

00570

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACION DEL CONTENIDO ALCALOIDEO DE LA
Packera candidissima (Greene) Weber & Love MEDIANTE
CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS"

TESIS CON
FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)
P R E S E N T A
MAMADOU MOUSTAPHA L BAH

Diallo

MEXICO, D. F.,

1992.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La *Packera candidissima* (Greene) Weber & Löve (*Senecio candidissimus*), conocida popularmente como "té milagro" o "lechuguilla de la sierra", es una especie medicinal mexicana ampliamente utilizada por los Tarahumaras y por la población no rural del Estado de Chihuahua para el tratamiento de diversos malestares. Entre sus bondades medicinales destacan sus propiedades antisépticas.

La investigación de su contenido metabólico mediante el empleo de los métodos convencionales de extracción, aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios condujo a la obtención de dos sesquiterpenos del tipo furanoeremofilanos, los cuales fueron caracterizados como la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27), mediante el empleo de técnicas espectroscópicas contemporáneas, en especial la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Por otra parte, con el objeto de determinar la potencialidad toxicológica de esta especie, se cuantificó el contenido alcaloideo en forma de bases libres y de N-óxidos. En las raíces, los alcaloides totales aislados representaron el 0.76% del material vegetal seco, 44.2% de ellos en forma de bases libres y 55.8% en forma de N-óxidos. En las partes aéreas, se encontró una menor proporción de alcaloides totales (0.36%), 83.03% de los cuales estuvieron en forma de N-óxidos. La cuantificación y la caracterización de los constituyentes individuales de estas mezclas de alcaloides se realizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, así como por espectroscopía de RMN. Se identificaron a la senecionina (1), la integerrimina (2), la retrorsina (3), la usaramina (4) y la senkirquina (5). La presencia del alto contenido de alcaloides pirrolizidínicos en la *P. candidissima* demostró el peligro que representa el uso de los remedios preparados a partir de esta planta medicinal.

ABSTRACT.

A study of the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids (PA) contained in *Packera candidissima* (Greene) Weber and Löve (*Senecio candidissimus* Greene), a common Mexican medicinal plant, is reported. Analysis by TLC, HPLC, and GC-MS have shown the presence in high levels of both PA and their N-oxides in the roots and the aerial parts of the analyzed material. GC-MS analysis showed the presence of senecionine (1), integerrimine (2), retrorsine (3), and usaramine (4) in the aerial parts. The roots were found to contain senkirikine (5) as the major component. These results indicate the harmful potential by sustained consumption of decoctions and infusions prepared from *P. candidissima*, which includes chronic hepatic veno-occlusive diseases. Users of this herb are at high risk of intoxication, especially members of certain cultural groups in northern Mexico and south-western United States.

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ESPECTROS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos particulares	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1. Generalidades sobre la tribu Senecioneae	6
3.2. Perfil químico del género <i>Senecio</i>	8
3.3. Alcaloides pirrolizidínicos	10
3.4. Perfil químico del género <i>Packera</i>	12
3.5. Toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos	15
3.6. Pirroles en otros tejidos	19
3.7. Efectos de los alcaloides pirrolizidínicos en humanos	19
3.7.1. Como alimentos	20
3.7.2. Como contaminantes de alimentos	21
3.7.3. Los AP en los remedios tradicionales	21
3.7.4. Los AP como fármacos	22
3.8. Envenenamiento de humanos por los AP	24
3.8.1. Algunos casos descritos	24
3.8.2. Aspectos clínicos y patológicos	27
3.9. Análisis de los alcaloides pirrolizidínicos	28
3.10. Generalidades sobre <i>Packera candidissima</i> Aspectos etnobotánicos	29

4. PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1. Técnicas analíticas	31
4.1.1. Procedimientos experimentales generales	31
4.1.2. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Condiciones instrumentales	31
4.1.3. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Condiciones instrumentales	32
4.1.4. Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>A. salina</i> Leach.....	32
4.1.4.1. Preparación de las muestras	32
4.1.4.2. Bioensayo	33
4.2. Material vegetal.....	33
4.3. Extracción y purificación de los constituyentes mayoritarios de la <i>P. candidissima</i>	33
4.3.1. Análisis fitoquímico preliminar	33
4.3.1.1. Análisis cualitativo de alcaloides	33
4.3.1.2. Análisis de alcaloides libres.....	34
4.3.1.3. Investigación preliminar del contenido de N-óxidos	34
4.3.1.4. Cuantificación de alcaloides totales	34
4.3.2. Extracción y purificación de los constituyentes mayoritarios de la raíz de <i>P. candidissima</i>	39
4.3.2.1. Extracción	39
4.3.2.2. Fraccionamiento del extracto total.....	39
4.3.3. Extracción y purificación de los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i>	41
4.3.3.1. Extracción	41

4.3.3.2.	Cuantificación de bases libres.....	41
4.3.3.3.	Procedimientos de análisis del extracto hexánico obtenido de las partes aéreas	42
4.4.	Análisis cualitativo antimicrobiano.....	43
4.4.1.	Microorganismos de prueba	43
4.4.2.	Preparación de los inóculos	44
4.4.3.	Preparación de la muestra de prueba	44
4.4.4.	Procedimientos del ensayo.....	44
4.5.	Evaluación de la actividad citotóxica	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	46
5.1.	Cuantificación de alcaloides	47
5.2.	Identificación de los alcaloides	53
5.2.1.	Alcaloides presentes en las partes aéreas	53
5.2.1.1.	Caracterización de la mezcla FAP-4: Identificación de la senecionina (1) y la integerrimina (2)	56
5.2.1.2.	Caracterización de la mezcla FAP-6. Identificación de la retrorsina (3) y la usaramina (4)	60
5.2.2.	Alcaloides presentes en la raíz	66
5.3.	Identificación de algunos constituyentes neutros. Caracterización de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27)	69
6.	CONCLUSIONES	82
7.	ESPECTROS.....	84
8.	BIBLIOGRAFIA	92

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Presencia de AP hepatotóxicos en la flora en general y en plantas medicinales.....	4
Cuadro 2. Citotoxicidad de algunos AP contra el rhabdomyosarcoma A-204 <i>in vitro</i>	23
Cuadro 3. Análisis cualitativo de alcaloides.....	36
Cuadro 4. Cuantificación de alcaloides totales.....	39
Cuadro 5. Cromatografía en columna del residuo orgánico neutro obtenido de las raíces de <i>P. candidissima</i> (Columna I).....	40
Cuadro 6. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i> (Columna V).....	43
Cuadro 7. Cantidades determinadas de AP en la <i>P. candidissima</i>	48
Cuadro 8. Dosis calculadas de AP de la <i>P. candidissima</i> que producirían envenenamientos agudos y/o malestares crónicos en humanos mediante la ingestión de las infusiones preparadas a partir de esta planta.....	50
Cuadro 9. Evaluación biológica preliminar de los extractos de <i>P. candidissima</i>	50
Cuadro 10. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones derivadas de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i>	52
Cuadro 11. Composición de la fracción alcaloidea de las partes aéreas de <i>candidissima</i>	56
Cuadro 12. RMN de ¹ H de los alcaloides 1, 2, 3, y 4 aislados de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i>	64

Cuadro 13. RMN de ^{13}C de los alcaloides 1, 2, 3, y 4 aislados de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i> .	65
Cuadro 14. Composición de la fracción alcaloidea de la raíz de <i>P. candidissima</i> .	68
Cuadro 15. Constantes físicas y espectroscópicas (UV, IR y EM) de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27) aisladas de <i>P. candidissima</i> .	79
Cuadro 16. Valores para los desplazamientos químicos en la RMN- ^1H de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona(27)	80
Cuadro 17. Valores de los desplazamientos químicos en la RMN- ^{13}C de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona 27)	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos aislados de <i>Werneria decora</i> (Asteraceae).	8
Figura 2. Esqueletos básicos de los sesquiterpenos característicos de la tribu Senecioneae.	9
Figura 3. Acilos alifáticos presentes en los sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae.	10
Figura 4. Alcaloides más frecuentes en el género <i>Senecio</i> .	11
Figura 5. Necinas más frecuentes en el género <i>Senecio</i> .	11
Figura 6. Quinonas y lactonas aisladas de <i>P. clevelandii</i> .	13
Figura 7. Alcaloides aislados de <i>P. anonyma</i> .	14
Figura 8. Sesquiterpenos aislados de <i>P. toluccana</i> .	14
Figura 9. Rutas metabólicas que conducen a la activación o a la desintoxicación de los AP.	17

Figura 10. Mecanismo de acción de los pirroles con los grupos nucleofílicos (X ⁻ , Y ⁻) de las moléculas biológicas.	18
Figura 11. Metabolismo de la rosmarinina (17) administrada a ratas.	19
Figura 12. Dos AP frecuentemente presentes en los remedios tradicionales.	22
Figura 13. Complejo formado entre un pirrol y el reactivo de Ehrlich.	28
Figura 14. Reproducción de la cromatografía en capa fina de los extractos alcaloideos preparados a partir de las raíces (R) y de las partes aéreas (PA) de la <i>P. candidissima</i> (CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH (25%), 85:14:1).....	51
Figura 15. Cromatograma (HPLC) de la mezcla de alcaloides de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i>	54
Figura 16. Cromatograma de gases de la mezcla de alcaloides de las partes aéreas de <i>P. candidissima</i>	55
Figura 17. Cromatograma de gases de la mezcla alcaloidea FAP-4.	57
Figura 18. Región vinílica del espectro de RMN de ¹ H de la mezcla FAP-4.	58
Figura 19. Cromatograma de gases del residuo obtenido de la recristalización fraccionada de la mezcla FAP-4.	59
Figura 20. Porción del espectro de RMN de ¹ H de la mezcla FAP-6 que muestra el sistema AB formado por el metileno 18.....	60
Figura 21. Comparación de los dos espectros de RMN de ¹³ C de las mezclas alcaloideas FAP-4 (Espectro A) y FAP-6 (Espectro B)	62
Figura 22. Espectro de RMN bidimensional ¹ H- ¹³ C (HETCOR) de la retrorsina.	63

Figura 23. Cromatogramas comparativos de los extractos alcaloideos de las partes aéreas (PA) y de las raíces (R) de <i>P. candidissima</i>	67
Figura 24. Alcaloides pirrolizidínicos identificados en la <i>P.</i> <i>candidissima</i>	68
Figura 25. Reproducción de la ccf del residuo orgánico neutro obtenido de la <i>P. candidissima</i>	70
Figura 26. Análisis por CG-EM que muestra la composición binaria del aceite PC-26-II.	71
Figura 27. Espectro de masas del aceite PC-26 II.	72
Figura 28. Furanoteremofilanos aislados de la <i>P. candidissima</i>	73
Figura 29. Región de campo alto (RMN- ¹ H) de la mezcla PC-26 II.	74
Figura 30. Región vinílica del espectro de RMN de ¹ H (Espectro 6) del constituyente PC-26 II.	75
Figura 31. Espectro de correlación bidimensional (2D-COSY) protónica del aceite PC-26 II.	77

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN de ¹ H de la senecionina (1) y la integerrimina (2)	85
Espectro 2. RMN de ¹³ C de la senecionina (1) y la integerrimina (2)	86
Espectro 3. RMN de ¹ H de la retrorsina (3) y la usaramina (4)	87
Espectro 4. RMN de ¹³ C de la retrorsina (3) y la usaramina (4)	88
Espectro 5. Espectro de IR de la mezcla PC-26 II	89
Espectro 6. RMN de ¹ H de la mezcla PC-26 II	90
Espectro 7. RMN- ¹³ C de la mezcla PC-26 II	91

1. INTRODUCCION

El empleo de las plantas en la alimentación y como remedios tradicionales para el tratamiento de numerosas enfermedades ha sobrevivido desde tiempos inmemoriales y, recientemente, la medicina tradicional ha adquirido un auge considerable no sólo entre los consumidores habituales, en su mayoría en la población rural de los países del tercer mundo, sino también entre la población urbana mundial (Anon., 1989). Al mismo tiempo, estas prácticas han despertado el interés de la comunidad científica así como de personalidades públicas y organismos políticos. Las plantas se consumen seguramente por razones diferentes en los países industrializados del Norte que en los países del Sur. De tal suerte que los remedios tradicionales siguen siendo la única alternativa para la mayoría de la población mundial ubicada en los países en vías de desarrollo, debido a la escasez de recursos económicos y a la mala calidad de los servicios médicos.

En los países industrializados, una parte considerable de la población cansada de los aditivos químicos en los alimentos manufacturados se inclina de nuevo hacia los alimentos naturales considerados por muchos como los alimentos necesariamente saludables. De igual manera la llamada medicina alternativa o complementaria ha ganado en la última década popularidad entre los habitantes de esas regiones. La pérdida de confianza en la práctica médica ortodoxa, debido a la incapacidad de ésta para resolver las crecientes expectativas medicinales y a la falta de atención hacia el paciente, o a la incapacidad de la medicina de cubrir las necesidades de éste son, entre otras, las principales razones que explican el resurgimiento en el interés por la medicina tradicional. El costo creciente de la atención médica no ha contribuido al incremento en los recursos a ese servicio, a pesar de los adelantos técnicos

adquiridos en los últimos años. Cabe recordar que la industria farmacéutica es ante todo un negocio gigantesco, cuyos parámetros dinámicos, la rentabilidad y la utilidad inmediata no siempre se reconcilian con las necesidades y expectativas en materia de salud, ni con la investigación básica en los centros universitarios. Incluso en muchos países industrializados, la atención médica sólo cubre cerca de la mitad de la población (Gori y Richter, 1978; Huxtable, 1990a). Con esta realidad viva, no es sorprendente que en todos los países se incremente el interés por la "alimentación sana" y por la medicina alternativa.

Las bondades de las plantas medicinales varían desde la acción directa de sus principios activos hasta la simple estimulación del sistema inmunológico. Wagner y Proksch (Wagner, 1983; Wagner y Proksch, 1985) enumeran una docena de plantas medicinales que contienen sustancias estimulantes del sistema inmunológico como los alcaloides, terpenos, fenoles, quinonas, lípidos, polisacáridos y proteínas. Es también conocido que muchas plantas contienen sustancias farmacológicamente activas y, por otra parte, muchos de los fármacos vendidos son de origen vegetal. En Estados Unidos, por ejemplo, un 25% de las prescripciones dispensadas entre 1959 y 1980 contenían principios activos extraídos de plantas superiores (Farnsworth, 1985) y otro tanto lo forman los productos de origen vegetal (Huxtable, 1990a).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto énfasis especial en la importancia de la medicina tradicional y, por ello, ha urgido a todos los países en vías de desarrollo a utilizar sus medicinas tradicionales, haciendo un llamamiento para iniciar programas de identificación, evaluación, preparación, cultivo y conservación de las plantas utilizadas en la medicina tradicional (Resolución 40-33 de la 43 Asamblea de la OMS, 1987).

Algunas investigaciones interdisciplinarias están orientadas no sólo hacia el descubrimiento de nuevos principios activos con usos terapéuticos

potenciales o hacia la validación de los usos que se les confiere a las plantas, sino también hacia la determinación del potencial tóxico de numerosas especies vegetales de importancia medicinal.

Desafortunadamente, no todas las plantas consumidas con fines terapéuticos o como alimentos son benéficas. Muchas plantas han resultado ser muy tóxicas, en particular las productoras de alcaloides pirrolizidínicos (AP) pertenecientes a las familias de las Compuestas (Asteraceae), Boraginaceas y Leguminosas. El empleo sostenido de esas plantas en la medicina tradicional se debe en parte al efecto analgésico que producen los AP, independientemente de cualquier otro valor terapéutico. Sin embargo, es importante mencionar que esos alcaloides causan efectos hepatotóxicos, citotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos, entre otros. Ese aspecto dañino de las plantas no ha sido olvidado por la OMS y, teniendo en cuenta la incidencia de las enfermedades hepáticas asociadas con el consumo de plantas productoras de AP, este organismo especializado lanzó una alerta sobre su consumo publicando en 1988 una lista que incluye a 284 especies pertenecientes a más de 40 diferentes géneros (Anon., 1988) (Cuadro 1). Más de 60 de esas especies incluidas en las tres familias antes mencionadas son utilizadas como plantas medicinales (Penso, 1983).

Cuadro 1. Presencia de AP hepatotóxicos en la flora en general y en plantas medicinales.

Familia	Flora en general ^a		Plantas medicinales ^b	
	Géneros	Especies	Géneros	Especies
Apocynaceae	2	6	-	-
Asteraceae	17	157	9	30
Boraginaceae	21	72	10	21
Leguminosae	1	46	1	11
Ranunculaceae	1	2	-	-
Scrophulariaceae	1	1	-	-
Total	43	284	20	62

^a Número de géneros y especies de plantas que fueron mencionadas como productoras de AP hepatotóxicos (Anon., 1988).

^b Número de géneros y especies de plantas que fueron mencionadas como productoras de AP hepatotóxicos (Anon. 1988) y al mismo tiempo como plantas medicinales (Penso, 1983).

El género *Senecio* (Asteraceae) es la fuente principal de esos AP y, naturalmente, es de esperar que la especie *Packera candidissima* (Greene) Weber & Löve (*Senecio candidissimus*) o "té milagro", una planta utilizada por la población de Chihuahua, contenga alcaloides pirrolizidínicos.

El presente trabajo está dirigido a determinar la potencialidad toxicológica de la *P. candidissima* mediante la cuantificación de su contenido alcaloideo. Los resultados de esta investigación constituirán además un apoyo adicional de tipo quimiotaxonómico para la clasificación botánica definitiva de esta especie.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL. El empleo de la *Packera candidissima* (Greene) Weber & Löve (*Senecio candidissimus*) en la medicina tradicional, tanto por la población indígena como por la población no rural del Estado de Chihuahua, despertó el interés por realizar el estudio químico de esta especie. El propósito fundamental de la presente investigación fue determinar el perfil químico de su contenido metabólico que permitiría justificar *a priori* o invalidar, si éste fuera el caso, el uso de esta planta en la medicina tradicional.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 2.2.1 Evaluar la potencialidad toxicológica de la *P. candidissima* mediante la cuantificación de su contenido alcaloideo.
- 2.2.2 Realizar el análisis fitoquímico de los extractos neutros y alcaloideos obtenidos a partir de las raíces y partes aéreas de la *P. candidissima*.
- 2.2.3 Realizar la evaluación de los extractos y sustancias aisladas como agentes antimicrobianos y antitumorales potenciales

3. ANTECEDENTES

3.1 GENERALIDADES SOBRE LA TRIBU SENECTIONEAE.

La tribu Senecioneae de la familia de las Compuestas (Asteraceae) está integrada desde el punto de vista taxonómico por dos subtribus.

-La subtribu Blennospermatinae la cual engloba a cuatro pequeños géneros con afinidades todavía no bien esclarecidas y que están fuera del interés del presente trabajo.

-La subtribu Senecioninae que incluye a 96 géneros según Nordenstam (1977) o a 85 géneros de acuerdo con Robins (1977), la mayor parte de los cuales provienen de los géneros anteriormente mal definidos *Cacalia* y *Senecio*. Los complejos "senecioides" y "cacaloide" están vagamente caracterizados por criterios morfológicos y citológicos. El complejo "cacaloide" se encuentra distribuido en México y en el este asiático, en tanto que el "senecioides" es cosmopolita aunque se localiza a nivel endémico en algunas regiones como los Andes, las Indias Occidentales y en el África austral y tropical (Nordenstam, 1977).

La mayor parte de las 1500 especies que integran el género *Senecio* está definida en base a estudios citológicos, siendo el parámetro utilizado el número de cromosomas del propio *Senecio* ($n = 10$), o múltiplos de este número ($n = 20, 30, \dots$). Sin embargo, se han encontrado alteraciones en este número básico, particularmente en Norte y Centro América, donde varias especies de *Senecio* se han distinguido por la presencia de 23 cromosomas (Nordenstam, 1977; Barkley, 1978, 1986). Estas alteraciones se relacionan con tendencias morfológicas conducentes al establecimiento de una segunda clasificación. De esta manera, con base al número de cromosomas $X = 8$, 51 especies anteriormente incluidas en el género *Senecio* han sido separadas e incluidas

dentro del género *Packera* (Weber y Löve, 1981). Por lo tanto, *Senecio candidissimus* es sinonimia de *Packera candidissima*. La transferencia de estas especies se basó en razonables evidencias morfológicas descritas por Barkely (1978) y en evidencias citológicas confirmadas para muchas de estas especies por los estudios realizados por varios autores (Turner et al., 1962; Wiens y Halleck, 1962; Ornduff et al., 1963; Palmblad, 1965; Taylor y Brockman, 1966; Ornduff et al., 1967; Johnson y Packer, 1968; Taylor y Mulligan, 1968; Lee, 1969; Packer, 1972; Löve y Löve, 1976; Weber y Löve, 1981).

Un tercer criterio utilizado en la taxonomía de esta subtribu lo constituye el perfil químico del contenido metabólico de estas especies. Así por ejemplo, el género *Adenostyles* ha sido clasificado por varios autores en la tribu Eupatorieae. Sin embargo, su perfil químico (Harmatha et al., 1969) se ajustó en un mayor grado al contenido metabólico característico de la tribu Senecioneae. Otro ejemplo relacionado con la quimiotaxonomía de la tribu Senecioneae lo proporciona la investigación química de las partes aéreas de *Werneria decora*, una especie utilizada en la medicina folclórica sub-americana para el tratamiento de la hipertensión y los desórdenes digestivos (Loc de Ugaz et al., 1990). El objetivo de esa investigación fue verificar el contenido metabólico para confirmar la inclusión del género *Werneria* (40 especies) dentro de la tribu Senecioneae. Esta investigación condujo al aislamiento de dos diterpenos con esqueleto de kaureno y de dos alcaloides pirrolizidínicos, los N-óxidos de la retrorsina y de la retronecina. La presencia de un alto contenido alcaloideo en esta especie constituyó el argumento que apoyó la clasificación de esta especie en la tribu Senecioneae (Lock de Ugaz et al., 1990) (Figura 1).

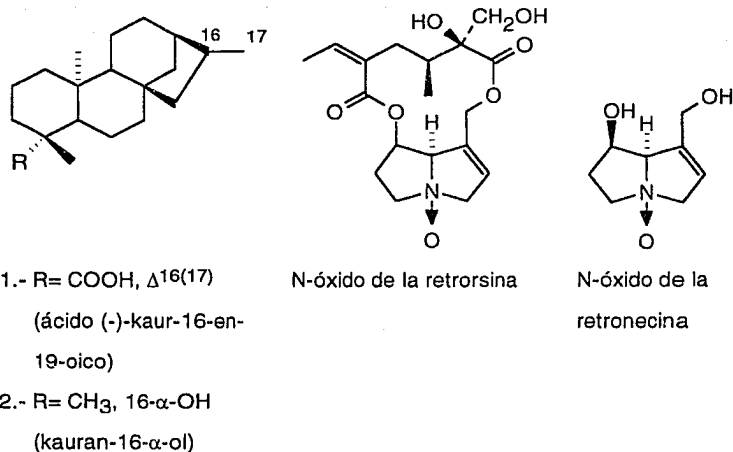


Figura 1. Metabolitos secundarios aislados de *Werneria decora* (Asteraceae).

3.2 PERFIL QUIMICO DEL GENERO *SENECIO*.

Los metabolitos secundarios encontrados en la tribu Senecioneae son totalmente diferentes de los de otras tribus incluidas en la familia Asteraceae. Se han estudiado más de 16 géneros y 250 especies de las 3,000 que integran la tribu. Un gran número de las especies investigadas sintetizan alcaloides pirrolizidínicos, los cuales tienen estructuras básicas variadas. Cabe mencionar que en la familia de las Compuestas, a parte del género *Senecio* sólo se ha encontrado ese tipo de alcaloides en cinco especies de la tribu Eupatoriaeae y recientemente se aisló la senkirina (5) a partir de *Chersodoma jodopappa* (Sch. Bip.) Cabr., investigación que constituye el primer reporte de AP en este género incluido en la tribu Senecioneae (Morales et al., 1986). Sin embargo, los AP se han encontrado en un amplio número de plantas pertenecientes a familias

taxonómicamente distantes. Las familias Boraginaceae, Asteraceae y Leguminosae son las fuentes más comunes aunque han sido aislados también de algunas especies de las familias Apocynaceae, Ranunculaceae, Scrophulariaceae y Gramineae.

El segundo rasgo quimiotaxonómico más importante de la tribu Senecioneae es la presencia de sesquiterpenos con el esqueleto de eremofilano (Figura 2, Estructura 1) y furanoeremofilano (Figura 2, Estructura 2).

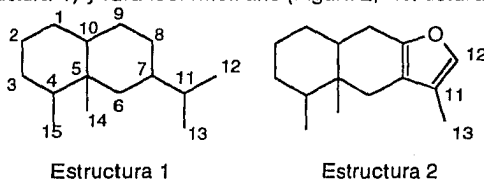


Figura 2. Esqueletos básicos de los sesquiterpenos característicos de la tribu Senecioneae.

Estas estructuras básicas presentan un gran número de variaciones las cuales incluyen:

- Oxidaciones para introducir funciones OH, cetona, epóxido.
- Oxidación de metilos para dar COOH.
- Formación de lactonas (eremofilanólidas).
- Esterificación de los OH por AcOH o por ácidos alifáticos saturados o insaturados con cuatro átomos de carbono (isobutiroilo) o cinco átomos de carbono (senecioilo, tigloilo y angelilo) (Figura 3).

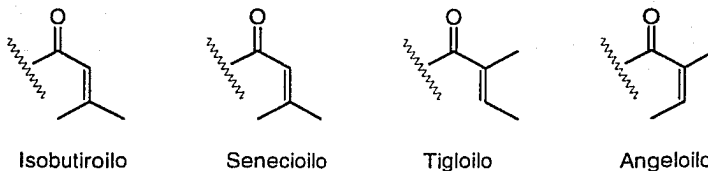


Figura 3. Acilos alifáticos presentes en los sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae.

Es importante mencionar que los eremofilanos y furanoeremofilanos no se distribuyen en ninguna otra tribu de la familia Asteraceae.

Dado que el género *Senecio* es el prototipo de la tribu Senecioneae, su contenido metabólico define el perfil químico del género *Packera* y de otros géneros filogenéticamente relacionados como *Cacalia*.

3.3 ALCALOIDES PIRROLIZIDINICOS.

La mayor parte de los AP son ésteres de 1-hidroximetil- pirrolizidinas frecuentemente hidroxiladas en diversas posiciones siendo el carbono 7 la más frecuente. Son conocidos por sus nombres triviales derivados de las plantas que les dan origen. El núcleo básico de aminoalcohol recibe el nombre de necina en tanto que la porción ácido se conoce como ácido néxico. Las necinas están esterificadas por uno o dos ácidos carboxílicos o por un ácido dicarboxílico para formar un macrólido de 11 ó 12 miembros. Los macrólidos más frecuentes en el género *Senecio* son la senecionina (1), la retrorsina (3) y la senecifilina (6) (Figura 4) (Robins, 1977).

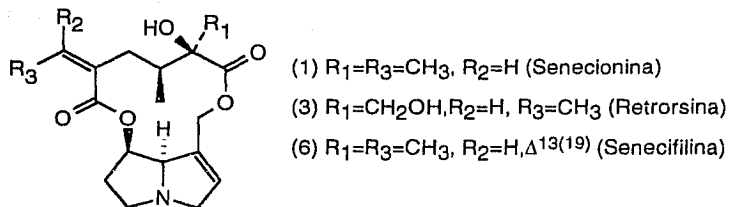


Figura 4. Alcaloides más frecuentes en el género *Senecio*.

La necina más frecuente en toda la tribu es la retronecina (7), generalmente acompañada de la otonecina (8). La hastanecina (9), la macronecina (10) y la rosmarinecina (11) sólo se han encontrado en el género *Senecio* (Figura 5).

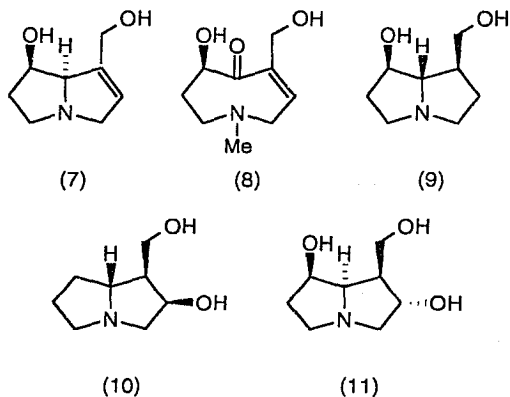


Figura 5. Necinas más frecuentes en el género *Senecio*.

Tanto las necinas como los ácidos nécicos han sido aislados como productos naturales y también representan evidentemente los productos de hidrólisis de los macrólidos.

Las necinas no esterificadas se extraen con poca frecuencia de fuentes naturales. Culvenor y Smith (1957) obtuvieron la isatinecina (el N-óxido de la retronecina) a partir de las semillas de *Crotalaria retusa*. Posteriormente se aislaron otras necinas como productos naturales (Birecka et al., 1983). Los AP cuyas necinas son saturadas son más frecuentes en la familia de las Graminaceas. Los AP existen en forma de bases libres y sus correspondientes N-óxidos. Las especies de *Ligularia* no sintetizan N-óxidos, característica biosintética que ha sido utilizada como criterio quimiotaxonómico relevante para descartar estas especies del género *Senecio* donde los N-óxidos son comunes (Klasek et al., 1971).

3.4 PERFIL QUIMICO DEL GENERO *PACKERA*.

A la fecha cinco especies de *Packera* incluyendo los resultados de la presente investigación de la *Packera candidissima*, han sido analizadas desde un punto de vista químico. Los objetivos de las investigaciones llevadas a cabo en cada especie fueron diferentes, lo cual se reflejó en el contenido metabólico encontrado en las cinco especies.

El estudio de las partes aéreas de *Packera clevelandii* (*Senecio clevelandii*) realizado por Bohlman y colaboradores (1981) condujo al aislamiento de lactonas monoterpénicas, una de ellas con una cadena acetilénica, así como de quinonas y sus derivados. En esta investigación orientada hacia la búsqueda de sesquiterpenos, no se encontraron furanoeremofilanos (Figura 6). Estos compuestos constituyeron un apoyo para

la ubicación de esta especie en el llamado grupo Eurosenecioide (Bohlman et al., 1979).

El primer estudio químico de la *Packera multilobata* (*Senecio multilobatus*) fue realizado por McCoy y Colaboradores en 1983. Ese estudio consistió en analizar el contenido alcaloideo de esta especie que fue responsable en 1982, conjuntamente con la especie *Cynoglossum officinale* de la familia de las Boraginaceas, de la muerte en el ganado equino en Colorado. El empleo de la espectrometría de masas por ionización química permitió identificar la senecionina (1) (Figura 4) como el componente alcaloideo mayoritario en esta especie.

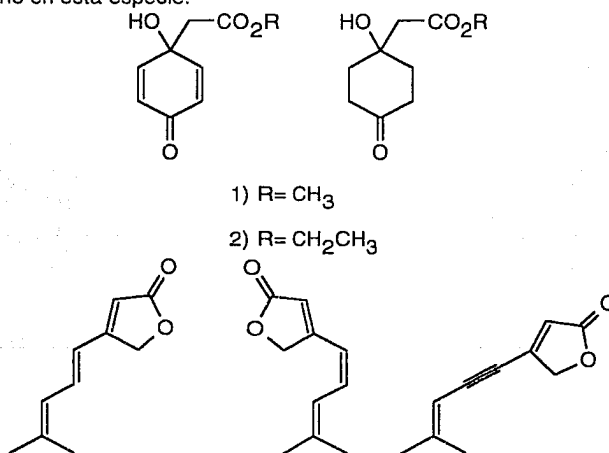


Figura 6. Quinonas y lactonas aisladas de *P. clevelandii*.

El análisis químico de la fracción alcaloidea preparada de *Packera anonyma* (*Senecio anonymus*) permitió aislar 10 AP (Zalkow et al., 1988), y también de esta especie se aisló el éster etílico de la jacaranona particularmente

citotóxica (Gelbaun et al., 1982), (Ester quinólico 1 de la Figura 6). Cuatro de esos macrólidos de 12 miembros (compuestos 1-4) fueron ésteres de la retronecina (7) en tanto que otros 6 resultaron ser ésteres de la otonecina (8).

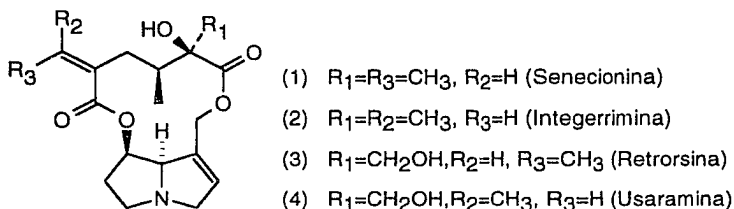


Figura 7. Alcaloides aislados de *P. anonyma*.

El estudio químico de las partes aéreas y de las raíces de la *Packera toluccana* (*Senecio toluccanus* DC. var. *modestus*) permitió aislar las eremofilanólidas de la Figura 8. Cuatro de ellas (compuestos 1a, 1c-e) resultaron ser nuevos metabolitos secundarios (Pérez et al., 1991).

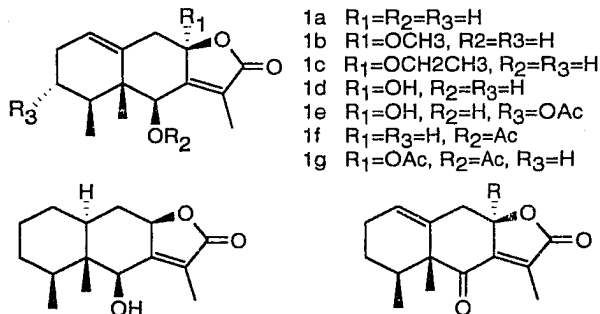


Figura 8. Sesquiterpenos aislados de *P. toluccana*.

3.5 TOXICIDAD DE LOS ALCALOIDES PIRROLIZIDINICOS.

El aspecto más importante de las especies medicinales incluidas en el género *Senecio* está asociado con la alta toxicidad demostrada por los AP presentes en los tés o infusiones preparados a partir de ellas. Esta toxicidad se manifiesta principalmente en efectos hepatotóxicos aunque han sido reportados también sus efectos citotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, entre otros. Se ha demostrado que los AP hepatotóxicos son los ésteres o las necinas que contienen el doble enlace en las posiciones 1, 2 (alcaloides pirrolizidínicos insaturados). Mientras, existe cierta disputa en cuanto a la toxicidad de los N-óxidos (Huxtable, 1980); estos metabolitos son probablemente tan tóxicos como las bases libres correspondientes (Mohabbat et al., 1976) y pueden jugar un papel en la incidencia de otros efectos tóxicos provocados por plantas medicinales (Mattocks y White, 1971a, b).

Experimentos realizados en animales han revelado la estrecha relación existente entre la citotoxicidad de los AP y su metabolismo. Se ha demostrado que esa toxicidad se debe a los metabolitos y no a los mismos alcaloides aislados de fuentes naturales. Las evidencias que sostienen esas afirmaciones son las siguientes (Mattocks, 1986a).

1. Los AP no tienen efecto tóxico local cuando son aplicados en la piel, ni en el sitio de inyección.
2. Los AP no dañan ciertos organismos como las mariposas y sus larvas; éstos son capaces de acumular grandes cantidades de esos metabolitos.
3. El hígado resulta ser el principal órgano dañado, independientemente de la vía de administración; los AP se metabolizan en el hígado.

4. La susceptibilidad de los animales de experimento varía en función de los tratamientos previos, los cuales pueden modificar la actividad de las enzimas metabólicas.

5. La estimulación de las enzimas microsomales del hígado por el pretratamiento con fenobarbital incrementa la susceptibilidad de los animales a los AP, debido a una aceleración de las rutas metabólicas para la formación de los metabolitos tóxicos (Mattocks y White, 1973; White et al., 1973).

6. Los AP son más bien inertes frente a los constituyentes de las células en condiciones fisiológicas. En cambio, los metabolitos formados a partir de ellos son altamente reactivos y más tóxicos.

En el organismo, los AP siguen diversas vías de metabolismo o disponibilidad y sus efectos biológicos dependen del balance de de cada una de ellas. Las principales rutas metabólicas consisten en la hidrólisis enzimática de los ésteres, la conversión de los AP a sus correspondientes N-óxidos y la deshidrogenación para formar derivados pirrólicos (dihidropirrolizinas). Las dos primeras se consideran como mecanismos de desintoxicación (Mattocks y White, 1971a; Chesney et al., 1974b). En tanto la formación de pirroles se asocia con la toxicidad de los AP.

La deshidrogenación y la N-oxidación se realizan mediante enzimas similares pertenecientes al sistema microsomal hepático y los dos tipos de metabolitos se producen simultáneamente en diferentes proporciones dependiendo de los factores estéricos en los sustratos (Mattocks y White, 1971a) (Figura 9).

Los N-óxidos no se metabolizan a pirroles por dichas enzimas. Esos compuestos son hidrosolubles y tienden a excretarse. Sin embargo, las enzimas de la flora intestinal catalizan su reducción a bases libres (Mattocks, 1968a;

Jago et al, 1970; Lanigan, 1970; Mattocks, 1972b; Powis et al., 1979; Powis y Wincentsen, 1980).

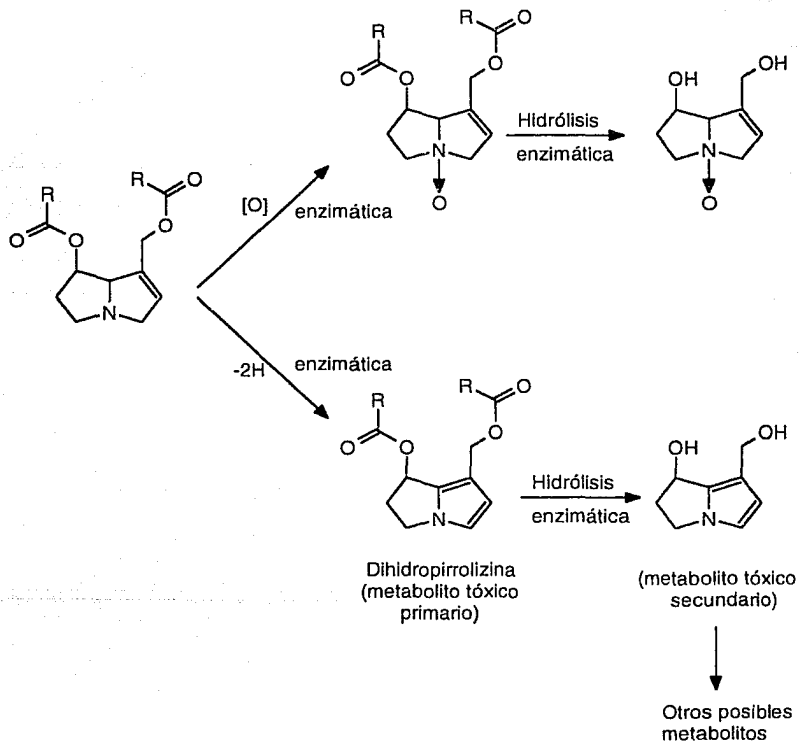


Figura 9. Rutas metabólicas que conducen a la activación o a la desintoxicación de los AP hepatotóxicos.

La citotoxicidad de los pirroles está asociada con su gran reactividad, misma que los convierte en agentes alquilantes de los constituyentes químicos de los tejidos, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los grupos nucleofílicos de esas macromoléculas, como el sulfhidrilo, reaccionan con los núcleos pirrólicos producidos en el metabolismo de los AP; esos metabolitos forman iones carbonio incipientes susceptibles de sufrir ataques nucleofílicos en sus posiciones 7 y 9 y quizás en otras posiciones (Mattocks, 1968a, b; Huxtable, 1990b) (Figura 10).

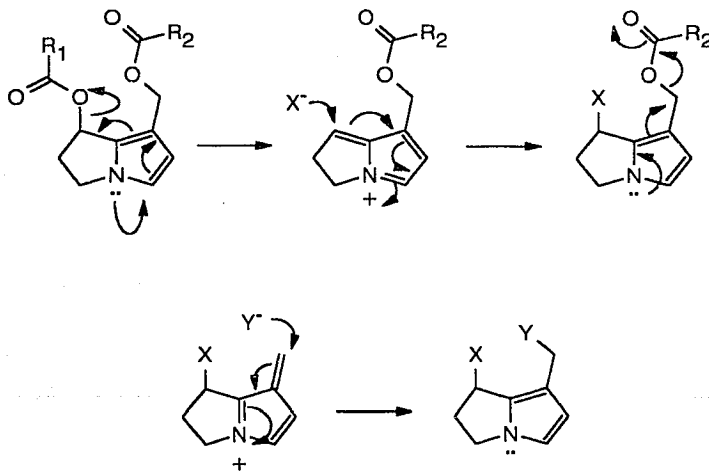


Figura 10. Mecanismo de acción de los pirroles con los grupos nucleofílicos (X⁻, Y⁻) de las moléculas biológicas.

La conjugación del anillo pirrólico con el grupo éster es un factor determinante en el poder alquilante y por lo tanto en la citotoxicidad de esos metabolitos. Así por ejemplo, Mattocks y White (1971a, b) encontraron que la

rosmarinina (17) administrada a ratas se metabolizaba para dar el monoéster 18, cuyo grupo éster no está conjugado con el nitrógeno, por lo tanto el metabolito producido no podía actuar como agente alquilante (Figura 11).

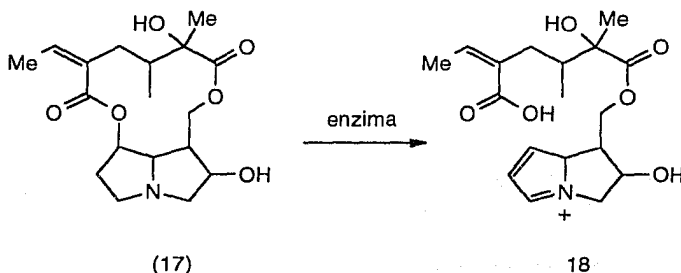


Figura 11. Metabolismo de la rosmarinina (17) administrada a ratas.

3.6 PIRROLES EN OTROS TEJIDOS.

Aunque el metabolismo de los AP a pirroles ocurre casi exclusivamente en el hígado, se han encontrado estos metabolitos en pequeñas cantidades en los pulmones, en los riñones y en el bazo de animales de laboratorio (Mattocks, 1972b). Sin embargo, se reportaron numerosos casos de bronconeumonía y varios decesos debidos a ese padecimiento provocado por la ingestión de AP (Hill et al., 1951; Heath et al., 1975; McGee, 1976; Stillman y Huxtable, 1977; Fox et al., 1978).

3.7 EFECTOS DE LOS AP EN HUMANOS.

Las plantas que sintetizan AP se encuentran en todo el mundo. De ellas las que crecen en las regiones calientes contienen una mayor cantidad de esos metabolitos secundarios. Estas plantas se consumen deliberada o inconscientemente por las poblaciones, ya sea como alimentos o como

remedios. Los cereales consumidos por humanos como el trigo, así como los pastos utilizados como forraje están muchas veces contaminados por esas malas hierbas. Se han reportado muchos casos de envenenamiento de humanos y del ganado por el consumo de esas plantas pertenecientes a las familias Asteraceae, Leguminosae y Boraginaceae que tienen en común la presencia de los AP, a tal grado que constituye un verdadero problema de salud en muchas áreas del mundo, particularmente en África, Centro y Sudamérica.

3.7.1 COMO ALIMENTOS.

En 1972 Rose describió 35 plantas pertenecientes al género *Senecio*, 15 de las cuales se usan como espinacas en Sudáfrica, incluyendo al *Senecio burchellii* y al *S. inaequidens*. En esta última especie se identificaron 19 alcaloides pirrolizidínicos, incluyendo a la senecionina (1), la integerrimina (2), la retrorsina (3) la usaramina (4) y la senkirkina (5) (Figura 7) cuya toxicidad es ampliamente conocida (Zalkow et al., 1988; Bicchi et al., 1989a).

Aunque los alcaloides presentes en *S. burchellii* no se conocen, la planta daña el hígado de ratas y es un contaminante del trigo (Willmot y Robertson, 1920). Las especies de leguminosas *Crotolaria juncea* y *C. retusa*, con una amplia reputación tóxica por la presencia de la monocrotalina (20) (Figura 11), se utilizan como verduras en la alimentación humana en la India. Las semillas de *C. mucronata* tostadas, y aún con AP, se emplean como sustitutos del café en Indonesia. *Petasites japonicus*, reconocido como un potente agente carcinogénico en ratas, se consume en Japón como alimento.

3.7.2 COMO CONTAMINANTES DE ALIMENTOS.

3.7.2 COMO CONTAMINANTES DE ALIMENTOS.

Varias especies de malas hierbas pertenecientes a los géneros de *Senecio*, *Heliotropium* y *Crotolaria* son cosechadas conjuntamente con los cereales y consumidas. La leche obtenida de animales alimentados con esas malas hierbas, la miel producida por abejas alimentadas a partir del nectar de *S. jacobaea* se encuentran entre los alimentos más frecuentemente contaminados por los AP (Dickinson et al., 1976; Miranda et al., 1981; Luthy et al., 1981; Deinzer et al., 1982). Sin embargo, no se conocen casos de envenenamiento de humanos por la ingestión de leche contaminada por los AP, debido probablemente a la baja concentración de esos alcaloides.

3.7.3 LOS AP EN LOS REMEDIOS TRADICIONALES.

El origen botánico y los efectos medicinales de las plantas amorfes vendidas en los mercados son generalmente desconocidos. La información acerca de ese material vegetal no es disponible o es escasa debido al secreto que existe en torno a la medicina folklórica. Muchas veces diferentes nombres se utilizan en diferentes localidades o diferentes plantas se conocen con el mismo nombre (Coady, 1973). Schoental (1968) recopiló más de una docena de nombres locales para la especie *Heliotropium indicum*, ampliamente utilizado para tratar heridas, mordeduras de serpientes e incluso para prevenir el aborto y al mismo tiempo como abortivo. De acuerdo a Schoental esta especie en su conjunto es más tóxica que su alcaloide mayoritario, la indicina (22). Schoental y Pullinger (1972) encontraron que muchas especies de los géneros *Senecio*, *Crotolaria* y *Cynoglossum*, entre otras, se emplean en la medicina tradicional del África oriental pero la mayor parte de los AP contenidos en ellas carecen de valor terapéutico (Figura 12).

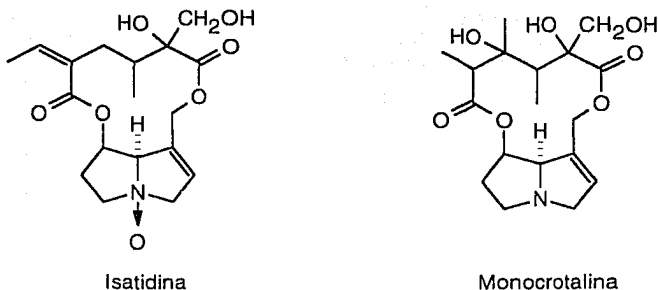
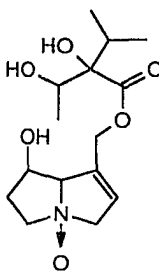


Figura 12. Dos AP frecuentemente presentes en los remedios tradicionales.

3.7.4 LOS AP COMO FARMACOS.

La actividad citotóxica y antimetabólica de varios AP ha impulsado a los científicos a promover investigaciones dirigidas a encontrar el uso de esos alcaloides como agentes anticancerígenos. Alcaloides naturales y análogos sintéticos han sido probados en varias líneas celulares. La senecionina (1) y su N-óxido mostraron actividad contra el tumor de Walker 256 (Kupchan y Suffness, 1967). La monocrotalina (20) fue activa contra el adenocarcinoma 755 en ratas (Kupchan et al., 1964). Los extractos del *S. tenuifolius* que contienen la senkirkina (5) y la senecionina, entre otros alcaloides, han mostrado una buena actividad contra la leucemia linfoide L-1210 en ratas. A la fecha sólo un AP, el N-óxido de la indicina (23) ha sido llevado a nivel clínico para tratar una leucemia aguda avanzada. Sólo dos de los diez pacientes fueron totalmente curados de su padecimiento original, pero al mismo tiempo desarrollaron los efectos tóxicos conocidos para estos productos. Estos efectos limitan sumamente el uso terapéutico de los AP (Kovach et al., 1979). Sin embargo, ese metabolito extraído de *Heliotropium indicum* fue seleccionado por el Instituto Nacional del Cáncer (Estados Unidos) como agente antitumoral a nivel clínico.

Posteriormente, se realizaron varios estudios de citotoxicidad de otros AP en otras líneas celulares entre los que destacan los ensayos realizados *in vitro* por Zalkow y colaboradores (1988) contra el rhabdomyosarcoma humano A-204 utilizando como estándar el N-óxido de la indicina. Todos los AP probados (los alcaloides de la *Packera anonyms*, Figura 7) fueron más citotóxicos que el estándar (Cuadro 2).



N-óxido de la indicina

Cuadro 2. Citotoxicidad de algunos AP contra el rhabdomyosarcoma A-204 *in vitro*.

Compuesto	Senecionina	Integerrimi- na	Retrorsina	Senkirkina	N-óxido de la Indicina
Base libre IC ₅₀ (μg/ml)	150±6	120±6	120±5	260±20	
N-óxido IC ₅₀ (μg/ml)	150±6	—	—	—	440±20

3.8 ENVENENAMIENTO DE HUMANOS POR LOS AP.

3.8.1 ALGUNOS CASOS DESCRITOS.

Numerosos informes sobre envenenamiento de humanos provocados por los AP se han descrito en todo el mundo. Sin embargo, como lo reconocen Stillman y colaboradores (1977), esos casos representan sólo una ínfima parte de las personas afectadas, debido a que los curanderos tradicionales no están familiarizados con este tipo de envenenamiento y además los efectos observados son generalmente atribuidos a otras causas. Los primeros reportes de envenenamiento por los AP fueron hechos por Willmot y Robertson (1920) quienes diagnosticaron una enfermedad aparecida entre la población pobre de la provincia del Cabo, en Sudáfrica. Esta enfermedad a la cual denominaron con el nombre de la "enfermedad del *Senecio*" se debió al consumo de pan contaminado con malas hierbas. Muchos de los consumidores murieron de 14 días a dos años después de iniciarse los síntomas clínicos. Posteriormente, las dos malas hierbas que fueron cosechadas conjuntamente con el trigo fueron identificadas como *Senecio ilicifolius* y *S. burchellii*.

Selzer y Parker (1951) describieron 12 casos clínicos similares en Cape Town, 6 de los cuales resultaron fatales debido a los daños hepáticos causados por los AP.

Un malestar agudo caracterizado por la oclusión de las venas hepáticas fue descrito por Bras y colaboradores (Bras et al., 1954; Bras y Hill, 1956) en Jamaica. Se reconoció que el consumo de los tés preparados a partir de *Crotalaria fulva* conducía a una oclusión de las venas central y sublobular del hígado, su obturación y la aparición de ascitis, conocido también como hidroperitoneum, una acumulación anormal de suero en la cavidad abdominal,

todo lo cual ocasionó la muerte de varias pacientes. Los sobrevivientes temporales desarrollaron una cirrosis hepática.

En 1963, Gupta y colaboradores diagnosticaron dos casos de oclusión de venas hepáticas en la India; los pacientes habían ingerido hierbas medicinales cuyo contenido era desconocido.

Numerosos casos de envenenamientos provocados por AP se han descrito en años posteriores (Tandon et al., 1976; Siddiki et al., 1978a, b; Kumana et al., 1985; Culvenor et al., 1986; De Payer y Schindler, 1987; Anon. 1988; Bach et al., 1989). El mayor caso de envenenamiento por los AP ocurrió en Afganistán en 1974 (Mohabbat et al., 1976; Tandon et al., 1978). 35,000 habitantes de 98 pueblos ubicados en áreas remotas del Noroeste de aquel país fueron afectados por el consumo del pan local contaminado por las semillas de *Heliotropium popovii*, subsp. *gallianum* H. Riedl, las cuales contenían más de 1.49% de AP tóxicos principalmente el N-óxido de la heliotrina (24). Los casos fatales se registraron de 3-9 meses después del inicio de los síntomas. Este alcaloide fue también responsable de la muerte de varias personas en la India; una de ellas fue especialmente sensible debido a un pretratamiento con fenobarbital, el cual acelera la activación de los AP a sus metabolitos tóxicos (Mattocks y White 1971a; Mattocks, 1972b).

En Escocia, en 1976, una mujer de 26 años desarrolló oclusiones hepáticas severas y falleció debido al consumo sostenido durante dos años de grandes cantidades del té conocido como "maté" o té de Paraguay, adquirido en los almacenes de alimentos naturistas. Cabe mencionar que ese té ampliamente consumido en varios estados de Sudamérica se obtiene por la infusión de varias especies de *Ilex*, especialmente de *Ilex paraguensis*, las cuales no sintetizan AP. Sin embargo, mediante análisis de una muestra por CG y espectrometría de masas se puso en evidencia la presencia de AP en la infusión. Posteriormente,

se determinó que los AP presentes en el té maté se debían a la presencia del *Senecio grisebachii*, particularmente rico en el alcaloide retrorsina (3) (McGee et al., 1976).

En el Estado de Arizona (Estados Unidos) muchos casos de envenenamiento por AP, principalmente entre la población infantil de inmigrantes mexicanos, fueron reportados debido al consumo del té de "gordolobo" (Stillman et al., 1977; Fox et al., 1978). Para la preparación de ese té, se emplea normalmente a la planta inofensiva *Gnaphalium macounii*. Sin embargo, debido nuevamente a errores de identificación, a menudo el *Senecio longilobus* (*S. douglasii*) muy parecido al *G. macounii* es colectado y consumido en su lugar. Cabe destacar que el *S. longilobus* contiene desde el 1.3% (Huxtable et al., 1977) hasta un 18 % en peso seco de AP (Johson et al., 1985), incluyendo a la riddelliina (25) y al N-óxido de la retrorsina (Huxtable, 1980a). Ese té es también tomado en México y otros países, incluyendo el suroeste de Estados-Unidos, donde varios grupos étnicos, particularmente los Navajos y Hopis (Moerman, 1977), lo consumen para aliviar los síntomas de la gripa (Huxtable, 1989).

El "suculento" extracto preparado a partir de *S. cineraria* (*cineraria maritima*), que contiene entre otros alcaloides a la senecionina (1), se usó durante varios años (antes de ser retirado del Physician's Desk Reference en 1987) con la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) como aplicación local en el ojo para aumentar la circulación en los tejidos intra-oculares y el metabolismo normal, dos funciones tan esenciales para la fisiología normal de este órgano.

Por otra parte, la especie *Senecio monoensis* es un té de uso común entre los Seris de Sonora (Felger y Moser, 1974), entre tanto el *S. aureus*, el cual contiene AP hepatotóxicos, es empleado en Estados Unidos como

ayuda "completamente sana" para desórdenes ginecológicos (Huxtable, 1989). La misma planta se cultiva en Rusia y sus extractos se expenden en forma de ampolletas (Hutchens, 1983).

3.8.2 ASPECTOS CLINICOS Y PATOLOGICOS.

La "enfermedad del *Senecio*" generalmente no se advierte hasta transcurridos varios días después de haber consumido los AP. Los primeros síntomas consisten de náuseas, dolores de estómago, ascitis acompañado de una dilatación de las venas del abdomen y fiebre (Selzer y Parker, 1951; McLean, 1970; Stillman et al., 1977; McLean y Mathocks, 1980). Aunque los mayores efectos de los AP se manifiestan en el hígado obstruyendo las venas hepáticas y dilatando el hígado, los pulmones desarrollan también edemas (Fox et al., 1978). El malestar agudo persiste si la ingestión de pequeñas cantidades de AP se realiza durante períodos prolongados. Esto conduce al estado crónico caracterizado por una fibrosis en el hígado, la cual se convierte en una cirrosis indistinguible de cualquier otro tipo de cirrosis (Bras y Hill, 1956). De esta forma, el diagnóstico resulta difícil y raras veces la enfermedad se asocia con el consumo de AP. La "enfermedad del *Senecio*" ha sido a menudo confundida con la hepatitis viral (Datta et al., 1978) y con la encefalohepatitis, enfermedad conocida también como síndrome de Reye, a causa de los síntomas neurológicos que produce (Fox et al., 1978).

Desde el punto de vista patológico, se estableció que los metabolitos producidos en el hígado dañan las células parenquimales hepáticas (McLean, 1970, 1974; Tandon et al., 1978), causando una megalocitosis caracterizada por la presencia de células anormales gigantes (Stuart y Bras, 1955; Schoental y Magee, 1959; McLean y Mattocks, 1980).

3.9 ANALISIS DE LOS AP.

La detección analítica de los alcaloides tóxicos constituye un importante objetivo para la determinación del potencial tóxico de plantas. Varias técnicas de análisis han sido utilizadas para la detección y cuantificación de mezclas de alcaloides pirrolizidínicos. El empleo de la cromatografía en capa fina permitió resolver mezclas complejas de AP. Sin embargo, los factores como el espesor de la fase estacionaria, el grado de saturación de las cámaras y la temperatura ambiente, entre otros, limitan la reproducibilidad de los factores de retención. Además, muchas veces diferentes alcaloides tienen el mismo valor de R_f , todo lo cual limita el empleo de este método en la detección e identificación de los AP. Entre los reactivos empleados para la visualización de esos metabolitos, destacan el clorano (Huizing et al., 1980), vapores de yodo y el reactivo de Ehrlich (Culvenor et al., 1970b). Sólo este último es específico para AP insaturados. Los pirroles producidos a partir de éstos reaccionan con el reactivo de Ehrlich para dar el complejo coloreado de la Figura 13 (véase Cuadro 3) (Mattocks, 1986b).

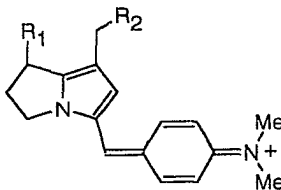


Figura 13. Complejo formado entre un pirrol y el reactivo de Ehrlich.

Posteriormente se desarrollaron técnicas instrumentales para separar mezclas de AP e identificar sus constituyentes. De esta manera, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ha sido la técnica analítica utilizada para separar las mezclas de alcaloides de numerosas especies de

Senecio (Qualls y Segall, 1978; Segall y Krick, 1979; Segall, 1979; Dimenna et al., 1980; Ramsdell y Buhler, 1981; Huizing y Malingré, 1981; Wagner et al., 1981; Niwa et al., 1983; Pieters y Vlietinck, 1986). Otro ejemplo de las técnicas de análisis utilizadas es el empleo de la cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas (CG-EM). La aplicación de esta secuencia instrumental permitió recientemente identificar la presencia de 19 constituyentes pirrolizidínicos en el *S. inaequidens* (Bicchi et al., 1989a), una planta nativa de Sudáfrica que constituye hoy día una de las malas hierbas más difundidas en Italia. La CG también ha tenido amplio uso en la caracterización de AP (Hawthorne et al., 1987; Bicchi et al., 1985, 1989a ,b, 1991; Janda et al., 1989; Onuska y Terry, 1989). Para la identificación y cuantificación de los AP se emplean además la RMN de ^1H y ^{13}C . El empleo de esta metodología instrumental permitió cuantificar los AP presentes en *S. vernalis*, empleando como referencia interna al p-dinitrobenceno (Pieters et al., 1989).

3.10. GENERALIDADES SOBRE *PACKERA CANDIDISSIMA*-ASPECTOS ETNOBOTANICOS.

La *Packera candidissima* es una hierba perenne perteneciente a la familia de las Compuestas (Asteraceae), cuya distribución se limita exclusivamente a las montañas centrales de la Sierra Tarahumara en el estado de Chihuahua. Esta especie es ampliamente utilizada por los Indios Tarahumaras quienes la llaman con el nombre de "chukaka". También se vende en los mercados de plantas locales como "lechuguilla de la sierra" o "té milagro". El "té milagro" es utilizado en la medicina tradicional con múltiples propósitos, principalmente como antiséptico. Las raíces y las hojas de la planta se aplican en forma de cataplasmas para el tratamiento de úlceras y heridas de la piel (Thord- Gray,

1955; Pennington, 1963). Las infusiones se utilizan contra la diabetes, los dolores del riñón y de la vagina (Bye, 1985, 1986). La planta seca y pulverizada es mezclada con poca agua para tratar las heridas, ampollas y úlceras, o mezclada con más agua se utiliza como baño medicinal (Bennett y Zingg, 1935; Thord-Gray, 1955). La planta fresca se mezcla con aceite de oliva para formar un cataplasma que se aplica varias veces al día en ampollas, tumores e infecciones (Von Reis Altschul, 1973). La raíz se aplica en las caries dentales para el alivio del dolor de muelas y para el tratamiento de los abscesos dentales (Bye, 1986). La decocción en caliente y la infusión de las hojas se emplean en el tratamiento de las heridas, las úlceras y las enfermedades venéreas. Preparado como té con "3 dedos" de hierba por litro de agua se toma sólo o en compuesto como agua de tiempo contra la diabetes, el dolor de los riñones y para problemas de la próstata. En este último caso, el material vegetal aéreo se combina con cola de caballo y barba de elote.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 TECNICAS ANALITICAS.

4.1.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.

Los espectros de ultravioleta se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman Du-7. Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599B en CHCl_3 . Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se generaron en un aparato Varian VXR-300S, utilizando CDCl_3 o MeOH como disolventes y TMS ($\delta=0$ ppm) como referencia interna. La rotación óptica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer 241.

Las cromatografías en columna se realizaron sobre gel de sílice 60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm y gránulos de 0.063-0.2 mm. Se utilizaron cromatoplasas cubiertas de gel de sílice 60-F₂₅₄ (Merck) para los análisis y las purificaciones a nivel preparativo en cromatografía en capa fina (ccf).

4.1.2 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS-CONDICIONES INSTRUMENTALES.

Los espectros de masas y los cromatogramas de gases se obtuvieron en un espectrómetro de masas cuadrupolar Hewlett-Packard 5985B conectado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5840. En este análisis se utilizó una columna de metilsilicón de 25 mm de longitud y 0.23 mm de diámetro. El flujo del gas acarreador (He) fue de $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$; el programa de temperatura se ajustó en el rango de 150-280 °C, con una velocidad de calentamiento de $10^\circ \times \text{min}^{-1}$. Cada uno de los espectros de masas se midió por un segundo con un voltaje de ionización de 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 260°C. Los espectros obtenidos por ionización química se registraron utilizando

amoniaco, con un voltaje de ionización de 90 eV. La temperatura de la fuente iónica fue de 150°C.

4.1.3 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC). CONDICIONES INSTRUMENTALES.

El análisis por HPLC de las mezclas de alcaloides se efectuó en un aparato ISCO modelo 2350 en el cual se utilizaron una columna analítica de fase reversa C₁₈ y un detector de UV que operaba a 241 nm. En este análisis el disolvente consistió de un sistema isocrático formado por MeOH-0.01M KH₂PO₄ (3:2) (pH=6.3) con un flujo de 1 ml x min⁻¹ durante una hora. Se inyectaron muestras de 200 g x 10⁻¹ μ l.

4.1.4 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PARA EL CRUSTACEO *Artemia salina* Leach.

4.1.4.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Se preparó una solución original de la muestra (extracto total, fracciones o compuestos) disolviendo 20 mg en 2 ml del disolvente adecuado (MeOH o CHCl₃). De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 μl a frascos viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se aforó cada vial con 5 ml de medio salino artificial, obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, respectivamente (Anderson et al., 1991).

4.1.4.2 BIOENSAYO.

Después de haber desarrollado previamente los huevos de *A. salina* L. en un medio salino artificial durante 48 horas, se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los viales conteniendo las muestras. Transcurridas 24 horas, se registra el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentaje de mortalidad. La concentración letal media (LC₅₀) se calculó mediante un análisis logarítmico de Probit (Lieberman, 1983).

4.2 MATERIAL VEGETAL.

Las raíces de una población de *Packera candidissima* se colectaron el 17 de noviembre de 1988, en el Km 19-20 al sur del Municipio de Bocoyna, entre San Juanito y Creel, a una altitud de 2290 m en el Estado de Chihuahua. Una segunda colecta de toda la planta se realizó el 6 de junio de 1990. La identificación y la recolecta del té milagro se efectuaron por el Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia para cada recolecta se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (Vouchers: Bye 17830 y 17848).

4.3 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LA *Packera candidissima*.

4.3.1 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.

4.3.1.1 ANALISIS CUALITATIVO DE ALCALOIDES.

Una muestra del extracto metanólico se suspendió en HCl 1N y se filtró hasta lograr una solución totalmente transparente. Este filtrado se hizo reaccionar con cada uno de los reactivos incluidos en el Cuadro 3.

4.3.1.2 ANALISIS DE ALCALOIDES LIBRES.

Aproximadamente 10 g de raíces se extrajeron por maceración con MeOH durante 24 horas. Posteriormente se filtró y se concentró el extracto a sequedad bajo presión reducida. 1 g de extracto metanólico se sometió a una partición empleando HCl 1N y CHCl_3 (20 ml, 4 veces cada una). La fase acuosa resultante se basificó con NH_4OH concentrado hasta alcanzar un $\text{pH}=9$ y se extrajo con CHCl_3 . La fase clorofórmica así obtenida (FA-1) se secó con Na_2SO_4 y se concentró para ser analizada por ccf empleando como sistema de elución una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). El reactivo de Dragendorff (Cuadro 3) se utilizó como agente cromógeno (Marcha A, Esquema 1).

4.3.1.3 INVESTIGACION PRELIMINAR DEL CONTENIDO DE N-OXIDOS.

En un segundo procedimiento (Esquema 2), la mitad de la fase acuosa ácida obtenida de la partición de 1 g de extracto metanólico se redujo con polvo de Zn, calentando y agitando durante 4 horas. Se comparó mediante ccf el crudo alcaloideo resultante del proceso reductivo (FA-3) con el obtenido de la segunda mitad tratada siguiendo el procedimiento de extracción no reductivo anteriormente descrito (FA-2) (Sección 4.3.1.2). Posteriormente, la FA-3 se purificó siguiendo la técnica descrita en la sección 4.3.1.4. Se obtuvieron 25 mg de alcaloides, parte de los cuales se analizaron por CG-EM (Sección 4.1.2).

4.3.1.4 CUANTIFICACION DE ALCALOIDES TOTALES.

Un peso conocido del extracto metanólico se trató con HCl 1N hasta alcanzar un pH de entre 5 y 6. La suspensión se filtró y el residuo orgánico se disolvió en AcOEt. Esta solución se sometió a una partición con HCl 1N. La solución ácida se redujo con un exceso de polvo de Zn (10% en peso del crudo orgánico tratado) agitando la mezcla a temperatura ambiente durante doce

horas. Posteriormente, el agente reductor se eliminó mediante filtración. Se añadió NH_4OH concentrado al filtrado hasta alcanzar un $\text{pH}=9$ y se extrajo cuatro veces con AcOEt . La solución acuosa se llevó a un $\text{pH}=10-11$ y se extrajo de nuevo. La fase orgánica reunida se lavó con agua saturada de NaCl , se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se destiló a presión reducida. Este procedimiento de separación de alcaloides se aplicó a cinco porciones del extracto metanólico y se calculó el rendimiento promedio (Cuadro 4).

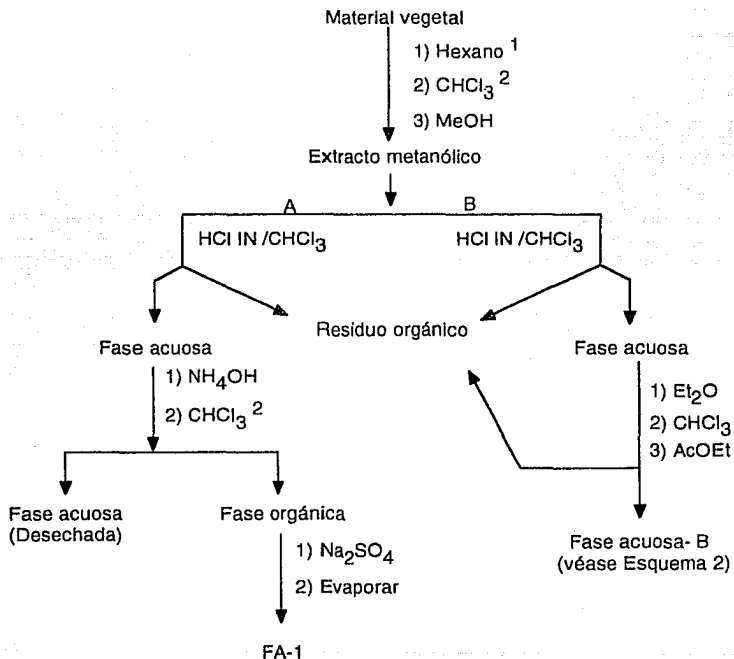
Para la purificación de la mezcla de alcaloides, ésta se disolvió en HCl 1N y se extrajo con Et_2O , CHCl_3 y AcOEt hasta que estas fases orgánicas no presentaran coloración alguna. Posteriormente, la fase acuosa se basificó hasta $\text{pH}=10-11$ y se extrajo con AcOEt siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. Al destilar el disolvente a presión reducida precipitaron los alcaloides, detectándose su olor acre característico.

Cuadro 3. Análisis cualitativo de alcaloides.

Reactivo	Resultado de la prueba	Color del precipitado
1 - Mayer	+	Blanco
2 - Sonneschain	+	Verde \longrightarrow Azul
3 - Silicotúngstico	+	Blanco
4 - Dragendorff	+	Anaranjado
5 - Ehrlich	+	Azul
6 - Wagner	-	-

1. Reactivo de Mayer: Añadir una solución de 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua a otra solución preparada con 5 g de KI en 10 ml de agua. Aforar a 100 ml.
2. R. Sonneschain: Disolver 10 g de ácido fosfomolibdico en una mezcla de ácido nítrico-agua (1:9, v/v) y aforar con esta mezcla a 100 ml.
3. R. de ácido silicotúngstico: 12 g del ácido se disuelven en agua y aforan con ella a 100 ml.
4. R. Dragendorff: Cuatro gramos de subnitrito de bismuto se disuelven en 10 ml de ácido nítrico al 30%. Disolver aparte 13.6 g de yoduro de potasio en 25 ml de agua. Mezclar, dejar reposar, filtrar y diluir con 50 ml de agua.
5. R. Ehrlich: Solución al 5% de p-Dimetilaminobenzaldehído en etanol.
6. R. Wagner: Disolver 1.27 g de KI y aforar a 100 ml con agua.

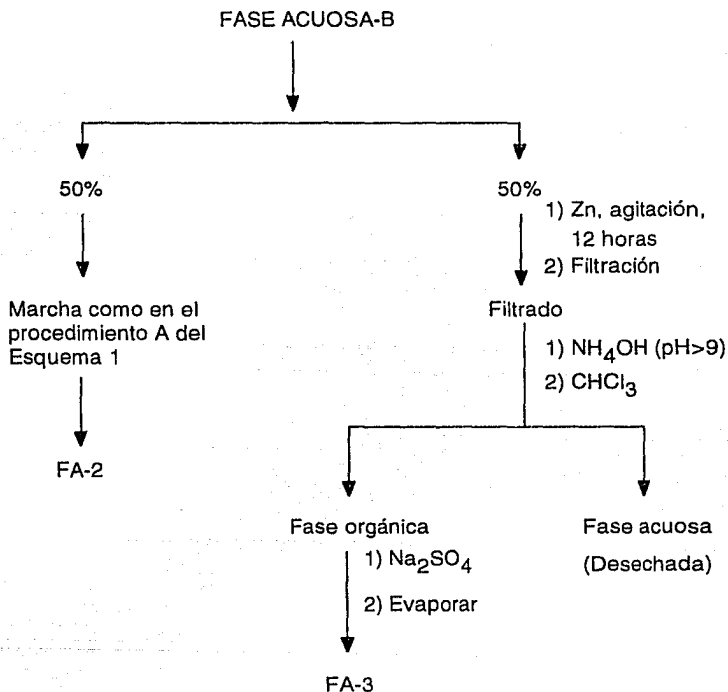
Esquema 1: Marcha seguida para el aislamiento de los alcaloides de la *P. candidissima* en forma de bases libres.



1.Sólo en partes aéreas.

2.Sólo enraíces.

Esquema 2. Marcha seguida para la cuantificación y purificación de los AP en forma de bases libres y N-óxidos.



$$\begin{aligned} \% \text{ N-óxidos} &= \frac{\text{Alcaloides totales} - \text{Bases libres}}{\text{Alcaloides totales}} \times 100 \\ &= \frac{(\text{FA-3}) - (\text{FA-2})}{(\text{FA-3})} \times 100 \end{aligned}$$

Cuadro 4. Cuantificación de alcaloides totales.

Porción	extracto metanólico (g)	Peso AP (g)	% AP (Extracto metanól. =100%)
1	106.060	1.7717	1.59
2	106.7246	1.7828	1.60
3	112.0644	1.8720	1.68
4	111.4000	1.8609	1.67
5	122.0617	2.039	1.83
Promedio			1.67

4.3.2 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES

MAYORITARIOS DE LA RAIZ DE *Packera candidissima*.

4.3.2.1 EXTRACCION.

1.9 Kg de raíces se fragmentaron en un molino de cuchillas, modelo Wiley 4 y el polvo obtenido se sometió a maceraciones sucesivas con CHCl_3 -MeOH (1:1) y MeOH durante 4-5 días cada una (12 l, 3 veces). Posteriormente, los disolventes de extracción se filtraron y se evaporaron a presión reducida proporcionando un extracto total de 292 g. Se realizaron las evaluaciones biológicas preliminares del extracto total determinando el efecto tóxico letal para el crustáceo *A. salina* (Sección 4.1.4).

4.3.2.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO TOTAL.

El extracto orgánico total preparado a partir de las raíces se sometió al proceso de partición previamente descrito (Sección 4.3.1.2) para el aislamiento

de las bases libres, proporcionando un crudo alcaloideo de 6.4532 g y un residuo orgánico neutro de 124.26 g.

La resolución de este residuo orgánico se llevó a cabo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1.250 Kg, Columna I) utilizando como eluyentes CHCl_3 y una mezcla de CHCl_3 -Acetona (véase Cuadro 5). Se colectaron 119 eluatos de 50 ml cada uno. La semejanza observada mediante un análisis de los eluatos por ccf permitió obtener 5 fracciones combinadas.

La fracción 9-17 (30.12 g) se purificó mediante cromatografía en columna (Columna II) y en capa fina, impregnando la gel de sílice con AgNO_3 al 2% en H_2O . Se recuperaron finalmente 64.3 mg de una muestra aceitosa denominada PC-26 II de $R_f=0.67$ (CHCl_3 -Acetona, 95:5), a la cual se le registraron sus espectros de IR, UV y RMN de ^1H y ^{13}C . También fue analizada por CG-EM y se determinó su rotación óptica. El análisis por HPLC del aceite PC-26 II no logró una separación satisfactoria.

Cuadro 5. Cromatografía en columna del residuo orgánico neutro obtenido de las raíces de *P. candidissima* (Columna I).

Sistema de eluyentes	Proporción	Fraciones colectadas	Eluatos combinados	Observación
CHCl_3		1-48	1-8	Desechada
CHCl_3 -Acetona	95:5	49- 59	9- 17	Columna II
	90:10	60- 78	18- 52	Desechada
	80:20	79- 96	53- 69	Columna 2-II
	70:30	97-106	70-119	Desechada
	50:50	107-119		

4.3.3 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LAS PARTES AEREAS DE *P. candidissima*.

4.3.3.1 EXTRACCION.

Aproximadamente 6 Kg del material vegetal seco y sin moler se desgrasaron con 12 litros de hexano (3 veces) durante 3-5 días cada una. Esta extracción proporcionó un crudo total de 156.5 g.

Posteriormente, el residuo vegetal se extrajo dos veces con metanol y se obtuvo un crudo total de 1320.4 g. Este extracto se sometió al análisis cualitativo de alcaloides (sección 4.3.1.1) y al proceso de partición ácido-base (sección 4.3.1.4).

4.3.3.2 CUANTIFICACION DE BASES LIBRES EN LAS PARTES AEREAS.

Un peso equivalente a 122.8 g del extracto metanólico se extrajo sin previa reducción para aislar las bases libres siguiendo la técnica anteriormente descrita (sección 4.3.1.4). Se obtuvo una mezcla de alcaloides con un peso total de 348 mg. Esta mezcla se sometió al análisis por HPLC y por CG-EM y posteriormente se resolvió por ccf a nivel preparativo, utilizando el sistema de eluyentes formado por CHCl_3 -MeOH-NH₄OH (25%) (85:14:1) (Pestchanker y Giordano, 1986). Una vez desarrollados los cromatogramas, las placas fueron visualizadas mediante exposición a la luz UV ($\lambda = 254$ y 366 nm) y las bandas mayoritarias, de R_f= 0.24 (FAP-6) y R_f= 0.60 (FAP-4) se separaron. De los 82.6 mg de muestra aplicada se obtuvieron 54.4 mg de FAP-4 y 27.3 mg de FAP-6. Estas dos bandas fueron analizadas por CG-EM y además se obtuvieron sus espectros de RMN. Finalmente cada banda se sometió a una cristalización fraccionada de acetona, la cual condujo a la obtención en cada caso de un

compuesto puro. Se registraron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos obtenidos así como sus espectros de RMN de correlación bidimensional homonuclear y heteronuclear. Se hizo un análisis comparativo mediante ccf de los extractos alcaloideos obtenidos de las raíces y de las partes aéreas de *P. candidissima*.

4.3.3.3 PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS DEL EXTRACTO HEXANICO OBTENIDO DE LAS PARTES AEREAS.

Los 156.5 g que constituyeron el extracto hexánico obtenido de la maceración de las partes aéreas de la *P. candidissima* se fraccionaron en columna empacada con 1.4 Kg de una mezcla 1:1 de gel de sílice 60 Merck 0.2-0.5 mm y 0.063-0.2 mm (Columna V). La elución se llevó a cabo empezando con hexano y aumentando la polaridad con CHCl_3 y acetona como se indica en el Cuadro 5. Se recogieron 657 eluatos de 200 ml cada uno, mismos que fueron reunidos en un total de 8 fracciones combinadas. El eluato 536 (51.4 mg) se purificó mediante varias ccf (CHCl_3 -Acetona, 97.5:2.5) y se obtuvieron 30.6 mg de un compuesto al que se denominó con la clave PC-536, de $R_f = 0.53$. Posteriormente, se registraron sus espectros de IR, UV y RMN de ^1H y ^{13}C . Varias fracciones de la Columna V fueron purificadas mediante ccf y/o por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose los compuestos indicados por las claves del Cuadro 6. Se obtuvieron los espectros IR de cada uno de los compuestos aislados. En base a las bandas características de los grupos funcionales presentes en ellos se consideró o descartó a cada compuesto.

Cuadro 6. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de la *P. candidissima* (Columna V).

Hexano	Proporción	Eluatos colectados	Fracciones combinadas	Observación
Hexano		1-260-	1-273	Desechada
Hexano-CHCl ₃	8:2	261-402	274-326	ColumnaIV
	6:4	403-535	327	PC-327*, d
	4:6	536-551	328-380	Desechada
	2:8	552-592	381-400	PC-381*, d
CHCl ₃ -Acetona	95:5	593-620	401-535	Desechada
	8:2	621-657	536	PC-536PP*
			537-657	Desechada

*: Compuestos purificados mediante ccf y/o cromatografía en columna.

d: Estos compuestos fueron descartados.

4.4 ANALISIS CUALITATIVO ANTIMICROBIANO.

La evaluación preliminar de la potencialidad antimicrobiana de los extractos y de las fracciones preparadas se realizó utilizando las técnicas microbiológicas cualitativas de difusión en agar (Rojas et al., 1992).

4.4.1 MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Las siguientes cepas se utilizaron como organismos de prueba en las evaluaciones antimicrobianas preliminares.

Microorganismo	ATCC No.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
<i>Escherichia coli</i>	8739
<i>Candida albicans</i>	10231

4.4.2 PREPARACION DE LOS INOCULOS.

Las bacterias se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37°C. *Candida albicans* se desarrolló en caldo glucosa 2% Sabouraud (Merck) y se incubó a 28°C por 48 horas.

La concentración final de organismos en cada uno de los cultivos preparados se ajustó mediante dilución en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta obtener la turbidez equivalente al estándar No. 1 de Mc Farland (0.1 ml de BaCl₂ al 1% y 9.9 ml de H₂SO₄ al 1%) , correspondiente a un número aproximado de 10⁶ células/ml.

4.4.3 PREPARACION DE LA MUESTRA DE PRUEBA.

Las muestras a evaluar se suspendieron en una solución acuosa de Tween 80 al 1%. Los extractos y las fracciones se evaluaron por duplicado a las concentraciones de 50 y 100 ppm. Los controles positivos (estándares) se prepararon a las concentraciones de 10 mg x ml⁻¹ de sulfato de estreptomicina y 100 mg x ml⁻¹ de nistatina, en solución acuosa.

4.4.4 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO.

Un mililitro de la suspensión bacteriana se sembró de manera uniforme en cada caja Petri (100 x 15 mm) de prueba, conteniendo 15 ml de agar-antibiótico No. 1 (Merck) para las bacterias o agar-Sabouraud (Glucosa 4% Merck) para *C. albicans*. Con un horador cilíndrico se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 11 mm. Posteriormente, se adicionaron 100 µl del control positivo en una de las perforaciones; 100 y 50 µl de la solución se adicionaron de manera independiente en las cavidades restantes. Las placas así preparadas se mantuvieron por un período de 1 a 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las

muestras. Transcurrido ese tiempo, las placas se incubaron por 24 horas a 37°C para las bacterias y durante 48 horas a 28°C para la levadura. Para cada muestra de prueba, el ensayo se realizó por duplicado.

La actividad antimicrobiana se registró midiendo la longitud (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada una de las perforaciones.

4.5 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA.

La actividad citotóxica de las mezclas de los AP aislados de *P. candidissima* así como de los extractos preparados a partir de las partes aéreas se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Mar et al., 1991). Las dos líneas celulares utilizadas fueron el carcinoma nasofaríngeo humano (KB) y el linfoma de mûridos (P-388). Los cultivos celulares obtenidos de estos dos tumores se trataron con cinco diferentes concentraciones de cada muestra (20.0 - 0.03 µg x ml⁻¹) disuelta en DMS y se incubaron por períodos de 48 horas para la línea celular P-388 y 72 horas para la línea KB. Al cabo del período de incubación, se determinó la cantidad de células en cada tubo de ensayo mediante un análisis colorimétrico para medir el contenido protéico celular utilizando el método de tinción con sulforhodamina B. Los resultados se expresaron finalmente en términos de dosis efectivas medias (ED₅₀).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el objeto de determinar el contenido metabólico de la *Packera candidissima* y su potencialidad toxicológica, se procedió a realizar un estudio fitoquímico preliminar en el cual pequeñas cantidades de raíces se extrajeron con MeOH. El extracto obtenido se analizó por cromatografía en capa fina utilizando el sulfato cérico y el reactivo de Dragendorff, entre otros (Cuadro 3) como cromógenos, para visualizar la complejidad del mismo.

Este análisis permitió detectar la presencia de compuestos alcaloideos y no alcaloideos en esta especie. La naturaleza pirrolizidínica de los alcaloides se confirmó por la prueba positiva dada por los mismos con el reactivo de Ehrlich, específico para este tipo de compuestos. Por otra parte se pudo verificar la existencia de N-óxidos en esta especie, ya que el extracto FA-3 obtenido del procedimiento reductivo mostró una mayor concentración de alcaloides que el extracto FA-2 obtenido mediante la secuencia de partición ácido-base no reductiva (ver secciones 4.3.1.2; 4.3.1.4 y Esquema 2). Sin embargo, la comparación de las dos fracciones no mostró ninguna diferencia cualitativa en el contenido de ambos (véase sección 5.1).

Estos resultados preliminares permitieron concluir que los alcaloides pirrolizidínicos presentes en la *P. candidissima* constituían una mezcla de bases libres y de N-óxidos. Debido a que cada una de las partes de esta planta se utilizaba de manera independiente en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos malestares, se decidió valorar el contenido metabólico de cada una de ellas por separado. Se prepararon extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de las raíces y partes aéreas según las técnicas descritas (secciones 4.3.2.1 y 4.3.3.1).

La determinación del efecto tóxico letal para *A. salina* del extracto metanólico preparado a partir de la raíz demostró una actividad marginal a concentraciones equivalentes a 1000 ppm. La evaluación cualitativa de su actividad antimicrobiana permitió observar un efecto inhibitorio moderado sobre bacterias Gram positivas.

5.1 CUANTIFICACION DE ALCALOIDES.

Para la cuantificación de los alcaloides presentes en la raíz, el extracto metanólico se sometió a una partición ácido base, proporcionando un crudo alcaloideo de 6.4532 g y un extracto orgánico no alcaloideo de 124.26 g (ver sección 4.3.2.2). Ambos extractos se evaluaron a su vez para determinar su actividad larvicida potencial. La fracción neutra resultó ser inactiva en tanto que los alcaloides fueron, como era de esperarse, los responsables de la actividad en el ensayo de *A. salina*, correspondiendo a un LC₅₀ de 409 ppm (Lieberman, 1983).

El paso siguiente consistió en determinar la cantidad total de alcaloides así como la de las bases libres y los N-óxidos presentes en las raíces del material vegetal obtenido de la primera colecta de la *P. candidissima* (ver sección 4.2). Los procedimientos de extracción reductivos (ver sección 4.3.1.4) condujeron a la obtención de 50 mg de alcaloides por cada gramo de extracto metanólico, el cual a su vez es generado por la extracción de 6.5 g de material vegetal seco. Mientras tanto la partición sin previa reducción de 1 g de extracto metanólico proporcionó 22.1 mg de bases libres. El análisis por ccf de los alcaloides obtenidos por las dos vías no reveló diferencia cualitativa entre ambos. La proporción de N-óxidos presentes en las raíces y en las partes aéreas se calculó de acuerdo a la siguiente relación (Stelljes y Seiber, 1990).

$$\% \text{ N-óxidos} = \frac{\text{Alcaloides totales} - \text{Bases libres}}{\text{Alcaloides totales}} \times 100$$

El Cuadro 7 incluye las estimaciones de los alcaloides en la raíz y en las partes aéreas.

Cuadro 7. Cantidades determinadas de AP en la *P. candidissima*.

Naturaleza	RAIZ				PARTES AEREAS			
	Cantidad (mg)	%	%	%	Cantidad (mg)	%	%	%
Material vegetal seco	6506.8	100			4544.07	100		
Extracto metanólico	1000	13.36	100		1000	22.0	100	
Alcaloides totales	50	0.76	5.0	100	16.7	0.36	1.67	100
Bases libres	22.1	0.33	2.21	44.2	2.83	0.06	0.28	16.94
N-óxidos	27.9	0.43	2.79	55.8	13.87	0.30	1.38	83.03

La partición ácido base de este extracto metanólico y la reducción previa de una porción del mismo condujeron a la cuantificación de los alcaloides totales, de las bases libres y los N-óxidos (Cuadro 7). Como se indica, la cantidad de alcaloides totales y de bases libres presentes en la raíz rebasa ampliamente las correspondientes cantidades determinadas en las partes aéreas. Estas cantidades respectivas de alcaloides pirrolizidínicos permiten expresar las dosis hipotéticas de 10 mg Kg^{-1} de alcaloides (Cuadro 8) que producen un envenenamiento agudo en humanos (Stillman et al., 1977;

Huxtable et al., 1977; Fox et al., 1978). Destaca el peligro real que representa el consumo de las decocciones y las infusiones preparadas con el té milagro (*P. candidissima*), ya que la infusión de tan sólo 78 g de raíces secas o de 160 g de partes aéreas proporciona la cantidad suficiente de alcaloides para producir malestares hepáticos crónicos en una persona adulta. Cabe recordar que los AP también se absorben a través de las membranas de las mucosas, aunque su toxicidad por esta vía suele ser menor, ya que su bioactivación ocurre en el hígado. De tal suerte que el material absorbido por la vagina o por las heridas no pasa directamente a este órgano siendo eliminado por los tejidos o por la orina.

Tanto el extracto metanólico como el orgánico neutro y el alcaloide o fueron evaluados como agentes citotóxicos para las líneas celulares KB (carcinoma epidermoide) y P-388 (linfoma de mûridos). Ninguno de los extractos mostró una actividad significativa a concentraciones de $20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Este resultado no es sorprendente, ya que la actividad antitumoral de muchos alcaloides pirrolizidínicos es muy variable (véase Cuadro 2) y no se ha establecido de manera clara una relación entre estructura química y actividad citotóxica para estos metabolitos secundarios (Kupchan et al., 1964; Kupchan y Suffnes, 1967; Culvenor, 1968; Bull et al., 1968; Culvenor et al., 1970b; Kovach et al., 1979; Huang et al., 1980). Se incluyen en el Cuadro 9 los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares realizadas con cada uno de los extractos de la raíz y partes aéreas. El extracto metanólico preparado a partir de las partes aéreas no mostró ninguna actividad en el ensayo de *A. salina*, lo cual comprobó la menor concentración de alcaloides tóxicos en estos órganos. En efecto, la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de este extracto no mostró un halo de inhibición importante para las cepas utilizadas (Cuadro 10).

Cuadro 8. Dosis calculadas de AP de la *P. candidissima* que producirían envenenamientos agudos y/o malestares crónicos en humanos mediante la ingestión de las infusiones preparadas a partir de esta planta.

	RAIZ			PARTES AEREAS		
	DOSIS			DOSIS		
Persona	mg/Kg	mg	material seco (g)	mg/Kg	mg	material seco (g)
Niño de 10 Kg	10	100	13	10	100	27
Adulto de 60 Kg	10	600	78	10	600	163

Cuadro 9. Evaluación biológica preliminar de los extractos de *P. candidissima*.

	RAIZ				PARTES AEREAS
	PORCENTAJE DE MORTALIDAD ^a				ED ₅₀ (µg x ml ⁻¹) ^b
Concentración (ppm)	1000	100	10	LC ₅₀	KB ; P-388
Extracto metanólico	50	0	0	-	>20
Extracto orgánico no alcaloideo	0	0	1000	>1000	>20
Extracto alcaloideo	60	35	16	409	>20

a: *Artemia salina*
b: Línea celular

Las cromatografías en capa fina de los extractos alcaloides preparados a partir de las raíces y las partes aéreas presentaron diferencias en el contenido de ambos (Figura 14).

Las partes aéreas presentaron dos bandas distinguibles en el UV, correspondientes a los Rf de 0.24 y 0.60, en tanto que la raíz presentó al ser revelada con el reactivo de Dragendorff, una sola banda, de Rf 0.27, aunque al ser expuesta a la luz UV se observaron dos bandas adicionales similares a las de las partes aéreas. Las dos bandas observadas en la mezcla alcaloidea de las partes aéreas fueron separadas por ccf a nivel preparativo, obteniéndose un 33.05% de la banda de mayor polaridad (FAP-6) y un 65.86% de la de menor polaridad (FAP-4).

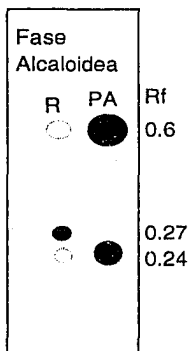


Figura 14. Reproducción de la cromatografía en capa fina (ccf) de los extractos alcaloides preparados a partir de la raíz (R) y de las partes aéreas (PA) de la *P. candidissima* (CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (25%), (85:14:1). Las líneas punteadas indican los compuestos que fueron únicamente visualizados por la luz UV.

Estas dos fracciones alcaloideas purificadas, así como el extracto metanólico y el orgánico neutro resultantes de la partición ácido base fueron evaluados como agentes antimicrobianos, sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas y sobre una levadura (*Candida albicans*) (Rojas et al., 1992). Los resultados obtenidos de estos ensayos se incluyen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones derivadas de las partes aéreas de *P. candidissima*.

Clasificación	Bacterias Gram (+)				Bacterias Gram (-)				Levadura	
	<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
concentración (ppm)	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
	Diámetro de la zona de inhibición (mm)									
Extracto total estándar **	-	-	2	3	-	-	-	-	-	9
PC-1 * estándar **	-	-	7	8	-	2	-	-	-	-
PC-2 * estándar **	1	2	7	8	-	1	1	2	-	-
PC-3 * estándar **	-	1	5	7	-	1	1	2	-	-
	-	9	15	15	9	7	10	10	-	-

* PC-1: Residuo orgánico neutro

PC-2: FAP-6

PC-3: FAP-4

** Estándar: Para bacterias= estreptomycin, 1g/100 ml H₂O

: Para levadura= nistatina, 3g/30 ml H₂O

La mayor actividad para todos los extractos evaluados se registró contra *B. subtilis*, agente causante de desórdenes gastrointestinales (Jephcott et al., 1977; Pérez, 1990). Cabe recordar que esas bacterias causan enfermedades diarreicas ya sea por colonización y crecimiento en el tubo digestivo, ya sea por la secreción de exotoxinas. En cambio no se observó ninguna actividad

significativa para las bacterias Gram negativas. Un alto porcentaje de las infecciones agudas del tracto urinario se deben a *E. coli* (Mond, 1965; McAllister, 1971; Pérez, 1990).

5.2 IDENTIFICACION DE LOS ALCALOIDES.

Con el objeto de determinar la complejidad de la mezcla alcaloidea purificada de las partes aéreas, ésta se sometió a un análisis por HPLC. Sin embargo, el cromatograma obtenido (Figura 15) permitió concluir que el sistema de fase reversa utilizado no era lo suficientemente efectivo para resolver las dos bandas mayoritarias detectadas en ccf. Se decidió entonces utilizar las condiciones experimentales descritas para la caracterización de los alcaloides de *S. inaequidens* por CG en combinación con la EM (Bicchi et al., 1985).

5.2.1 ALCALOIDES PRESENTES EN LAS PARTES AEREAS.

La observación del cromatograma de gases generado por la mezcla alcaloidea preparada de las partes aéreas (Figura 16) reveló la existencia de cuatro constituyentes mayoritarios (compuestos a-d). Los tiempos de retención y los iones moleculares obtenidos de este análisis instrumental se compararon con los reportados en la literatura (Bicchi et al., 1985). Esos datos incluidos en el Cuadro 10 permitieron identificar a la integerrimina (2) como el constituyente mayoritario, con un 68.16% de los alcaloides totales aislados de estos órganos. También se identificaron a la senecionina (1), la retrorsina (3) y la usaramina (4) como constituyentes adicionales de la fracción alcaloidea obtenida de las partes aéreas de la *P. candidissima*.

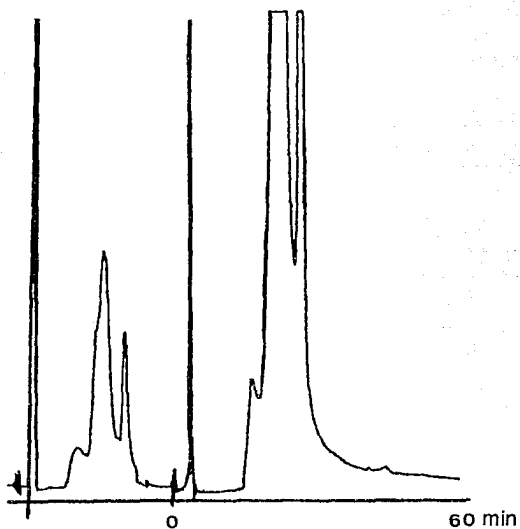


Figura 15. Cromatograma (HPLC) de la mezcla de alcaloides de las partes aéreas de *P. candidissima*. (Condiciones instrumentales, Véase sección 4.1.3).

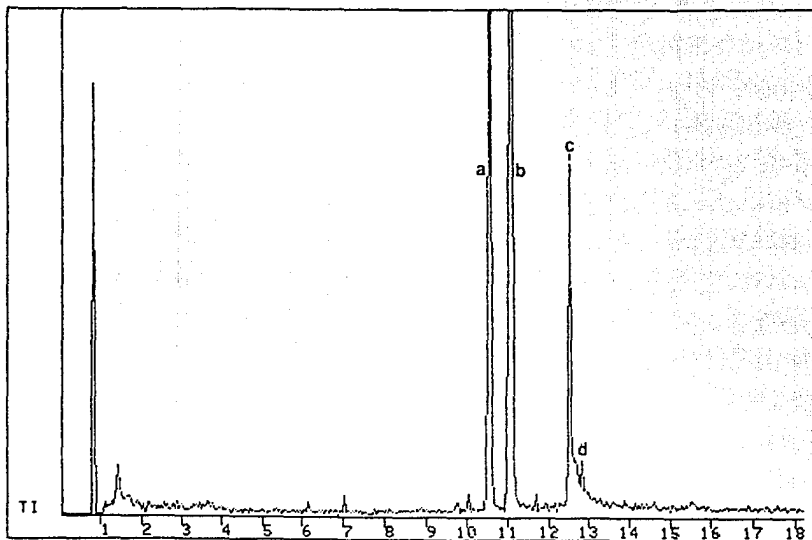


Figura 16. Cromatograma de gases de la mezcla de alcaloides de las partes aéreas de *P. candidissima*.

5.2.1.1 CARACTERIZACION DE LA MEZCLA FAP-4: IDENTIFICACION DE LA SENEACIONINA (1) Y LA INTEGERRIMINA (2).

El análisis por CG-EM de la banda de menor polaridad (R_f 0.63) (sección 5.1) obtenida de la fracción alcaloidea generó el cromatograma de la Figura 16, en el cual se aprecia la composición binaria de esta mezcla, con los tiempos de retención de 10.5 y 11.2 min. A pesar de numerosos intentos para lograr la resolución de esta mezcla FAP-4, no se encontró ningún sistema adecuado de eluyentes para resolver los dos constituyentes por ccf, por lo cual se registraron los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C de la mezcla para poder caracterizar inequívocamente a sus dos constituyentes. Estos espectros (Espectros No.1 y 2) permitieron identificar la presencia de los isómeros cis y trans que correspondieron respectivamente a la senecionina (1) y a la integerrimina (2) cuya relación de abundancia de 1:3 se verificó mediante la comparación de las áreas de integración de sus respectivas señales.

Cuadro 11. Composición de la fracción alcaloidea de las partes aéreas de *P. candidissima*.

Compuesto identificado	Nombre	R_t (min)	m/e (M^+)	Concentración %
a	Senecionina	10.5	335	23.80
b	Integerrimina	11.2	335	68.16
c	Retrorsina	12.5	351	7.09
d	Usaramina	12.9	351	0.95

El espectro de RMN de ^1H permitió distinguir fácilmente a los dos isómeros E y Z mediante la absorción del protón H-20 (Joseph-Nathan y Manjárez, 1967; Gusten y Salzwedel, 1967), cuya señal aparece como un cuarteto a $\delta = 6.48$ ppm para el isómero E (compuesto 2, $\text{R}_1=\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$). Mientras la señal correspondiente en el isómero Z (compuesto 1, $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$) apareció en $\delta = 5.75$ ppm. Cabe recordar que esta asignación se hace con base en la desprotección adicional del H-20 en el isómero E debido a su posición vecinal al carboxilato (Figura 18).

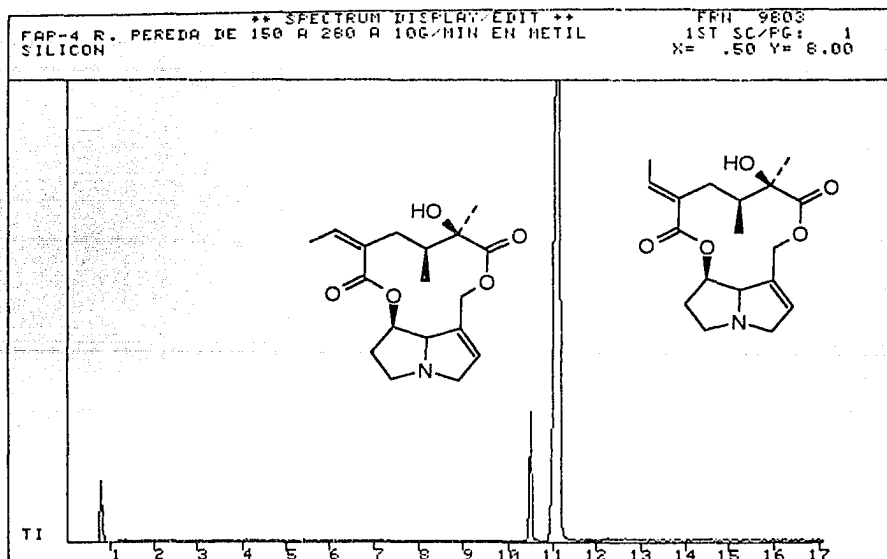
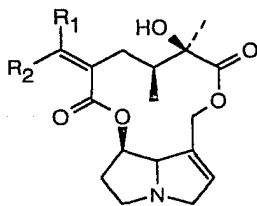
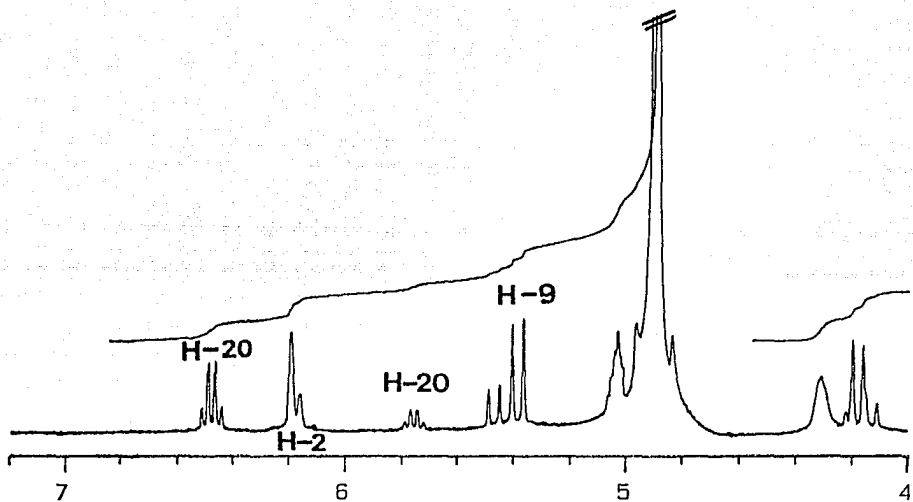


Figura 17. Cromatograma de gases de la mezcla alcaloidea FAP-4.



$R_1=H$, $R_2=CH_3$ (Senecionina)

$R_1=CH_3$, $R_2=H$ (Integerrimina)

Figura 18. Región vinílica del espectro de RMN de 1H de la mezcla FAP-4.

De manera adicional, se observaron las señales diagnósticas de los núcleos H-2 en 6.19 y 6.16 ppm para los isómeros E y Z respectivamente. Los dos hidrógenos diastereotópicos del metileno en C-9 que forman un sistema AB, aparecieron como dobletes, con un $\Delta\delta$ de 1.21 ppm para el constituyente mayoritario y 1.33 ppm para la senecionina minoritaria. Las constantes espectroscópicas de RMN de ^1H de los dos constituyentes de la mezcla FAP-4 se incluyen en el Cuadro 11. El espectro de RMN de ^{13}C -APT (Espectro 2) confirmó la asignación propuesta para los dos isómeros 1 y 2.

Esta mezcla de senecionina (1) e integerrimina (2) se sometió a una cristalización fraccionada de acetona, la cual condujo a la obtención de la integerrimina en forma pura. El cromatograma del componente así obtenido mostró una sola señal con el tiempo de retención de 11.2 min (Figura 19).

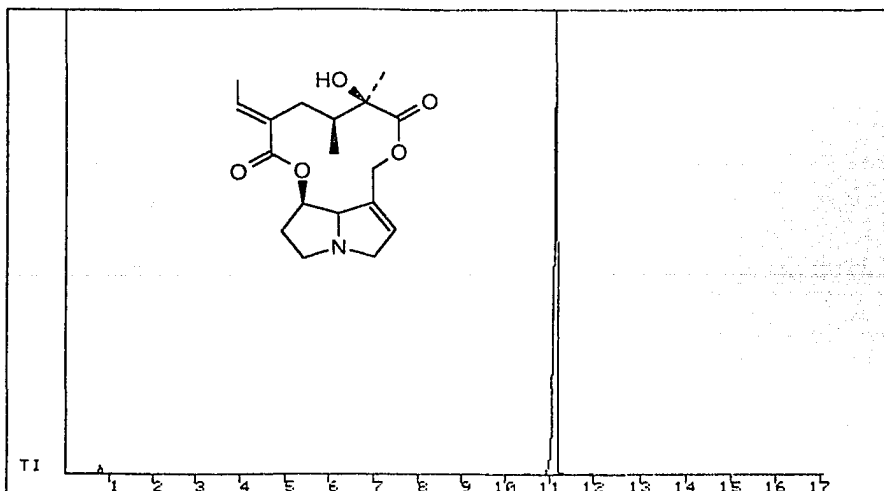


Figura 19. Cromatograma de gases del residuo obtenido de la cristalización fraccionada de la mezcla FAP-4

5.2.1.2 CARACTERIZACION DE LA MEZCLA FAP-6: IDENTIFICACION DE LA RETRORSINA (3) Y LA USARAMINA (4).

La banda de mayor polaridad en el cromatograma de la Figura 14 se aisló y se caracterizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la banda FAP-4 (véanse Secciones 5.1 y 5.2.1.1 y Espectros 3 y 4).

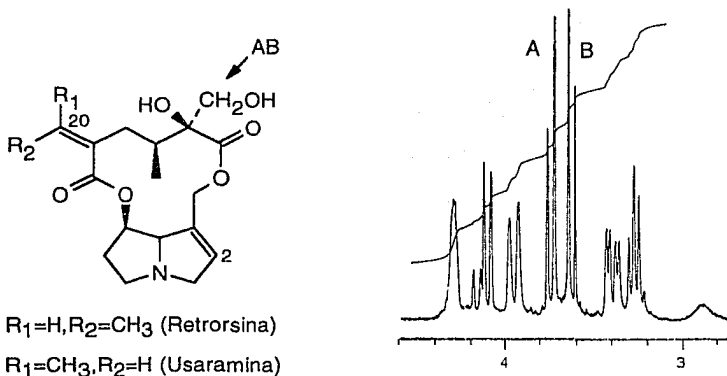


Figura 20. Porción del espectro de la mezcla FAP-6 (Espectro 3) que muestra el sistema AB formado por el metileno 18.

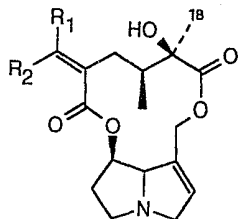
La observación del espectro de RMN de 1H (Espectro 3) permitió concluir que la banda FAP-6 correspondía también a una mezcla de dos isómeros cis y trans. Sin embargo, en esta ocasión el isómero Z representó el constituyente mayoritario.

Los espectros de masas de los dos compuestos incluidos en esta mezcla mostraron un ión molecular de 351 unidades de m/e y por lo tanto indicaban la oxidación adicional de la senecionina (1) y la integerrimina (2) ($M^+=335$) a los correspondientes hidroximetileno. Esto se confirmó por la ausencia en el espectro de RMN de 1H de la mezcla FAP-6 del singulete en 1.32 ppm

asignable al metilo 18 de la integerrimina y por la aparición del sistema AB de un grupo hidroximetileno en C-18 centrado en $\delta = 3.64$ ppm y $\delta = 3.68$ ppm (Figura 20). Esta asignación se verificó también en la RMN de ^{13}C (Espectro 4). Así, al comparar los espectros para la mezcla FAP-4 con el obtenido para FAP-6, se aprecia la señal en 25.4 ppm presente en FAP-4 que se asigna al metilo 18 de la integerrimina así como la presencia del hidroximetileno en 68 ppm en el espectro de FAP-6 (Figura 20). Este análisis permitió concluir que la mezcla FAP-6 estaba formada por la retrorsina (3) y la usaramina (4). Las intensidades relativas de las señales se utilizaron nuevamente para determinar la proporción de los constituyentes individuales de esta mezcla.

Mediante técnicas de cristalización fraccionada de la mezcla FAP-6 en acetona, se logró obtener en forma pura al constituyente mayoritario, la retrorsina (3), y de esta forma verificar la estructura propuesta mediante el análisis de sus espectros de RM homonuclear y heteronuclear bidimensionales registrados en CDCl_3 . El espectro de correlación bidimensional ^1H - ^{13}C de la retrorsina se ilustra en la Figura 21. Este espectro permitió distinguir los carbonos 2 y 20, generalmente intercambiados en las asignaciones descritas en la literatura (Drewes et al., 1981; Zalkow et al., 1988).

R₁=H, R₂=CH₃ (Senecionina)
 R₁=CH₃, R₂=H (Integerrimina)



R₁=H, R₂=CH₃ (Retrorsina)
 R₁=CH₃, R₂=H (Usaramina)

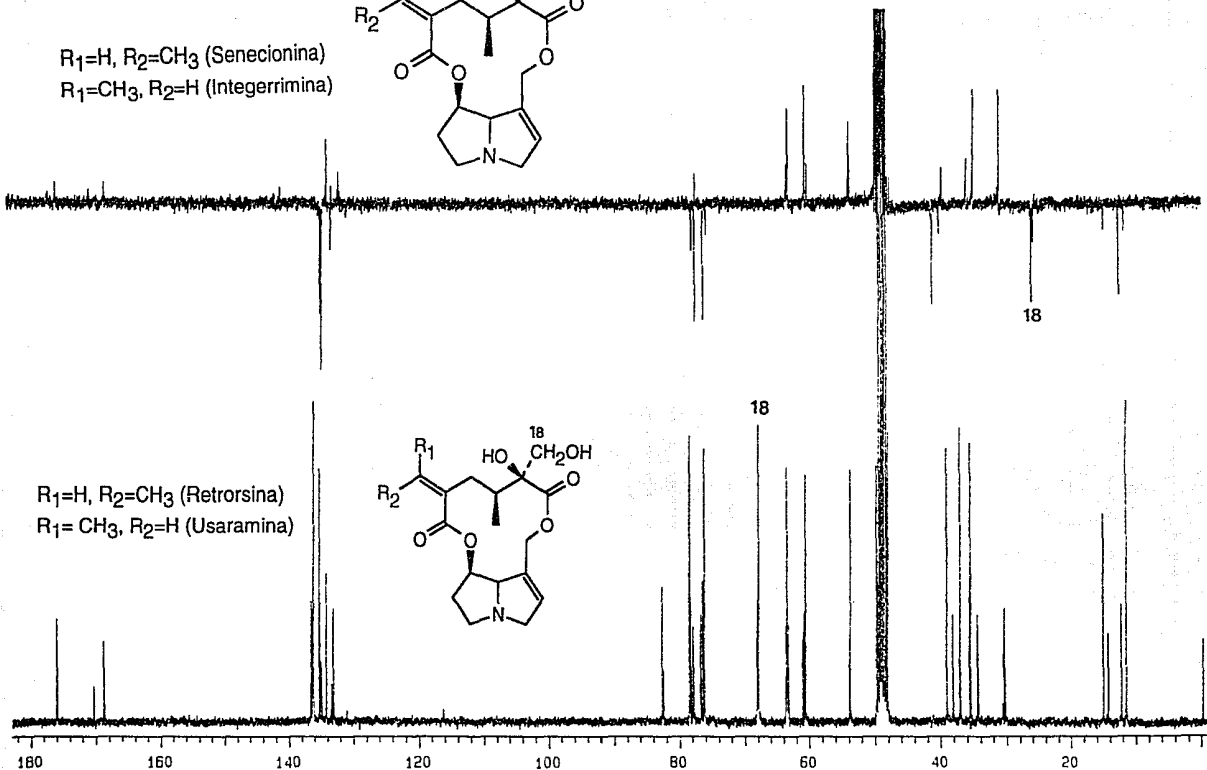
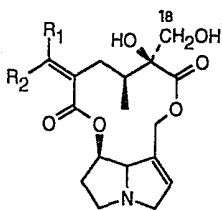


Figura 21. Comparación de los dos espectros de RMN de ¹³C de las mezclas
 FAP-4 (Espectro A) y FAP-6 (Espectro B).

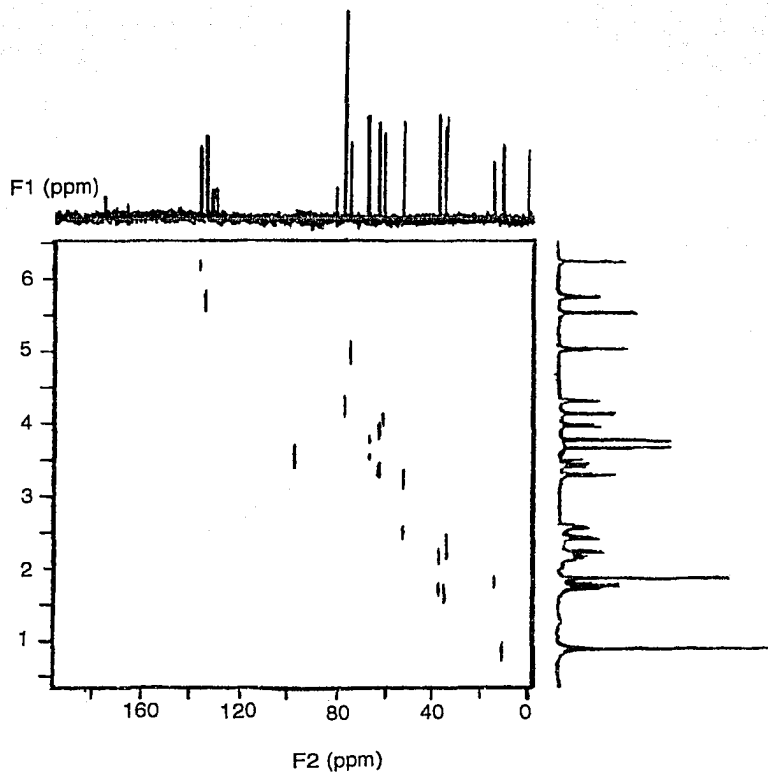


Figura 22. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C (HETCOR) de la retrorsina.

Cuadro 12. RMN de ^1H de los alcaloides 1, 2, 3 y 4 aislados de *P. candissimaa* (300 Mhz, δ (ppm). CDCl_3 , TMS) (Espectros 1 y 3)*.

^1H	Integerrimina	Senecionina	Retrorsina	Usaramina
2	6.19 sa	6.16 sa	6.21 sa	6.18 sa
3a	3.9 dm (14.16)	3.9 dm (14.16)	3.95 d (15.9)	3.95 d (15.9)
3b	3.38 dd (14.16; 6.2)	3.38 dd (14.16; 6.2)	3.39 dd (15.9; 6)	3.39 dd (15.9; 6)
5a	3.20-3.24 m	3.20-3.24 m	3.28 t (8.5)	3.28 t (8.5)
5b	2.06 m	2.06 m	2.53 m	2.53 m
6a	2.41 m	2.40 m	2.34dd (13.86; 5.65)	2.34 dd(13.86;5.65)
6b	2.06 m	2.06 m	2.13 m	2.13 m
7	5.03 m	5.03 m	5.02 t(3.3)	5.02 t(3.3)
8	4.30 m	4.30 m	4.29 d(2.14)	4.29 d(2.14)
9a	5.38d (11.7)	5.46 d (11.7)	5.50 d (11.7)	5.43 d (1.9)
9b	4.17 d (11.7)	4.13 d (11.7)	4.10 d (11.9)	4.16 d (12.07)
13	1.70 m	1.70 m	1.60-1.8 m	1.60-1.80 m
14a	2.20 da (10.38)	2.24 dm (10.38)	2.20 m	2.18 m
14b	1.68 m	1.70 m	1.60-1.80 m	1.60-1.80 m
18a	1.32 s	1.32 s	3.74 d (11.3)	3.74 d (11.3)
18b	1.32 s	1.32 s	3.63 d (11.3)	3.63 d (11.3)
19	0.87 d (6.76)	0.87 d (6.76)	0.86 d (6.25)	0.86 d (6.25)
20	6.48 c (7.08)	5.75 c (7.08)	5.73 c (6.86)	6.53 c (6.9)
21	1.74 d (7.08)	1.80 dd (7.16; 1.6)	1.84 dd (7.02; 1.37)	1.84 dd (7.16; 1.6)

* Constantes de acoplamiento en Hz, entre parentesis .

5.2.2 ALCALOIDES PRESENTES EN LA RAIZ.

El análisis mediante CG de la mezcla de alcaloides obtenida a partir de la raíz de *Packera candidissima* mostró una composición compleja de la misma. El cromatograma obtenido (Figura 23) indicó la presencia de por lo menos cinco constituyentes principales. La retrorsina (1) y la usaramina (2), identificadas como los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas, se encontraron en concentraciones sumamente bajas. El constituyente de mayor proporción en la mezcla correspondió al tiempo de retención de 12 min, el cual no estaba presente en las partes aéreas. A través del ión molecular observado de m/e 365 y el patrón de fragmentación detectado se propuso la estructura de la senkirquina (5) (Bicchi et al., 1985) para este componente mayoritario de las raíces.

De nuevo, la identificación de los alcaloides se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y los iones moleculares obtenidos en las condiciones experimentales descritas (ver sección 4.1.2) con las reportadas en la literatura (Bicchi et al., 1985) para cada uno de los compuestos (Cuadro 13). Esta observación permitió identificar a la senkirquina como el constituyente mayoritario, con un 53.48% del total de alcaloides. De manera adicional, se identificaron a la senecionina (1) y a la integerrimina (2) en las proporciones de 10 y 12%, respectivamente. Dos alcaloides adicionales de mayor polaridad con los tiempos de retención de 14.4 y 15.7 min y que en su conjunto representaron la cuarta parte del total de alcaloides, no pudieron ser identificados, debido a que no se detectaron sus iones moleculares.

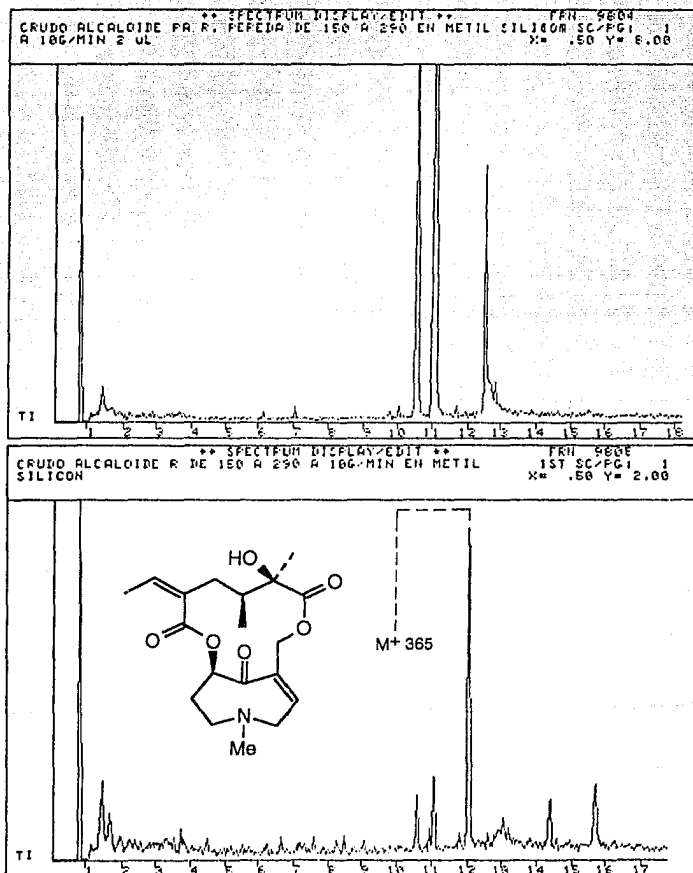
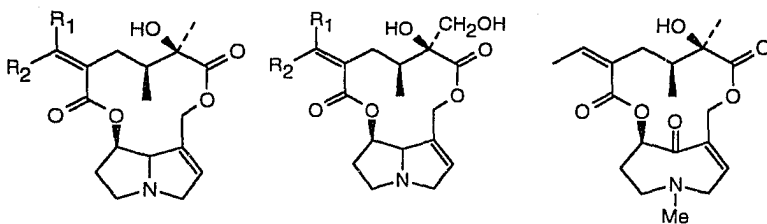


Figura 23. Cromatogramas comparativos de los extractos alcaloides de las partes aéreas (PA) y de las raíces (R) de *P. candidissima*.

Cuadro 14. Composición de la fracción alcaloidea de la raíz de *P. candidissima*.

Compuesto identificado	Nombre	Rt (min)	m/e (M ⁺)	Concentración (%)
a	Senecionina	10.6	335	10.34
b	Integerrimina	11.0	335	12.15
e	Senkirikina	12.0	365	53.48
f	No identificado	14.4	No Obs.	8.70
g	No identificado	15.7	No Obs.	15.33



R₁=H, R₂=CH₃

(Senecionina)

R₁=CH₃, R₂=H

(Integerrimina)

R₁=H, R₂=CH₃

(Retrorsina)

R₁=CH₃, R₂=H

(Usaramina)

Senkirikina

Figura 24. Alcaloides pirrolizidínicos identificados en la *P. candidissima*

5.3. IDENTIFICACION DE ALGUNOS CONSTITUYENTES NEUTROS. CARACTERIZACION DE LA NEOADENOSTILONA Y LA EPINEO- ADENOSTILONA.

A pesar de que los extractos orgánicos neutros obtenidos de las raíces y las partes aéreas de *P. candidissima* no presentaron una actividad significativa en el ensayo de *A. salina*, se decidió purificar y caracterizar sus constituyentes mayoritarios con el objeto de confirmar la relación filogenética de esta especie con el género *Senecio*. Para el logro de este objetivo, se llevó a cabo un análisis de los extractos mediante ccf, utilizando varios sistemas de eluyentes (secciones 4.3.2 y 4.3.3). Se estableció que estos extractos contenían principalmente dos bandas visibles en el UV que correspondieron a los Rf de 0.33 y 0.67 (Acetona- CHCl_3 , 5:95) (Figura 25). La banda de mayor polaridad se descartó debido a su gran inestabilidad. La banda con el factor de retención de 0.67 se purificó mediante sucesivas cromatografías en columna y en capa fina. Estos procedimientos condujeron al aislamiento a partir de la raíz del aceite PC-26 II y a partir de las partes aéreas del aceite PC-536. Posteriormente se determinó que ambos constituyentes neutros eran idénticos. Este aceite fue ópticamente activo y consistió de una mezcla de compuestos, los cuales fueron caracterizados como furanoeremofilanos mediante sus constantes espectroscópicas de IR, UV y RMN así como por su espectrometría de masas.

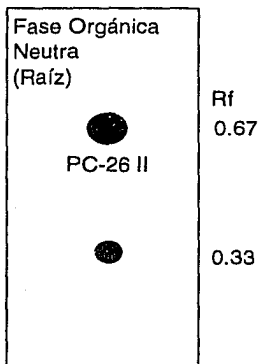


Figura 25. Reproducción de la ccf del residuo orgánico neutro obtenido de la *P. candidissima*.

El análisis de la mezcla mediante CG acoplada con la espectrometría de masas generó el cromatograma de la Figura 26 en el cual se aprecia la composición binaria del aceite PC-26 II. Estos compuestos con los tiempos de retención de 13.38 y 14.06 min correspondieron a dos epímeros cuya fórmula molecular fue determinada mediante espectrometría de masas por impacto electrónico (EM/IE). El ión molecular observado de 328 unidades de m/e permitió calcular la fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_4$ para los dos epímeros. El patrón de fragmentación observado para ambos era idéntico, difiriendo solamente en las abundancias relativas de los fragmentos, en especial los correspondientes al pico base. De manera adicional, la generación de los fragmentos de m/e 246 y 228 producidos por la pérdida de 82 y 100 unidades de masa atómica, respectivamente, y que correspondieron a la eliminación de una cetena $O=C(CH_3)-CH=CH_2$ y del ácido angélico $CH_3-CH=C(CH_3)-COOH$ a partir del ión molecular (Figura 27) constituyeron una evidencia adicional para la fórmula molecular propuesta.

El espectro UV del aceite mostró un máximo de absorción de $\lambda = 302$ nm

lo cual sugiere la presencia de varios cromóforos conjugados y otro a 220 nm (Cuadro 15) (Novotny et al. 1964; Rodriguez-Hahn et al., 1968; Harmatha et al., 1969).

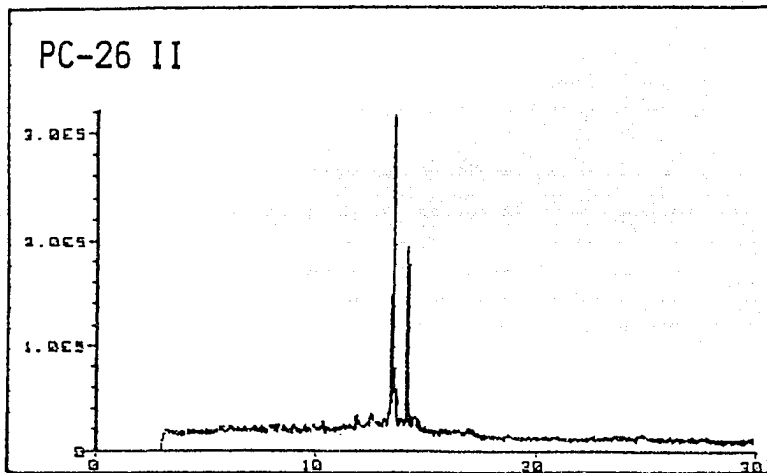


Figura 26. Análisis por CG-EM que muestra la composición binaria del aceite PC-26 II.

El espectro IR (Espectro 5) presentó las bandas características de un anillo de furano en 1600, 1535 y 890 cm^{-1} así como las bandas correspondientes a una cetona $\alpha,\beta,\alpha',\beta'$ -insaturada en 1680 y 1630 cm^{-1} . Además se observaron las absorciones correspondientes a los alargamientos de carbonilo de un éster α,β -insaturado en 1720 cm^{-1} (Cuadro 15) (Rodríguez-Hahn et al., 1968, Harmatha et al., 1969).

Del espectro de RMN de ^1H (Espectro 6), se determinó que el aceite correspondía a una mezcla de compuestos estrechamente relacionados, cuyos

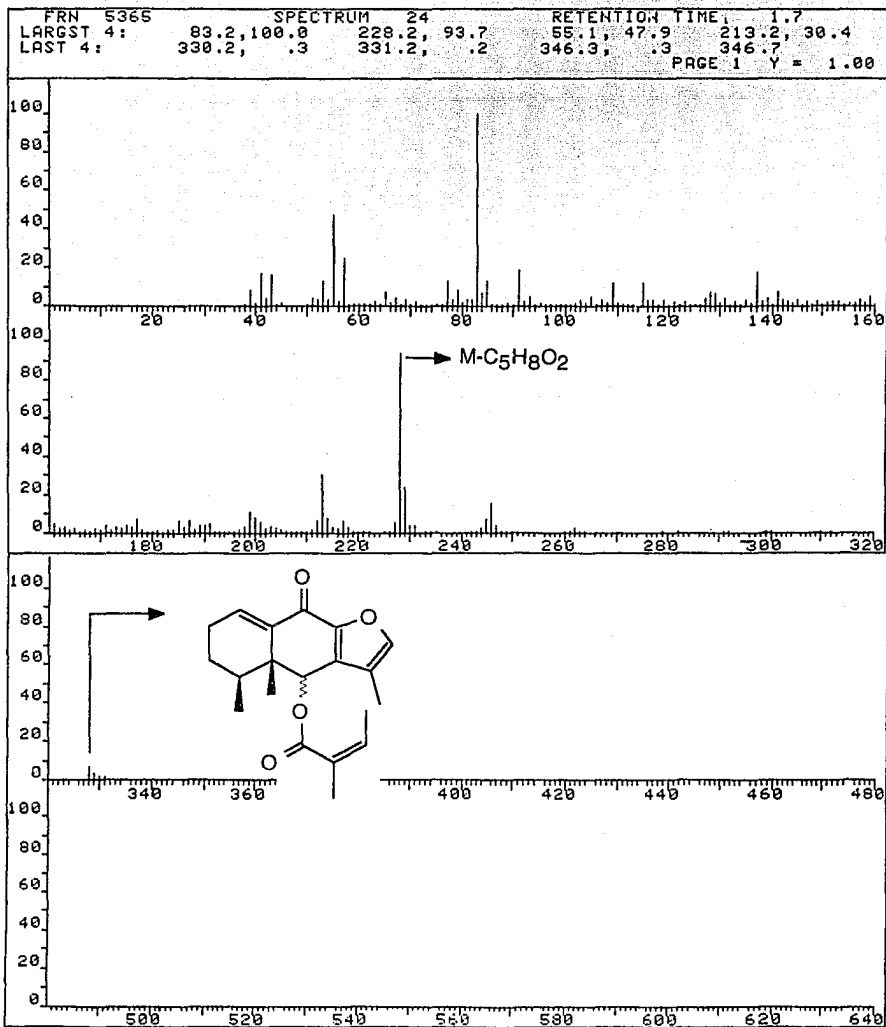
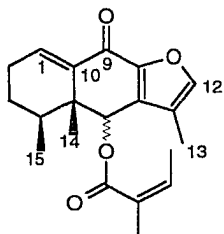


Figura 27. Espectro de masas del aceite PC-26 II.

esqueletos estructurales consistían de sesquiterpenos del tipo furanoeremofilanos (estructuras 26 y 27; Figura 27) los cuales como es sabido se producen en la ruta biosintética del acetato-mevalonato.

Los esqueletos estructurales antes mencionados se propusieron en base a la observación en la RMN de ^1H de las señales diagnósticas siguientes (Figura 29):



(26) 6 β -Angeloiloxi-

(27) 6 α -Angeloiloxi-

Figura 28. Furanoeremofilanos aislados de la *P. candidissima*.

1. Dos singuletes en 1.16 ppm (3H) y 1.11 ppm (3H) asignados a dos metilos terciarios ($\text{C}_5\text{-Me}$).

2. Dos dobletes entre 0.96 y 1.04 ppm que fueron asignados a los metilos sobre C_4 . Se identificó además la presencia de un grupo angeloilo mediante la observación de las absorciones correspondientes a los protones respectivos de dicho grupo en la RMN de ^1H (Figura 30). De esta manera, el protón vinílico H-3' para los dos compuestos apareció a $\delta=6.30$ ppm (2H, cc, $J=7.17$ y 1.5 Hz). La correlación bidimensional en la RMN ^1H (2D-COSY) (Figura 31) fue especialmente útil para la ubicación de los núcleos H-13, así como los núcleos H-2a,2b, H-3a,3b, H-4, H-15, H-4' y H-5'.

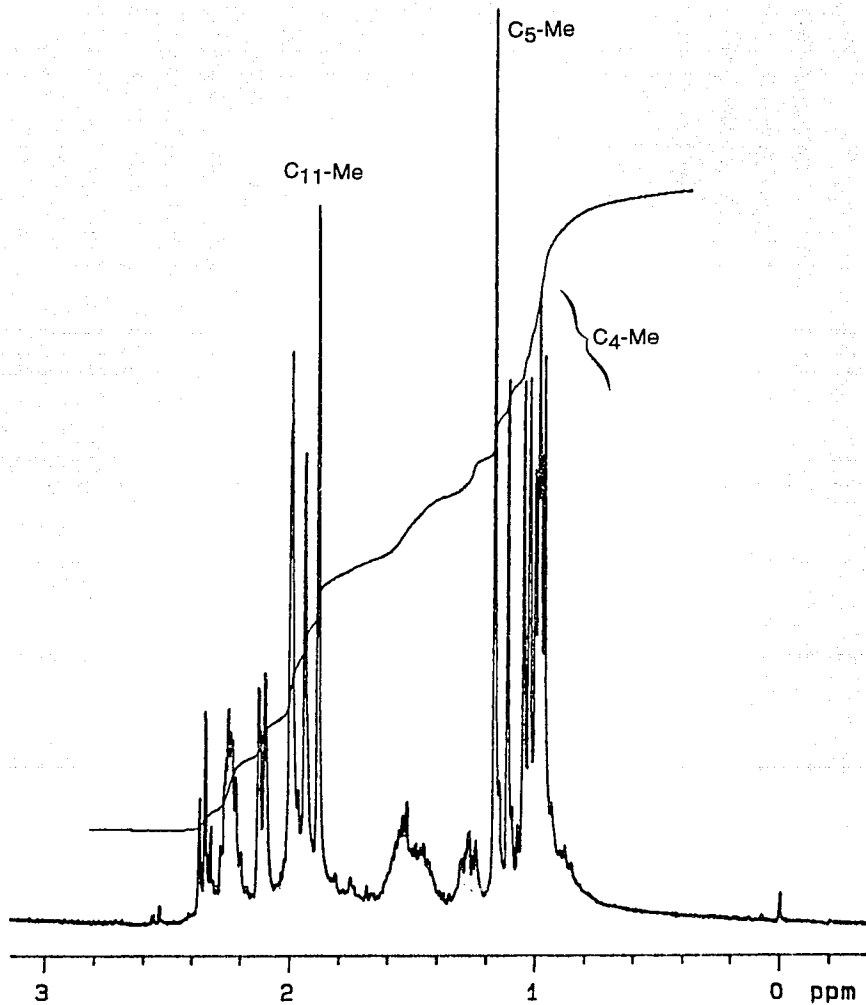


Figura 29. Región de campo alto (RMN^{-1}H) de la mezcla PC-26 II.

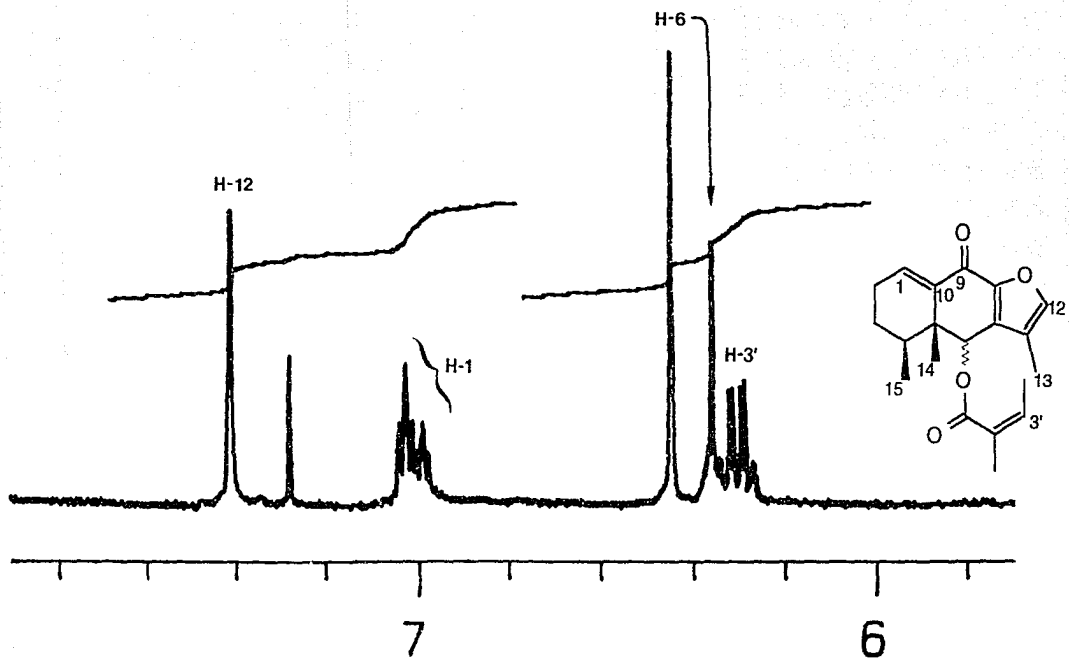


Figura 30. Región vinílica del espectro de RMN ^1H (Espectro 6) del constituyente PC-26 II.

De esta forma, el cuadro de conectividad observado entre el núcleo H-3' y el multiplete centrado en 2.11 ppm (dc), así como las constantes de acoplamiento calculadas de 7.17 y 1.5 Hz, permitieron asignar esta señal al metilo 4' y subsecuentemente el metilo 5' se localizó a $\delta = 1.99$ ppm.

La región vinílica del espectro de RMN de ^1H (Espectro 6) proporcionó la evidencia para confirmar la naturaleza insaturada del núcleo estructural sesquiterpénico de los dos epímeros, mediante la presencia de los dos tripletes centrados en 7.02 y 6.98 ppm. Por su desplazamiento químico y su multiplicidad, estas dos señales se atribuyeron a dos hidrógenos de cetonas α, β -insaturadas (Figura 30). Esta observación permitió ubicar el carbonilo en la posición 9 del esqueleto principal.

Por otra parte, los dos singuletes centrados en 6.44 (2H) y 6.35 ppm (1H) indicaban la sustitución por el angelato en la posición 6 y demostraban la presencia de la mezcla epimérica en este centro quiral.

La correlación bidimensional también mostró el acoplamiento entre el núcleo H-1 y el multiplete en 2.24 ppm, el cual debe corresponder a los protones H-2. Este resultado está de acuerdo con los valores reportados para estos dos núcleos (2.17 y 2.27 ppm) (Merikli et al., 1989) (Figura 31).

La interacción del Me en C-4 con el multiplete centrado en 1.99 ppm (sobrepuesto con la señal del Me en C_5) constituyó el argumento para asignar dicho multiplete al núcleo H-4 (Figuras 29 y 31).

Por último, el acoplamiento observado entre el H-2 y los multipletes centrados en 1.57 y 1.44 ppm permitieron asignar éstos a los núcleos H-3a y H-3b respectivamente para los dos epímeros.

La RMN de ^{13}C y ^{13}C -APT de la mezcla permitió corroborar las asignaciones propuestas para los dos compuestos (Espectro 7), mediante

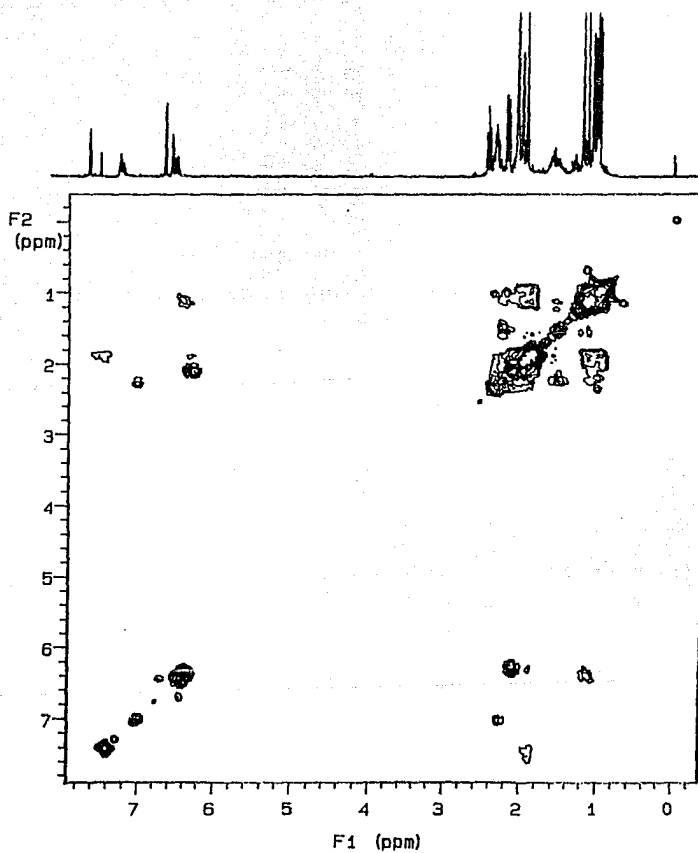


Figura 31. Espectro de correlación bidimensional (2D-COSY) protónica del aceite PC-26 II.

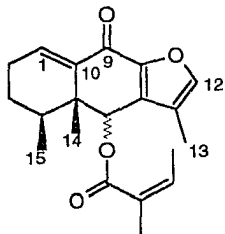
las señales de los carbonilos pertenecientes a las cetonas conjugadas en $\delta = 176.54$ y 176.78 ppm. Estos espectros mostraron también los pares de señales para los núcleos C-13 (8.4 y 8.7 ppm), C-4 (37.1 y 37.9 ppm) y C-6 (73.9 y 74.2 ppm) que reflejaron las proporciones de $1:1.14$ entre los dos epímeros.

Por otra parte, el singulete ancho en el espectro de RMN de ^1H (Espectro 6, Cuadro 15) a $\delta = 7.40$ ppm, el único protón aromático, así como el singulete en 1.88 ppm permitieron establecer la sustitución por el grupo metilo en la posición 11 sobre el anillo de furano.

El cuadro 15 incluye el valor de la rotación óptica y algunas constantes espectroscópicas de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27), los dos furanoeremofilanos aislados de la *P. candidissima*. Los cuadros 16 y 17 incluyen los valores para los desplazamientos químicos observados en la RMN- ^1H y ^{13}C para los dos compuestos epiméricos.

Es importante mencionar que la neoadenostilona (26) ha sido aislada en varias especies vegetales de la familia de las compuestas (Harmatha et al., 1969). Sin embargo, sus constantes espectroscópicas de RMN de ^{13}C (Espectro 7) no habían sido descritas con anterioridad. Por otra parte, el compuesto 27 resulta ser un nuevo metabolito secundario en la familia Asteraceae.

Cuadro 15. Constantes físicas y espectroscópicas (UV, IR y EM) de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27) aisladas de *P. candidissima*.



(26): Neoadenostilona (6 β -angeloiloxy)

(27): Epineoadenostilona (6 α -angeloiloxy)

Aceite

$$[\alpha]_D^{25} = -32.7^{\circ}$$

UV (CHCl₃) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm): 302, 220

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) (Espectro 5): 2965-2875, 1720, 1680, 1630, 1600, 1535,

890

EM/IE 70eV: m/e (% abund. rela.):

26:

328 M⁺ (8),

246 [M-82]⁺ (21)

228 [M-100]⁺ (83)

213 [228-15]⁺ (49),

137 [C₇H₅O₃]⁺ (18),

83 [C₄H₇CO]⁺ (9),

43 [C₃H₇]⁺ (100).

27:

328 M⁺ (8),

246 (42),

228 (97),

213 (57),

137 (21),

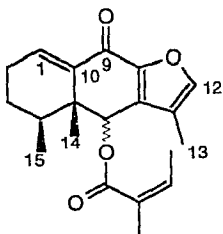
85 [C₄H₉CO]⁺ (52),

57 [85-CO]⁺ (100).

Cuadro 16. Valores para los desplazamientos químicos en la RMN- ^1H de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27) (300 MHz, δ (ppm), CDCl_3 , TMS) (Espectro 6)*.

H	26	27
1	7.02t (4.12)	6.98t (4.12)
2a	2.24 m	2.24 m
3a	1.57 m	1.57 m
3b	1.44 m	1.44 m
4	1.99 m	1.99 m
6	6.44 s	6.35 s
12	7.40 sa	7.40 sa
13	1.88 sa	1.93 sa
14	1.16 s	1.11 s
15	1.03 d (6.71)	0.97 d (6.71)
3'	6.29 cc (7.17; 1.5)	6.30 cc (7.32; 1.5)
4'	2.11 dc (7.17; 1.5)	2.11 dc (7.17; 1.5)
5'	1.99 dc (1.5; 1.5)	1.99 dc (1.5; 1.5)

*Constantes de acoplamiento, entre paréntesis.



(26): Neoadenostilona (6 β -angeloioloxo)

(27): Epineoadenostilona (6 α -angeloioloxo)

Cuadro 17. Valores de los desplazamientos químicos en la RMN- ^{13}C de la neoadenostilona (26) y la epineoadenostilona (27) (75.429 Mhz, δ (ppm), CDCl_3 , TMS) (Espectro 7).

C	26	27
1	141.55	141.55
2	27.91	27.80
3	25.14	24.77
4	37.87	37.14
5	43.36	46.62
6	73.86	74.16
7	135.94	135.80
8	141.274	141.274
9	176.54	176.78
10	141.274	141.274
11	120.97	121.11
12	138.14	137.93
13	8.39	8.69
14	17.48	17.48
15	15.87	15.66
1'	166.95	166.95
2'	126.91	126.91
3'	145.88	145.88
4'	20.55	24.84
5'	22.62	22.62

6. CONCLUSIONES

1 El análisis fitoquímico de la *P. candidissima* (Greene) Weber & Löve (Asteraceae) permitió determinar el perfil químico del metabolismo secundario de esta especie. Los constituyentes mayoritarios fueron caracterizados como alcaloides pirrolizidínicos (AP) y furanoeremofilanos, todos característicos del género *Senecio*. Por lo tanto, estos resultados no pueden ser utilizados como un criterio de tipo quimiotaxonómico que permita diferenciar a las especies incluidas en el género *Packera* de las pertenecientes a *Senecio*.

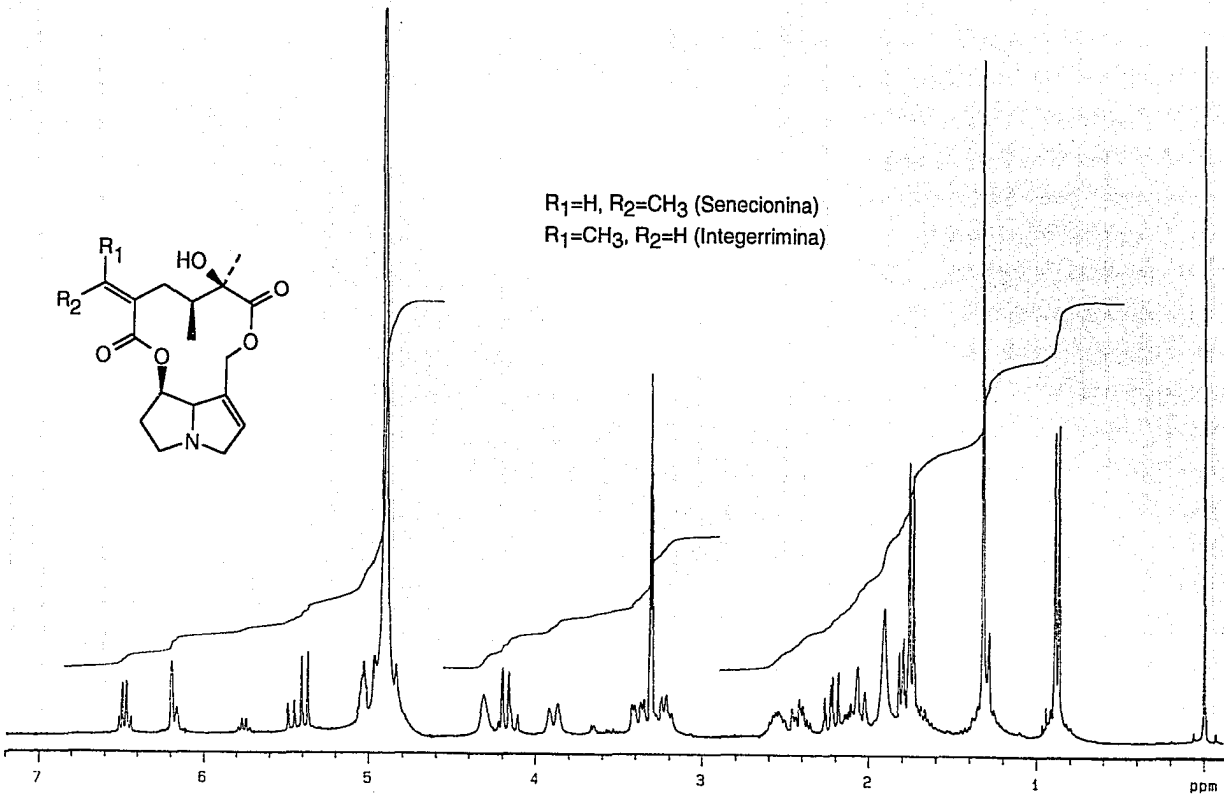
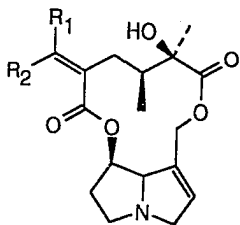
2 El empleo de la cromatografía de gases permitió cuantificar y caracterizar los alcaloides presentes en la *P. candidissima*. A pesar de que las partes aéreas presentan un menor contenido alcaloideo, éstas concentran el mayor potencial hepatotóxico de esta planta, ya que los alcaloides presentes en ellas, la senecionina (1), la integerrimina (2), la retrorsina (3) y la usaramina (4), son más tóxicos que la senkirina (5), alcaloide mayoritario en las raíces. Sin embargo, el empleo prolongado vía una administración oral de las infusiones y decocciones preparados a partir de ambos órganos provocarían los efectos crónicos conocidos. Esta toxicidad suele ser menor cuando estos remedios se aplican en forma de cataplasmas o lavados para las heridas de la piel o las infecciones de la vagina, debido a la poca absorción de los AP por esas vías.

3 Probablemente, la conclusión más importante que se deriva de los resultados obtenidos de la presente investigación está relacionada con el alto contenido de alcaloides tóxicos en esta planta, ya que se ha demostrado que la toxicidad de estos metabolitos secundarios ocasiona trastornos de tipo crónico que en la mayor parte de los casos no se asocia ni directamente, ni en primer instancia, al empleo de plantas medicinales productoras de alcaloides pirrolizidínicos. De tal suerte que las investigaciones conducentes a la valoración del potencial tóxico de plantas utilizadas tradicionalmente por las

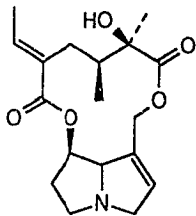
poblaciones indígenas, e incluso por la población no rural constituyen una señal de alerta que debe ser difundida mediante los mecanismos de salud pública apropiados.

ESPECTROS

R₁=H, R₂=CH₃ (Senecionina)
R₁=CH₃, R₂=H (Integerrimina)



ESPECTRO I

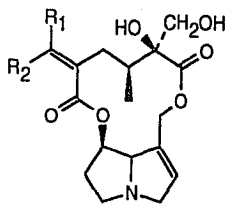


R₁=H, R₂=CH₃ (Senecionina)

R₁=CH₃, R₂=H (Integerrimina)

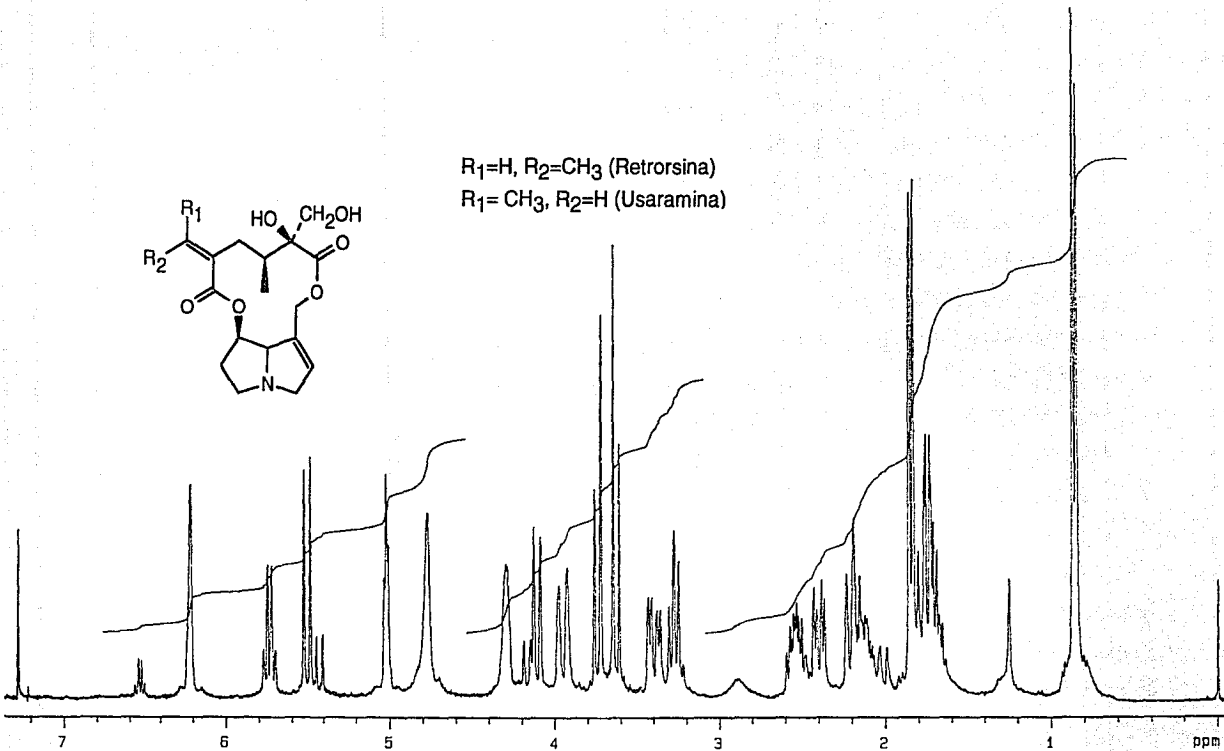
180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

ESPECTRO 2

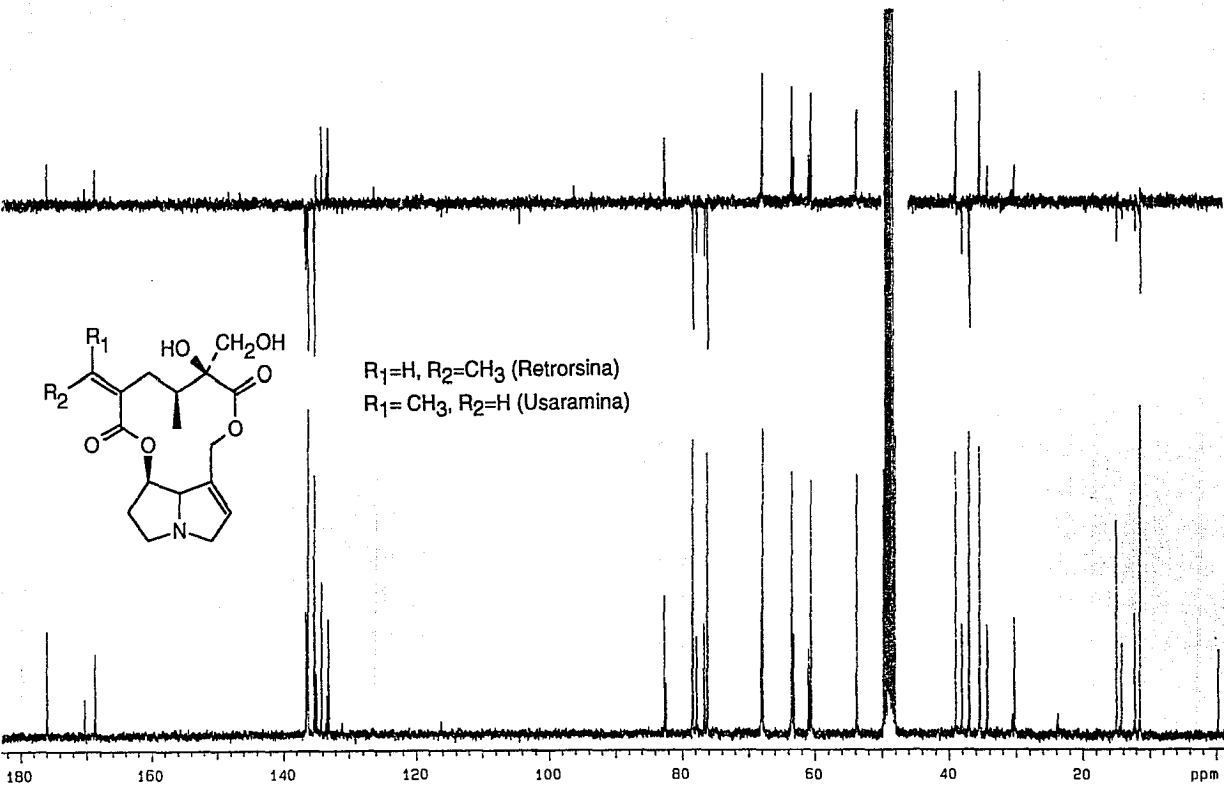


R₁=H, R₂=CH₃ (Retrorsina)

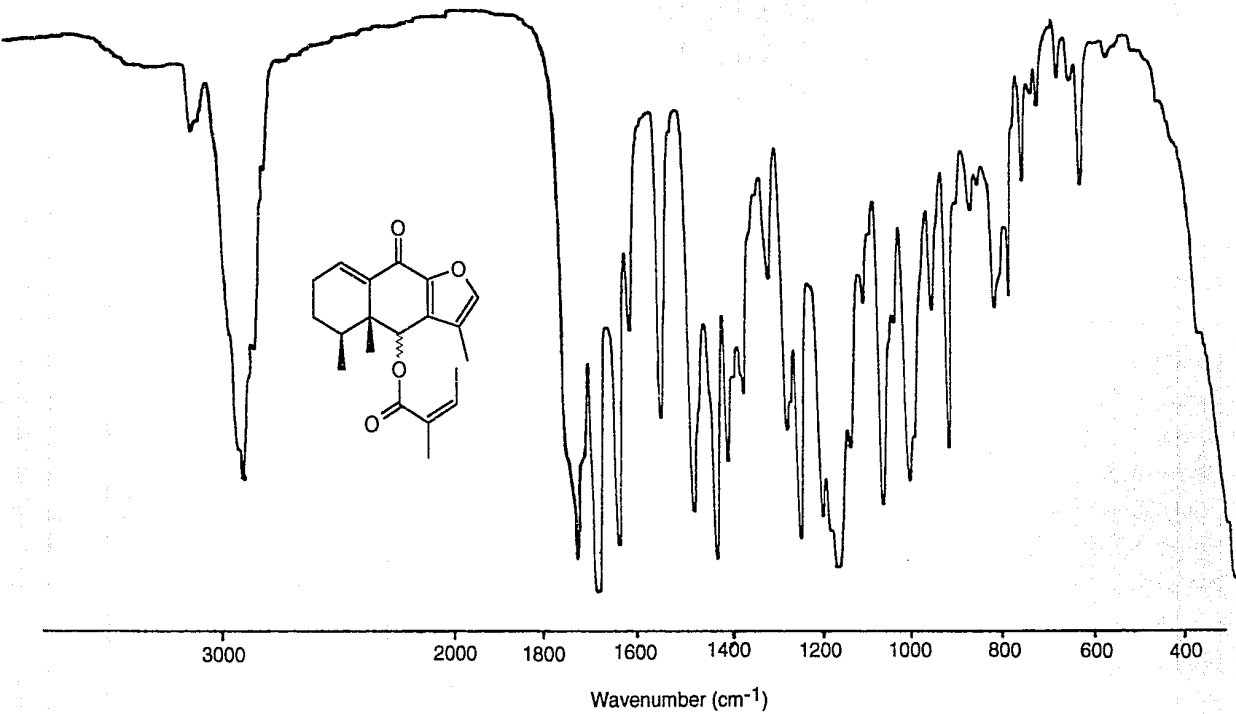
R₁=CH₃, R₂=H (Usaramina)



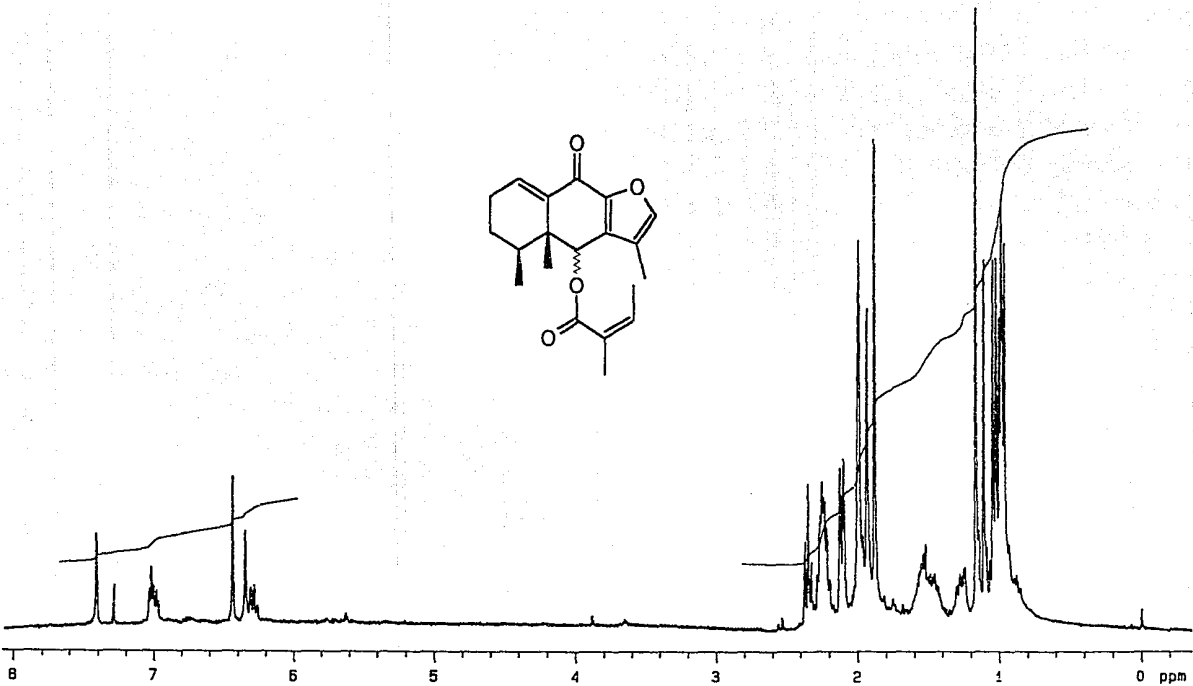
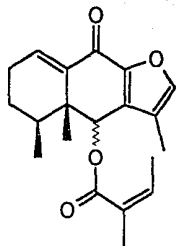
ESPECTRO 3



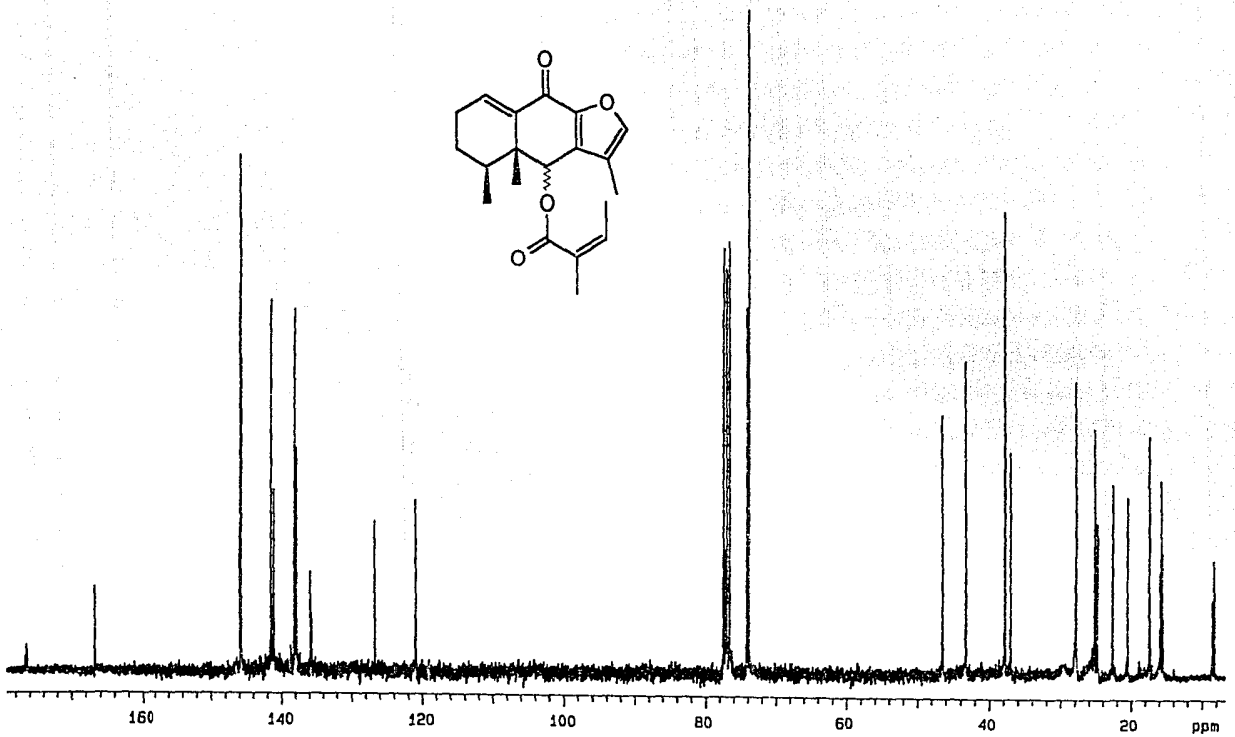
ESPECTRO 4



ESPECTRO 5



ESPECTRO 6



ESPECTRO 7

8. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L. y Suffness, M. (1991) A Blind Comparison of simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analysis* 2, 107-111.
- Anon. (1988) *Pyrrrolizidine Alkaloids*. Environmental Health Criteria, 80. World Health Organization, Geneva.
- Anon. (1989) Commercial potential of medicinal plants. *Scrip* 1400, 31.
- Bach, N., Thung, S.N. y Schaffner, F. (1989) Confrey herb tea-induced hepatic veno-occlusive disease. *American Journal of Medicine* 87, 97-99.
- Barkley, T.M. (1978) *Senecio*. *North American Flora*. Ser. II, Part 10, 50-139.
- Barkley, T.M. (1986) *Senecio in Great Plains Flora Association, Flora of the Great Plains*. Lawrence, K.S. University Press of Kansas, pp. 93-99.
- Bennet, W.C. y Zingg, R.M. (1935) *The Tarahumara, An Indian Tribe of Northern Mexico*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, p. 142.
- Bicchi, C., Caniato, R., Tabacchi, R. y Tsoupras, G. (1989a) Capillary gas chromatography/positive and negative ion chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio inaequidens* using ammonia and hydroxyl ions as the reagent species. *Journal of Natural Products* 52, 32-41.
- Bicchi, C., D'Amato, A. y Cappelletti, E. (1985) Determination of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio inaequidens* D.C. by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* 349, 23-29.
- Bicchi, C., Rubiolo, P. y Frattini, C. (1989b) Capillary gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio inaequidens* D.C. *Journal of Chromatography* 473, 161-170.

- Bicchi, C., Rubiolo, P., Frattini, C., Sandra, P. y David, F. (1991) Off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species. *Journal of Natural Products* 54, 941-945.
- Birecka, H., Frolich, M. y Glickman, L.M. (1983) Free and esterified necines in *Heliotropium* species from Mexico and Texas. *Phytochemistry* 22, 1167-1171.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Berger, D., Suwita, A., Mahanta, P. y Jeffrey, C. (1979) Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten. *Phytochemistry* 18, 79-93.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M. y Robinson, H. (1981) The first acetylenic monoterpene and other constituents from *Senecio Clevelandii*. *Phytochemistry* 20, 2425-2427.
- Bras, G. y Hill, K.R. (1956) Venno-occlusive disease of the liver. *Lancet* 2, 161-163
- Bras, G. Brooks, S.E.H. y Walter, D.C. (1961) Cirrhosis of liver in Jamaica. *Journal of Pathology and Bacteriology* 82, 503-512.
- Bras, G., Jelliffe, D.M. y Stuart, K.L. (1954) Venno-occlusive disease of liver with non-portal type of cirrhosis occurring in Jamaica. *Archive of Pathology* 57, 285-300.
- Bull, L.B., Culvenor, C.C.J. y Dick, A.T. (1968) *The Pyrrolizidine Alkaloids*. Amsterdam. Nort-Holland Publ.
- Bye, R. (1985). Medicinal plants of the Tarahumara Indians of Chihuahua, Mexico. In R.A. Tyson and D.V. Elerick (Eds.) *Two Mummies from Chihuahua, Mexico; A Multidisciplinary Study*. San Diego Museum of Man Papers No. 19. San Diego Museum of Man. San Diego, CA. pp. 77-104.

- Bye, R. (1986) Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40, 103-124.
- Chesney, C.F., Hsu, I.C. y Allen, J.R. (1984) Modifications of *in vitro* metabolism of the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids monocrotaline. *Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology* 8, 567-570.
- Coady, A. (1973) "Evidence for the exposure of human population in Ethiopia and elsewhere to liver toxins, including carcinogens of plant origin". Ph.D. Dissertation submitted to University of Manchester. Gran Bretaña.
- Culvenor, C.C.J. (1968) Tumor-inhibitory activity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 57, 1112-1117.
- Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Smith, L.W., Kumana, C.R. y Lin, H.J. (1986) *Heliotropium lasiocarpum* Fish and Mey identifies as cause of veno-occlusive disease due to a herbal tea. *Lancet*, 978.
- Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Smith, L.W. y Tweeddale, H.J. (1970a) Dihydropyrrolizidines. III. Preparation and reactions of derivatives related to pyrrolizidine alkaloids. *Australian Journal of Chemistry* 23, 1853-1867.
- Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Smith, L.W. y Tweeddale, H.J. (1970b) Dihydropyrrolizidines. IV. Manganese dioxide oxidation of 1,2-dihydropyrrolizidines. *Australian Journal of Chemistry* 23, 1869-1879.
- Culvenor, C.C.J. y Smith, L.W. (1957) The Alkaloids of *Crotolaria retusa* L. *Australian Journal of Chemistry* 10, 464-473.
- Datta, D.V., Khurro, M.S., Mattocks, A.R., Aikat, B.K. y Chhuttani, P.N. (1978) Herbal medicines and veno-occlusive disease in India. *Postgraduate Medical Journal* 54, 511-515.
- Deinzer, M.L., Arbogast, B.L., Buhler, D.R. y Cheeke, P.R. (1982) Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Analytical Chemistry* 54, 1811-1814.

- De Peyer, R. y Schindler, A.M. (1987) Hepatomegalie et ascite soudaines chez un carreleur portugais et son fils. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 117, 767-772.
- Dickinson, J.O., Cooke, M.P., King, R.R. y Mohamed, P.A. (1976) Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *Journal American Veterinary Medical Association*. 169, 1192-1196.
- Dimenna, G.P., Krick, T.P. y Segall, H.J. (1980) Rapid high-performance liquid chromatography isolation of monoesters, diesters and macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* and *Amsinkia intermedia*. *Journal of Chromatography* 192, 474-478.
- Drewes, S.E. Antonowitz, I., Kaye, P. y Coleman, P.C. (1981) ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of the *Senecio* alkaloids, Retrorsine, Isoline, and Hygrophylline. *Journal of The Chemical Society. Perkin Transaction I*, 287-289.
- Farnsworth, N. (1985) Plants and modern medicine: where science and folklore meet. *World Health Forum* 6, 76-80.
- Felger, R.S. and Moser, B.M. (1974) Seri Indian pharmacopea. *Economic Botany* 28, 414.
- Fox, D.W., Hart, M.C., Bergeson, P.S., Jarrett, P.B., Stillman, A.E. y Huxtable, R.J. (1978) Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye's syndrome. *Journal of Pediatrics*. 93, 980-982.
- Gelbaun, L.T., Gordon, M.M., Miles, M. y Zalkow, L.H. (1982) Semisynthetic Pyrrolizidine Alkaloid Antitumor Agents. *The Journal of Organic Chemistry* 47, 2501-2504.
- Gori, G. y Richter, B. (1978) Macroeconomics of disease prevention in the United States. *Science* 200, 1124-1130.

- Gupta, P.S., Gupta G.D. y Sharma, M.L. (1963) Veno-occlusive disease of the liver. *British Medical Journal* 1, 1184-1186.
- Güsten, H. y Salzwedel, M. (1967) Die Kernmagnetischen Resonanzspektra Substituierter Cis-Stilbene. *Tetrahedron* 23, 187-191.
- Harmatha, J., Samek, Z., Novotny, L., Herout, V. y Sorm, F. (1969) The structure of adenostylone, isoadenostylone and neoadenostylone-Components of the rhizomes of *Adenostyles alliariae* (Gouan) Kern. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 34, 1739-1749.
- Hawthorne, S.B., Krieger, M.S. y Miller, J. (1987) Directly coupled supercritical fluid extraction-gas chromatographic analysis of pyrrolic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from environmental solids. *Journal of Chromatography* 403, 63-67.
- Heath, D., Shaba, J., Williams, A., Smith, P. y Kombe, A. (1975) A pulmonary hypertension-producing plant from Tanzania. *Thorax* 30, 399-404.
- Hill, K.R., Rhodes, K. Stafford, J.L., y Aub, R. (1951) Liver disease in Jamaican children (serous hepatitis). *West Indian Medical Journal* 1, 49-63.
- Huang, L., Wu, K.-M., Xue, Z., Cheng, J.-C., Xu, L.-Z., Xu, S.-P. y Xi, Y.-G. (1980) Isolation of antitumor active principle of *Crotalaria sessiliflora* and synthesis of its derivatives. *Chemical Abstracts* 95, 43427 (1981).
- Huizing, H.J., (1880) Chloranil, a sensitive detection reagent for pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography* 195, 407-411.
- Huizing, H.J. y Malingré Th.M. (1981) Ion pair adsorption chromatography of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chromatography* 205, 218-222.
- Hutchens, A.R. (1983) *Indian Herbology of North America*, 9th ed., Merco, Windsor, Ontario.

- Huxtable, R.J. (1980a) Herbal teas and toxin: Novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspectives in Biology and Medicine* 24, 1-14.
- Huxtable, R.J. (1980b) Problems with pyrrolizidines. *Trends Pharm. Sc.* 1, 299-303.
- Huxtable, R.J., (1989) Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: P.R. Cheeke (Ed.), *Toxicants of plant origin, Vol. I. Alkaloids*, CRC Press, Boca Raton, pp. 41-86.
- Huxtable, R.J. (1990a) The harmful potential of herbal and other plant products. *Drug Safety* 5, (Suppl. 1), 126-136.
- Huxtable, R.J., (1990b) Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmac. Ther.* 47, 371-389.
- Huxtable, R.J., Stillman, E.A. y Ciaramitaro, D. (1977) Characterization of alkaloids involved in human *Senecio* (Pyrrolizidine) poisoning. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 20, 455-459.
- Jago, M.V., Edgar, J.A., Smith, L.W. y Culvenor, C.C.J. (1970) Metabolic Conversion of Heliotridine-Based Pyrrolizidine Alkaloids to Dehydroheliotridine. *Molecular Pharmacology* 6, 402-406.
- Janda, V., Steenbeke, G. y Sandra, P. (1989) Supercritical fluid extraction of 5-triazine herbicides from sediment. *Journal of Chromatography* 479, 200-205.
- Jephcott, A.E., Barton, B.W., Gilbert, R.J. y Shearer, C.W. (1977) A closely related *B. subtilis* and foodborne illness. *Lancet* 2, 129-130.
- Johson, B. y Packer, J.C. (1968) Chromosome numbers in the flora of Ogotoruk Greek, N.W. Alaska. *Botanical Notiser* 121, 403-456.

- Joseph-Nathan, P. y Manjarrez, A. (1967) Evaluación de mezclas de geranial y neral por Resonancia Magnética Nuclear. *Revista de la Sociedad Química de México* 11, 116-117.
- Klásek, A., Sedmera, P. y Santavy, F. (1971) Pyrrolizidine alkaloids. XVI. Alkaloids from some plants of the genus *Ligularia*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 36, 2205-2215.
- Kovach, J.S., Ames, M.M., Powis, G., Morte, G.G. Hahn, R.G. y Creagan, E.T. (1979) Toxicity and Pharmacokinetics of a pyrrolizidine alkaloid, indicine N-oxide, in Humans. *Cancer Research* 39, 4540-4544.
- Kugelman, M., Liu, W.-C., Axelford, M., McBride, T.J. y Rao, K.V. (1976) Indicine N-oxide: The antitumor Principle of *Heliotropium indicum*. *Lloydia* 39, 125-128.
- Kumana, C.R., Ng, M., Lin, H.J., Ko, W., Wu, P.-C. y Todd, D. (1983) Hepatic veno-occlusive disease due to toxic alkaloid in herbal tea. *Lancet* 2, 1360-1361.
- Kumana, C.R., Ng, M., Lin, H.J., Ko, W., Wu, P.-C. y Todd, D. (1985) Herbal tea-induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloids exposure in adults. *Gut* 26, 101-104.
- Kupchan, S.M., Doskotch, R.W. y Vanevenhoven, P.W. (1964) Tumor inhibitors III. Monocrotaline, the active principle of *Crotalaria spectabilis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 53, 343-345.
- Kupchan, S.M. y Suffness, M.I. (1967) Tumor inhibitors XXII. Senecionine and Senecionine N-oxide, the active principles of *Senecio triangularis*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 56, 541-543.
- Lanigan, G.W. (1970) Metabolism of pyrrolizidine alkaloids in the ovine rumen. II. Factors affecting rate of alkaloids breakdown by rumen fluid *in vitro*. *Australian Journal of Agricultural Research* 21, 633-639.

- Lee, Y.N. (1969). Chromosome number of flowering plants in Korea 2. *Korean Res. Inst. Better Living* 2, 141-145.
- Lieberman, H.R. (1973) Estimating EC₅₀ using the probit technique: A basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology* 6, 111-116.
- Lock de Ugaz, O., Franco, J., Seminario, G., Delle Monache, F., Millan, B., Sánchez, R.P.U., Schlemper, E.O. y Tempesta, M.S. (1990) Alkaloids and Diterpenoids from *Werneria decora*. *Phytochemistry* 29, 2373-2375.
- Löve, A. y Löve, D. (1976) Nomenclatural notes on Arctic plants. *Botanical Notiser* 128, 497-523.
- Luthy, J., Zweifel, U., Karlhuber, B. y Schlatter, C. (1981) Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio alpinus* L. and their detection in feedingstuffs. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 29, 302-305.
- McAllister, T.A., Percival, A., Alexander, J.G. et al., (1971) The sensitivities of urinary pathogenesis-a survey; multicentric study of sensitivities of urinary tract pathogens. *Postgraduate Medical Journal* 47 (Suppl.), 7.
- McCoy, J.W., Roby, M.R., Stermitz, F.R. (1983) Analysis of plants alkaloid mixtures by ammonia chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Natural Products* 46, 894-900.
- McGee, J.O'D., Patrick, R.S, Wood, C.B. y Blumgart, L.H. (1976) A case of veno-occlusive disease of the liver in Britain associated with herbal tea consumption. *Journal of Clinical Pathology* 29, 788-794.
- McLean, E.K. (1970) Toxic actions on pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharmacological Reviews* 22, 429-483.
- McLean, E.K. (1974) *Senecio* and others plants as liver poisons. *Israel Journal of Medical Sciences* 10, 436-440.
- McLean, E.K. y Mattocks, A.R. (1980) In: E. Farber and M.M. Fisher (Eds.). *Toxic Injury of the liver. Part B*. Dekker. New York, pp. 517-539.

- McLean, E.K. (1974) *Senecio* and others plants as liver poisons. *Israel Journal of Medical Sciences* 10, 436-440.
- McLean, E.K. y Mattocks, A.R. (1980) In: E. Farber and M.M. Fisher (Eds.). *Toxic Injury of the liver. Part B*. Dekker. New York, pp. 517-539.
- Mar, W., Tan, G.T., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Jurcic, K., Offermann, F., Redl, K., Steinke, B. y Wagner, H. (1991) Biological Activity of Novel Macrocyclic Alkaloids (Budmunchiamines) From *Albizia amara* detected on the basis of interaction with DNA. *Journal of Natural Products* 54, 1531-1542.
- Mattocks, A.R. (1968a) Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 217, 723-728.
- Mattocks, A.R. (1968b) Spectrometric determination of pyrrolizidine alkaloids—some improvements. *Analytical Chemistry* 40, 1749-1750.
- Mattocks, A.R. (1971a) Hepatotoxic effects due to pyrrolizidine alkaloid N-oxides. *Xenobiotica* 1, 563-565.
- Mattocks, A.R. (1972) Acute hepatotoxicity and pyrrolic metabolites in rats dosed with pyrrolizidine alkaloids. *Chemical and Biological Interactions* 5, 227-242.
- Mattocks, A.R. (1986a) Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. Academic Press, London, pp. 158-190.
- Mattocks, A.R. (1986b) Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. Academic Press, London, pp. 143-146.
- Mattocks, A.R., Schoental, R., Crowley, H.C. y Culvenor, C.C.J. (1961) Indicine: The major alkaloid of *Heliotropium indicum* L. *Journal of the Chemical Society*, 5400-5403.
- Mattocks, A.R. y White, I.N.H. (1971a) Conversion of pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydropyrrolizidine derivatives by rat-liver microsomes *in vitro*. *Chem. Biol. Interactions* 3, 383-396.

- Mattocks, A.R. y White, I.N.H. (1971b). Pyrrolic metabolites from non-toxic pyrrolizidine alkaloids. *Nature (London)*, New Biol. 231, 114-115.
- Mattocks, A.R. y White, I.N.H. (1973) Toxic effects and pyrrolic metabolites in the liver of young rats given the pyrrolizidine alkaloids retrorsine. *Chemical and Biological Interacciones* 6, 297-306.
- Merikli, A.H., Merikli, F., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Domínguez, X.A. y Vega, H.S. (1989) Eremophilane derivatives and other constituents from Mexican *Senecio* species. *Phytochemistry* 28, 1149-1153.
- Miranda, C.L., Cheeke, P.R., Goeger, D.E. y Buhler, D.R. (1981) Effect of consumption of milk from goats fed *Senecio jacobaea* on hepatic drug metabolizing enzyme activities in rats. *Toxicology Lett.* 8, 343-347.
- Moerman, D.E., (1977) *American Medical Ethnobotany. A Reference Dictionary.* Garland, New York, p. 527.
- Mohabbat, O., Strivastava, R.N., Younos, M.S., Sediq, G.G., Merzad, A.A. y Aram, G..N. (1976) An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afganistan. *Lancet* 2, 269-271.
- Mond, N.C., Percival, A., Williams, J.D. y Brumfitt, W. (1965) Presentation, diagnosis, and treatment of urinary tract infections in General Practice. *Lancet* 1, 514-516.
- Morales, G., Bórquez, J., Mancilla, A., Pedreros, S. y Loyola, L.A. (1986) Constituents of *Chersodoma jodopappa*. *Journal of Natural Products* 49, 1140-1141
- Niwa, H., Ishiwata, H. y Yamada, K. (1983) Separation and determination of macrocyclic pyrrolizidine alkaloids of the otonecine type present in the edible plant *Petasites japonicus* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 257, 146-150.

- Novotny, L., Tabacikova-Wlodska, Ch., Herout, V. y Sorm, F. (1964) On Terpenes. CLXVI. Constitution of furanopetasine, the main constituent of *Petasites officinalis* Moench. Rhizomes. *Collection Czechoslovak Chemical Communications* 29, 1922- 1931.
- Onuska, F.I. y Terry, K.A. (1989) Supercritical fluid chromatography of alkylene oxide-fatty alcohol condensates: their quantification in water samples. *Journal High Resolution Chromatography* 12, 347.
- Ornduff, R., Raven, P.H., Kyhos, D.W. y Kruckeberg, A.R. (1963) Chromosome numbers in Compositae III. Senecionae II. *American Journal of Botany* 50, 131-139.
- Ornduff, R., Mosquin, T., Kyhos, D.W., Raven, P.H. (1967) Chromosome numbers in Compositae IV. Senecioneae II. *American Journal of Botany* 54, 205-213.
- Packer, J.G. (1972) A taxonomic and phytogeographical review of some arctic and alpine *Senecio* species. *Canadian Journal of Botany* 50, 507-518.
- Palmblad, T.G. (1965) Chromosome numbers in *Senecio* (Compositae). *Canadian Journal of Botany* 43, 715-721.
- Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Randoux, T., Braekman, J.C. and Dalose, D. (1988) Pyrrolizidine alkaloids of probable host-plant origin in the pronotal and elytral secretion of the leaf beetle *Oreina cacalia*. *Entomologia Experimentalis et applicata* 49, 55-58.
- Pennington, C.W. (1963) *The Tarahumara of Mexico. Their environment and Material Culture*. University of Utah Press. Salt Lake City, Utah, p. 191.
- Penso, G. (1983) *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum*. Organizzazione Editoriale Farmaceutica Milano.
- Pérez, T. (1990) *Principios de Patología*. Editorial Panamericana, 3a Edición, pp. 315-343.

- Pérez, A.L., Vidales, J. y Romo de Vivar, A. (1991) Eremofilanolides from *Senecio toluccanus* var. *modestus*. *Phytochemistry* 30, 905-908.
- Pestchanker, M.J. y Giordano, O.S. (1968) Pyrrolizidine Alkaloids from five *Senecio* species. *Journal of Natural Products* 49, 722-723.
- Pieters, L.A., Hartmann, T., Janssens, J. y Vlietinck, A.J. (1989) Comparison of capillary gas chromatography with ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for the quantification of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vernalis*. *Journal of Chromatography* 462, 387-391.
- Pieters, L.A. y Vlietinck, A.J. (1986) Comparison of high-performance liquid chromatography with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for the quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris*. *Journal of Liquid Chromatography* 9, 745-755.
- Powis, G., Ames, M.M. y Kovach, J.S. (1979) Metabolic conversion of indicine N-oxide to indicine in rabbits and humans. *Cancer Research* 39, 3564-3570.
- Powis, G. y Wincentsen, L. (1980) Pyridine nucleotide cofactor requirements of indicine N-oxide reduction by hepatic microsomal cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology* 29, 347-351.
- Qualls, C.W. y Segall, H.J. (1978) Rapid isolation and identification of pyrrolizidine alkaloids (*Senecio vulgaris*) by use of high-performance liquid chromatography). *Journal of Chromatography* 150, 202-206.
- Ramsdell, H.S. y Buhler, D.R. (1981) High-performance liquid chromatographic analysis of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids using a reversed phase styrene-divinylbenzene resin column. *Journal of Chromatography* 210, 154-158.
- Robins, D.J. (1977) Senecioneae-chemical review. En: V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Burner (Eds.). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press. New York, N.Y., pp. 831-850.

- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R. y Mata, R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 275-283.
- Rodríguez-Hahn, L., Guzmán, A. y Romo, J. (1968) The Constituents of *Cacalia decomposita* A. Gray-IV. Structure of Decompostin. *Tetrahedron* 24, 477-483.
- Rose, E.F. (1972) Senecio species: toxic plants used as food and medicine in the Transkei. *South African Medical Journal* 46, 1039-1043.
- Segall, H.J. (1979) Preparative isolation of pyrrolizidine alkaloids derived from *Senecio vulgaris*. *Journal of Liquid Chromatography* 2, 1319-1323.
- Segall, H.J. y Krick, T.P. (1979) Pyrrolizidine alkaloids: organohalogen derivative isolated from *Senecio jacobaea* (Tansy Ragwort). *Toxicology Letters* 4, 193-198.
- Schoental, R. (1968) Toxicology and Carcinogenic Action of Pyrrolizidine Alkaloids. *Cancer Research* 28, 2237-2246.
- Schoental, R. y Magee, P.N. (1959) Further observation on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various pyrrolizidines (*Senecio*) alkaloids. *Journal of Pathological Bacteriology* 78, 471-482.
- Schoental, R. y Pullinger, B.D. (1972) Alleged estrogenic and other medicinal properties of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *East African Medical Journal* 49, 436-439.
- Selzer, G. y Parker, R.G.F. (1951) *Senecio* poisoning exhibiting as Chiari's syndrome. Report of twelve cases. *American Journal of Pathology* 27, 885-907.
- Sharma, A.K. Khahuria, G.S. y Atal, C.K. (1965) Thin-layer chromatography of Pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chromatography* 19, 433-434.

- Selzer, G. y Parker, R.G.F. (1951) *Senecio* poisoning exhibiting as Chiari's syndrome. Report of twelve cases. *American Journal of Pathology* 27, 885-907.
- Sharma, A.K. Khahuria, G.S. y Atal, C.K. (1965) Thin-layer chromatography of Pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chromatography* 19, 433-434.
- Siddiki, M.A., Suri, K.A., Suri, O.P. y Atal, C.K. (1978a) Genus *Crotolaria*: Part 34. Cronaburmine, a new pyrrolizidine alkaloid from *Crotolaria nana burm.* *Indian Journal of Chemistry* 16B, 1132-1133.
- Siddiki, M.A., Suri, K.A., Suri, O.P. y Atal, C.K. (1978b) Novel pyrrolizidine alkaloids from *Crotolaria nana*. *Phytochemistry* 17, 2143-2144.
- Stelljes, M.E. y Seiber, J.N. (1990) Pyrrolizidine alkaloids in an overwintering of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) in California. *Journal of Chemical Ecology* 16, 1459-1470.
- Stillman, A.E., Hustable, R., Consroe, P., Kohnen, P. y Smith, S. (1977) Hepatic veno-occlusive disease due to pyrrolizidine poisoning in Arizona. *Gastroenterology* 73, 349-352.
- Stuart, K.L. y Bras, G. (1955) Clinical observations on veno-occlusive disease of the liver in Jamaican adults. *British Medical Journal* 2, 348.
- Tandon, H.D., Tandon B.N. y Matlocks, A.R. (1978) An epidemic of veno-occlusive disease of the liver in Afganistan. *American Journal of Gastroenterology* 72, 607-613.
- Tandon, R.K., Tandon, B.N., Tandon H.D., Bhatia, M.L., Bhargava, S. Lal, P. y Arora, R.R. (1976) Study of an epidemic of veno-occlusive disease in India. *Gut* 17, 849-855.
- Tandon, B.N., Tandon, R.K., Tandon, H.D., Narndranathan, M. y Joshi, Y.K. (1976) An epidemic of veno-occlusive disease in Central India. *Lancet* 2, 271-272.

- Thord-Gray, I. (1955) *Tarahumara-English, English-Tarahumara Dictionary and an introduction to Tarahumara Grammar*. University of Miami Press. Coral Gables, Florida, p. 141.
- Turner, B.L., Powell, M., King, R.M. (1962) Chromosome numbers in the Compositae. VI. Additional Mexican and Guatemalan species. *Rhodora* 64, 251-271.
- Von Reis Altschul, S. (1973) *Drugs and Food from Little-Known Plants*. Notas en Harvard University Herbaria. Harvard University Press. Cambridge, MA, p. 334.
- Wagner, H. (1983) Immunostimulants of fungi and higher plants. *Natural Products and Drug Development*. P. Krogsgaard-Larsen, Munksgaard Publ. (Eds.). Copenhagen, pp. 391-403.
- Wagner, H., Neidhardt, U. y Tittel, G. (1981) II: TLC and HPLC-analysis of pyrrolizidine-N-oxide alkaloids of *Symphiti radix*. *Planta Medica* 41, 232-239.
- Wagner, H. y Proksch, A. (1985) Immunostimulatory drug of fungi and higher plants. En: *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press Inc., Londres, Vol. 1, pp. 113-153.
- Wang, X., Han, G., Cui, J., Pan, J., Li, C. y Zheng, G. (1981) Preliminary study of the structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids. *Chemical Abstracts* 97, 33100 (1982).
- Weber, W.A. y Löve, A. (1981) New Combinations in the Genus *Packera* (Asteraceae). *Phytologia* 49, 44-50.
- White, I.N.H., Matlocks, A.R. y Butler, W.H. (1973) Conversion of the pyrrolizidine alkaloids retrorsine to pyrrolic derivatives *in vivo* and *in vitro* and its acute toxicity to various animal species. *Chemical and Biological Interactions* 6, (4) 207-218.

- White, I.N.H., Mattocks, A.R. y Butler, W.H. (1973) Conversion of the pyrrolizidine alkaloids retrorsine to pyrrolic derivatives *in vivo* and *in vitro* and its acute toxicity to various animal species. *Chemical and Biological Interactions* 6, (4) 207-218.
- Wiens, D. y Halleck, D.K. (1962) Chromosome numbers in Rocky Mountain plants. I. *Botanical Notiser* 115, 455-464.
- Willmot, F.C. y Robertson, G.W. (1920) *Senecio* disease, or cirrhosis of the liver caused by *Senecio* poisoning. *Lancet* 2, 848-849.
- Wink, M. y Schneider, D. (1988) Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of the aposematic and alkaloid exploiting moth *Cretonotos*. *Naturwissenschaften* 75, 524-525.
- Zalkow, L.H., Asibal, C.F., Glinski, J.A., Bonetti, S.J., Gelbaum, L.T., VanDerveer, D. y Powis, G. (1988) Macrocyclic pyrrolizidine alkaloids from *Senecio anonymus*. Separation of a complex alkaloid extract using droplet counter current chromatography. *Journal of Natural Products* 51, 690-702.