

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Efecto de la etapa fenológica, las condiciones de cultivo y la
elicitación biológica sobre el perfil metabolómico de la raíz de *Heliopsis*
longipes”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. GABRIELA VICTORIA RUIZ CASTILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

CODIRIGIDA POR:

Dra. NURIA ESTURAU ESCOFET

QUERÉTARO
JULIO DE 2026
MÉXICO

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Efecto de la etapa de fenológica, las condiciones de cultivo y la elicitación biológica sobre el perfil metabólico de la raíz de *Heliopsis longipes*”.

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. GABRIELA VICTORIA RUIZ CASTILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA

CODIRIGIDA POR:

Dra. NURIA ESTURAU ESCOFET

COMITÉ TUTORAL

Dra. María Alejandra Rojas Molina

Presidente

Dr. Nuria Esturau Escofet

Secretario

Dr. Ixchel Parola Contreras

Vocal

Dr. César Ibarra Alvarado

Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Dr. José Santos Cruz
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

Dr. José Toledano Ayala
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Junio 2026

DEDICATORIA

A mis padres:

*Por esculpir con amor, paciencia y ejemplo la persona que hoy soy; por iluminar mi camino y protegerme de las sombras que nunca llegué a conocer
Con todo mi amor, gratitud y admiración.*

A la señora del mandil a cuadros:

Quien, con manos incansables y corazón de acero, crió hijos que la vida no le exigía. Una mujer de fe inquebrantable y valentía absoluta que nos enseñó que el amor es verdadero motor de la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la infraestructura y formación académica otorgada en mis estudios de doctorado.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) antes CONACyT, por la beca de manutención otorgada para mis estudios de doctorado.

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación, Vinculación y Extensión de la Universidad Autónoma de Querétaro (FONFIVE-UAQ) por el financiamiento otorgado a través del proyecto FQU202418.

A la convocatoria Nuevos Talentos Científicos y Tecnológicos (UAQ-CONCyTEQ), por el financiamiento otorgado a través del proyecto NTCT-2025FQU05.

Al Dr. Ramón Gerardo González Guevara por todo su apoyo, asesoría y acompañamiento durante mi experimentación en Campus Amazcala. Agradezco profundamente que, a pesar de sus múltiples actividades, siempre se dio el tiempo para resolver mis dudas y mantenerse al pendiente de mi avance. También hago el extenso a su equipo de trabajo y en especial al Dr. Adrián Ortega y al Dr. Luis Contreras, cuya calidez y disposición para apoyar fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

Al Dr. Pedro Vázquez Landaverde, por su valioso apoyo y total apertura para la conclusión de la última etapa de este proyecto. Agradezco profundamente su disposición y compromiso, lo cual fue determinante para culminar este trabajo con éxito. Muchas gracias por mantener siempre las puertas abiertas de su laboratorio.

Al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, por su infinita paciencia en la asesoría de los análisis quimiométricos y por estar siempre en la mejor disposición de ayudar. Agradezco profundamente su tiempo y entrega a este proyecto. Sin su apoyo, este trabajo no habría sido posible.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar una estancia de investigación. Su asesoría y guía fueron fundamentales

para el desarrollo y culminación de este proyecto. Asimismo, agradezco a su grupo de investigación por haberme acogido con gran profesionalismo. De manera muy especial, expreso mi gratitud a la Dra. Martha y al Dr. Pablo Aguilar, quienes me recibieron con los brazos abiertos y compartieron su conocimiento en un área que era totalmente desconocida para mí. Muchas gracias por su generosidad y apoyo.

A mi asesora, la Dra. Alejandra Rojas Molina, por su invaluable guía y, sobre todo, por la confianza que depositó en mí para el desarrollo de este proyecto. Mi más sincero agradecimiento por su paciencia infinita. Su exigencia académica y gran vocación científica no solo estructuraron este trabajo, sino que se convirtieron en la motivación que me impulsan a ser mejor cada día en el camino de la ciencia.

A los miembros del comité evaluador, por sus acertados cuestionamientos, revisiones y valiosas aportaciones, las cuales enriquecieron significativamente este proyecto. Agradezco profundamente el tiempo dedicado y su valioso compromiso en mi formación académica a lo largo de este doctorado.

A mi tutor, el Dr. Moustapha Bah, por su constante guía y acompañamiento a lo largo de estos seis años de maestría y doctorado. Gracias por contagiarme su pasión por la espectroscopia y por ser un pilar importante en mi formación. Mi más profunda admiración hacia su trabajo y su persona; usted ha sido un ejemplo por su calidad humana, así como por su integridad y rectitud en el camino de la ciencia.

Un agradecimiento muy especial a los estudiantes de servicio social que formaron parte de este camino doctoral: Juan Romero, Dora González, Gustavo Cantera, Aaron Romero, Dafne Flores, Alejandra Reyes, Liliana García, Frida Gámez, Daniel Martínez, Pamela Torres, Diego Valencia y Marcos Hernández. Su apoyo fue fundamental para realizar este proyecto. Gracias por enseñarme tanto.

A mis compañeros del posgrado y en especial a mi grupo de investigación: Beatriz Luz, Dailenys Marrero, Dora González, Juan Romero y Citlali García. Les agradezco su amistad y todo apoyo durante mi trayectoria académica.

A mis compañeros del posgrado y, en especial, a mi grupo de investigación: Beatriz Luz, Dailenys Marrero, Dora González, Juan Romero y Citlali García. Gracias por

compartir conmigo este camino, por las largas jornadas de laboratorio, los proyectos que parecían interminables y las risas que aligeraron los días difíciles. Su amistad hizo de esta etapa una experiencia mucho más llevadera.

A mis amigas Rebeca Rodríguez, Odette Flores, Diana López y Dulce Caraveo, quiénes me ofrecieron su amistad sincera y me permitieron entrar a su vida y a su familia. A quiénes siempre estuvieron en disposición de apoyarme en el invernadero, en la carretera o donde fuera necesario. Gracias por hacerme sentir en familia tan lejos de casa. Siempre recordaré todas nuestras versiones: fitness, fiesta, intelectual y científica. Gracias por siempre estar al pendiente de mí.

A todos mis amigos y de manera muy especial a Jazmín Soto, Nayelly Camargo, Judith Páez y Midory Rivera que, a pesar de la distancia, el tiempo y las dificultades siempre están presentes. Gracias por creer en mí, por apoyarme incondicionalmente y sobre todo por hacer que la distancia no signifique nada.

A mis papás, que no aparecen como autores de esta tesis, pero han estado detrás de cada página, sacrificando sueños, tiempo y comodidad para que yo pudiera seguir creciendo. Gracias por dar forma a la persona que hoy soy, por ser mi refugio en los días difíciles y mi impulso en cada logro. Por su amor incondicional, sus enseñanzas y por protegerme incluso de las sombras que nunca llegué a conocer. Este logro también les pertenece.

A mis hermanos, porque la vida fue amable al darme la oportunidad de compartirla con ustedes. Gracias por cada llamada, cada abrazo, y cada gesto de cariño que me acompañó durante este camino. Gracias por estar presentes de tantas maneras.

A mi familia, por ser el lugar al que siempre puedo volver. Gracias por tanto amor y por recordarme en cada etapa de mi vida que nunca he estado sola. Este logro también refleja el cariño y la fortaleza que he encontrado en ustedes.

Y a quienes sin esperar nada a cambio me compartieron un poco de su conocimiento, me compartieron un taco y me regalaron un pedacito de su vida.

Sé cómo el agua: fluye, adapta tu curso y encuentra tu camino

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

M en C. Gabriela Victoria Ruiz Castillo

ÍNDICE

Contenido.....	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	xv
RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
II. ANTECEDENTES.....	4
II.1. Medicina Tradicional.....	5
II.2. Biodiversidad vegetal en México.....	5
II.3. Familia Asteraceae.....	6
II.4. Género <i>Heliopsis</i>	6
II.5. <i>Heliopsis longipes</i>	7
II.5.1. Estudios farmacológicos de <i>H. longipes</i>	9
II.5.2. Composición química de <i>H. longipes</i>	10
II.5.3. Importancia farmacológica de la afinina.....	11
II.5.4. Fuente de obtención de la afinina.....	13
II.6. Mecanismos adaptativos de defensa de las plantas ante los factores de estrés ambiental.....	14
II.7. Influencia de la etapa fenológica sobre el perfil químico de las especies vegetales.....	15
II.8. Influencia de las condiciones ambientales en el perfil químico de las especies vegetales.....	18
II.9. Inducción de mecanismos de defensa en las plantas a través de elicitores.....	21
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
V. HIPÓTESIS.....	27
VI. OBJETIVOS.....	28
VI.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
VI.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
VII.1. Recolección del material vegetal.....	30
VII.2. Germinación de semillas de <i>H. longipes</i>	30

VII.3. Aclimatación de ejemplares de <i>H. longipes</i> en condiciones silvestres y de invernadero.....	30
VII.4. Identificación de las etapas fenológicas de <i>H. longipes</i>	31
VII.5. Parámetros morfológicos de los ejemplares de <i>H. longipes</i> ...	31
VII.6. Obtención de extractos orgánicos a partir de la raíz de <i>H. longipes</i>	31
VII.7. Análisis metabólico de los extractos de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i> mediante Resonancia Magnética Nuclear Protónica	32
VII.8. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano de ejemplares silvestres por Cromatografía en Columna Abierta.....	33
VII.9. Purificación por Cromatografía en Capa Fina preparativa.....	34
VII.10. Purificación por Cromatografía Líquida de alta-resolución preparativa acoplado a un detector de matriz de Fotodiodos.....	34
VII.11. Elucidación estructural e identificación de los compuestos purificados por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.....	34
VII.12. Cuantificación de la afinina mediante Cromatografía Líquida de alta-resolución acoplada a un detector de matriz de Fotodiodos...	35
VII.13. Análisis de los extractos de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i> mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	35
VII.14. Actividad enzimática de la Valina descarboxilasa por Espectrofotometría UV-Vis.....	36
VII.15. Determinación del efecto vasodilatador de los extractos de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i> mediante el ensayo de aorta aislada de rata.....	36
VII.16. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales presentes en los extractos metanólicos de la raíz de <i>H. longipes</i> por Espectrofotometría UV-Vis.....	37
VII.17. Elicitación biológica de ejemplares cultivados en condiciones de invernadero.....	37
VII.18. Análisis estadístico.....	38
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
VIII.1. Condiciones experimentales de cultivo.....	39
VIII.2. Identificación de las etapas fenológicas.....	42
VIII.3. Parámetros morfológicos.....	45
VIII.4. Análisis metabólico por ¹ H-RMN.....	46

VIII.5. Obtención del extracto de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i> y su fraccionamiento cromatográfico por CCA.....	56
VIII.6. Análisis cromatográfico del grupo F104 mediante CCF prep...	58
VIII.7. Análisis cromatográfico del grupo F384 mediante CCF y HPLC-DAD.....	60
VII.8. Elucidación estructural de los compuestos purificados.....	66
VIII.8.1. Identificación del compuesto 2B.....	66
VIII.8.2. Identificación del compuesto correspondiente al pico 1 del grupo F384.....	68
VIII.8.3. Identificación del compuesto correspondiente al pico 2 del grupo F384.....	74
VIII.8.4. Identificación del compuesto correspondiente al pico 3 del grupo F384.....	76
VIII.8.5. Identificación del compuesto correspondiente al pico 4 del grupo F384.....	77
VIII.8.6. Identificación del compuesto correspondiente al pico 5 del grupo F384.....	80
VIII.8.7. Identificación del compuesto correspondiente al pico 6 del grupo F384.....	81
VIII.8.8. Identificación del compuesto correspondiente al pico 7 del grupo F384.....	83
VIII.9. Cuantificación de afinina.....	86
VIII.10. Análisis por compuestos semivolátiles por CG-EM.....	90
VIII.11. Actividad de la valina descarboxilasa.....	94
VIII.12. Efecto vasodilatador de los extractos de diclorometano de la raíz de <i>H. longipes</i>	96
VIII.13. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	101
VIII.14. Análisis químico del EHI.....	103
VIII.15. Efecto de la elicitación biológica sobre la morfología de los ejemplares de <i>H. longipes</i>	105
VIII.15. Cuantificación de afinina en los ejemplares elicitados.....	115
VIII.16. Análisis de los compuestos semivolátiles de los ejemplares elicitados por CG-EM.....	117
VIII.16.1. Perfil de ácidos grasos de los ejemplares elicitados.	128
VIII.16.2. Perfil de alcanidas de los ejemplares elicitados.....	133
VIII.16.3. Perfil de terpenos de los ejemplares elicitados.....	140
IX. CONCLUSIONES.....	151
X. BIBLIOGRAFÍA.....	153
XI. ANEXOS.....	169

i. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localidades mexicanas con inventarios florísticos que corresponden a 378.886 km ² que representan el 19.2 % del territorio mexicano.	5
2	Distribución comercial conocida de <i>Heliopsis longipes</i> .	9
3	Clasificación de elicitores considerando su origen.	22
4	Variación estacional de la temperatura máxima, mínima y promedio registrada en un termohigrómetro digital en A) CI y B) los datos meteorológicos registrados en CS obtenidos de smn.conagua.gob.mx. Los valores correspondientes a la media $\pm$ EEM ($n=6$).	42
5	Etapas fenológicas identificadas en los ejemplares de <i>H. longipes</i> aclimatados en CS y CI. A) Etapa vegetativa (prefloración), B) etapa de floración (formación de botones florales), C) etapa de fructificación (desarrollo de achenios y semillas) y D) etapa de defoliación (pérdida parcial o total de hojas).	45
6	Parámetros morfológicos de los ejemplares cultivados CS y CI en diferentes etapas fenológicas: (A altura del tallo y (B longitud de la raíz. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).	46
7	Parámetros morfológicos de los ejemplares cultivados en CS y CI en diferentes etapas fenológicas: (A peso del espécimen y (B peso de la raíz. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0.05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un	47

ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

- | | | |
|----|--|----|
| 8 | Espectros representativos de ^1H -RMN de extractos de diclorometano de raíces de <i>H. longipes</i> correspondientes a diferentes etapas fenológicas: A y D) etapa vegetativa; B y E) floración; C y F) fructificación; y G) defoliación. Los espectros mostrados corresponden a plantas en CS (A–C) y en CI (D–G). | 50 |
| 9 | Análisis multivariado de los extractos de diclorometano de muestras de <i>H. longipes</i> cultivadas en CI en diferentes etapas fenológicas: A) Gráfico de puntuación PCA y B) Gráfico de puntuación OPLS-DA. Los extractos se codificaron por colores considerando la etapa fenológica, con seis réplicas biológicas por grupo: vegetativa (amarillo), floración (azul), fructificación (rojo) y defoliación (verde). | 53 |
| 10 | Gráficos de puntuación OPLS-DA que ilustran la discriminación metabólica en las distintas etapas fenológicas: A) vegetativa frente a floración y B) floración frente a fructificación. Las muestras se codificaron por colores considerando las etapas fenológicas ($n=6$). | 54 |
| 11 | Análisis cromatográfico de la fracción F104 en CCF A) analítica y B) preparativa revelada con <i>p</i> -anisaldehído y luz Uv a 254 nm, respectivamente. Sistema de elución de hexano/diclorometano en una proporción 1:1. | 58 |
| 12 | Análisis cromatográfico por CCF A) uni y B) bidimensional de las franjas recuperadas por CCF prep: A) franjas recuperadas y franjas mayoritarias, B) compuesto 1A y C) compuesto 2B revelada con <i>p</i> -anisaldehído. Sistema de elución de hexano/acetato de etilo en una proporción 6:4. | 59 |
| 13 | Análisis cromatográfico por CCF A) uni y B) bidimensional de del grupo F384 y C) su comparación con afinina reveladas con luz Uv a 254 nm y <i>p</i> -anisaldehído. Sistema de elución de hexano/acetato de etilo en una proporción 6:4. | 60 |
| 14 | Cromatograma analítico del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.12. | 62 |

15	Cromatograma analítico del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). A y B) enriquecimiento del grupo F384 con afinina y C y D) $\lambda_{\text{máx}}$ del grupo y de la afinina. Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.12.	62
16	Cromatograma preparativo por HPLC-DAD del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.9.	63
17	Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 2B purificado por CCF prep (CDCl_3 , 175 MHz).	66
18	Espectro de ^1H -RMN del compuesto purificado por CCF prep (CDCl_3 , 700 MHz).	67
19	Estructuras químicas de los compuestos purificados a partir del extracto de diclorometano de <i>H. longipes</i> caracterizadas mediante RMN. A) Acetato de lupeol; B) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida; C) <i>N</i> -isobutildeca-3(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida; D) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),4(<i>E</i>)-dien-8,10-diínamida; E) afinina (<i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),6(<i>Z</i>),8(<i>E</i>)-trienamida); y F) homoespilantol (<i>N</i> -(2-metilbutil)deca-2(<i>E</i>),6(<i>Z</i>),8(<i>E</i>)-trienamida).	85
20	Efecto de las condiciones de cultivo y la etapa fenológica en la concentración de afinina en la raíz de <i>H. longipes</i> . Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0.005$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre los estadios fenológicos. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).	87
21	Cromatogramas representativos del perfil de las alcanidas presentes en <i>H. longipes</i> cultivadas en CS y CI en diferentes etapas fenológicas obtenidos mediante HPLC-DAD ($\lambda=236$ nm). Los picos cromatográficos se identifican de la siguiente manera: Picos: 1) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida y <i>N</i> -isobutildeca-3(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida, 2) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),4(<i>E</i>)-dien-8,10-diínamida, 3) desconocido, 4) isómero de afinina, 5) afinina, 6) isómero de afinina, 7) homoespilantol y 8) desconocido.	89

22	Mapa de calor (<i>heatmap</i>) de la abundancia relativa de las principales familias de metabolitos en la raíz de <i>H. longipes</i> . Las filas representan los extractos de las diferentes etapas fenológicas bajo las dos condiciones de cultivo: silvestre (SIL) e invernadero (INV). Las columnas corresponden a la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados por CG-EM. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (<i>Z-score</i>), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.	90
23	Efecto de las condiciones de cultivo y la etapa fenológica sobre la actividad de la valina descarboxilasa. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).	89
24	Curvas de concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por extractos de raíces de ejemplares de <i>H. longipes</i> cultivados en A) CS y de B) CI en diferentes etapas fenológicas ($n=5$). Las respuestas se registraron en anillos aórticos aislados de rata con endotelio funcional.	94
25	Curvas de concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por los compuestos identificados en <i>H. longipes</i> ($n=5$). Las respuestas se registraron en anillos aórticos aislados de rata con endotelio funcional.	97
26	Cuantificación de A) compuestos fenólicos y B) flavonoides totales en ejemplares de <i>H. longipes</i> cultivados en CS y CI en diferentes etapas fenológicas. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=3$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0.05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se	100

evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

- 27 Altura del tallo de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). 102
- 28 Longitud de raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). 105
- 29 Peso total de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). 106
- 30 Peso total de la raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). 107
- 31 Peso de la raíz principal de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). 108

32	Número de acodos formados por ejemplar posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).	109
33	Ejemplares representativos del aspecto morfológico de <i>H. longipes</i> posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos.	110
34	Contenido de afinina de la raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples Tuckey ($p < 0.05$).	111
35	Cromatogramas representativos del perfil de las alcanidas presentes en <i>H. longipes</i> cultivadas en CI en diferentes tratamientos durante A) 3 y B) 6 meses, obtenidos mediante HPLC-DAD ($\lambda=236$ nm). Los picos cromatográficos se identifican de la siguiente manera: Picos: 1) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida y <i>N</i> -isobutildeca-3(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida, 2) <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),4(<i>E</i>)-dien-8,10-diínamida, 3) desconocido, 4) isómero de afinina, 5) afinina, 6) isómero de afinina, 7) homoespilantol y 8) desconocido.	115
36	Mapa de calor (<i>heatmap</i>) de la abundancia relativa de las principales familias de metabolitos en la raíz de ejemplares de <i>H. longipes</i> elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación <i>Z</i> (<i>Z-score</i>), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.	116
37	Mapa de calor (<i>heatmap</i>) de la abundancia relativa de ácidos grasos presentes en la raíz de ejemplares de <i>H. longipes</i> elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la	118

clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (*Z-score*), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

- | | | |
|----|---|-----|
| 38 | <p>Mapa de calor (<i>heatmap</i>) de la abundancia relativa de alcamidas presentes en la raíz de ejemplares de <i>H. longipes</i> elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (<i>Z-score</i>), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.</p> | 128 |
| 39 | <p>Mapa de calor (<i>heatmap</i>) de la abundancia relativa de terpenos presentes en la raíz de ejemplares de <i>H. longipes</i> elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (<i>Z-score</i>), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.</p> | 134 |

ii. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación y etiquetado de productos químicos del Sistema Globalmente Armonizado.	12
2	Caracterización edafológica de los sustratos utilizados en CS y CI.	40
3	Fracciones obtenidas y el sistema de elución utilizado en CCA.	57
4	Rendimiento obtenido de las franjas obtenidas por CCF prep del grupo F104.	59
5	Rendimiento de los compuestos purificados del grupo F384 por HPLC-DAD prep.	64
6	Los cromatogramas y las $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos purificados por HPLC-DAD prep.	65
7	Comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 2B del grupo F104 con los reportados para el acetato de lupeol.	68
8	Comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del pico 1 del grupo F384 con los reportado para <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida.	71
9	Comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del pico 2 del grupo F384 con los reportado para <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),4(<i>E</i>)-dien-8,10-diínamida.	75
10	Comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del pico 4 del grupo F384 con lo reportado para la afinina.	79
11	Comparación de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C del pico 6 del grupo F384 con lo reportado para el homoespilantol.	82
12	Efecto vasodilatador inducido por extractos de raíz de <i>H. longipes</i> sobre la aorta de rata pre-contraída con L-fenilefrina con endotelio funcional.	98

13	Efecto vasodilatador reportado de los compuestos identificados en los extractos de diclorometano de <i>H. longipes</i> sobre anillos de aorta de rata con endotelio funcional.	101
14	Perfil fitoquímico semivolátil no polar por CG-EM del EHL.	104

iii. LISTA DE ACRÓNIMOS

¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear protónica
¹³C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
ACh	Acetil colina
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
Ás	Ácido salicílico
BK_{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BPA	Bisfenol A
Brd	Doblete ancho
Brs	Singulete ancho
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCF prep	Cromatografía en Capa Fina preparativa
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CE₅₀	Concentración Efectiva Media
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CI	Condiciones de invernadero
CO	Monóxido de carbono
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear
CS	Condiciones silvestres
d	Doblete
DBP	di- <i>n</i> -butil ftalato

dd	Doblete de dobles
ddd	Doblete de dobles de dobles
dddd	Doble de dobles de dobles de dobles
dddt	Doblete de dobles de dobles tripletes
ddp	Doblete de dobles de pentetes
DL₅₀	Dosis Letal Media
dq	Dobletes cuartetos
dt	Dobletes de tripletes
dtd	Doblete de tripletes de dobles
eCB	Receptor Cannabinoide Endotelial
EEM	Error estándar de la media
EHl	Extracto etanólico de la raíz de <i>H. Longipes</i>
E_{máx}	Efecto máximo
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
GRPc	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples enlaces
HNO	Nitroxilo
HPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Detector de fotodiodos
HPLC-DAD prep	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Detector de fotodiodos preparativo
HSQC	Correlación heteronuclear a un solo enlace

J	Constante de acoplamiento
K_{ATP}	Canales de Potasio dependientes de ATP
m	Multiplete
MeJA	Metil-jasmonato
MEP	Vía del metileritritol fosfato
MVA	Vía del mevalonato
NO	Óxido Nítrico
OPLS-DA	Análisis Discriminante de Proyecciones Ortogonales en Estructuras Latentes
PBT	Tereftalato de polibutileno
PCA	Análisis de Componentes Principales
Per	Peróxido de hidrógeno
PGI₂	Prostaglandina 2
ppm	Partes por millón
PVAc	Acetato de polivinilo
q	Cuarteto
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Singulete
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SMIRs	Respuestas morfogénicas inducidas por estrés
t	Triplete
TMS	Tetrametil silano
TOCSY	Espectroscopia de correlación total
TR	Tiempo de retención

TRPA₁	Receptor de Potencial Transitorio tipo Anquirina 1
TRPAV1	Receptor de Potencial Transitorio tipo Vanilloide 1
VDC	Valina Descarboxilasa
λ	Longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud máxima de adsorción

RESUMEN

Heliopsis longipes es una planta perenne endémica de la Sierra Gorda de México cuya raíz posee un alto valor culinario, insecticida y medicinal debido a sus efectos antimicrobianos, analgésicos y antihipertensivos. Estas propiedades se atribuyen principalmente a la afinina, una alcalamida de gran relevancia económica con amplias aplicaciones industriales. Actualmente, las principales fuentes de obtención de este metabolito, como la síntesis química y su purificación a partir de *Acmella oleracea*, presentan rendimientos limitados y costos elevados. En contraste, la raíz de *H. longipes* contiene aproximadamente 40 % de afinina, por lo que constituye una fuente natural particularmente valiosa. Sin embargo, hasta el momento se desconocían las variaciones de su perfil metabolómico a lo largo del desarrollo fenológico, así como la influencia de la elicitación biológica sobre la producción de biomasa y metabolitos especializados.

En la presente investigación se evaluó la influencia de la etapa fenológica, las condiciones de cultivo y la adición de elicitors biológicos sobre la biomasa y el perfil metabolómico de la raíz de *H. longipes*. Para ello, se caracterizaron extractos de diclorometano mediante Resonancia Magnética Nuclear Protónica (¹H-RMN) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), complementadas con estudios fitoquímicos, enzimáticos y farmacológicos. El estudio fitoquímico realizado permitió purificar e identificar por primera vez en esta especie tres alcalamidas de naturaleza acetilénica: *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida, *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida y *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida, ampliando significativamente el conocimiento fitoquímico de la especie. Asimismo, se demostró que la aclimatación en invernadero incrementó significativamente la biomasa radicular y la concentración de alcalamidas en comparación con las poblaciones silvestres. En contraste, no se observó una correlación directa entre la acumulación de afinina y la actividad de la enzima valina descarboxilasa, lo que sugiere la participación de mecanismos regulatorios adicionales en su biosíntesis.

La integración de los análisis morfológicos, metabolómicos y farmacológicos demostró que la etapa de fructificación constituye la condición óptima de cosecha, al coincidir con la mayor acumulación de biomasa, las concentraciones más elevadas de afinina y una alta eficacia vasodilatadora de los extractos radiculares. Adicionalmente, la afinina y la (+)-sesamina se perfilaron como los candidatos más relevantes a marcadores farmacológicos para futuros estudios de validación dirigida. Asimismo, la mayor potencia observada en los extractos de la etapa vegetativa, a pesar de presentar menores concentraciones de afinina, sugiere que la actividad biológica de la especie no depende exclusivamente de este metabolito y que podrían existir interacciones aditivas o sinérgicas con otros componentes de la matriz química.

Respecto a la elicitación biológica, se demostró que el tratamiento durante seis meses con extracto de raíz de la propia especie estimuló significativamente la formación de acodos; el peróxido de hidrógeno favoreció el incremento de la biomasa radicular; mientras que el metil jasmonato promovió la mayor acumulación de afinina. Estos resultados evidencian que la respuesta de *H. longipes* a la elicitación depende tanto de la naturaleza del estímulo como del tiempo de exposición y que es posible modular de manera dirigida el crecimiento y la composición química de la especie.

En conjunto, los hallazgos de esta investigación aportan herramientas relevantes para el aprovechamiento sostenible y la producción controlada de *H. longipes*. Desde una perspectiva agrícola, el establecimiento del cultivo en invernadero y la cosecha durante la etapa de fructificación permiten optimizar el rendimiento de biomasa y el aprovechamiento estacional de la especie. Desde el punto de vista biotecnológico y farmacológico, el uso estratégico de elicitors ofrece una alternativa para modular la producción de afinina y otros metabolitos especializados, contribuyendo a la estandarización de materias primas y extractos con perfiles químicos definidos para el desarrollo de productos derivados de esta especie y de su principal metabolito bioactivo.

Palabras clave: *Heliopsis longipes*, afinina, metabolómica, etapa fenológica, elicitación biológica, actividad vasodilatadora.

ABSTRACT

Heliopsis longipes is a perennial plant endemic to the Sierra Gorda region of Mexico. The roots of this species possess high culinary, insecticidal, and medicinal value due to their antimicrobial, analgesic, and antihypertensive properties, respectively. These biological activities have been mainly attributed to affinin, an alkamide of considerable economic importance with broad industrial applications. Currently, the main sources of affinin, including chemical synthesis and purification from *Acmella oleracea*, are associated with limited yields and high production costs. In contrast, the roots of *H. longipes* contain approximately 40 % affinin, making this species a particularly valuable natural source of this bioactive compound. However, little was known about the metabolomic variation of the roots throughout plant development or about the influence of biological elicitation on biomass production and specialized metabolism.

Therefore, the present study evaluated the influence of phenological stage, cultivation conditions, and biological elicitation on root biomass and metabolomic profile in *H. longipes*. Dichloromethane root extracts were characterized by Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), complemented with phytochemical, enzymatic, and pharmacological analyses.

The phytochemical investigation enabled the purification and first identification in this species of three acetylenic alkamides: *N*-isobutyldeca-2(*E*)-en-8,10-diynamide, *N*-isobutyldeca-3(*E*)-en-8,10-diynamide y *N*-isobutyldeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diynamide, substantially expanding the phytochemical knowledge of *H. longipes*. In addition, greenhouse acclimatization significantly increased root biomass and alkamide accumulation compared with wild populations. In contrast, no direct correlation was observed between affinin accumulation and valine decarboxylase activity, suggesting the involvement of additional regulatory mechanisms in affinin biosynthesis.

The integration of morphological, metabolomic, and pharmacological analyses demonstrated that the fruiting stage represents the optimal harvest period, as it coincided with maximum biomass accumulation, the highest affinin concentrations, and high vasodilatory efficacy of root extracts. Furthermore, affinin and (+)-sesamin emerged as the most promising candidate pharmacological markers for future targeted validation studies. Interestingly, the greater vasodilatory potency observed in vegetative-stage extracts, despite their lower affinin content, suggests that the biological activity of *H. longipes* is not exclusively dependent on this metabolite and that additive or synergistic interactions with other constituents of the phytochemical matrix may occur.

Regarding biological elicitation, six-month treatment with root extract from the same species significantly stimulated layer formation, hydrogen peroxide promoted root biomass accumulation, and methyl jasmonate induced the highest affinin concentrations. These findings demonstrate that the response of *H. longipes* to elicitation depends on both the nature of the stimulus and the duration of exposure, making it possible to modulate plant growth and chemical composition in a directed manner.

Overall, the findings of this study provide valuable tools for the sustainable utilization and controlled production of *H. longipes*. From an agricultural perspective, greenhouse cultivation combined with harvesting during the fruiting stage optimizes biomass yield and seasonal exploitation of the species. From a biotechnological and pharmacological standpoint, the strategic use of elicitors offers an effective approach for modulating affinin production and specialized metabolism, contributing to the standardization of raw materials and extracts with defined chemical profiles for the development of products derived from this species and its principal bioactive metabolite.

Keywords: *Heliopsis longipes*; affinin; metabolomics; phenological stage; biological elicitation; vasodilatory activity.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han desempeñado un papel esencial en el mantenimiento de la salud del ser humano y han demostrado ser una terapia eficaz, segura y de bajo costo (Liu *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2020). En la actualidad, las plantas medicinales continúan siendo un importante recurso para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud, principalmente en aquellas poblaciones en las que no existe un fácil acceso a los sistemas de salud pública. Adicionalmente, las plantas han sido una fuente muy valiosa de novedosas entidades químicas para el desarrollo de nuevos fármacos (Newman y Cragg, 2020). Entre los factores que han obstaculizado la integración completa de las plantas medicinales en los sistemas de salud convencionales, se encuentran la gran complejidad de su composición química y la variabilidad en el contenido de sus metabolitos, dependiendo de diferentes factores ambientales y de su etapa de desarrollo (Yang *et al.* 2018; Liu *et al.* 2018).

La familia Asteraceae constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares que existe sobre el planeta y cuenta con una alta representación en México; muchas especies vegetales pertenecientes a esta familia son ampliamente utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana (Bessada *et al.* 2015; Villaseñor, 2018). Algunos géneros pertenecientes a esta familia, entre los que se incluyen *Acmella*, *Achillea*, *Wedelia*, *Equinaceae* y *Heliopsis*, se caracterizan por la acumulación de alcaloides en sus raíces, en particular las especies *A. oleracea* y *H. longipes* (Molina-Torres *et al.* 2001; Buitimea-Cantúa *et al.* 2020).

H. longipes es una planta perenne de gran importancia económica, ya que su raíz es ampliamente utilizada con fines culinarios, insecticidas y medicinales. Se han realizados diversos estudios científicos dirigidos a validar el uso de esta raíz. En este sentido, se ha comprobado que extractos obtenidos a partir de la raíz de *H. longipes* inducen efecto: analgésico (Cariño-Cortés *et al.* 2010; Cilia-López *et al.* 2010;), antinociceptivo (Luz-Martínez *et al.* 2025), antimicrobiano (Gutiérrez-Lugo *et al.* 1996; Molina-Torres *et al.* 2004) e insecticida (Hernández-Morales *et al.* 2012; Beltrán *et al.* 2015). Adicionalmente, se ha demostrado que los extractos de la raíz

de *H. longipes* presentan actividad antiinflamatoria (Hernández, 2009) y vasodilatadora (Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021) y antihipertensiva (Luz-Martínez *et al.* 2024; Marrero-Morfa *et al.* 2025).

Históricamente, los estudios químicos realizados en extractos orgánicos de *H. longipes*, se han enfocado en la raíz, mientras que las partes aéreas de esta especie permanecen poco exploradas. Frente a este sub-aprovechamiento, nuestro grupo de investigación se ha enfocado al estudio de las partes aéreas de esta especie, logrando identificar algunos compuestos fenólicos (Parola-Contreras *et al.* 2021) y otras moléculas de interés como la (+)-sesamina y el γ -eudesmol, (+)-Rosifoliol, asarinina y el γ -sitosterol las cuales presentan un prometedor potencial con efectos cardiovasculares (Romero-Tovar *et al.* 2025). Con respecto a la raíz, se han identificado abundantes terpenos y alcanidas (Aguilar *et al.* 2016; Ruiz Castillo *et al.* 2021). La afinina o espilantol, es la alcanida que se encuentra en mayor proporción (alrededor del 45 %) y se considera como el principal compuesto responsable de los efectos farmacológicos demostrados en extractos orgánicos de esta raíz (García-Chávez *et al.* 2004; Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021). Considerando las características fisicoquímicas y los efectos biológicos de la afinina, se han elaborado una amplia variedad de productos de higiene, analgésicos y antienviejecimiento a base de esta molécula y de extractos de plantas que la contienen (Silveira *et al.* 2018; Rondanelli *et al.* 2020).

La afinina es un compuesto de importancia en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia y actualmente, su precio por 10 mg oscila entre los 6,000.00 y 10,000.00 M.N. (Chromadex®) (Barbosa *et al.* 2016; Silveira *et al.* 2018). El elevado costo de este compuesto se debe a que, en la actualidad, los métodos para su obtención, ya sea por síntesis química o por purificación a partir de *Acmella oleracea*, proporcionan bajos rendimientos (aproximadamente un 60 %) (Ikeda *et al.* 1984; Barbosa *et al.* 2016; Rondanelli *et al.* 2020).

Considerando la alta concentración de afinina que posee la raíz de *H. longipes*, esta especie vegetal constituye un candidato idóneo para la extracción y purificación de esta alcanida. A pesar de los diferentes estudios químicos y farmacológicos

realizados sobre la raíz de *H. longipes*, a la fecha no se conoce la variación en su perfil químico durante las diferentes etapas de desarrollo de la planta, ni tampoco la influencia de las condiciones de cultivo y el empleo de elicitores biológicos sobre el perfil metabolómico de esta raíz. La comprensión del perfil metabolómico durante las etapas de crecimiento de esta especie vegetal, en condiciones normales y en procesos de adaptación bajo condiciones de estrés, permitirá, por una parte, establecer estrategias de cultivo idóneas para su preservación, propagación y mejoramiento y por otra, establecer los criterios de selección en el momento más apropiado para la recolección y el aprovechamiento de los ejemplares con mayor rendimiento y de manera más sustentable. De tal forma que, el objetivo de la presente disertación doctoral es determinar, mediante un análisis metabolómico, la influencia de la etapa fenológica y la adición de elicitores (ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, metil-jasmonato y el extracto de la raíz de esta especie) sobre el perfil químico de esta raíz.

II. ANTECEDENTES

II.1. Medicina Tradicional

La utilización de las plantas con fines medicinales ha desempeñado un papel esencial en el mantenimiento de la salud del ser humano desde su aparición en nuestro planeta y esto ha tenido un significativo impacto positivo en el progreso de la civilización. Las plantas medicinales han demostrado ser una terapia eficaz, segura y de bajo costo en la prevención y el tratamiento de las enfermedades humanas (Liu *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2020).

En la actualidad, las plantas no solo satisfacen las necesidades de atención primaria de salud en la mayoría de los países en desarrollo, sino también han proporcionado las fuentes primarias para el desarrollo de nuevos fármacos desde 1940 (Newman y Cragg, 2020). Los productos naturales obtenidos a partir de las plantas medicinales presentan una gran ventaja en comparación con las moléculas sintéticas. Esto es debido a que la naturaleza da origen a moléculas pequeñas que son capaces de modular la función de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) y de interactuar con estructuras biológicas específicas como enzimas, receptores, etc. Así mismo, los productos naturales al ser producidos por organismos vivos desempeñan una función sobre el mismo organismo o sobre otros organismos, lo que les permite atravesar fácilmente las membranas biológicas y por consecuencia, poseer propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas importantes que, a su vez, permiten el desarrollo de medicamentos con alta especificidad a blancos endógenos (Ferro, 2015; Drasar *et al.* 2020).

Sin embargo, una de las desventajas ampliamente discutidas de las plantas medicinales, es su composición química compleja y altamente variable en cuanto al tipo y cantidad de metabolitos y, por lo tanto, de sus efectos biológicos. Esto ha representado un problema para la integración de la medicina tradicional a las prácticas médicas convencionales (Yang *et al.* 2018; Liu *et al.* 2018).

II.2. Biodiversidad vegetal en México

México es considerado como una región de gran interés por la diversidad de sus recursos naturales, en especial por su riqueza florística (Figura 1). Se encuentra dentro de los cinco países con mayor diversidad vegetal en el mundo con 27,322 especies de plantas vasculares distribuidas en su territorio y solo el 19.2 % de su superficie ha sido estudiada (SEMARNAT, 2016; Villaseñor, 2016).

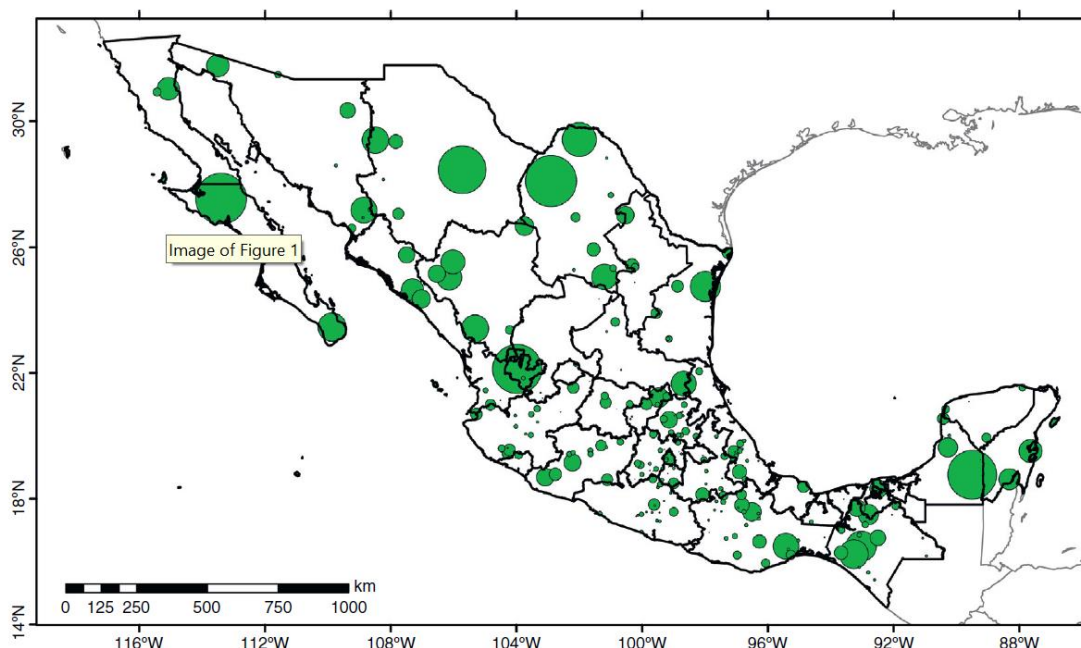


Figura 1. Localidades mexicanas con inventarios florísticos que corresponde a 378.886 km² que representan el 19.2 % del territorio mexicano (Villaseñor, 2016).

México no solo es reconocido mundialmente por su diversidad de especies de plantas, sino también, por su alto porcentaje de especies endémicas, ya que del 50 al 60 % de las especies de plantas distribuidas en el territorio nacional son endémicas de nuestro país (Villaseñor, 2016). El número estimado de plantas utilizadas en México con fines medicinales es de 5,000 especies, que representan el 18.3 % de la flora total mexicana. Éstas, en forma silvestre, se continúan utilizando por 60 grupos étnicos. En tanto que, el resto de la población, las emplea mediante productos elaborados a base de éstas (Chávez *et al.* 2017).

II.3. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial. Constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta, con una alta representación en el territorio mexicano. Es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats, su riqueza a nivel mundial se estima en 1,600 géneros y 23,000 especies y México registra 417 géneros y 3,113 especies, de las cuales 3,050 son especies nativas y 1,988 (63.9 %) son endémicas del territorio nacional (Bessada *et al.* 2015; Villaseñor, 2018).

En cuanto a su composición química, las plantas de esta familia se caracterizan por la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides (Burlec *et al.* 2017), diterpenos (Chagas-Paula *et al.* 2015), cumarinas, derivados del ácido clorogénico (Bessada *et al.* 2015) y lactonas sesquiterpénicas (Ruiz-Reyes y Suárez, 2015). Algunos géneros pertenecientes a esta familia, se caracterizan por la acumulación de alcanoides en las raíces, entre éstos destacan los géneros *Acmella*, *Achillea*, *Wedelia*, *Equinaceae* y *Heliopsis*, particularmente en las especies *A. oleracea* y *H. longipes* (Molina-Torres *et al.* 2001; Buitimea-Cantúa *et al.* 2020).

II.4. Género *Heliopsis*

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Asteraceae; fue descrito en 1807 por C.H. Persoon y posteriormente por Fisher (1945) y Turner (1987). Este género es nativo del continente americano y se distribuye en el hemisferio occidental, desde el oriente de los Estados Unidos hasta Bolivia. El clima en el que se desarrolla es variado e incluye regiones áridas, húmedas, cálidas y templadas (Cilia-López *et al.* 2008; 2013).

Heliopsis es un género de plantas herbáceas perennes, con 32 especies, de las cuales 11 son endémicas de México (*H. anomala* B.L., *H. annua* Hemsl., *H. brachactis* Standl., *H. filifolia* S.Watson, *H. longipes* S.F. Blake, *H. novogaliciana* B.L. Turner, *H. parviceps* S.F. Blake, *H. procumbens* Hemsl., *H. rubra* Fisher, *H. sinaloensis* B.L. Turner y *H. sufruticosa*) (García-Chávez *et al.* 2004).

Las plantas del género *Heliopsis* se caracterizan por sintetizar y acumular lactonas sesquiterpénicas y una gran cantidad de alcanoides en sus raíces. Sin embargo, su uso se ve restringido a solo dos especies. *H. helianthoides*, la cual se comercializa en Estados Unidos como flor de ornato en la jardinería como “falso girasol” y *H. longipes*, que posee diversas aplicaciones en México y una larga tradición herbolaria indígena (García-Chávez *et al.* 2004; Buitimea-Cantúa *et al.* 2020).

H. longipes ha sido empleada en la Medicina Tradicional Mexicana desde la época colonial temprana y ha sido registrada bajo diversos nombres como, por ejemplo: “inchcha” en la obra de Francisco Hernández de “*De historia plantarum Novae Hispanie*”, y como “pelitre” (extractos) en la obra de Francisco Hernández titulada “*Quatro libros de la natvraleza*”. Adicionalmente, existen registros del empleo del “pelitre de África” por sus propiedades insecticidas en el libro “*curso e historia de drogas*” en 1902 (García-Chávez *et al.* 2004). *H. longipes* también fue utilizada durante la segunda guerra mundial (en extractos) ya que las raíces presentaban actividad paralítica y toxicidad contra moscas y otros insectos; éstos representan algunos de los ejemplos que ponen en evidencia que *H. longipes* es la especie con mayor importancia económica dentro de su género, debido a su empleo culinario, insecticida y medicinal durante cientos de años (Castro-Ruiz, *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021).

II.5. *Heliopsis longipes*

Heliopsis longipes es una planta perenne microendémica de la sierra de Álvarez y de la sierra Gorda (21°50' al norte, 20°55' al sur, 99°37' al este y 100°25' al oeste en cañones escarpados) región de confluencia entre los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro (Cilia-López *et al.* 2013; Abugannam *et al.* 2019).

La distribución geográfica silvestre de esta planta abarca, los municipios de Rioverde, San Luis Potosí y San Luis de la Paz, Guanajuato (Cilia-López *et al.* 2008). En el municipio de Rioverde (SLP), destacan las localidades de: Las Márgaras, El pescadito, Cuchill Alta, Las Albercas, La Alameda, Cerro del Terán,

Rincón de los Jabalines, la Caña y Huertitas, en el municipio de Xichú (GTO), el rancho de Beltrán y el Ocotero y en el municipio de Arroyo Seco (QRO) las localidades de Concá y San Buenaventura (Figura 2) (Cilia-López *et al.* 2013; Abugannam *et al.* 2019; Parola-Contreras *et al.* 2020).

El clima de las regiones en las que crece *H. longipes* es semicálido y subhúmedo tipo C, con lluvias en verano y una temperatura media anual de 18°C y 700 mm de precipitación anual media. Esta ubicación exhibe una época húmeda (junio a septiembre), seca-fría (octubre a febrero) y seca-cálida (marzo a mayo). El 75 % de las poblaciones de *H. longipes* se localizan sobre sustrato ígneo y el resto sobre sustrato sedimentario, principalmente rocas calizas con suelo de litosol, feozem o luvisol, cubiertos con una capa profunda de hojarasca (Cilia-López *et al.* 2013).

En los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, además de su empleo como insecticida, el uso más frecuente de la raíz de esta planta es como condimento en salsas, guisos y como sustituto de chile, por su sabor pungente y por su efecto de insensibilización. Dentro de sus usos tradicionales, esta raíz es utilizada para calmar dolores de muelas, herpes bucal, dolores musculares, artritis, como desinflamante, para el tratamiento de la diarrea y el empacho, como desparasitante, para tratar problemas de encías e infecciones bucales (Cilia-López *et al.* 2008; 2013).

En dichos estados, el nombre más utilizado para esta planta es “chilcuague” (o chilcúan), también conocida como pelitre, raíz de oro y raíz azteca. Esta raíz se comercializa durante todo el año en los tianguis de las comunidades de Rioverde (SLP), San Ciro (SLP), San Luis de la Paz (GTO), Dr. Mora (GTO), San Felipe (GTO), San José Iturbide (GTO), Xichú (GTO) y Jalpan (QRO) (Cilia-López *et al.* 2008; 2013).

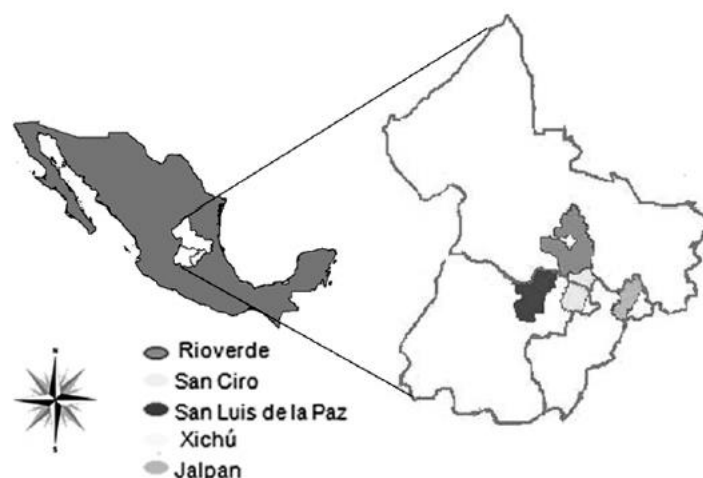


Figura 2. Distribución comercial conocida de *Heliopsis longipes* (Cilia-López *et al.* 2008)

II.5.1. Estudios farmacológicos de *H. longipes*

Considerando su empleo en la medicina tradicional, se han realizado diversos estudios *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo* para comprobar y validar su uso como analgésico, antimicrobiano e insecticida.

Los estudios realizados en extractos orgánicos de la raíz de *H. longipes* han comprobado su actividad bactericida (Gutiérrez-Lugo *et al.* 1996; Molina-Torres *et al.* 2004), antifúngica (Ramírez-Chávez *et al.* 2000; Molina-Torres *et al.* 2004), insecticida (Hernández-Morales *et al.* 2012; Beltrán *et al.* 2015), analgésica (Cariño-Cortés *et al.* 2010; Cilia-López *et al.* 2010), antinociceptiva (Déciga-Campos *et al.* 2010). De manera reciente, se demostró que la afinina es un compuesto antinociceptivo multiblanco que atenúa la hipotermia, hipolocomoción y las conductas de enfermedad en modelos murinos inducidos con lipopolisacáridos (Luz-Martínez *et al.* 2025). Asimismo, se han reportado sus propiedades antiinflamatoria, (Hernández, 2009), vasodilatadora (Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021) y recientemente, su efecto antihipertensivo (Luz-Martínez *et al.* 2024; Marrero-Morfa *et al.* 2025), el cual actúa a través de la activación de los receptores CB1 y de los canales TRPA1 y TRPV1 (Luz-Martínez

et al. 2024). Con el fin de mejorar la entrega biológica de estos extractos, nuestro grupo desarrolló un sistema de auto-microemulsificación a partir del extracto etanólico de la raíz para mejorar la solubilidad y la liberación de la afinina (Marrero-Morfa *et al.* 2023).

En lo que respecta al efecto vasodilatador, hasta la fecha, solo se han logrado identificar tres compuestos con actividad vasodilatadora que pudieran contribuir al efecto del extracto de diclorometano de esta especie vegetal: la afinina, el ácido adípico y el escualeno (Ruiz Castillo, 2021).

II.5.2. Composición química de *H. longipes*

Los estudios químicos realizados en extractos orgánicos de la raíz de *H. longipes*, han permitido la identificación de diversos metabolitos, que incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, ésteres, éteres, hidrocarburos aromáticos, abundantes terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y alcanidas (alifáticas y acetilénicas) (Aguilar *et al.* 2016; Ruiz Castillo *et al.* 2021).

Las moléculas bioactivas predominantemente encontradas en esta especie son las *N*-alcanidas o alcanidas. Hasta la fecha se han logrado purificar a partir de la raíz de *H. longipes* solo cuatro alcanidas lineales: la afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida), la longipinamida A (*N*-isobutil-8,10-diinoico-3*Z*-undecenamida), la longipenamida A (*N*-isobutil-sin-8,9-dihidroxi-2*E*,6*Z*-decadienamida) y la longipenamida B (*N*-isobutil-sin-6,9-dihidroxi-2*E*,7*E*-decadienamida) (López-Martínez *et al.* 2011).

Las alcanidas identificadas en la raíz de *H. longipes*, particularmente la afinina, son importantes desde un punto de vista farmacológico, ya que los efectos biológicos que se han demostrado a los extractos orgánicos preparados a partir de la raíz se han atribuido principalmente a la presencia de este compuesto (García-Chávez *et al.* 2004; Aguilar *et al.* 2016; Ruiz Castillo, 2021). En este contexto, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la optimización de estas aplicaciones desde su

cultivo, recientemente se ha evaluado como la elicitación controlada y los tiempos de aclimatación en invernadero modifican las variables morfológicas y bioquímicas en colectas de esta especie (Parola-Contreras *et al.* 2020).

II.5.3. Importancia farmacológica de la afinina

La afinina o espilantol, es la alcanida que se encuentra en mayor proporción en la raíz de *H. longipes* (López-Martínez *et al.* 2011; Ruiz Castillo, 2021) y, como ya se mencionó anteriormente, se considera como el principal compuesto responsable de los efectos farmacológicos demostrados para los extractos de esta raíz (García-Chávez *et al.* 2004; Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021; Luz-Martínez *et al.* 2024).

Diversos estudios realizados en modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la afinina es una molécula de carácter lipofílico con una excelente capacidad para penetrar la piel, la mucosa oral (por difusión pasiva) y posteriormente, alcanzar la circulación sanguínea. Además, tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en grandes cantidades (~ 98) lo que le confiere gran capacidad para ejercer múltiples efectos farmacológicos en el sistema nervioso central (Veryser *et al.* 2016).

Esta molécula posee diversas actividades biológicas asociadas principalmente a su empleo en la medicina tradicional (insecticida y analgésica). Se ha demostrado su actividad analgésica (Rios *et al.* 2007), antinociceptiva (Déciga-Campos *et al.* 2010), antiinflamatoria (Huang *et al.* 2018), ansiolítica (Cariño-Cortés *et al.* 2010), antimicrobiana (Molina-Torres *et al.* 1999), antifúngica (Buitimea-Cantúa *et al.* 2019), antibacteriana (Molina-Torres *et al.* 2004) y recientemente por nuestro grupo de trabajo, su actividad vasodilatadora (Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021) y antihipertensiva (Luz-Martínez *et al.* 2024)

Se ha propuesto que el efecto analgésico de la afinina involucra la vía del NO-GMPc-Canales de potasio y los sistemas GABAérgico, opiodérgico y

serotoninérgico (Déciga-campos *et al.* 2010). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el efecto vasodilatador inducido por esta alcalida implica una activación de las vías de los gasotransmisores (NO/GMPc, CO/GMPc y H₂S/K_{ATP}) y las prostaciclinas (PGI₂/AMPc). Adicionalmente, nuestro grupo ha encontrado evidencia que indica que la afinina activa los receptores a cannabinoides (CB1 y eCB) y los canales endoteliales TRPA1 y TRPV1 localizados en el endotelio vascular y, además, es capaz de estimular la vía del HNO-TRPA₁ y GRPc (Castro-Ruiz *et al.* 2017; Valencia-Guzmán *et al.* 2021).

Por otra parte, se ha demostrado que la administración subcrónica de la afinina (50 mg/kg) en ratones Swiss Webster exhibe una actividad “ligeramente tóxica con una DL₅₀ de 1,442.2 mg/kg, sin que indujera cambios en los parámetros bioquímicos y hematológicos, descartando efectos nocivos en el sistema nervioso central. Estos estudios demostraron que la afinina no solo es un candidato útil para un posible nuevo fármaco, sino también es un compuesto seguro para su administración repetida (Cuadro 1) (De la Rosa-Lugo *et al.* 2020).

Cuadro 1. Clasificación y etiquetado de productos químicos del Sistema Globalmente Armonizado (OECD, 2001).

Clasificación del Sistema Globalmente Armonizado (GSH)					
Categoría	1	2	3	4	5
Símbolo de comunicación de peligro					Sin símbolo
Palabras de advertencia	Peligroso	Peligroso	Peligroso	Atención	Atención
Indicación de peligro	Mortal en caso de ingestión	Mortal en caso de ingestión	Tóxico en caso de ingestión	Nocivo en caso de ingestión	Puede ser nocivo en caso de ingestión
DL ₅₀ (mg/kg)	5	50	300	2,000	5,000

Considerando los efectos farmacológicos que se le han demostrado a nivel de los sistemas cardiovascular y nervioso central y su baja toxicidad, la afinina, podría considerarse como un candidato idóneo para el desarrollo de un nuevo fármaco y/o como un marcador químico idóneo para la cuantificación y estandarización de un

extracto preparado a partir de *H. longipes* para el posterior desarrollo de fitomedicamentos útiles para tratar el dolor y algunas enfermedades cardiovasculares. Para consolidar este potencial, nuestro grupo de trabajo desarrolló un sistema auto-microemulsificante optimizado y estandarizado con base en el contenido de afinina; este sistema no solo supera las limitaciones de solubilidad y optimiza la liberación del compuesto activo, sino que ya ha demostrado con éxito su efecto antihipertensivo *in vivo* (Marrero-Morfa *et al.* 2023), abriendo una vía concreta y tecnológicamente viable para la formulación de fitomedicamentos.

II.5.4. Fuentes de obtención de la afinina

La afinina es una molécula de gran importancia en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Se han elaborado una amplia variedad de productos con base en afinina y/o mediante el empleo de extractos de plantas que la contienen. Las plantas más importantes productoras de afinina pertenecen a los géneros *Acmella* (*Spilanthes*), *Heliopsis* y *Wedelia*. Esta molécula se encuentra en gran proporción en las especies de *A. oleracea* (84.52 mg/g de extracto hidroalcohólico (95:5) de flores y 77.98 mg/g de extracto hidroalcohólico (95:5) de raíz) y *H. longipes* (400 mg/g de extracto etanólico de raíz) (Barbosa *et al.* 2016; Valencia-Guzmán *et al.* 2021).

Hasta la fecha, se han patentado 91 productos alimentarios, cosméticos y farmacéuticos que contienen afinina (Silveira *et al.* 2018) y 31 de ellos, se desarrollaron a partir de *Acmella oleracea* (Milhomen *et al.* 2019). Estos productos incluyen: productos de higiene como pasta de dientes (Colgate®), como analgésico oral (Buccaldol®), gel antibacteriano (Indolphar®) y productos antienvjecimiento (Gatuline®, SYN®-COLL, ChroNOLine™) (Rondanelli *et al.* 2020).

En la actualidad, la afinina presenta un precio alto en el mercado. El precio de 10 mg de este compuesto oscila entre los 6,000.00 y 10,000.00 M.N. (Chromadex®), y las principales fuentes para su obtención son la síntesis química y la purificación a partir sus fuentes naturales (Barbosa *et al.* 2016; Silveira *et al.* 2018).

Dada su importancia industrial, se han empleado diversos métodos para el aislamiento y la purificación de la afinina a partir de las flores de *A. oleracea* (Barbosa *et al.* 2016) y la síntesis estereoselectiva, la cual no proporciona altos rendimientos (61 %) (Ikeda *et al.* 1984; Barbosa *et al.* 2016; Rondanelli *et al.* 2020).

En este sentido, vale la pena considerar que diversos estudios han demostrado que la afinina es el compuesto mayoritario presente en la raíz de *H. longipes* y que su abundancia en ésta es de aproximadamente 45 % (López-Martínez *et al.* 2011; Ruiz Castillo, 2021). Considerando lo anterior, indudablemente la raíz de *H. longipes* es una fuente muy valiosa para la extracción y purificación de dicha molécula.

II.6. Mecanismos adaptativos de defensa de las plantas ante factores de estrés ambiental

La adaptabilidad al estrés ambiental es un comportamiento generalizado en la naturaleza. Los organismos vivos se encuentran constantemente desafiados por diversos factores ambientales (incluidos el estrés biótico y abiótico). Este proceso de adaptación, implica la compensación biológica a estas interacciones, mediante la reprogramación de su expresión génica para ajustar su metabolismo y hacer frente a los cambios que se presentan en su entorno (Yang *et al.* 2018; Salomé-Abarca *et al.* 2020).

Debido a su sesibilidad, las plantas han estado sometidas a una fuerte presión evolutiva, lo cual ha dado como resultado el desarrollo de sofisticados sistemas adaptativos (físicos y bioquímicos) que les han permitido sobrevivir y desarrollar respuestas a las interacciones a las que se ven expuestas en los diversos ecosistemas en que se desarrollan. Los exudados vegetales, las estructuras superficiales (espinas, pelos, tricomas, etc.) y los metabolitos especializados son mecanismos que les ayudan a enfrentarse a los diferentes retos a los que se ven expuestas (Liebelt *et al.* 2019; Salomé-Abarca *et al.* 2020).

La composición química de las plantas es altamente cambiante. La síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios se han asociado a procesos de

adaptación a las condiciones agroclimáticas, incluidas: la irradiación de luz (duración, intensidad, calidad), la temperatura, la disponibilidad de agua, la fertilidad y salinidad del suelo y, algunos procesos asociados con el crecimiento y desarrollo. Adicionalmente, la producción de metabolitos secundarios se ha asociado a procesos de defensa/protección contra ataques de herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso contra otras plantas. Adicionalmente, algunos de estos tipos de metabolitos desempeñan funciones de comunicación entre plantas y microorganismos simbióticos, para atraer polinizadores y dispersores de semillas (Liu *et al.* 2018; Yang *et al.* 2018; Valentino *et al.* 2020; Salomé-Abarca *et al.* 2020).

II.7 Influencia de la etapa fenológica sobre el perfil químico de las especies vegetales

La biosíntesis de los metabolitos de origen vegetal comienza a partir de vías bioquímicas básicas, tales como la glucólisis y posteriormente, se diversifica dependiendo del tipo de célula, la etapa de desarrollo y las señales ambientales. Estos compuestos, que se distribuyen y se almacenan en diferentes células, tejidos y órganos, suelen ser producidos o inhibidos durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo (Li *et al.* 2020).

De manera general, la raíz y los tallos de las plantas son los órganos responsables de la acumulación de componentes bioactivos con importante valor medicinal. Esta acumulación se ve afectada por periodos de crecimiento, estaciones de crecimiento y los años de crecimiento (Li *et al.* 2020). Los exudados de la raíz, comprenden una gran variedad de compuestos liberados por las plantas a la rizosfera, incluidos metabolitos primarios de bajo peso molecular (sacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos), metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y terpenoides) y moléculas orgánicas (dióxido de carbono y agua). Estos exudados tienen un papel importante en diversos procesos, incluyendo la movilización y adquisición de nutrientes, atrayendo y repelando ciertas especies microbianas e inhibiendo el crecimiento de especies vegetales competidoras (Gargallo-Garriga, 2018; Hennion *et al.* 2019).

En las primeras etapas de crecimiento, el metabolismo primario proporciona la energía necesaria y las macromoléculas indispensables para la construcción de proteínas, polímeros estructurales, etc. Los metabolitos primarios importantes como los azúcares, nucleótidos, lípidos y aminoácidos son abundantes durante su crecimiento y se ven disminuidos en etapas maduras (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Friederike *et al.* 2016). Durante las etapas reproductiva y de fructificación, algunos productos del metabolismo secundario presentan funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos pigmentos proporcionan color a flores y frutos que desempeñan un papel esencial en la reproducción, atrayendo insectos polinizadores o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento y posteriormente contribuirán a la dispersión de semillas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Por otra parte, la maduración, desde un punto de vista metabólico, conlleva una diferenciación de tejidos, síntesis de enzimas y modificaciones fisicoquímicas. Esta etapa se caracteriza por un incremento en la respiración, producción de aroma, un decremento en el almidón, firmeza y un eventual envejecimiento (Janampa, 2017). En este contexto, la biosíntesis y acumulación de los metabolitos primarios y secundarios están controladas de manera temporal y fuertemente influenciada por su entorno cambiante (Li *et al.* 2020).

Las investigaciones recientes realizadas sobre diversas especies vegetales indicaron que, durante la etapa vegetativa, la raíz de *Duboisia Myoporoides* y *D. leichhardtii* (Solanaceae) mostró una alta concentración de azúcares (glucosa y sacarosa) y aminoácidos (alanina, treonina y prolina) (Friederike *et al.* 2016). Estos metabolitos primarios son esenciales para el proceso de crecimiento y diferenciación de estructuras primarias (Li *et al.* 2020). Adicionalmente, un estudio realizado en la raíz de *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae), demostró que existen compuestos únicos, que se encuentran en etapas específicas del desarrollo. La 8,2'-trihidroxi-6,7-dimetoxi flavona se encontró únicamente en la etapa de germinación. En tanto que el 2'-O- β -D-glucósido de la 5,7,2', 6'-tetrahidroxi flavona, el 7-O- β -D-glucurónido de la isoscutellareína, el 7-O- β -D-glucósido de la 5,7,2'-trihidroxi-6-metoxi flavona, la 5,2',6'-trihidroxi-7,8-dimetoxi flavona, la luteolina, el 4'-O-

glucósido de la cirsimarina, la 5,2', 5'-trihidroxi-6,7,8-trimetoxi flavona y la 5,7-dihidroxi-6,8-dimetoxi flavona fueron característicos en plántulas. Mientras que en la etapa madura de esta planta se encontraron el 3-O- β -D-glucósido de la 3,5,7,4'-tetrahidroxi-6-metoxi flavanona, el 8-O- β -D-glucurónido de la isoscutellareína y la dihidronorwogonina. De manera general, en la etapa de germinación se observó un incremento de flavonoles como el 3-O-glucósido de la dihidromiricetina, el 7-O-glucósido de la taxifolina, la dihidromiricetina y el 3-O-glucósido del kaempferol y sus isómeros; en la etapa de plántulas, se observó un incremento de flavonoides como la baicalina, el wogonosido, la baicaleína, la wogonina; y en etapas maduras, hubo un incremento de flavonas como la escutelarina, la baicalina y el 7-O- β -D-glucurónido de la crisina (Xu *et al.* 2018).

El comportamiento metabólico frecuente en las plantas perennes es un incremento en el contenido y el rendimiento de los metabolitos secundarios conforme avanza el tiempo (Li *et al.* 2020). Estudios realizados en la raíz de *Achyranthus bidentata* (Amaranthaceae) mostraron que la síntesis y acumulación de saponinas triterpenoides (agliconas de ácido oleanólico) incrementaban con la etapa de crecimiento. Dichas saponinas están directamente relacionadas con la biomasa de la planta y alcanzan el mayor rendimiento en las raíces completamente desarrolladas (con estructuras terciarias) (Li y Hu, 2009). Por otro lado, estudios realizados en *Panax ginseng* (Araliaceae) demostraron que el contenido de ginsenósidos en la raíz aumenta con la edad, presentando el mayor rendimiento a los 5 años (Shi *et al.* 2007).

Así mismo, en la raíz de *Panax notoginseng* (Araliaceae), las plantas de tres años presentan el mayor rendimiento de saponinas (Hong, 2005). No obstante, estudios realizados en *Codonopsis lanceolata* (Campanulaceae) demostraron que la acumulación de triterpenos (ácido oleanólico y ácido tánico) en la raíz disminuía cuando la planta envejecía (Zhu *et al.* 2014). Adicionalmente, el contenido de polisacáridos (inulina, CPPS₃, CPP-1, CPPA y CPP) saponinas triterpenoides tipo oleanano (feetidisimosido A, aster saponina Hb, codonolasido I-V y lancemasida A-G) y fenilpropanoides (tangsenósido I-II y eleuterósido B) aumentaban conforme

aumentaba el tiempo de desarrollo (2 a 4 años) (Zhu *et al.* 2014). Esto indica una tendencia general del incremento del contenido de saponinas y triterpenos con el paso del tiempo en etapas maduras.

Por otro lado, en la raíz de *Equinaceae purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) se ha demostrado un incremento de derivados de ácido chicórico y alcamidas con el paso de los años (Xu *et al.* 2014). Adicionalmente, se ha asociado un incremento de la concentración de afinina en la raíz de *Heliopsis longipes* (Asteraceae) con el paso del tiempo (9 meses) (Parola-Contreras *et al.* 2020).

Los estudios previamente descritos indican que, de manera general, en las especies vegetales durante las primeras etapas de crecimiento, los metabolitos primarios importantes en su desarrollo (azúcares y aminoácidos) son abundantes (Friederike *et al.* 2016). Así mismo, se ha asociado un incremento de flavonoides y compuestos fenólicos en las etapas de floración y fructificación (Xu *et al.* 2014; Xu *et al.* 2018) y un incremento en triterpenos, saponinas y alcamidas en etapas avanzadas de crecimiento (Hong *et al.* 2005, Xu *et al.* 2014, Parola-Contreras *et al.* 2020).

II.8. Influencia de las condiciones ambientales en el perfil químico de las especies vegetales

De manera natural, el crecimiento y el desarrollo de las especies vegetales suelen ser estimulados o inhibidos por diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, su adaptación morfológica, anatómica y funcional ante los cambios bióticos y abióticos puede influir en la acumulación de metabolitos secundarios. Las vías metabólicas y su regulación son altamente susceptibles a las variaciones ambientales, ya que la expresión de genes se ve alterada por distintos tipos de estrés (Borges *et al.* 2017; Sanchita y Sharma, 2018).

Durante el desarrollo de las plantas, éstas interactúan con el entorno circulante, de tal forma que entran en contacto con diferentes componentes abióticos como el agua, la luz, la temperatura, el suelo y algunos productos químicos. Sin embargo, estos factores abióticos pueden ser negativos como la sequía o las inundaciones,

los cambios extremos de luz y temperatura, suelos pobres en nutrientes o existencia de sustancias químicas tóxicas que generan tensiones que desencadenan variaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Verma y Shukla, 2015).

En respuesta a la radiación lumínica (aumento o disminución), las plantas se adaptan a los rayos solares mediante la liberación y acumulación de diversos ácidos fenólicos y flavonoides. Estudios realizados en la raíz de *Withania somnifera* (Solanaceae) demostraron que la radiación solar UV-B induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y promueve la biosíntesis de alcaloides, antocianinas, carotenoides, flavonoides, lignina, fitoesteroles, saponinas y taninos (Takshak y Agrawal, 2014). Adicionalmente, un estudio realizado en la raíz de *Mahonia brevifolia* (Berberidaceae) demostró un incremento en la concentración de alcaloides con exposiciones del 30 y 50 % de luz solar (Li *et al.* 2018).

Las variaciones en la temperatura se han asociado a la presencia de metabolitos secundarios. Si la temperatura se eleva, se acumulan alcaloides en algunas especies vegetales, en tanto que si la temperatura baja, aumentan los compuestos fenólicos y algunos terpenos (Li *et al.* 2020). En un estudio realizado en *Astragalus compactus* (Fabaceae) se asoció el incremento de la temperatura con el aumento de la concentración de ácidos fenólicos en la raíz (Naghiloo *et al.* 2012). Adicionalmente, en *Artemisia annua* (Asteraceae) se incrementó la concentración de lactonas sesquiterpénicas (artemisinina) en toda la planta con un tratamiento de preenfriamiento transitorio (Yin *et al.* 2008). Así mismo, en el *Chrysanthemum morifolium* (Asteraceae) disminuyó la concentración de antocianinas cuando la planta se sometió a altas temperaturas (Shibata *et al.* 1988).

En respuesta al estrés hídrico, generalmente, las plantas disminuyen su tamaño y aumentan la concentración de alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides, estos últimos en sequía grave. En la raíz de *Hypericum brasiliense* (Hypericaceae) y toda la planta de *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) se incrementó la concentración de compuestos fenólicos totales en estrés por sequía (De Abreu y Mazzafera, 2005; Cheng *et al.* 2018). En las mismas condiciones, en *Artemisia annua* (Asteraceae)

se observó un incremento en la concentración de lactonas sesquiterpénicas (Artemisinina) en toda la planta (Verma y Shukla, 2015).

Existen reportes que demuestran que la composición química de los exudados de la raíz de plantas estresadas por sequía (excepto de aquellas con sequía prolongada) varía, según la intensidad de la sequía. En las sequías más extremas, se han encontrado concentraciones altas de fructosa, arginina y valina, aminoácidos precursores de metabolitos secundarios como los alcaloides y alcanoides alifáticos (Gargallo-Garriga, 2018).

Se ha comprobado que el estrés salino provoca en las plantas un aumento en la síntesis de polifenoles, saponinas, flavonoides, alcaloides y terpenos en condiciones de salinidad. Estudios realizados en *Achillea fragratissima* (Asteraceae) demostraron que, al incrementar la salinidad del medio, se incrementó la concentración de taninos y alcaloides en toda la planta (Abd y Ahmed, 2009). Así mismo, en la raíz de *Plantago ovata* (Plantaginaceae) se incrementó la concentración de alcaloides, saponinas y de aminoácidos como la prolina (Haghighi *et al.* 2012).

Adicionalmente, la síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios se ven influenciados por otras clases de estrés ambiental, tales como el tipo y composición del suelo, heridas, presencia de iones metálicos, el ritmo circadiano, el origen geográfico, etc. (Yang *et al.* 2018; Li *et al.* 2020). En los últimos años, ha habido numerosos reportes acerca de la influencia de diferentes tipos de estrés, la disponibilidad de nutrientes (Dar *et al.* 2016), la presencia de iones metálicos (Marslin *et al.* 2018), el origen geográfico (Ortiz-Rojas *et al.* 2017; Li *et al.* 2018), el genotipo (Friederike *et al.* 2016) y el estrés químico (Verma y Shukla, 2015; Parola-Contreras *et al.* 2020) sobre el metabolismo primario y secundario de diferentes especies vegetales.

Estos estudios han contribuido a comprender los mecanismos de adaptación de las plantas ante las condiciones cambiantes de su entorno, lo cual constituye un punto de partida para establecer las condiciones idóneas de crecimiento y desarrollar las estrategias ambientales para la obtención de cultivos más productivos, nutritivos y

resistentes a enfermedades. Por otra parte, se han explorado estrategias a fin de estimular rutas biosintéticas específicas con el objeto de incrementar la producción de metabolitos de importancia en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Piñeros-Castro, *et al.* 2009; Li *et al.* 2020).

II.9. Inducción de mecanismos de defensa en las plantas a través de elicitores

Los metabolitos secundarios son moléculas con características únicas que tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica para el desarrollo de aditivos alimentarios, sabores, olores y productos farmacéuticos. La acumulación de estos metabolitos, se puede inducir mediante el empleo de inductores o moléculas de señalización que provoquen situaciones de estrés en la planta (Akula *et al.* 2011; Li *et al.* 2020).

Existe una gran cantidad de moléculas (elicitores) que actúan como señales generando una respuesta de defensa. Estas, se clasifican en dos grandes grupos (Figura 3): i) los elicitores provenientes de patógenos o moléculas de señalización producidas dentro de la planta (bióticos) que regulan procesos celulares, tales como la síntesis de polisacáridos, ácidos nucleicos, feromonas, fitohormonas, entre otros y aquellas ii) moléculas externas de origen químico o físico que pueden inducir una respuesta, tales como minerales, gases, nanoestructuras, rayos ultravioleta, temperatura, sequía, ondas acústicas, entre otros (Vázquez-Hernández *et al.* 2019).

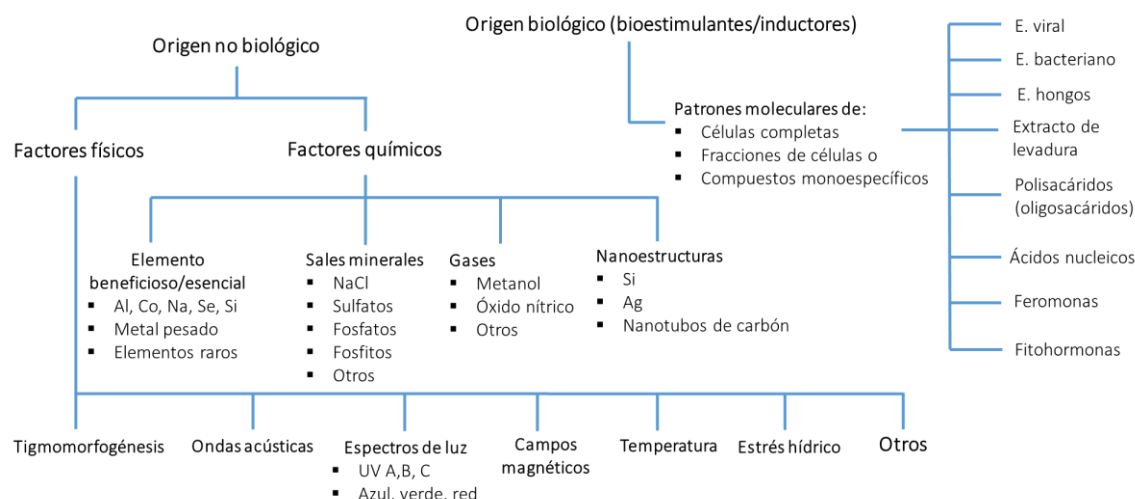


Figura 3. Clasificación de elicitores con base a su origen (Vázquez-Hernández *et al.* 2019).

Los elicitores son moléculas que producen estímulos de estrés en las plantas, los cuales, al ser aplicados en pequeñas cantidades (agente eutresor), tienen la capacidad de activar los mecanismos de defensa y la capacidad de adaptación, mediante la síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, cuando el estímulo permanece constante y es aplicado a altas concentraciones (agente distresor), se pueden ocasionar consecuencias dañinas irreversibles en las plantas e incluso provocar su muerte (Caicedo-López *et al.* 2018).

La aplicación de elicitores, ya sean químicos o biológicos en los cultivos vegetales, son una estrategia biotecnológica de gran importancia que permite obtener mayor rendimiento de diversos metabolitos secundarios y desarrollar estrategias para la purificación y extracción simultánea de metabolitos de importancia en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, etc. (Zhao *et al.* 2005; Piñeros-Castro, *et al.* 2009; Akula *et al.* 2011; Li *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2020).

El ácido salicílico, el peróxido de hidrógeno y el ácido metil-jasmónico se consideran hormonas vegetales y son los elicitores biológicos más utilizados para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en las plantas (Vázquez-Hernández *et al.* 2019). Estudios realizados en la raíz de *Polygonum multiflorum* (Polygonaceae)

demonstraron que la elicitación controlada con ácido salicílico y ácido metil-jasmónico (50 μ M) indujo un incremento significativo en la biomasa de la raíz seca e incrementó la concentración de compuestos fenólicos (flavonoides) (Ho *et al.* 2017). La estimulación *in vivo* con ácido salicílico en cultivos de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) incrementó de manera considerable la biomasa y la concentración (hasta 10 veces en comparación con el control) de compuestos fenólicos derivados del ácido cafeico, el ácido chicórico, el ácido clorogénico y la rutina (Kuzel *et al.* 2009; Mehrpooya, 2021). También, se ha demostrado que la adición de elicitors biológicos aumenta la concentración de alcanidas en algunas especies vegetales de la familia Asteraceae. Por ejemplo, se observó un aumento en la concentración de las alcanidas *N*-isobutil-undeca-2*E*,4*Z*-dieno-8,10-diinamida (i); *N*-isobutil-undeca-2*Z*,4*E*-dieno-8,10-diinamida (ii); *N*-isobutildodeca-2*E*,4*Z*-dieno-8,10-diinamida (iii); 2-metil-butilamida del ácido undeca-2*Z*,4*E* dieno-8,10-di-enoico (iv); *N*-isobutildodeca-2*E*,4*E*,10*E*-trieno-8-diinamida (v); dodeca-2*E*,4*E*-dieno-8,2-metilbutilamida del ácido 10-di-enoico (vi); *N*-isobutil-(2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*)-dodecatetraenamida (vii); *N*-isobutil-(2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*)-dodecatetraenamida (viii); Isobutilamida del ácido dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienoico (ix); *N*-isobutil-(2*E*,4*E*)-dodecadienamida (x) con la adición de ácido metil jasmónico (10-40 μ M) en cultivos de raíces peludas de *E. purpurea*, *E. pallida* y *E. angustifolia* (Romero *et al.* 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que la afinina posee efectos como promotora del crecimiento vegetal. Un estudio realizado en cultivos de tomate reveló que la aplicación de esta alcanida incrementa la altura de la planta, la longitud de la raíz y la biomasa total, además de mejorar notablemente la arquitectura radicular (González-Morales *et al.* 2015). Asimismo, se ha reportado que las alcanidas inducen el desarrollo de raíces laterales en modelos como *Arabidopsis* (Méndez-Bravo *et al.* 2010). A pesar de estos hallazgos, hasta el momento se desconoce si la afinina modifica la composición química de la raíz en las plantas tratadas, lo que sugiere un comportamiento potencial como elicitor. Si bien el empleo de esta alcanida en su forma pura resulta poco rentable para aplicaciones agrícolas a gran escala, la estandarización de extractos orgánicos que contengan este metabolito activo representa una importante área de oportunidad biotecnológica.

En lo que respecta a *H. longipes*, Parola-Contreras *et al.* (2020) demostraron que la aplicación foliar con peróxido de hidrógeno (200 mM) y ácido salicílico (100 mM) incrementó la actividad enzimática de la valina descarboxilasa y aumentó el rendimiento de la afinina en la raíz de *H. longipes* a los 5 meses de aclimatación. Sin embargo, en dicho trabajo no se realizó el análisis del perfil metabolómico completo de la planta.

Indudablemente, *H. longipes* es una planta con gran importancia económica, debido a su empleo en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Sin embargo, a la fecha no existe información relativa a la variación en el perfil y concentración de los metabolitos primarios y secundarios presentes en la raíz de esta especie vegetal en función de sus etapas fenológicas y como respuesta a la estimulación con elicitores biológicos. El conocimiento de la influencia de la etapa de desarrollo de *H. longipes* sobre su perfil metabolómico posibilitará, por una parte, confirmar si la afinina representa un marcador químico idóneo para el desarrollo de extractos estandarizados que garanticen la seguridad y eficacia de productos farmacéuticos y cosméticos preparados partir de la raíz de *H. longipes*. Adicionalmente, se pondrán establecer las condiciones idóneas para la propagación y preservación de esta especie vegetal.

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo determinar la influencia de la etapa fenológica, las condiciones de cultivo y la elicitación biológica (peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, metil-jasmonato, y extracto de la raíz de *H. longipes*) sobre el perfil metabolómico de *H. longipes*.

III. JUSTIFICACIÓN

Heliopsis longipes es una planta perenne perteneciente a la familia Asteraceae que es microendémica de la Sierra Gorda (San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro). Su raíz es la parte más utilizada con fines medicinales, principalmente para aliviar el dolor de muelas, gingivitis y dolor muscular. Los diversos estudios han demostrado que los extractos orgánicos de esta raíz poseen actividad antimicrobiana, analgésica, antinociceptiva, vasodilatadora y más recientemente antihipertensiva. La raíz se caracteriza por la presencia de terpenos y alcanidas, siendo la afinina la principal alcanida responsable de los efectos farmacológicos observados. La afinina, es una molécula lipofílica que posee buenas propiedades farmacocinéticas, acción analgésica y efectos farmacológicos sobre el sistema cardiovascular, lo que la convierten en un candidato idóneo para el desarrollo de fármacos y/o como un marcador químico para la obtención de fitomedicamentos con efecto analgésico y para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En la actualidad, la afinina cuenta con 91 patentes para el desarrollo de productos alimentarios y farmacéuticos y su costo comercial es muy elevado. Debido a los bajos rendimientos obtenidos por la síntesis química o por extracción de *Acmella oleracea*.

La raíz de *H. longipes* representa una fuente valiosa de afinina, con concentraciones reportadas de hasta 350 mg/g de extracto. Sin embargo, se desconoce cómo varía su perfil químico según la etapa fenológica de la planta y cuál es el efecto de la aplicación de elicitores biológicos sobre la síntesis de metabolitos primarios y secundarios.

De igual forma, existe escasa información sobre la influencia de las condiciones de cultivo, particularmente la comparación entre sistemas silvestres y controlados (invernadero), en la acumulación y variación de metabolitos bioactivos. Considerando que factores como la disponibilidad de agua, la radiación, la temperatura y las características edáficas pueden modular la expresión metabólica de las plantas, es razonable suponer que las condiciones de cultivo pueden impactar

significativamente la biosíntesis de alcaloides, incluida la afinina. Sin embargo, este aspecto no ha sido abordado de manera sistemática en *H. longipes*, lo que representa una limitante para el diseño de estrategias de producción estandarizada y aprovechamiento sostenible.

La caracterización del metaboloma de la raíz de *H. longipes* en diferentes etapas de su desarrollo y bajo la influencia de elicitores biológicos permitirá establecer condiciones idóneas para su propagación y preservación. Además, brindará bases científicas para el aprovechamiento sustentable de esta importante especie vegetal, endémica de México, con gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, fitomedicamentos y productos cosméticos y alimenticios.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la etapa fenológica, las condiciones de cultivo y la adición de elicitores biológicos en el perfil metabolómico de la raíz de *Heliopsis longipes*?

V. HIPÓTESIS

La etapa fenológica y las condiciones de cultivo modificarán el perfil metabolómico de la raíz de *H. longipes*. En la etapa vegetativa se encontrarán mayores concentraciones de metabolitos primarios, tales como aminoácidos y carbohidratos, mientras que en etapas reproductivas se incrementará el contenido de metabolitos secundarios. La actividad de la enzima valina descarboxilasa y la concentración de alcaloides aumentarán progresivamente conforme avanza el desarrollo de la planta. Las condiciones de cultivo (silvestre e invernadero) generarán diferencias en el contenido de alcaloides y en el perfil metabolómico de la raíz. La aplicación de elicitores biológicos provocará un incremento en la actividad de la valina descarboxilasa, induciendo un aumento en la concentración de alcaloides.

VI. OBJETIVOS

VI.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de las condiciones de cultivo, la etapa fenológica y la adición de elicitores biológicos sobre el perfil metabolómico de la raíz de *H. longipes*.

VI.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar los compuestos mayoritarios de la raíz de *H. longipes* mediante técnicas cromatográficas convencionales a partir de extractos de ejemplares silvestres.
- Analizar la composición química del suelo y obtener los datos climáticos del sitio en el que se desarrollan los ejemplares de *H. longipes* en condiciones silvestres.
- Establecer las condiciones óptimas de cultivos para el crecimiento y desarrollo de ejemplares de *H. longipes* en condiciones de invernadero.
- Aclimatar ejemplares de *H. longipes* en condiciones silvestres y de invernadero e identificar sus cuatro etapas fenológicas.
- Seleccionar la etapa fenológica y las condiciones de cultivo con mayor rendimiento de afinina, y elicitar (con ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, metil-jasmonato y extracto de ejemplares de *H. longipes*) durante 3 y 6 meses de aclimatación.
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo, la etapa fenológica y la aplicación foliar de elicitores biológicos sobre la actividad de la enzima valina descarboxilasa y el contenido de afinina, mediante HPLC-DAD.
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo, la etapa fenológica y la aplicación foliar de elicitores biológicos sobre el perfil metabolómico de la raíz de *H. longipes* mediante el empleo de ^1H -RMN y CG-EM.

- Proponer un mecanismo general que explique la influencia de los estados fenológicos y la adición de elicitores biológicos sobre el perfil metabólico de la raíz de *H. longipes*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Recolección del material vegetal.

Los ejemplares de referencia y las muestras de *Heliopsis longipes* utilizadas en el estudio fitoquímico fueron recolectados en la Reserva de la Biosfera de la Sierra Gorda, en la localidad de Rancho Beltrán, municipio de Xichú, Guanajuato (21° 16' 15.5856" N, 100° 3' 11.4624" O).

La identificación y autenticación taxonómica fue realizada por el Dr. Luis Hernández. Así mismo, un ejemplar de respaldo fue depositado en el Herbario Jerzy Rzedowski de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con el siguiente número de voucher QMEX00006951.

VII.2. Germinación de semillas de *H. longipes*.

Las semillas recolectadas de ejemplares silvestres en Beltrán, Gto. fueron germinadas en charolas. Se utilizó el suelo de la localidad como sustrato y riego exclusivo con agua. Las plántulas permanecieron bajo la sombra durante 3 meses para su desarrollo hasta su trasplante.

VII.3. Aclimatación de ejemplares de *H. longipes* en condiciones silvestres y de invernadero.

Los ejemplares fueron trasplantados en bolsas de L/30 K con fuelle blanco. El grupo de Condiciones de Invernadero (CI) fue transferido a un invernadero con techo curvo localizado en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala (20° 42' 15.5" N, 100° 15' 34.2" O), mientras que el grupo de Condiciones Silvestres (CS) fue aclimatados al aire libre en Beltrán, Xichú, Guanajuato. En CI, se utilizó como sustrato una proporción de 4:4:2 de Pet moss® (musgo del género *Sphagnum*), composta y tezontle cernido, respectivamente. El riego fue automatizado por goteo

suplementado con solución de Steiner. Por el contrario, en CS, el sustrato utilizado fue el suelo local y riego manual con agua.

Durante los experimentos, en CI se registró la humedad y temperatura con un termohigrometro Elitech® GSP-6, mientras que los datos meteorológicos de las CS se obtuvieron de la página oficial de la Comisión Nacional del Agua smn.conagua.gob.mx.

Para la realización del muestreo y el análisis fertilidad, propiedades hídricas y condiciones de habitabilidad de los sustratos utilizados en los experimentos se consideró la NOM-021-RENAC-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos (Semarnat, 2002).

VII.4. Identificación de las etapas fenológicas de *H. longipes*.

Las etapas fenológicas fueron identificadas considerando los criterios estacionales y estructurales (estructuras vegetativas y reproductivas) descritos por Cilia-López y cols. en 2013. Adicionalmente, se empleó la escala BBCH extendida para la subclasificación precisa (Meier *et al.* 2009).

VII.5. Parámetros morfológicos de los ejemplares de *H. longipes*.

Las variables morfológicas de los ejemplares recolectados fueron determinadas de la siguiente manera: la altura de la planta, longitud del tallo y de la raíz fue determinado con un medidor de distancia láser YOMYM® OQ-40/40S, mientras que el peso del ejemplar y de su raíz en una escala mecánica de triple brazo Ohaus® serie 700.

VII.6. Obtención de los extractos orgánicos a partir de la raíz de *H. longipes*.

La raíz de cada recolecta se colocó en papel Kraft y secó a la sombra. Una vez seca, la raíz fue triturada (molino electrónico IKA® MF 10 con diámetro de poro de

0.5 mm) para la preparación de los extractos. El vegetal seco y molido se sometió a un proceso de extracción por maceración (sólido-líquido) con diclorometano grado reactivo. Este procedimiento se realizó por triplicado. Concluido el tiempo, el solvente se filtró y fue removido por destilación rotatoria a presión reducida en un rotaevaporador (BÜCHI® R-114) hasta la obtención del extracto seco.

Una vez obtenido el extracto de diclorometano, el material vegetal recuperado se sometió a un proceso de extracción por maceración con metanol grado reactivo. Este procedimiento se llevó a cabo con las condiciones descritas anteriormente hasta obtener el extracto metanólico.

VII.7. Análisis metabolómico de los extractos de diclorometano de la raíz de *H. longipes* mediante Resonancia Magnética Nuclear Protónica.

Los extractos de diclorometano se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3 al 99.8 % + 0.03 % v/v de TMS Cambridge Isotope Laboratories®) y se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm x 7 in (Norell SV SUPER®).

Los espectros de ^1H -RMN se adquirieron en un espectrómetro Avance III HD 700 (Bruker®) a una frecuencia de 699.99 MHz, equipado con una criosonda TCI con gradiente de eje z (5 mm), a 298 K, mediante secuencias de pulsos estándar. Se aplicó un factor de ensanchamiento de línea exponencial de 0.3 Hz al decaimiento por inducción libre antes de la transformada de Fourier. Los espectros se procesaron de manera automática y se corrigió de forma manual la fase y la línea base, y se referenciaron al desplazamiento químico del tetrametil silano (TMS) a 0.00 ppm en el software TopSpin® v. 3.5.6.

Los datos numéricos de cada espectro se redujeron generando intervalos homogéneos de 0.04 ppm en un rango de desplazamiento químico de 0.23 a 11.33 ppm excluyendo la señal del disolvente (7.23 a 7.33 ppm) mediante el software Chenomx® v. 8.3. La matriz de los datos se sometió a análisis exploratorios de Componentes Principales (PCA) y a un discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) en el software SIMCA® v. 9.05. La identificación

de los compuestos presentes en los extractos se realizó mediante la comparación de los desplazamientos químicos (ppm), multiplicad de las señales y constantes de acoplamiento (*J*).

VII.8. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de diclorometano de ejemplares silvestres por cromatografía en columna abierta.

El extracto de diclorometano obtenido de la raíz de ejemplares silvestres se sometió a un fraccionamiento en Cromatografía en Columna Abierta (CCA). Se absorbieron 50 g del extracto en 27 g de silica gel (Kiegesel 60 Merk® 100-230 mesh, 8 x 100 mm). La fase estacionaria consistió en silica gel suspendida en *n*-hexano, mientras que la fase móvil consistió en diferentes proporciones de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol (J.T. Baker®).

El proceso fue monitoreado por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en placas de silica gel 60 F₂₅₄ Merck® con un espesor de 200 µm, las cuales fueron reveladas en luz ultravioleta (λ : 254 nm y λ : 365 nm) y finalmente, con aspersión de *p*-anisaldehído™ con posterior calentamiento a 100 °C (Secretaría de Salud, 2021).

VII.9. Purificación por Cromatografía en Capa Fina preparativa (CCF prep)

El grupo F104 obtenido en el sistema de elución compuesto por hexano y diclorometano en una proporción 5:5 seleccionado por su rendimiento y perfil cromatográfico, se disolvió en diclorometano grado reactivo y fue adsorbido en una placa preparativa de vidrio recubierta con silica gel GF₂₅₄ con espesor de 1000 µm (UNIPLATE™) y se eluyó con hexano:diclorometano en una proporción 1:1. La separación de los compuestos fue visualizada con luz ultravioleta, los cuales fueron raspados y recuperados con diclorometano.

VII.10. Purificación por Cromatografía Líquida de alta-resolución preparativa acoplada a un detector de Matriz de Fotodiodos.

El grupo F384 fue analizado en un Cromatógrafo de Líquidos de alta-resolución (HPLC Waters® 600E) acoplado a un Detector de Matriz de Fotodiodos (DAD Waters® 2998) en una columna Waters symmetryprep™ C18 de 7 µm, 7.8 x 300 mm. La fase móvil consistió en A (ácido acético al 1 % en agua grado HPLC) y B (acetonitrilo grado HPLC) en una proporción 60:40 en modalidad isocrática. El volumen de inyección fue de 200 µL y se detectó a una longitud de onda (λ) de 236 nm.

VII.11. Elucidación estructural e identificación de los compuestos purificados por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

Los compuestos purificados se disolvieron en 700 µL de cloroformo deuterado (CDCl₃ al 99.8 % + 0.03 % v/v de TMS, Cambridge Isotope Laboratories®) para su análisis en RMN. Los espectros se adquirieron a 700 MHz en un espectrómetro Bruker Avance II HD equipado con criosonda TCI de gradiente de eje z. Se utilizó TMS como estándar interno para referenciar los desplazamientos químicos (δ).

La caracterización se realizó mediante el registro de espectros unidimensionales de ¹H y ¹³C y bidimensionales homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC y HMBC).

De manera complementaria, la confirmación de la identidad química se realizó mediante Espectrometría de Masas (EM) de impacto electrónico con cuadrupolo (Agilent® 5975C) a 70 eV de energía de ionización. Los espectros de masas se procesaron en el software MSD ChemStation® y se cotejaron con los registros de la biblioteca NIST® v. 2.0.

VII.12. Cuantificación de la afinina mediante Cromatografía Líquida de alta-resolución acoplada a un detector de Matriz de Fotodiodos.

La cuantificación de la afinina se llevó a cabo utilizando como base el método previamente desarrollado y validado por nuestro grupo de investigación (Marrero-Morfa *et al.* 2023) en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución descrito en la sección 7.10. La elución se realizó en una columna Agilent® ZORBAX Eclipse XDB-C8 de 5 µm, 4.5 x 150 mm y 120 Å. La fase móvil consistió en A (ácido acético al 1 % en agua grado HPLC) y B (acetonitrilo grado HPLC) en una proporción 65:35 en modalidad isocrática. El volumen de inyección fue de 20 µL y se detectó a una λ de 236 nm. La curva de calibración se realizó con afinina estándar (Chromadex®) en un rango de 15-90 µg/mL.

VII.13. Análisis de los extractos de diclorometano de la raíz de *H. longipes* mediante CG-EM.

El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Gases (Agilent® 7890^a) con detector de ionización a la flama (CG). La fase estacionaria utilizada consistió en una columna capilar HP-5MS (60 m x 0.25 mm). El gas acarreador utilizado fue helio de alta pureza a un flujo de 1 mL/min. La ionización de los extractos se realizó con rampa de temperatura iniciando con 150 °C durante 5 minutos, incrementando a una velocidad de 5 °C/min hasta alcanzar 230 °C, dicha temperatura se mantuvo por 15 minutos.

El análisis de espectrometría de masas se realizó en un Espectrómetro de impacto electrónico con analizador de cuadrupolo (Agilent® 5975C). La temperatura de la fuente de iones y del cuadrupolo se ajustó a 230 °C y 250 °C, respectivamente. El escaneo se realizó en un rango de 33-300 uma a una velocidad de escaneo de 5.3/s, con un voltaje de ionización de 70 eV. Como estándar interno se utilizó una serie de *n*-alcanos. La identificación de los compuestos se realizó por medio de la comparación de su espectro de masas con lo registrado en la biblioteca de NIST® v. 2019.

VII.14. Actividad enzimática de la Valina descarboxilasa por Espectrofotometría Uv-Vis.

La actividad de la enzima Valina Descarboxilasa (VDC) se determinó en 1 g de raíz fresca de los ejemplares de *H. longipes* recolectados. La cuantificación de proteína y de isobutilamina se realizó en un espectrofotómetro Uv-Vis (Bio-Rad® Benchmark Plus) a una longitud de onda de 595 y 550 nm, respectivamente. La cuantificación de proteína se determinó por el método de Bradford y la isobutilamina liberada por el método de Cortez-Espinosa *et al.* en 2011. La actividad de la VDC se expresó como U/mg de proteína.

VII.15. Determinación del efecto vasodilatador de los extractos de diclorometano de la raíz de *H. longipes* mediante el ensayo de aorta aislada de rata

Los animales utilizados para la determinación del efecto vasodilatador de los extractos de diclorometano de la raíz de *H. longipes* fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de una Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. Las ratas macho Wistar (200-230 g) se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con libre acceso a agua potable y alimento (Rodent LabDiet®). El protocolo de estudio recibió la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, México (código de aprobación: CBQ25/005b). La manipulación y el sacrificio de los animales se realizó considerando la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001).

Para la extracción de la aorta torácica ascendente, los animales fueron sacrificados por decapitación con previa anestesia con isoflurano. El ensayo *ex vivo* se realizó con la metodología descrita por Ibarra-Alvarado *et al.* en 2010. La aorta extraída se limpió de sangre y tejido conectivo en solución de Krebs-Henseleit fría. La aorta se cortó en anillos de 4 mm, los cuales fueron colocados en cámaras para tejido aislado

con solución de Krebs-Henseleit en condiciones fisiológicas (37 °C, pH 7.4) y oxigenación constante con O₂/CO₂ (95:5 %). Posteriormente, el tejido fue contraído con KCl (3.3 µM) para comprobar la viabilidad el tejido y posteriormente con L-fenilefrina (1 µM) para inducir la contracción.

Los cambios registrados en la tensión producidos por los extractos y los compuestos purificados fueron registrados en un transductor de fuerza Grass® FT03 acoplado a un polígrafo Grass® 7D. El efecto farmacológico se evaluó a través de la construcción de curvas de concentración-respuesta acumuladas en un intervalo de dosis de 1, 3.16, 10, 31.6, 100, 316 y 1000 µg/ml. Los datos fueron registrados como porcentaje de vasodilatación con base a la contracción generada por la L-fenilefrina.

VII.16. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales presentes en los extractos metanólicos de la raíz de *H. longipes* por Espectrofotometría UV-Vis.

El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales se cuantificó mediante los métodos de Folin-Ciocalteu y Zhishen, respectivamente. Las determinaciones se realizaron un espectrofotómetro Uv-Vis (Bio-Rad® Benchmark Plus) a una longitud de 765 y 510 nm, respectivamente. Las curvas de calibración se elaboraron con los estándares de ácido gálico Sigma-Aldrich® (0.005 – 0.1 mg/mL) y catequina Sigma-Aldrich® (0.02 – 0.2 mg/mL). Los resultados fueron expresados en mEq de catequina y de ácido gálico (Luna-Vázquez *et al.* 2013).

VII.17. Elicitación biológica de ejemplares cultivados en condiciones de invernadero

Los elicitores biológicos utilizados en este estudio fueron de origen comercial. Se emplearon: peróxido de hidrógeno (Per) grado reactivo (J.T. Baker®, 30 % de pureza), ácido salicílico (Ás) grado reactivo (Meyer®, 99.0 % de pureza) y metil-jasmonato (MeJA) (Sigma Aldrich®, 95 % de pureza). Adicionalmente, se utilizó el extracto etanólico preparado a partir de las raíces de *H. longipes* (EHI) colectadas

en la localidad de Xichú, Guanajuato. El contenido de afinina en el extracto fue 345 mg de afinina/g de extracto.

Los ejemplares de *H. longipes* obtenidos por germinación de semillas fueron aclimatados en CI siguiendo el procedimiento descrito en la sección VII.3. Después de 3 semanas de aclimatación, los ejemplares fueron agrupados por tratamiento ($n=6$). Al grupo 1 se le adicionó Ás (10 mM), al grupo 2 Per (200 mM), al grupo 3 la combinación de Ás y Per a una concentración de 10 y 200 mM, respectivamente, al grupo 4 MeJA (40 mM), al grupo 5 EHI (lo equivalente a 345 mg de afinina). El grupo 6 fue utilizado como control, al cual se le adicionó únicamente agua de riego. Los tratamientos se aplicaron de manera foliar mediante aspersion a punta de gota, con aplicación cada 2 semanas antes de la apertura de las estomas para facilitar su absorción. Posterior a los 3 y 6 meses de tratamiento, se recolectaron los ejemplares en etapa de fructificación, definida por un mínimo de 80 % de flores con desarrollo de aquenios y formación de semillas.

VII.18. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ el error estándar de la Media (EEM) de 3 a 5 réplicas de las muestras independientes ($n=6$). Los resultados de la evaluación farmacológica fueron graficados en el software GraphPad Prism® v. 8.01, mientras que el resto de los resultados fueron graficados en SigmaPlot® v. 12.0. Las diferencias significativas fueron determinadas con ANOVA de una vía y finalmente una prueba de Tuckey *post hoc*.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1. Condiciones experimentales de cultivo

Con el propósito de caracterizar los ambientes de crecimiento utilizados en este estudio, se realizó un análisis edafológico de los sustratos correspondientes a las CS y CI. Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias importantes en las propiedades químicas, físicas e hídricas de ambos sustratos, las cuales podrían influir en la disponibilidad nutrimental, el crecimiento vegetal y la acumulación de metabolitos especializados en *H. longipes* (Cuadro 2).

El sustrato proveniente de la localidad de Beltrán, empleado en las CS, se caracterizó por presentar altas concentraciones de calcio y magnesio intercambiable, así como una elevada saturación por bases. En conjunto, estas características son consistentes con un suelo de reacción cercana a la neutralidad (pH 6.92), con una adecuada disponibilidad de cationes esenciales para el desarrollo vegetal y una importante capacidad amortiguadora frente a cambios en la química del suelo.

En cuanto a las propiedades físicas, el sustrato presentó una proporción considerable de limo y arcilla, lo que favorece una elevada capacidad de retención de agua, reflejada en los valores de capacidad de campo y punto de marchitez. Estas características pueden resultar particularmente relevantes bajo condiciones de disponibilidad hídrica variable, al contribuir al almacenamiento y conservación de agua en el suelo. Asimismo, los contenidos de materia orgánica oxidable y carbono orgánico sugieren condiciones favorables para la actividad microbiana y los procesos de mineralización de nutrientes.

También se identificaron algunas limitaciones potenciales relacionadas con la elevada densidad aparente y el desequilibrio observado en determinadas relaciones catiónicas podrían favorecer procesos de compactación y restringir parcialmente la aireación del suelo y el crecimiento radicular. Adicionalmente, estos factores podrían

influir en la disponibilidad de nutrientes y en la respuesta fisiológica de las plantas bajo condiciones naturales (Cuadro 2) (Matus *et al.* 2016).

Cuadro 2. Caracterización edafológica de los sustratos utilizados en CS y CI.

Parámetros	CS	CI
I. Nutrientes del suelo		
Nitrógeno (%)	0.115 ± 0.0071	0.35085 ± 0.0363
Fósforo (mg/kg)	75.602 ± 4.7482	378.5275 ± 38.1113
Potasio intercambiable (mg/kg)	373.037 ± 21.5616	2397.415 ± 231.9559
Calcio intercambiable (mg/kg)	1506.86 ± 56.3182	127.2802 ± 63.6401
Magnesio intercambiable (mg/kg)	403.45 ± 6.2432	318.76 ± 17.3880
Sodio intercambiable (mg/kg)	48.395 ± 5.6287	133.9625 ± 29.5930
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol ⁺ kg)	12.005 ± 0.3448	26.485 ± 1.1355
Saturación de calcio (%)	62.5925 ± 0.6120	64.9775 ± 1.7150
Saturación de magnesio (%)	27.9875 ± 0.8669	9.9025 ± 0.2757
Saturación de potasio (%)	7.9275 ± 0.2373	22.9725 ± 1.2916
Salinidad por sodio (%)	1.715 ± 0.1706	2.1475 ± 0.3945
Saturación por bases (%)	98.2575 ± 0.1593	97.8525 ± 0.3945
II. Caracterización y propiedades hidricas		
Textura (%)	52.32 ± 3.5360	81.04 ± 1.7321
Arcilla	18.46 ± 1.000	7.6 ± 0.6855
Limo	29.65 ± 1.4045	11.3600 ± 1.3076
Capacidad de campo (%)	19.77 ± 1.0894	9.3400 ± 0.6008
Punto de marchitez (%)	10.745 ± 0.5916	5.0750 ± 0.3246
III. Propiedades fisicoquímicas		
Humedad (%)	2.3525 ± 0.995	31.0300 ± 2.9137
Densidad aparente (g/cm ³)	2.6667 ± 2.6667	2.1674 ± 0.0820
Densidad real (g/cm ³)	2.0504 ± 2.0504	2.0950 ± 0.1540
Color Munsell (suelo seco)	5YR 5/3	5YR 4/3
Color Munsell (suelo húmedo)	5YR 2.5/2	5YR 3/2
IV. Condiciones de habitabilidad		
pH	6.9195 ± 0.0400	8.3365 ± 0.4867
Conductividad eléctrica (dSm ⁻¹)	0.2252 ± 0.0304	0.4110 ± 0.0364
Materia orgánica oxidable (%)	2.4 ± 0.03545	1.4554 ± 0.7277
Carbón orgánico (%)	1.39 ± 0.2080	4.0700 ± 0.4214
Relación Ca+Mg/K	11.43 ± 0.7783	3.1550 ± 0.2471
Relación Ca/K	7.91 ± 0.3281	2.8675 ± 0.2394
Relación Mg/K	2.2675 ± 0.2068	0.4350 ± 0.0520
Riesgo de apelmazamiento (Ca/Na)	3.515 ± 0.4571	34.1000 ± 7.0208

* Los parámetros evaluados en este cuadro se determinaron de acuerdo a la NOM-021-RENAC-2000. Especificaciones para estudios de muestreo y análisis de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

La caracterización del sustrato empleado en las CS evidenció carencias nutrimentales y una elevada capacidad de retención de agua. Considerando lo anterior, la formulación del sustrato para los ejemplares cultivados en CI se basó en el diseño propuesto por Parola-Contreras *et al.* (2020), con algunas modificaciones. El sustrato empleado en CI fue enriquecido con un mayor porcentaje de Peat Moss® con el objetivo de incrementar la retención de agua y mejorar la aireación, además de la adición humus para aumentar la disponibilidad de macronutrientes.

El sustrato utilizado en CI presentó mayores concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio intercambiable, así como una mayor capacidad de intercambio catiónico, lo cual indica una fertilidad química superior con respecto al sustrato de las CS. En cuanto a la textura, el sustrato en CI se clasificó predominantemente como arenoso, lo cual favorece una mejor aireación y drenaje. Así mismo, los valores de pH ligeramente alcalinos se asocian a un incremento en la conductividad eléctrica, lo cual refleja una mayor presencia de sales solubles con una mayor disponibilidad de nutrientes en el sustrato.

La temperatura máxima registrada en CI se observó durante el otoño (50.900 ± 1.300 °C), mientras que en CS se registró en verano (32.264 ± 0.729 °C). En contraste, las temperaturas mínimas en ambas condiciones se presentaron en invierno con valores de -1.728 ± 0.290 °C y 8.210 ± 0.9256 °C, respectivamente. En este sentido, ambas condiciones de cultivo presentaron contrastes térmicos muy marcados. La temperatura máxima registrada en ambas condiciones tiene una diferencia de 18.63 °C, mientras que en las temperaturas mínimas una diferencia de 9.938 °C. No obstante, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en todas las variables entre ambas condiciones en todas las estaciones del año (Ver Anexo 2). Los datos climáticos de los sitios experimentales se presentan en la Figura 4.

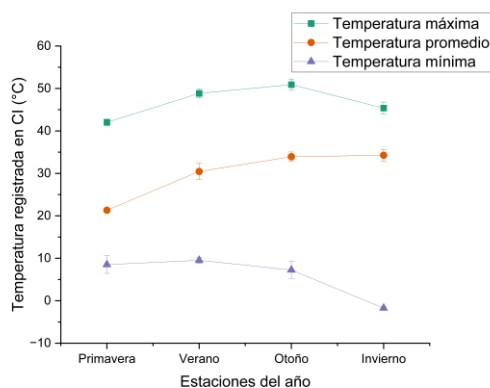
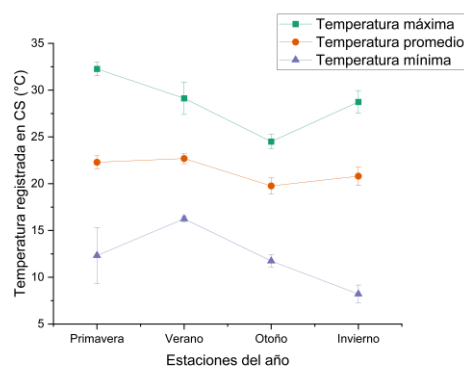
A**B**

Figura 4. Variación estacional de la temperatura máxima, mínima y promedio registrada en un termohigrómetro digital en A) CI y B) los datos meteorológicos registrados en CS obtenidos de smn.conagua.gob.mx. Los valores corresponden a la media $\pm$ EEM ($n=6$).

La humedad relativa registrada en CI no pudo compararse con las CS ya que los datos de la localidad no fueron reportados por la CONAGUA. No obstante, es importante señalar que la humedad relativa máxima dentro del invernadero alcanzó valores de $99 \pm 0 \%$ en verano y el $99 \pm 2.763 \%$ en otoño, mientras que la mínima se registró durante el verano con un valor de $13.00 \pm 0.0 \%$. Por otro lado, el registro de las precipitaciones en las CS durante el periodo de estudio se muestra en el Anexo 3.

Las áreas endémicas de *H. longipes* se caracterizan por presentar temperaturas medias anuales entre 18 y 20 °C y precipitaciones anuales de 600 a 800 mm (Cilia-López *et al.* 2013, 2014). En este contexto, las CI evaluadas en el presente estudio registraron una temperatura media anual superior (29.00 ± 3.02 °C) a la reportada para el hábitat natural de la especie. Por su parte, las condiciones silvestres presentaron una temperatura media anual de 20.80 ± 1.01 °C, valor cercano al intervalo descrito para las poblaciones naturales. Adicionalmente, durante el periodo de estudio se registró una precipitación de 2.59 ± 1.78 mm, valor considerablemente menor al reportado para las zonas endémicas de la especie (Cilia-López *et al.* 2013, 2014).

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que los ejemplares evaluados estuvieron expuestos a ambientes edáficos y climáticos contrastantes. Estas diferencias podrían influir significativamente en la disponibilidad de nutrientes, la disponibilidad hídrica y las condiciones de crecimiento de *H. longipes*, contribuyendo potencialmente a las variaciones observadas posteriormente en el desarrollo morfológico, la acumulación de afinina y la composición metabolómica de la especie.

VIII.2. Identificación de las etapas fenológicas

La identificación de las etapas fenológicas de *H. longipes* se realizó mediante la clasificación de cuatro estadios clave del desarrollo, definidos a partir de descriptores morfológicos específicos y su correspondiente codificación en la escala BBCH. La etapa de crecimiento vegetativo se identificó en la subetapa BBCH 19, caracterizada por el despliegue completo de nueve o más hojas verdaderas y una arquitectura foliar densa (Figura 5A). Este estadio coincide con lo reportado por Meier *et al.* (2009) para plantas herbáceas perennes, donde el establecimiento de una base foliar robusta constituye un requisito previo para la transición hacia el estado reproductivo.

La transición reproductiva, categorizada como etapa de floración, se definió estrictamente por la formación y desarrollo de botones florales, comprendiendo las subetapas BBCH 51 a 55. Durante este periodo, los ejemplares presentaron órganos florales visibles, pero aún cerrados, con los capítulos protegidos por las brácteas del involucre (Figura 5B). A diferencia de otros estudios, la antesis plena no fue incluida dentro de esta categoría, ya que se priorizó el análisis del estado de botón floral como el punto crítico de transición metabólica hacia la maduración reproductiva.

Posteriormente, la etapa de fructificación (FRS; BBCH 71–89) se identificó por la presencia de aquenios maduros localizados en el margen de la cabeza floral (Figura

5C). Este estadio representa una fase crítica dentro del ciclo fenológico de la especie, debido a que la maduración del fruto y el desarrollo de las semillas ocurren de manera simultánea mientras el receptáculo conserva aún tonalidades verdes y turgencia.

Durante esta etapa, los aquenios experimentan un proceso de endurecimiento y adquieren su pigmentación característica, evidenciando que las semillas, localizadas tanto en el margen como en el envés de la cabeza floral, han alcanzado su madurez fisiológica. Esta sincronía morfológica sugiere una translocación activa de nutrientes y fotoasimilados desde las estructuras fotosintéticas remanentes hacia los órganos de propagación. En consecuencia, este proceso marca el inicio del declive de la actividad vegetativa aérea, favoreciendo la acumulación de reservas energéticas en las semillas y preparando a la planta para la transición hacia la senescencia.

Finalmente, el estadio de defoliación se clasificó dentro de la subetapa de senescencia avanzada (BBCH 97). Esta fase se distinguió por la pérdida casi total de la lámina foliar y el marchitamiento de los tallos aéreos, marcando el inicio del estado de latencia del sistema radicular (Figura 5D). Como se mencionó previamente, la identificación de esta etapa únicamente fue posible en las CI, ya que la ausencia de marcadores visuales aéreos en las CS imposibilita la localización precisa de los individuos en su hábitat natural, de acuerdo con los criterios de muestreo establecidos por Meier *et al.* (2009).

La definición precisa de estas etapas fenológicas permitió establecer un marco de referencia para evaluar los cambios morfológicos, bioquímicos y metabolómicos asociados al desarrollo de *H. longipes*. Asimismo, esta clasificación facilitó la comparación de los efectos de las condiciones de cultivo y de los tratamientos de elicitación sobre la dinámica de crecimiento, la acumulación de biomasa y la producción de metabolitos especializados a lo largo del ciclo de vida de la especie.

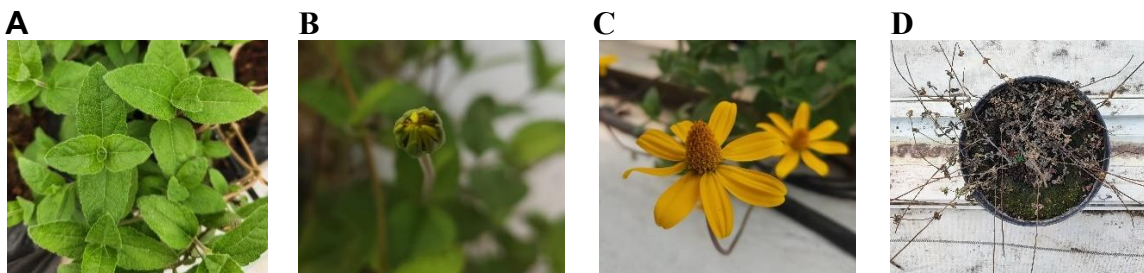


Figura 5. Etapas fenológicas identificadas en los ejemplares de *H. longipes* aclimatados en CS y CI. A) Etapa vegetativa (prefloración), B) etapa de floración (formación de botones florales), C) etapa de fructificación (desarrollo de aquenios y semillas) y D) etapa de defoliación (pérdida parcial o total de hojas).

VIII.3. Parámetros morfológicos

La aclimatación de los ejemplares de *H. longipes* en CI favoreció el crecimiento general de las plantas, reflejándose principalmente en una mayor acumulación de biomasa y en un desarrollo más pronunciado del sistema radicular en comparación con los individuos desarrollados bajo CS. Sin embargo, al analizar específicamente la altura del tallo principal, se observó que los ejemplares en las etapas vegetativa y de floración presentaron valores superiores en CS respecto a los cultivados en CI. En contraste, durante las etapas de fructificación y defoliación la altura del tallo alcanzó sus valores máximos, sin detectarse diferencias significativas entre ambas condiciones de cultivo (Figura 6A).

La longitud de la raíz mostró un comportamiento distinto al observado en la parte aérea. Los ejemplares cultivados en CI presentaron raíces significativamente más largas que los desarrollados en CS durante las etapas de floración, fructificación y defoliación, mientras que en la etapa vegetativa no se observaron diferencias entre ambas condiciones (Figura 6B). Estos resultados sugieren que las CI favorecieron principalmente el desarrollo del sistema radicular, mientras que el crecimiento aéreo estuvo influenciado tanto por la etapa fenológica como por las condiciones ambientales de cultivo.

La respuesta diferencial observada entre la parte aérea y el sistema radicular podría estar relacionada con las diferencias edafológicas descritas previamente para ambos sistemas de cultivo. En particular, la mayor disponibilidad de nutrientes y la

mayor capacidad de intercambio catiónico registradas en CI podrían haber favorecido el crecimiento radicular sostenido, mientras que las condiciones ambientales presentes en CS habrían promovido un mayor crecimiento inicial del tallo durante las primeras etapas del desarrollo.

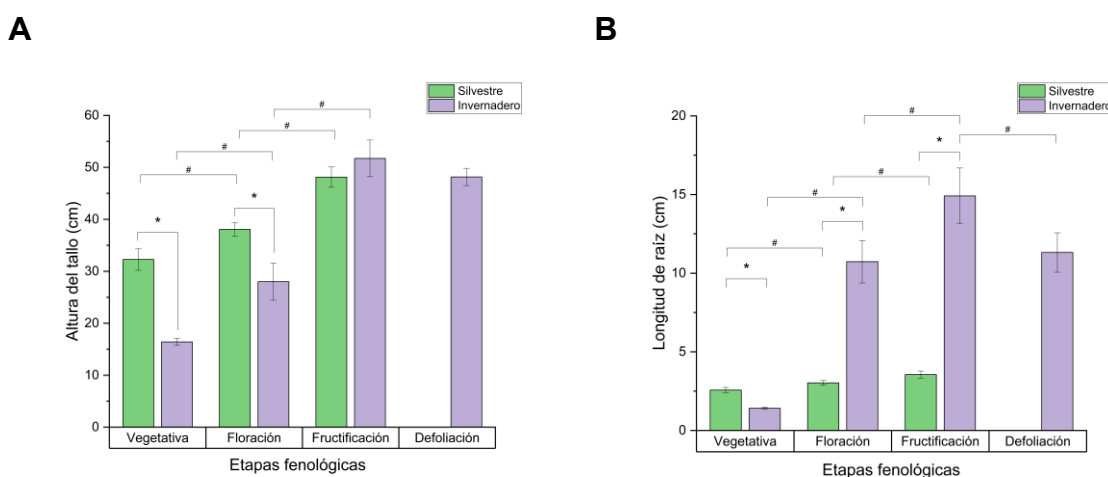


Figura 6. Parámetros morfológicos de los ejemplares cultivados en CS y de CI en diferentes etapas fenológicas: (A) altura del tallo y (B) longitud de la raíz. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

En términos de biomasa, los ejemplares cultivados en CI presentaron una mayor acumulación de biomasa total y radicular en comparación con aquellos desarrollados bajo CS. En ambas condiciones de cultivo, las etapas de fructificación y defoliación registraron los valores más altos para ambos parámetros, evidenciando una acumulación progresiva de materia vegetal conforme avanzó el desarrollo fenológico de la especie (Figura 7).

Estos resultados indican que la producción de biomasa en *H. longipes* se incrementa gradualmente a lo largo de su ciclo de desarrollo, alcanzando sus valores máximos durante las etapas finales. Asimismo, la mayor acumulación de biomasa observada en CI sugiere que las condiciones edafológicas y ambientales

de este sistema favorecieron el crecimiento de la especie, particularmente del sistema radicular. Este comportamiento es consistente con la mayor disponibilidad nutrimental y la mayor capacidad de intercambio catiónico registradas en el sustrato de CI (Cuadro 2), factores que pueden contribuir a una mayor eficiencia en la absorción de agua y nutrientes y, por consiguiente, a una mayor producción de biomasa.

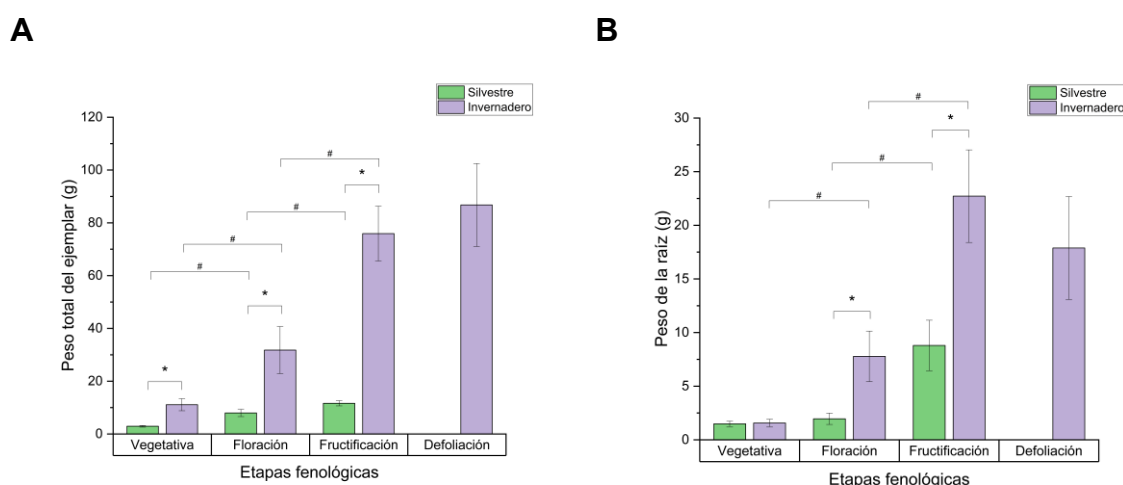


Figura 7. Parámetros morfológicos de los ejemplares cultivados en CS y CI en diferentes etapas fenológicas: (A peso del espécimen y (B peso de la raíz. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

La aclimatación de los ejemplares de *H. longipes* favoreció significativamente el crecimiento y la acumulación de biomasa en CI en comparación con los individuos desarrollados en CS. En este sentido, la sustitución del sustrato endémico por un sustrato enriquecido con macronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, tales como nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio y azufre, promovió el desarrollo de estructuras vegetativas y radicales, reflejándose en valores hasta 3.5 veces superiores en algunas de las variables evaluadas. Asimismo, la mayor capacidad de intercambio catiónico y la mayor disponibilidad nutrimental registradas

en CI (Cuadro 2) pudieron contribuir a una absorción más eficiente de agua y nutrientes, favoreciendo el crecimiento general de los ejemplares.

En conjunto, estos resultados sugieren que la disponibilidad y el equilibrio nutrimental influyen de manera importante en los procesos fisiológicos asociados al crecimiento de *H. longipes*. En contraste, el menor crecimiento observado en los ejemplares desarrollados en CS podría estar relacionado con las limitaciones nutrimentales y las características fisicoquímicas del sustrato local, las cuales podrían restringir parcialmente el desarrollo óptimo de la especie.

Independientemente de la condición de cultivo, los ejemplares mostraron una tendencia general de incremento en las variables de crecimiento y acumulación de biomasa conforme avanzaron las etapas fenológicas. Este comportamiento se mantuvo desde la etapa vegetativa hasta la fructificación, mientras que durante la defoliación se observó una ligera disminución en algunos parámetros morfológicos. No obstante, las etapas de fructificación y defoliación concentraron los valores más elevados para la mayoría de las variables evaluadas, indicando que el máximo desarrollo estructural de la planta ocurre durante las fases finales de su ciclo de crecimiento (Figura 6 y Figura 7).

El patrón observado es consistente con la secuencia ontogénica característica de las especies perennes, en las cuales el crecimiento vegetativo inicial es seguido por una fase de intensa acumulación de biomasa y desarrollo reproductivo, culminando posteriormente con procesos de senescencia aérea y preparación para los periodos de latencia. En este contexto, los resultados sugieren que *H. longipes* mantiene una acumulación progresiva de recursos durante gran parte de su ciclo fenológico, alcanzando su máximo desarrollo durante las etapas de fructificación y defoliación.

Las etapas previas a la fructificación se caracterizan por un crecimiento activo de las estructuras vegetativas y reproductivas, reflejado en el incremento progresivo de la talla y la biomasa observado en los ejemplares evaluados. Conforme la planta avanza hacia la fructificación, una proporción importante de los recursos fisiológicos se destina al desarrollo y maduración de frutos y semillas, procesos que representan una de las principales demandas metabólicas durante el ciclo reproductivo.

Posteriormente, una vez alcanzada la madurez reproductiva, la planta inicia gradualmente la transición hacia la senescencia. Durante esta etapa disminuye la actividad fisiológica de los órganos aéreos y se manifiestan cambios morfológicos asociados con el final del ciclo de crecimiento visible. Este comportamiento concuerda con la ligera disminución observada en algunos de los parámetros evaluados durante la defoliación. En conjunto, estos resultados respaldan que el máximo desarrollo estructural de *H. longipes* ocurre durante las etapas de fructificación y defoliación, seguido por el establecimiento progresivo de los procesos de senescencia característicos de las especies perennes.

VIII.4. Análisis metabólico por ^1H -RMN

Los espectros de ^1H -RMN obtenidos a partir de los extractos de diclorometano de la raíz de ejemplares de *H. longipes* cultivados en CS y CI durante las distintas etapas fenológicas revelaron un perfil metabólico complejo dominado por señales características de alcanidas. Los espectros adquiridos en CDCl_3 a 700 MHz, mostraron patrones espectrales consistentes entre las muestras, aunque con diferencias notables en la intensidad relativa de las señales localizadas en las regiones de desplazamiento químico correspondientes a cadenas alifáticas (δ_{H} 0.8–2.5 ppm), protones olefínicos (δ_{H} 5.0–6.5 ppm) y grupos funcionales asociados a amidas (δ_{H} 1.5–4.5 ppm) (Figura 8).

Las señales observadas en estas regiones espectrales coincidieron principalmente con las reportadas para la afinina, la alcanida mayoritaria previamente descrita en las raíces de *H. longipes*. En conjunto, los espectros obtenidos sugieren que este metabolito constituye uno de los principales componentes responsables del perfil químico de los extractos evaluados, las diferencias observadas en la intensidad indican variaciones metabólicas asociadas a las condiciones de cultivo y al avance de las etapas fenológicas.

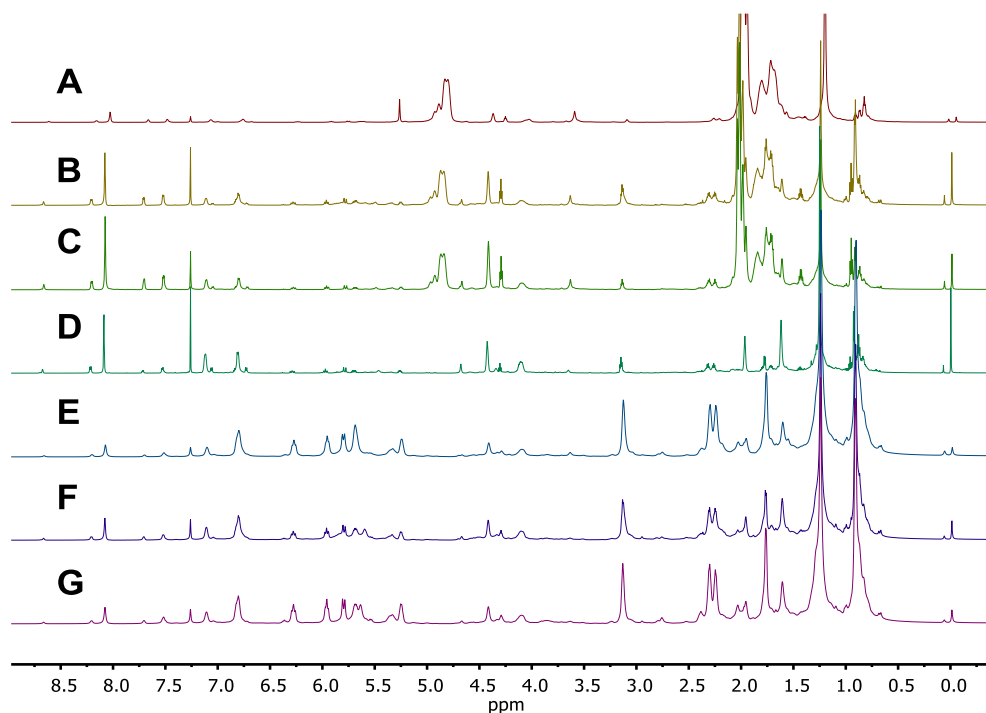


Figura 8. Espectros representativos de ^1H -RMN de extractos de diclorometano de raíces de *H. longipes* correspondientes a diferentes etapas fenológicas: A y D) etapa vegetativa; B y E) floración; C y F) fructificación; y G) defoliación. Los espectros mostrados corresponden a plantas cultivadas en CS (A–C) y en CI (D–G).

Durante el procesamiento de los espectros se identificaron señales exógenas que no correspondían al perfil metabólico de *H. longipes*. Entre ellas, se detectó una señal diferencial en la región de desplazamiento químico cercana a $\delta_{\text{H}} \sim 5.0$ ppm, presente exclusivamente en los extractos obtenidos de ejemplares cultivados en CS. El análisis detallado de los desplazamientos químicos y correlaciones H-C en los espectros 2D permitió identificar a este compuesto como acetato de polivinilo (PVAc) (ver Anexo 4). Un análisis exhaustivo de las posibles fuentes de contaminación permitió asociar el origen de este polímero al adhesivo empleado en el revestimiento de corcho de las tapas de los viales utilizados para el almacenamiento de las muestras (Figura 9).

En los mismos espectros, el análisis también permitió identificar el di-*n*-butil ftalato (DBP) (ver Anexo 5), confirmándose como un plastificante derivado de materiales empleados durante la preparación y manipulación analítica (Fankhauser-Noti *et al.*

2007). Las regiones espectrales asociadas con PVAc y DBP presentaron una mayor abundancia relativa en los espectros correspondientes a los ejemplares cultivados en CS.

Por otra parte, en los espectros correspondientes a los ejemplares cultivados en CI también se identificaron señales inconsistentes con el perfil metabólico endógeno de *H. longipes*. Los patrones observados coincidieron con reportes previos de contaminantes derivados de materiales plásticos (Bhaskar *et al.* 2014) y el análisis de los espectros permitió asignarlos al bisfenol A (BPA) y tereftalato de polibutileno (PBT) (de Souza *et al.* 1998; Zhou *et al.* 2013) (ver Anexos 6 y 7). Sin embargo, la presencia de ftalatos en muestras vegetales ha sido ampliamente documentada y puede estar asociada tanto a fuentes ambientales, incluyendo suelos contaminados, materiales agrícolas y deposición atmosférica, como al contacto con materiales poliméricos durante la manipulación y el procesamiento rutinarios (Frankhauser-Noti *et al.* 2007; Li *et al.* 2023). Debido a que estas señales estuvieron presentes de forma consistente en las muestras analizadas, se decidió conservarlas para los análisis posteriores y evaluar su posible influencia sobre los modelos multivariados.

El análisis exploratorio PCA (Figura 9A) utilizando los espectros de RMN de ^1H mostró que prácticamente todas las muestras se localizaron dentro de la elipse de confianza del 95 % de Hotelling T^2 . Aunque se identificó una muestra correspondiente a la etapa de defoliación como posible valor atípico, no se encontró una justificación biológica o experimental que sustentara su exclusión, por lo que todas las observaciones fueron conservadas para los análisis subsecuentes. El modelo PCA explicó una proporción considerable de la variabilidad de los datos ($R^2X(\text{cum})=0.935$) y presentó una adecuada capacidad predictiva ($Q^2(\text{cum})=0.837$) utilizando dos componentes principales.

En este modelo, no se observó una segregación de las muestras en función de la etapa fenológica. No obstante, los ejemplares correspondientes a la etapa vegetativa mostraron una separación parcial respecto al resto de los grupos, sugiriendo la existencia de diferencias metabólicas asociadas con las fases tempranas del desarrollo.

Con el objetivo de incrementar la capacidad discriminatoria del análisis, se construyó un modelo supervisado OPLS-DA (Figura 9B). Este modelo mostró una separación moderada de las muestras de acuerdo con la etapa fenológica ($R^2X(\text{cum})=0.805$; $Q^2(\text{cum})=0.201$). La influencia de las señales asignadas a ftalatos fue evaluada mediante análisis paralelos realizados con y sin dichas regiones espectrales. La consistencia observada entre los modelos obtenidos, cuyas métricas no presentaron diferencias relevantes, indicó que estas señales no alteraban sustancialmente la interpretación biológica de los datos.

El gráfico de puntuaciones mostró que la separación de las muestras ocurrió principalmente a lo largo de la variable latente predictiva $t[1]$, la cual explicó el 41.5 % de la variabilidad observada. Los ejemplares correspondientes a la etapa vegetativa fueron nuevamente el único grupo que presentó una separación parcial, ubicándose hacia el extremo negativo de $t[1]$, mientras que las muestras de floración, fructificación y defoliación mostraron un elevado grado de superposición.

Debido a esta limitada discriminación global, se priorizó el empleo de modelos OPLS-DA por pares en lugar de un modelo multiclase. Esta estrategia permitió evaluar de manera más precisa los cambios metabólicos asociados con transiciones fenológicas específicas, facilitando la identificación de biomarcadores diferenciales que podrían quedar enmascarados por la variabilidad acumulada a lo largo de todo el ciclo de desarrollo de la planta.

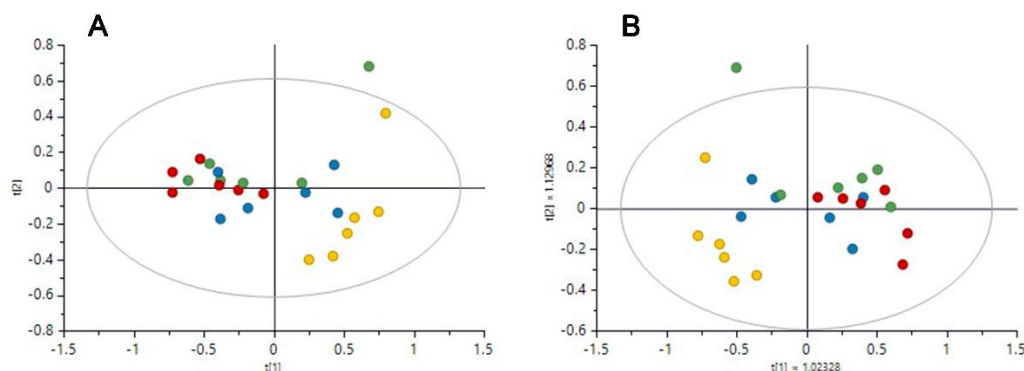


Figura 9. Análisis multivariado de extractos de diclorometano de muestras de *H. longipes* cultivadas en CI en diferentes etapas fenológicas: A) Gráfico de puntuación PCA y B) Gráfico de puntuación OPLS-DA. Los extractos se codificaron por colores considerando la etapa fenológica, con seis réplicas biológicas por grupo: vegetativa (amarillo), floración (azul), fructificación (rojo) y defoliación (verde).

El modelo OPLS-DA construido para las dos primeras etapas de desarrollo (Figura 10A) mostró una elevada robustez, con valores de $R^2X(\text{cum}) = 0.880$ y $Q^2(\text{cum}) = 0.879$, lo que indica una excelente capacidad descriptiva y predictiva. La variación explicada por el modelo se distribuyó en un componente predictivo $t[1]$ y dos componentes ortogonales, $t_0[1]$ y $t_0[2]$.

Durante la etapa vegetativa, el perfil de carga estuvo dominado por señales asociadas a cadenas alifáticas largas, consistentes con una composición metabólica enriquecida en compuestos de naturaleza lipídica, precursores de ácidos grasos y estructuras saturadas. En contraste, la etapa de floración mostró un desplazamiento del perfil metabólico hacia regiones espectrales típicamente asociadas con estructuras que contienen grupos amida. Aunque la superposición de señales sugiere que otros metabolitos estructuralmente relacionados podrían contribuir a estas señales, este patrón es consistente con una mayor participación de las alcanoides durante la transición hacia el desarrollo reproductivo.

Por otra parte, el modelo OPLS-DA con las etapas de floración y fructificación (Figura 10B) presentó una menor capacidad predictiva ($R^2X(\text{cum})=0.812$; $Q^2(\text{cum})=0.451$), lo que indica una mayor similitud metabólica entre ambas fases

reproductivas. El modelo estuvo constituido por un componente predictivo y un componente ortogonal. A pesar de la discriminación limitada, el perfil de carga reveló un incremento sostenido en la intensidad de las señales localizadas en regiones comúnmente asociadas con señales de alcamidas durante la etapa de fructificación.

La persistencia y el aumento progresivo de estas señales sugieren que las alcamidas continúan siendo componentes dominantes del perfil metabólico radicular de *H. longipes* a lo largo del desarrollo reproductivo. En conjunto, estos resultados indican que la transición de la etapa vegetativa a la floración implica una reorganización metabólica más marcada que la observada entre floración y fructificación, donde el perfil químico conserva gran parte de las características adquiridas durante el inicio de la fase reproductiva.

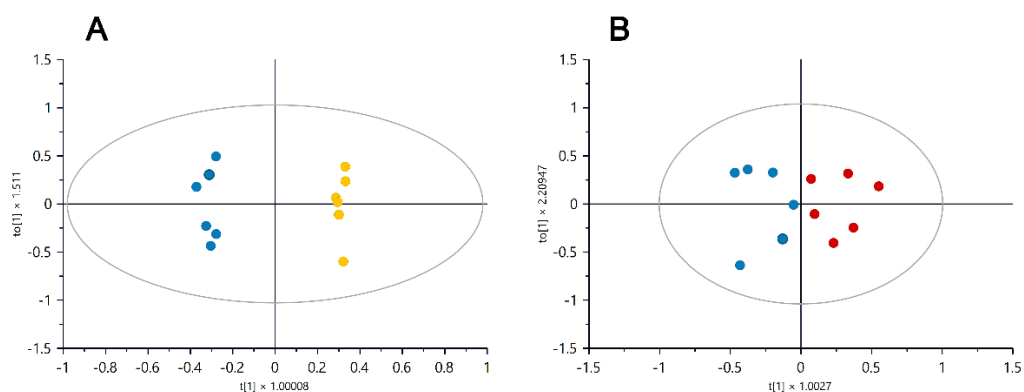


Figura 10. Gráficos de puntuación OPLS-DA que ilustran la discriminación metabólica en las distintas etapas fenológicas: A) vegetativa frente a floración y B) floración frente a fructificación. Las muestras se codificaron por colores según la etapa fenológica ($n=6$).

El análisis OPLS-DA con las etapas de fructificación y defoliación no generó un modelo predictivo válido, lo que indica una elevada similitud metabólica entre ambas fases del desarrollo. Este resultado es consistente con la limitada separación observada previamente en los análisis multivariados y sugiere que los principales cambios químicos asociados al desarrollo de *H. longipes* ocurren antes de la

fructificación, mientras que las etapas finales del ciclo fenológico conservan perfiles metabólicos altamente relacionados.

El análisis metabolómico basado en ^1H -RMN reveló que el perfil químico de los extractos estuvo dominado principalmente por señales atribuibles a la afinina. Entre las señales más representativas se identificaron aquellas asociadas con la porción isobutilo de esta alcanida, incluyendo los grupos metilo terminales en δ_{H} 0.96 ppm, el protón metino en δ_{H} 1.8–2.0 ppm y el grupo metileno adyacente al nitrógeno amida ($\text{N}-\text{CH}_2$) en δ_{H} 3.16 ppm, todos ellos característicos de estructuras que contienen grupos amida. Adicionalmente, la señal observada en δ_{H} 2.28 ppm fue asignada a protones alílicos presentes en la cadena carbonada insaturada.

Esta interpretación se vio reforzada por las señales localizadas en la región insaturada (δ_{H} 5.16–8.32 ppm), particularmente las señales observadas en δ_{H} 5.72, 5.88 y 6.28 ppm, consistentes con el sistema trieno conjugado característico de la afinina. Sin embargo, aunque la RMN permitió identificar claramente este metabolito como el componente predominante de los extractos, las alcanidas minoritarias no pudieron resolverse individualmente debido a su baja abundancia relativa y a la superposición de señales espectrales.

Considerando estas limitaciones analíticas y con el objetivo de caracterizar de manera más completa la composición química de las raíces de *H. longipes*, se implementó un enfoque fitoquímico complementario orientado al aislamiento y la identificación de las principales alcanidas presentes en el extracto de diclorometano. Para ello, se desarrolló un método de HPLC preparativa que permitió la purificación de los constituyentes mayoritarios, seguida de su elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas.

VIII.5. Obtención del extracto de diclorometano de la raíz de *H. longipes* y su fraccionamiento por CCA

El análisis metabólico por RMN indicó que la afinina constituía el metabolito predominante en los extractos de diclorometano de las raíces de *H. longipes*. Sin embargo, la presencia de señales superpuestas y la baja abundancia relativa de otras alcanidas limitaron su identificación individual mediante esta técnica. En consecuencia, se implementó una estrategia fitoquímica complementaria orientada al aislamiento e identificación de los constituyentes minoritarios presentes en el extracto, con el propósito de ampliar la caracterización química de la especie y complementar los resultados obtenidos mediante metabólica.

A partir de 3 kg de raíz seca de *H. longipes* recolectada en Xichú, Guanajuato, se obtuvieron 300 g de extracto de diclorometano, equivalente a un rendimiento aproximado del 10 % respecto al material vegetal inicial. Con el propósito de simplificar la compleja composición química del extracto y facilitar el aislamiento de sus principales constituyentes, éste fue sometido a un proceso de fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta.

Como resultado, se obtuvieron un total de 500 fracciones cromatográficas, las cuales fueron agrupadas con base en su similitud cromatográfica en 25 grupos finales. El sistema de elución empleado, la distribución de las fracciones obtenidas y sus respectivos rendimientos se presentan en el Cuadro 3. Este procedimiento permitió concentrar metabolitos estructuralmente relacionados en grupos específicos de fracciones, facilitando su posterior purificación e identificación estructural.

Cuadro 3. Fracciones obtenidas y el sistema de elución utilizado en CCA.

Fracciones colectadas	Sistema de elución	Proporción (v/v)	Intervalo de agrupación	Nombre del grupo	Rendimiento (g)
1-15	Hexano	100	1-14	F1	0.0002
16-26	Hexano/ Diclorometano	99:1	15-26	F15	0.0001
27-30		95:5	26-36	F26	0.0001
31-55		90:10	37-54	F37	0.0031
56-79		85:15	55-79	F55	0.0010
80-99		80:20	80-103	F80	0.0025
100-129		75:25	104-128	F104	0.0763
130-155		65:35	129-156	F129	0.0083
156-200		60:40	157-199	F157	0.0027
201-225		50:50	200-227	F200	0.0001
226-244		40:60	228-243	F228	0.0046
245-265		35:65	244-267	F244	0.0002
267-285		30:70	268-277	F268	0.0006
286-288		25:75	278-287	F278	0.0002
289-297		20:80	288-297	F288	0.0001
298-363		10:90	298-318	F298	0.0067
			319-363	F319	0.0023
265-400		95:05	364-383	F364	0.0044
			384-400	F384	0.964
401-420		99:01	401-421	F401	0.065
421-440	Diclorometano	100	422-438	F422	0.023
440-448	Diclorometano/ acetato de etilo	50:50	439-447	F439	0.010
449-485	Acetato de etilo	100	448-486	F448	0.037
480-495	Acetato de etilo/metanol	50:50	487-495	F487	0.045
496-500	Metanol	100	496-500	F496	1.546

El seguimiento cromatográfico de las fracciones mediante CCF, en conjunto con el registro de la masa recuperada, permitió identificar las fracciones candidatas para su análisis mediante técnicas cromatográficas preparativas.

VIII.6. Análisis cromatográfico del grupo F104 mediante CCF prep.

El perfil cromatográfico del grupo F104 mostró dos componentes mayoritarios con factor de retención de 0.125 y 0.229, que al ser reveladas con *p*-anisaldehído mostraron una coloración violeta y magenta, respectivamente (Figura 11A), características de triterpenos pentacíclicos (Secretaría de Salud *et al.* 2021). La adecuada resolución observada entre ambos componentes a nivel analítico, junto con el rendimiento obtenido para este grupo de fracciones, permitió seleccionar al grupo F104 para su posterior separación mediante cromatografía en capa fina preparativa. Esta estrategia permitió concentrar los compuestos de interés y facilitar su aislamiento para los análisis estructurales subsecuentes.

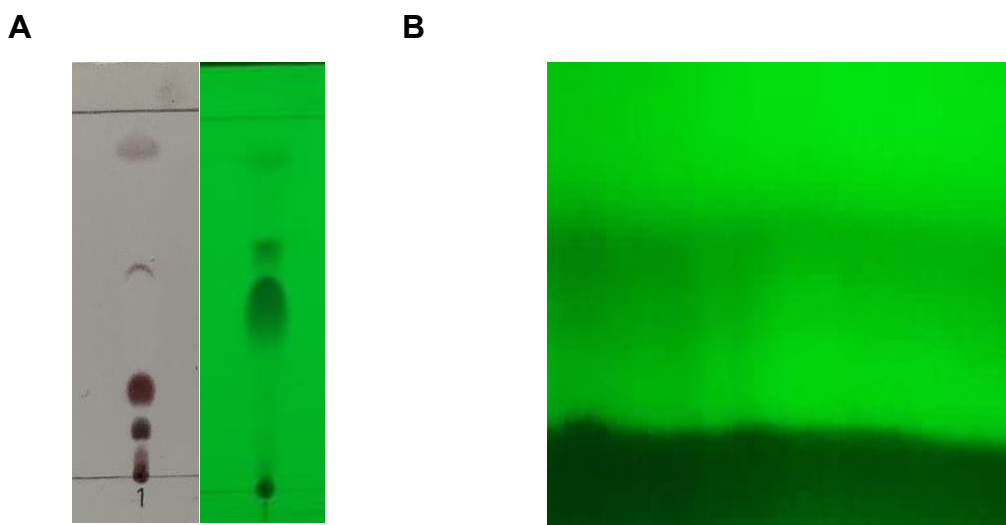


Figura 11. Análisis cromatográfico del grupo F104 en CCF A) analítica y B) preparativa revelada con *p*-anisaldehído y luz Uv a 254 nm, respectivamente. Sistema de elución de hexano/diclorometano en una proporción 1:1.

La separación cromatográfica mediante cromatografía en capa fina preparativa permitió el aislamiento de cuatro franjas bien definidas (Figura 11B), las cuales fueron enumeradas en orden de polaridad descendente. Los rendimientos individuales obtenidos para cada una de estas franjas se resumen en el Cuadro 4. La obtención de estas sub-fracciones permitió reducir la complejidad química del

grupo F104 y facilitó la posterior caracterización de sus constituyentes mayoritarios mediante técnicas espectroscópicas.

Cuadro 4. Rendimiento obtenido de las franjas obtenidas por CCF prep del grupo F104.

Numero de franja	Rendimiento (mg por cada 30 mg del grupo)
1A	5
2B	10
3C	1
4D	4

Las franjas recuperadas fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina utilizando el mismo sistema de elución, con el propósito de evaluar su composición y verificar el grado de pureza alcanzado tras el proceso de separación (Figura 12A). El análisis por cromatografía en capa fina bidimensional de las franjas 1 y 2 mostró la presencia de una única mancha sin evidencia de desdoblamiento o separación adicional, lo que sugiere un elevado grado de pureza cromatográfica para ambos compuestos (Figura 12B-C).

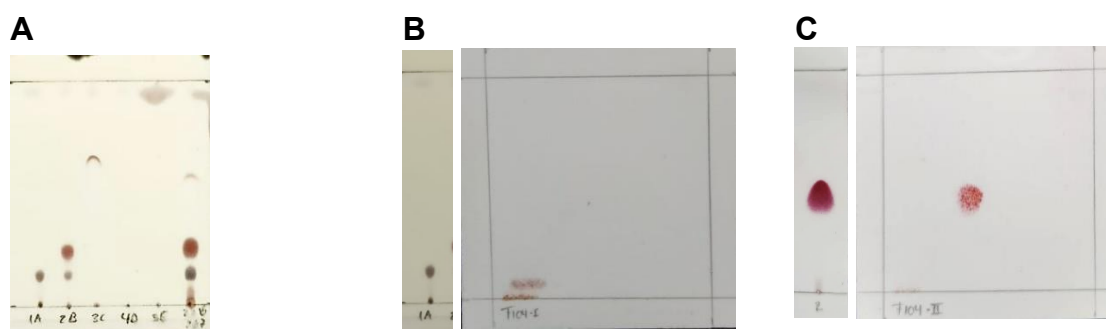


Figura 12. Análisis cromatográfico por CCF uni y bidimensional de las franjas recuperadas por CCF prep: A) las franjas recuperadas y las franjas mayoritarias, B) compuesto 1A y C) compuesto 2B revelada con *p*-anisaldehído. Sistema de elución de hexano/diclorometano en una proporción 1:1.

En este sentido, considerando la masa recuperada y el elevado grado de pureza cromatográfica observado para esta fracción, el compuesto 2B fue seleccionado para su posterior análisis mediante RMN, con el propósito de avanzar en su identificación estructural.

VIII.7. Análisis cromatográfico del grupo F384 mediante CCF y HPLC-DAD.

El análisis inicial del grupo F384 mediante cromatografía en capa fina reveló la presencia de un componente mayoritario con un factor de retención de 0.50, el cual desarrolló una coloración café tras el revelado con *p*-anisaldehído (Figura 13A-B). De acuerdo con los criterios cromatográficos descritos previamente, esta coloración es característica de las alcaloides (Secretaría de Salud *et al.* 2021).

Con el propósito de avanzar en la identificación preliminar de este compuesto, se realizó un análisis comparativo mediante cromatografía en capa fina utilizando un estándar comercial de afinina (Chromadex®). La coincidencia observada tanto en la coloración como en el valor de factor de retención entre ambas muestras sugiere que la afinina constituye el principal componente presente en el grupo F384 (Figura 13C). No obstante, esta asignación se consideró preliminar y fue posteriormente corroborada mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas complementarias.

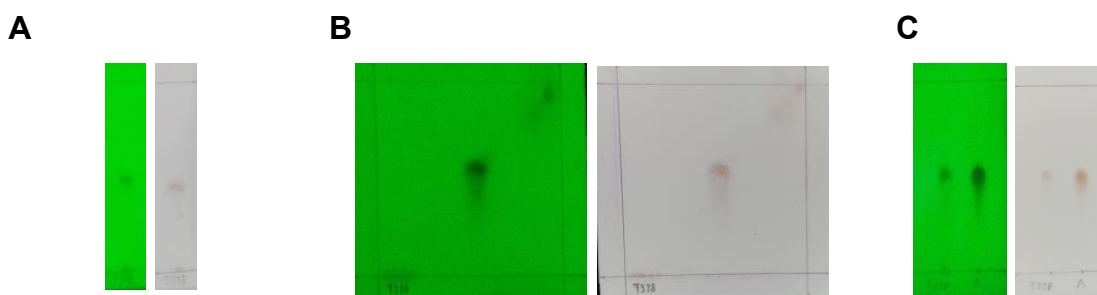


Figura 13. Análisis cromatográfico por CCF A) uni y B) bidimensional del grupo F384 y C) su comparación con afinina reveladas con luz Uv a 254 nm y *p*-anisaldehído. Sistema de elución de hexano/acetato de etilo en una proporción 6:4.

Por otro lado, el análisis del grupo F384 mediante cromatografía en capa fina bidimensional indicó que no correspondía a un compuesto puro, sino a una mezcla de constituyentes con elevada similitud estructural, los cuales no pudieron resolverse adecuadamente mediante este sistema cromatográfico. Estos resultados evidenciaron las limitaciones de la CCF para separar los componentes presentes en esta fracción, por lo que se recurrió a la cromatografía líquida de alta resolución con el propósito de incrementar la capacidad de resolución y caracterizar con mayor precisión su composición química.

El cromatograma analítico del grupo F384 reveló la presencia de al menos siete componentes mayoritarios con tiempos de retención (TR) de 25.279, 32.014, 33.503, 35.635, 38.881, 63.103 y 65.829 minutos (Figura 14). La presencia de múltiples señales cromatográficas confirmó que el grupo correspondía a una mezcla compleja de metabolitos estrechamente relacionados, lo que explica la limitada separación observada previamente mediante CCF bidimensional.

Con el objetivo de determinar cuál de estos siete picos correspondía al constituyente principal identificado preliminarmente como afinina mediante CCF, se realizó un enriquecimiento del grupo F384 con un estándar de referencia de este compuesto. Esta estrategia permitió establecer la correspondencia entre el pico cromatográfico del estándar y los componentes presentes en la muestra, facilitando su identificación dentro del perfil cromatográfico obtenido.

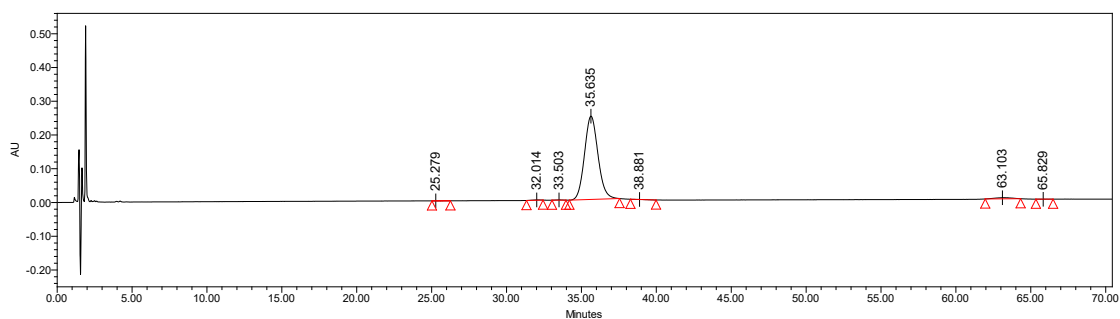
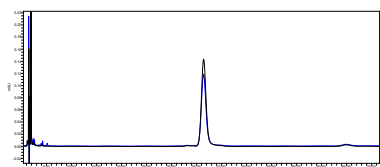


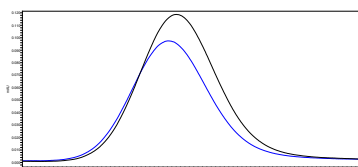
Figura 14. Cromatograma analítico del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.12.

El análisis comparativo confirmó que el pico con un TR de 35.635 min correspondía a la afinina, dado que el espectro de absorción ultravioleta no mostró desdoblamiento del pico (Figura 15A-B) y registró a una longitud de onda máxima idéntica ($\lambda_{\text{máx}}$) (Figura 15C-D).

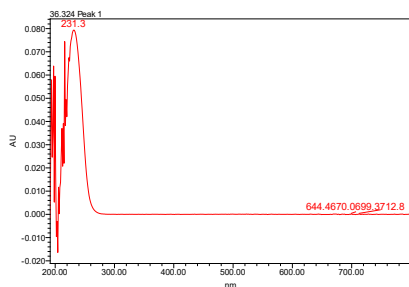
A



B



C



D

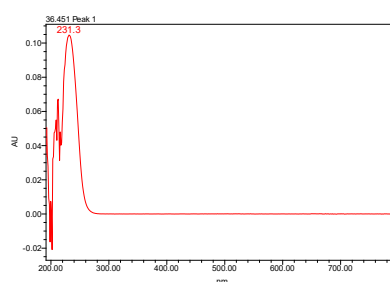


Figura 15. Cromatograma analítico del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). A y B) enriquecimiento del grupo F384 con afinina y C y D) $\lambda_{\text{máx}}$ del grupo y de la afinina. Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.12.

Finalmente, el método de HPLC preparativa desarrollado permitió la separación y el aislamiento individual de los siete componentes mayoritarios previamente detectados en el análisis cromatográfico analítico del grupo F384. Los compuestos fueron recolectados de manera individual conforme a su orden de elución y a sus respectivos tiempos de retención, permitiendo la obtención de fracciones enriquecidas para su posterior caracterización estructural.

El cromatograma preparativo correspondiente al grupo F384 se presenta en la Figura 16, mientras que los rendimientos obtenidos para cada uno de los compuestos aislados se muestran en el Cuadro 5. La resolución alcanzada mediante este método permitió recuperar de forma independiente los principales constituyentes de la fracción, proporcionando material suficiente para los análisis espectroscópicos subsecuentes.

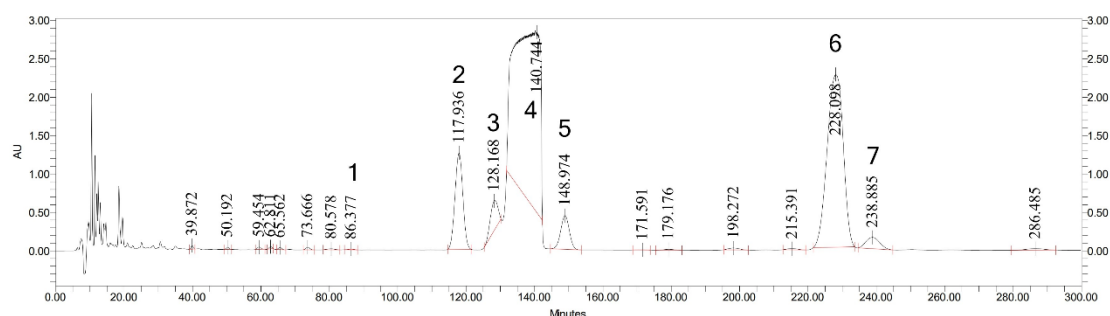


Figura 16. Cromatograma preparativo por HPLC-DAD del grupo F384 ($\lambda=236$ nm). Las condiciones de análisis se muestran en la sección VII.10.

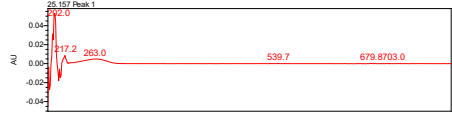
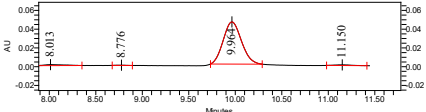
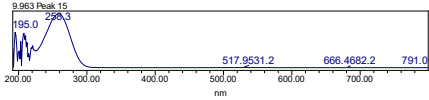
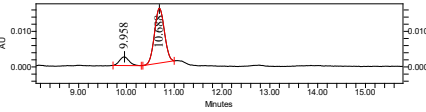
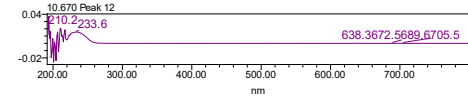
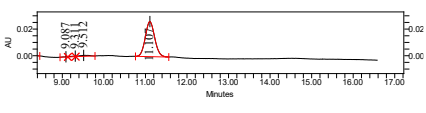
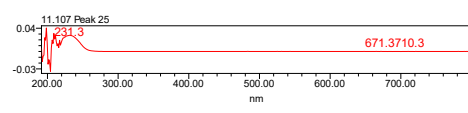
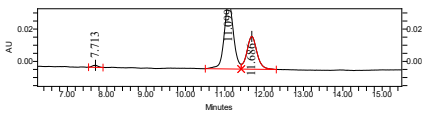
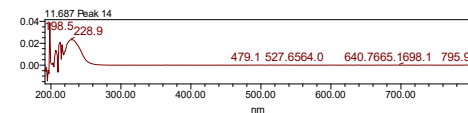
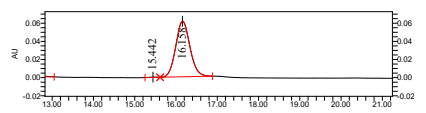
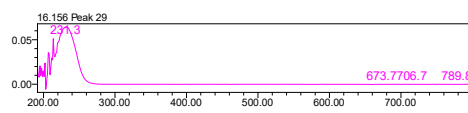
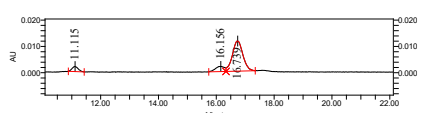
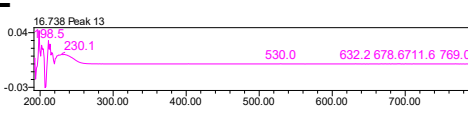
Es importante destacar que la afinina representó el 78.92 % del contenido total de las alcanidas presentes en este grupo, lo que confirma su predominancia dentro del perfil cromatográfico obtenido. Esta elevada abundancia relativa es consistente con los resultados previamente observados mediante RMN y HPLC-DAD, los cuales señalaron a la afinina como el principal constituyente químico de las raíces de *H. longipes*. En conjunto, estos hallazgos respaldan que esta alcanida constituye el metabolito especializado predominante de la especie y uno de los principales responsables de las variaciones observadas en el perfil químico radicular.

Cuadro 5. Rendimiento de los compuestos purificados del grupo F384 por HPLC-DAD prep.

Número de pico	TR (minutos)	Rendimiento (mg por cada 200 mg del grupo)
1	86.377	8.2
2	117.936	5.0
3	128.168	1.7
4	140.744	97.8
5	148.974	3.1
6	228.098	5.0
7	238.885	2.1

Adicionalmente, se caracterizó el perfil de absorción ultravioleta de los metabolitos aislados con el propósito de obtener información complementaria sobre sus sistemas cromóforos. Los valores de longitud de $\lambda_{\text{máx}}$ determinados para cada compuesto purificado se presentan en el Cuadro 6. Los máximos de absorción observados son consistentes con la presencia de sistemas de dobles enlaces conjugados y enlaces triples característicos de las alcanidas, en concordancia con lo reportado por Cheng *et al.* (2015). En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia espectroscópica adicional que respalda la naturaleza estructural de los compuestos aislados y complementa la información obtenida mediante los análisis cromatográficos realizados previamente.

Cuadro 6. Los cromatogramas y las $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos purificados por HPLC-DAD prep.

No. de pico	Cromatograma del pico purificado	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	ND	
2	A 	G 
3	B 	H 
4	C 	I 
5	D 	J 
6	E 	K 
7	F 	L 

ND: No determinado

Finalmente, con el objetivo de establecer su identidad química, los compuestos fueron sometidos a análisis por RMN para su elucidación estructural.

VIII.8. Elucidación estructural de los compuestos purificados

VIII.8.1. Identificación del compuesto 2B del grupo F104.

El espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 2B presentó un total de 32 señales de carbono, lo que sugirió la presencia de un derivado triterpénico pentacíclico. Tanto el número de carbonos observados como la distribución de sus desplazamientos químicos son consistentes con los patrones reportados para compuestos pertenecientes a esta clase estructural (Zakiri *et al.* 2023).

Entre las señales más relevantes destacó la observada en δ_c 171.09 ppm, característica de un carbono carbonílico asociado a un grupo acetato. Asimismo, se identificó una resonancia en δ_c 81.0 ppm atribuible a un carbono oxigenado (C-3), junto con señales en δ_c 150.97 ppm y δ_c 109.9 ppm correspondientes a un sistema olefínico terminal formado por los carbonos C-20 y C-29, respectivamente. Este último constituye una de las características estructurales más representativas del grupo isopropenilo presente en los triterpenos tipo lupano (Figura 17).

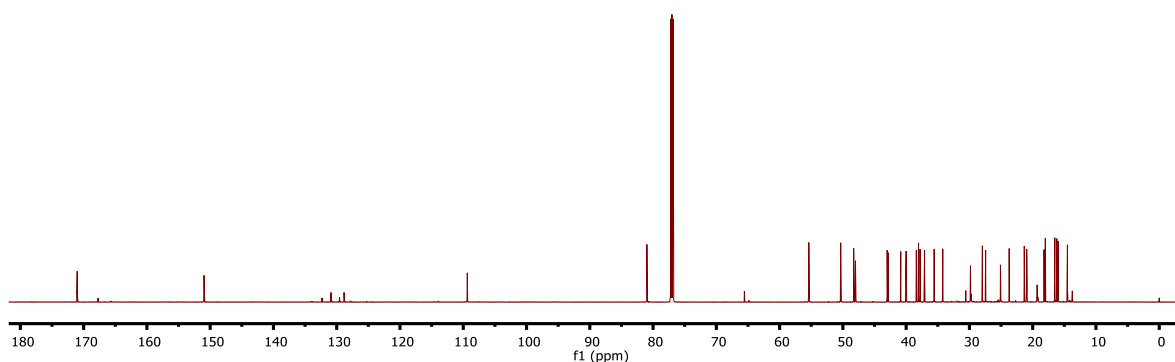


Figura 17. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 2B purificado por CCF prep (CDCl_3 , 175 MHz)

Por otra parte, el espectro de ^1H -RMN mostró seis singuletes intensos en la región de campo alto, con desplazamientos químicos en δ_H 0.78, 0.83, 0.84, 0.85, 0.94 y 1.03 ppm. Estas señales corresponden a protones de grupos metilo unidos a

carbonos cuaternarios, una característica distintiva de los triterpenos pentacíclicos. La presencia de múltiples señales metílicas intensas en esta región es consistente con la elevada sustitución alifática característica del esqueleto lupánico (Figura 18). En conjunto, este patrón de señales constituye una evidencia adicional que respalda la asignación preliminar del compuesto 2B como un triterpeno pentacíclico de tipo lupano.

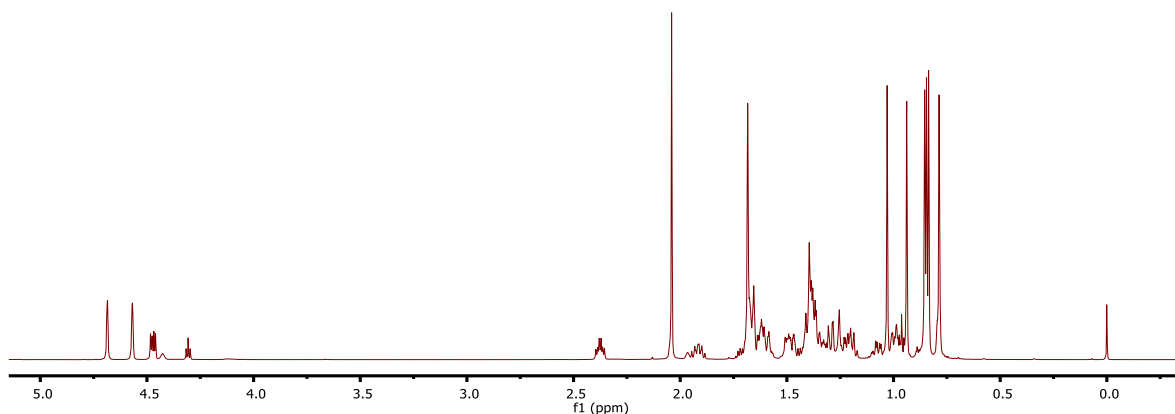


Figura 18. Espectro de ¹H-RMN del compuesto purificado por CCF prep (CDCl₃, 700 MHz).

En el Cuadro 7, se muestra las señales que sustentan la propuesta de identidad del compuesto del compuesto 2B como acetato de lupeol.

Cuadro 7. Comparación de los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN del compuesto 2B del grupo F104 con los reportados para el acetato de lupeol.

Posición	Datos del compuesto 2B del grupo F104 (CDCl_3 , 700 MHz)		Datos reportados para el acetato de lupeol (CDCl_3 , 700 MHz) (Zakari <i>et al.</i> 2023)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, J (Hz), integración	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, J (Hz), integración
1	40.0	-	39.99	1.64, t (2.8), 2H
2	38.4	-	38.03	1.03, q (3.8), 2H
3	80.98	4.49,	80.98	4.6, dd (3.3, 4.3), 1H
4	43.00	-	42.99	-
5	48.01	-	48.00	2.39, ddd (6.9, 7.5, 7.9), 1H
6	35.57	-	35.56	1.58, q (5.6), 2H
7	34.21	-	34.20	1.6, t (5.3), 2H
8	37.09	-	37.08	-
9	-	-	48.68	1.06, t (7.2), 1H
10	42.83	-	42.81	-
11	29.84	-	29.82	1.07, q (1.4), 2H
12	-	-	27.92	1.37, q (8.5), 2H
13	27.95	-	27.94	1.04, q (3.7), 1H
14	21.33	-	21.33	2.07, t (1.3), 1H
15	-	-	21.31	2.09, q (9.4), 1H
16	25.10	-	25.08	1.37, d (8.5), 2H
17	-	-	21.30	-
18	-	-	21.29	1.06, t (8.9), 1H
19	48.29	-	48.28	1.61, q (4.8), 1H
20	150.97	-	150.96	-
21	23.72	-	23.71	1.69, q (5.6), 2H
22	-	-	21.32	1.66, t (6.4), 2H
23	19.29	1.05, s, 3H	19.28	1.69, s, 3H
24	18.01	0.81, s, 3H	17.99	0.79, s, 3H
25	16.50	0.86, s, 3H	16.49	0.79, s, 3H
26	28.02	0.87, s, 3H	16.35	1.03, s, 3H
27	16.19	0.88, s, 3H	16.17	0.79, s, 3H
28	15.98	1.05, s, 3H	15.97	1.03, s, 3H
29	109.36	4.59	109.35	4.57, dd, (3.9, 4.2), 2H
		4.71		
30	55.38	0.81	55.37	0.79, s, 3H
1'	O		O	-
2'	171.02		171.02	-
3'	-		57.53	0.87, s

s: singulete, brs: singulete ancho, d: doblete, brd: doblete ancho, dd: doblete de dobles, ddd: doblete de dobles de dobles, dddd: doblete de dobles de dobles de dobles, dtd: doblete de tripletes de dobles, dddt: doblete de dobles de dobles de tripletes, t: triplete, q: cuarteto, dt: doblete de tripletes, dq: doblete de cuartetos, ddp: doblete de dobles de pentetes, m: multiplete.

VIII.8.2. Identificación del compuesto correspondiente al pico 1 del grupo F384.

El espectro de ^{13}C -RMN del pico recolectado a un TR de 86.377 mostró un total de 30 señales de carbono, entre las cuales destacaron dos a δ_c 171.11 y 166.30 ppm que revelaron la existencia de dos grupos carbonilo de tipo amida. El carácter cuaternario de ambos carbonos se corroboró por la ausencia de correlaciones en el experimento de ^1H y ^{13}C en HSQC. El espectro COSY mostró dos sistemas de espín

independientes, mientras que las correlaciones HMBC asociaron el carbonilo de δ_C 166.33 ppm únicamente con el sistema de espín integrado por las señales H-1' (δ_H 3.15), H-2 (δ_H 5.79) y H-3 (δ_H 6.88). Asimismo, el carbonilo de δ_C 171.11 ppm presentó correlaciones exclusivas con un segundo conjunto de señales H-1' (δ_H 3.15), H2 (δ_H 2.96) y H3 (δ_H 5.59) sin observarse correlaciones de largo alcance entre ambos sistemas. Estos resultados demostraron que las señales correspondían a dos compuestos diferentes en la muestra.

El análisis de las correlaciones observadas en los experimentos HSQC, COSY y HMBC permitió identificar un primer fragmento estructural correspondiente al sustituyente unido al nitrógeno de la amida. La señal del metilo H-3' (δ_H 0.92, d, J = 6.71 Hz) presentó correlaciones HMBC con C-1', C-2' y C-3', además de una correlación COSY con H-2', lo que evidenció su unión al metino C-2. A su vez, el protón H-2' (δ_H 1.78, m) mostró correlaciones COSY con H-1' y H-3', así como correlaciones HMBC con C-1' y C-3', lo que permitió establecer la secuencia CH₃-CH-CH₂. Finalmente, el metileno H-1' (δ_H 3.15, dd, J = 6.86, 6.09 Hz) presentó correlación COSY con el protón NH (δ_H 5.43, bs) y correlaciones HMBC con el carbonilo C-1 (δ_C 166.33 ppm) y los carbonos C-1' y C-2', lo que confirmó que este fragmento correspondía a un grupo *N*-isobutilo unido al nitrógeno de una amida (ver anexo 8).

El análisis de la cadena carbonada mostró un sistema olefínico constituido por los protones H-1 (δ_H 5.79, t, J = 1.59 Hz) y H-2 (δ_H 6.81, t, J = 6.88 Hz). Ambos protones presentaron correlación mutua en el experimento COSY. El protón H-1 mostró correlaciones HMBC con el carbonilo C-1 y el metileno C-4, lo que ubicó el doble enlace en posición α,β con respecto a la amida. De manera complementaria, H-2 presentó correlaciones HMBC con C-1, C-2, C-3 y C-4, lo cual confirmó la continuidad de la cadena carbonada. La secuencia alifática continuó con los metilenos H-4, H-5, H-6 y H-7, los cuales presentaron correlaciones consecutivas en el experimento COSY (H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-6 y H-6/H-7), lo que permitió establecer de forma inequívoca la continuidad del esqueleto carbonado. Las correlaciones de largo alcance observadas en el experimento HMBC reforzaron esta

asignación, ya que H-4 correlacionó con C-2, C-3, C-5 y C-6, H-5 con C-3, C-4, C-6 y C-7, H-6 con C-4, C-5, C-7 y C-8, y H-7 con C-6, C-7, C-8, C-9, C-10 y C-11. Estas últimas correlaciones resultaron particularmente importantes, ya que establecieron la conexión entre la cadena metilénica y el sistema acetilénico terminal.

En la región de carbono *sp*, el espectro de ^{13}C -RMN mostró cuatro señales a δ_{C} 77.85 (C-8), 68.48 (C-9), 68.59 (C-10) y 65.16 ppm (C-11) con desplazamientos químicos característicos de un sistema diacetilénico. La ausencia de correlaciones en el experimento HSQC confirmó que C-8, C-9 y C-10 correspondían a carbonos acetilénicos no protonados. En contraste, C-11 presentó una correlación directa con el protón terminal H-11 (δ_{H} 1.96, t, $J = 1.18$ Hz), mientras que las correlaciones HMBC observadas desde H-11 permitieron establecer la posición del sistema diino en el extremo de la cadena carbonada.

La integración de todas las correlaciones observadas en los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió reconstruir la conectividad completa del compuesto, desde el sustituyente unido al nitrógeno hasta el sistema diacetilénico terminal. Posteriormente, la comparación de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento con los datos reportados en la literatura permitió establecer la identidad del compuesto como *N*-isobutilundeca-2(*E*)-en-8,10-diinamida.

La asignación completa de las señales de ^1H y ^{13}C RMN se presenta en el Cuadro 8, donde se comparan los valores experimentales obtenidos en este estudio con los reportados previamente por Alperth *et al.* (2024). La elevada concordancia observada entre ambos conjuntos de datos respalda la identificación propuesta para este compuesto.

Cuadro 8. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C RMN del pico 1 del grupo F384 y los reportados para *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida.

Posición	Datos del pico 1 del grupo F384 (CDCl_3 , 700 MHz)		Datos reportados para <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>)-en-8,10-diínamida (CDCl_3 , 700 MHz) (Alperth et al. 2024)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración
1	166.33	-	165.9	-
2	124.21	5.79, t (1.59)	124.1	5.78, d (15.2)
3	143.91	6.81, t (6.88)	143.8	6.82, dt, (15.2, 7.0)
4	31.60	2.20, m	31.3	2.20, q (6.3)
5	27.46	1.58, m	27.2	1.58
6	27.41	1.58, m	27.4	1.58
7	19.05	2.28, 7d, (6.99, 1.29)	18.9	2.28, m
8	77.85	-	77.9	-
9	68.48	-	65.0	-
10	68.59	-	68.4	-
11	65.16	1.96, t, 1.18	64.7	1.97, s
1'	46.98	3.15, dd, (6.86, 6.09)	46.9	3.16, t (6.4)
2'	28.79	1.78, m	28.6	1.80, m
3'	20.25	0.92, d (6.71)	20.2	0.93, d (6.5)
4'	20.25	0.92, d (6.71)	20.2	0.93, d (6.5)
-NH		5.43, brs	-	5.44, brs

s: singulete, brs: singulete ancho, d: doblete, brd: doblete ancho, dd: doblete de dobles, ddd: doblete de dobles de dobles, dddd: doblete de dobles de dobles de dobles, dtd: doblete de tripletes de dobles, dddt: doblete de dobles de dobles de tripletes, t: triplete, q: cuarteto, dt: doblete de tripletes, dq: doblete de cuartetos, ddp: doblete de dobles de pentetes, m: multiplete.

Por otro lado, las señales del segundo esqueleto estructural asociado al carbonilo a δ_{C} 171.11 ppm permanecieron prácticamente invariables en comparación con el compuesto previamente descrito, particularmente aquellas correspondientes al grupo *N*-isobutilamida y al sistema 8,10-diínico, lo que indicó que ambos compuestos comparten el mismo esqueleto molecular.

La principal diferencia estructural con respecto al isómero *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida radica en el desplazamiento del doble enlace hacia la posición Δ^3 , lo que elimina la conjugación directa entre el sistema olefínico y el grupo carbonilo de la amida. Esta modificación estructural se reflejó en los espectros de RMN, donde el carbono α al carbonilo se observó como un metileno a δ_{C} 40.68 ppm (C-2) con una señal de protón a δ_{H} 2.96 ppm (m). Las correlaciones HMBC desde H-2' hacia el carbonilo (C-1, δ_{C} 171.11 ppm) y los carbonos olefínicos C-3 (δ_{C} 123.76 ppm) y C-4 (δ_{C} 134.52 ppm), en conjunto con la correlación COSY entre H-3 y H-4 (δ_{H} 5.59 ppm) confirmaron su posición adyacente al grupo amida y sustentaron el desplazamiento del doble enlace respecto al isómero Δ^3 .

De manera consistente, el sistema olefínico presentó señales a δ_C 123.76 (C-3) y 134.52 ppm (C-4), ambas asociadas a protones a δ_H 5.59 ppm. Las correlaciones HMBC de H-3 con C-2 y C-5, así como las correlaciones COSY entre H-4 y H-5, permitieron establecer la continuidad de la cadena carbonada. Asimismo, las correlaciones de largo alcance observadas para H-5 hacia C-3, C-4, C-6 y C-7 confirmaron la conexión entre el sistema olefínico y la porción correspondiente al sistema diacetilénico.

El sistema diíno terminal conservó desplazamientos químicos prácticamente idénticos a los del isómero *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida, con señales a δ_C 77.85 (C-7), 68.48 (C-9), 68.59 (C-10) y 65.16 ppm (C-11). De igual forma, las correlaciones HMBC del metileno adyacente (H-7) hacia C-8, C-9, C-10 y C-11 confirmaron que esta región permanecía inalterada. En conjunto, la ausencia de variaciones significativas en esta zona indicó que la diferencia estructural entre ambos compuestos se limita al desplazamiento del doble enlace dentro de la porción insaturada de la porción amida (ver Anexo 9).

En contraste, el grupo *N*-isobutilamida presentó desplazamientos químicos y patrones de correlación bidimensional idénticos a los del compuesto previamente elucidado, lo que evidenció la conservación de este fragmento estructural. En consecuencia, ambos compuestos comparten el mismo esqueleto molecular y difieren únicamente en la posición del enlace olefínico, por lo que se clasifican como isómeros constitucionales de posición.

Finalmente, tras una revisión exhaustiva de la literatura, no se encontraron reportes previos de *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida aislado de *H. longipes*. Por lo tanto, su asignación estructural se sustentó en el análisis comparativo de los datos de 1H y ^{13}C RMN, así como de las correlaciones obtenidas en los experimentos COSY, HSQC y HMBC, respecto al isómero *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida, cuya estructura ha sido previamente descrita (Alperth *et al.*, 2024).

VIII.8.3. Identificación del compuesto correspondiente al pico 2 del grupo F384.

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto correspondiente al pico recolectado con TR de 117.936 min del grupo F384 mostró un total de 15 señales de carbono, entre las cuales destacó una señal a δ_{C} 166.30 ppm correspondiente al carbonilo de una amida. La ausencia de correlación en el experimento HSQC confirmó el carácter cuaternario de este carbono. El análisis conjunto de los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió establecer la presencia de una alcanida con un fragmento *N*-isobutil y una cadena acíclica constituida por un sistema dieno conjugado y un sistema diacetilénico terminal.

El fragmento correspondiente al sustituyente unido al nitrógeno de la amida fue identificado como un grupo *N*-isobutilo. Las señales correspondientes a los grupos metilo H-3' y H-4' (δ_{H} 0.91, m; δ_{C} 20.01 ppm) mostraron correlaciones HMBC con los carbonos C-1', C-2' y C-3', además de la correlación COSY con H-2', lo cual evidenció su conexión con un carbono metínico. El protón H-2' (δ_{H} 1.81, m; δ_{C} 28.46 ppm) presentó correlaciones COSY con H-1' y H-3', así como correlaciones HMBC con C-1' y C-3', lo cual estableció la secuencia característica *N*-CH₂-CH(CH₃)₂. Finalmente, el metileno H-1' (δ_{H} 3.15, dd, J = 6.86, 6.13 Hz; δ_{C} 46.81 ppm), directamente enlazado al nitrógeno, presentó correlaciones HMBC con el carbonilo C-1 (δ_{C} 166.30 ppm), confirmando la presencia del sustituyente *N*-isobutilo.

El análisis de la cadena acíclica permitió identificar un sistema dieno conjugado. La señal correspondiente a H-2 (δ_{H} 5.53, d, J = 11.33 Hz; δ_{C} 119.31 ppm) presentó correlaciones HMBC con el carbonilo C-1, así como con C-3 y C-4, confirmando su posición α al grupo amida. Asimismo, H-2 mostró correlación COSY con H-3 (δ_{H} 6.39, td, J = 11.19, 0.84 Hz; δ_{C} 140.87 ppm), estableciendo el primer doble enlace de la cadena acíclica.

La continuidad del sistema conjugado fue establecida mediante las correlaciones observadas entre H-3/H-4 y H-4/H-5 en el experimento COSY. El protón H-4 (δ_{H} 7.50, ddq, J = 15.00, 10.90, 1.27, 1.16 Hz; δ_{C} 128.00 ppm) presentó correlaciones

HMBC con C-2 y C-5, mientras que H-5 (δ_H 5.97, td, J = 15.26, 6.33 Hz; δ_C 139.59 ppm) mostró correlaciones HMBC con C-3, C-4, C-6 y C-7, confirmando la presencia de un sistema dieno conjugado dentro de la cadena carbonada.

Las constantes de acoplamiento observadas permitieron establecer la configuración geométrica de las insaturaciones. El valor de J = 11.33 Hz observado entre H-2 y H-3 fue consistente con una configuración *Z* para esta insaturación, mientras que el acoplamiento de J = 15.26 Hz entre H-4 y H-5 indicó una configuración *E* para el segundo doble enlace. Considerando la nomenclatura empleada para las alcanidas, el sistema conjugado fue asignado como 2(*Z*),4(*E*).

La región alifática posterior al sistema dieno estuvo constituida por los metilenos C-6 y C-7. El protón H-6 (δ_H 2.40, m; δ_C 31.33 ppm) presentó correlaciones COSY con H-5 y H-7, mientras que H-7 (δ_H 2.40, m; δ_C 18.93 ppm) mostró correlaciones HMBC con C-5, C-6, C-8, C-9 y C-10, permitiendo establecer la conexión entre la región olefínica y el sistema diacetilénico terminal.

En la región correspondiente a los carbonos *sp*, el espectro de ^{13}C -RMN mostró cuatro señales características de un sistema diacetilénico terminal: δ_C 77.36 (C-8), 68.44 (C-9), 68.44 (C-10) y 65.45 ppm (C-11). La ausencia de señales HSQC para C-8, C-9 y C-10 confirmó la presencia de carbonos acetilénicos no protonados, mientras que C-11 presentó correlación con el protón terminal H-11 (δ_H 1.99, t, J = 1.13 Hz), confirmando la presencia de un alquino terminal.

La integración de las correlaciones obtenidas mediante los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió reconstruir la conectividad completa del compuesto, desde el sustituyente *N*-isobutilo hasta el sistema diacetilénico terminal. La comparación de los desplazamientos químicos obtenidos mediante RMN de ^1H y ^{13}C con los datos reportados previamente en la literatura permitió identificar este compuesto como un isómero geométrico de la *N*-isobutildeca-2,4-dien-8,10-diínamida, ya que el compuesto previamente reportado corresponde al isómero 2(*E*),4(*E*), mientras que el metabolito caracterizado en este estudio presentó la configuración 2(*Z*),4(*E*).

Los datos espectroscópicos completos se presentan en el Cuadro 9, donde se comparan los valores experimentales obtenidos para el compuesto aislado del grupo F384 con los datos reportados previamente para *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida. La elevada similitud entre ambos conjuntos de datos respalda la asignación estructural propuesta.

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C RMN del pico 2 del grupo F384 y los reportados para la *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida.

Posición	Datos del pico 2 del grupo F384 (CDCl_3 , 700 MHz)		Datos reportados para la <i>N</i> -isobutildeca-2(<i>E</i>),4(<i>E</i>)-dien-8,10-diínamida (CDCl_3 , 400 MHz) (Aydin <i>et al.</i> 2019)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración
1	166.41	-	166.2	-
2	119.72	5.52, d (11.29)	123.2	5.84, d (15.04)
3	140.97	6.38, t (11.24)	140.3	7.18, dd (15.02, 10.76)
4	128.10	7.53, m	129.8	6.20, dd (15.14, 10.76)
5	139.72	5.97, dddd (14.29, 5.16, 4.04, 1.11)	139.0	6.06, m
6	31.30	2.42, m	31.3	2.4, m
7	19.16	2.39, m	18.8	2.4, m
8	77.57	-	76.9	-
9	68.47	-	68.2	-
10	68.47	-	65.4	-
11	65.50	1.98, m	65.0	2.0, s
1'	46.99	3.14, d (6.88, 6.13)	47.0	3.16, t (6.40)
2'	28.68	1.81 m, (13.44, 6.67)	28.6	1.87, m
3'	20.40	0.93, d 6.67)	20.1	0.92, d (6.68)
4'	20.40	0.93, d (6.67)	20.1	0.92, d (6.68)
-NH	-	5.50, brd		

s: singulete, brs: singulete ancho, d: doblete, brd: doblete ancho, dd: doblete de dobles, ddd: doblete de dobles de dobles, dddd: doblete de dobles de dobles de dobles, dtd: doblete de triplete de dobles, dddt: doblete de dobles de dobles de triplete, t: triplete, q: cuarteto, dt: doblete de triplete, dq: doblete de cuartetos, ddp: doblete de dobles de pentetes, m: multiplete.

Finalmente, los datos de EM respaldaron la estructura propuesta a partir de los análisis de RMN. El espectro mostró un ion molecular $[\text{M}]^+$ en m/z 229, consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}$ y un índice de deficiencia de hidrógeno correspondiente a siete insaturaciones, atribuibles a cuatro dobles enlaces, dos enlaces triples y un grupo carbonilo.

El patrón de fragmentación observado proporcionó evidencia adicional sobre la conectividad de la molécula. Entre los fragmentos más relevantes destacó el ion en m/z 157 $[\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}]^+$, atribuido a un catión acilio generado tras la pérdida del

fragmento amino. Asimismo, la señal observada en m/z 128 $[C_{10}H_8]^+$ fue consistente con la ruptura de la cadena hidrocarbonada insaturada, mientras que el ion en m/z 57 $[C_4H_9]^+$ correspondió al fragmento isobutilo $[CH_2CH(CH_3)_2]$ característico de las alcanidas con fragmento *N*-isobutilo. En conjunto, estos fragmentos fueron congruentes con la estructura propuesta para el compuesto aislado.

Es importante destacar que, tras una revisión exhaustiva de los antecedentes fitoquímicos de *H. longipes*, no se encontraron reportes previos de la presencia de *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida en esta especie. Aunque este metabolito ha sido identificado previamente en otros géneros de la familia Asteraceae, su detección en las raíces de *H. longipes* amplía significativamente el conocimiento sobre la diversidad estructural de las alcanidas alifáticas y acetilénicas presentes en la especie. En consecuencia, el presente estudio constituye el primer reporte de este metabolito para *H. longipes*.

VIII.8.4. Identificación del compuesto correspondiente al pico 3 del grupo F384.

La elucidación estructural completa del compuesto correspondiente al pico recolectado con TR de 128.168 min no fue posible debido al bajo rendimiento obtenido durante el proceso de purificación (rendimiento < 2 mg), cantidad insuficiente para la adquisición de espectros de RMN en 2D con calidad adecuada para su interpretación.

No obstante, los datos de EM proporcionaron información preliminar sobre su posible identidad. El espectro mostró un ion molecular $[M]^+$ en m/z 221, consistente con la fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, la cual coincide con la reportada para la afinina. Asimismo, el patrón de fragmentación presentó señales diagnósticas en m/z 41, 53, 81, 98, 126, 141, 175 y 221, las cuales mostraron una elevada similitud con los fragmentos descritos previamente para esta alcanida (ver anexo 11).

La coincidencia observada tanto en la masa molecular como en el patrón de fragmentación sugiere que este metabolito corresponde a un compuesto

estructuralmente relacionado con la afinina. Sin embargo, debido a la ausencia de información espectroscópica complementaria obtenida por RMN, no fue posible determinar si se trata de la propia afinina o de un isómero posicional o geométrico con la misma composición elemental. Por lo tanto, la identidad definitiva de este compuesto deberá confirmarse mediante estudios posteriores que permitan obtener una mayor cantidad de material purificado y realizar su caracterización estructural completa.

VIII.8.5. Identificación del compuesto correspondiente al pico 4 del grupo F384.

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto correspondiente al pico con TR de 140.744 min mostró un total de 14 señales de carbono, destacando una señal a δ_{C} 165.89 ppm, atribuida a un carbonilo de amida. La ausencia de correlación en el experimento HSQC confirmó que dicha señal corresponde a un carbono cuaternario. El análisis conjunto de los experimentos HSQC, COSY y HMBC permitió establecer la conectividad completa del esqueleto molecular y determinar la presencia de una cadena acíclica poliinsaturada característica de una alcanida.

El análisis del fragmento unido al nitrógeno permitió identificar un grupo *N*-isobutilo. La señal correspondiente al metilo H-3' (δ_{H} 0.92, d, $J = 6.70$ Hz; δ_{C} 20.36 ppm) presentó correlaciones HMBC con C-1, C-2 y C-3, además de una correlación COSY con H-2'. El protón metínico H-2' (δ_{H} 1.79, m; δ_{C} 28.50 ppm) mostró correlaciones COSY con H-1' y H-3', así como correlaciones HMBC con C-1' y C-3', estableciendo la secuencia $\text{CH}_2\text{-CH-(CH}_3)_2$ característica del fragmento isobutilo. Posteriormente, el metileno H-1' (δ_{H} 3.14, dd, $J = 6.90, 6.09$ Hz; δ_{C} 46.96 ppm), debido a su desplazamiento químico compatible con un carbono unido a nitrógeno, presentó correlaciones COSY con H-2 y el NH, además de correlaciones HMBC con el carbonilo C-1 (δ_{C} 165.89 ppm) y con C-1' y C-2', confirmando la presencia del fragmento *N*-isobutilamida.

La primera insaturación de la cadena acíclica se estableció a partir del sistema olefínico formado por H-2 (δ_H 5.79, dt, J = 15.27, 1.59 Hz; δ_C 124.25 ppm) y H-3 (δ_H 6.81, dt, J = 15.25, 6.71 Hz; δ_C 143.72 ppm). Ambos protones mostraron correlación COSY, mientras que las correlaciones HMBC de H-2 con el carbonilo C-1 y con C-4, así como de H-3 con C-1, C-4 y C-5, lo cual permitió ubicar el doble enlace entre C-2 y C-3. La constante de acoplamiento observada entre H-2 y H-3 (J = 15.27 Hz) fue consistente con una configuración *E* para esta insaturación.

La extensión de la cadena carbonada se estableció mediante las correlaciones entre los protones alifáticos H-4 (δ_H 2.25, m; δ_C 32.12 ppm) y H-5 (δ_H 2.31, q, J = 7.27, 6.88 Hz; δ_C 26.60 ppm). Ambos protones mostraron correlaciones COSY consecutivas (H-3/H-4, H-4/H-5 y H-5/H-6), mientras que las correlaciones HMBC de H-4 con C-2, C-3, C-5 y C-6, y de H-5 con C-3, C-4, C-6 y C-7, confirmaron la continuidad de la cadena hasta la siguiente región insaturada.

Los dobles enlaces restantes se identificaron mediante las señales olefínicas correspondientes a H-6 (δ_H 5.25, dtd, J = 10.86, 7.42, 7.37, 0.91 Hz; δ_C 127.80 ppm), H-7 (δ_H 5.96, d, J = 10.95 Hz; δ_C 129.53 ppm), H-8 (δ_H 6.28, dddt, J = 15.49, 10.96, 3.19, 1.67 Hz; δ_C 126.80 ppm) y H-9 (δ_H 5.69, dq, J = 13.81, 6.75 Hz; δ_C 130.13 ppm). Las correlaciones COSY entre H-6/H-7, H-7/H-8 y H-8/H-9 demostraron la continuidad del sistema trieno. Además, las correlaciones HMBC observadas entre estos protones y los carbonos vecinos permitieron establecer la ubicación de las insaturaciones restantes dentro de la cadena carbonada.

La configuración geométrica de los dobles enlaces fue determinada a partir de las constantes de acoplamiento observadas. El valor de J = 15.49 Hz entre H-8 y H-9 fue consistente con una configuración *E* para el doble enlace correspondiente, mientras que el valor de J = 10.95 Hz entre H-6 y H-7 fue compatible con una configuración *Z*. En conjunto, los datos espectroscópicos permitieron establecer un sistema trieno con la configuración geométrica correspondiente a la *N*-isobutildeca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida.

La integración de las correlaciones obtenidas mediante COSY, HSQC y HMBC permitió reconstruir la conectividad completa del compuesto, constituido por un

grupo *N*-isobutilamida unido a una cadena acíclica con tres dobles enlaces y configuraciones geométricas definidas. Finalmente, la concordancia entre los desplazamientos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamiento y patrones de correlación permitió proponer inequívocamente la estructura de *N*-isobutildeca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida. La asignación completa de las señales espectroscópicas se presenta en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C RMN el pico 4 del grupo F384 y los reportados para la afinina.

Posición	Datos del pico 4 del grupo F384 (CDCl_3 , 700 MHz)		Datos reportados para la afinina (CDCl_3 , 400 MHz) (Alperth <i>et al.</i> 2024)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración
1	165.89	-	166	-
2	124.25	5.79, dt (15.27, 1.59)	124.2	5.81, brd (15.4)
3	143.72	6.81, dt (15.25, 6.71)	143.5	6.83, dt (15.3, 6.7)
4	32.12	2.25, m	32.1	2.26, m
5	26.60	2.31, q (7.27, 6.88)	26.4	2.33, m
6	127.80	5.25, dtd (10.86, 7.42, 7.37, 0.91)	127.7	5.26, dt (10.7, 6.9)
7	129.53	5.96, 10.95	129.4	5.98, t (10.8)
8	126.80	6.28, dddt (15.49, 10.96, 3.19, 1.67)	126.7	6.29, dd (13.0, 11.0)
9	130.13	5.69, dq (13.81, 6.75)	130.0	5.69
10	18.43	1.77, m	18.3	1.78, d (6.5)
1'	46.96	3.14, dd (6.90, 6.09)	46.9	3.14, t (6.6)
2'	28.50	1.79, m	28.6	1.80, m
3'	20.36	0.92, d (6.70)	20.1	0.92, d (6.7)
4'	20.36	0.92, d (6.70)	20.1	0.92, d (6.7)
-NH	-	5.51 brs	-	5.68

s: singlete, brs: singlete ancho, d: doblete, brd: doblete ancho, dd: doblete de dobles, ddd: doblete de dobles de dobles, dddd: doblete de dobles de dobles de dobles, dtd: doblete de tripletes de dobles, dddt: doblete de dobles de dobles de tripletes, t: triplete, q: cuarteto, dt: doblete de tripletes, dq: doblete de cuartetos, ddp: doblete de dobles de pentetes, m: multiplete.

Finalmente, los datos de EM confirmaron la estructura propuesta a partir de los análisis de RMN. El espectro mostró un ion molecular $[\text{M}]^+$ en *m/z* 221, consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}$. El patrón de fragmentación obtenido proporcionó evidencia adicional sobre la conectividad de la molécula y la presencia de los grupos funcionales característicos de esta alcalamida.

Entre los fragmentos más representativos destacaron los iones observados en *m/z* 189, 167 y 141, los cuales se atribuyeron a pérdidas sucesivas de fragmentos de la cadena hidrocarbonada insaturada. Asimismo, la señal en *m/z* 126 fue consistente

con procesos de fragmentación asociados a la ruptura del sistema amida. Por otra parte, el ion observado en m/z 98 se asignó al fragmento *N*-isobutilamida, mientras que las señales intensas en m/z 81, 53 y 41 fueron compatibles con procesos de fragmentación del sistema de insaturaciones conjugadas presente en la molécula. Finalmente, el fragmento característico en m/z 57 $[C_4H_9]^+$ confirmó la presencia del grupo isobutilo.

En conjunto, la coincidencia entre la masa molecular observada, el patrón de fragmentación y los datos obtenidos mediante RMN de 1H y ^{13}C confirmaron la identidad del compuesto como *N*-isobutildeca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida (afinina o espilantol), constituyendo el principal metabolito especializado presente en la raíz de *H. longipes*.

VIII.8.6. Identificación del compuesto correspondiente al pico 5 del grupo F384.

De manera preliminar, el compuesto recolectado a un TR de 148.974 min fue identificado como afinina considerando la elevada concordancia entre sus desplazamientos químicos de RMN de 1H y ^{13}C y los valores reportados previamente para este metabolito. Esta similitud espectroscópica, aunada a la coincidencia de la fórmula molecular determinada mediante EM, proporciona evidencia consistente con la estructura de la afinina (ver anexo 13).

No obstante, la baja relación señal/ruido obtenida en los espectros de RMN limitó la resolución detallada de algunas señales críticas para la asignación inequívoca de sus multiplicidades y constantes de acoplamiento. En consecuencia, aunque los datos disponibles indican que este compuesto comparte la misma conectividad molecular que la afinina, no fue posible descartar completamente la posibilidad de que corresponda a esta molécula o a un isómero posicional o geométrico. Por lo tanto, la asignación estructural debe considerarse preliminar y requerirá estudios espectroscópicos adicionales para su confirmación definitiva.

VIII.8.7. Identificación compuesto correspondiente al pico 6 del grupo F384.

El espectro de ^{13}C -RMN del compuesto correspondiente al pico con TR de 228.098 min mostró un total de 15 señales de carbono, destacando una señal a δ_{C} 166.20 ppm, atribuida al carbonilo de una amida. La ausencia de correlación de esta señal en el experimento HSQC confirmó que corresponde a un carbono cuaternario. El análisis conjunto de los experimentos HSQC, COSY y HMBC permitió establecer la conectividad completa del compuesto, evidenciando la presencia de una alcanida constituida por un sustituyente *N*-alquilo y una cadena alifática trienoica.

El análisis del fragmento unido al nitrógeno permitió identificar un grupo *N*-(2-metilbutilo). Los metilos H-4' (δ_{H} 0.89, m; δ_{C} 11.11 ppm) y H-5' (δ_{H} 0.89, m; δ_{C} 17.02 ppm) mostraron correlaciones HMBC con los carbonos C-2', C-3' y C-5', mientras que el metileno H-3' (δ_{H} 1.14 y 1.41, m; δ_{C} 27.37 ppm) presentó correlaciones COSY con H-4' y H-5', además de correlaciones HMBC con C-1, C-3, C-4 y C-5. El metino H-2' (δ_{H} 1.58, m; δ_{C} 35.17 ppm) mostró correlaciones COSY con H-2', H-4' y H-5', así como correlaciones HMBC con C-1, C-2, C-4 y C-5. Finalmente, el metileno H-1' (δ_{H} 3.13 y 3.25, m; δ_{C} 45.00 ppm), característico de un carbono unido al nitrógeno, presentó correlaciones HMBC con C-2', C-3', C-4' y con el carbonilo C-1, confirmando la presencia del sustituyente *N*-(2-metilbutilo) unido al nitrógeno de la amida.

La cadena acíclica se estableció a partir de las correlaciones COSY entre H-2/H-3, H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8 y H-8/H-9, las cuales definieron la continuidad de una cadena alifática con tres dobles enlaces conjugados. Las correlaciones HMBC observadas de H-2 con el carbonilo C-1 y C-3, de H-3 con C-1, C-4 y C-5, de H-4 con C-2, C-3, C-5 y C-6, y de H-5 con C-3, C-4, C-6 y C-7, confirmaron la conectividad de la cadena carbonada.

La constante de acoplamiento observada entre H-2 y H-3 ($J = 15.28$ Hz) fue consistente con una configuración *E* para el primer doble enlace, mientras que el valor de $J = 11.03$ Hz entre H-6 y H-7 indicó una configuración *Z* para el segundo doble enlace. Por su parte, el doble enlace terminal presentó constantes de acoplamiento compatibles con una configuración *E*, de acuerdo con el valor de $J =$

15.54 Hz observado entre H-8 y H-9, lo cual estableció un sistema trieno con configuración 2(*E*),6(*Z*),8(*E*).

La integración de las correlaciones obtenidas mediante los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió reconstruir la conectividad completa del compuesto. La comparación de los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y la fórmula molecular obtenida mediante EM con los datos reportados en la literatura permitió asignar el compuesto como *N*-(2-metilbutil)deca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida.

En conjunto, estos datos indican que el compuesto conserva el mismo sistema carbonado insaturado presente en la afinina, diferenciándose principalmente por la sustitución del grupo *N*-isobutilo por una unidad *N*-metilbutilamida, lo que sugiere la presencia de una alcalamida estructuralmente relacionada dentro del perfil químico de la raíz de *H. longipes* (ver anexo 14).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C RMN del pico 6 del grupo F384 y los reportados para el homoespilantol.

Posición	Datos del pico 6 del grupo F384 (CDCl ₃ , 700 MHz)		Datos reportados para el homoespilantol (CDCl ₃ , 700 MHz) (Alperth <i>et al.</i> 2024)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplete, <i>J</i> (Hz), integración	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm), multiplicidad, <i>J</i> (Hz), integración
1	166.20	-	166.0	-
2	124.19	5.79, dt (15.28, 1.60)	124.1	5.78, d (15.3)
3	143.21	6.81, m	143.5	6.82, td (6.7, 15.2)
4	32.08	2.25, m	32.2	2.26, q (7.4)
5	26.51	2.32, m	26.4	2.32, q (7.4)
6	127.86	5.25, dt (10.96, 7.26)	127.7	5.27, dt (11.0, 7.5)
7	129.49	5.98, t (11.03)	129.4	5.97, t (11.0)
8	126.85	6.29, ddp (15.54, 10.90, 1.68, 1.65)	126.7	6.29, t (13.0)
9	130.27	5.69, dq (13.80, 6.71)	130.0	5.71, m
10	18.52	1.77, dd (6.79, 1.64)	18.3	1.78, d (6.7)
1'	45.00	3.13, 3.25 m	45.1	3.26, 3.14, m
2'	35.17	1.58, m	35.0	1.58
3'	27.37	1.14, 1.41, m	27.0	1.41, 1.16, m
4'	11.11	0.89, m	11.3	0.91
5'	17.02	0.89, m	17.2	0.91
-NH	-	-	-	5.41, brs

s: singulete, brs: singulete ancho, d: doblete, brd: doblete ancho, dd: doblete de dobles, ddd: doblete de dobles de dobles, dddd: doblete de dobles de dobles de dobles, dtd: doblete de triplete de dobles, dddt: doblete de dobles de dobles de triplete, t: triplete, q: cuarteto, dt: doblete de triplete, dq: doblete de cuartetos, ddp: doblete de dobles de pentetes, m: multiplete.

Finalmente, la identidad estructural del compuesto fue corroborada mediante EM. El espectro mostró un ion molecular $[M]^+$ en m/z 235, consistente con la fórmula molecular $C_{15}H_{25}NO$, en concordancia con la estructura propuesta a partir de los datos de RMN.

El patrón de fragmentación proporcionó evidencia adicional sobre la conectividad molecular. Entre los fragmentos más representativos destacaron los iones observados en m/z 206, 189 y 155, los cuales se atribuyeron a pérdidas sucesivas de fragmentos de la cadena hidrocarbonada insaturada. Asimismo, la señal en m/z 126 se asoció con la ruptura del enlace amida y la retención de la porción acílica de la molécula.

Por otra parte, el ion observado en m/z 98 fue consistente con la presencia del fragmento *N*-metilbutilamida, mientras que las señales intensas en m/z 81, 53 y 41 fueron atribuidas a procesos de fragmentación del sistema de insaturaciones conjugadas. Finalmente, el fragmento en m/z 57 confirmó la presencia de la porción alquílica correspondiente al sustituyente unido al nitrógeno de la amida.

En conjunto, la coincidencia entre la masa molecular observada, el patrón de fragmentación y los datos obtenidos mediante RMN de 1H y ^{13}C respaldan la identidad del compuesto como una alcanida estructuralmente relacionada con la afinina que presenta una unidad *N*-metilbutilamida en sustitución del grupo *N*-isobutilo característico de esta última.

VII.8.8. Identificación del compuesto correspondiente al pico 7 del grupo F384.

La elucidación estructural completa del compuesto correspondiente al pico con TR de 238.885 min no fue posible debido al bajo rendimiento obtenido durante el proceso de purificación (2.1 mg), cantidad insuficiente para realizar una caracterización exhaustiva mediante RMN. No obstante, los datos obtenidos por EM proporcionaron evidencia sólida sobre su posible identidad.

El espectro mostró un ion molecular $[M]^+$ en m/z 247, consistente con la fórmula molecular $C_{16}H_{25}NO$, la cual coincide con la reportada para la *N*-isobutildodeca-2(*E*),4(*Z*),8(*Z*),10(*E*)-tetraenamida (ver anexo 15). Asimismo, el patrón de fragmentación presentó señales diagnósticas en m/z 41, 57, 81, 95, 115, 128, 152, 167, 196, 217 y 247, las cuales mostraron una elevada concordancia con los espectros reportados en la biblioteca NIST para esta alcanida.

Entre los fragmentos más representativos destacó la señal en m/z 57, correspondiente al ion $[C_4H_9]^+$, característica de la ruptura del grupo isobutilo terminal. Por otra parte, los fragmentos observados en m/z 81 y 95 fueron consistentes con procesos de ciclación y fragmentación del sistema poliinsaturado de la cadena alifática, generando cationes estabilizados por conjugación. Finalmente, los iones de mayor masa observados en m/z 196 y 167 fueron compatibles con pérdidas sucesivas asociadas a la cadena hidrocarbonada y a la formación de fragmentos acíclicos sustituidos, proporcionando evidencia adicional en favor de la estructura propuesta.

En conjunto, los datos espectrométricos sugieren que este compuesto corresponde a la *N*-isobutildodeca-2(*E*),4(*Z*),8(*Z*),10(*E*)-tetraenamida. Sin embargo, debido a la ausencia de información complementaria obtenida mediante RMN, la configuración estereoquímica y la conectividad estructural deberán corroborarse mediante estudios posteriores una vez que se disponga de una mayor cantidad de material purificado.

La identificación de estas alcanidas pone de manifiesto la notable plasticidad biosintética de las raíces de *H. longipes*. Una de las principales variaciones estructurales observadas se relaciona con la naturaleza de la fracción amínica, la cual se origina a partir del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. La presencia predominante de alcanidas *N*-isobutiladas sugiere que la L-leucina constituye uno de los principales precursores biosintéticos utilizados por la especie (Cortez-Espinosa *et al.* 2011). No obstante, la detección de la *N*-isobutildodeca-2(*E*),4(*Z*),8(*Z*),10(*E*)-tetraenamida demuestra que *H. longipes* también es capaz de incorporar precursores alternativos derivados de la L-isoleucina, ampliando así la

diversidad estructural de sus metabolitos especializados. Esta capacidad de conjugar una misma cadena acíclica con diferentes aminas probablemente modifica propiedades fisicoquímicas relevantes, como la lipofilicidad, y podría influir en la actividad biológica de las alcanidas resultantes.

Por otra parte, los resultados evidenciaron la coexistencia de dos familias estructurales principales de alcanidas. La primera corresponde a compuestos caracterizados por sistemas de dobles enlaces conjugados, representados por la afinina y sus derivados relacionados. La segunda comprende alcanidas que incorporan sistemas acetilénicos, cuya presencia refleja una elevada especialización enzimática hacia la biosíntesis de metabolitos que contienen enlaces triples carbono-carbono.

La coexistencia de sistemas olefínicos y acetilénicos dentro de una misma matriz química constituye una de las características más distintivas del perfil metabolómico radicalar de *H. longipes*. En este contexto, el reporte de estas alcanidas adicionales no solo amplía significativamente el conocimiento fitoquímico de la especie, sino que también confirma que la afinina representa únicamente el componente predominante de una red mucho más diversa de metabolitos estructuralmente relacionados. En conjunto, estos hallazgos refuerzan el valor de *H. longipes* como un modelo biológico de alta complejidad química y relevancia quimiotaxonómica dentro de la familia Asteraceae (Figura 19).

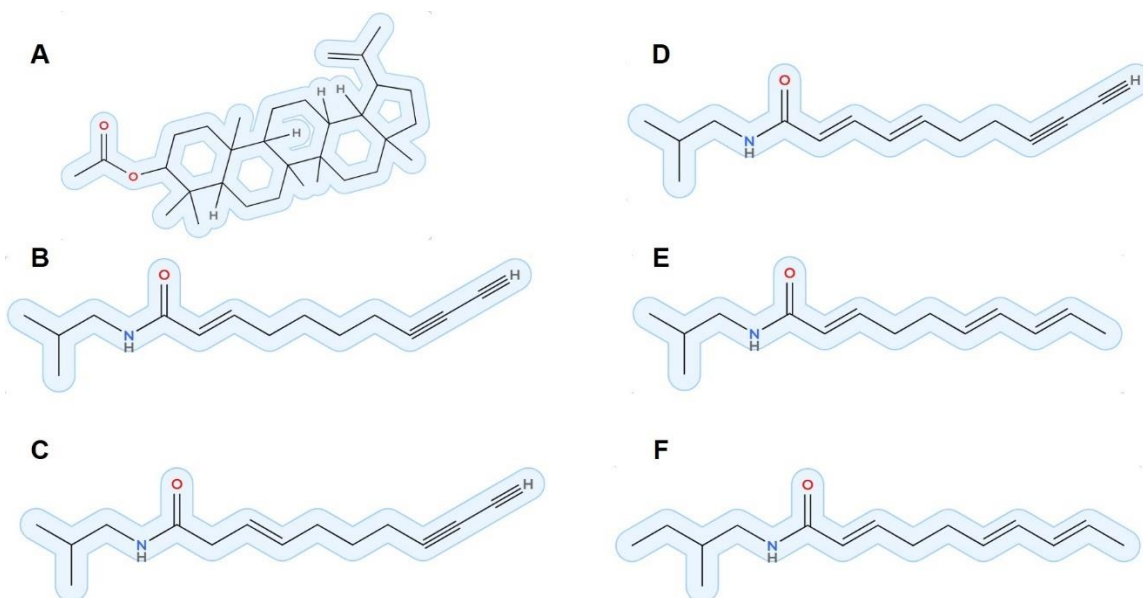


Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos purificados a partir del extracto de *H. longipes* caracterizadas mediante RMN. A) acetato de lupeol; B) *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida; C) *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida; D) *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida; E) afinina (*N*-isobutildeca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida); y F) homoespilantol (*N*-(2-metilbutil)deca-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-trienamida).

VIII.9. Cuantificación de afinina

La cuantificación de afinina reveló que las CI favorecieron significativamente su acumulación en comparación con las CS. Asimismo, los resultados demostraron que este compuesto está presente desde las etapas tempranas del desarrollo de *H. longipes* y permanece detectable a lo largo de todo su ciclo fenológico, lo que indica que su producción constituye una característica metabólica mantenida durante el crecimiento de la especie.

En ambas condiciones de cultivo, la concentración de afinina mostró una tendencia creciente conforme avanzó el desarrollo fenológico de la planta. Los valores más bajos se registraron durante la etapa vegetativa, mientras que las mayores concentraciones se observaron en las etapas de fructificación y defoliación. No obstante, para cada una de las etapas evaluadas, las plantas cultivadas en CI presentaron concentraciones superiores a las observadas en los ejemplares

desarrollados bajo condiciones silvestres (Figura 20). En conjunto, estos resultados indican que tanto la condición de cultivo como la etapa fenológica influyen en la acumulación de afinina en la raíz de *H. longipes*, favoreciendo su concentración durante las fases finales del desarrollo de la planta.

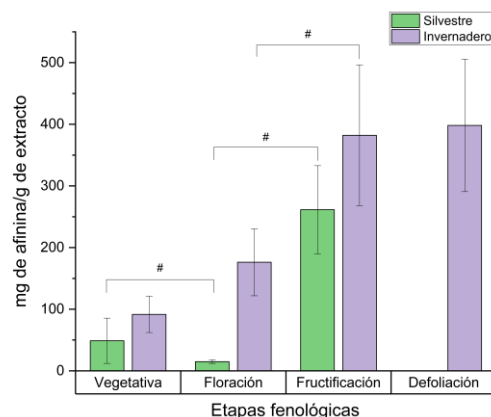


Figura 20. Efecto de las condiciones de cultivo y la etapa fenológica en la concentración de afinina en la raíz de *H. longipes*. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,005$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre los estadios fenológicos. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Por otro lado, es importante destacar que estos resultados concuerdan plenamente con las tendencias previamente identificadas mediante análisis de ^1H -RMN de los ejemplares en CI, lo cual proporciona una validación cuantitativa de las mismas, reforzando la idea de que la afinina es el metabolito más dinámicamente regulado y representativo a lo largo de las etapas fenológicas evaluadas.

Desde una perspectiva aplicada, los resultados obtenidos permiten identificar a la etapa de fructificación como el periodo más favorable para el aprovechamiento de la raíz de *H. longipes* destinada a la obtención de afinina. Independientemente de la condición de cultivo, esta etapa presentó simultáneamente los valores más altos

de biomasa radicular y las mayores concentraciones de afinina, características que la convierten en el momento óptimo de cosecha para maximizar el rendimiento de este metabolito bioactivo.

Adicionalmente, las condiciones de cultivo no solo influyeron en la acumulación de afinina, sino también en la abundancia relativa de otras alcanoidas presentes en la raíz. La Figura 21 muestra cromatogramas representativos de muestras provenientes de plantas desarrolladas bajo CS y CI en distintas etapas fenológicas, evidenciando modificaciones tanto cualitativas como cuantitativas en el perfil metabolómico radicular. Estos resultados sugieren que la condición de cultivo ejerce un efecto más amplio sobre el metabolismo especializado de *H. longipes* que el observado únicamente para la afinina.

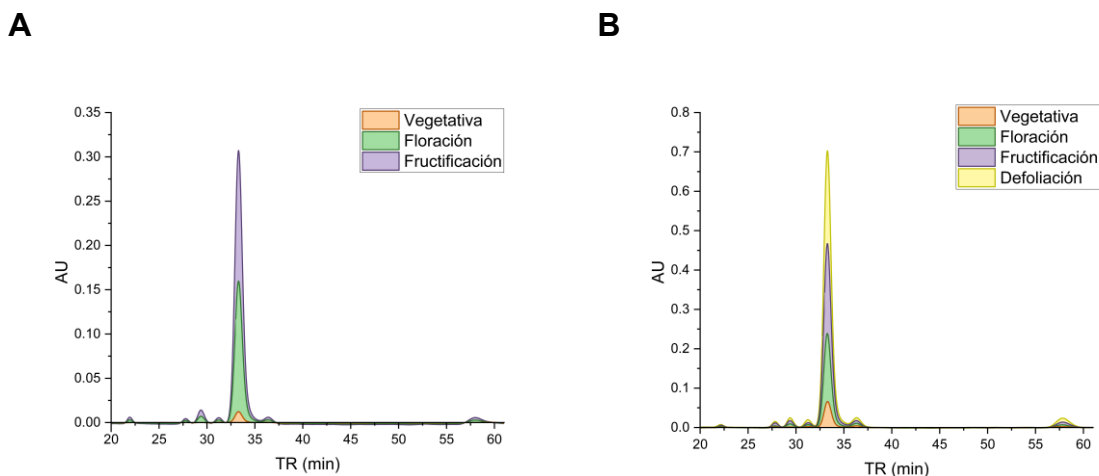


Figura 21. Cromatogramas representativos de HPLC-DAD ($\lambda=236$ nm) del perfil de las alcaloides presentes en *H. longipes* cultivadas en A) CS y B) CI en diferentes etapas fenológicas. Los picos cromatográficos se identifican de la siguiente manera: Picos: 1) *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida y *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida, 2) *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida, 3) desconocido, 4) isómero de afinina, 5) afinina, 6) isómero de afinina, 7) homoespilantol y 8) desconocido.

En ambas condiciones de cultivo, la etapa vegetativa presentó las menores proporciones relativas de afinina y de las alcaloides minoritarias detectadas en los cromatogramas, mientras que la etapa de fructificación exhibió la mayor abundancia de estos compuestos. Este comportamiento coincide con el incremento general observado en la acumulación de metabolitos especializados durante las etapas reproductivas de la planta y sugiere que la biosíntesis de alcaloides se intensifica conforme avanza el desarrollo fenológico.

Aunque las alcaloides minoritarias no fueron cuantificadas individualmente en este estudio, los cambios observados en sus señales cromatográficas indican que su acumulación podría estar influenciada tanto por la etapa fenológica como por la condición de cultivo. Estos resultados amplían las observaciones reportadas por López-Martínez *et al.* (2011) y proporcionan una base para futuras investigaciones dirigidas a la identificación, cuantificación y evaluación biológica de las alcaloides minoritarias presentes en *H. longipes*.

VIII.10. Análisis de los compuestos semivolátiles por CG-EM.

El análisis por CG-EM de los extractos de diclorometano de las raíces de *H. longipes* reveló una matriz compleja de compuestos semivolátiles. El perfil metabólico radicular está compuesto predominantemente por alcanidas, ácidos grasos, fenilpropanoides, derivados lipídicos asociados a la cutícula radicular y terpenos (Figura 22). Estos grupos de compuestos mostraron variaciones distintivas en las diferentes etapas fenológicas, así como diferencias características en las condiciones de cultivo en CS y CI. En el anexo 16 se proporcionan las listas detalladas de los compuestos identificados en conjunto con sus respectivas clasificaciones biosintéticas.

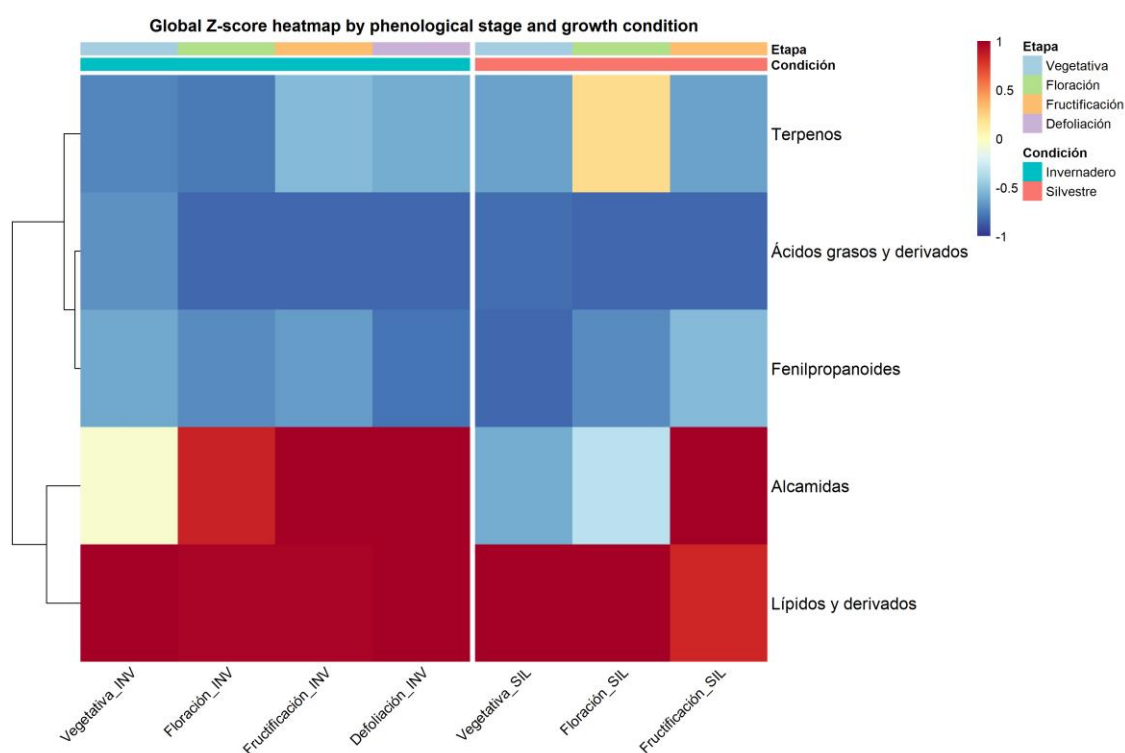


Figura 22. Mapa de calor (*heatmap*) de la abundancia relativa de las principales familias de metabolitos en raíces de *H. longipes*. Las filas representan los extractos de las diferentes etapas fenológicas bajo ambas condiciones de cultivo: CS y CI. Las columnas corresponden a la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados por CG-EM. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (Z-score), donde el espectro rojo indica una mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

Durante la etapa vegetativa, los ejemplares en CI mostraron una mayor abundancia relativa en la mayoría de las familias químicas en comparación con las CS. Se registró una mayor acumulación de alcanidas (9.8414 %), ácidos grasos y sus derivados (1.7274 %), fenilpropanoides (2.7427 %) y derivados lipídicos (26.1908 %) con respecto a los ejemplares en CS (2.9965, 0.0647, 0, 24.1811 y 2.4588 %, respectivamente). En contraste, los ejemplares en CS mostraron una mayor abundancia de terpenos (2.4588 %) con respecto a los cultivados en CI (1.0874 %). Este comportamiento puede atribuirse a que las familias de metabolitos mayoritarias en CI están asociadas a procesos de mantenimiento celular y metabolismo primario en condiciones controladas (Schaller, 2003). Por el contrario, la mayor acumulación de terpenoides en los ejemplares en CS sugiere la activación de mecanismos de defensa asociados y de comunicación entre las plantas y su ecosistema (Bai *et al.* 2021; Dong & Qi, 2025; Thimmapa *et al.* 2014).

La transición de la etapa vegetativa a la etapa de floración se caracterizó por un incremento en la abundancia relativa de las alcanidas acompañado de una disminución en los niveles de ácidos grasos y derivados lipídicos en ambas condiciones de cultivo. Este comportamiento sugiere un posible redireccionamiento del metabolismo desde la síntesis de componentes estructurales asociados al metabolismo primario hacia la acumulación de metabolitos especializados vinculados con el desarrollo reproductivo. Durante la etapa de floración, los ejemplares cultivados en CI mostraron una acumulación superior de alcanidas (21.3957 %) en comparación con los ejemplares desarrollados en CS (6.4079 %). En contraste, en CI se observó una menor abundancia relativa de fenilpropanoides (1.4253 %), derivados lipídicos (22.9013 %) y terpenos (0.6041 %) respecto a CS (1.5077, 30.4342 y 13.2263 %, respectivamente). Asimismo, durante esta etapa no se detectaron ácidos grasos ni sus derivados en ninguna de las condiciones evaluadas.

La transición de la etapa de floración a fructificación se caracterizó por un incremento adicional en la abundancia de alcanidas y fenilpropanoides, acompañado por una disminución relativa de los derivados lipídicos. Durante la

fructificación, los ejemplares cultivados en CI presentaron una mayor acumulación de alcanoides (35.2484 %), fenilpropanoides (22.9128 %) y terpenos (3.7193 %) en comparación con los ejemplares de CS (28.7872 %, 21.1880 % y 2.5510 %, respectivamente). Este comportamiento coincide con la etapa de máxima acumulación de afinina observada previamente y sugiere una intensificación de las rutas biosintéticas asociadas a la producción de alcanoides durante el desarrollo y maduración de las estructuras reproductivas. De manera paralela, el incremento de fenilpropanoides podría estar relacionado con procesos de lignificación y fortalecimiento de tejidos vasculares y de soporte, necesarios para sostener el aumento de biomasa y la demanda fisiológica asociada a la reproducción.

Finalmente, la transición de la etapa de fructificación a la etapa de defoliación en CI se caracterizó por un incremento marcado en la abundancia de derivados lipídicos (28.9737 %), acompañado por una disminución significativa de fenilpropanoides (0.4009 %) y una ligera reducción en el contenido de terpenos (2.8899 %) con respecto a la etapa anterior. Cabe destacar que la abundancia relativa de las alcanoides se mantuvo elevada durante esta fase. En conjunto, estos resultados sugieren que, una vez concluido el desarrollo reproductivo, el sistema radicular entra en una fase de reorganización metabólica asociada al establecimiento de la senescencia y la latencia. En este contexto, la reducción de metabolitos derivados de rutas biosintéticas energéticamente demandantes, junto con el incremento de compuestos lipídicos, podría estar relacionada con procesos de almacenamiento de reservas y mantenimiento de la integridad estructural de membranas y tejidos radiculares durante el periodo de reposo fisiológico.

Con respecto al perfil de alcanoides, se observó una evolución dinámica a lo largo del desarrollo fenológico de la planta. La afinina se consolidó como el componente constante y mayoritario en todas las etapas, independientemente de las condiciones de cultivo, mientras que las transiciones entre fases estuvieron acompañadas por la aparición de alcanoides diferenciales características de cada estadio de desarrollo. La etapa vegetativa se caracterizó por la presencia de *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diánamida y erucamida. Por su parte, la transición hacia la floración se asoció con la

aparición de homoespilantol, hexadecamida y *N*-isobutil-sec-butilamida. Durante la fructificación se mantuvieron la afinina, el homoespilantol y la erucamida; además, se identificó la *N*-isobutilhexadecanamida como la alcanida diferencial de esta etapa. Finalmente, durante la defoliación se conservó el perfil de alcanidas observado en fructificación, con excepción de la erucamida. Si bien la erucamida, la hexadecamida y la *N*-isobutil-sec-butilamida no fueron identificadas mediante HPLC-DAD, su detección por CG-EM resulta particularmente relevante. El estudio de estas alquilamidas aporta información valiosa sobre los cambios químicos asociados al desarrollo ontogenético y a las condiciones de cultivo, permitiendo proponerlas como potenciales marcadores químicos de etapas específicas del ciclo biológico de la especie.

Con respecto a su posible función biológica, la dinámica observada en las alcanidas sugiere la existencia de un sistema de protección y adaptación del órgano subterráneo estrechamente relacionado con las demandas fisiológicas de cada etapa de desarrollo y con las condiciones del microambiente edáfico. Durante la etapa vegetativa, la presencia de afinina y *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida podría contribuir a la protección de los tejidos radiculares debido a la elevada reactividad química asociada a los sistemas diínicos, los cuales han sido relacionados con actividades nematocidas y fitoalexínicas en otras especies (Christensen y Lam *et al.* 1991; Molina-Torres *et al.* 2004). Asimismo, la presencia de erucamida podría estar relacionada con procesos de organización y mantenimiento de membranas celulares durante el crecimiento activo de la raíz.

Con el inicio de las etapas reproductivas, la aparición y acumulación sostenida de homoespilantol sugiere una ampliación de la capacidad defensiva del sistema radicular. Este compuesto ha sido asociado con actividades biológicas que podrían contribuir a la protección frente a organismos del suelo, reforzando el papel de la raíz como un importante reservorio de metabolitos especializados durante los periodos de mayor inversión energética de la planta (Greger, 1984). De manera simultánea, el incremento en la diversidad de alcanidas observado durante la floración y fructificación coincide con la etapa de máxima acumulación de afinina y

con el aumento de biomasa radicular registrado previamente, lo que sugiere una estrecha relación entre el desarrollo reproductivo y la acumulación de metabolitos especializados.

Finalmente, durante la etapa de defoliación, la persistencia de afinina, homoespilantol y *N*-isobutilhexadecanamida podría representar una estrategia de mantenimiento químico del sistema radicular durante el periodo de latencia. La permanencia de estas alcanidas, caracterizadas por estructuras relativamente estables, sugiere que podrían contribuir a la protección de los tejidos subterráneos frente a microorganismos y otros factores ambientales durante el periodo de reposo fisiológico. En conjunto, estos resultados indican que la composición de alcanidas en *H. longipes* no es estática, sino que responde de manera dinámica a las necesidades fisiológicas de la planta a lo largo de su ciclo de desarrollo, contribuyendo potencialmente tanto a procesos de defensa como de adaptación ecológica (Schafleitner *et al.* 2007).

VIII.11. Actividad de la valina descarboxilasa.

Las condiciones de cultivo evaluadas no indujeron cambios significativos en la actividad de la valina descarboxilasa en la raíz de *H. longipes* (Figura 23).

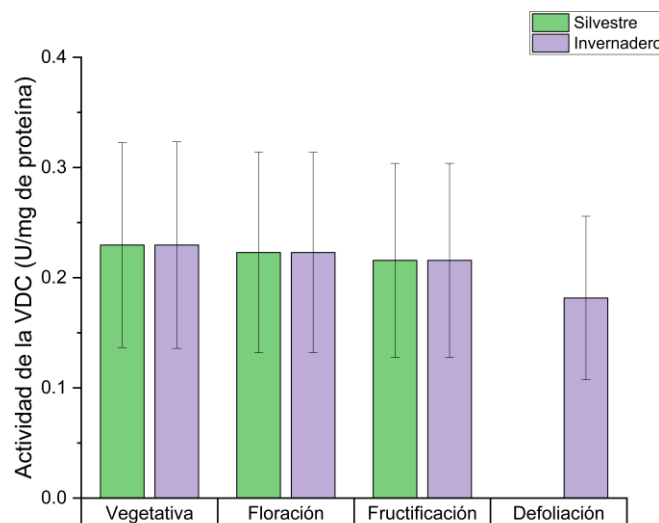


Figura 23. Efecto de las condiciones de cultivo y la etapa fenológica sobre la actividad de la valina descarboxilasa. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0,05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la actividad de la VDC permanece relativamente estable durante el ciclo fenológico de *H. longipes* y que, bajo las condiciones evaluadas, no es afectada significativamente por la condición de cultivo ni por el avance del desarrollo fenológico. Esta estabilidad podría indicar que la descarboxilación de la valina constituye un proceso metabólico mantenido a lo largo del crecimiento de la especie, independientemente de los cambios morfológicos observados durante su desarrollo. Esta tendencia podría estar relacionada con los cambios fisiológicos asociados a la senescencia y a la disminución gradual de la actividad metabólica característica de las etapas finales del desarrollo de la planta.

En este contexto, el estudio de Parola-Contreras *et al.* (2020; 2024) demostró que la inducción de estrés mediante la adición de Per (200 mM) y Ás (10 mM) incrementa significativamente la actividad de esta enzima en *H. longipes*. Esto sugiere que la regulación de la VDC opera bajo un control de carácter inducible y es altamente sensible a las alertas ambientales y de señalización por estrés. Desde esta

perspectiva, la actividad enzimática relativamente constante y basal observada en el presente estudio es consistente con un desarrollo vegetal bajo condiciones no restrictivas, donde la homeostasis no se vio comprometida y, por lo tanto, la enzima respondió de manera exclusiva a las demandas del reloj ontogenético interno de la planta.

Este resultado aporta nueva evidencia para el entendimiento de la ruta biosintética de la afinina y sugiere que la regulación de este metabolito no depende exclusivamente de la actividad de la VDC. En consecuencia, es probable que otros factores metabólicos participen en el control de su acumulación, incluyendo la disponibilidad de precursores o la regulación de etapas posteriores de la ruta biosintética. En este sentido, la participación de compuestos lipídicos precursores, como el ácido decanoico, el ácido (2*E*,6*E*,8*E*)-deca-2,6,8-trienoico u otros ácidos grasos intermediarios, constituye una hipótesis consistente con el modelo biosintético propuesto por Buitimea-Cantúa *et al.* (2020).

VIII.12. Efecto vasodilatador de los extractos de diclorometano de la raíz de *H. longipes*

Los extractos radiculares de *H. longipes* indujeron una respuesta vasodilatadora dependiente de la concentración en anillos de aorta con endotelio funcional, confirmando la presencia de compuestos con actividad relajante vascular en todas las etapas fenológicas evaluadas. El análisis farmacológico reveló diferencias significativas tanto en $E_{m\acute{a}x}$ como en la CE_{50} entre las distintas etapas de desarrollo, así como entre las condiciones de cultivo estudiadas, lo que indica que la actividad vasodilatadora de la especie está influenciada por cambios asociados al desarrollo fenológico y al ambiente de crecimiento. Las curvas concentración-respuesta obtenidas para cada extracto se presentan en la Figura 24, mientras que los parámetros farmacológicos correspondientes, junto con los valores determinados para la acetilcolina (ACh, control positivo) y la afinina, se resumen en el Cuadro 12.

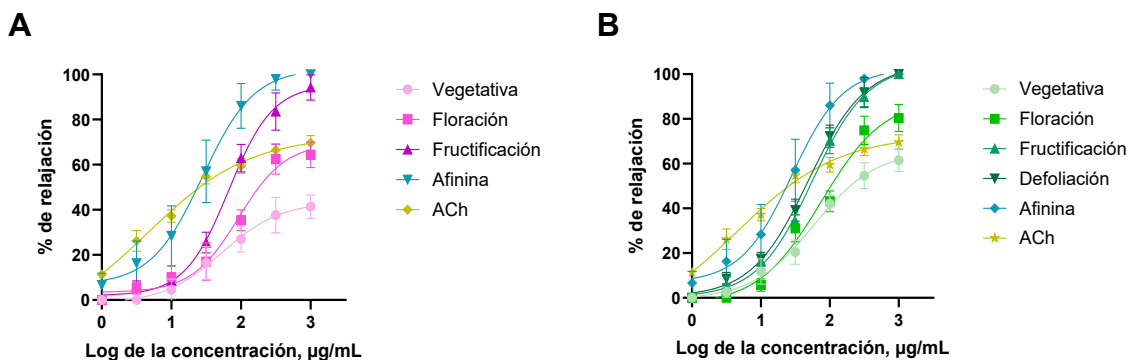


Figura 24. Curvas de concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por extractos de raíces de ejemplares de *H. longipes* cultivados en A) CS y de B) CI en diferentes etapas fenológicas ($n=5$). Las respuestas se registraron en anillos aórticos aislados de rata con endotelio funcional.

En este sentido, la etapa vegetativa presentó los valores más bajos de $E_{\text{máx}}$ en ambas condiciones de cultivo. En contraste, las etapas de floración, fructificación y defoliación bajo CI indujeron los mayores efectos vasodilatadores. Cabe destacar que estas etapas también mostraron el mayor contenido de afinina, en comparación con la etapa vegetativa y los ejemplares cultivados en CS. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la afinina constituye probablemente el principal compuesto responsable de la actividad vasodilatadora de los extractos de diclorometano, y que su mayor concentración se asocia con un incremento en la eficacia en el efecto vasodilatador.

No obstante, a pesar de presentar el menor contenido de afinina, la etapa vegetativa en ambas condiciones de cultivo exhibió una mayor potencia relativa en comparación con las otras de las etapas (Cuadro 12). Ese comportamiento podría atribuirse a la presencia de otros compuestos bioactivos o a un efecto sinérgico entre metabolitos diferenciales característicos de esta etapa fenológica.

Cuadro 12. Efecto vasodilatador inducido por extractos de raíz de *H. longipes* sobre la aorta de rata pre-contráida con L-fenilefrina con endotelio funcional.

Etapas fenológicas	$E_{\text{máx}}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{\text{máx}}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	CS		CI	
Vegetativa	$43.78 \pm 1.17^{* \#}$	53.16 ± 1.880	$65.13 \pm 0.25^{* \#}$	58.11 ± 3.99
Floración	$65.72 \pm 1.52^{* \#}$	116.2 ± 1.568	$98.41 \pm 1.71^{* \#}$	99.8 ± 2.23
Fructificación	$93.19 \pm 1.50^{* \#}$	73.80 ± 3.690	100 ± 0	56.72 ± 1.43
Defoliación	ND	ND	100 ± 0	49.33 ± 4.54
ACh	$E_{\text{máx}}$ (%)	67.88 ± 1.43	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	9.30 ± 1.14

Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=5$). Los asteriscos (*) y las cruces (†) indican diferencias significativas en los valores de $E_{\text{máx}}$ y CE_{50} entre las condiciones de cultivo ($p=0,005$), mientras que los signos de número (#) y las cruces dobles (‡) indican diferencias significativas entre las etapas fenológicas, respectivamente. Las diferencias significativas se determinaron mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

En este sentido, la vasodilatación inducida por la afinina parece involucrar múltiples vías de señalización, incluyendo los sistemas NO/GMPc, CO/GMPc, H_2S/K_{ATP} y $PGI_2/AMPc$. Además, se ha demostrado que este compuesto activa los receptores CB1, así como los canales TRPA1 y TRPV1, al tiempo que inhibe los canales de calcio tipo L (Valencia-Guzmán *et al.* 2021). El efecto vasodilatador de la afinina también se ha asociado con la modulación de los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BK_{Ca}), promoviendo la hiperpolarización de la membrana celular y contribuyendo a la reducción del tono vascular. En conjunto, estas evidencias respaldan que la afinina constituye el principal determinante de la eficacia vasodilatadora observada en los extractos de raíz de *H. longipes*, aunque su actividad probablemente se encuentra modulada por la interacción dinámica con otros componentes presentes en la matriz química.

Sin embargo, hasta el momento no puede descartarse la participación de otras alcaloides minoritarias en la actividad vasodilatadora observada. Estos metabolitos forman parte de una matriz química compleja en la que la afinina representa el componente predominante, pero no el único constituyente bioactivo. Aunque las propiedades vasodilatadoras individuales de estas alcaloides aún no han sido evaluadas experimentalmente, comparten elementos estructurales relevantes con la afinina, particularmente la porción amida α,β -insaturada y la cadena

hidrocarbonada lipofílica. Dichos motivos estructurales han sido reconocidos como determinantes importantes de la actividad biológica de las alquilamidas, influyendo en su capacidad de interactuar con diversos blancos moleculares (Bai *et al.* 2021). Por lo tanto, es razonable plantear que algunas de estas alquilamidas podrían contribuir, de manera aditiva o sinérgica, al efecto farmacológico global de los extractos.

Curiosamente, aunque las etapas de fructificación y las etapas subsecuentes presentaron las mayores concentraciones de afinina y la máxima eficacia vasodilatadora, los extractos obtenidos durante la etapa vegetativa mostraron una mayor potencia farmacológica. Esta observación sugiere que factores adicionales a la concentración de afinina pueden influir en la respuesta vasodilatadora. Una posible explicación es la contribución de metabolitos cuya abundancia relativa es mayor durante la etapa vegetativa. Entre ellos destaca la (+)-sesamina, identificada como uno de los metabolitos discriminantes en el análisis metabolómico, la cual ha sido asociada con efectos vasorrelajantes dependientes del endotelio mediante el incremento de la biodisponibilidad de NO. Estudios previos han demostrado que este lignano puede incrementar la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial y disminuir el estrés oxidativo vascular a través de la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa (Elufioye *et al.* 2020). En consecuencia, aunque la afinina parece ser el principal responsable del efecto vasodilatador global, la mayor potencia observada durante la etapa vegetativa podría estar relacionada con interacciones aditivas o sinérgicas entre múltiples metabolitos, incluyendo la (+)-sesamina. No obstante, el presente estudio no fue diseñado para evaluar combinaciones de compuestos puros, por lo que esta hipótesis deberá corroborarse mediante estudios farmacológicos específicos.

Asimismo, algunos de los metabolitos detectados de manera constante en los extractos de raíz a lo largo de las diferentes etapas fenológicas y condiciones de cultivo cuentan con actividades vasodilatadoras previamente reportadas. Entre ellos destacan el escualeno (Ruiz-Castillo *et al.* 2021) y el estigmasterol (Wongaswatkul *et al.* 2008), los cuales podrían contribuir de forma aditiva al efecto vasodilatador

global observado en los extractos crudos (Figura 25). La relevancia de estos compuestos no se limita a la modulación aguda del tono vascular, sino que también podría estar relacionada con el efecto antihipertensivo previamente demostrado para *H. longipes*. Este planteamiento se encuentra respaldado por reportes que documentan actividad antihipertensiva para el escualeno (Mirmiranpour *et al.* 2026), así como para el sistema fitocomplejo conformado por estigmasterol y β -sitosterol (Villar *et al.* 2020). De manera similar, la (+)-sesamina ha mostrado efectos benéficos sobre la función vascular y el control de la presión arterial. En conjunto, la coexistencia de alcanidas, lignanos, terpenos y fitoesteroles en la raíz sugiere que la actividad cardiovascular de *H. longipes* podría ser el resultado de múltiples mecanismos complementarios y potenciales interacciones farmacológicas entre sus metabolitos especializados.

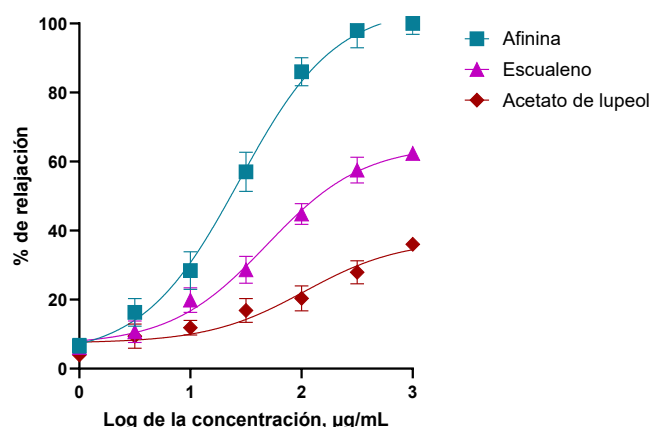


Figura 25. Curvas de concentración-respuesta del efecto vasodilatador inducido por los compuestos identificados en *H. longipes* ($n=5$). Las respuestas se registraron en anillos aórticos aislados de rata con endotelio funcional.

Adicionalmente, en este estudio se reporta por primera vez el efecto vasodilatador del acetato de lupeol, el cual fue purificado directamente a partir del extracto de diclorometano de *H. longipes*. Los parámetros farmacológicos evaluados para los compuestos individuales se resumen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Efecto vasodilatador reportado de los compuestos identificados en los extractos de diclorometano de *H. longipes* sobre anillos de aorta de rata con endotelio funcional.

Compuesto	$E_{\text{máx}}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Afinina	100 ± 3.10	27.38 ± 1.20	Castro-Ruiz <i>et al.</i> 2017
Escualeno	61.58 ± 3.98	47.10 ± 5.44	Ruiz-Castillo <i>et al.</i> 2021
Acetato de lupeol	36.01 ± 2.76	123.5 ± 2.41	-
Sesamina (como metabolito activo SC-1)	~90	-	Nakano <i>et al.</i> 2006

En general, la integración de datos fenológicos, metabólicos y farmacológicos demuestra que *H. longipes* exhibe una estrategia de estabilidad metabólica cualitativa combinada con especialización cuantitativa. La afinina emerge como el metabolito más representativo y regulado dinámicamente, cuya acumulación está estrechamente ligada al desarrollo. Es importante destacar que estos hallazgos indican que la etapa óptima de cosecha depende no solo de maximizar el rendimiento del compuesto, sino también de equilibrar la potencia biológica, lo que subraya que la máxima acumulación de los compuestos bioactivos ya identificados no necesariamente coincide con la máxima eficacia farmacológica.

VIII.13. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides.

Los ejemplares cultivados en CS presentaron los mayores niveles de compuestos fenólicos y flavonoides totales en comparación con las CI en todas las etapas fenológicas (Figura 26). El mayor contenido de fenoles y flavonoides se registró durante las etapas de fructificación y defoliación, respectivamente.

En cuanto a los compuestos fenólicos, en CI se evidenció un aumento progresivo conforme avanzaron las etapas fenológicas, seguido de un decremento en la etapa de defoliación ($p < 0.05$). Por el contrario, en CS, los compuestos fenólicos se mantuvieron constantes durante las primeras dos etapas sin mostrar diferencia significativa, sin embargo, durante la etapa de fructificación se registró un incremento significativo de 2.5 veces superior al observado en las etapas iniciales (Figura 26A).

Por otro lado, en ambas condiciones de cultivo, el contenido de flavonoides se mantuvo relativamente constante durante las primeras dos etapas, mostrando un incremento significativo ($p < 0.05$) en la etapa de fructificación en CS (2.5 veces más) y durante la etapa de defoliación en CI (3.2 veces) (Figura 26B).

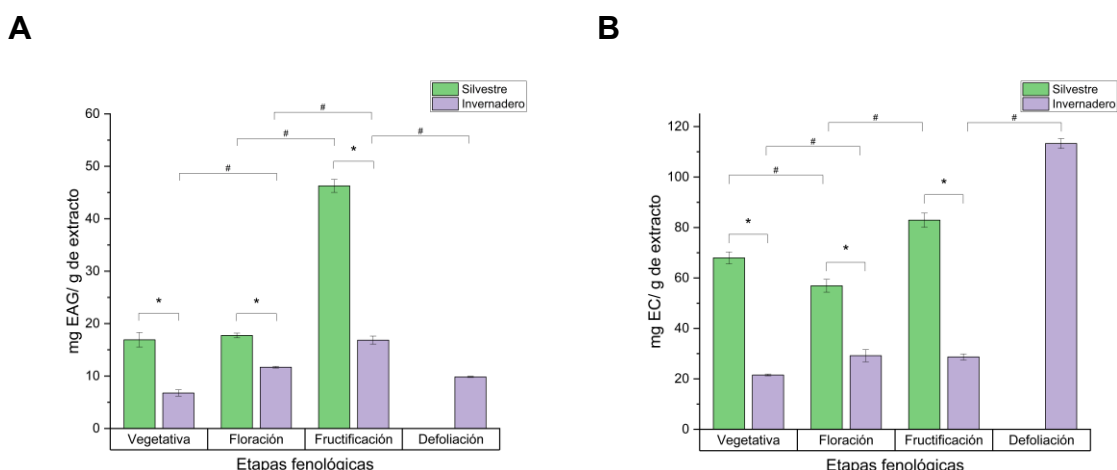


Figura 26. Cuantificación de A) compuestos fenólicos y B) flavonoides totales en ejemplares de *H. longipes* cultivados en CS y CI en diferentes etapas fenológicas. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=3$). Un asterisco (*) indica una diferencia significativa entre las condiciones de cultivo ($p=0.05$), mientras que un signo de número (#) indica una diferencia significativa entre las etapas fenológicas. La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Por otro lado, es importante destacar que, a diferencia de lo observado en la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides, las plantas cultivadas bajo CS presentaron una menor concentración de afinina en comparación con aquellas cultivadas bajo CI. Este hallazgo sugiere que el metabolismo de los ejemplares se encuentra redireccionado hacia la biosíntesis y acumulación preferencial de compuestos fenólicos y flavonoides en contraste con la biosíntesis de afinina y en comparación con los ejemplares cultivados en CI. Dicho comportamiento podría estar asociado a la activación de mecanismos de defensa frente a estresores abióticos tales como la disponibilidad limitada de nutrientes y la tolerancia a la sequía (Gharibi *et al.* 2016; Sharma *et al.* 2019), considerando la baja fertilidad

encontrada en el sustrato y que, además, durante el periodo de estudio se registró una menor precipitación anual en Xichú en comparación con reportes previos en la región. En cuanto al estrés biótico, este tipo de compuestos también están involucrados en procesos de comunicación planta-microorganismo (Wang *et al.* 2022), los cuales podrían verse atenuados en CI. En este sentido, la identificación futura de este tipo de metabolitos resulta relevante para la comprensión de esta especie.

Por otro lado, este cambio en el perfil metabólico podría tener implicaciones funcionales sobre la actividad biológica de los extractos. Si bien la afinina mostró ser el principal compuesto responsable de la eficacia vasodilatadora en los extractos de diclorometano, la posible presencia de otros compuestos de origen fenólico y de baja polaridad como los lignanos, podrían contribuir al efecto observado. A pesar de que estos compuestos no han sido reportados hasta el momento en las raíces de *H. longipes*, si han sido identificados en las hojas de *H. helianthoides* (Hajdu *et al.* 2004) lo cual no descarta su presencia en las raíces de especies de este género (Efentakis *et al.* 2015; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009)

VIII.14. Caracterización del EHI.

La caracterización química mediante CG-EM del EHI reveló un perfil semivolátil dominado por un número reducido de metabolitos mayoritarios. En total, fue posible identificar el 57.06 % del área cromatográfica correspondiente a compuestos volátiles y semivolátiles de bajo peso molecular. La afinina constituyó el componente predominante, con una abundancia relativa de 28.47 %, confirmando su papel como el principal metabolito detectable en este tipo de extracto.

Además de la afinina, se identificaron otros compuestos en menores proporciones, entre los que destacaron el acetato de linalilo (4.21 %) y el α -terpineno (1.68 %). La marcada dominancia de la afinina sobre el resto de los compuestos identificados sugiere que este metabolito contribuye de manera importante a las características

químicas del EHI. La lista completa de los compuestos identificados se presenta en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Perfil fitoquímico semi-volátil no polar por CG-EM del EHI.

Nombre	Familia biosintética	Sub-clasificación	Índice de coincidencia	Área (%)	Número CAS
Afinina	Alcamida	Alifática	70	41.5533	1000106-17-5
Cis-Dihidrojasmonato	Otros	Jasmonato	90	1.1255	039647-11-5
Acetato de linalilo	Terpeno	Monoterpeno	91	6.1473	000115-95-7
β -Mirceno	Terpeno	Monoterpeno	80	0.5867	000123-35-3
D-Limoneno	Terpeno	Monoterpeno	94	0.7307	005989-27-5
α -Terpineno	Terpeno	Monoterpeno	90	2.4583	000099-86-5
Stigmasdieno	Terpeno	Fitoesterol	78	4.4624	004970-37-0
			Total	57.0647	

Es importante destacar que la selección del etanol como solvente de extracción no estuvo orientada a maximizar la recuperación de afinina, sino a obtener un extracto compatible con su aplicación como agente elicitor. Aunque el etanol puede presentar una menor capacidad de extracción para algunos metabolitos lipofílicos en comparación con otros solventes orgánicos, su elevada miscibilidad con el agua facilita la preparación de formulaciones acuosas para aplicación foliar y favorece la disponibilidad de los compuestos bioactivos durante el proceso de elicitación.

A pesar de estas consideraciones, el análisis por CG-EM demostró que la afinina continuó siendo el metabolito predominante del EHI, con una abundancia relativa de 28.47 %, lo que confirma su presencia como uno de los principales componentes químicos de la preparación utilizada. Asimismo, la utilización de CG-EM para la caracterización del extracto se consideró adecuada debido a la naturaleza volátil de la afinina y a su relevancia como marcador químico del tratamiento elicitor. Esta estrategia permitió estandarizar la aplicación de los extractos mediante la cuantificación de la afinina y el ajuste de la dosis equivalente a 350 mg de este compuesto, garantizando así una mayor reproducibilidad en los tratamientos de elicitación aplicados a las plantas.

VIII.15. Efecto de la elicitación biológica sobre la morfología de los ejemplares de *H. longipes*

La aplicación repetida de elicitores biológicos modificó significativamente el crecimiento aéreo de los ejemplares de *H. longipes*, evidenciándose cambios en la altura del tallo principal a lo largo del periodo experimental. Después de tres meses de tratamiento, los ejemplares tratados con MeJA presentaron una altura significativamente mayor que la observada en el grupo control ($p < 0.05$). Posteriormente, a los seis meses de tratamiento, tanto el MeJA como el EHI indujeron incrementos significativos en esta variable con respecto al control. En contraste, los ejemplares tratados con Ás mostraron una reducción significativa en la altura del tallo principal ($p < 0.05$), indicando una respuesta diferencial del crecimiento en función del elicitor aplicado (Figura 27).

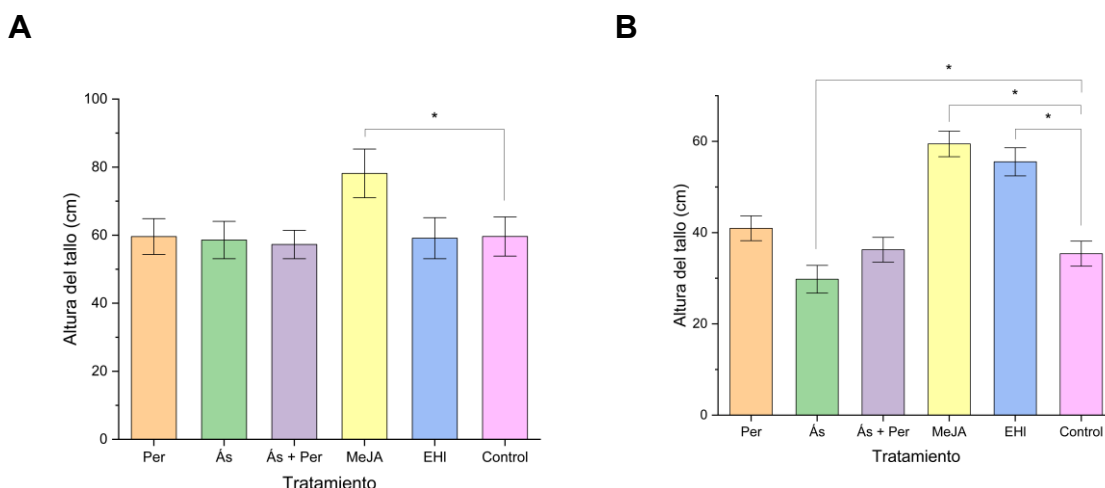


Figura 27. Altura del tallo de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

En relación con la longitud de la raíz, ninguno de los elicitores evaluados produjo cambios significativos respecto al grupo control después de tres meses de tratamiento. Sin embargo, tras seis meses de aplicación, los tratamientos con Per,

MeJA y EHI indujeron un incremento significativo en la longitud radicular de los ejemplares en comparación con el grupo control ($p < 0.05$; Figura 28). Estos resultados sugieren que la respuesta del sistema radicular a los elicitores evaluados requiere periodos prolongados de exposición para manifestarse, evidenciando un efecto dependiente del tiempo de tratamiento sobre el crecimiento de la raíz.

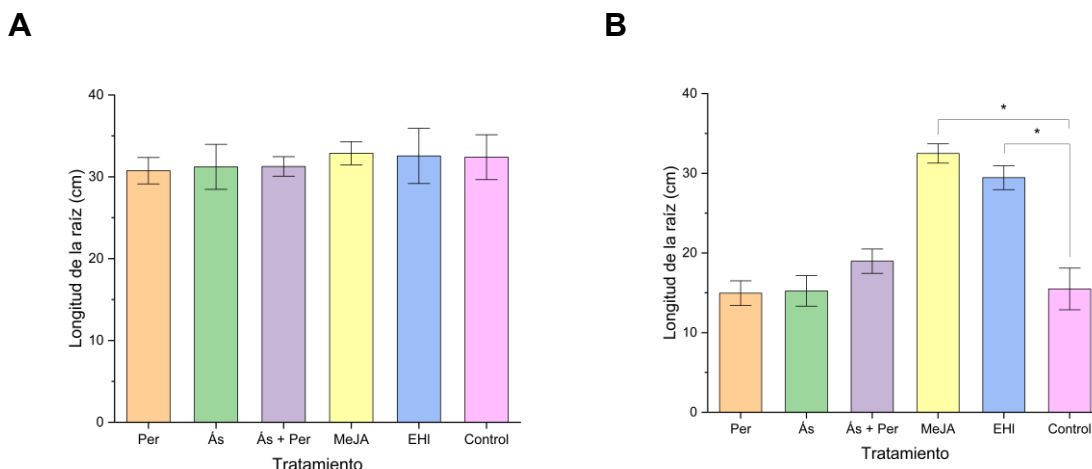


Figura 28. Longitud de raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Con respecto a la biomasa radicular, ninguno de los tratamientos evaluados durante los primeros tres meses produjo cambios significativos en comparación con el grupo control. Sin embargo, tras seis meses de aplicación, el Per, la combinación de Ás + Per y MeJA promovieron incrementos significativos en el peso total de la raíz ($p < 0.05$).

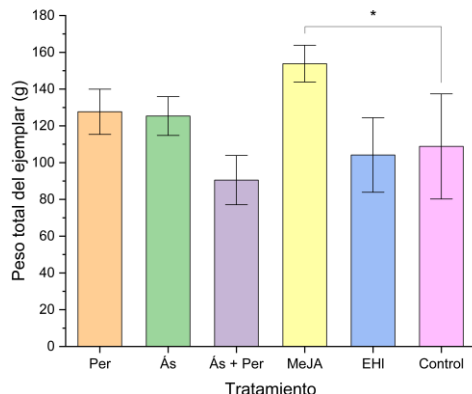
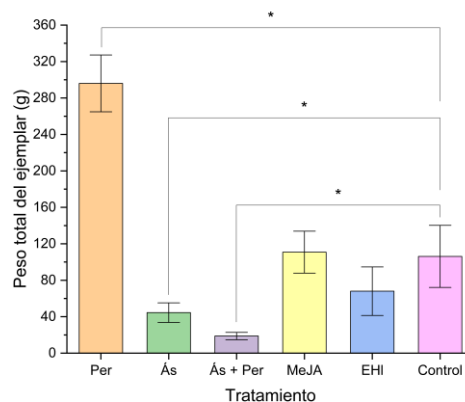
A**B**

Figura 29. Peso total de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitors biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Los efectos más pronunciados se observaron en los tratamientos con Per y MeJA, los cuales incrementaron la biomasa radicular en aproximadamente 3.5 y 2.5 veces, respectivamente, en comparación con el grupo control (Figura 30). Estos resultados indican que la exposición prolongada a determinados elicitors favorece significativamente el desarrollo del sistema radicular, órgano de interés debido a que constituye la principal fuente de afinina y otros metabolitos especializados en *H. longipes*.

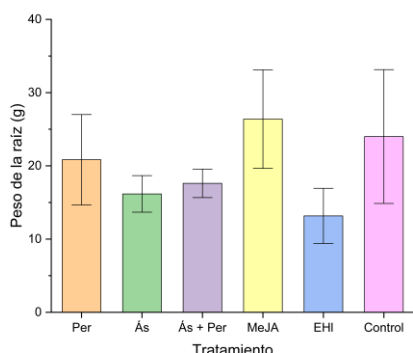
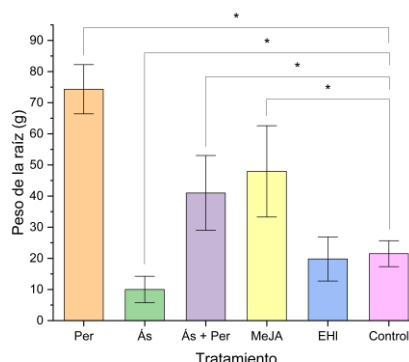
A**B**

Figura 30. Peso total de la raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitors biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

En cuanto al peso de la raíz principal, únicamente el tratamiento con Ás durante tres meses produjo una disminución significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$). Sin embargo, después de seis meses de tratamiento, el Per y el MeJA promovieron incrementos significativos en esta variable, aumentando el peso de la raíz principal aproximadamente 2.8 y 2.4 veces, respectivamente, en comparación con el grupo control.

Por el contrario, los tratamientos con Ás y EHI aplicados durante seis meses ocasionaron una reducción significativa en la biomasa de la raíz principal ($p < 0.05$) (Figura 31). En conjunto, estos resultados evidencian que la respuesta de la raíz principal depende tanto del tipo de elicitor como de la duración del tratamiento, observándose efectos contrastantes entre los tratamientos promotores del crecimiento radicular (Per y MeJA) y aquellos que limitaron la acumulación de biomasa en este órgano (Ás y EHI).

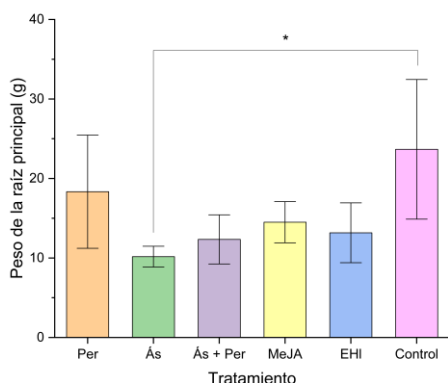
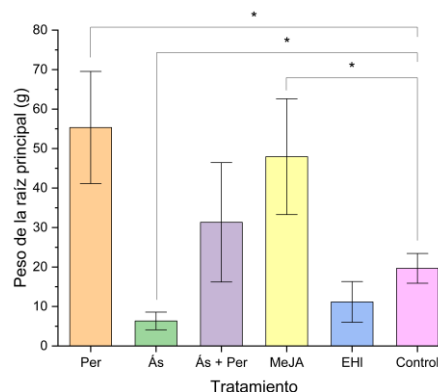
A**B**

Figura 31. Peso de la raíz principal de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitors biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

La aplicación de los elicitors evaluados modificó significativamente la formación de acodos en los ejemplares de *H. longipes*. Después de tres meses de tratamiento, todos los elicitors, con excepción del EHI, promovieron la formación de acodos en comparación con el grupo control. Los incrementos más pronunciados se observaron en los tratamientos con la combinación de Ás + Per y con MeJA, los cuales aumentaron el número de acodos aproximadamente 18 y 11 veces, respectivamente, en relación con el grupo control ($p < 0.05$).

Tras seis meses de tratamiento, el patrón de respuesta fue diferente. En esta etapa, el Per, el MeJA y el EHI indujeron incrementos significativos en la formación de acodos respecto al control. Los mayores efectos se observaron en los tratamientos con EHI y MeJA, los cuales incrementaron el número de acodos aproximadamente 21 y 16 veces, respectivamente (Figura 32). En conjunto, estos resultados indican que los elicitors evaluados no solo afectan el crecimiento vegetativo y radicular de *H. longipes*, sino que también influyen en mecanismos asociados con la propagación vegetativa de la especie, evidenciando respuestas dependientes tanto del tipo de estímulo como del tiempo de exposición.

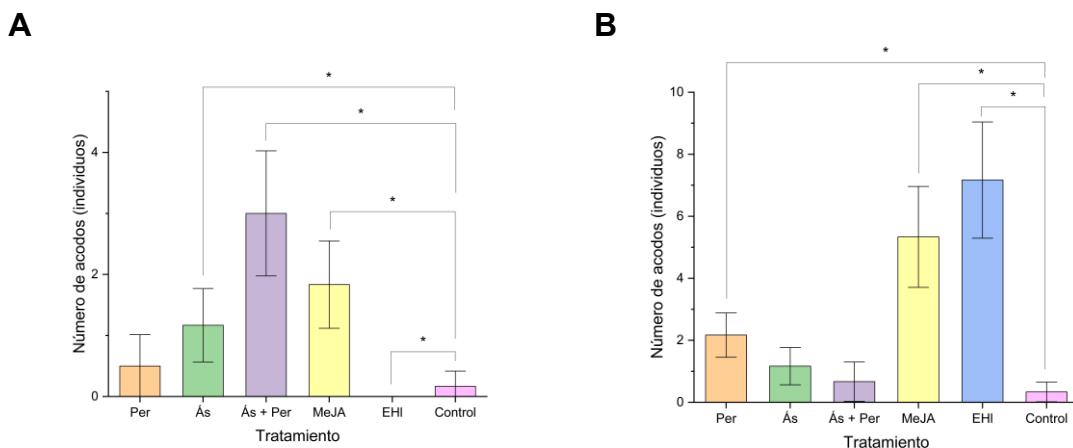


Figura 32. Número de acodos formados por ejemplar posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p=0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la elicitación biológica acumulativa durante seis meses produjo efectos más pronunciados sobre la morfología de *H. longipes* que los observados tras tres meses de tratamiento. Este comportamiento sugiere que, bajo las dosis evaluadas, los elicitores requieren una exposición prolongada para inducir cambios significativos en el crecimiento y desarrollo de la especie.

Durante los primeros tres meses de tratamiento, la respuesta morfológica fue limitada y específica para algunos parámetros. En este periodo no se observaron cambios importantes en la biomasa total ni en el desarrollo radicular, con excepción de los efectos promovidos por el MeJA. Asimismo, aunque el Ás redujo significativamente el peso de la raíz principal, también estimuló la formación de acodos, lo que sugiere una respuesta diferencial dependiendo del parámetro evaluado. Este comportamiento podría indicar que, en etapas tempranas, el Ás favorece procesos relacionados con la diferenciación y propagación vegetativa antes que la acumulación de biomasa.

Por el contrario, después de seis meses de tratamiento se observaron modificaciones significativas en la mayoría de las variables evaluadas. En la parte

aérea, el MeJA, el Per y el EHI promovieron incrementos en la altura del tallo y en la biomasa de los ejemplares, mientras que el Ás produjo una reducción de estas variables. De manera similar, Per y MeJA estimularon significativamente el crecimiento radicular, aumentando tanto la longitud como la biomasa de la raíz, mientras que el EHI mostró efectos positivos principalmente sobre algunos parámetros de crecimiento y propagación vegetativa. Entre los tratamientos evaluados, Per y MeJA mostraron los efectos más consistentes y pronunciados sobre el desarrollo general de la planta (Figura 33).

En conjunto, estos resultados evidencian que la respuesta morfológica de *H. longipes* frente a la elicitación biológica depende tanto de la naturaleza del estímulo como del tiempo de exposición, siendo los tratamientos prolongados los que generan las modificaciones más importantes en el crecimiento de la especie.

A



B



Figura 33. Ejemplares representativos del aspecto morfológico de *H. longipes* posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitores biológicos.

En cuanto a la raíz principal, los tratamientos con Per y MeJA promovieron incrementos significativos en su biomasa, mientras que el Ás y el EHI produjeron reducciones significativas en esta variable. Sin embargo, estos últimos tratamientos favorecieron significativamente la formación de acodos, lo que sugiere una modificación en el patrón de crecimiento del sistema radicular, caracterizada por una mayor ramificación en detrimento del crecimiento de la raíz principal.

Desde una perspectiva general, el Per fue el elicitor que produjo los efectos más consistentes sobre las variables morfológicas evaluadas después de seis meses de tratamiento, seguido por el MeJA. En contraste, el Ás tendió a reducir diversos parámetros asociados al crecimiento y acumulación de biomasa. Estos resultados sugieren que la señalización inducida por Per y MeJA favorece el desarrollo sostenido de *H. longipes* bajo las condiciones evaluadas, mientras que el Ás genera una respuesta fisiológica diferente que limita la acumulación de biomasa a largo plazo.

Por otro lado, la formación de acodos fue una de las variables más sensibles a la elicitación. A los tres meses de tratamiento, el Ás promovió un incremento significativo en el número de acodos, mientras que a los seis meses los mayores efectos se observaron con MeJA y EHI. Particularmente, el EHI mostró una

respuesta dependiente del tiempo, ya que no indujo cambios significativos en esta variable durante los primeros tres meses, pero después de seis meses promovió incrementos importantes en la altura del tallo, la longitud de la raíz y, especialmente, en la formación de acodos.

Las divergencias fenotípicas observadas tras seis meses de exposición crónica a los elicitores se fundamentan en la activación diferencial de vías de transducción de señales. Estas cascadas bioquímicas modifican sustancialmente la asignación de recursos metabólicos y los patrones morfogénicos de *H. longipes*. En el caso del Per, el incremento sostenido en la biomasa total y radicular responde a su función dual como molécula señalizadora y agente de remodelación de la pared celular. A concentraciones subletales, las ROS como el H_2O_2 actúan induciendo un estado de eustrés que activa canales de calcio transmembranales, promoviendo cascadas de fosforilación asociadas al crecimiento. Simultáneamente, el Per participa en la dinámica de la pared celular a través de su interacción con peroxidasas de clase III, catalizando el entrecruzamiento y subsecuente relajamiento de las microfibrillas de celulosa; un proceso biomecánico insustituible para la expansión y elongación celular rápida en el tejido radicular (Foreman *et al.* 2003; Mittler *et al.* 2004).

Por su parte, el MeJA actuó como un potente promotor global del crecimiento vegetativo. Fisiológicamente, la señalización por jasmonatos trasciende la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, estableciendo una estrecha intercomunicación con las vías de auxinas y etileno. La exposición a MeJA incrementa la fuerza de demanda del sistema radicular, transformándolo en un flujo metabólico altamente eficiente. Esta reconfiguración facilita la movilización y redirección de fotoasimilados desde los órganos aéreos hacia la raíz, garantizando la disponibilidad de esqueletos de carbono necesarios para sostener tanto la actividad mitótica en los meristemas apicales como la acumulación masiva de biomasa (Wasternack y Hause, 2013).

En marcado contraste, los ejemplares tratados con Ás exhibieron una reducción significativa en la biomasa de la raíz principal y en la altura del tallo. Este detrimento morfológico ilustra el paradigma ecofisiológico conocido como compensación entre

crecimiento y defensa (*growth-defense trade-off*). La aplicación exógena de Ás simula un estado de estrés biótico que activa la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). La instauración de la SAR representa un alto costo bioenergético para la planta, obligándola a desviar precursores metabólicos principalmente ATP y carbohidratos del crecimiento primario hacia la síntesis *de novo* de proteínas relacionadas con la patogénesis (Huot *et al.* 2014). No obstante, la percepción aguda de este estrés químico desencadena Respuestas Morfogénicas Inducidas por Estrés (SIMRs), justificando la estimulación temprana en la formación de acodos como una estrategia compensatoria de propagación vegetativa ante condiciones percibidas como adversas (Pasternak *et al.* 2005).

Finalmente, el fenotipo inducido por el EHI evidencia la acción de un mecanismo especializado en la reprogramación de la arquitectura radical, mediado primordialmente por la afinina. Esta alcalamida activa una cascada bioquímica dependiente de la síntesis endógena de NO. Al fungir como segundo mensajero, el NO interviene en la homeostasis, percepción y transporte polar de las auxinas endógenas mediante la modulación de las proteínas transportadoras PIN. Esta sinergia hiperestimula las divisiones periclinales en las células competentes del periciclo (Ramírez-Chávez *et al.* 2004; Méndez-Bravo *et al.* 2011). En consecuencia, la planta canaliza preferencialmente sus recursos bioenergéticos hacia la vigorosa emisión y elongación de raíces adventicias y laterales, en detrimento del engrosamiento y acumulación de biomasa en el eje de la raíz principal.

Desde una perspectiva agronómica y aplicada, la implementación programada de elicitors como el MeJA y el EHI constituye una herramienta biotecnológica altamente prometedora. Al inducir la formación masiva de acodos de manera anticipada a la cosecha destructiva de las raíces, se facilita la propagación clonal *in situ* de los ejemplares. Esta aproximación prospectiva no solo permite optimizar el rendimiento productivo mediante el manejo dirigido del fenotipo, sino que sienta las bases biológicas para el diseño de protocolos de cultivo estrictamente sostenibles, garantizando el aprovechamiento racional y la conservación a largo plazo de las poblaciones de *H. longipes*.

La pertinencia de esta estrategia se sustenta en la baja diversidad genética y la elevada similitud entre las poblaciones naturales de *H. longipes*, condiciones que, aunadas a la extracción intensiva de sus raíces, incrementan la vulnerabilidad de la especie (Parola-Contreras *et al.* 2024). En este contexto, la propagación clonal constituye una alternativa con potencial para favorecer su conservación y aprovechamiento sostenible.

VIII.16 Cuantificación de afinina en los ejemplares elicitados.

La cuantificación de afinina mostró cambios significativos en la concentración de esa alcaloide. El tratamiento con EHI durante 3 meses aumentó significativamente la concentración de afinina con respecto al grupo control. En contraste, el tratamiento con Per y Ás disminuyeron la concentración de afinina con respecto al grupo control. Por otro lado, el tratamiento con MeJA y EHI durante 6 meses aumentó la concentración de la afinina con respecto a la elicitación durante únicamente 3 meses y el grupo control (Figura 34).

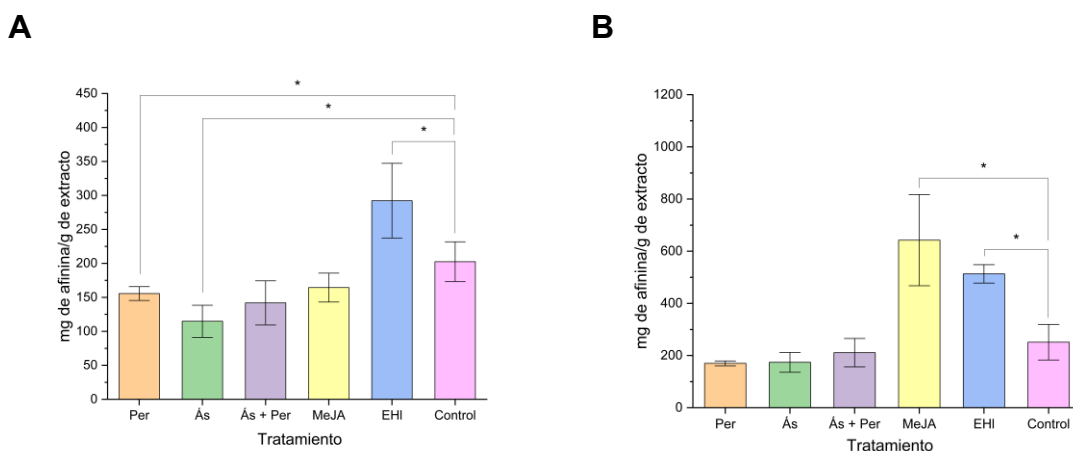


Figura 34. Contenido de afinina en la raíz de los ejemplares posterior a A) 3 y B) 6 meses de tratamiento con elicitors biológicos. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM ($n=6$). El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$). La significancia estadística se evaluó mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Por otro lado, la elicitación biológica no solo influyó en la concentración de afinina, sino que también favorecieron el incremento de otras alcanidas minoritarias. En la Figura 35 se presentan cromatogramas representativos de muestras provenientes de plantas elicitadas con los diferentes tratamientos durante 3 y 6 meses, lo que evidencia cambios cuali y cuantitativos en el perfil metabolómico radicular.

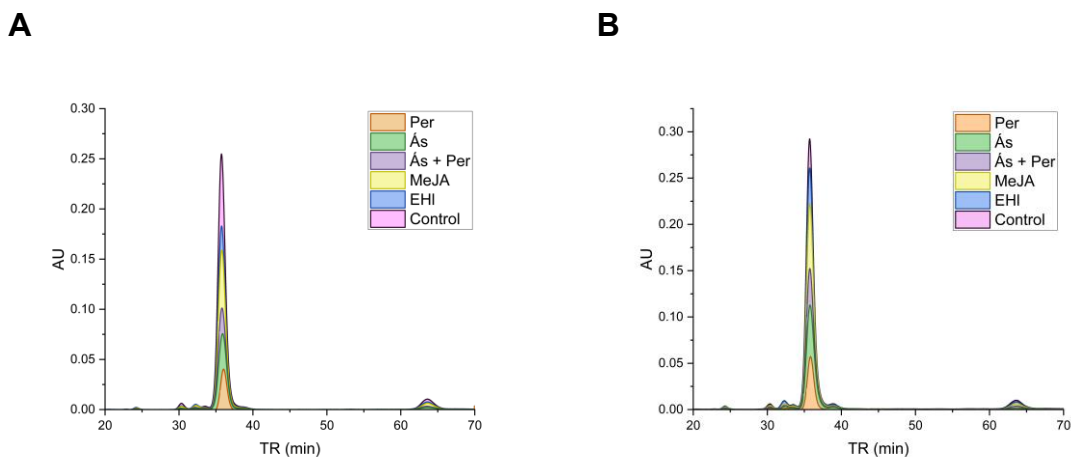


Figura 35. Cromatogramas representativos de HPLC-DAD ($\lambda=236$ nm) del perfil de las alcanidas presentes en *H. longipes* cultivadas en CI con diferentes tratamientos durante A) 3 y B) 6 meses. Los picos cromatográficos se identifican de la siguiente manera: Picos: 1) *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida y *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida, 2) *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida, 3) desconocido, 4) isómero de afinina, 5) afinina, 6) isómero de afinina, 7) homoespíntol y 8) desconocido.

En todos los tratamientos se observó un aumento significativo en el ABC de las alcanidas minoritarias presentes en los extractos. No obstante, a los 3 meses de tratamiento se observó un incremento de las alcanidas *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida y *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida en todos los tratamientos, mientras que a los 6 meses de tratamiento se observó un aumento de una alcanida desconocida y la *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida de manera conjunta. En conjunto, estas variaciones cuantitativas y cualitativas demuestran que la elicitación induce una reprogramación metabólica dependiente del tiempo de exposición en *H. longipes*. El incremento de diínamidas a los tres meses,

independiente del tratamiento, sugiere una respuesta inicial generalizada que prioriza compuestos poliacetilénicos de respuesta rápida. En contraste, a los seis meses, el MeJA y el EHI consolidan una adaptación que reorienta el flujo de carbono hacia la hiperacumulación de afinina y la diversificación de análogos como la *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida. Esto confirma que la elicitación prolongada no solo maximiza el rendimiento del metabolito mayoritario, sino que modula integralmente el perfil metabolómico radicular. Así, esta estrategia se consolida como una herramienta de precisión para estandarizar perfiles fitoquímicos e incrementar el valor de la biomasa.

VIII.17. Análisis de compuestos semivolátiles de ejemplares elicitados por CG-EM.

El perfil metabolómico basal de las raíces no elicitadas de *H. longipes* a los 3 meses de cultivo se caracterizó por una marcada predominancia de la fracción nitrogenada, con una abundancia relativa promedio de alcaloides del 65.80 %. El segundo bloque metabólico en importancia cuantitativa correspondió a los terpenos, los cuales registraron un promedio de 9.81 %, seguidos de cerca por la fracción de lípidos y sus derivados con el 5.72 %. Las familias de menor representatividad en el extracto orgánico basal fueron los ácidos grasos y sus derivados, con un valor promedio de 2.74 %, y los fenilpropanoides, que se posicionaron en un 1.41 %. Esta distribución del flujo de carbono confirma que, en condiciones de crecimiento estables, el metabolismo radicular de la planta prioriza de manera constante la vía biosintética de los alcaloides sobre las rutas del MVA, del MEP y del ácido shikímico (ver anexo 17).

A pesar de esta clara tendencia hacia la síntesis de compuestos nitrogenados, los datos analíticos revelaron cierta variabilidad interna entre las muestras del mismo tratamiento. Esta heterogeneidad biológica se manifestó en una de las réplicas, la cual exhibió una disminución en la abundancia de alcaloides (47.88 %) acoplada a incrementos compensatorios en las fracciones de terpenos (18.49 %) y lípidos (10.10 %), en comparación con la estabilidad observada en las otras dos réplicas.

Estas fluctuaciones intragrupos sugieren que, incluso en ausencia de inductores exógenos, el sistema radicular conserva una plasticidad intrínseca capaz de redirigir temporalmente los precursores metabólicos comunes en respuesta a pequeñas variaciones en el suelo o a ligeras asincronías en el desarrollo ontogenético de cada individuo (Figura 36).

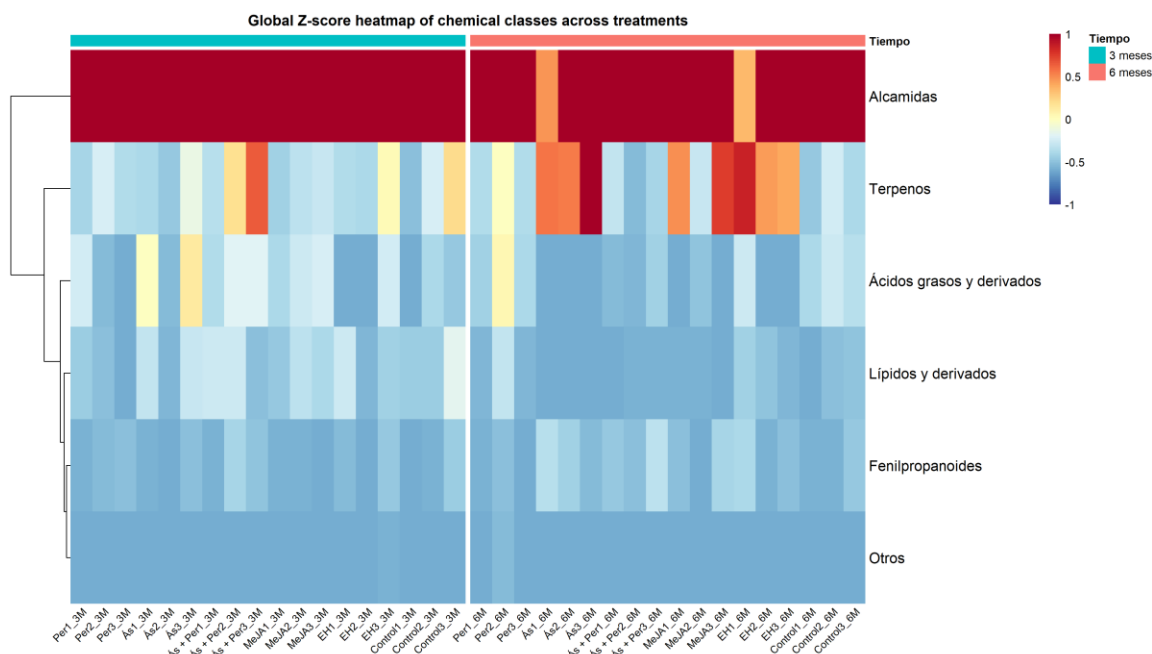


Figura 36. Mapa de calor (*heatmap*) de la abundancia relativa de las principales familias de metabolitos en raíces de *H. longipes*. Las filas corresponden a las clasificaciones biosintéticas de los compuestos semivolátiles identificados por CG-EM. Las columnas representan los diferentes tratamientos en CI durante 3 meses. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (Z-score), donde el espectro rojo indica una mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

La elicitación con Per a los 3 meses de cultivo indujo una reconfiguración drástica y selectiva en el perfil metabolómico radicular de *H. longipes*. Este tratamiento se caracterizó por dirigir la máxima canalización del flujo de carbono hacia la fracción nitrogenada, alcanzando un promedio de abundancia relativa de alcamidas del 69.72 %. En contraste con la dominancia de las alcamidas, las fracciones correspondientes a los terpenos y a los fenilpropanoides se mantuvieron en niveles discretos, registrando promedios generales de 6.19 % y 1.41 %, respectivamente. El fenómeno cuantitativo más notable bajo esta condición de estrés oxidativo fue la

marcada reducción de los componentes lipídicos, donde la fracción de lípidos y sus derivados cayó a un promedio del 1.89 %, mientras que los ácidos grasos y sus derivados se redujeron severamente hasta un valor promedio de 3.24 %. Desde una perspectiva bioquímica, este comportamiento sugiere que el estrés oxidativo agudo inducido por el Per actúa como un potente desencadenante para el consumo de precursores lipídicos de membrana, derivándolos presumiblemente mediante cascadas de lipoxigenasas hacia la síntesis acelerada de alcanidas como un mecanismo prioritario de protección celular y señalización frente al daño (Bhattacharya *et al.* 2010; Mittler, 2002).

A nivel intra-tratamiento se observó cierta variabilidad biológica debido a que las réplicas Per1 y Per2 mostraron una acumulación moderada de alcanidas (~61-64 %) y niveles estables de ácidos grasos, mientras que la muestra Per3 polarizó la respuesta al suprimir casi por completo la fracción lipídica (0.15 %) para disparar la síntesis de alcanidas hasta un 83.33 %.

La elicitación hormonal con Ás a los 3 meses de cultivo indujo una respuesta metabólica distintiva que refleja la activación de vías de defensa sistémica en el sistema radicular de *H. longipes*. Bajo esta condición, la abundancia relativa promedio de las alcanidas disminuyó a un 46.82 %, posicionándose como el valor medio más bajo entre todos los tratamientos a los 3 meses. En contraparte, el flujo de carbono se redirigió de manera notable hacia la síntesis de componentes lipídicos y de defensa volátil; los ácidos grasos y sus derivados registraron un promedio del 10.63 %, mientras que la fracción de lípidos y sus derivados se situó en un 4.80 %. Asimismo, la acumulación relativa de terpenos alcanzó un promedio de 6.18 %, respaldando el rol clásico del ácido salicílico en la modulación de respuestas de resistencia y en la activación de rutas hacia fitoalexinas y compuestos de naturaleza terpenoide (Reymond y Farmer, 1998).

Al interior del tratamiento se presentó una marcada variabilidad biológica condicionada por el comportamiento atípico de la réplica Ás1, la cual mantuvo niveles elevados de alcanidas (59.29 %) y una baja proporción de terpenos (5.00 %). Por el contrario, las réplicas Ás2 y Ás3 consolidaron la tendencia característica

del inductor al contraer la fracción nitrogenada en torno al 40 % y disparar la acumulación de ácidos grasos (hasta 16.71 %) y terpenos (alcanzando 10.73 % en Ás3), lo que evidencia diferencias individuales en el tiempo de sincronización y transducción de la señal hormonal.

La combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) a los 3 meses de cultivo desencadenó una profunda reprogramación en el flujo metabólico de *Heliopsis longipes*, caracterizada por el efecto sinérgico más evidente sobre la vía de los isoprenoides. Bajo esta condición de co-elicitación, la fracción nitrogenada de alcanidas se mantuvo en un nivel intermedio con un promedio de abundancia relativa del 50.72 %, mientras que la fracción de lípidos y sus derivados promedió un 5.70 % y los ácidos grasos y sus derivados un 8.09 %. El rasgo analítico distintivo de este tratamiento fue la hiperestimulación de la ruta de los terpenos, los cuales alcanzaron un promedio general del 17.62 %, duplicando los valores observados en los tratamientos individuales correspondientes y sugiriendo un fenómeno de *cross-talk* positivo entre la señal hormonal del ácido salicílico y el mensajero secundario ROS (Per) que maximiza el arsenal de defensa de la planta (Mur *et al.* 2006; Vasconsuelo y Boland, 2007).

La variabilidad interna del tratamiento estuvo marcada por una respuesta escalonada y progresiva entre las réplicas biológicas, donde la acumulación de terpenos ascendió de manera lineal desde un 5.93 % en la muestra Ás + Per1 hasta un valor cumbre de 28.93 % en la réplica Ás + Per3. Este comportamiento diferencial se correlacionó de forma inversa con la fracción de lípidos estructurales (la cual cayó de 7.35 a 2.02 %), evidenciando que el grado de amplificación de la cascada de transducción varía entre unidades experimentales, influyendo directamente en la tasa de redirección de carbono hacia las rutas del MVA o del MEP.

La inducción hormonal con MeJA a los 3 meses de cultivo promovió una respuesta metabólica altamente homogénea y orientada a la estabilidad de la fracción nitrogenada en las raíces de *H. longipes*. Bajo esta condición, la abundancia relativa promedio de las alcanidas se posicionó en un 65.74 %, consolidándose como la segunda familia más representativa del perfil global. Esta priorización biosintética

mantuvo controlado el gasto energético en los componentes lipídicos primarios, registrando promedios generales de 6.85 % para los ácidos grasos y sus derivados, y de 4.66 % para la fracción de lípidos y sus derivados; mientras que los terpenos y los fenilpropanoides se mantuvieron en niveles discretos con promedios de 5.71 % y 0.56 %, respectivamente. Estos resultados confirman el rol clásico del MeJA como el modulador maestro para la activación sostenida de genes involucrados en la homeostasis y síntesis de metabolitos secundarios nitrogenados (Wasternack y Hause, 2013).

A nivel intra-tratamiento se observó una variabilidad interna muy baja en la acumulación de la fracción nitrogenada principal, donde dos réplicas mantuvieron niveles de alcaloides estrechamente similares (~71 y 69 %, respectivamente). La fluctuación biológica más notoria se restringió a una réplica, la cual presentó una ligera disminución en la abundancia de alcaloides (56.66 %) acoplada a incrementos marginales en las fracciones de lípidos y fenilpropanoides. Esta homogeneidad general confirma que el jasmonato ejerce un control transcripcional robusto y uniforme sobre la ruta de los alcaloides, minimizando las desviaciones del flujo de carbono hacia rutas secundarias concurrentes a los 3 meses de desarrollo.

La elicitación con el EHI a los 3 meses de cultivo indujo una de las respuestas fitoquímicas más potentes y complejas en el sistema radicular de *H. longipes*. Este tratamiento forzó una masiva canalización del flujo de carbono hacia la fracción nitrogenada, alcanzando una abundancia relativa promedio de alcaloides del 73.98 %, el valor medio más alto registrado entre todos los inductores en este periodo evaluado. Este marcado incremento coexistió con un promedio del 4.34 % en la fracción de lípidos y sus derivados, un 2.77 % en los ácidos grasos y un 1.63 % en los fenilpropanoides, mientras que los terpenos acumularon un promedio general del 7.86 %. La capacidad del EHI para estimular simultáneamente múltiples familias metabólicas sugiere que su naturaleza multicomponente actúa como un elicitor crudo que activa receptores celulares múltiples, simulando una señal de daño tisular generalizado que obliga a la planta a robustecer sus defensas químicas solubles (Baenas *et al.* 2014; Thakur y Sohal, 2013).

Al interior del tratamiento se presentó una variabilidad biológica progresiva, donde la acumulación de alcanidas mostró niveles sobresalientes en todas las unidades, pero con dinámicas internas distintas, destacando la réplica EHI2 con el valor máximo de 79.94 % acoplado a la supresión casi total de ácidos grasos (0.09 %). Por el contrario, la muestra EHI3 exhibió una ligera contracción en la fracción nitrogenada (69.34 %), la cual fue compensada por un repunte notable en la síntesis de terpenos (14.30 %) y fenilpropanoides (3.10 %). Estas fluctuaciones demuestran que, aunque la mezcla compleja del extracto exógeno induce una alerta metabólica generalizada y robusta en todas las réplicas, la magnitud de la desviación del flujo de carbono hacia las rutas secundarias conserva un componente de variabilidad individual (Figura 36).

Por otro lado, el perfil metabolómico basal de las raíces de *H. longipes* a los 6 meses de cultivo reflejó la consolidación de un estado metabólico maduro, caracterizado por una canalización del flujo de carbono predominantemente enfocada en la fracción nitrogenada. En este periodo, la abundancia relativa promedio de las alcanidas incrementó de manera notable hasta situarse en un 78.25 %, reafirmando su posición como la familia de metabolitos mayoritaria. Por su parte, los ácidos grasos y sus derivados registraron un promedio del 6.11 %, seguidos de cerca por los terpenos con un 5.19 % y la fracción de lípidos y sus derivados con el 1.67 %, mientras que los fenilpropanoides se mantuvieron como el grupo de menor representatividad cuantitativa con un promedio de 1.36 %. Esta distribución química corrobora que, bajo un desarrollo ontogenético avanzado y condiciones ambientales estables, la maquinaria biosintética de la planta prioriza y estabiliza el almacenamiento constitutivo de alcanidas en el órgano subterráneo.

La variabilidad intra-tratamiento entre las réplicas biológicas basales fue moderada y evidenció una consistencia general en la dominancia nitrogenada, aunque con ligeras reconfiguraciones en las rutas minoritarias.

La elicitación crónica con Per a los 6 meses de cultivo indujo una fase de estabilización y especialización celular en el sistema radicular de *H. longipes*, tras el choque oxidativo inicial observada en etapas tempranas. Bajo esta condición de

estrés crónico, la fracción de alcanidas se consolidó con una abundancia relativa promedio del 68.62 %, manteniéndose como la ruta biosintética prioritaria. Las familias acompañantes registraron promedios generales del 8.00 % para terpenos, 4.44 % para lípidos y sus derivados, y un discreto 0.97 % para fenilpropanoides. Por su parte, la fracción de ácidos grasos y sus derivados promedió un 8.03 %, lo que sugiere una reconfiguración orientada a sostener la síntesis defensiva sin comprometer de manera absoluta la viabilidad celular del órgano subterráneo.

A nivel intra-tratamiento se presentó una marcada polarización metabólica debido al comportamiento atípico de la réplica Per2. Mientras que las muestras Per1 y Per3 exhibieron una respuesta altamente consistente y homogénea.

La elicitación prolongada con Ás a los 6 meses de cultivo desencadenó una de las respuestas más drásticas y polarizadas del desarrollo ontogenético en *H. longipes*, forzando una canalización del flujo de carbono sumamente selectiva. Bajo esta condición crónica, la abundancia relativa promedio de las alcanidas sufrió una severa contracción hasta situarse en un 34.53 %. El rasgo analítico más contundente de este tratamiento fue la redirección radical del metabolismo hacia la vía de los isoprenoides, donde la fracción de terpenos alcanzó un promedio general del 30.52 %, posicionándose como el valor más alto registrado para esta familia. De manera paralela, los fenilpropanoides incrementaron notablemente hasta promediar un 3.84 %, mientras que los ácidos grasos y los lípidos estructurales se bloquearon por completo, registrando un 0 % en todas las muestras. Este comportamiento confirma que, a largo plazo, la vía de señalización del ácido salicílico prioriza de forma exclusiva el almacenamiento de defensas de naturaleza terpenoide y fenilpropanoide en detrimento absoluto de las fracciones lipídicas (Reymond y Farmer, 1998).

Al interior del tratamiento se observó una variabilidad interna moderada que reflejó la maduración de la respuesta defensiva, principalmente en la magnitud de la inversión energética. Esta fluctuación marginal sugiere que, ante el estímulo crónico con Ás, el sistema radicular unifica el bloqueo de las rutas lipídicas primarias, pero

conserva diferencias individuales en la tasa de acumulación neta de sus fitoalexinas volátiles y semivolátiles.

A los 6 meses de tratamiento, la combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) modificó drásticamente la tendencia sinérgica observada en las etapas tempranas, redirigiendo el flujo de carbono de manera concertada hacia la fracción nitrogenada. Bajo esta condición de estrés crónico combinado, la abundancia relativa promedio de las alcanidas incrementó de forma escalonada hasta situarse en un 68.52 %. En contraparte, la ruta de los isoprenoides sufrió una severa depresión, registrando un promedio general de terpenos de apenas 4.37 %. Por su parte, los fenilpropanoides mantuvieron una presencia notable con un promedio del 3.82 %, mientras que las fracciones lipídicas se mantuvieron en niveles mínimos, promediando un 2.32 % para los ácidos grasos y sus derivados, y un 0.56 % para los lípidos estructurales. Este comportamiento tardío sugiere un fenómeno de *cross-talk* transcripcional donde la persistencia del estrés combinado obliga al sistema radicular a deponer la producción de compuestos volátiles para priorizar amidas estables de alto peso molecular.

La variabilidad interna del tratamiento fue baja y evidenció una notable consistencia en la consolidación del escudo nitrogenado a nivel intra-tratamiento. Esta homogeneidad general confirma que, ante la exposición crónica combinada, las diferencias individuales disminuyen y el sistema radicular unifica sus recursos energéticos hacia la ruta mayoritaria como estrategia de supervivencia prolongada.

La inducción prolongada con MeJA a los 6 meses de cultivo consolidó su rol como el estimulante por excelencia de la ruta de las alcanidas bajo estrés crónico en *H. longipes*. Este tratamiento redirigió el flujo de carbono y nitrógeno de manera masiva hacia la fracción nitrogenada, alcanzando una abundancia relativa promedio del 67.53 %. Como consecuencia de esta polarización biosintética, las rutas competitivas concurrentes se mantuvieron reprimidas, registrando promedios generales de 2.21 % para los fenilpropanoides y un escaso 0.62 % para los lípidos y sus derivados. Por su parte, la fracción de terpenos se posicionó en un promedio del 20.96 %, mientras que los ácidos grasos y sus derivados disminuyeron

drásticamente hasta un valor medio de 0.85 %, confirmando que la exposición crónica al jasmonato monopoliza los recursos energéticos para maximizar el arsenal de defensas amídicas en la raíz (Rios-Chávez *et al.* 2003; Wasternack y Hause, 2013).

A nivel intra-tratamiento se presentó la variabilidad biológica más drástica de todo el diseño experimental a los 6 meses, evidenciando respuestas metabólicas bimodales entre las unidades experimentales, lo que demuestra que el umbral de saturación al estímulo crónico por jasmonatos puede desencadenar una canalización metabólica total y diferencial entre individuos del mismo tratamiento.

La elicitación crónica con el EHI a los 6 meses de cultivo indujo un perfil adaptativo particular en *H. longipes*, caracterizado por sostener una alerta metabólica diversificada que evitó el acostumbramiento celular. Bajo esta condición de exposición prolongada a una matriz compleja, la fracción de alcanidas registró una abundancia relativa promedio del 39.68 %, mostrando una disminución en comparación con las etapas tempranas. Por el contrario, el flujo de carbono se canalizó de manera robusta y constante hacia la ruta de los isoprenoides, donde la fracción de terpenos alcanzó un promedio general del 26.91 %. Las familias acompañantes se mantuvieron en niveles discretos, reportando promedios de 2.51 % para los ácidos grasos y sus derivados, 2.50 % para los fenilpropanoides y 1.68 % para los lípidos estructurales. Estos datos corroboran que la complejidad fitoquímica del inductor exógeno obliga al sistema radicular a disminuir severamente su gasto en lípidos basales para sostener un sistema defensivo mixto, balanceando su inversión entre amidas solubles y terpenoides semivolátiles (Baenas *et al.* 2014; Thakur y Sohal, 2013).

Al interior del tratamiento se observó una variabilidad biológica controlada que se manifestó principalmente en la proporcionalidad de las dos familias mayoritarias. Esta oscilación intra-tratamiento confirma que, si bien la exposición crónica a una mezcla de extractos crudos previene la habituación y mantiene activo un escudo químico dual, la magnitud exacta con la que cada individuo distribuye sus recursos entre ambas rutas conserva un margen de plasticidad biológica.

En este sentido, a los 3 meses de cultivo, la elicitación química y hormonal desencadenó una reprogramación metabólica rápida y divergente en el sistema radicular de *H longipes*, caracterizada por la competencia inmediata en la asignación de carbono hacia rutas de defensa específicas. El estrés oxidativo agudo inducido por el peróxido de hidrógeno Per y la complejidad fitoquímica del EHI actuaron como potentes señales de peligro celular, activando preferencialmente la ruta de las alcanidas (metabolismo secundario nitrogenado) mediante el consumo acelerado de precursores lipídicos de membrana.

Por el contrario, los tratamientos hormonales tempranos reflejaron respuestas polarizadas: el Ás atenuó la fracción nitrogenada para desviar los recursos metabólicos hacia la vía del ácido shikímico (fenilpropanoides) y la vía del MVA/MEP (síntesis de terpenos basales); mientras que el MeJA consolidó la homeostasis de las alcanidas al actuar como regulador transcripcional específico de esta vía nitrogenada. El hallazgo más relevante de este periodo fue el marcado *cross-talk* positivo de la co-elicitación (Ás + Per, la cual hiperestimuló de manera sinérgica la ruta de los isoprenoides (terpenos), multiplicando el arsenal defensivo volátil ante la convergencia de una señal hormonal y un mensajero secundario de estrés.

A los 6 meses de exposición prolongada, el sistema radicular abandonó las respuestas de choque temprano para consolidar rutas de especialización tardía y adaptaciones metabólicas maduras. La elicitación crónica con Per transitó hacia una fase de estabilización celular donde coexistieron la síntesis sostenida de alcanidas y la reactivación de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y lípidos estructurales, orientada a la reparación de membranas por peroxidación sostenida. En este periodo maduro, las vías hormonales individuales se polarizaron drásticamente: el Ás bloqueó por completo el metabolismo lipídico primario para monopolizar el flujo de carbono hacia la vía de los terpenoides, alcanzando los niveles máximos de fitoalexinas semivolátiles; en contraparte, el MeJA ejerció un control absoluto sobre el flujo de nitrógeno, alcanzando el máximo histórico en la acumulación de alcanidas y demostrando ser el inductor crónico por excelencia para esta familia.

De manera contrastante con la fase temprana, la persistencia del estrés combinado en el tratamiento Ás + Per deprimió severamente la síntesis de terpenos para redirigir los recursos de forma concertada hacia amidas estables de alto peso molecular, evidenciando un ajuste en el *cross-talk* transcripcional para salvaguardar la viabilidad del órgano subterráneo a largo plazo. Finalmente, el EHI a los 6 meses sostuvo una alerta metabólica dual balanceada que evitó el acostumbramiento celular, diversificando la inversión energética de la planta de manera equitativa entre la ruta de las alcanidas y la ruta de los terpenoides, lo que corrobora que la complejidad de una matriz fitoquímica exógena fuerza un estado de defensa mixto y sostenido en el tiempo (Figura 36).

VIII.17.1. Perfil de ácidos grasos de los ejemplares elicitados.

El perfil basal de la fracción de ácidos grasos y sus derivados en la raíz no elicitada de *H. longipes* a los 3 meses registró un promedio de abundancia relativa del 1.95 %. Cuantitativamente, esta fracción estuvo constituida casi en su totalidad por triglicéridos de cadena corta, los cuales promediaron un 1.80 %, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (0.11 %) y los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, 0.04 %) se detectaron en niveles marginales. A nivel intra-tratamiento se observó una variabilidad biológica moderada. Esta distribución metabólica sugiere que, en condiciones de desarrollo homeostático temprano y sin estrés, el sistema radicular almacena formas lipídicas simplificadas y estables como reserva energética basal (Figura 37) (ver anexo 17).

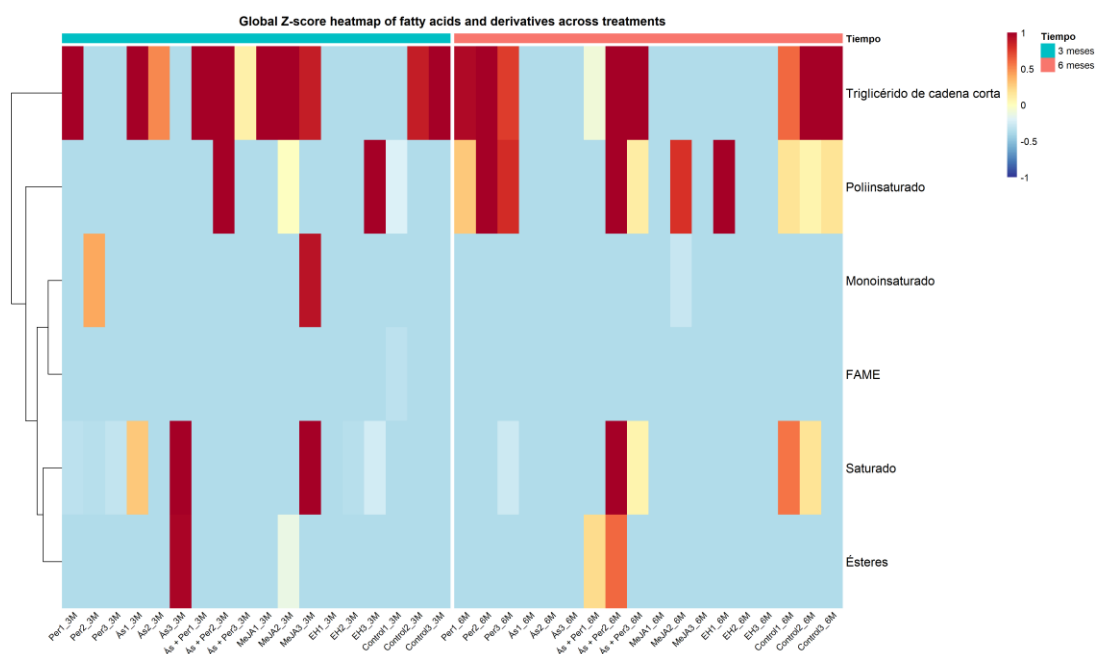


Figura 37. Mapa de calor (*heatmap*) de la abundancia relativa de los ácidos grasos presentes en la raíz de ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (*Z-score*), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

La elicitación con Per indujo una movilización selectiva y decreciente en el pool de ácidos grasos, alcanzando un promedio general del 3.24 %. El rasgo analítico más contundente bajo este estrés oxidativo agudo. Esta drástica supresión de las formas lipídicas libres en la réplica de respuesta rápida sustenta el consumo acelerado de precursores lipídicos de membrana para alimentar, mediante cascadas de lipoxigenasas, la síntesis prioritaria de alcanoidas frente al daño oxidativo (Bhattacharya *et al.* 2010; Mittler, 2002).

El tratamiento con ácido salicílico desencadenó la mayor acumulación de ácidos grasos y sus derivados en este periodo, registrando un promedio de abundancia relativa del 10.63 %. Cuantitativamente, el flujo de carbono se dividió principalmente entre triglicéridos de cadena corta (promedio de 4.61 %) y ácidos grasos saturados (promedio de 5.11 %). Este comportamiento corrobora que la señalización por

salicilato promueve una activa remodelación lipídica celular en etapas tempranas, estimulando la síntesis *de novo* de cadenas saturadas y formas de almacenamiento como parte de su respuesta de resistencia sistémica.

La combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) mitigó el incremento masivo de ácidos grasos libres observado bajo el estímulo aislado de salicilato, reportando un promedio general del 5.29 %. En esta condición de co-elicitación, los triglicéridos de cadena corta volvieron a predominar con un promedio del 3.66 %, acompañados de forma minoritaria por ácidos grasos poliinsaturados (1.62 %). Esta estabilización interna sugiere que el *cross-talk* entre la hormona y el mensajero ROS regula finamente el grado de insaturación lipídica, evitando la acumulación de ácidos libres saturados y facilitando la fluidez de membrana durante la respuesta defensiva concertada.

La inducción hormonal con MeJA promovió una acumulación intermedia y altamente diversificada de ácidos grasos, con un promedio de abundancia relativa del 6.90 %. A diferencia de los otros tratamientos, el MeJA estimuló la presencia simultánea de múltiples subclases, registrando promedios generales de 4.47 % para triglicéridos de cadena corta, 1.11 % para ácidos grasos saturados, 0.87 % para monoinsaturados y 0.25 % para poliinsaturados. Esta sólida complementariedad confirma que el jasmonato actúa como un modulador homeostático maestro, sosteniendo un pool dinámico y completo de precursores lipídicos para abastecer de manera constante los requerimientos de la ruta de las alcanoidas (Rios-Chávez *et al.* 2003).

La elicitación con el EHI provocó una severa supresión en la abundancia de ácidos grasos y sus derivados, situándose en un promedio general de apenas 3.06 %. Este patrón de supresión severa seguido de un rebote metabólico concentrado en cadenas poliinsaturadas demuestra que la matriz compleja del extracto actúa como un elicitor crudo potente, obligando a la raíz a movilizar u oxidar de forma inmediata sus reservas lipídicas basales para priorizar la síntesis de defensas amídicas solubles.

El perfil metabólico basal de la fracción de ácidos grasos y sus derivados en las raíces no elicítadas de *H. longipes* a los 6 meses se estabilizó en un promedio de abundancia relativa del 6.11 %. Cuantitativamente, el flujo de carbono se concentró de forma prioritaria en los triglicéridos de cadena corta (promedio de 3.70 %), respaldados por aportes menores de ácidos grasos saturados (1.02 %) y poliinsaturados (1.03 %).

La elicitación crónica con peróxido de hidrógeno a los 6 meses indujo un incremento en el pool de ácidos grasos, promediando un 8.03 % de abundancia relativa general. A diferencia de la fase temprana, el flujo se redirigió selectivamente hacia componentes de almacenamiento celular, donde los triglicéridos de cadena corta lideraron la fracción con un promedio del 5.24 %, seguidos por los ácidos grasos poliinsaturados con un 2.71 %. Esta reactivación madura de cadenas poliinsaturadas y triglicéridos sustenta una respuesta orientada a la aclimatación y reparación de las membranas celulares, mitigando el daño estructural derivado de la peroxidación lipídica sostenida por la exposición crónica al ROS.

El tratamiento prolongado con Ás provocó un bloqueo absoluto e irreversible en la biosíntesis y acumulación de todas las subclases de ácidos grasos, registrando un 0.00 % de abundancia relativa en las tres réplicas biológicas analizadas. Desde una perspectiva fitoquímica, esta supresión total evidencia que, bajo un escenario de exposición crónica, la vía de señalización del salicilato ejerce un control transcripcional inhibitorio estricto sobre la acetil-CoA carboxilasa y el complejo de la ácido graso sintasa en el sistema radicular. Al anular por completo el gasto energético en la fracción lipídica primaria, la planta monopoliza el flujo de carbono remanente para sostener la masiva hiperestimulación observada en la vía de los terpenoides, consolidando un arsenal defensivo basado exclusivamente en fitoalexinas de naturaleza isoprenoide (Reymond y Farmer, 1998).

La combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) rompió el bloqueo metabólico total impuesto por el salicilato individual, permitiendo una acumulación promedio de ácidos grasos del 7.26 %. Cuantitativamente, la fracción estuvo integrada por triglicéridos de cadena corta (promedio de 2.65 %), ácidos grasos

saturados (2.29 %), poliinsaturados (1.28 %) y ésteres (1.05 %). Este comportamiento tardío confirma que la presencia del peróxido como mensajero secundario contrarresta la señal de represión del Ás, reactivando la síntesis lipídica estructural para estabilizar las membranas celulares frente al estrés combinado prolongado.

La inducción crónica con MeJA provocó una severa depresión en el pool lipídico general, promediando una abundancia relativa de apenas 0.85 %. El análisis analítico de la variabilidad biológica interna reveló un comportamiento diferente el MeJA suprimió casi en su totalidad (0.00 %). Esta inhibición generalizada corrobora que, a los 6 meses, la exposición prolongada al jasmonato monopoliza de manera casi unánime los recursos energéticos y los esqueletos de carbono para maximizar de forma prioritaria la ruta de las alcanidas, restringiendo al mínimo la síntesis de precursores lipídicos basales (Rios-Chávez *et al.* 2003).

Finalmente, la elicitación prolongada con el EHI crudo repitió el patrón de supresión severa observado en la hormona MeJA, registrando un promedio general de abundancia relativa del 2.51 %. Este comportamiento confirma que, a largo plazo, la matriz compleja del EHI induce un estado de habituación o redirección selectiva en la mayoría de los individuos, los cuales detienen la inversión en ácidos grasos libres para balancear su metabolismo constitutivamente entre alcanidas estables y terpenos.

En este sentido, a los 3 meses de cultivo, la fracción de ácidos grasos y sus derivados exhibió una activa y coordinada respuesta de movilización, actuando principalmente como un pool de reserva energética y suministro de precursores lipídicos. En el grupo Control, el flujo basal se destinó de manera casi exclusiva al almacenamiento de triglicéridos de cadena corta. No obstante, la elicitación química alteró este equilibrio de forma inmediata: el estrés oxidativo agudo por Per, lo cual provocó una drástica supresión de estas formas libres en las unidades de respuesta rápida, evidenciando el consumo acelerado de lípidos para alimentar la ruta de biosíntesis de alcanidas a través de cascadas de lipoxigenasas.

Por su parte, las vías hormonales individuales incrementaron sustancialmente la fracción lipídica; el MeJA activó simultáneamente múltiples subclases (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) para sostener de manera homeostática el pool de precursores nitrogenados, mientras que el Ás indujo la máxima acumulación de la fase temprana mediante la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados y formas de almacenamiento como parte de la ruta de resistencia sistémica. Este incremento masivo del salicilato fue atenuado de forma concertada bajo la co-elicitación (Ás + Per), donde el *cross-talk* reguló el grado de insaturación celular para favorecer la fluidez de membrana. Finalmente, la matriz compleja del EHI forzó un consumo exhaustivo e inmediato de los pools lipídicos basales en la mayoría de sus réplicas, obligando a la planta a priorizar la defensa química soluble.

A los 6 meses de exposición prolongada, la dinámica de los ácidos grasos transitó desde una fase de movilización generalizada hacia un escenario de estricta regulación transcripcional y especialización celular. En el grupo Control, la maduración ontogenética estabilizó e incrementó el almacenamiento constitutivo de triglicéridos de cadena corta. Bajo el estímulo crónico de los elicitores, el comportamiento lipídico se polarizó de manera radical entre la aclimatación y la inhibición enzimática total. El Per provocó una reactivación madura de cadenas poliinsaturadas y triglicéridos, redirigiendo el flujo de carbono hacia la ruta de reparación de membranas para contrarrestar la peroxidación lipídica sostenida y preservar la viabilidad celular del órgano subterráneo.

En marcado contraste, las vías hormonales crónicas suprimieron severamente esta fracción. El MeJA deprimió el pool lipídico a niveles mínimos, mientras que el ácido salicílico Ás impuso un bloqueo absoluto (0.00 %) en todas las réplicas biológicas, confirmando una represión transcripcional estricta sobre las enzimas de la síntesis de ácidos grasos basales; en ambos casos, la anulación de esta ruta primaria permitió monopolizar los recursos remanentes hacia la vía de las alcanidas y la vía de los terpenoides, respectivamente. Este bloqueo total del salicilato fue revertido por la presencia del peróxido en el tratamiento combinado (Ás + Per), el cual reactivó la síntesis de cadenas saturadas y ésteres para estabilizar la estructura celular

frente al estrés crónico. Finalmente, la exposición prolongada a la matriz compleja del EHI consolidó un apagado metabólico de la fracción en la mayoría de sus individuos, lo que corrobora que a largo plazo la raíz previene el gasto en lípidos libres para balancear de manera equitativa su inversión entre defensas amídicas e isoprenoides (Figura 37).

VIII.17.2. Perfil de alcanidas de los ejemplares elicitados.

El perfil constitutivo de alcanidas en la raíz no elicitada de *H. longipes* a los 3 meses registró un promedio de abundancia relativa total del 65.80 %. La distribución individual reflejó que la maquinaria biosintética de la planta está dominada categóricamente por la alcanida triénica afinina, la cual alcanzó un promedio del 53.71 %, consolidándose como el biomarcador mayoritario de la especie. Las familias secundarias estuvieron integradas por el homoespilantol (promedio de 9.79 %) y la amida acetilénica *N*-isobutilundeca-2(*E*)-en-8,10-diinamida (promedio de 1.96 %), mientras que la erucamida se mantuvo en niveles marginales (0.12 %) (Figura 39) (ver anexo 17).

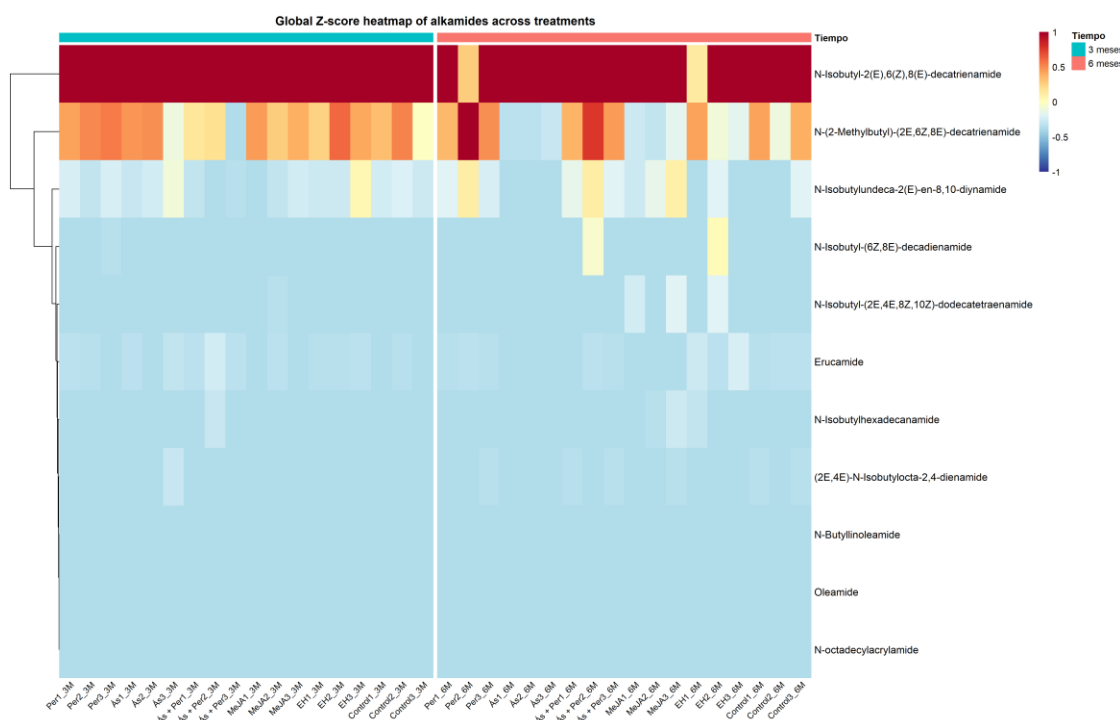


Figura 38. Mapa de calor (*heatmap*) de la abundancia relativa de alcanamidas presentes en la raíz de ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (*Z-score*), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

La elicitación con Per indujo una fuerte estimulación hacia la fracción nitrogenada, promediando una abundancia relativa total del 69.72 %. Este incremento estuvo sustentado casi en su totalidad por la síntesis *de novo* de afinina, la cual promedió un 54.58 %. Las amidas acompañantes mantuvieron una consistencia notable, reportando promedios de 12.87 % para la *N*-(2-metilbutil)-trienamida y de 1.76 % para la alcanamida diénica. Este comportamiento confirma que el choque por estrés oxidativo agudo actúa como un potente interruptor transcripcional que activa rutas enzimáticas secundarias de la ruta de las alcanamidas para mitigar el daño tisular mediante la diversificación de amidas insaturadas.

El tratamiento hormonal con Ás provocó la mayor tasa de depresión en la fracción nitrogenada a los 3 meses, disminuyendo la abundancia relativa promedio de

alcamidas totales a un 46.80 %. Esta contracción afectó directamente a la afinina, la cual cayó a un promedio general del 33.84 %. La fluctuación intra-tratamiento demuestra que, si bien el Ás deprime la ruta nitrogenada principal para favorecer a los terpenos, induce de manera selectiva la síntesis de alcamidas no triénicas como respuesta adaptativa secundaria.

La combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) compensó el efecto inhibitorio del salicilato individual, posicionando la abundancia relativa promedio de alcamidas totales en un 50.72 %. Por otro lado, la afinina promedió un 41.46 %, mientras que la *N*-(2-metilbutil)-trienamida se situó en un 5.34 %. Este comportamiento sugiere que el *cross-talk* transcripcional temprano modula de manera fina la expresión de desaturasas y elongasas, generando perfiles amídicos heterogéneos entre individuos, pero protegiendo al pool nitrogenado de la supresión total impuesta por el Ás.

La inducción hormonal con MeJA promovió una acumulación intermedia y altamente estable de alcamidas, alcanzando un promedio de abundancia relativa total del 65.74 %. La distribución porcentual de los componentes mayoritarios se mantuvo en un equilibrio homeostático notable, con promedios generales de 53.40 % para afinina y 11.05 % para la *N*-(2-metilbutil)-trienamida. Esta consistencia intra-tratamiento confirma que el jasmonato actúa como un regulador transcripcional directo, uniforme y robusto, que optimiza la ruta de las alcamidas y minimiza las desviaciones estructurales mayores en etapas tempranas del desarrollo radicular.

La elicitación con el EHI desencadenó la respuesta nitrogenada más potente y masiva de toda la fase de 3 meses, alcanzando un promedio de abundancia relativa total de alcamidas del 73.98 %. Este marcado incremento estuvo liderado por una sobresaliente acumulación de afinina, la cual registró un promedio general de 60.94 %, posicionándose como el valor medio más alto para este biomarcador entre todos los tratamientos. La abundancia de las familias minoritarias también se elevó, promediando un 11.77 % para la *N*-(2-metilbutil)-trienamida y un 3.12 % para la alcamida diénica. Este comportamiento robustece la premisa de que la naturaleza multicomponente del EHI simula una alerta generalizada de daño que satura de

manera unánime los receptores celulares, maximizando de forma prioritaria el escudo nitrogenado radicular (Figura 38).

A los 6 meses de cultivo, el perfil constitutivo de alcanidas en la raíz basal de *H. longipes* se consolidó en un promedio de abundancia relativa total del 78.25 %, reflejando la maduración de la ruta nitrogenada. La afinina reafirmó su dominancia absoluta con un promedio general del 67.52 %. Las familias minoritarias constitucionales estuvieron representadas por el homoespilantol (promedio de 9.04 %) y la alcanida diénica *N*-isobutilundeca-2(*E*)-en-8,10-diinamida (promedio de 0.90 %).

La elicitación crónica con Per indujo una fase de especialización e inducción selectiva, promediando una abundancia relativa total de alcanidas del 68.62 %. Este tratamiento estuvo marcado por una drástica bimodalidad intra-tratamiento. El comportamiento general actuó de forma homogénea y sobresaliente al acumular ~80.01 y 80.98 % de alcanidas totales (lideradas por 66.31 y 65.45 % de afinina, respectivamente). Esta reconfiguración intra-tratamiento demuestra que, ante un estrés oxidativo prolongado, ciertas unidades biológicas desvían el flujo de carbono desde la afinina hacia amidas ramificadas y acetilénicas como mecanismo de diversificación celular y adaptación al daño crónico.

El tratamiento crónico con Ás consolidó la represión más severa de la ruta nitrogenada observada en el diseño experimental, deprimiendo el promedio general de alcanidas totales a un 34.53 %. Esta inhibición crónica afectó de manera unánime a las amidas minoritarias ramificadas y acetilénicas, provocando un bloqueo absoluto (0.00 %) de la alcanida diénica y de la erucamida en todas las réplicas. Consecuentemente, el flujo residual de nitrógeno se monopolizó de forma exclusiva en la síntesis de estructuras triénicas, donde la afinina promedió un 33.69 % y la *N*-(2-metilbutil)-trienamida un escaso 0.84 %. La variabilidad biológica interna fue baja y consistente con el efecto represor. Este comportamiento confirma que la exposición prolongada al Ás suprime de manera drástica y sistemática los genes involucrados en la elongación e insaturación de alcanidas complejas para priorizar metabólicamente la vía de los terpenoides.

La combinación simultánea a los 6 meses (Ás + Per) modificó por completo el antagonismo observado en la hormona individual, promoviendo una sólida recuperación y homogeneización del escudo nitrogenado con un promedio total de alcanidas del 68.52 %. El perfil químico maduro estuvo constituido de forma mayoritaria por afinina (promedio de 50.13 %), *N*-(2-metilbutil)-trienamida (promedio de 13.42 %) y la alcanida diénica (promedio de 4.43 %). A nivel intra-tratamiento se presentó una consistencia notable y un comportamiento lineal ascendente: las alcanidas totales transitaron de forma regular desde un 64.99 % hasta un 71.30 %. La fluctuación biológica más relevante se observó en la arquitectura fitoquímica de dos réplicas, la cual acumuló la mayor concentración de la variante diénica (7.04 %) y activó de forma exclusiva la síntesis de la variante decadienamida (*N*-isobutil-(6*Z*,8*E*)-decadienamida) con un notable 4.75 %. Este ajuste en el *cross-talk* tardío demuestra que la persistencia del mensajero ROS contrarresta la señal de represión del salicilato, unificando a los individuos hacia la producción de amidas triénicas y activando desaturasas específicas para la acumulación de fitoalexinas nitrogenadas estables.

La inducción crónica con MeJA reafirmó su rol como el estimulante transcripcional específico de esta ruta, promediando una abundancia relativa total del 67.53 %. No obstante, a los 6 meses el tratamiento desencadenó la respuesta fitoquímica más heterogénea y polarizada de todo el estudio. Las réplicas exhibieron un comportamiento moderado (~52.37 y 60.30 % de alcanidas totales, respectivamente), caracterizado por niveles contenidos de afinina (~47.42 y 45.78 %) y una fuerte diversificación hacia la alcanida tetraénica (*N*-isobutildodeca-2(*E*),4(*Z*),8(*Z*),10(*E*)-tetraenamida), la cual alcanzó un 1.81 % en y su máximo histórico de 2.78 %. Por el contrario, la otra muestra experimentó una canalización metabólica total al disparar las alcanidas hasta un 89.93 % (el valor más alto de todo el experimento a los 6 meses), concentrando un extraordinario 83.26 % exclusivamente en afinina. Esta drástica variación interna revela que el estímulo prolongado con jasmonato puede inducir un umbral bimodal, donde algunos individuos optan por diversificar el perfil con amidas tetraénicas y saturadas (*N*-

isobutilhexadecanamida, 1.42 %), mientras que otros saturan por completo la vía clásica de síntesis de afinina.

Finalmente, la elicitación crónica con el EHI disminuyó la masiva acumulación observada en etapas tempranas, registrando un promedio general de alcanidas totales del 39.68 %. Cuantitativamente, el flujo nitrogenado remanente estuvo compuesto por afinina (promedio de 27.86 %) y *N*-(2-metilbutil)-trienamida (promedio de 6.35 %). La variabilidad intra-tratamiento evidenció una marcada dispersión biológica relacionada con el grado de habituación al inductor multicomponente. Este comportamiento corrobora que, a largo plazo, la matriz compleja del EHI induce un agotamiento o acostumbramiento de la vía nitrogenada en la mayoría de los individuos, los cuales deprimen el gasto en afinina libre para balancear su metabolismo de forma equitativa hacia la vía de los terpenoides (Figura 38).

La evaluación integrativa de las fracciones lipídica y nitrogenada a los 3 y 6 meses de cultivo reveló un estrecho acoplamiento bioquímico en el sistema radicular de *H. longipes*, donde el pool de ácidos grasos actuó como el sustrato celular crítico para modular el tipo, la magnitud y la velocidad de síntesis de las alcanidas frente al estrés por elicitación.

A los 3 meses de cultivo, la respuesta radicular estuvo administrada por una movilización activa de precursores lipídicos orientada a la protección tisular inmediata. Bajo condiciones basales, la planta priorizó un almacenamiento simplificado de triglicéridos de cadena corta acoplado a niveles estables de alcanidas constitutivas (65.80 % total, dominado por afinina).

Sin embargo, el choque oxidativo por Per rompió este equilibrio; la drástica contracción de ácidos grasos en las unidades de respuesta rápida Per cayó a 0.15 % de saturados) coincidió de manera matemática con el valor cumbre de alcanidas totales (83.33 %), validando la hipótesis de que el estrés agudo por ROS induce el consumo inmediato de cadenas grasas libres mediante cascadas de lipoxigenasas para alimentar la ruta biosintética de alcanidas y diversificar el perfil con variantes decadienamidas.

En contraste, las hormonas individuales marcaron destinos metabólicos divergentes: el Ás acumuló masivamente ácidos grasos saturados (10.63 %) a expensas de deprimir la fracción nitrogenada principal (46.80 % total), mientras que el MeJA demostró su rol como modulador homeostático temprano al activar de manera simultánea múltiples subclases lipídicas (saturados, mono y poliinsaturados) para sostener de forma regular y predecible el pool de afinina sin comprometer la viabilidad celular. Finalmente, la matriz compleja del EHI actuó como el inductor agudo más potente, forzando un vaciado casi absoluto de ácidos grasos en las primeras réplicas para disparar la mayor acumulación de afinina (60.94 % promedio) de toda la fase temprana.

A los 6 meses de exposición prolongada, el sistema radicular transitó de una fase de choque y consumo hacia un escenario de estricta regulación transcripcional y aclimatación de membranas. En las plantas maduras del grupo control, la ruta se estabilizó de manera natural hacia la consolidación del escudo nitrogenado constitutivo (78.25 %), acumulando de forma paralela triglicéridos de reserva.

Bajo la perturbación crónica de los elicitores, el metabolismo lipídico secundario se polarizó radicalmente. La exposición prolongada a Per derivó el flujo hacia una ruta de reparación de membranas, donde la sobreacumulación de triglicéridos y ácidos poliinsaturados (8.03 %) funcionó como un mecanismo homeostático para resguardar la viabilidad celular frente a la peroxidación sostenida, permitiendo que las alcanidas se estabilizaran sin sufrir una caída drástica.

Por su parte, el tratamiento crónico con MeJA monopolizó el flujo de nitrógeno, reduciendo el pool de ácidos grasos al mínimo para canalizar los esqueletos de carbono hacia la biosíntesis masiva de amidas, induciendo perfiles bimodales donde algunas réplicas alcanzaron el máximo histórico de afinina (hasta 83.26 %) y otras diversificaron la ruta con amidas tetraénicas y saturadas complejas.

El fenómeno más contundente de esta fase se observó bajo el estímulo crónico con Ás, el cual impuso un bloqueo enzimático absoluto (0.00 %) en todas las subclases de ácidos grasos; al anular por completo el gasto energético en lípidos primarios y deprimir severamente las alcanidas a su punto más bajo (34.53 %), la planta

redirigió todo el flujo de carbono remanente de forma exclusiva hacia la vía de los terpenoides. Este bloqueo severo fue revertido eficientemente por la co-elicitación (Ás + Per), donde el *cross-talk* tardío reactivó la síntesis de cadenas saturadas y ésteres (7.26 %) para estabilizar la estructura celular, permitiendo una sólida recuperación y homogeneización del perfil de alcanidas triénicas y diénicas. Finalmente, el extracto crudo EHI consolidó un estado de habituación a largo plazo, induciendo un apagado lipídico en la mayoría de sus individuos para balancear de manera equitativa sus recursos entre alcanidas estables y terpenos semivolátiles.

VIII.17.3. Perfil de terpenos de los ejemplares elicitados.

El perfil constitutivo de terpenos e isoprenoides en las raíces no elicitadas de *H. longipes* a los 3 meses registró un promedio de abundancia relativa total del 15.04 %. Cuantitativamente, la fracción estuvo dominada por la acumulación basal de fitoesteroides (promedio de 5.62 %) y triterpenos (promedio de 6.65 %) Este incremento excepcional estuvo sustentado por una masiva acumulación de triterpenos (16.41 %), fitoesteroides (10.96 %) y lactonas (3.65 %), sugiriendo que ciertas unidades biológicas aceleran prematuramente la vía del MVA bajo condiciones estándar de crecimiento para estructurar componentes de membrana o soporte tisular (Figura 39) (ver anexo 17).

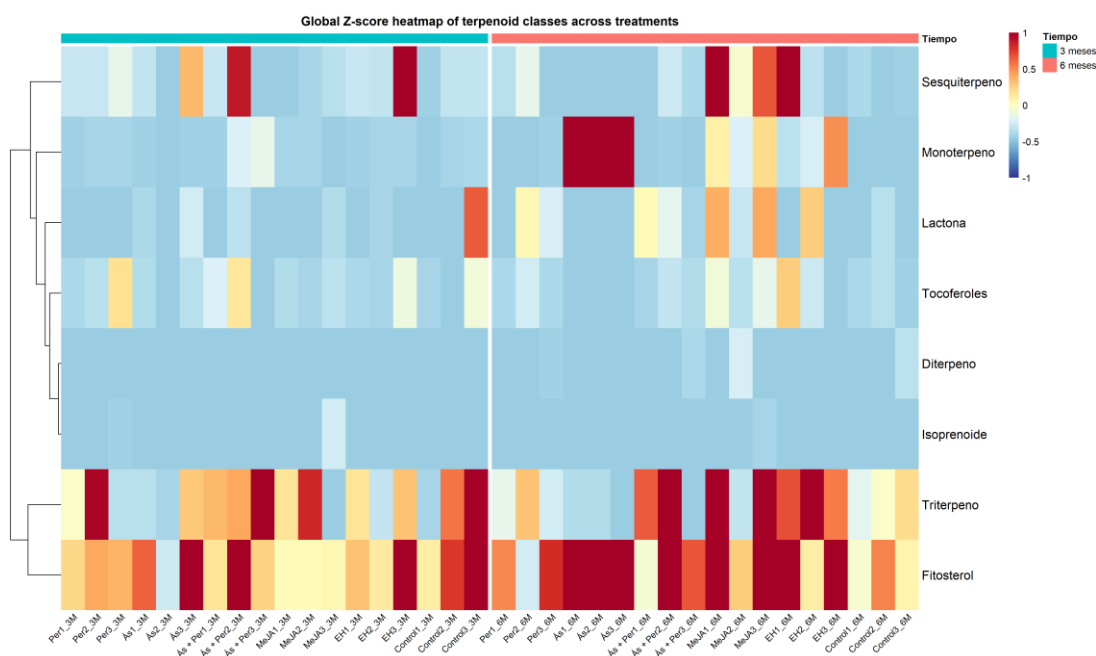


Figura 39. Mapa de calor (*heatmap*) de la abundancia relativa de terpenos presentes en la raíz de ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 y 6 meses. Las filas representan la clasificación biosintética de los compuestos semivolátiles identificados en CG-EM. Las columnas corresponden a los diferentes tratamientos. La escala de color de la derecha representa los valores de intensidad normalizados mediante puntuación Z (*Z-score*), en donde el espectro rojo indica mayor acumulación relativa y el espectro amarillo señala una menor abundancia.

La elicitación con Per indujo una movilización intermedia y relativamente homogénea en el pool de isoprenoides, promediando una abundancia relativa total del 8.00 %. La arquitectura del perfil químico estuvo integrada principalmente por fitoesteroles (promedio de 2.62 %), triterpenos (promedio de 2.16 %) y sesquiterpenos (promedio de 0.69 %). Al evaluar la variabilidad intra-tratamiento, se observó un comportamiento consistente entre las muestras (~5.11 y 5.50 % totales), las cuales concentraron sus recursos preferencialmente en fitoesteroles y mantuvieron niveles mínimos de monoterpenos. Por el contrario, la última réplica duplicó la respuesta del grupo alcanzando un 13.39 % total, impulsada por un incremento selectivo en triterpenos (4.74 %) y fitoesteroles (2.87 %). Bioquímicamente, este repunte moderado de triterpenos y esteroides estructurales bajo el estrés oxidativo por Per respalda una estrategia celular orientada a

estabilizar la balsa de lípidos de las membranas radicales ante el choque agudo por ROS.

El tratamiento hormonal temprano con Ás registró un promedio de abundancia relativa total de terpenos del 6.32 %. A nivel fitoquímico, el pool estuvo constituido de manera mayoritaria por fitoesteroles (promedio de 3.07 %) y triterpenos (promedio de 0.99 %), acompañados por trazas de lactonas (0.29 %). La variabilidad biológica interna mostró una tendencia bimodal neta: las réplicas exhibieron una respuesta contenida (~4.96 y 2.81 %, respectivamente), mientras que la última muestra polarizó el tratamiento al elevar la fracción hasta un 11.21 %. Interesantemente, esta última no solo duplicó los niveles de triterpenos (2.47 %) y fitoesteroles (5.03 %) de sus adyacentes, sino que activó de forma exclusiva la mayor síntesis de sesquiterpenos de este grupo (2.64 %). Este comportamiento intra-tratamiento confirma que, a los 3 meses, el estímulo con salicilato inicia una canalización selectiva y fina hacia la ruta de las fitoalexinas volátiles y semivolátiles en individuos de respuesta rápida.

La combinación simultánea de ambos inductores desencadenó la respuesta fitoquímica más potente, sinérgica y masiva de toda la fase temprana, alcanzando un promedio general de abundancia relativa de terpenos del 17.70 %. Cuantitativamente, el flujo de carbono se dividió entre fitoesteroles (promedio de 3.29 %), triterpenos (promedio de 10.38 %) y sesquiterpenos (promedio de 1.65 %). El rasgo más contundente fue la monopolización casi absoluta del flujo hacia la subclase de triterpenos, registrando un extraordinario 25.59 % (el valor individual más alto de todo el estudio a los 3 meses). Este comportamiento metabólico confirma un potente *cross-talk* positivo temprano, donde la convergencia del mensajero ROS y la hormona hiperestimula de forma cooperativa los genes de la vía mevalonato MVA y la escualeno sintasa para erigir un blindaje lipofílico masivo.

La inducción hormonal con MeJA promovió una acumulación controlada y diversificada de isoprenoides, registrando un promedio de abundancia relativa total del 5.82 %. Fitoquímicamente, el MeJA estimuló la presencia simultánea de múltiples subclases, reportando promedios generales de 2.10 % para triterpenos,

1.61 % para fitoesteroles, 0.26 % para tocoferoles y la aparición puntual de lactonas (0.09 %) e isoprenoides minoritarios (0.22 %). La variabilidad intra-tratamiento mostró una consistencia analítica robusta en la acumulación total de las réplicas (~4.13 y 6.21 %, dominadas por triterpenos). No obstante, la última muestra operó como un eje de diversificación química; aunque suprimió por completo la biosíntesis de triterpenos (0.00 %), compensó la ruta derivando activamente el flujo de carbono hacia fitoesteroles (1.64 %), tocoferoles antioxidantes (0.40 %), sesquiterpenos (0.35 %), lactonas (0.26 %) e isoprenoides minoritarios libres (0.67 %). Esta plasticidad confirma que el jasmonato actúa como un sintonizador fino de la ruta, manteniendo un suministro balanceado que prioriza la estructura basal en algunas réplicas y la síntesis de fitoalexinas complejas en otras.

La elicitación con el EHI indujo una respuesta robusta y marcadamente dispersa en la fracción de terpenos, promediando una abundancia relativa general del 11.52 %. Cuantitativamente, las subclases mayoritarias correspondieron a fitoesteroles (promedio de 6.32 %), triterpenos (promedio de 1.69 %) y sesquiterpenos (promedio de 2.34 %). El análisis de la variabilidad biológica interna reveló un comportamiento homogéneo y contenido en las primeras réplicas (5.4 y 4.81 %) enfocaron sus recursos casi exclusivamente en la síntesis de fitoesteroles basales. Sin embargo, la última réplica actuó como un drástico punto de inflexión fitoquímico al disparar la acumulación total hasta un 24.30%. Esta última polarizó la ruta al sobreacumular fitoesteroles (14.46 %) y, de forma sumamente destacada, registrar el valor máximo de sesquiterpenos de todo el experimento con un 5.99 %. Este patrón de respuesta tardía concentrado demuestra que la complejidad multicomponente del extracto crudo es capaz de romper los umbrales de homeostasis celular, forzando en unidades seleccionadas una co-activación masiva de fitoalexinas semivolátiles y esteroides de membrana.

En esta etapa madura, se observa la consolidación de rutas secundarias volátiles y estructurales, con una participación muy activa de monoterpenos, sesquiterpenos, fitoesteroles y lactonas.

El perfil metabólico constitutivo de la fracción de terpenos e isoprenoides en las raíces basales de *H. longipes* a los 6 meses se estabilizó en un promedio de abundancia relativa total del 4.63 %. Cuantitativamente, el flujo basal maduro se concentró en la síntesis de fitoesteroides estructurales (promedio de 2.11 %) y triterpenos (promedio de 1.51 %). La variabilidad intra-tratamiento fue baja en comparación con la etapa temprana, mostrando que la planta alcanza una homeostasis en el desarrollo de sus isoprenoides basales. La única fluctuación interna relevante ocurrió en la última muestra, la cual fue la única réplica basal que activó la síntesis de diterpenos (0.41 %), confirmando que el sistema radicular maduro mantiene una tasa de biosíntesis basal sumamente discreta y canalizada a soporte de membranas.

La elicitación crónica con Per a los 6 meses indujo una fase de acumulación moderada, promediando una abundancia relativa total del 9.32 %. Al igual que en las etapas previas, el perfil estuvo integrado de forma mayoritaria por fitoesteroides (promedio de 2.70 %) y triterpenos (promedio de 1.41 %), pero incorporó de manera madura la presencia de lactonas (promedio de 0.79 %). A nivel intra-tratamiento se presentó una marcada polarización biológica debido al comportamiento de una réplica. Mientras que dos de ellas exhibieron una respuesta altamente consistente y homogénea (~4.72 y 6.00 % totales), la última muestra triplicó los niveles del tratamiento alcanzando un 17.25 % total. Esta muestra redirigió de forma exclusiva su flujo hacia lactonas (1.65 %), sesquiterpenos (0.98 %) y triterpenos (2.57 %). Esta fluctuación intra-tratamiento confirma que, ante el estrés oxidativo crónico, ciertas unidades biológicas activan mecanismos enzimáticos especializados de la vía MVA para acumular fitoalexinas complejas y estabilizadores lipofílicos frente al daño celular sostenido.

El tratamiento crónico con Ás consolidó la mayor hiperestimulación de la vía de los isoprenoides de todo el diseño experimental, alcanzando un promedio de abundancia relativa total del 30.52 %. El rasgo analítico y fitoquímico más contundente de este tratamiento fue la masiva y selectiva canalización del flujo de carbono hacia la subclase de monoterpenos (promedio de 8.33 %) y fitoesteroides

(promedio de 14.48 %), mientras que las lactonas y diterpenos se bloquearon por completo (0.00 %). Al interior del tratamiento, la variabilidad biológica fue moderada y reflejó la maduración de la respuesta defensiva: las réplicas operaron de manera casi idéntica, registrando ~26.81 y 26.51 % totales, con acumulaciones sobresalientes de monoterpenos (7.59 y 12.00 %) y fitoesteroles (18.96 y 14.22 %). Por su parte, la última muestra polarizó la inducción al registrar un 38.24 % total. Este comportamiento confirma que la exposición prolongada al Ás suprime de forma unánime las rutas lipídicas y amídicas primarias para monopolizar la energía celular en la síntesis de fitoalexinas monoterpénicas y esteroides defensivos.

La combinación simultánea de ambos inductores (Ás + Per) a los 6 meses modificó drásticamente la tendencia sinérgica observada en la fase temprana, deprimiendo el pool general de terpenos a un promedio de abundancia relativa de apenas 9.82 %. Fitoquímicamente, el flujo remanente se dividió entre triterpenos (promedio de 3.40 %) y fitoesteroles (promedio de 3.81 %). A nivel intra-tratamiento se observó una variabilidad bimodal drástica: las muestras se mantuvieron fuertemente reprimidas (~6.72 y 4.58 % totales), concentrando sus escasos recursos en fitoesteroles y triterpenos basales. En marcado contraste, la última réplica duplicó la respuesta del grupo alcanzando un 18.15 % total, impulsada por un repunte en triterpenos (6.53 %) y sesquiterpenos (0.64 %). Este apagado generalizado de la vía de los isoprenoides en el tratamiento combinado tardío confirma un ajuste en el *cross-talk* transcripcional, donde la persistencia del estrés combinado obliga a la raíz a deponer la síntesis de compuestos volátiles (como los monoterpenos de Ás) para priorizar el resguardo del escudo nitrogenado.

La inducción crónica con MeJA promovió una acumulación masiva y altamente diversificada de terpenos en la fase madura, alcanzando un promedio de abundancia relativa total del 20.96 %. A diferencia del salicilato, el MeJA estimuló la presencia concertada de prácticamente todas las subclases isoprenoides, reportando promedios generales de 4.27 % para triterpenos, 3.31 % para sesquiterpenos, 1.60 % para monoterpenos y una notable acumulación de fitoesteroles (promedio de 7.90 %) y lactonas (2.06 %). La variabilidad intra-

tratamiento evidenció una respuesta bimodal absoluta acoplada al perfil de alcanidas: las réplicas consolidaron el éxito del tratamiento al registrar acumulaciones sobresalientes del 24.94 y 30.98 % totales, respectivamente (lideradas por fitoesteroides y sesquiterpenos). Por el contrario, la última muestra contrajo drásticamente la fracción hasta un escaso 6.96 %. Como se discutió en el bloque nitrogenado, esta destinó el 89.93 % de sus recursos a las alcanidas, lo que demuestra que el jasmonato crónico induce un umbral de saturación donde los individuos optan de manera excluyente por el escudo nitrogenado o por la diversificación masiva de la vía de los terpenos.

La elicitación prolongada con el EHI desencadenó una respuesta metabólica robusta y sostenida a los 6 meses, consolidando un promedio general de abundancia relativa de terpenos del 23.90 %. Cuantitativamente, la matriz compleja del EHI forzó una canalización dirigida principalmente hacia fitoesteroides (promedio de 8.61 %), triterpenos (promedio de 8.29 %) y sesquiterpenos (promedio de 3.08 %). Al evaluar la variabilidad intra-tratamiento, se observó una consistencia elevada en la magnitud del estímulo en toda la cohorte: una muestra registró un 33.29 % total (marcada por un elevado 17.28 % de fitoesteroides y 8.82 % de sesquiterpenos); este último se situó en un 24.20 % (destacando un máximo de 17.74 % en triterpenos y 2.38 % en lactonas); finalmente, se reportó un 14.21 % total. Esta distribución demuestra que, a largo plazo, la naturaleza multicomponente del extracto crudo evita la habituación celular de la vía MVA, obligando a todas las réplicas biológicas a mantener un flujo elevado y balanceado de defensas isoprenoides para coexistir con el estímulo exógeno.

La evaluación integrada de la fracción de terpenos e isoprenoides a los 3 y 6 meses de cultivo puso de manifiesto la enorme plasticidad de la vía del MVA (responsable de la síntesis de triterpenos, fitoesteroides y lactonas) y la vía del MEP (asociada a monoterpenos y sesquiterpenos) en el sistema radicular de *H. longipes*, transitando de una activación cooperativa temprana a una marcada especialización o habituación celular en la fase tardía.

A los 3 meses de cultivo, el pool de terpenos funcionó como un sistema de respuesta rápida frente a estímulos combinados y matrices complejas, coexistiendo con las demandas estructurales del crecimiento radicular basal. En el grupo Control, la vía del MVA mostró una actividad constitutiva heterogénea orientada a la acumulación de fitoesteroles y triterpenos para el soporte de membranas celulares en pleno desarrollo.

La perturbación química individual de esta fase generó movilizaciones intermedias: el Per activó de manera discreta la síntesis de triterpenos como un mecanismo de estabilización de las balsas lipídicas celulares ante el choque por ROS; por su parte, los tratamientos hormonales individuales Ás y MeJA mostraron una inducción incipiente y bimodal, donde las réplicas de respuesta rápida comenzaron a canalizar el flujo de carbono hacia fitoalexinas semivolátiles mediante la vía MEP.

El hallazgo analítico más contundente de este periodo fue la potente sinergia observada en la co-elicitación (Ás + Per); la convergencia de la hormona y el mensajero oxidativo desencadenó un *cross-talk* positivo temprano que hiperestimuló la vía MVA, induciendo una acumulación masiva de triterpenos que alcanzó un promedio del 17.70 % (con un valor cumbre de 25.59 %). Finalmente, la matriz multicomponente del EHI fue capaz de romper los umbrales de homeostasis biológica en sus unidades sensibles, induciendo una co-activación drástica de fitoesteroles y sesquiterpenos.

A los 6 meses de exposición prolongada, el panorama metabólico se reconfiguró de manera radical, transitando hacia un control transcripcional estricto donde los terpenos se consolidaron como el principal escudo químico alternativo ante la supresión de las rutas primarias. Mientras que el grupo Control estabilizó y contrajo su flujo basal de isoprenoides (4.63 %) debido a la maduración ontogenética, las raíces bajo elicitación crónica se polarizaron drásticamente.

El Per mantuvo una respuesta discreta y protectora a través de la vía del MVA (lactonas y fitoesteroles) para preservar la viabilidad celular frente al estrés oxidativo sostenido. Sin embargo, las vías hormonales crónicas experimentaron una masiva especialización: Ás monopolizó el flujo de carbono radicular al bloquear por

completo los ácidos grasos y deprimir las alcanidas, redirigiendo toda la energía celular a la vía MEP para registrar el máximo histórico de terpenos totales (30.52 %), caracterizado por una acumulación selectiva y sin precedentes de monoterpenos volátiles.

En contraparte, el MeJA indujo un umbral de saturación bimodal absoluto: mientras que la réplica MeJA2 se volcó de forma exclusiva hacia la ruta nitrogenada, las últimas réplicas compensaron el sistema activando de forma concertada cada una de las subclases de las vías MVA y MEP, acumulando altos niveles de fitoesteroides, lactonas y sesquiterpenos.

El fenómeno inverso a la fase temprana se observó en la co-elicitación (Ás + Per), donde el *cross-talk* prolongado deprimió severamente la ruta de los isoprenoides (9.82 %), apagando la producción de monoterpenos para salvaguardar el escudo amídico. Finalmente, el EHI demostró ser el inductor crónico más eficiente y equilibrado, al evitar el acostumbramiento celular y forzar a toda la cohorte biológica a sostener una tasa elevada y constante de defensas mixtas (23.90 % promedio), balanceando de manera equitativa el flujo entre triterpenos estructurales y sesquiterpenos defensivos.

El análisis integrado de los perfiles metabolómicos de alcanidas, terpenos y ácidos grasos a los 3 y 6 meses de cultivo revela que el sistema radicular de *H. longipes* posee una notable plasticidad adaptativa frente a la elicitación química y hormonal. Esta respuesta no es estática, sino que evoluciona desde una movilización de choque y competencia energética en la fase adaptativa aguda (3 meses) hacia un escenario de estricta especialización celular y regulación transcripcional concertada en la fase crónica (6 meses). El flujo coordinado de carbono y nitrógeno demuestra que la planta modula sus defensas secundarias a expensas de reconfigurar su metabolismo lipídico primario. Esto evidencia un acoplamiento fitoquímico estrecho donde la disponibilidad de ácidos grasos libres actúa como el sustrato crítico o el sensor celular necesario para sintonizar tanto la magnitud como la diversidad estructural de las amidas e isoprenoides basales e inducidos.

Desde una perspectiva agrobiotecnológica, esta capacidad de reprogramación metabólica otorga un valor de aplicación diferenciado a la biomasa radicular según el esquema de elicitación seleccionado, abriendo la posibilidad de diseñar extractos fitofarmacéuticos a la medida. El uso crónico de MeJA o la inducción temprana con el EHI se consolidan como las estrategias óptimas para la obtención industrial de alcanidas triénicas de alta pureza. Estos tratamientos logran maximizar el pool de afinina (alcanizando hasta un 83.26 % de abundancia relativa) para su aprovechamiento como analgésico, antiinflamatorio o biopesticida de alta potencia. Por el contrario, la elicitación con Per o la co-elicitación (Ás + Per) tardía inducen desaturasas específicas que enriquecen cualitativamente el espectro nitrogenado mediante la síntesis de variantes minoritarias complejas como decadienamidas, tetraenamidas y compuestos acetilénicos. Este fenómeno incrementa sustancialmente el valor científico y farmacéutico de la biomasa en la búsqueda de nuevas sinergias químicas contra patógenos resistentes.

De forma complementaria, la manipulación dirigida de las MVA y del MEP redefine el potencial de la fracción volátil y la estabilidad galénica de los extractos obtenidos. La elicitación prolongada con Ás suprime por completo el gasto metabólico en ácidos grasos primarios y deprime la vía amídica con el fin de monopolizar los recursos celulares hacia la síntesis masiva de monoterpenos y fitoesteroles estructurales (30.52 % total). Esto genera una biomasa ideal para la destilación de aceites esenciales bioactivos y repelentes agrícolas volátiles. Asimismo, la presencia coordinada de triterpenos y fitoesteroles bajo los tratamientos con EHI y la co-elicitación temprana aporta un valor añadido fundamental para el desarrollo de formas farmacéuticas. Estos lípidos isoprenoides actúan como coadyuvantes naturales que estabilizan las balsas lipídicas celulares, lo que potencialmente optimiza la permeabilidad cutánea, la estabilidad oxidativa y la biodisponibilidad de la afinina en formulaciones tópicas o emulsiones industriales.

Finalmente, el monitoreo analítico de la fracción de ácidos grasos y sus derivados trasciende su papel como intermediario biosintético para consolidarse como un riguroso indicador técnico de la viabilidad celular y un optimizador de procesos

downstream. Mientras que el aumento de ácidos grasos y triglicéridos observados bajo el estímulo crónico con Per reflejan procesos metabólicos asociados a la aclimatación y al mantenimiento de la integridad de las membranas celulares frente al estrés oxidativo, la ausencia de estas clases lipídicas en los ejemplares tratados con Ás maduro (0.00 % en todas las subclases detectadas) representa una característica de particular interés para el aprovechamiento fitoquímico de la especie. Esta reducción sustancial de metabolitos lipídicos mayoritarios genera una matriz radicular con menor complejidad lipofílica, lo que potencialmente podría simplificar los procesos de extracción, reducir las etapas de desengrasado y favorecer la recuperación de metabolitos especializados durante los procedimientos de purificación. En consecuencia, esta condición podría contribuir a disminuir los costos operativos y mejorar la eficiencia de los procesos de aislamiento de compuestos bioactivos.

IX. CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo controladas favorecieron significativamente el crecimiento de *H. longipes*, incrementando la biomasa radicular, la acumulación de afinina y la eficacia vasodilatadora de los extractos en comparación con las poblaciones silvestres.

La etapa de fructificación constituyó la ventana óptima de cosecha, al presentar simultáneamente la mayor producción de biomasa, las concentraciones más elevadas de afinina y una alta eficacia vasodilatadora.

El análisis metabolómico y fitoquímico confirmó que la afinina es el principal metabolito especializado de la raíz, además de permitir la identificación por primera vez en la especie de las alcanidas *N*-isobutildeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida, *N*-isobutildeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida y *N*-isobutildeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida, ampliando significativamente el conocimiento fitoquímico de *H. longipes*.

La mayor potencia vasodilatadora observada en la etapa vegetativa, a pesar de su menor concentración de afinina, sugiere que la actividad farmacológica de la especie no depende exclusivamente de este metabolito y que podrían existir interacciones aditivas o sinérgicas con otros compuestos presentes en la matriz química, entre ellos la (+)-sesamina.

La ausencia de una relación directa entre la actividad de la valina descarboxilasa y la acumulación de afinina indica que la biosíntesis de esta alcanida depende de factores regulatorios adicionales, por lo que esta enzima no constituye un indicador confiable del rendimiento final del metabolito.

La elicitación biológica modificó significativamente la morfología, el desarrollo radicular y la composición química de *H. longipes*. El peróxido de hidrógeno promovió el incremento de la longitud y biomasa radicular, favoreciendo la acumulación de estructuras asociadas al crecimiento subterráneo. El MeJA mostró el efecto más consistente sobre el crecimiento vegetal, incrementando la altura de los ejemplares, la biomasa radicular y la acumulación de afinina, consolidándose como el elicitador más eficaz para estimular la producción de alcanidas. El ácido

salicílico redujo el crecimiento vegetativo y la biomasa de la raíz principal, aunque estimuló la formación temprana de acodos, evidenciando un efecto diferencial sobre la arquitectura radicular. La combinación de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno generó respuestas intermedias que sugieren una interacción entre ambas vías de señalización. Por su parte, el extracto de *H. longipes* favoreció el incremento de la longitud radicular y la formación de acodos, destacando su potencial para promover la propagación vegetativa de la especie. En conjunto, los resultados demuestran que la respuesta a la elicitación depende tanto de la naturaleza del estímulo como del tiempo de exposición, permitiendo modular de manera dirigida el crecimiento y el perfil metabolómico de la planta.

En conjunto, los resultados demuestran que la combinación de cultivo controlado, cosecha durante la fructificación y aplicación estratégica de elicitors constituye una herramienta efectiva para optimizar la producción de biomasa, la acumulación de alcaloides y la actividad biológica de *H. longipes*, consolidando a esta especie como una fuente promisorio de metabolitos bioactivos con potencial aplicación cardiovascular.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Kader, A. A., & Ahmed, S. T. H. (2009). Effect of salinity and cutting date on growth and chemical constituents of *Achillea fragrantissima* Forssk. under Ras Sudr conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(6), 1121–1129.
- Abugannam, C. M., & García, J. F. (2019). Chilcuague: El potencial endémico del centro de México. *Academia Journals*, 11(8), 1946–1953.
- Aguilar, M. I., Castillo, E. N., Alvarado-López, C., Duarte-Lisci, G., Ríos-Gómez, R., & Rios, M. Y. (2016). HPLC determination of the alkamide affinin in fresh and dry roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF analysis of volatile components. *Food Analytical Methods*, 9(7), 1807–1813. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0358-5>
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Alperth, F., Feistrietzer, T., Huber, M., Kunert, O., & Bucar, F. (2024). Natural Deep Eutectic Solvents for the extraction of spilanthol from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. *Molecules*, 29(3), Artículo 612. <https://doi.org/10.3390/molecules29030612>
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Aydin, T., Yurtvermez, B., Senturk, M., Kazaz, C., & Cakir, A. (2019). Inhibitory effects of metabolites isolated from *Artemisia dracunculus* L. against the human carbonic anhydrase I (hCA I) and II (hCA II). *Records of Natural Products*, 13(3), 216–225. <https://doi.org/10.25135/rnp.102.18.07.329>
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Biotic elicitors for improving bioactive compounds in sprouts for human nutrition. *Molecules*, 19(11), 17641–17653. <https://doi.org/10.3390/molecules191117641>
- Bai, Y., Fernández-Calvo, P., Ritter, A., Huang, A. C., Morales-Herrera, S., Bicalho, K., Karady, M., Pauwels, L., Buyst, D., Njo, M., & Goossens, A. (2021). Modulation of *Arabidopsis* root growth by specialized triterpenes. *New Phytologist*, 230(1), 228–243. <https://doi.org/10.1111/nph.17144>
- Barbosa, A. F., de Carvalho, M. G., Smith, R. E., & Sabaa-Srur, A. U. O. (2016). Spilanthol: Occurrence, extractions, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.024>

Bauer, R., Khan, I. A., & Wagner, H. (1988). TLC and HPLC analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* roots. *Planta Medica*, 54(5), 426–430. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962489>

Beltrán, M., Cerna, E., Delgado, J. C., & Ochoa, Y. M. (2015). Evaluación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake sobre ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae). *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (66), 12–15.

Bessada, S. M., Barreira, J. C., & Oliveira, M. B. P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>

Bhaskar, G., Tanuja, B., & Yong-Chien, L. (2014). Sulfonated graphene as highly efficient and reusable acid carbocatalyst for the synthesis of ester plasticizers. *RSC Advances*, 4(93), 57297–57304. <https://doi.org/10.1039/c4ra11205a>

Bhattacharya, A., Sood, S., & Citovsky, V. (2010). The role of plant oxylipins in development and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.05.006>

Boonen, J., Baert, B., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., & De Spiegeleer, B. (2010). LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bioactive spilanthol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.010>

Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., & Lima, G. P. P. (2017). Plantas medicinales: Influencia de factores ambientales sobre el contenido de metabolitos secundarios. En *Plantas medicinales y desafíos ambientales* (pp. 259–277). (Completar con editorial o entidad editora si se trata de un capítulo de libro).

Borges, J., Barrios, M., Sandoval, E., Bastardo, Y., & Márquez, O. (2012). Características físico-químicas del suelo y su asociación con microelementos en áreas destinadas a pastoreo en el estado de Yaracuy. *Bioagro*, 24(2), 121–126.

Buitimea-Cantúa, G. V., Buitimea-Cantúa, N. E., Rocha-Pizaña, M. R., Rosas-Burgos, E. C., Hernández-Morales, A., & Molina-Torres, J. (2019). Antifungal and anti-aflatoxigenic activity of *Heliopsis longipes* roots, and affinin/spilanthol against *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of *afID* and *afIR* genes of the aflatoxins biosynthetic pathway. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(11), 902–910. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1681818>

Buitimea-Cantúa, G. V., Marsch-Martínez, N., Ríos-Chávez, P., Méndez-Bravo, A., & Molina-Torres, J. (2020). Global gene expression analyses of the alkamide-producing plant *Heliopsis longipes* supports a polyketide synthase-mediated

biosynthesis pathway. *PeerJ*, 8, Artículo e10074.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10074>

Burlec, A. F., Arsene, C., Gille, E., Hancianu, M., & Cioanca, O. (2017). Ornamental *Asteraceae* species as new sources of secondary metabolites. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S425–S428.
<https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.61>

Caicedo-López, L. H., Villagómez-Aranda, A. L., Sáenz de la O, D., Zavala-Gómez, C. E., Espinoza-Márquez, E., & Romero-Zepeda, H. (2021). Elicitores: Implicaciones bioéticas para la agricultura y la salud humana. *Revista de Bioética*, 29(1), 76–86.
<https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448>

Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J., Ortiz, M., Sánchez-Gutiérrez, P., García-Reyna, P., Cilia-López, V., Pérez-Hernández, N., Moreno, E., & Ponce-Monter, H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 216–221.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.037>

Castro-Ruiz, J., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., & Ibarra-Alvarado, C. (2017). Affinin (Spilanthol), isolated from *Heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), Artículo 15.
<https://doi.org/10.3390/ijms18010218>

Chagas-Paula, D. A., Zhang, T., Da Costa, F. B., & Edrada-Ebel, R. (2015). A metabolomic approach to target compounds from the *Asteraceae* family for dual COX and LOX inhibition. *Metabolites*, 5(3), 404–430.
<https://doi.org/10.3390/metabo5030404>

Chávez, M. C., White, L., Moctezuma, S., & Herrera, F. (2017). Prácticas curativas de plantas medicinales: Un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, 56(2), 26–47.

Cheng, L., Han, M., Yang, L. M., Yang, L., Sun, Z., & Zhang, T. (2018). Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress. *Industrial Crops and Products*, 122, 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.030>

Cheng, Y. B., Liu, R., Ho, M. C., Wu, T. Y., Chen, C. Y., Lo, I. W., ... & Chang, F. R. (2015). Alkylamides of *Acmella oleracea*. *Molecules*, 20(4), 6970–6977.
<https://doi.org/10.3390/molecules20046970>

Christensen, L. P., & Lam, J. (1991). Acetylenics and related compounds in *Heliantheae*. *Phytochemistry*, 30(1), 11–49. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84096-b](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84096-b)

- Cilia-López, V., Aguirre-Rivera, R., Espinosa-Reyes, G., Flores-Cano, J., Reyes-Agüero, A., & Juárez-Flores, B. (2013). Distribución de *Heliopsis longipes* (Heliantheae: Asteraceae), un recurso endémico del centro de México. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(1), 47–53. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.04.013>
- Cilia-López, V., Juárez-Flores, B., Aguirre-Rivera, J., & Reyes-Agüero, J. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 195–200. <https://doi.org/10.3109/13880200903078495>
- Cilia-López, V. G., Aguirre-Rivera, J. R., Reyes-Agüero, J. A., & Juárez-Flores, B. I. (2008). Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (83), 81–87. <https://doi.org/10.17129/botsci.1788>
- Cortez-Espinosa, N., Aviña-Verduzco, J., & Ramírez-Chávez, E. (2011). Valine and phenylalanine as precursors in the biosynthesis of alkamides in *Acmella radicans*. *Natural Product Communications*, 6(6), 857–861. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600627>
- Dar, N. A., Mir, M. A., Kasana, J. A., & Ahmad, P. (2016). Effect of nutrient availability on secondary metabolites production in plants. En *Plant Secondary Metabolites, Volume 3: Their Role in Response to Biotic and Abiotic Stresses* (pp. 115–134). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/b21554-6>
- De Abreu, L. N., & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.020>
- De la Rosa-Lugo, V., Déciga-Campos, M., Ríos, M. Y., Navarrete-Herrera, D. S., & López-Muñoz, F. J. (2020). Affinin and hexahydroaffinin: Chemistry and toxicological profile. *Drug Development Research*, 81(8), 1017–1025. <https://doi.org/10.1002/ddr.21721>
- de Souza, C. M. G., & Tavares, M. I. B. (1998). Nuclear magnetic resonance study of commercial poly(vinyl acetate). *Journal of Applied Polymer Science*, 70(12), 2457–2461. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19981219\)70:12%3C2457::AID-APP18%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19981219)70:12%3C2457::AID-APP18%3E3.0.CO;2-9)
- Déciga-Campos, M., Ríos, M. Y., & Aguilar-Guadarrama, B. (2010). Antinociceptive effect of *Heliopsis longipes* extract and affinin in mice. *Planta Medica*, 76(7), 665–670. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240688>
- Dong, H., & Qi, X. (2025). Biosynthesis of triterpenoids in plants: Pathways, regulation and biological functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 85, Artículo 102701. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2025.102701>

- Drasar, P., & Khripach, V. (2020). Growing importance of natural products research. *Molecules*, 25(1), 6. <https://doi.org/10.3390/molecules25010006>
- Efentakis, P., Al-Hassan, M. H., Heba, H., Giannouli, S., & Agrogiannis, G. (2015). Effects of plant-derived lignans on vascular tone and nitric oxide production in isolated rat aorta. *Phytomedicine*, 22(11), 1011–1019. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.008>
- Elufioye, T. O., Habtemariam, S., & Adjare, A. O. (2020). Chemistry and pharmacology of alkylamides from natural origin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(5), 622–640. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00095-5>
- Fankhauser-Noti, A., & Grob, K. (2007). Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutylphthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.012>
- Ferro, E. (2015). Productos naturales como fuente de moléculas con actividad biológica. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 13(2), 4–5.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M., & Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by plant NADPH oxidases regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442–446. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
- Friederike, S., Aversch, N. J. H., Castellanos, L., Choi, Y. H., Rothauer, A., & Kayser, O. (2016). Discrimination of wild types and hybrids of *Duboisia myoporoides* and *Duboisia leichhardtii* at different growth stages using ¹H NMR-based metabolite profiling and tropane alkaloids-targeted HPLC-MS analysis. *Phytochemistry*, 131, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.08.008>
- García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2004). El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*, (69), 115–131. <https://doi.org/10.21829/abm69.2004.983>
- Gargallo-Garriga, A., Preece, C., Sardans, J., Oravec, M., Urban, O., & Peñuelas, J. (2018). Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Sci. Rep.*, 23(8), 12696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30150-0>
- Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G., & Goli, S. A. H. (2016). Effect of drought stress on total phenolic, flavonoid and secondary metabolites production in *Achillea millefolium* L. s.l. *Industrial Crops and Products*, 92, 245–253. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1909-3>
- González-Morales, S., Pérez-Labrada, F., García-Enciso, E. L., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., & Juárez-Maldonado, A. (2015). Application of affinin (spilanthol) alters the root architecture and stimulates the growth of tomato

seedlings. *Scientia Horticulturae*, 191, 101–108.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.011>

Greger, H. (1984). Alkamides and structural relationships in *Asteraceae*. *Planta Medica*, 50(5), 366–375. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969741>

Gutiérrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2(4), 341–347. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80079-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80079-1)

Haghighi, Z., Modarresi, M., & Mollayi, S. (2012). Enhancement of compatible solute and secondary metabolites production in *Plantago ovata* Forsk. by salinity stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(18), 3495–3500. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1354>

Hajdu, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., & Jerkovich, G. (2004). Dimeric sesquiterpene lactones and lignans from *Heliopsis helianthoides*. *Journal of Natural Products*, 67(9), 1540–1545. <https://doi.org/10.1021/np040055c>

Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Maurousset, L., Lemoine, R., & Pourtau, N. (2014). Sugars en route to the roots: Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Plant Physiology*, 165(1), 44–57. <https://doi.org/10.1111/ppl.12751>

Hernández, I., Lemus, Y., Prieto, S., Molina-Torres, J., & Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effect of an ethanolic root extract of *Heliopsis longipes* in vitro. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 160–164.

Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Gómez-Luna, B., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M. R., Martínez-Soto, G., & Molina-Torres, J. (2012). Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del estado de Guanajuato. *Jóvenes en la Ciencia*, 1(2), 111–118.

Ho, T. T., Murthy, H. N., & Park, S. Y. (2017). Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(23-24), 8143–8153. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8541-1>

Hong, D. Y., Lau, A. J., Yeo, C. L., Liu, X. K., Yang, C. R., Koh, H. L., & Hong, Y. (2005). Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8460–8467. <https://doi.org/10.1021/jf051248g>

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant Russo*, 7(8), 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>

- Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L., & Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 732–739. <https://doi.org/10.3109/13880200903271280>
- Ikeda, Y., Ukai, J., Ikeda, N., & Yamamoto, H. (1984). Facile routes to natural acyclic polyenes: Synthesis of spilanthol and trail pheromone for termite. *Tetrahedron Letters*, 25(45), 5177–5180. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91257-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91257-8)
- Janampa, C. (2017). *Determinación de metabolitos primarios, actividades enzimáticas y características físico-químicas de lúcumá (Pouteria lucuma) en dos estados fisiológicos* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional UNALM.
- Kuzel, S., Vydra, J., Tříška, J., Vrchotová, N., Hrubý, M., & Cígler, P. (2009). Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7907–7911. <https://doi.org/10.1021/jf9011246>
- Li, J., & Hu, Z. (2009). Accumulation and dynamic trends of triterpenoid saponin in vegetative organs of *Achyranthes bidentata*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(2), 122–129. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00795.x>
- Li, X., Wang, Q., Jian, N., Lv, H., Liang, C., Yang, H., Yao, X., & Wang, J. (2023). Occurrence, source, ecological risk, and mitigation of phthalate (PAEs) in agricultural soils and the environment: A review. *Environmental Research*, 220, Artículo 115196. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115196>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Li, Y. Q., Kong, D. X., Liang, H. L., & Wu, H. (2018). Alkaloid content and essential oil composition of *Mahonia breviflora* cultivated under different light environments. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 171–179. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.023>
- Liebelt, D. J., Jordan, J. T., & Doherty, C. J. (2019). Only a matter of time: The impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1409–1433. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09633-x>
- Liu, C., Guo, D., & Liu, L. (2018). Quality transitivity and traceability system of herbal medicine products base on quality markers. *Phytomedicine*, 44, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.003>

Liu, W., & Yin, D. (2020). Multi-component organic matter in medicinal plants: A review on quality markers and safety evaluations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(5), 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.06.002>

López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, B., & Ríos, M. Y. (2011). Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochemistry Letters*, 4(3), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.017>

Luna-Vázquez, F. J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, J. I., Yahia, E. M., Rivera-Pastrana, D. M., & Zavala-Sánchez, Á. M. (2013). Nutritional value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. fruits: Antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules*, 18(12), 14597–14612. <https://doi.org/10.3390/molecules181214597>

Luz-Martínez, B., Marrero-Morfa, D., Luna-Vázquez, F. J., Rojas-Molina, A., & Ibarra-Alvarado, C. (2024). Affinin, isolated from *Heliopsis longipes*, induces an antihypertensive effect that involves CB₁ cannabinoid receptors and TRPA1 and TRPV1 channel activation. *Planta Medica*, 90(5), 380–387. <https://doi.org/10.1055/a-2212-0777>

Luz-Martínez, B. A., Viveros-Paredes, J. M., Rojas-Molina, A., & Ibarra-Alvarado, C. (2025). El compuesto antinociceptivo multiobjetivo Affinin y sus efectos sobre la hipotermia, la hipolocomoción y el comportamiento de enfermedad en ratones tratados con lipopolisacáridos. *Molecules*, 30(12), Artículo 2554. <https://doi.org/10.3390/molecules30122554>

Marrero-Morfa, D., Ibarra-Alvarado, C., Luna-Vázquez, F. J., Quirino-Barreda, C. T., Rojas-Molina, J. I., & Rojas-Molina, A. (2023). Sistema auto-microemulsionante de un extracto etanólico de raíz de *Heliopsis longipes* para mejorar la solubilidad y la liberación de afinina. *AAPS Open*, 9, Artículo 17. <https://doi.org/10.1186/s41120-023-00086-5>

Marrero-Morfa, D., Luz-Martínez, B. A., Luna-Vázquez, F. J., Quirino-Barreda, C. T., Rojas-Molina, J. I., García-Servín, M., Vázquez-Landaverde, P. A., Ruiz-Castillo, V., Ibarra-Alvarado, C., & Rojas-Molina, A. (2025). Antihypertensive effect of a self-microemulsifying system obtained from an ethanolic extract of *Heliopsis longipes* roots in spontaneously and L-NAME-induced hypertensive rats. *Molecules*, 30(12), Artículo 3711. <https://doi.org/10.3390/molecules30123711>

Marslin, G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2018). Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Materials*, 11(6), Artículo 940. <https://doi.org/10.3390/ma11060940>

Mattos, E. M. F., & Collantes, I. E. (2020). Seasonal variation of the chemical constituents of the essential oil of the leaves from *Ophryosporus peruvianus*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 258–269. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.300>

Matus, F., Garrido, E., Hidalgo, C., Paz-Pellat, F., Etchevers B., J. D., Merino, C., & Báez, A. (2016). Saturación del carbono en las partículas de limo y arcilla en suelos con mineralogía contrastante. *Revista Terra Latinoamericana*, 34(3), 311–319.

Mehrpooya, M., Noori, M., & Khaksar, G. (2021). Elicitation strategies for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: A review. *Plant Growth Regulation*, 95(2), 115–132. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00742-5>

Meier, U., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Hess, M., Lancashire, P. D., Schnock, U., Staub, R., & Van den Boom, T. (2009). The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—history and publications. *Journal für Kulturpflanzen*, 61(2), 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>

Méndez-Bravo, A., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Raya-González, J., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2011). Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(9), 1031–1042. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-11-0023>

Méndez-Bravo, A., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Raya-González, J., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Lugon-Moulin, N., & López-Bucio, J. (2010). Alkamides activate jasmonic acid signaling for growth re-distribution and furanocoumarin phytoalexin accumulation in *Arabidopsis* and *Ammi majus* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), 1635–1649. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq116>

Milhomen, L., De Lima, G., Torres, R. C., Campo, M. J., & Belmino, J. A. (2019). Estudo prospectivo do jambu no período de 2008 a 2018. *Encontro Nacional de Propriedade Intelectual*, 5(1), 942–949. <https://doi.org/10.4322/2447-9128.anpi2019113>

Mirmiranpour, H., Baghdasaryan, I., & Martirosyan, D. (2026). Squalene supplementation reduces cardiac injury biomarkers and blood pressure in ischemic heart disease: An open-label randomized controlled trial. *Bioactive Molecules and Pharmaceuticals*, 3(4), 21–33. <https://doi.org/10.31989/bmp.v3i4.1988>

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>

Molina-Torres, J., & García-Chávez, A. (2001). Alcamidas en plantas: Distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 20, 377–387.

Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis*

longipes roots: Affinin and reduced amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4700–4704. <https://doi.org/10.1021/jf049830r>

Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00133-2)

Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The biophysical and biochemical basis of nitric oxide-mediated hypersensitive cell death. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1369–1381. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj115>

Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S., & Dadpour, M. R. (2012). Ontogenic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). *BiolImpacts*, 2(2), 105–109. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.015>

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Ngoufack Tagousop, C., Feugap Tsamo, D., Nguetse Dongmo, A. J., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., Tamokou, J. D., & Nhnokam, D. (2025). Chemical constituents from ethyl acetate extract of *Graptophyllum glandulosum* Turrill and new semi-synthetic derivative with antimicrobial activities. *Advances in Biological Chemistry*, 15(1), 18–30. <https://doi.org/10.4236/abc.2025.151002>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]. (2001). *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Diario Oficial de la Federación [DOF], 22 de agosto de 2001.

Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD]. (2001). *Test No. 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>

Ortiz-Rojas, L.Y., & Chaves-Bedoya, G. (2017). Phytochemical composition of the root extract in *Ichthyonthera terminalis* from two geographical regions in Colombia.

Parola-Contreras, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., Ruiz-Castillo, G. V., Rojas-Molina, A., & Guevara-González, R. G. (2024). Controlled elicitation and greenhouse acclimation time effects on morphological and biochemical variables in collections of *Heliopsis longipes* from Central México. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43(3), 889–901. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11147-0>

Parola-Contreras, I., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Ocampo-Velázquez, R. V., Gastélum-Barrios, A., & Torres-Pacheco, I. (2021). Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*Heliopsis longipes*, Asteraceae). *Botanical Sciences*, 99(1), 149–160. <https://doi.org/10.17129/botsci.2671>

Parola-Contreras, I., Tovar-Pérez, E. G., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F. J., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2020). Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (Chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products*, 148, Artículo 112314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>

Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 1991–2001. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri196>

Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G., & Jansen, M. A. (2005). Morphogenic responses of plants to stress. *Trends in Plant Science*, 10(11), 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008>

Piñeros-Castro, Y., Otálvaro-Álvarez, A., & Velásquez-Lozano, M. (2009). Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4-β-hidroxiwithanólido E en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 23–28. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.eada>

Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., & Molina-Torres, J. (2000). Fungicidal activity of affinin and *Heliopsis longipes* crude root extract on two *Sclerotium* species. *Agrociencia*, 34(2), 207–215.

Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., & Molina-Torres, J. (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1058–1068.

- Reymond, P., & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate signaling pathways for plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(5), 404–411. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80263-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80263-1)
- Rios, M. Y., Aguilar-Guadarrama, A. B., & Gutiérrez, M. C. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.041>
- Romero-Tovar, J. J. (2025). *Análisis químico y determinación del efecto vasodilatador de extractos obtenidos de las partes aéreas de Heliopsis longipes* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional de la UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/11233>
- Romero, F. R., Delate, K., Kraus, G. A., Solco, A. K., Murphy, P. A., & Hannapel, D. J. (2009). Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(6), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9187-1>
- Rondanelli, M., Fossari, F., Vecchio, V., Braschi, V., Riva, A., Allegrini, P., Petrangolini, G., Iannello, G., Faliva, M. A., Peroni, G., Nichetti, M., Gasparri, C., Spadaccini, D., Infantino, V., Mustafa, S., Alalwan, T., & Perna, S. (2020). *Acmella oleracea* for pain management. *Fitoterapia*, 140, Artículo 104419. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104419>
- Ruiz-Castillo, G. V. (2021). *Caracterización química del extracto de diclorometano de la raíz de Heliopsis longipes y evaluación del efecto vasodilatador de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional de la UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3416>
- Ruiz-Reyes, E., & Suárez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas: Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 9–24.
- Salomé-Abarca, L. F., Godevac, D., Sun, K., Geu-Sook, H., Cheol, S., Pyo, Y., van den Hondel, C. A. M. J. J., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G. L., & Choi, Y. H. (2020). Latex metabolome of *Euphorbia* species: Geographical and inter-species variation and its proposed role in plant defense against herbivores and pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 47(6), 564–576. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01268-x>
- Sanchita, & Sharma, A. (2018). Análisis de expresión genética en plantas medicinales en condiciones de estrés abiótico. En *Metabolitos vegetales y regulación bajo estrés ambiental* (pp. 407–414). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00018-3>

Schafleitner, R., Rosales, R. O., Gaudin, A., Aliaga, M. S. A., Nomberto, G., Castañeda, G., Alvarado, R., Forbes, G., del Rosario Herrera, M., Khan, M. A., & Bonierbale, M. (2007). Capturing candidate genes for drought tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 61(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.005>

Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* Russo, 42(3), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00047-4)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (2002). *Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis*. Diario Oficial de la Federación [DOF], Segunda Sección, 31 de diciembre de 2002.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (2016). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México 2015: Compendio de Estadísticas Ambientales, Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de México, México.

Secretaría de Salud. (2021). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (13.^a ed.). Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), Artículo 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>

Shi, W., Wang, Y., Li, J., Zhang, H., & Ding, L. (2007). Investigation of ginsenoside in different parts and ages of *Panax ginseng*. *Food Chemistry*, 102(3), 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.050>

Shibata, M., Amano, M., Kawata, J., & Uda, M. (1988). Breeding process and characteristics of “Summer Queen”, a spray-type chrysanthemum. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea*, 2, 245–255.

Silveira, N., Pergaud, L., & Weber, M. (2018). Spilanthol-containing products: A patent review (1996–2016). *Trends in Food Science & Technology*, 74, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.016>

Takshak, S., & Agrawal, S. B. (2014). Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental Ultraviolet-B radiation in *Withania somnifera* Dunal, an indigenous medicinal plant. *Journal of Photochemistry*

and *Photobiology B: Biology*, 140, 332–343.
<https://doi.org/10.1016/j.iphotobiol.2014.08.014>

Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*, 2013, Artículo 762412. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>

Thimmapa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040035>

Valencia-Guzmán, C. J., Castro-Ríos, J. E., García-Gasca, T., Rojas-Molina, A., Romo-Mancillas, A., Luna-Vázquez, F. J., Rojas-Molina, J. I., & Ibarra-Alvarado, C. (2021). Endothelial TRP channels and cannabinoid receptors are involved in affinin-induced vasodilation. *Fitoterapia*, 155, Artículo 104985. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104985>

Valentino, G., Graziani, V., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Fiorentino, A., & Scognamiglio, M. (2020). NMR-based plant metabolomics in nutraceutical research: An overview. *Molecules*, 25(6), Artículo 1444. <https://doi.org/10.3390/molecules25061444>

Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular mechanisms of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(3), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.001>

Vázquez-Hernández, M. C., Parola-Contreras, I., Montoya-Gómez, L. M., Torres-Pacheco, I., Schwarz, D., & Guevara-González, R. G. (2019). Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. *Scientia Horticulturae*, 250, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.043>

Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>

Veryser, L., Taevernier, L., Joshi, T., Tatke, P., Wynendaele, E., Bracke, N., Stalmans, S., Peremans, K., Burvenich, C., Risseuw, M., & De Spiegeleer, B. (2016). Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, Artículo 177. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1164-6>

Villar, I. C., Centeno, F., & Jiménez, R. (2020). Antihypertensive and vasodilator effects of a phytocomplex rich in stigmasterol and β -sitosterol. *Phytomedicine*, 72, Artículo 153210. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153210>

- Villaseñor, J. L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332–358. <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wang, Y., Zhang, Y., & Zhang, R. (2022). The role of flavonoids in plant-microbe interactions and structural assembly of the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 13, Artículo 915380. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.915380>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Huang, W. C., Wu, L. Y., Sindy, H., & Wu, S. J. (2018). Spilanthol inhibits COX-2 and ICAM-1 expression via suppression of NF- κ B and MAPK signaling in interleukin- β -stimulated human lung epithelial cells. *Inflammation*, 41(5), 1934–1944. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0837-3>
- Wongaswatkul, O., Anantsolabho, M., & Rojsanga, P. (2008). Vasodilator effect of phytosterols isolated from medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Health Research*, 22(3), 115–121.
- Xu, C., Tang, T., Chen, R., Liang, C., Liu, X., Wu, C., Yang, Y., Yang, D., & Wu, H. (2014). A comparative study of bioactive secondary metabolite production in diploid and tetraploid *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 116(3), 323–332. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0406-8>
- Xu, J., Yu, Y., Shi, R., Xie, G., Zhu, Y., Wu, G., & Qin, M. (2018). Organ-specific metabolic shifts of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* at different growth and development stages. *Molecules*, 23(2), Artículo 428. <https://doi.org/10.3390/molecules23020428>
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), Artículo 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

- Yin, L., Zhao, C., Huang, Y., Yang, R. Y., & Zeng, Q. P. (2008). Abiotic stress-induced expression of artemisinin biosynthesis genes in *Artemisia annua* L. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 14(1), 1–5. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2008.00001>
- Zakiri, A., Jibrin, S., Majekodunmi Oladeji, F., Hassan Shaggal, M., & Sule, A. (2023). Cytotoxic terpenes from the stem bark of *Echinacea angustifolia* DC. collected from Girei, Adamawa State, Nigeria. *Journal of Essential Oil & Plant Composition*, 1(2), 129–137. <https://doi.org/10.58985/jeopc.2023.v01i02.18>
- Zhao, F., Li, W., Pan, W., Chen, Z., & Qu, H. (2020). A novel critical control point and chemical marker identification method for the multi-step process control of herbal medicines via NMR spectroscopy and chemometrics. *RSC Advances*, 10(23), 13801–13812. <https://doi.org/10.1039/D0RA01479F>
- Zhao, J., Davis, L., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zhou, J., Jiang, Z., Wang, Z., Zhang, J., Li, J., Li, Y., Zhang, J., Chen, P., & Gu, Q. (2013). Synthesis and characterization of triblock copolymer PLA-b-PBT-b-PLA and its effect on the crystallization of PLA. *RSC Advances*, 3(40), 18464–18473. <https://doi.org/10.1039/C3RA42483C>
- Zhu, Y., Xu, C., Huang, J., Li, G., Liu, X. H., Sun, S., & Wang, J. (2014). Rapid discrimination of cultivated *Codonopsis lanceolata* in different ages by FT-IR and 2DCOS-IR. *Journal of Molecular Structure*, 1069, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.02.012>

XI. ANEXOS

XI.1. Anexo 1. Artículo JCR



Article

Metabolomic Analysis of *Heliopsis longipes* Roots Across Phenological Stages

Victoria Ruiz-Castillo ¹, Ramón Gerardo Guevara-González ², César Ibarra-Alvarado ³,
Pedro Alberto Vázquez-Landaverde ⁴, Eduardo Rodríguez de San Miguel ⁵, Pablo Aguilar-Rodríguez ⁶,
Martha Elena García-Aguilera ⁶, Nuria Esturau-Escofet ^{6,*} and Alejandra Rojas-Molina ^{3,*}

¹ Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Santiago de Querétaro C.P. 76010, Querétaro, Mexico

² Grupo de Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, Carr. Chichimequillas-Amazcala Km 1 2/N, Amazcala, El Márques C.P. 76265, Querétaro, Mexico; ramon.guevara@uaq.mx

³ Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Santiago de Querétaro C.P. 76010, Querétaro, Mexico; cibarra@uaq.mx

⁴ Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnológica Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro, Cerro Blanco 141, Colinas del Cimatarío, Santiago de Querétaro C.P. 76090, Querétaro, Mexico; pavazquez@ipn.mx

⁵ Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico; erdsng@unam.mx

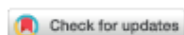
⁶ Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico

* Correspondence: nesturau@quimica.unam.mx (N.E.-E.); rojas@uaq.mx (A.R.-M.);
Tel.: +52-56224770 (ext. 45648) (N.E.-E.); +52-442-192-1200 (ext. 5527) (A.R.-M.)

Abstract

Heliopsis longipes, commonly known as chilcuague, is a Mexican medicinal plant recognized for its diverse biological activities, largely attributed to its alkamide content, particularly affinin. However, metabolic variations associated with plant development remain poorly understood. This study evaluated the influence of phenological stage on the phytochemical profile and vasodilatory activity of *H. longipes* roots. Dichloromethane root extracts from plants at different developmental stages were analyzed using metabolomics based on ¹H NMR spectroscopy, complemented by GC-MS profiling. Major alkamides were isolated and structurally characterized as analytical standards. Notably, three alkamides, *N*-isobutylundeca-2(*E*)-en-8,10-diynamide, *N*-isobutylundeca-3(*E*)-en-8,10-diynamide, and *N*-isobutyl-2(*E*),4(*Z*)-undecadiene-8,10-diynamide, are reported for the first time in *H. longipes* roots. Multivariate analyses (PCA and OPLS-DA) revealed significant stage-dependent metabolic variation, particularly in affinin. The lack of correlation between valine decarboxylase activity and affinin levels suggests additional regulatory steps in its biosynthesis. Vasodilatory activity increased during development, reaching maximum effect during fructification and defoliation stages, with no significant differences between them. These findings highlight the impact of phenological stage on alkamide production and bioactivity, providing a basis for optimizing cultivation and harvest timing.

Keywords: *Heliopsis longipes*; alkamides; metabolomics; ¹H NMR spectroscopy; GC-MS; vasodilatory activity



Academic Editors: José Ángel López-Valenzuela, María Fernanda Quintero-Soto, Nancy Yaeli Salazar-Salas and Karen V. Pineda-Hidalgo

Received: 10 May 2026

Revised: 12 June 2026

Accepted: 15 June 2026

Published: 16 June 2026

Copyright: © 2026 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

XI.2. Anexo 2. Temperatura registrada en CS y en CI

Cuadro 2A. Temperatura registrada en las CI.

ESTACIÓN	Temperatura máxima (%)	Temperatura mínima (%)	Temperatura promedio (%)
PRIMAVERA Del 21 de marzo al 20 de junio	42.029 ± 0.767	8.523 ± 2.067	21.311 ± 0.423
VERANO Del 20 de junio al 22 de septiembre	48.850 ± 1.068	9.525 ± 0.715	30.45 ± 1.898
OTOÑO Del 23 de septiembre al 21 de diciembre	50.900 ± 1.330	7.257 ± 1.993	33.9315 ± 1.103
INVIERNO Del 22 de diciembre al 20 de marzo	45.384 ± 1.4305	-1.728 ± 0.290	34.2736 ± 1.406
TEMPERATURA PROMEDIO ANUAL			29.991 3.019

Cuadro 2B. Temperatura registrada en las condiciones silvestres.

ESTACIÓN	Temperatura máxima (%)	Temperatura mínima (%)	Temperatura promedio (%)
PRIMAVERA Del 21 de marzo al 20 de junio	32.264 ± 0.729	12.323 ± 2.988	22.294 ± 0.689
VERANO Del 20 de junio al 22 de septiembre	29.125 ± 1.724	16.250 ± 0.3227	22.687 ± 0.545
OTOÑO Del 23 de septiembre al 21 de diciembre	24.500 ± 0.769	11.7368 ± 0.662	19.763 ± 0.8623
INVIERNO Del 22 de diciembre al 20 de marzo	28.736 ± 1.218	8.210 ± 0.956	18.473 ± 0.864
TEMPERATURA PROMEDIO ANUAL			20.804 ± 1.011

XI.3. Anexo 3. Humedad relativa registrada en CS y CI

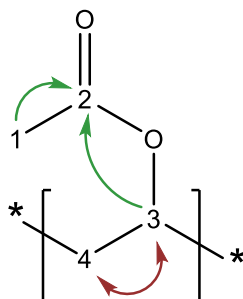
Cuadro 3A. Humedad relativa registrada en CI del estudio fenológico.

ESTACIÓN	Humedad máxima (%)	Humedad mínima (%)	Humedad promedio (%)
PRIMAVERA Del 21 de marzo al 20 de junio	69.200 ± 3.690	17.905 ± 4.342	30.347 ± 1.575
VERANO Del 20 de junio al 22 de septiembre	99.000 ± 0.000	13.000 ± 0.000	45.500 ± 5.330
OTOÑO Del 23 de septiembre al 21 de diciembre	99.000 ± 2.763	14.110 ± 1.896	25.840 ± 2.295
INVIERNO Del 22 de diciembre al 20 de marzo	77.042 ± 2.751	16.836 ± 2.751	17.457 ± 2.030
PROMEDIO ANUAL DE LA HUMEDAD RELATIVA			29.786 ± 5.879

Cuadro 3B. Precipitación registrada por la CONAGUA en CS.

ESTACIÓN	Precipitación (%)
PRIMAVERA Del 21 de marzo al 20 de junio	0.9118 ± 0.9398
VERANO Del 20 de junio al 22 de septiembre	7.8500 ± 7.5204
OTOÑO Del 23 de septiembre al 21 de diciembre	0.0000 ± 1.2262
INVIERNO Del 22 de diciembre al 20 de marzo	0.0526 ± 0.0526
PRECIPITACIÓN PROMEDIO ANUAL	2.593 ± 1.779 mm

XI.4. Anexo 4. Elucidación estructural del acetato de polivinilo (PVAc)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 2.02 (bs), 4.87 (bs), 1.76 (bs).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 21.16, 170.59, 67.17, 39.51.

Cuadro 4A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	2.02 (bs)	21.16	C-2	-
2	-	170.59	-	-
3	4.87 (bs)	67.17	C-2, 3, 4	H-4
4	1.76 (bs)	39.51	C-3, 4	H-3

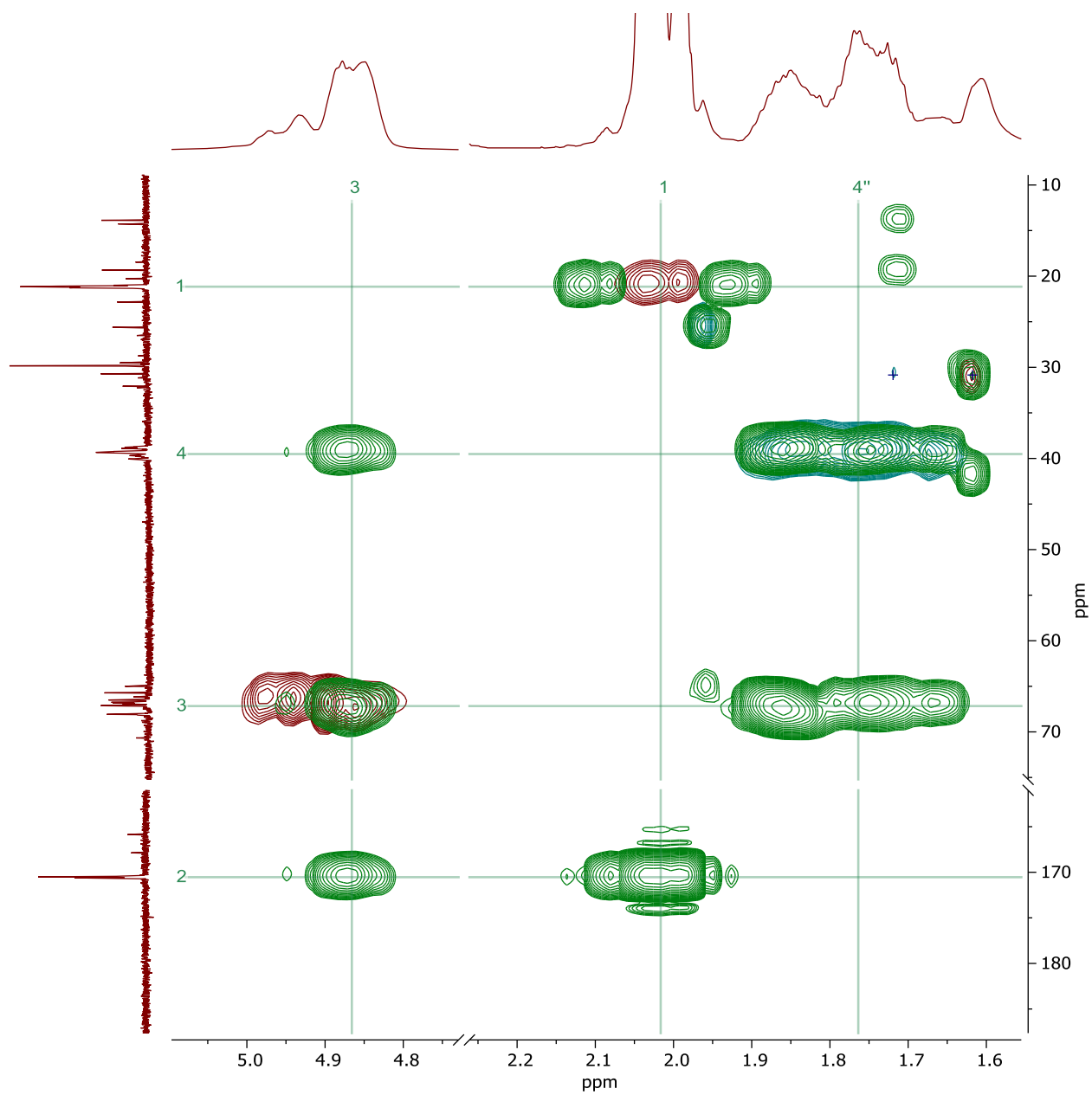


Figura 4A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) and HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

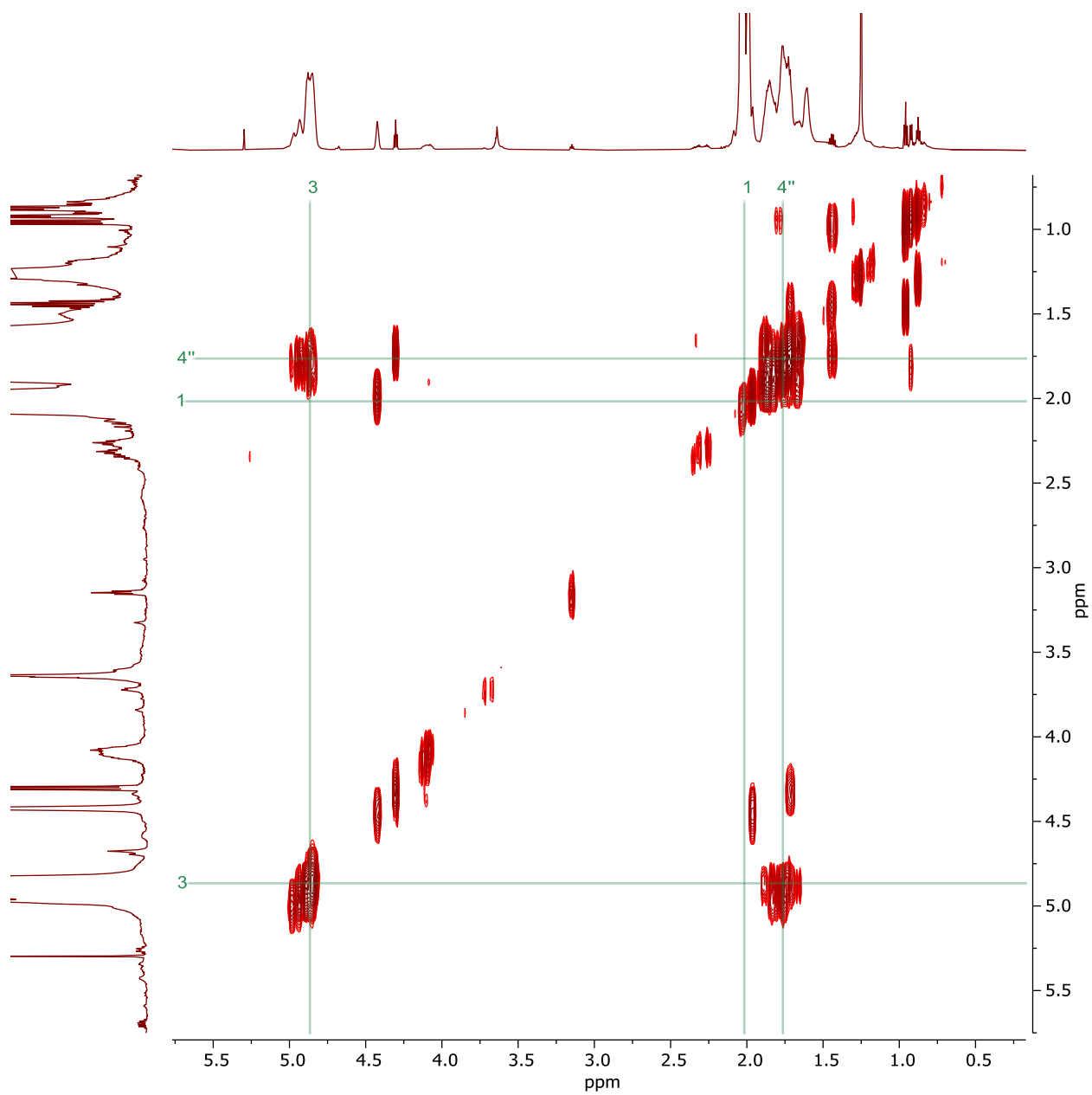
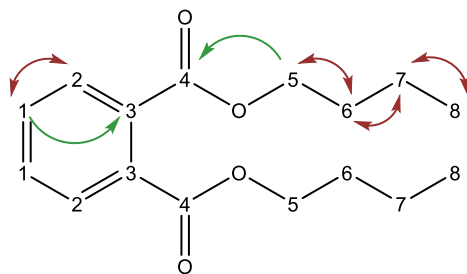


Figura 4B. Espectros de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

XI.5. Anexo 5. Elucidación estructural del ftalato de dibutilo (DBP)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} . 7.52 (dd, 3.29, 5.66), 7.71 (dd, 3.32, 5.71), 4.31 (t, 6.75), 1.72 (m), 1.44 (h, 7.41), 0.96 (t, 7.41). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 131.11, 128.94, 130.82, 167.63, 65.27, 30.71, 19.31, 13.84

Cuadro 5A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	7.52 (dd, 3.29, 5.66)	131.11	C-2, 3	H-2
2	7.71 (dd, 3.32, 5.71)	128.94	C-1, 3	H-1
3	-	130.82	-	-
4	-	167.63	-	-
5	4.31 (t, 6.75)	65.27	C-4, 6, 7	H-6
6	1.72 (m)	30.71	C-7, 8	H-5, 7
7	1.44 (h, 7.41)	19.31	C-5, 6, 8	H-6, 8
8	0.96 (t, 7.41)	13.84	C-6, 7	H-7

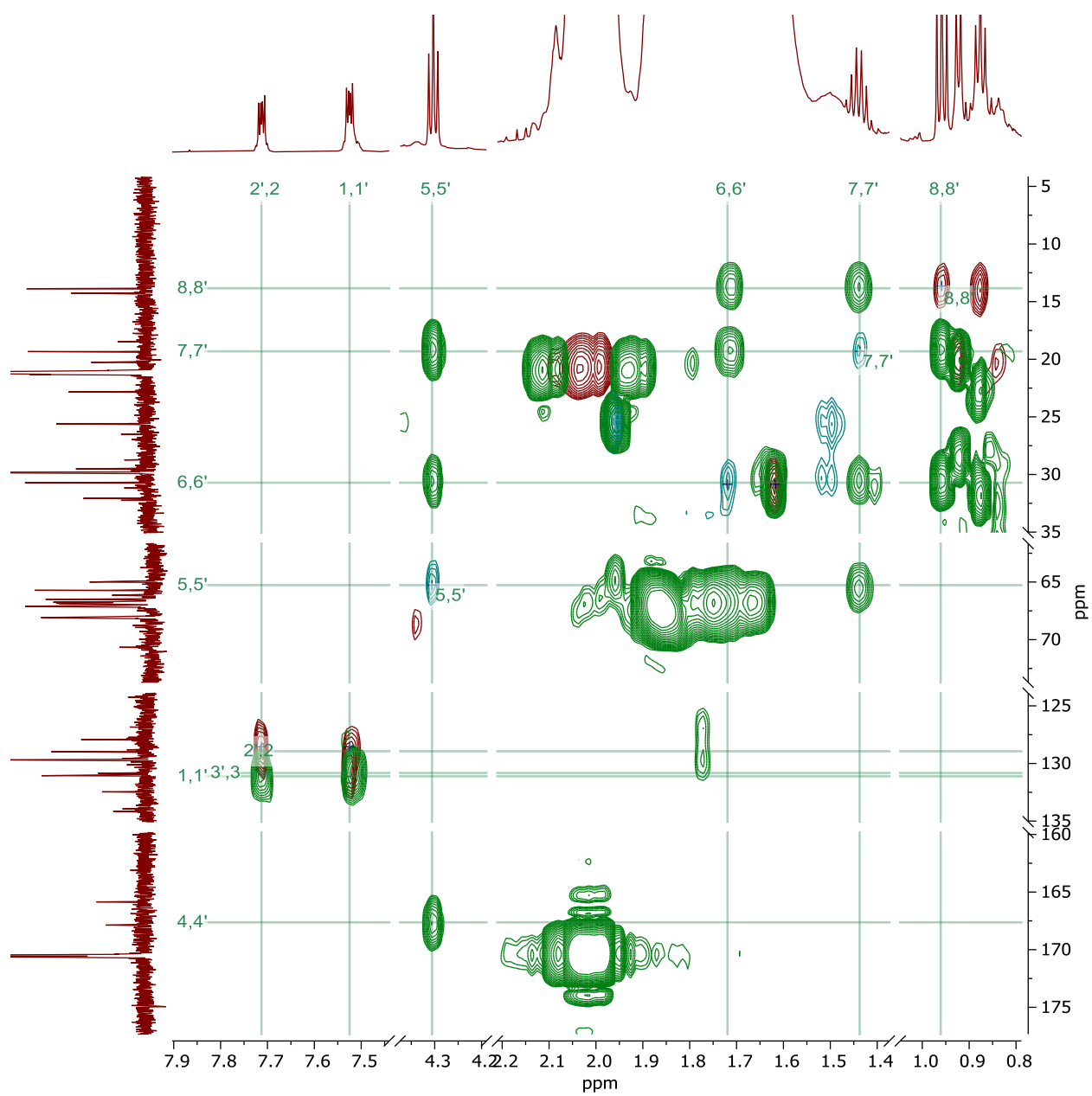


Figura 5A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

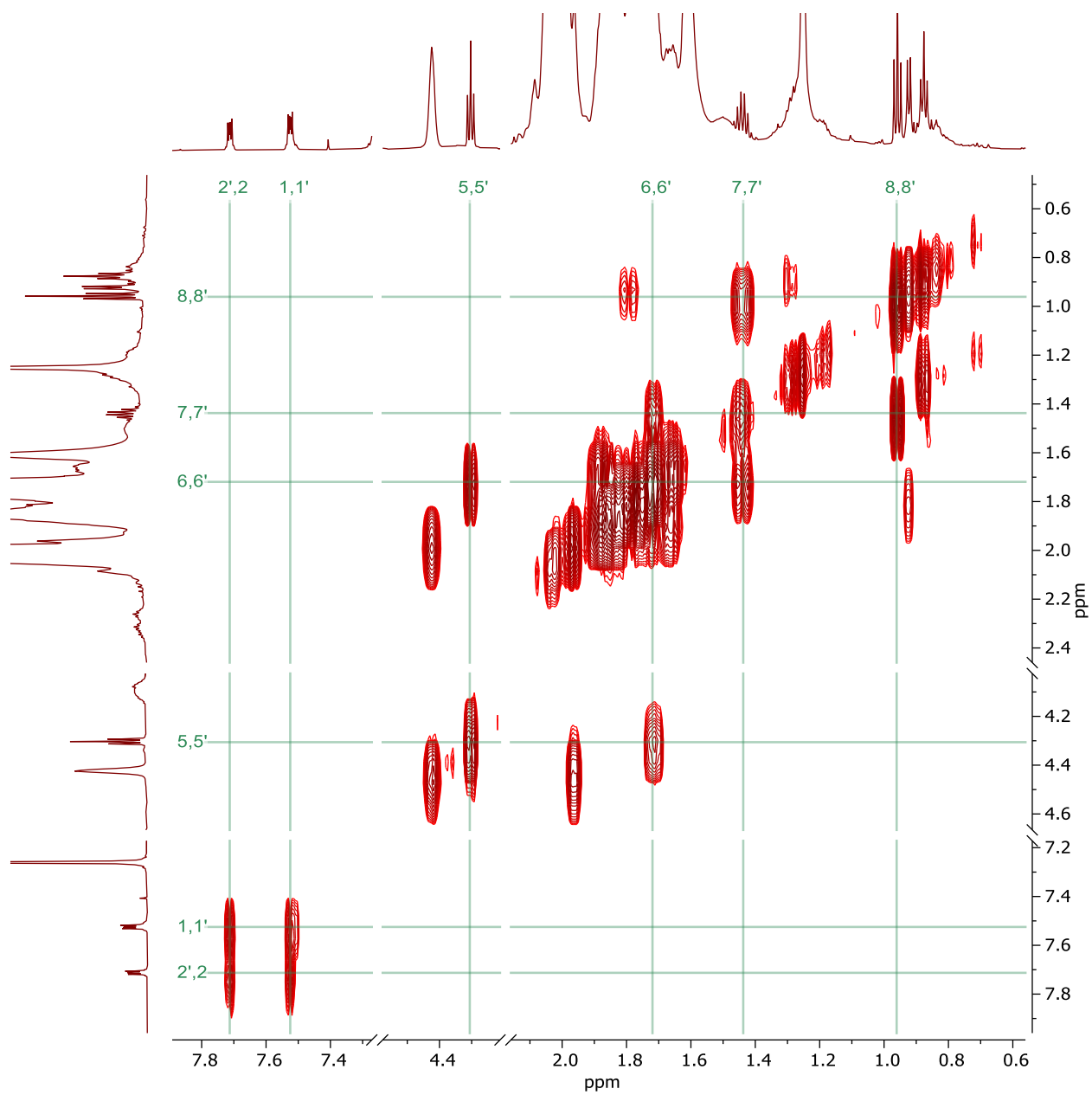
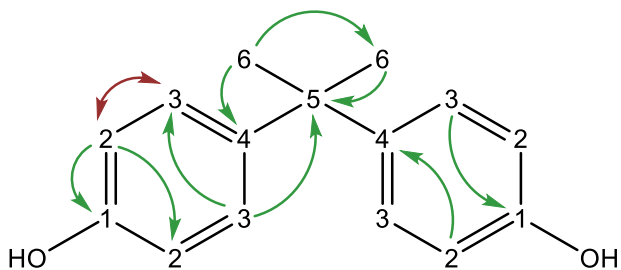


Figura 5B. Espectros de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

XI.6. Anexo 6. Elucidación estructural del bisfenol A (BPA)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 6.81 (bs), 7.12 (bs), 1.62 (bs).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 156.58, 114.00, 127.91, 143.90, 41.81, 31.15.

Cuadro 6A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	-	156.58	-	-
2	6.81 (bs)	114.00	C-1, 2, 4	H-3
3	7.12 (bs)	127.91	C-1, 3, 5	H-2
4	-	143.90	-	-
5	-	41.81	-	-
6	1.62 (bs)	31.15	C-4, 5, 6	-

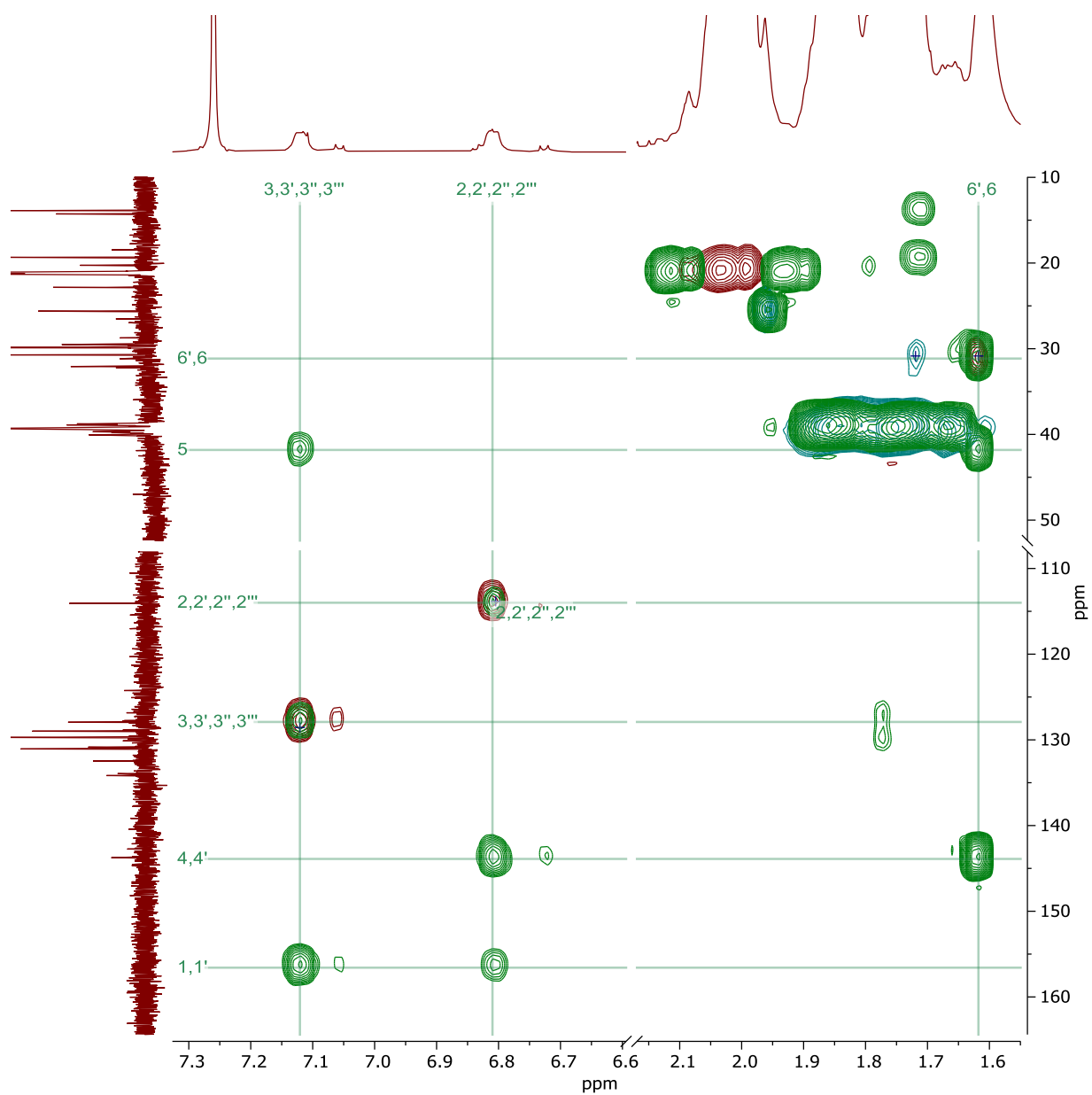


Figura 6A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) and HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

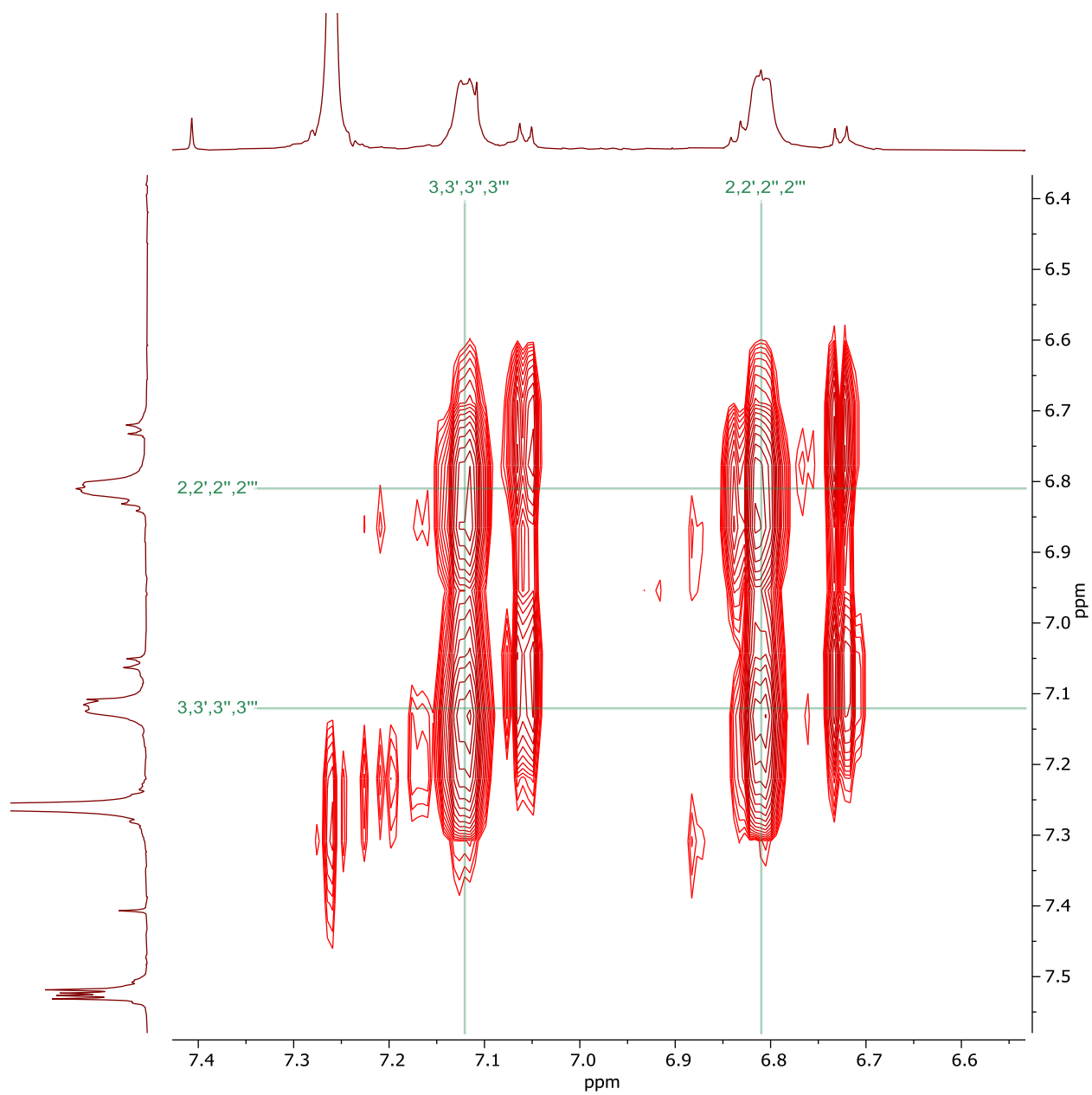
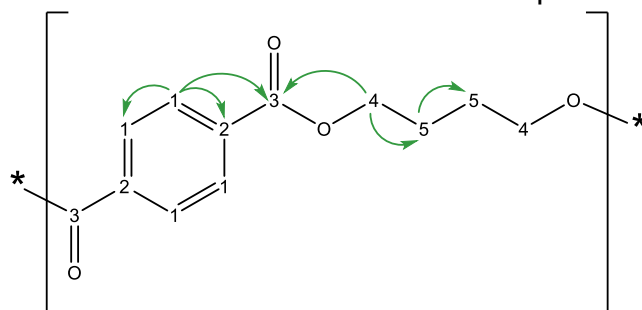


Figura 6B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

XI.7. Anexo 7. Elucidación estructural del tetraftalato de polibutifeno (PBT)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 8.08 (bs), 4.42 (bs), 1.96 (bs). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 129.74, 133.95, 165.69, 64.90, 25.68.

Cuadro 7A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	8.08 (bs)	129.74	C-1, 2, 3	-
2,	-	133.95	-	-
3	-	165.69	-	-
4	4.42 (bs)	64.90	C-3, 5	H-4
5	1.96 (bs)	25.68	C-4, 5	H-5

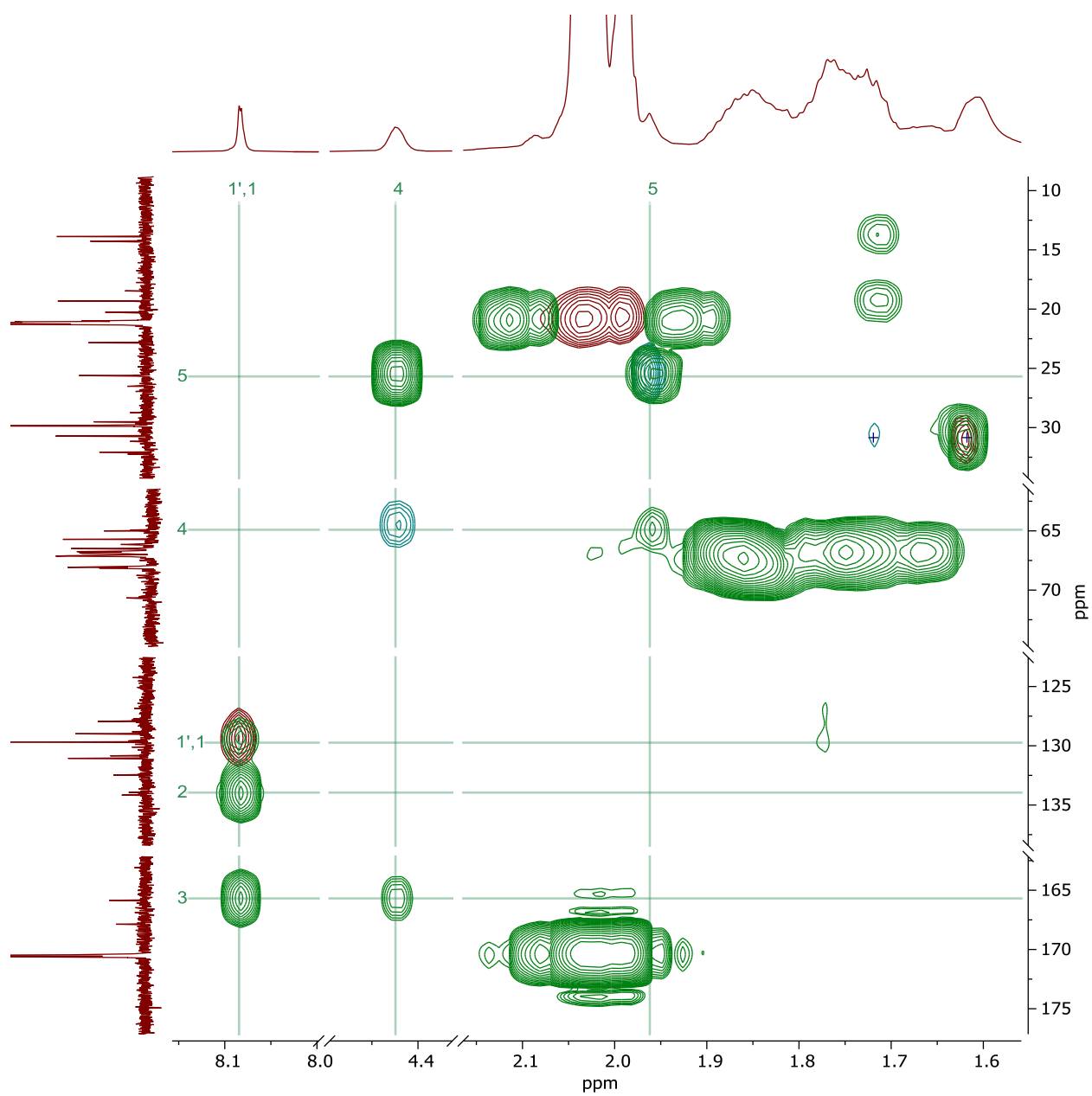


Figura 7A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

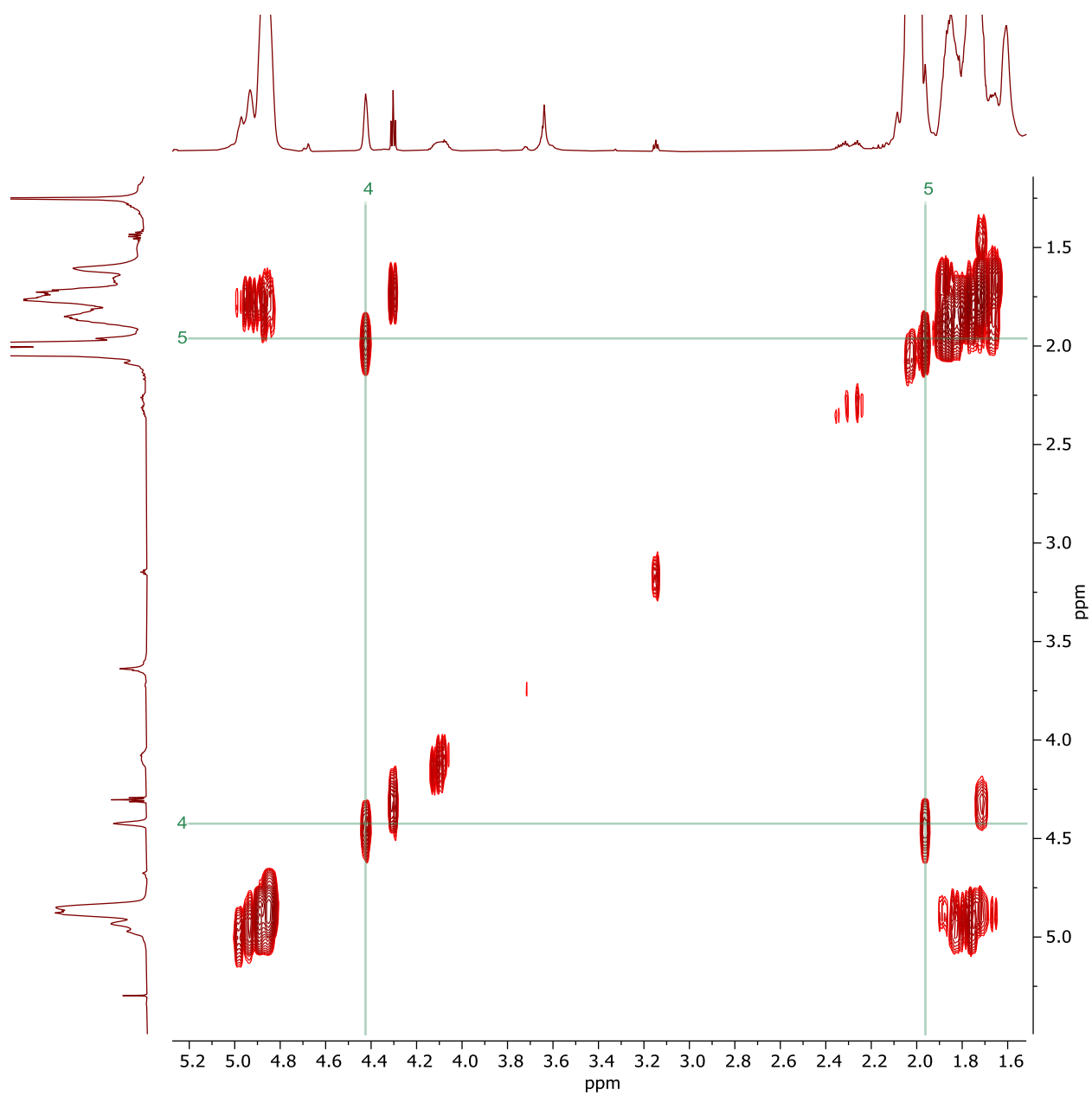
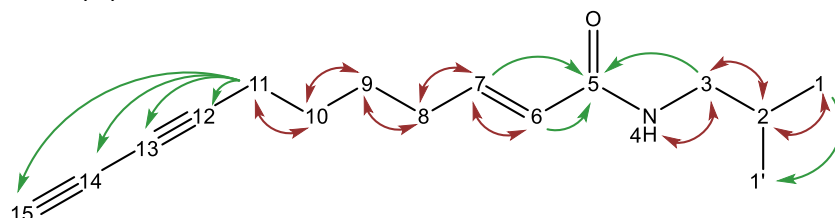


Figura 7B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

XI.8. Anexo 8. Elucidación estructural del compuesto 1 identificado como *N*-isobutillundeca-2(*E*)-en-8,10-diínamida



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.92 (d, 6.71, H1), 1.78 (m, H2), 3.15 (dd, 6.86, 6.09, H3), 5.43 (bs, H4), 5.79 (t, 1.59, H6), 6.81 (t, 6.88, H7), 2.20 (m, H8), 1.58 (m, H9), 1.58 (m, H10), 2.28 (td, 6.99, 1.29, H11), 1.96 (t, 1.18, H15). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 20.25, 28.79, 46.98, 166.33, 124.21, 143.91, 31.60, 27.46, 27.41, 19.05, 77.85, 68.48, 68.59, 65.16.

Cuadro 8A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY (H $\rightarrow$ H)
1	0.92 (d, 6.71)	20.25	C-1, 2, 3	H-2
2	1.78 (m)	28.79	C-1, 3	H-1, 3
3	3.15 (dd, 6.86, 6.09)	46.98	C-1, 2, 5	H-4
4	5.43 (bs)	-	-	H-3
5	-	166.33	-	-
6	5.79 (t, 1.59)	124.21	C-5, 8	H-7
7	6.81 (t, 6.88)	143.91	C-5, 6, 8, 9	H-6, 8
8	2.20 (m)	31.60	C-6, 7, 9, 10	H-7, 9
9	1.58 (m)	27.46	C-7, 8, 10, 11	H-8, 10
10	1.58 (m)	27.41	C-8, 9, 11, 12	H-9, 11
11	2.28 (td, 6.99, 1.29)	19.05	C-9, 10, 12, 13, 14, 15	H-10
12	-	77.85	-	-
13	-	68.48	-	-
14	-	68.59	-	-
15	1.96 (t, 1.18)	65.16	-	-

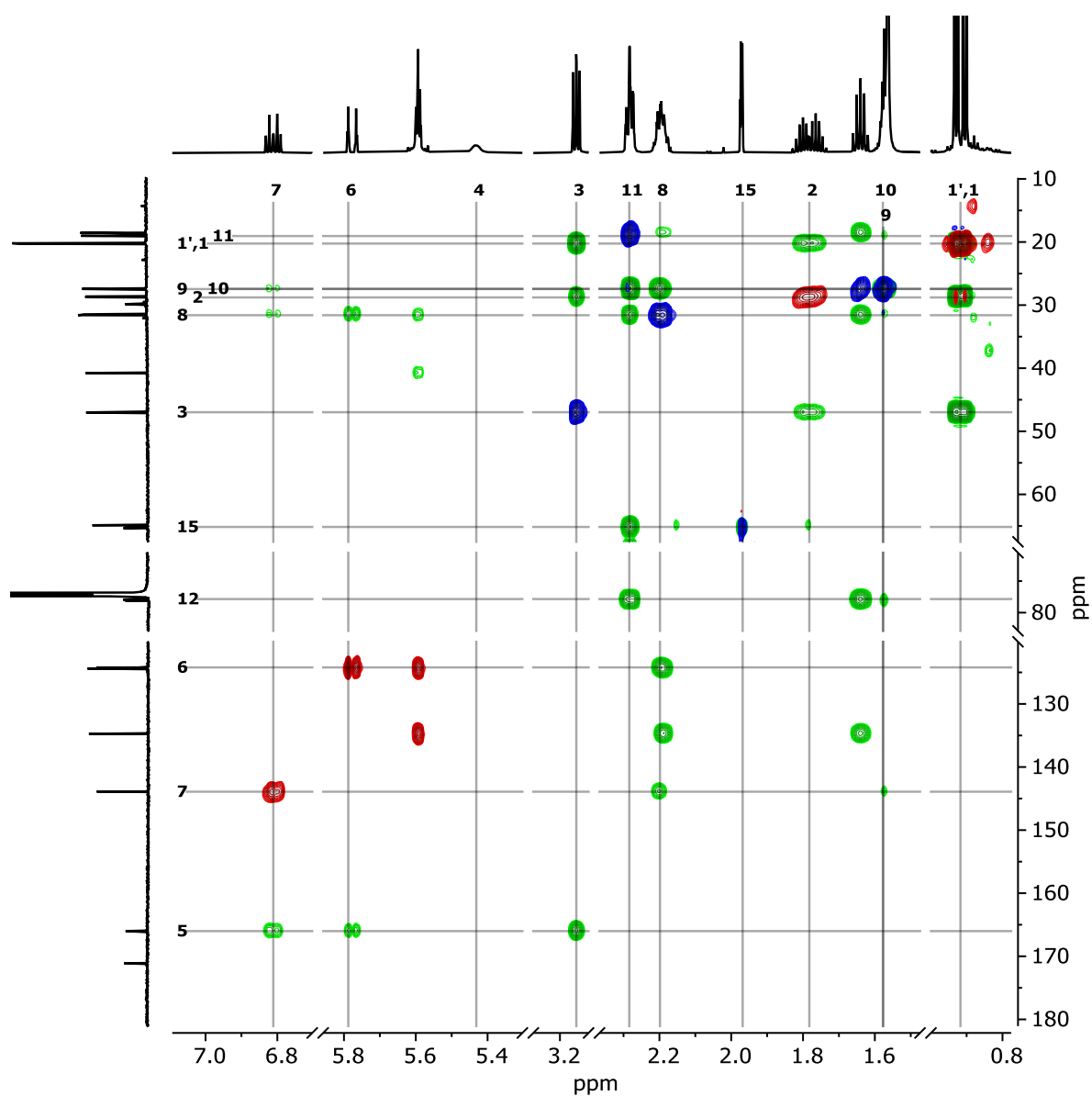


Figure 8A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) spectra (700 MHz, 300K, CDCl_3)

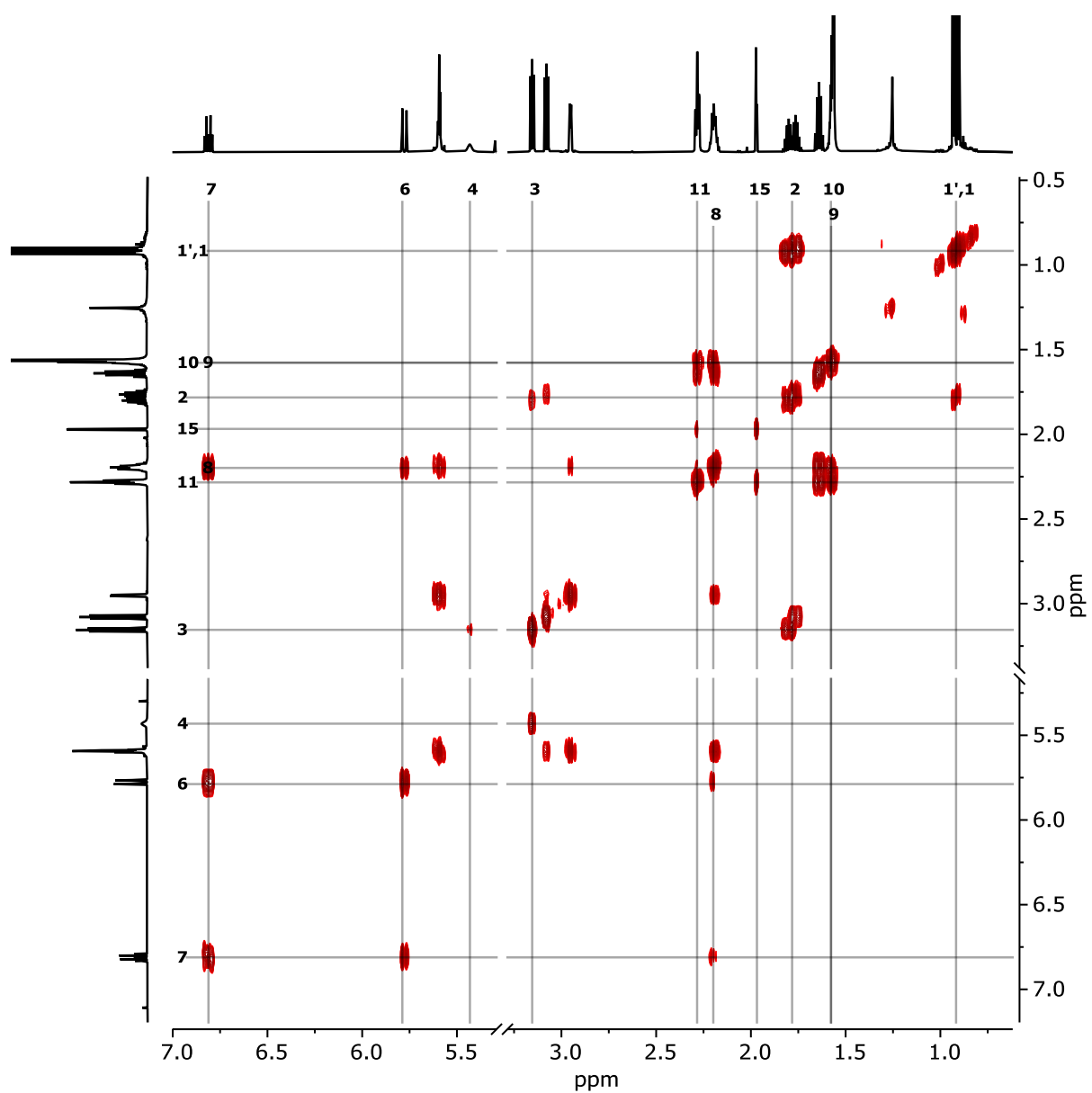


Figura 8B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

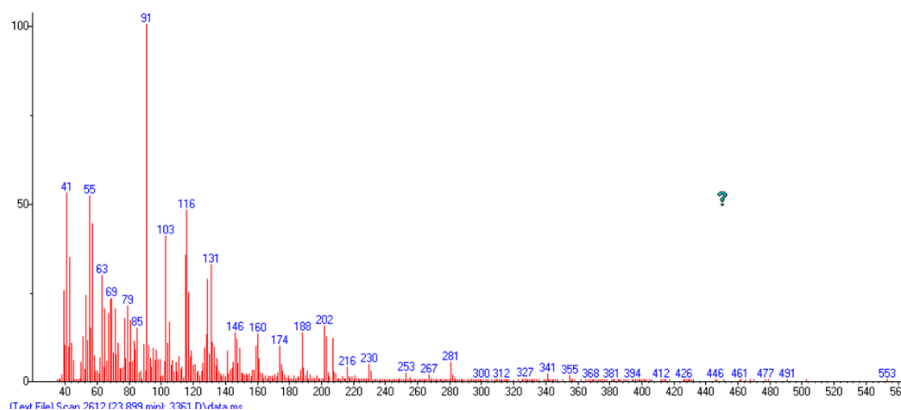


Figura 8C. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto 1 (m/z 33–600).

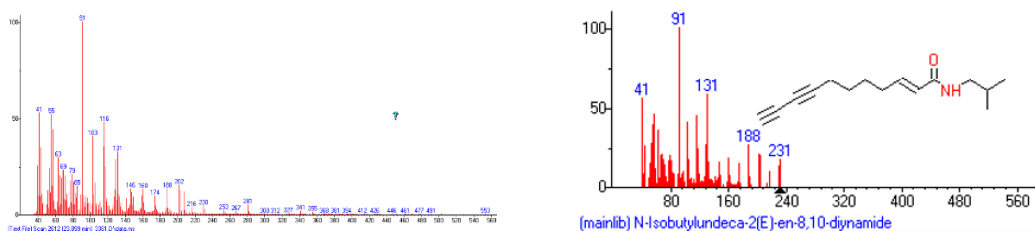
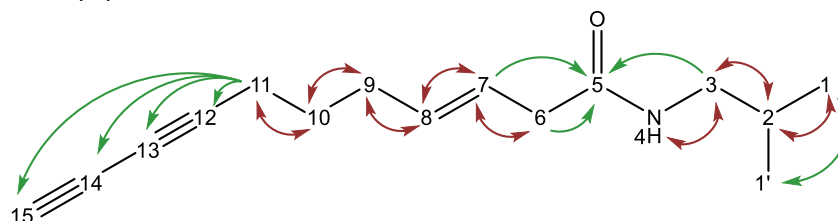


Figura 8D. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 1 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutylundeca-2(*E*)-en-8,10-diinamida (B).

IX.9. Anexo 9. Elucidación estructural del compuesto 1' identificado como *N*-isobutilundeca-3(*E*)-en-8,10-diínamida



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.92 (d, 6.71, H1), 1.78 (m, H2), 3.15 (dd, 6.86, 6.09, H3), 5.43 (bs, H4), 2.96 (m, H6), 5.59 (m, H7), 5.59 (m, H8), 2.19 (m, H9), 1.64 (m, H10), 2.28 (td, 6.99, 1.29, H11), 1.97 (t, 1.18, H15). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 20.25, 28.79, 46.98, 166.33, 40.68, 123.76, 134.52, 32.15, 27.45, 18.84, 77.85, 68.48, 68.59, 65.16.

Cuadro 9A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY (H $\rightarrow$ H)
1	0.92 (d, 6.71)	20.25	C-1, 2, 3	H-2
2	1.78 (m)	28.79	C-1, 3	H-1, 3
3	3.15 (dd, 6.86, 6.09)	46.98	C-1, 2, 5	H-4
4	5.43 (bs)	-	-	H-3
5	-	166.33	-	-
6	2.96 (m)	40.68	C-5, 7, 8	H-7
7	5.59 (m)	123.76	C-6, 9	H-6, 8
8	5.59 (m)	134.52	C-6, 9	H-9
9	2.19 (m)	32.15	C-7, 8, 10, 11	H-8, 10
10	1.64 (m)	27.45	C-8, 9, 11, 12	H-9, 11
11	2.28 (td, 6.99, 1.29)	18.84	C-9, 10, 12, 13, 14, 15	H-10
12	-	77.85	-	-
13	-	68.48	-	-
14	-	68.59	-	-
15	1.97 (t, 1.18)	65.16	-	-

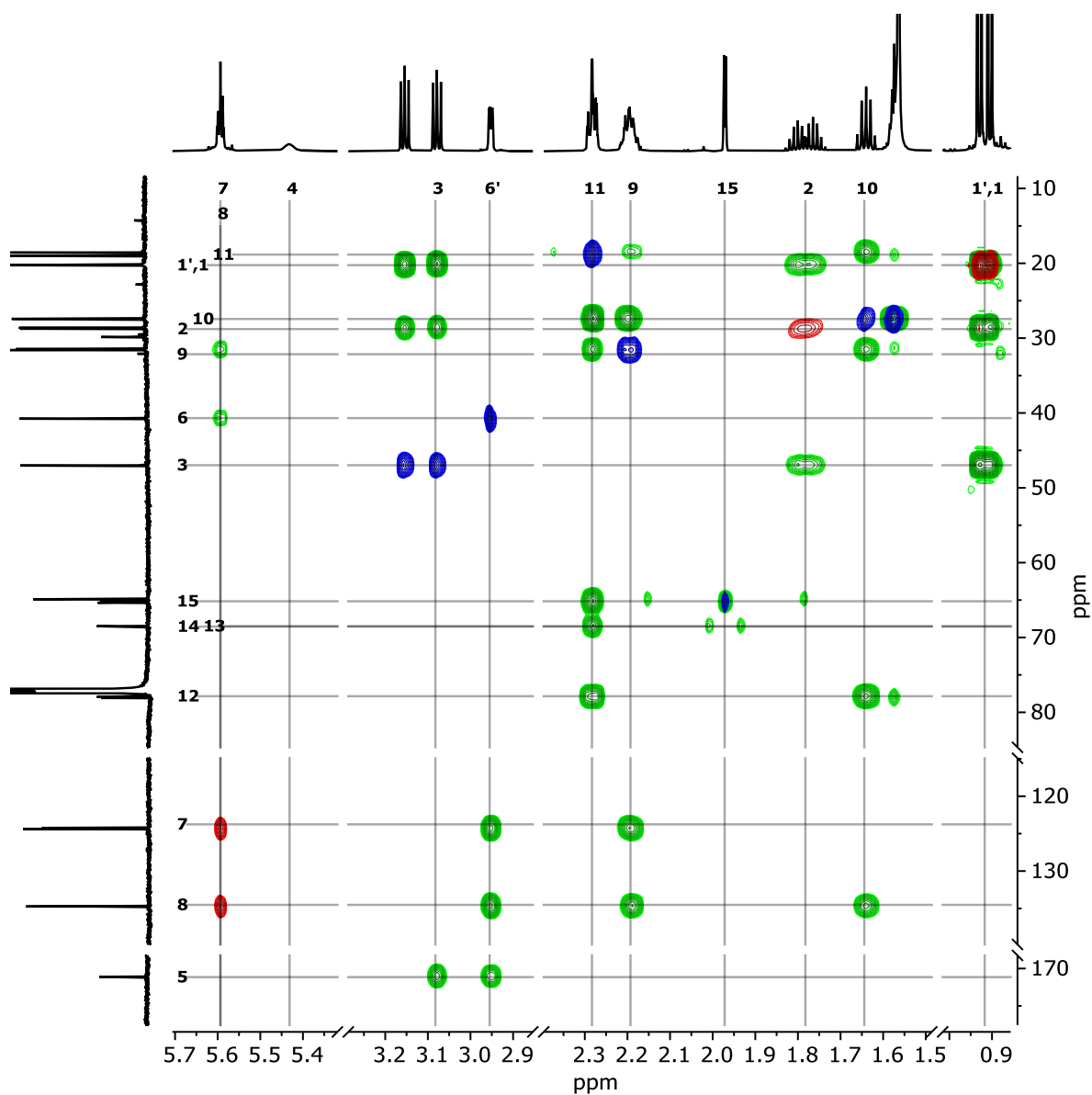


Figura 9A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

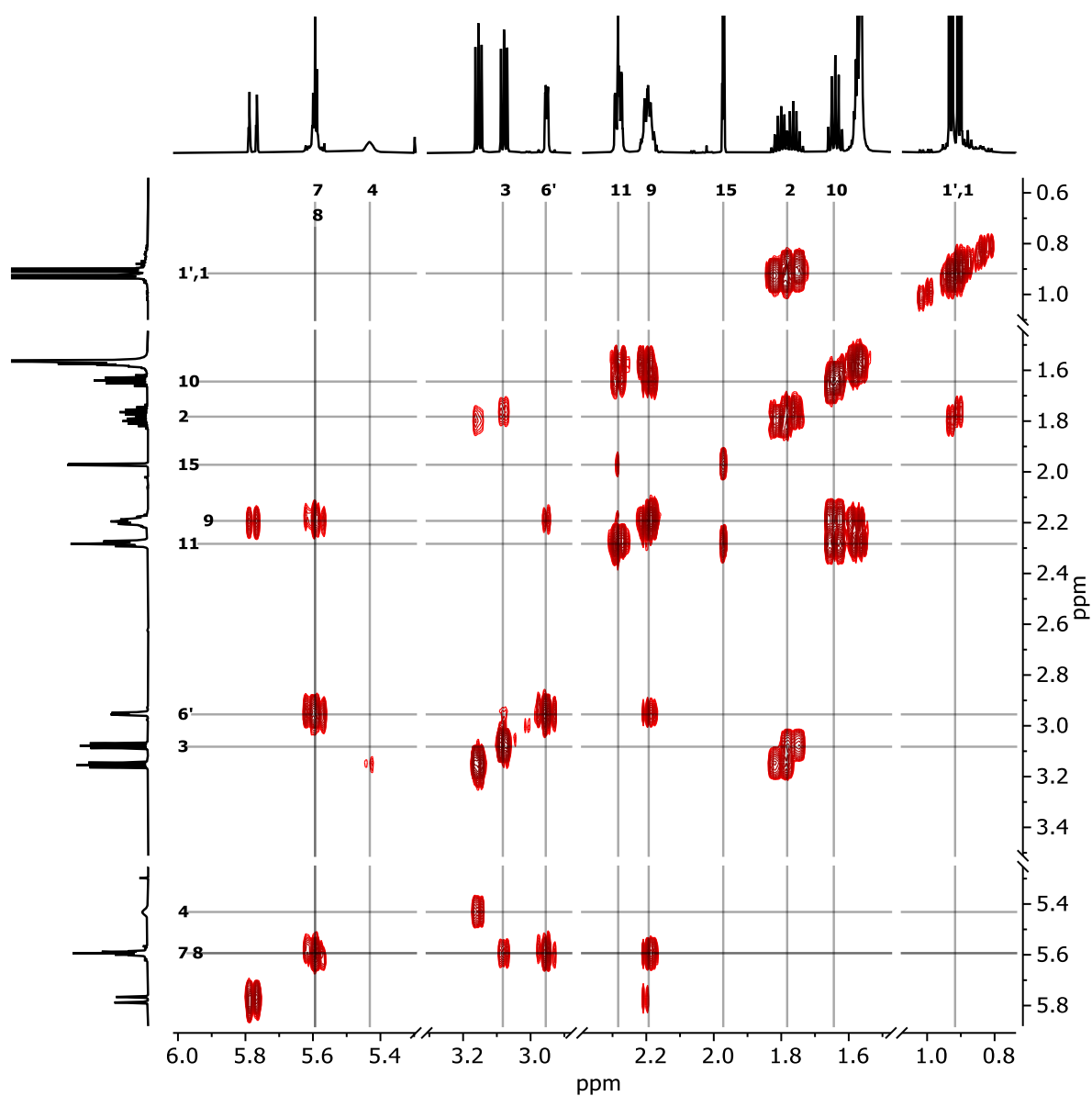
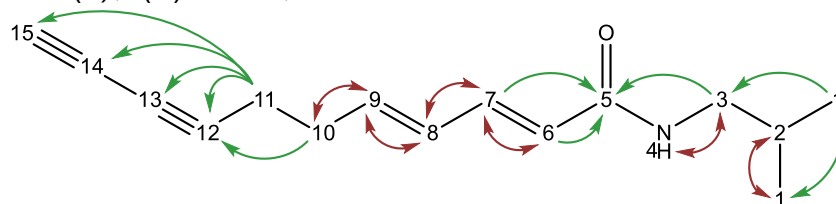


Figura 9B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

XI.10. Anexo 10. Elucidación estructural del compuesto 2 identificado como *N*-isobutilundeca-2(*E*),4(*E*)-dien-8,10-diínamida.



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03% v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.93 (d, 6.67, H1), 1.81 (m, 13.44, 6.67, H2), 3.14 (dd, 6.88, 613, H3), 5.50 (bs, H4), 5.52 (d, 11.29, H6), 6.38 (t, 11.24, H7), 7.53 (m, H8), 5.97 (dddd, 14.29, 5.16, 4.04, 1.11, H9), 2.42 (m, H10), 2.39 (m, H11), 1.98 (m, H15). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 166.41, 119.72, 140.97, 128.10, 139.72, 31.30, 19.16, 77.57, 68.47, 68.47, 65.50.

Cuadro 9A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY (H $\rightarrow$ H)
1	0.93 (d, 6.67)	20.40	C-1, 2, 3	H-2
2	1.81 (m, 13.44, 6.67)	28.68	C-1, 3	H-1, 3
3	3.14 (dd, 6.88, 613)	46.99	C-1, 2, 5	H-2, 4
4	5.50 (bs)	-	-	H-3
5	-	166.41	-	-
6	5.52 (d, 11.29)	119.72	C-5, 8	H-7
7	6.38 (t, 11.24)	140.97	C-5, 9	H-6, 8
8	7.53 (m)	128.10	-	H-7, 9
9	5.97 (dddd, 14.29, 5.16, 4.04, 1.11)	139.72	C-10, 11	H-8, 10
10	2.42 (m)	31.30	C-8, 9, 11, 12	H-9
11	2.39 (m)	19.16	C-9, 10, 13, 14, 15	-
12	-	77.57	-	-
13	-	68.47	-	-
14	-	68.47	-	-
15	1.98 (m)	65.50	-	-

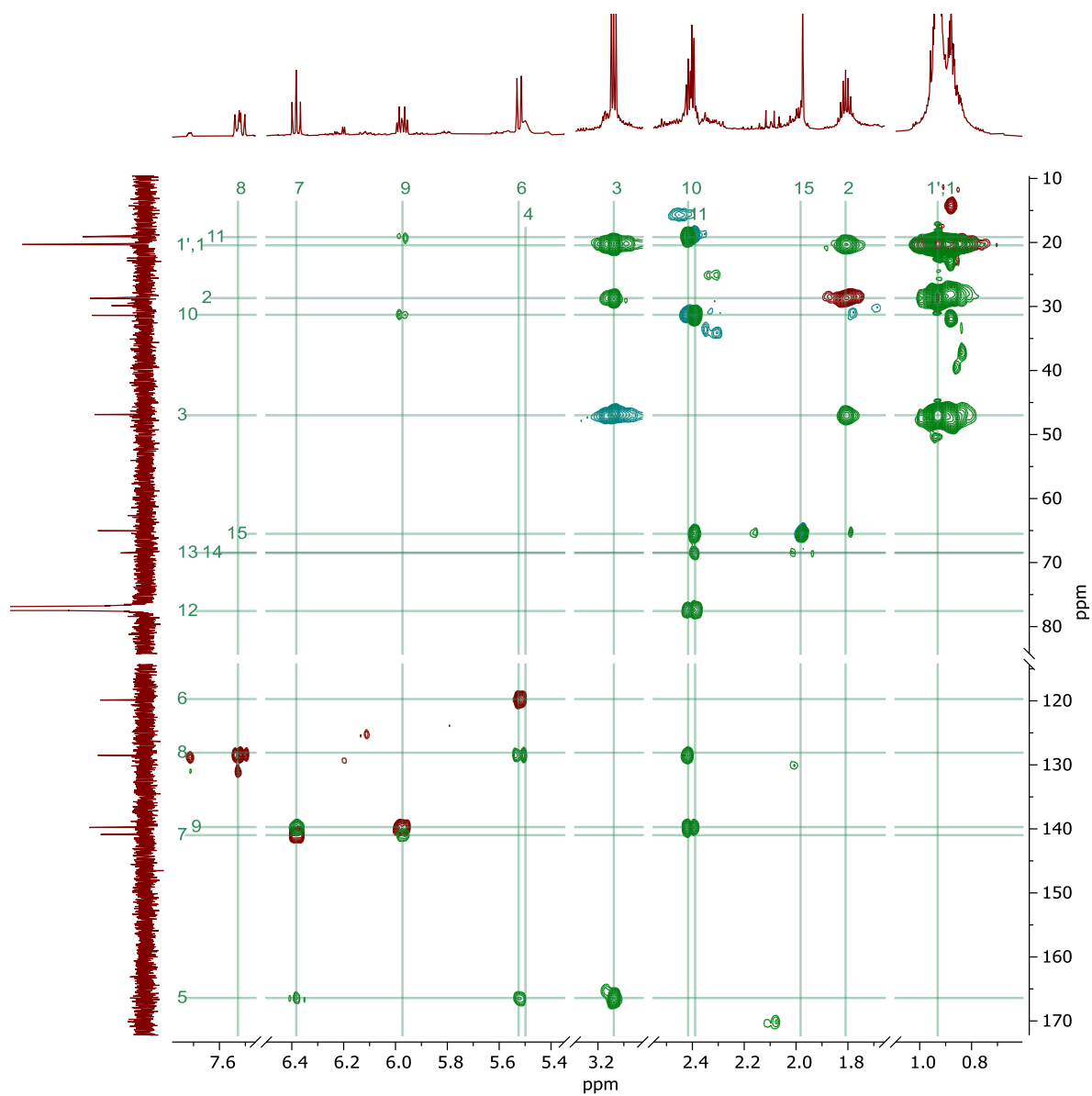


Figura 9A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

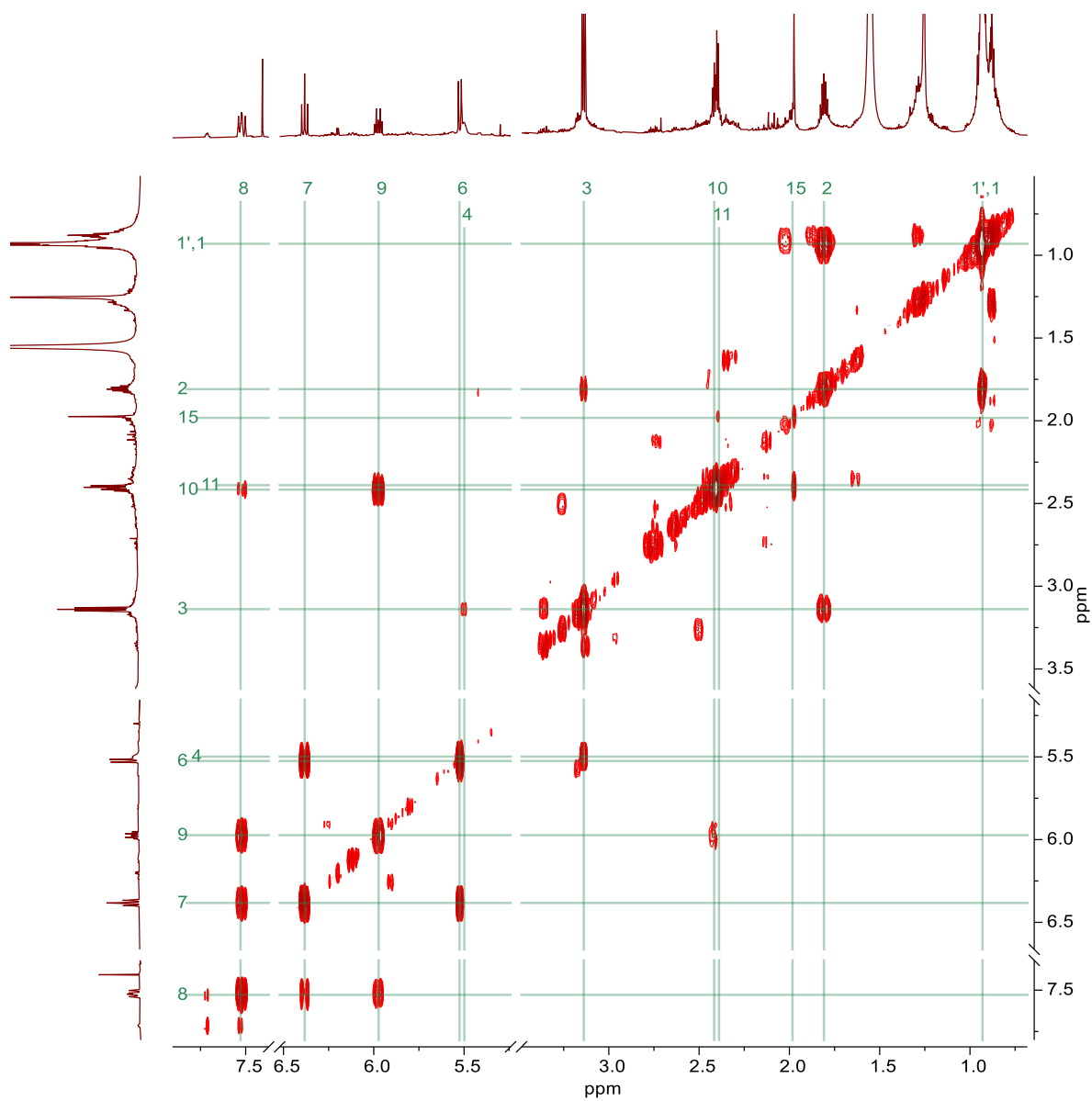


Figura 9B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

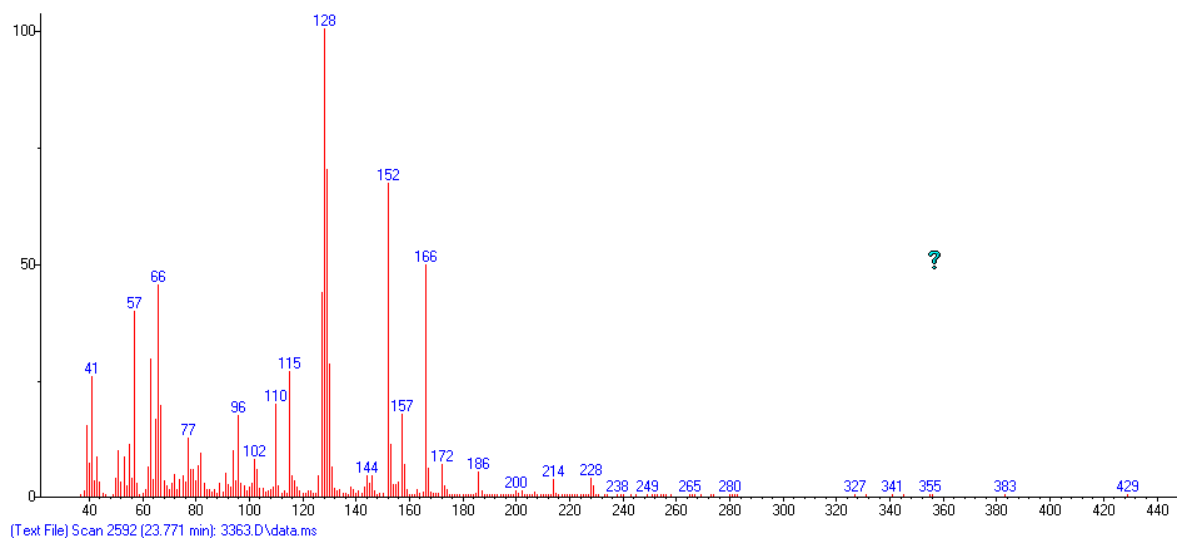


Figura 9C. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto 2 (m/z 33–600).

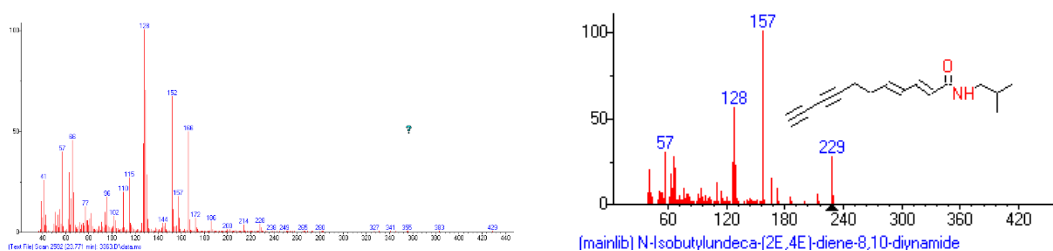


Figura 9D. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 2 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutilundeca-2(*E*),4(*Z*)-dieno-8,10-diánamida (B).

XI.11. Anexo 11. Elucidación estructural del compuesto 3

Compuesto 3. Compuesto desconocido.

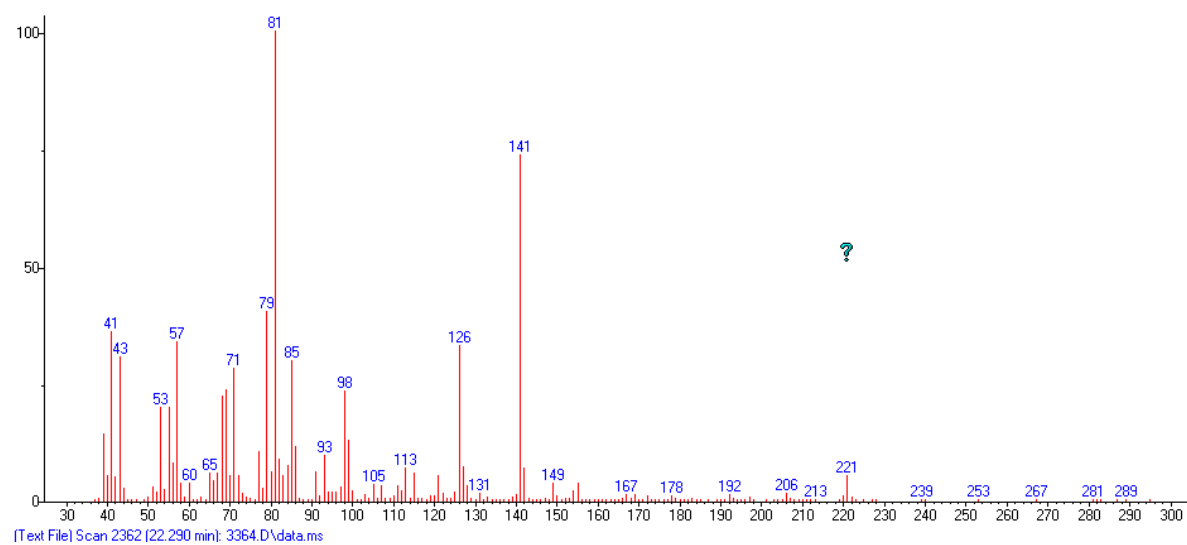


Figura 11A. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto 3 (m/z 33–600).

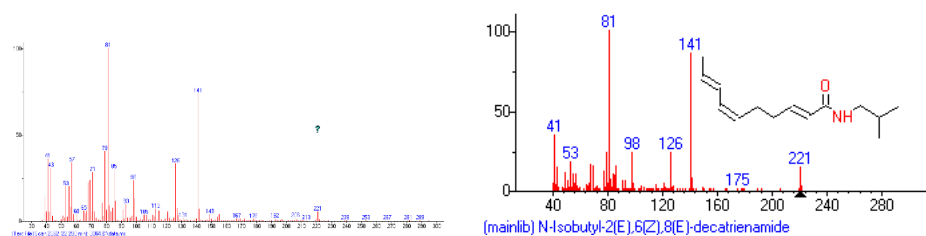
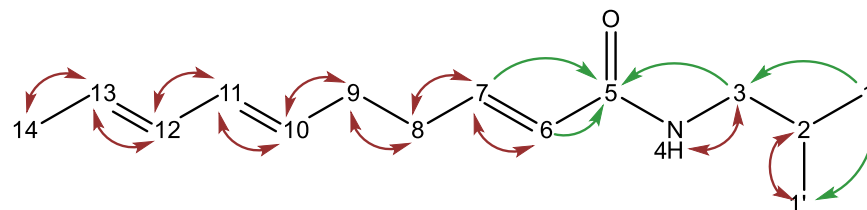


Figura 11B. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 3 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (B).

XI.12. Anexo 12. Elucidación estructural del compuesto 4 identificado como *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (afinina o espilantol)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03 % v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.92 (d, 6.70, H1), 1.79 (m, H2), 3.14 (dd, 6.90, 6.09, H3), 5.51 (bs, H4), 5.79 (dt, 15.27, 1.59, H6), 6.81 (dt, 15.25, 6.71, H7) 2.25 (m, H8), 2.31 (q, 7.27, 6.88, H9), 5.25 (dtd 10.86, 7.42, 7.37, 0.91, H10), 5.96 (10.95, H11), 6.28 (dddt, 15.49, 10.96, 3.19, 1.67, H12), 5.69 (dq, 13.81, 6.75, H13) 1.77 (m, H14). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 20.36, 28.50, 46.96, 165.89, 124.25, 143.72, 32.12, 26.60, 127.80, 129.53, 126.80, 130.13, 18.43.

Cuadro 12A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	0.92 (d, 6.70)	20.36	C-1, 2, 3	H-2
2	1.79 (m)	28.50	C-1, 3	H-1, 3
3	3.14 (dd, 6.90, 6.09)	46.96	C-1, 2, 5	H-2, 4
4	5.51 (bs)	-	-	H-3
5	-	165.89	-	-
6	5.79 (dt, 15.27, 1.59)	124.25	C-5, 8	H-7
7	6.81 (dt, 15.25, 6.71)	143.72	C-5, 8, 9	H-6, 8
8	2.25 (m)	32.12	C-6, 7, 9, 10	H-7, 9
9	2.31 (q, 7.27, 6.88)	26.60	C-7, 8, 10, 11	H-8, 10
10	5.25 (dtd 10.86, 7.42, 7.37, 0.91)	127.80	C-8, 9, 11, 12	H-9, 11
11	5.96 (10.95)	129.53	C-9, 12, 13	H-10, 12
12	6.28 (dddt, 15.49, 10.96, 3.19, 1.67)	126.80	C-10, 11, 13, 14	H-11, 13
13	5.69 (dq, 13.81, 6.75)	130.13	C-11, 14	H-12, 14
14	1.77 (m)	18.43	C-12, 13	H-13

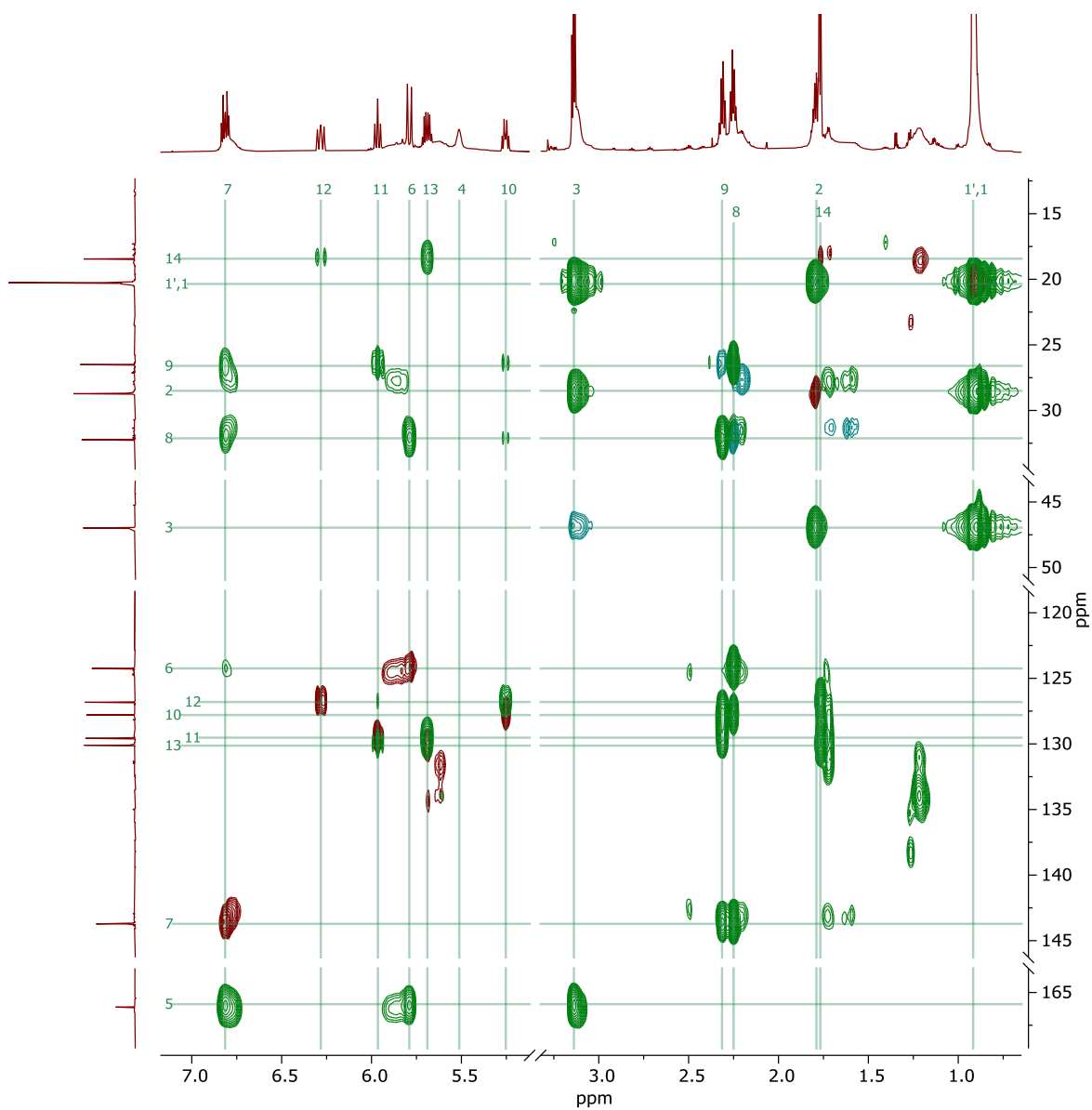


Figura 12A. Espectro de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

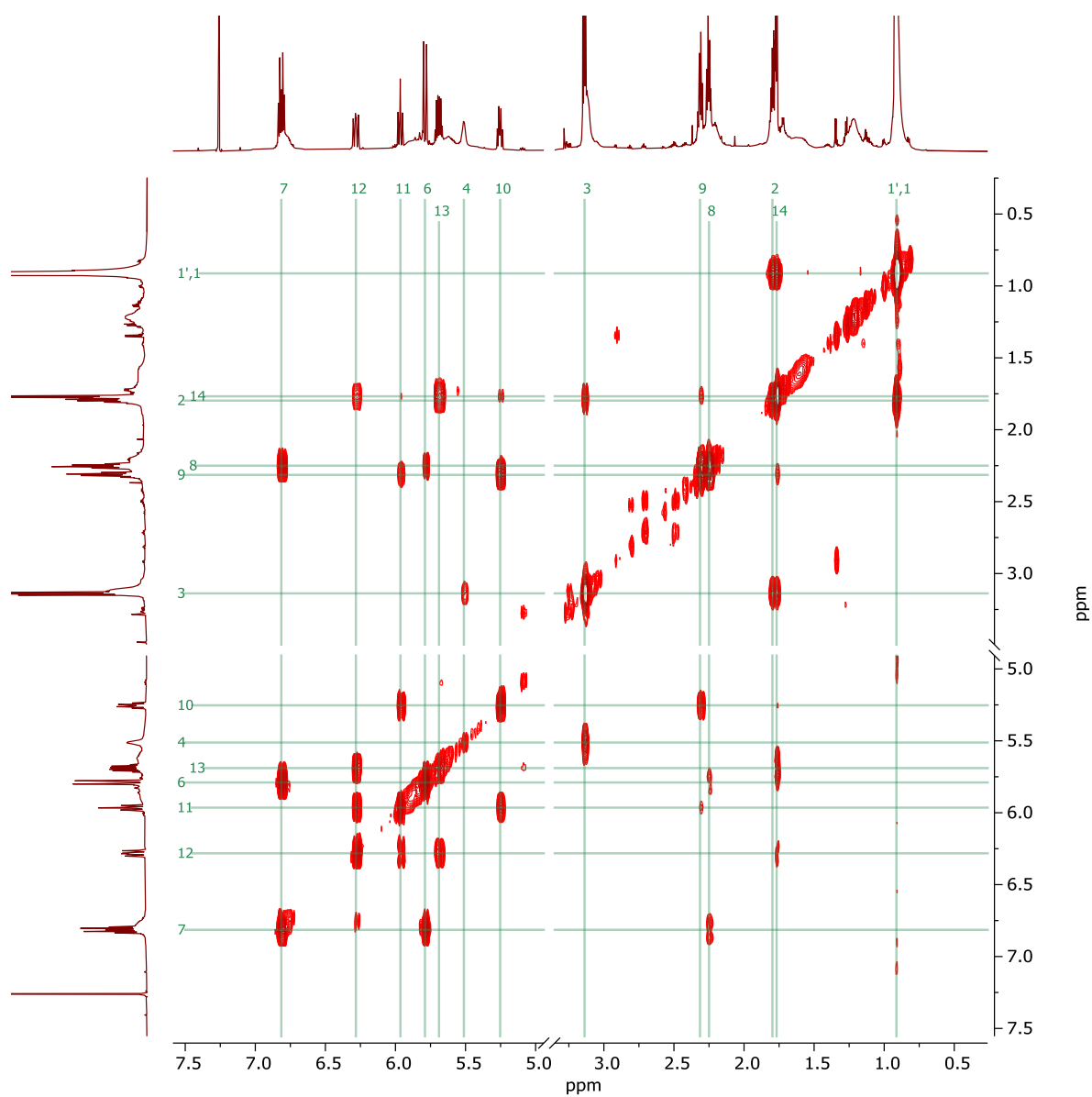


Figura 12B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

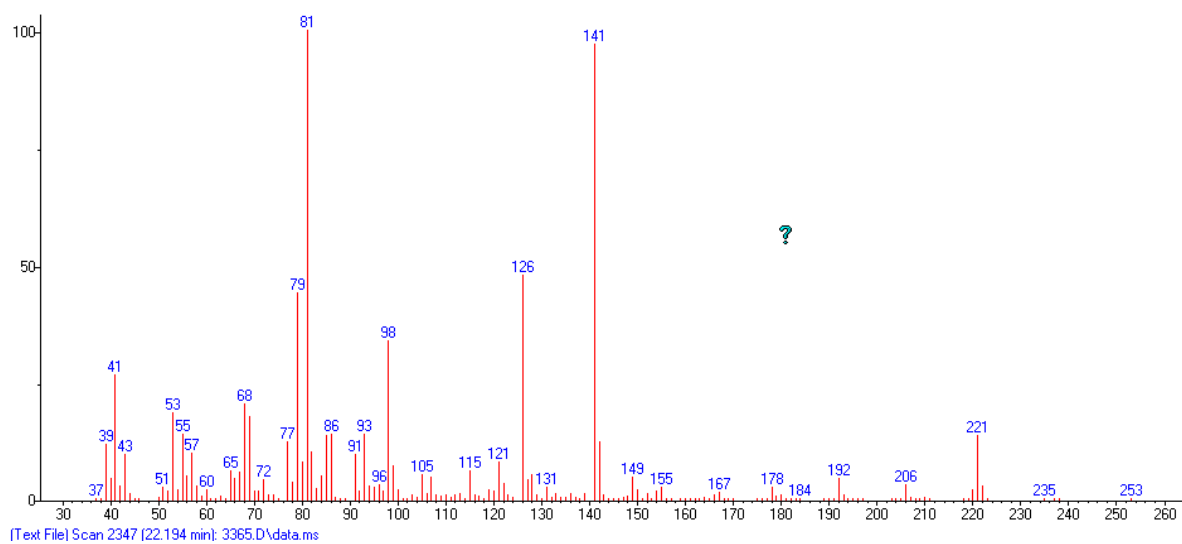


Figure 12C. Espectrometría de masas (EI, 70 eV) del compuesto 4 (m/z 33–600).

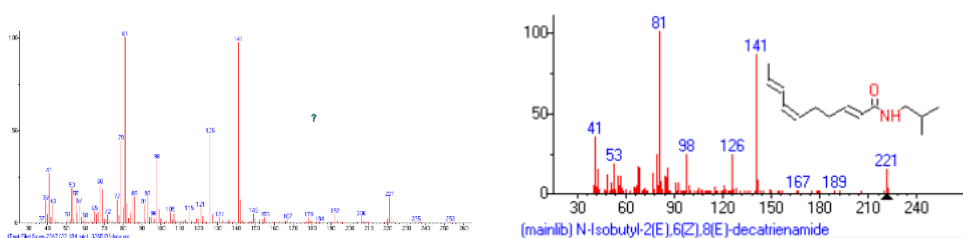
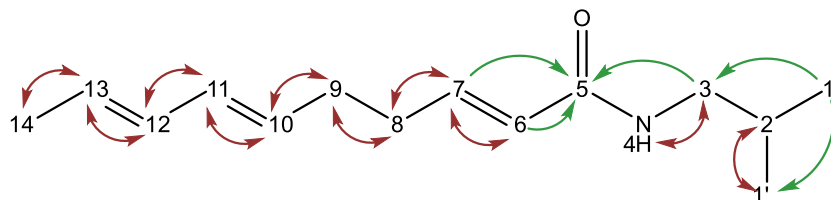


Figura 12D. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 4 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (B).

XI.13. Anexo 13. Elucidación estructural del compuesto 5 identificado como *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03 % v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.94 (d, 6.72, H1) 1.82 (m, H2) 3.17 (t, 6.48, H3) 5.44 (bs, H4), 5.80 (m, H6), 6.84 (m, H7) 2.29 (m, H8) 2.34 (m, H9) 5.26 (m, H10) 5.98 (m, H11) 6.29 (m, H12) 5.70 (m, H13) 1.76 (d, 6.98, H14). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 20.20, 28.60, 46.94, 165.89, 123.88, 143.38, 31.67, 27.74, 127.67, 129.71, 126.66, 130.75, 17.89.

Cuadro 13A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY (H $\rightarrow$ H)
1	0.94 (d, 6.72)	20.20	C-1, 2, 3	H-2
2	1.82 (m)	28.60	C-1, 3	H-1, 3
3	3.17 (t, 6.48)	46.94	C-1, 2, 5	H-2, 4
4	5.44 (bs)	-	-	H-3
5	-	165.89	-	-
6	5.80 (m)	123.88	C-5, 8	H-7
7	6.84 (m)	143.38	C-5, 8, 9	H-6, 8
8	2.29 (m)	31.67	C-6, 7, 9, 10	H-7, 9
9	2.34 (m)	27.74	C-7, 8, 10, 11	H-8, 10
10	5.26 (m)	127.67	-	H-9, 11
11	5.98 (m)	129.71	-	H-10, 12
12	6.29 (m)	126.66	-	H-11, 13
13	5.70 (m)	130.75	C-14	H-12, 14
14	1.76 (d, 6.98)	17.89	C-12, 13	H-13

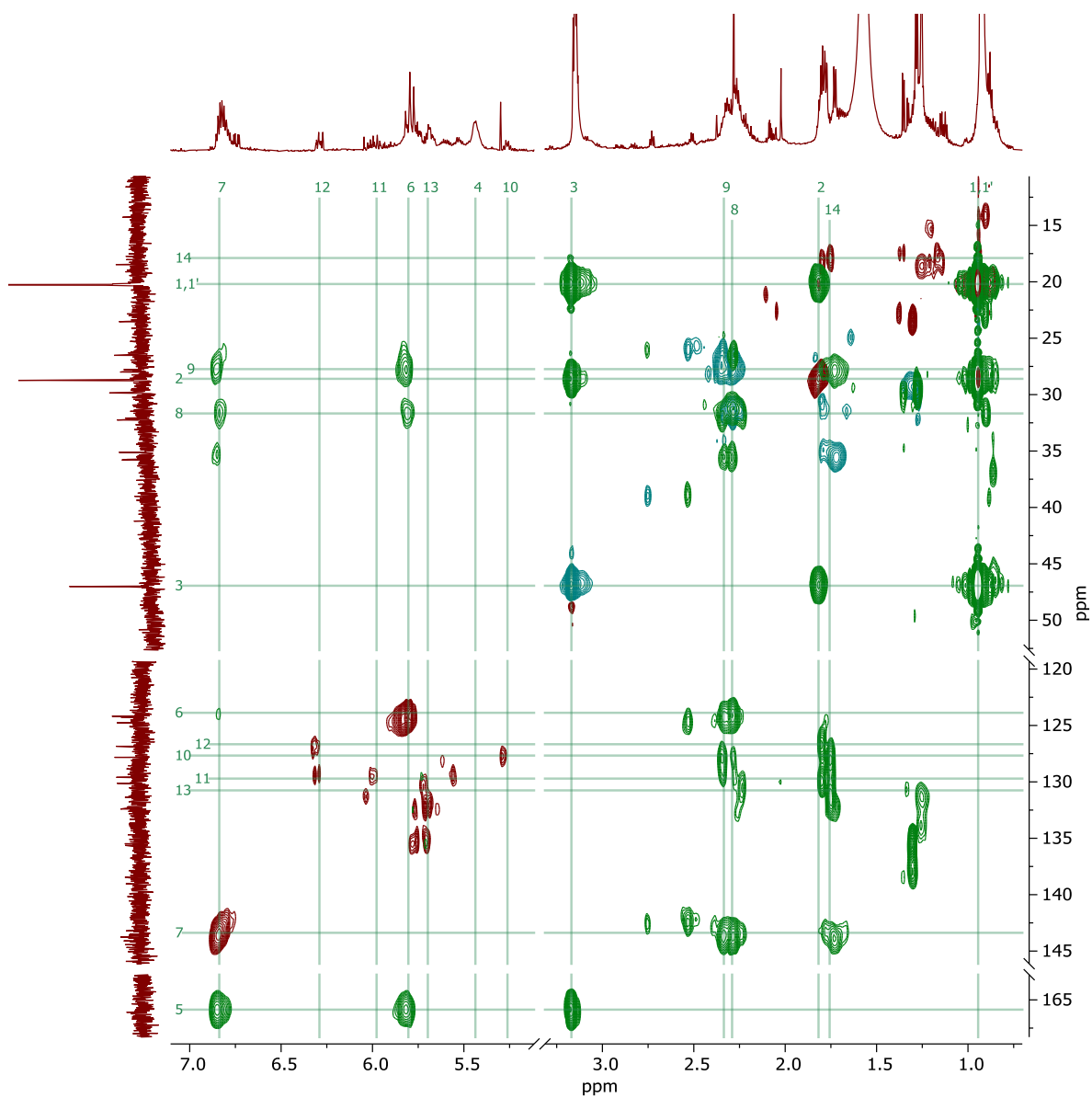


Figura 13A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

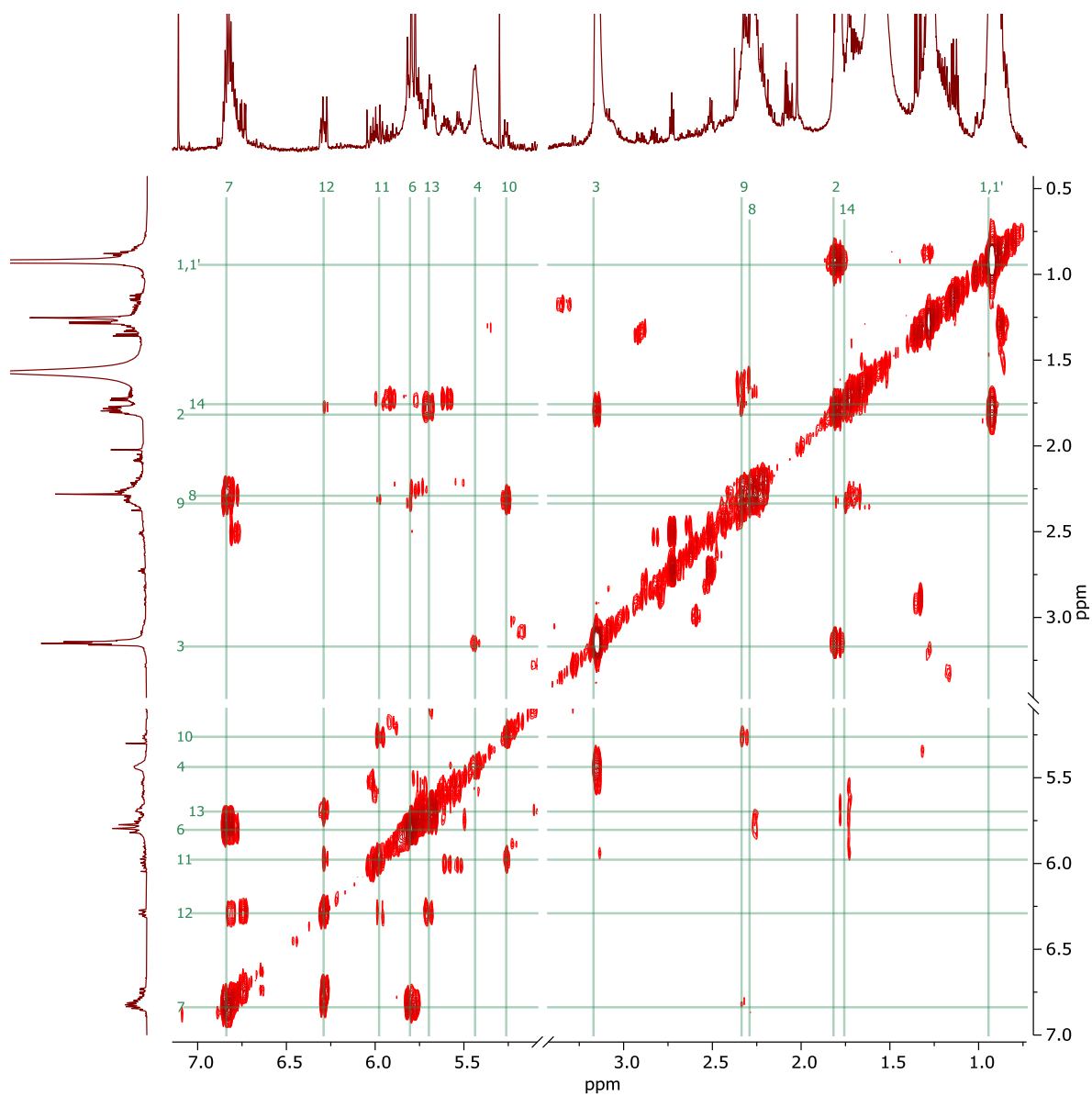


Figura 13B. Espectro de COSY (700 MHz, 300 K, CDCl_3).

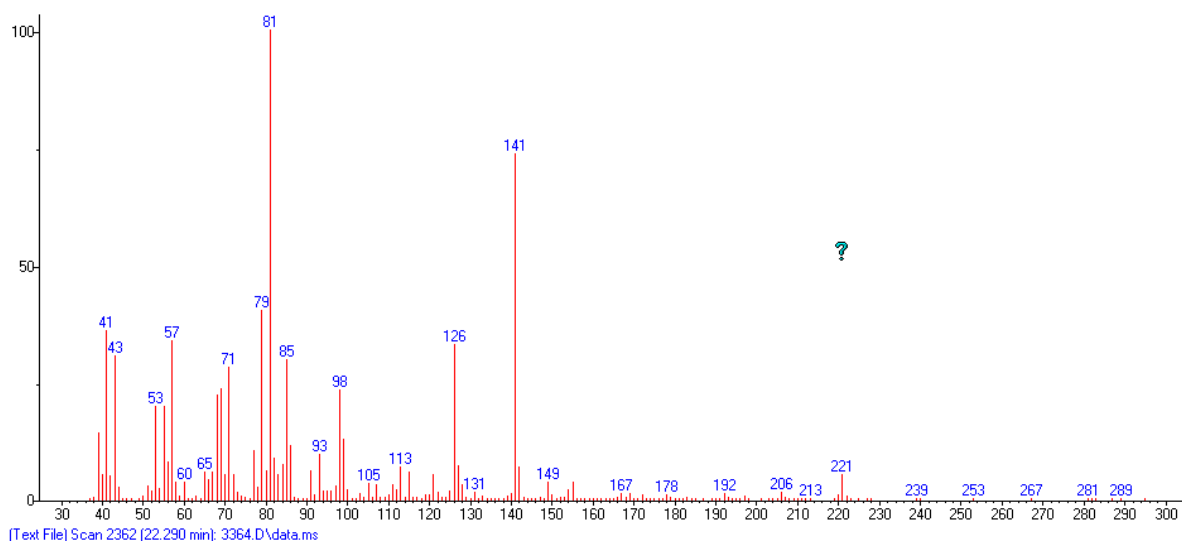


Figura 13C. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto 5 (m/z 33–600).

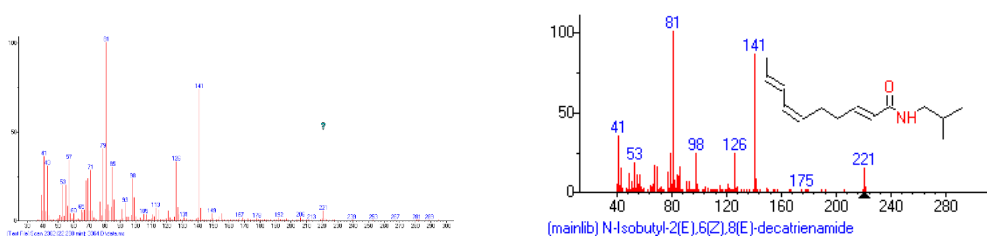
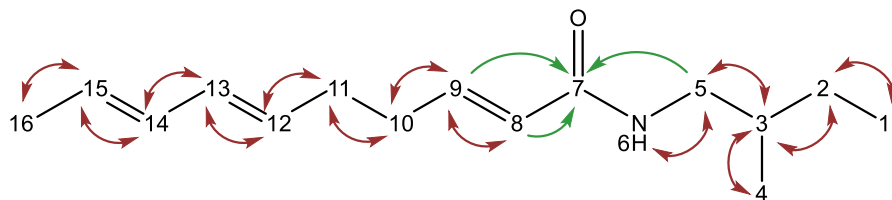


Figura 13D. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 5 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (B).

XI.14. Anexo 14. Elucidación estructural del compuesto 6 identificado como *N*-(2-Metilbutil)-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (homoespilantol)



RMN de ^1H (CDCl_3 con 0.03 % v/v TMS, 700 MHz): δ_{H} 0.89 (m, H1), 1.14, 1.41 (m, H2), 1.58 (m, H3), 0.89 (m, H4), 3.13, 3.25 (m, H5), 5.48 (m, H6), 5.79 (dt, 15.28, 1.60, H8), 6.81 (m, H9), 2.25 (m, H10), 2.32 (m, H11), 5.25 (dt, 10.96, 7.26, H12), 5.98 (t, 11.03, H13), 6.29 (ddp, 15.54, 10.90, 1.68, 1.65, H14), 5.69 (qd, 13.80, 6.71, H15), 1.77 (dd, 6.79, 1.64, H16). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz): δ_{C} 11.11, 27.37, 35.17, 17.02, 45.00, 166.20, 124.19, 143.21, 32.08, 26.51, 127.86, 129.49, 126.85, 130.27, 18.52.

Cuadro 14A. Datos espectroscópicos de δ_{H} , δ_{C} , HMBC y COSY (300 K, CDCl_3).

Asignación	δ_{H} /ppm (Multiplicidad, J/Hz)	δ_{C} /ppm	HMBC (H→C)	COSY (H→H)
1	0.89 (m)	11.11	C-2, 3	H-2
2, 2'	1.14, 1.41 (m)	27.37	C-1, 3, 4, 5	H-1, 3
3	1.58 (m)	35.17	C-1, 2, 4, 5	H-2, 4, 5
4	0.89 (m)	17.02	C-2, 3, 5	H-3
5, 5'	3.13, 3.25 (m)	45.00	C-2, 3, 4, 7	H-3-
6	5.48 (m)	-	-	-
7	-	166.20	-	-
8	5.79 (dt, 15.28, 1.60)	124.19	C-7, 10	H-9
9	6.81 (m)	143.21	C-7, 10, 11	H-8, 10
10	2.25 (m)	32.08	C-8, 9, 11, 12	H-9, 11
11	2.32 (m)	26.51	C-9, 10, 11, 12	H-10, 12
12	5.25 (dt, 10.96, 7.26)	127.86	C-10, 11, 14	H-11, 13
13	5.98 (t, 11.03)	129.49	C-11, 14, 15	H-12, 14
14	6.29 (ddp, 15.54, 10.90, 1.68, 1.65)	126.85	C-13, 16	H-13, 15
15	5.69 (qd, 13.80, 6.71)	130.27	C-13, 16	H-14, 16
16	1.77 (dd, 6.79, 1.64)	18.52	C-14, 15	H-15

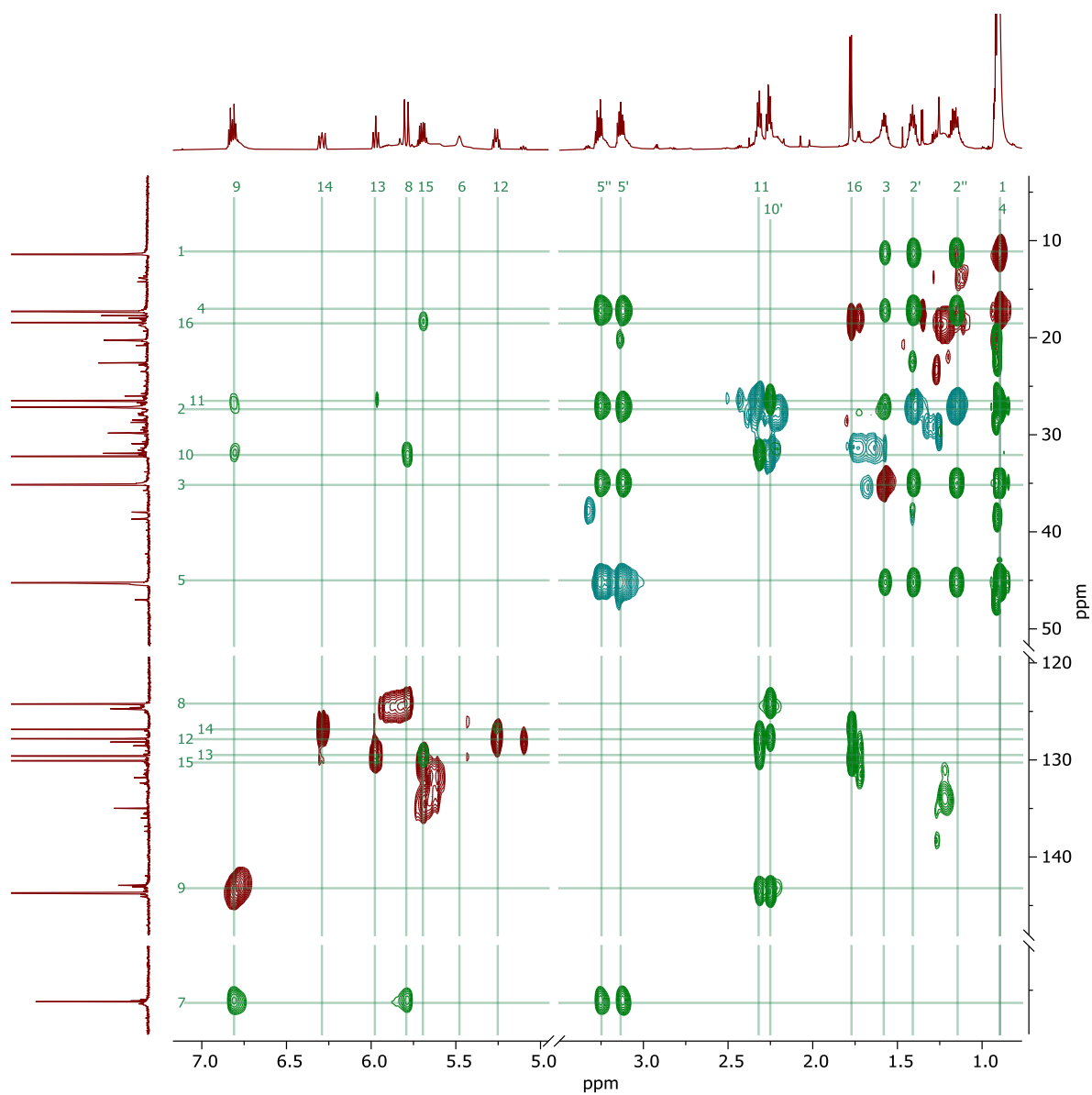


Figura 14A. Espectros de ed-HSQC (rojo-azul) y HMBC (verde) (700 MHz, 300 K, CDCl₃).

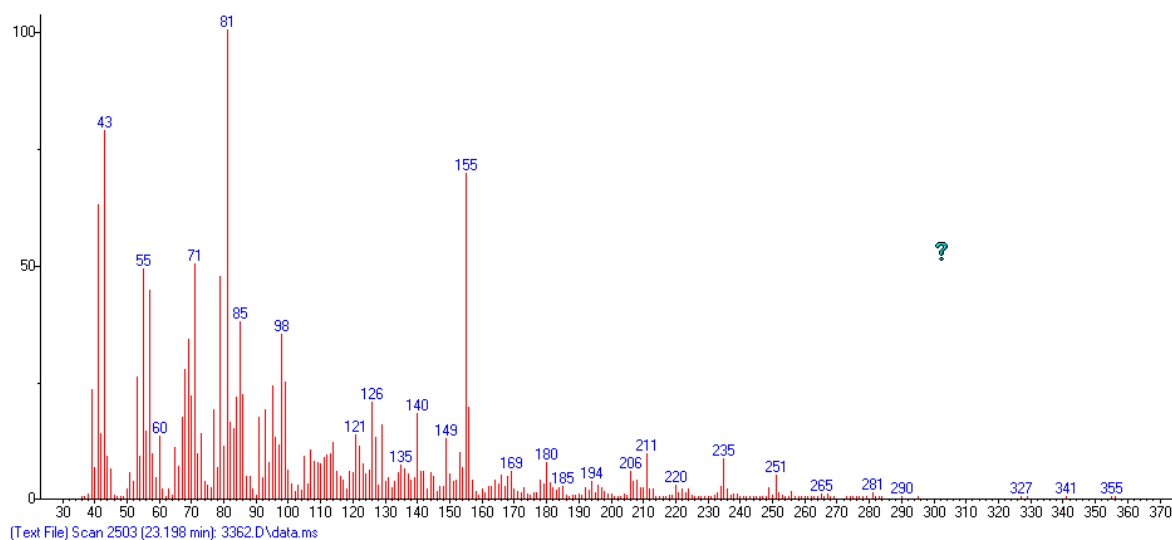


Figura 14C. Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto 6 (m/z 33–600).

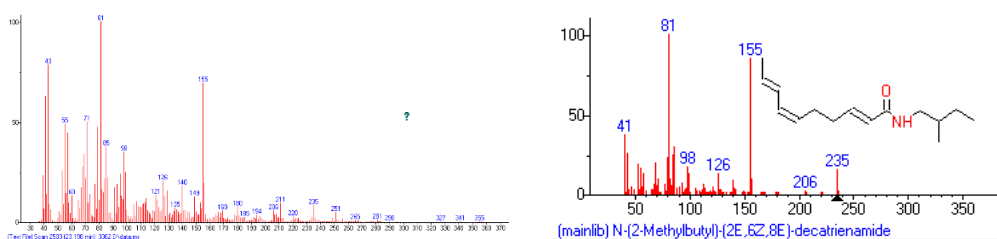


Figura 14D. Comparación del espectro de masas experimental del compuesto 6 (A) con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-(2-metilbutil)-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (B).

XI.15. Anexo 15. Elucidación estructural del compuesto 7

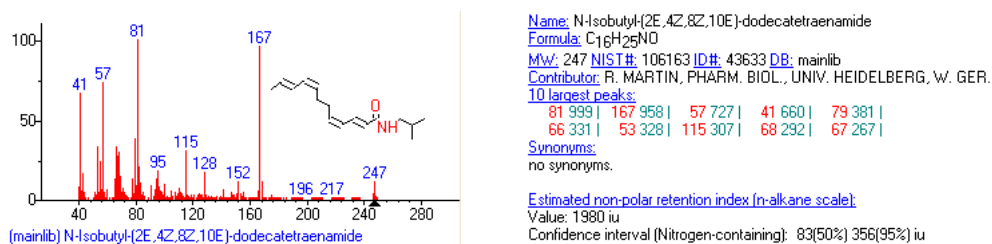


Figura 15A. Espectro de masas experimental del compuesto 7 con la referencia de la biblioteca NIST23 para *N*-isobutil-(2*E*,4*Z*,8*Z*,10*E*)-dodecatetramida.

XI.16. Anexo 16. Datos de CG-EM de las diferentes etapas fenológicas

Cuadro 16A. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-ME en la etapa vegetativa de *H. longipes*.

Nombre	Familia biosintética	Índice de coincidencia	Área (%)	Número CAS
Afinina	Alcamida	70	10.490	1000106-17-5
N-Isobutilundeca-2(E)-en-8,10-diinamida	Alcamida	50	3.1102	099615-81-3
Erucamida	Alcamida	99	1.3625	000112-84-5
Ácido crotónico	Ácidos grasos y sus derivados	96	0.4009	000541-47-9
Ácido n-cáprico	Ácidos grasos y sus derivados	95	0.0675	000334-48-5
Ácido palmítico	Ácidos grasos y sus derivados	99	0.9880	000057-10-3
Estearato de metilo	Ácidos grasos y sus derivados	96	1.1698	000112-61-8
Palmitato de octan-2-ilo	Ácidos grasos y sus derivados	90	1.0839	055194-81-5
Fitona	Isoprenoide	98	0.2164	000502-69-2
Benzaldehído	Fenilpropanoide	87	0.0228	000100-52-7
8-metoxicumarina	Fenilpropanoide	87	0.1921	002445-81-0
β-sitosterol	Fitoesterol	95	0.0102	000083-46-5
(+)-Sesamina	Lignano	99	2.5974	000607-80-7
Fargesina	Lignano	99	1.3575	031008-19-2
n-eicosano	Lípidos y sus derivados	90	0.0006	000112-95-8
Hexadecano	Lípidos y sus derivados	91	1.2417	000544-76-3
n-pentadecano	Lípidos y sus derivados	95	0.3265	000629-62-9
Tricosano	Lípidos y sus derivados	94	1.0306	000638-67-5
2-metilpentadecano	Lípidos y sus derivados	91	3.3776	001560-93-6
Octadecano	Lípidos y sus derivados	93	1.0801	000593-45-3
1-dococeno	Lípidos y sus derivados	95	3.0186	001599-67-3
Hexacosano	Lípidos y sus derivados	94	1.7077	000630-01-3
Nonadecano	Lípidos y sus derivados	91	1.0961	000629-92-5
Octacosano	Lípidos y sus derivados	99	3.8291	000630-02-4
Docosano	Lípidos y sus derivados	94	1.5160	000629-97-0
Heptacosano	Lípidos y sus derivados	96	4.5665	000593-49-7
n-pentacosano	Lípidos y sus derivados	93	2.5159	000629-99-2
2-metilpentacosano	Lípidos y sus derivados	93	2.4653	000629-87-8
Tetracosano	Lípidos y sus derivados	98	3.447	000646-31-1
Hentriacontano	Lípidos y sus derivados	90	1.1578	000630-04-6
2-metilheptadecano	Lípidos y sus derivados	94	0.8796	001560-89-0
10-metildotriacontano	Lípidos y sus derivados	90	1.0703	058349-83-0
Heneicosano	Lípidos y sus derivados	97	1.4611	000629-94-7
Triacotano	Lípidos y sus derivados	89	0.5959	000638-68-6
Escualeno	Terpeno	83	1.2354	000111-02-4
lupenona	Terpeno	99	0.1912	001617-70-5

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 16B. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-EM en la etapa de floración de *H. longipes*.

Nombre	Familia biosintética	Índice de coincidencia	Área (%)	Número CAS
Afinina	Alcamida	81	18.2281	1000106-17-5
Homoespilantol	Alcamida	93	2.8627	1010106-16-0
Hexadecanamida	Alcamida	89	1.3850	000629-54-9
Benzaldehído	Fenilpropanoide	87	0.077	000100-52-7
Estigmastan-3,5,22-trieno	Fitoesterol	89	0.1306	100214-18-1
Estigmasta-3,5-dieno	Fitoesterol	98	0.2720	004970-37-0
Estigmasterol	Fitoesterol	86	0.0827	000083-48-7
(+)-Sesamina	Lignano	99	1.4199	000607-80-7
Farnesano	Lípidos y sus derivados	86	0.2442	014905-56-7
Pentadecano	Lípidos y sus derivados	91	1.1906	000629-62-9

Heptadecano	Lípidos y sus derivados	93	0.2474	000629-78-7
Pristano	Lípidos y sus derivados	90	0.1471	000638-36-8
Octadecano	Lípidos y sus derivados	95	1.0056	000593-45-3
Nonadecano	Lípidos y sus derivados	91	1.6541	000629-92-5
Heneicosano	Lípidos y sus derivados	94	4.1944	000629-94-7
Docosano	Lípidos y sus derivados	91	4.9778	000629-97-0
Heptacosano	Lípidos y sus derivados	97	2.5118	000593-49-7
2-metilhentriacontano	Lípidos y sus derivados	95	4.9779	000629-97-0
Hexacosano	Lípidos y sus derivados	99	2.5119	000593-49-7
<i>n</i> -pentacosano	Lípidos y sus derivados	96	0.9993	001720-12-3
Octacosano	Lípidos y sus derivados	99	1.4586	000630-01-3
Hexadecano	Lípidos y sus derivados	94	1.0210	000629-99-2
<i>n</i> -eicosano	Lípidos y sus derivados	94	1.0329	000630-02-4
Tetracosano	Lípidos y sus derivados	98	0.1598	000112-95-8
Lupenona	Terpeno	74	0.0356	001617-70-5

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 16C. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-EM en la etapa de fructificación de *H. longipes*.

Nombre	Familia biosintética	Índice de coincidencia	Área (%)	Número CAS
Afinina	Alcamida	76	19.4572	1000106-17-5
Homoespilantol	Alcamida	81	3.2131	1010106-16-0
<i>N</i> -isobutirpalmitamida	Alcamida	90	8.7655	054794-72-8
Benzaldehído	Fenilpropanoide	96	0.077	000100-52-7
Estigmasta-3,5-dieno	Fitoesterol	99	0.5658	004970-37-0
Estigmasterol	Fitoesterol	99	0.5176	000083-48-7
γ -sitosterol	Fitoesterol	93	1.0354	000083-47-6
(+)-sesamina	Lignano	97	1.9082	000607-80-7
Dodecano	Lípidos y sus derivados	90	0.8925	000112-40-3
Pentadecano	Lípidos y sus derivados	87	0.2930	000629-62-9
Hexadecano	Lípidos y sus derivados	93	0.1043	000544-76-3
Heptadecano	Lípidos y sus derivados	94	0.2277	000629-78-7
Heptacosano	Lípidos y sus derivados	90	1.3969	000593-49-7
Octadecano	Lípidos y sus derivados	93	0.6537	000593-45-3
<i>n</i> -eicosano	Lípidos y sus derivados	94	4.2717	000112-95-8
Heneicosano	Lípidos y sus derivados	97	2.1913	000629-94-7
Triacotano	Lípidos y sus derivados	96	1.0606	000638-68-6
Tetracosano	Lípidos y sus derivados	83	0.0966	000646-31-1
Erucamida	Alcamida	86	0.3619	000112-84-5
Docosano	Lípidos y sus derivados	90	0.1618	000629-97-0
<i>n</i> -pentacosano	Lípidos y sus derivados	93	0.0148	000629-99-2
Hentriacontano	Lípidos y sus derivados	81	0.0887	000630-04-6
Octacosano	Lípidos y sus derivados	89	0.0796	000630-02-4
3-etil-2,6,10-trimetilundecano	Lípidos y sus derivados	80	0.063	1000432-25-9
Escualeno	Terpeno	86	0.1037	007683-64-9
α -Tocospiro B	Terpeno	91	0.02818	601490-41-9
Vitamina E	Terpeno	89	0.0009	010191-41-0
Lupenona	Terpeno	99	0.2249	001617-70-5

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 16D. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-EM en la etapa de defoliación de *H. longipes*.

Name	Familia biosintética	Índice de coincidencia	Área (%)	Número CAS
Afinina	Alcamida	87	34.1552	1000106-17-5
Homoespilantol	Alcamida	90	6.0113	1010106-16-0

N-isobutylpalmitamida	Alcamida	49	1.1899	054794-72-8
Palmitato de cetilo	Ácidos grasos y sus derivados	86	0.0717	000540-10-3
(+)-sesamina	Lignano	91	0.3214	000133-03-9
1-dodeceno	Lípidos y sus derivados	96	0.1627	000112-41-4
Pentadecano	Lípidos y sus derivados	87	0.8052	000629-62-9
Hexadecano	Lípidos y sus derivados	93	0.3176	000544-76-3
2-metil-8-propildodecano	Lípidos y sus derivados	86	0.2868	055045-07-3
2-metilheptadecano	Lípidos y sus derivados	91	0.0629	001560-89-0
Heptadecano	Lípidos y sus derivados	97	0.4994	000629-78-7
Pristano	Lípidos y sus derivados	91	0.2084	001921-70-6
Docosano	Lípidos y sus derivados	87	1.8738	000629-97-0
4-metoxi-7-metilindan-1-ona	Lípidos y sus derivados	89	0.1858	103988-25-6
Heptacosano	Lípidos y sus derivados	90	0.6693	000593-49-7
n-eicosano	Lípidos y sus derivados	91	0.2277	000112-95-8
Heneicosano	Lípidos y sus derivados	80	0.3967	000629-94-7
2-metilhexacosano	Lípidos y sus derivados	83	0.3413	001561-02-0
Fitano	Lípidos y sus derivados	93	1.0618	000638-36-8
miristato de isopropilo	Lípidos y sus derivados	96	0.6484	000110-27-0
Triacotano	Lípidos y sus derivados	86	1.1699	000638-68-6
trans-2,3-epoxidecano	Lípidos y sus derivados	83	1.4186	054125-39-2
11-tricoseno	Lípidos y sus derivados	93	4.2798	052078-56-5
Octadecano	Lípidos y sus derivados	95	1.8486	000593-45-3
Nonacos-1-eno	Lípidos y sus derivados	95	6.1775	018835-35-3
Docosano	Lípidos y sus derivados	94	0.5541	000629-97-0
11-metilpentacosano	Lípidos y sus derivados	83	0.6545	015689-71-1
n-pentacosano	Lípidos y sus derivados	98	1.2066	000629-99-2
Hexacosano	Lípidos y sus derivados	99	1.2054	000630-01-3
Heptacosano	Lípidos y sus derivados	80	0.1447	000593-49-7
Tetracosano	Lípidos y sus derivados	97	0.9066	000646-31-1
Oleamida	Alcamidas	89	0.4028	000301-02-0
3-metilhexadecano	Lípidos y sus derivados	91	0.1054	006418-43-5
2-metilhexadecano	Lípidos y sus derivados	90	0.1022	001560-92-5
3-metilheptadecano	Lípidos y sus derivados	93	0.0740	006418-44-6
Heptatriacontano	Lípidos y sus derivados	91	0.0331	007194-84-5
9-octilheptadecano	Lípidos y sus derivados	81	0.1007	007225-64-1
Benzaldehído	Fenilpropanoide	96	0.077	000100-52-7
estigmasta-3,5-dieno	Fitoesterol	91	0.3921	004970-37-0
Estigmasterol	Fitoesterol	98	0.7819	000083-48-7
γ-Sitosterol	Fitoesterol	95	0.2581	000083-47-6
acetato de cicloartenol	Terpeno	80	0.0401	001259-10-5
D-limoneno	Terpeno	93	0.2338	005989-27-5
Escualeno	Terpeno	97	0.0582	007683-64-9
α-tocospiro A	Terpeno	95	0.2811	601490-40-8
Vitamina E	Terpeno	89	0.0604	000059-02-9
Lupenona	Terpeno	85	0.0907	001617-70-5

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

XI.7. Anexo 17. Datos de CG-EM de los diferentes tratamientos

Cuadro 17A. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-EM en ejemplares de *Heliopsis longipes* elicitados durante 3 meses.

Tratamiento	Alcamidas	Ácidos grasos y sus derivados	Fenil-propanoides	Lípidos y sus derivados	Otros	Terpenos	Total
Per1	64.4519	7.8894	0.8294	3.3373	0	4.5638	81.0720
Per2	61.3686	1.6849	1.4223	2.2368	0.0343	8.6443	75.3914
Per3	83.3339	0.14978	1.9624	0.0873	0.1256	5.3778	91.0370
Ás1	59.2915	13.3641	0.7761	6.4357	0.0403	5.0037	84.9117
Ás2	40.3036	1.8147	0.0693	1.0826	0	2.8059	46.0764
Ás3	40.8658	16.7162	2.1162	6.9298	0	10.7325	77.3607
Ás + Per1	55.2424	5.3388	0.4756	7.3583	0.0093	5.9326	74.3572
Ás + Per2	44.5737	9.6091	4.5324	7.7164	0.0951	18.0250	84.5520
Ás + Per3	52.3341	9.3188	2.3880	2.0245	0	28.9295	94.9951
MeJA1	71.1476	4.6174	0.7190	3.0219	0	3.8042	83.3102
MeJA2	56.6563	7.6147	0.8456	6.0261	0.0499	6.2123	77.4052
MeJA3	69.4043	8.4678	0.1243	4.9420	0.0255	7.1059	90.0700
EHI1	72.6594	0	1.6203	7.7040	0.0026	5.4594	87.4459
EHI2	79.9402	0.0970	0.1715	1.2808	0.0234	4.8062	86.3195
EHI3	69.3411	8.2062	3.1056	4.0213	0.6102	14.3043	99.5890
Control1	79.9810	0.4365	0.1106	3.5728	0.0179	2.2335	86.3526
Control2	69.5380	4.8993	0.8032	3.4913	0.1986	8.6997	87.6304
Control3	47.8823	2.8859	3.3187	10.1070	0.3889	18.4933	83.0764

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17B. Perfil químico de compuestos no polares identificados mediante CG-EM en ejemplares de *Heliopsis longipes* elicitados durante 6 meses.

Tratamiento	Alcamidas	Ácidos grasos y sus derivados	Fenil-propanoides	Lípidos y sus derivados	Otros	Terpenos	Total
Per1	80.0188	4.0623	0.4564	1.3291	0.1511	5.1112	91.1292
Per2	44.8638	15.0824	2.0313	6.8465	1.3733	13.3873	83.5849
Per3	80.9760	4.9409	0.4218	1.1616	0.1683	5.4971	93.1659
Ás1	24.7961	0	5.9291	0	0	26.8073	57.5325
Ás2	41.5553	0	4.0596	0	0	26.5115	72.1265
Ás3	37.2394	0	1.5349	0	0	38.2392	77.0136
Ás + Per1	64.9852	1.7394	3.1267	0.1877	0.2099	6.7158	76.9650
Ás + Per2	69.2714	1.2222	1.9046	0.6261	0	1.8148	74.8393
Ás + Per3	71.3017	3.9923	6.4331	0.8699	0.3612	4.5845	87.5430
MeJA1	52.3685	0	1.9812	0.5921	0	24.9404	79.8823
MeJA2	89.9295	2.5561	0.1499	0.8444	0.2424	6.9565	100.6791
MeJA3	60.2963	0	4.4831	0.4216	0.1249	30.9763	96.3023
EHI1	21.9844	7.5178	4.8522	4.0828	0.0232	33.2891	71.7499
EHI2	56.2423	0	0.6423	2.4388	0	24.2003	83.5240
EHI3	40.8274	0	2.0186	0.9833	0	23.2135	67.0430
Control1	86.8316	5.0441	0.5123	0.2428	0.0937	2.8556	95.5804
Control2	76.6432	7.5146	0.7697	2.1479	0.0406	8.0669	95.1832
Control3	71.2803	5.7675	2.8108	2.6162	0.2887	4.6614	87.4252

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17C. Perfil de ácidos grasos identificados mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 meses.

Tratamiento	Poli-insaturados	Mono-insaturado	Saturado	FAME	Ésteres	Triglicéridos de cadena corta	Total
Per1	0.0000	0.0000	0.0931	0.0000	0.0000	7.7962	7.8894
Per2	0.0000	1.6127	0.0721	0.0000	0.0000	0.0000	1.6849
Per3	0.0000	0.0000	0.1497	0.0000	0.0000	0.0000	0.1497
Ás1	0.0000	0.0000	1.3580	0.0000	0.0000	12.0061	13.364
Ás2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.8147	1.8147
Ás3	0.0000	0.0000	13.9716	0.0000	2.7446	0.0000	16.716
Ás + Per1	0.0000	0.0000	0.0191	0.0000	0.0000	5.3196	5.3388
Ás + Per2	4.8674	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	4.7416	9.6091
Ás + Per3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9312	0.9312
MeJA1	0.0000	0.0000	0.0235	0.0000	0.0000	4.5938	4.6174
MeJA2	0.7485	0.0000	0.0000	0.0000	0.5235	6.3022	7.6147
MeJA3	0.0000	2.6156	3.3231	0.0000	0.0000	2.5290	8.4678
EHI1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
EHI2	0.0000	0.0000	0.0679	0.0000	0.0000	0.02911	0.9770
EHI3	7.9515	0.0000	0.2547	0.0000	0.0000	0.0000	8.2062
Control1	0.3240	0.0000	0.0000	0.1124	0.0000	0.0000	0.4365
Control2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.5169	2.5169
Control3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.8859	2.8859

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17D. Perfil de ácidos grasos identificados mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 6 meses.

Tratamiento	Poli-insaturados	Mono-insaturado	Saturado	FAME	Ésteres	Triglicéridos de cadena corta	Total
Per1	1.3579	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.7045	4.0623
Per2	4.3565	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	10.7259	15.082
Per3	2.4013	0.0000	0.2391	0.0000	0.0000	2.3005	4.9409
Ás1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Ás2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Ás3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Ás + Per1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.1703	0.5692	1.7395
Ás + Per2	2.8307	0.0000	5.9718	0.0000	1.9811	4.2696	15.053
Ás + Per3	0.9968	0.0000	0.9046	0.0000	0.0000	3.0877	4.9891
MeJA1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
MeJA2	2.3506	0.1966	0.0000	0.0089	0.0000	0.0000	2.5562
MeJA3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
EHI1	7.5179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	7.5179
EHI2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
EHI3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Control1	1.1000	0.0000	1.9282	0.0000	0.0000	2.0160	5.0442
Control2	0.8942	0.0000	1.1179	0.0000	0.0000	4.4346	7.5147
Control3	1.1112	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	4.6563	5.7675

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17E. Perfil de alcanidas identificadas mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 meses.

Tratamiento	Afinina	Homoespilantol	N-Isobutylundeca-2(E)- en-8,10-diinamida	Erucamida	(2E,4E)-N-Isobutyl octa- 2,4-dienamida	N-Isobutylhexa- decanamida	Oleamida	N-Butilinoeamida	N-Isobutil-(6Z,8E)- decadienamida	N-Isobutil- (2E,4E,8Z,10Z)- dodecatetraenamida	Total
Per1	49.9339	11.9611	2.0290	0.5279	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	64.452
Per2	47.0530	13.0147	1.0353	0.2656	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	61.368
Per3	66.7618	13.6335	2.2216	0.1743	0.1379	0.0000	0.0000	0.0000	0.4048	0.0000	83.333
As1	44.9615	12.5802	1.1085	0.5514	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	59.201
As2	25.7783	12.6994	1.8260	0.0465	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	40.303
As3	30.7786	3.7632	4.2924	0.8481	1.1835	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	40.865
As + Per1	46.0439	7.6462	0.9735	0.5788	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	55.242
As + Per2	33.0581	8.3838	0.0000	1.8700	0.0000	1.2619	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	44.573
As + Per3	45.2760	0.0000	0.2934	0.4944	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0179	0.0000	52.334
MeJA1	58.8153	12.2840	0.0000	0.0483	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	71.147
MeJA2	45.1790	9.5158	1.0421	0.6507	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2688	56.656
MeJA3	56.1938	11.3525	1.7411	0.1169	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	69.404
EHI1	61.4814	9.3197	1.6638	0.1945	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	72.659
EHI2	63.5028	14.4917	1.4713	0.3459	0.1285	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	79.940
EHI3	57.8375	11.5036	6.2236	0.7105	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	69.341
Control1	67.3905	10.4681	1.9591	0.1634	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	79.981
Control2	53.1507	13.4978	2.5266	0.1915	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1714	0.0000	69.538
Control3	40.5959	5.3949	1.3844	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	47.882

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17F. Perfil de alcanidas identificadas mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 6 meses.

Tratamiento	Afinina	Homoespilantol	N-Isobutylundeca-2(E)-en-8,10-dinamida	Erucamida	(2E,4E)-N-Isobutyllocta-2,4-dienamida	N-Isobutylhexa-decanamida	Oleamida	N-Butillinoeamida	N-Isobutyl-(6Z,8E)-decanamida	N-Isobutyl-(2E,4E,8Z,10Z)-dodecatetraenamida	Total
Per1	66.3062	10.8372	2.6689	0.2065	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	64.452
Per2	9.5083	27.6522	7.0458	0.6575	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	61.368
Per3	65.4452	12.9125	2.0915	0.2475	0.2428	0.0000	0.0000	0.0364	0.0000	0.0000	83.333
As1	24.2240	0.5721	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	24.796
As2	40.9284	0.6269	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	41.555
As3	35.9235	1.3160	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	37.239
As + Per1	50.0521	11.0528	3.4104	0.1524	0.3176	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	64.985
As + Per2	44.8631	16.8613	7.0382	0.5088	0.0000	0.0000	0.0000	0.1083	4.7548	0.0000	69.271
As + Per3	55.4726	12.3547	2.8405	0.3669	0.2671	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	71.301
MeJA1	47.4169	1.5669	1.4001	0.0000	0.0000	0.0000	0.1181	0.0596	0.0000	1.8069	52.368
MeJA2	83.2601	0.9791	3.3079	0.0000	0.1381	0.2081	0.0129	0.0144	0.0000	0.0000	89.920
MeJA3	45.7776	2.8856	6.8792	0.0000	0.3730	1.4236	0.1120	0.0000	0.0000	2.7762	60.296
EHI1	7.5762	11.9049	0.0000	1.6401	0.0000	0.8633	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	21.984
EHI2	40.1288	4.2374	2.6351	0.6023	0.0000	0.0000	0.0515	0.0000	5.8969	2.6904	56.242
EHI3	35.8977	2.9234	0.0000	2.0064	0.0000	0.0000	0.0000	0.0617	0.0000	0.0000	40.827
Control1	74.1775	11.9176	0.0000	0.3365	0.3383	0.0000	0.0000	0.0617	0.0000	0.0000	86.831
Control2	72.0170	3.9688	0.0000	0.6575	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	76.643
Control3	56.3696	11.2409	2.6964	0.6195	0.3540	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	71.280

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17G. Perfil de terpenos identificados mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 3 meses.

Tratamiento	Tri-terpeno	Di-terpeno	Sesqui-terpeno	Mono-terpeno	Toco-ferol	Fito-esterol	Lacto-na	Isprop-enoid-e	Total
Per1	1.4067	0.0000	0.5474	0.0956	0.2198	2.2505	0.0000	0.0000	5.1113
Per2	4.7431	0.0000	0.5270	0.1364	0.3676	2.8703	0.0000	0.0000	13.3874
Per3	0.3355	0.0000	0.9850	0.1193	2.1433	2.7284	0.0000	0.0414	5.4971
As1	0.3422	0.0000	0.4769	0.0587	0.2890	3.5834	0.2051	0.0000	4.9553
As2	0.1695	0.0000	0.0000	0.0000	0.0198	0.6092	0.0000	0.0000	2.8060
As3	2.4696	0.0000	2.6375	0.0502	0.3490	5.0266	0.6812	0.0000	11.2142
As + Per1	2.6888	0.0000	0.5259	0.0528	0.7891	2.0890	0.0000	0.0000	6.1457
As + Per2	2.8716	0.0000	4.4302	0.8248	1.9718	5.4356	0.4328	0.0382	18.0251
As + Per3	25.5916	0.0000	0.0000	0.9940	0.0000	2.3440	0.0000	0.0000	28.9296
MeJA1	2.0462	0.0000	0.0000	0.1250	0.2562	1.5750	0.0000	0.0000	4.1274
MeJA2	4.2515	0.0	0.1212	0.1102	0.1260	1.6035	0.0000	0.0000	6.2124
MeJA3	0.0000	0.0000	0.3480	0.0000	0.3993	1.6400	0.2631	0.6729	7.1059
EHI1	2.0746	0.0000	0.5598	0.0664	0.1921	2.5642	0.0023	0.0000	5.4594
EHI2	0.4909	0.0000	0.4688	0.1152	0.1400	1.9370	0.1565	0.0000	4.8062

EHI3	2.5235	0.0000	5.9918	0.1630	1.1683	14.4578	0.0000	0.0000	24.3044
Control1	0.1205	0.0000	0.0596	0.0000	0.1183	1.8476	0.0000	0.0000	2.2335
Control2	3.4097	0.0000	0.4785	0.1092	0.0000	4.0695	0.0000	0.0000	8.0669
Control3	16.4111	0.0000	0.4631	0.1811	1.2021	10.9581	3.6486	0.0000	34.8294

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.

Cuadro 17H. Perfil de terpenos identificados mediante CG-EM en ejemplares de *H. longipes* elicitados durante 6 meses.

Tratamiento	Tri-terpeno	Di-terpeno	Sesqui-terpeno	Mono-terpeno	Toco-ferol	Fito-esterol	Lacto-na	Isprop-enoid-e	Total
Per1	0.9899	0.0000	0.3278	0.0141	0.1848	3.2004	0.0000	0.0000	4.7170
Per2	2.5652	0.0000	0.9841	0.0000	0.7004	0.7004	1.6471	0.0000	17.2534
Per3	0.6878	0.0788	0.0000	0.0812	0.1963	4.1931	0.7277	0.0000	5.9967
Ás1	0.2638	0.0000	0.0000	7.5852	0.0000	18.9583	0.0000	0.0000	26.8073
Ás2	0.2890	0.0000	0.0000	12.0036	0.0000	14.2190	0.0000	0.0000	26.5116
Ás3	0.0123	0.0000	0.0000	5.3928	0.0000	10.2349	0.0000	0.0000	15.6401
Ás + Per1	3.6616	0.0000	0.0000	0.0000	0.1472	1.2966	1.6104	0.0000	6.7159
Ás + Per2	6.5323	0.0000	0.6377	0.0876	0.4564	6.3673	0.9145	0.0000	18.1483
Ás + Per3	0.0000	0.2044	0.2142	0.0000	0.2496	3.7483	0.1680	0.0000	4.5846
MeJA1	4.7952	0.0000	4.8584	1.8152	1.2130	9.4437	2.7787	0.0000	24.9404
MeJA2	0.4604	0.7547	1.3614	0.8153	0.3520	2.4200	0.5395	0.0000	6.9565
MeJA3	7.5608	0.0000	3.7167	2.1808	1.0126	11.8233	2.8683	0.1065	30.9763
EHI1	3.7742	0.0000	8.8225	0.4048	2.4171	17.2823	0.0000	0.0000	33.2892
EHI2	17.7398	0.0000	0.4034	0.7155	0.6189	1.8377	2.3766	0.0000	24.2004
EHI3	3.3590	0.0000	0.0000	3.1460	0.0000	6.7085	0.0000	0.0000	14.2136
Control1	0.9261	0.0000	0.1734	0.0000	0.2151	1.3692	0.0000	0.0000	2.8557
Control2	1.4179	0.0000	0.0000	0.0378	0.3214	3.2606	0.3269	0.0000	6.3849
Control3	2.1814	0.4052	0.0637	0.0136	0.0796	1.7118	0.0000	0.0000	4.6615

Nota: La identificación se basa en la comparación de los espectros de masas y los números CAS con la biblioteca NIST® 2023.