



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS  
COMPONENTES LIPOFÍLICOS DEL TÉ  
MILAGRO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## JURADO ASIGNADO


Presidente      Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
Vocal            Dra. Rachel Mata Essayag  
Secretario      Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano  
1er. Suplente   Dr. Francisco Hernández Luis  
2do. Suplente   Dr. José Fausto Rivero Cruz

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de  
Química, UNAM.

### ASESOR:

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano



---

### SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda



---

### SUSTENTANTE:

Gabriela Figueroa González



---

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. Rogelio Pereda Miranda y a la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su gran apoyo, paciencia, disposición de asesorar y corregir mi tesis.

Gracias a la Dra. Nadia Jacobo y a la M. en C. Lilia Chérigo por su apoyo, valiosos comentarios y asesoría en los detalles importantes en la realización de este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 123 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química por su apoyo, risas y compañía.

Gracias a la Dra. Rachel Mata Essayag, a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y nuevamente a la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano integrantes del sínodo, por sus grandes conocimientos, comentarios y disposición para corregir y dar forma a esta tesis.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por ser mi segundo hogar, por brindarme todas las herramientas necesarias para mi formación profesional y a quien le debo gran parte de lo que soy.

Agradezco también el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto 45861-Q.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS _____	I
LISTA DE CUADROS _____	II
LISTA DE ESPECTROS _____	II
LISTA DE ABREVIATURAS _____	III
1. Introducción _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1. Hipótesis de Trabajo _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2. Objetivos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.1. Objetivo General _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.2. Objetivos Específicos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2. Antecedentes _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1. Características de la familia Asteraceae ____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2. Generalidades sobre la tribu Senecioneae _	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3. Perfil químico del género <i>Senecio</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4. El género <i>Packera</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5. Generalidades sobre <i>Packera bellidifolia</i> (Kunth) (WA Weber & A Love) <b>Error!</b>	
2.6. Sesquiterpenos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.1. Biogénesis de Sesquiterpenos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3. Parte Experimental _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1. Material y Métodos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.1. Material Vegetal _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.2. Disolventes Utilizados _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.3. Métodos Espectroscópicos _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.3.1. <i>Espectroscopía de Infrarrojo</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.3.2. <i>Análisis por Cromatografía de Gases—Espectrometría de Masas</i> <b>Err</b>	
3.1.3.3. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i> ____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.3.4. <i>Rotación Óptica</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.4. Técnicas Analíticas _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.4.1. <i>Cromatografía en Capa Fina</i> ____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

3.1.4.2. Cromatografía en Columna _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.4.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2. Diseño Experimental _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.1. Extracción y purificación de los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de <i>Packera bellidifolia</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.1.1 Extracción _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.1.2. Análisis del extracto hexánico obtenido de las partes aéreas de <i>Packera bellidifolia</i> _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4. Resultados y Discusión _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1. Separación de los compuestos mayoritarios de la fracción Pcr del extracto hexánico _____	27
4.2. Identificación y Caracterización de la Neoadenostilona y Epineoadenostilona _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5. Conclusiones _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6. Bibliografía _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7. Apéndice _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.1. Espectros _____	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Esqueletos básicos de sesquiterpenos tipo eremofilano, furanoeremofilano y lactona sesquiterpénica característicos de la tribu Senecioneae_____	10
<b>FIGURA 2</b>	Acilos alifáticos presentes en sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae_____	11
<b>FIGURA 3</b>	Sesquiterpenos aislados de <i>Packera toluccana</i> ( <i>Senecio toluccanus</i> DC. var. <i>modestus</i> )_____	12
<b>FIGURA 4</b>	Furanoeremofilanos aislados de <i>Packera candidissima</i> _____	12
<b>FIGURA 5</b>	Alcaloides pirrolizidínicos identificados en <i>Packera candidissima</i> _____	13
<b>FIGURA 6</b>	Constituyentes químicos identificados de <i>Packera coahuilenses</i> _____	14
<b>FIGURA 7</b>	<i>Packera bellidifolia</i> (H.B.K.) Weber & Love_____	15
<b>FIGURA 8</b>	Distribución de <i>Packera bellidifolia</i> en México_____	16
<b>FIGURA 9</b>	Ruta biosintética de IPP y DMAPP_____	19
<b>FIGURA 10</b>	Biosíntesis de terpenos, ruta Acetato-Mevalonato_____	20
<b>FIGURA 11</b>	Análisis por HPLC a nivel preparativo que muestra la composición binaria de la fracción Pcr_____	28
<b>FIGURA 12</b>	Cromatograma correspondiente a la purificación mediante HPLC de Pcr-9_____	30
<b>FIGURA 13</b>	Cromatograma correspondiente a la purificación mediante HPLC de Pcr-10_____	30
<b>FIGURA 14</b>	Espectro de masas del compuesto Pcr-9_____	31
<b>FIGURA 15</b>	Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto Pcr-9 (neoadenostilona)_____	34
<b>FIGURA 16</b>	Región de campo alto en RMN <sup>1</sup> H para el compuesto Pcr-9 (neoadenostilona)_____	35

<b>FIGURA 17</b>	Región de campo bajo (región vinílica) del espectro de RMN $^1\text{H}$ para el compuesto Pcr-9_____	35
<b>FIGURA 18</b>	Espectro HSQC que permite observar la correspondencia de protones y carbonos del compuesto Pcr-9_____	37
<b>FIGURA 19</b>	Espectro de HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a larga distancia ( $^{2,3,4}\text{J}$ )_____	37

### LISTA DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b>	Clasificación de la familia Asteraceae_____	6
<b>CUADRO 2.</b>	Disolventes utilizados en la columna abierta y en la purificación por HPLC_____	21
<b>CUADRO 3.</b>	Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>P. bellidifolia</i> (Columna 1)____	26
<b>CUADRO 4.</b>	Valores de rotación óptica de Neoadenostilona y Epineoadenostilona_____	32
<b>CUADRO 5.</b>	Desplazamientos químicos en RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de la Neoadenostilona_____	39
<b>CUADRO 6.</b>	Desplazamientos químicos en RMN $^1\text{H}$ de la Epineoadenostilona_____	40

### LISTA DE ESPECTROS

<b>ESPECTRO 1</b>	IR de la mezcla epimérica Neoadenostilona-Epineoadenostilona_____	48
<b>ESPECTRO 2</b>	IR de Neoadenostilona _____	49
<b>ESPECTRO 3</b>	RMN $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{Cl}$ de la Neoadenostilona _____	50
<b>ESPECTRO 4</b>	RMN $^{13}\text{C}$ en $\text{CD}_3\text{Cl}$ de Neoadenostilona _____	51
<b>ESPECTRO 5</b>	RMN $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ de la Epineoadenostilona_____	52
<b>ESPECTRO 6</b>	RMN $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{Cl}$ de la Epineoadenostilona _____	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AP</b>	Alcaloides Pirrolizidínicos
<b>ATP</b>	Adenil Trifosfato
<b>c</b>	Cuarteto
<b>cc</b>	Cuarteto de Cuartetos
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol Deuterado
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo Deuterado
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Metileno
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>dc</b>	Doblete cuarteteado
<b>DIP</b>	Direct Insertion Probe
<b>DMAPP</b>	Difosfato de Dimetilalilo
<b>eV</b>	Electrón Volts
<b>FPP</b>	Difosfato de Farnesilo
<b>GPP</b>	Difosfato de Geranilo
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
<b>IPP</b>	Difosfato de Isopentenilo
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>m</b>	Multiplete
<b>m/z</b>	Relación Masa-Carga

<b>MHz</b>	Mega hertz
<b>NADPH</b>	Fosfato de Nicotinamida Adenín Dinucleótido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<b>s</b>	Singulete
<b>t</b>	Triplete
<b>UMA</b>	Unidad de Masa Atómica
<b>UV</b>	Ultravioleta

## 1. Introducción

La medicina tradicional para la población de los países de tercer mundo, ha constituido uno de los principales recursos disponibles de atención a la salud pública. Sin embargo, hace poco más de una década, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la necesidad que tiene la evaluación y validación de los sistemas de la denominada “medicina tradicional” e incorporar sus elementos diagnósticos y terapéuticos más sobresalientes dentro del marco de estrategias de atención primaria a la salud. Al mismo tiempo, destacó la necesidad de iniciar programas de identificación, evaluación, preparación, cultivo y conservación de las plantas utilizadas en la medicina tradicional (Cifuentes, 1990). De esta forma, la medicina tradicional ha adquirido un auge considerable, desde los consumidores habituales, en su mayoría la población rural, hasta la población urbana mundial (Cifuentes, 1990).

La flora medicinal del centro y sur de México, donde surgieron las culturas mesoamericanas más importantes, es ampliamente conocida; en dichas regiones abundan las fuentes autóctonas para el conocimiento de su botánica medicinal como pictografías, códices, libros sagrados, pinturas murales, esculturas, etc.

El registro escrito más antiguo sobre plantas medicinales, mal llamado “*Códice Badiano*”, es el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Opúsculo acerca de las hierbas medicinales de los Indios) que fue dictado en Náhuatl en 1552 por el médico indígena, Martín de la Cruz de Tlatelolco, traducido y escrito al

latín, por otro indígena xochimilca, Juan Badiano. Esta obra contiene 185 ilustraciones de las plantas a color y menciona el uso de 270 especies vegetales (Emmart, 1940). De igual forma en el siglo XVI, el monje franciscano Fray Bernardino de Sahagún, escribió su obra "*Historia General de las Cosas de la Nueva España*", también conocida como el *Códice Florentino*; el texto fue escrito en español y náhuatl y contiene información sobre aproximadamente 250 plantas medicinales, acompañado por numerosas ilustraciones delineadas y coloridas.

En los últimos años se ha logrado revalorar los recursos vegetales de nuestro país, que gracias a su diversidad climática ha permitido una gran riqueza florística, donde se incluyen a las plantas con propiedades medicinales. Cabe señalar que la investigación farmacológica de las plantas sobre la naturaleza de sus constituyentes químicos puros y activos requiere de un proceso muy largo y detallado en el cual se demanda la colaboración multidisciplinaria de gente especializada como son los botánicos, químicos, farmacólogos, etc. (Hostettmann, 1995).

La preocupación por los altos costos de la atención médica especializada y la complejidad en el acceso a los servicios de salud ha incitado a que los organismos responsables impulsen el estudio y la aplicación de los elementos de la medicina tradicional que pudieran tener utilidad terapéutica; sin embargo, cabe resaltar que existe aún gran diferencia en cuanto al uso apropiado de la terapéutica moderna, ya que ésta, en muchos casos, simboliza la diferencia entre

la enfermedad, la salud o la muerte dependiendo del uso o abuso que se tenga de ella.

Desgraciadamente, no todas las plantas consumidas con fines terapéuticos o alimenticios son benéficas, se ha visto que muchas plantas son tóxicas. En algunas especies de las familias Asteraceae, Boraginaceae y Leguminosae se atribuye principalmente este efecto a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (AP), dichos compuestos se siguen usando en la medicina tradicional debido a su actividad analgésica a pesar de los efectos secundarios adversos a largo plazo que estos producen como mutagénicos, citotóxicos, carcinogénicos, entre otros (Bah, 1992). La OMS al no olvidarse de este aspecto tan importante, lanzó un aviso en 1988 y alertó a la población sobre su consumo, para ello publicó una lista de 284 especies pertenecientes a más de 40 géneros diferentes, dentro de los cuales 60 se incluyen en las tres familias antes mencionadas utilizadas como plantas medicinales (Penso, 1983).

Hay que resaltar que la importancia de los productos naturales, llámense alimentos naturales, se ha intensificado más en los países industrializados debido a que la gente se ve envuelta en un mundo de aditivos químicos y, por lo tanto, tiende a inclinarse más hacia los productos con un menor grado de manufactura, considerados por muchos como alimentos más saludables. De manera adicional, se puede señalar que los productos bioactivos de las plantas pueden ser utilizados con fines medicinales como tales o como modelos para llevar a cabo

sus síntesis químicas, aunque también es pertinente mencionar la alta aceptación reciente de los fitofármacos a los que se atribuyen menores efectos secundarios (Hostettmann, 1995; Cordell, 1995; Lozoya, 1999).

Los beneficios de las plantas medicinales varían desde la acción directa por sus principios activos hasta la simple estimulación del sistema inmunológico.

## **1.1. Hipótesis de Trabajo**

Mediante el empleo de métodos convencionales se podrá realizar el análisis químico del extracto hexánico preparado con las partes aéreas de la especie *Packera bellidifolia* para determinar y caracterizar por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas los constituyentes mayoritarios de tipo furanoeremofilano y otros metabolitos lipofílicos y así establecer el perfil metabólico secundario de esta especie.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Establecer el perfil químico del contenido metabólico de naturaleza lipofílica de la especie *Packera bellidifolia* (H.B.K.) Weber & Love.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar el análisis fitoquímico del extracto hexánico obtenido a partir de las partes aéreas de la especie bajo estudio.
- Elucidar la estructura de aquellos constituyentes mayoritarios del tipo furanoeremofilano, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

---

---

---



## 2. Antecedentes

### 2.1. Características de la familia Asteraceae

Las especies pertenecientes a la familia Asteraceae, generalmente son hierbas anuales o perennes, algunas especies son arbustos y raras veces son árboles pequeños. Tienen hojas principalmente alternas pero a menudo también opuestas o verticiladas, simples o compuestas, variadas en forma, tamaño y disposición (Cronquist, 1981; Bremer, 1994; Zumlefer, 1994). La familia Asteraceae se subdivide en diversas tribus, las cuales tienen diferentes características químicas. Como se resume en el cuadro 1, dentro de la clasificación de la familia Asteraceae (Compositae), la subfamilia Asteroideae comprende 10 tribus dentro de las cuales se encuentra la Senecioneae.

**Cuadro 1.** Clasificación de la familia Asteraceae.

<i>Familia</i>	<i>Subfamilia</i>	<i>Tribu</i>	<i>Subtribu</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>
Asteraceae	Asteroideae	Inuleae	--	38	480
		Plucheeae	--	28	220
		Gnaphalieae	5	181	2,000
		Calenduleae	--	8	110
		Astereae	3	174	2,800
		Anthemideae	12	109	1,740
		<b>Senecioneae</b>	3	120	3,200
		Helenieae	8	110	830
		Heliantheae	10	189	2,500
		Eupatorieae	16	170	2,400

La familia Asteraceae pertenece a la clase Magnoliopsida, orden Asterales (Domínguez, 1990), y se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial. Esta familia comprende 1,535 géneros y 23,000 especies y se considera como una de las familias más grandes de las dicotiledóneas y con una gran importancia desde los puntos de vista alimenticio, farmacéutico e industrial; además de que muchas especies constituyen la base de la floricultura (Espinoza, 2000).

Además de la importancia en la industria farmacéutica que tiene la familia Asteraceae, también se distingue su gran número de especies en México y su amplio contenido de productos naturales que son útiles en el tratamiento de malestares que han afectado a los habitantes de México, principalmente a la población rural.

La familia Asteraceae se caracteriza por tener una amplia variedad de metabolitos secundarios como los terpenoides (lactonas sesquiterpénicas), poliacetilenos, ácido caféico y sus ésteres, flavonoides y alcaloides, además de que es rica en aceites esenciales (Heinrich, 1998; Wagner, 1971).

## **2.2. Generalidades sobre la tribu Senecioneae**

La relación del género *Packera* con la tribu Senecioneae no se encuentra bien establecida desde un punto de vista taxonómico. Tratamientos recientes de esta tribu (Bremer, 1994; Jeffrey, 1992) demuestran que el género *Packera* y *Senecio* no son idénticos, pero ambos autores reconocen tres grupos, las subtribus Blennospermatinae, Tussilaginatae y Senecioninae. Con base en su

morfología, hay un acuerdo general de que el género *Packera* es un miembro de la subtribu Senecioninae, sin embargo su clasificación taxonómica aún no está bien definida. Jeffrey (1992) coloca a *Packera* en la subtribu Senecioninae y enfatiza su falta de relación con otros géneros (Bain, 2000).

Con base en estudios citológicos, la mayoría de las 1500 especies pertenecientes al género *Senecio* se encuentra bien establecida. Esta definición se basa en el número de cromosomas del propio género ( $n = 10$ ), o múltiplos de este número ( $n = 20, 30$ , etc.). A pesar de esto, en varias especies del género *Senecio* de Norte y Centroamérica se ha reportado que tienen alteraciones de su número básico de cromosomas (de 20 a 23 cromosomas) (Nordenstam, 1977; Barkley, 1978 y 1986). Dadas estas alteraciones, incluyendo su relación con tendencias morfológicas, se ha decidido realizar una segunda clasificación (Barkley, 1978), en donde especies que habían sido incluidas en el género *Senecio* fueron separadas y transferidas al género *Packera* (Weber & Love, 1981). Por lo tanto, *Senecio bellidifolius* es sinónimo de *Packera bellidifolia*. El perfil metabólico de estos géneros se utiliza también como otro criterio para su clasificación.

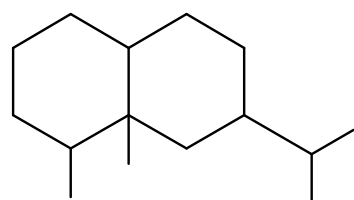
### **2.3. Perfil químico del género *Senecio***

En la tribu Senecioneae, se encuentran metabolitos secundarios completamente diferentes a los encontrados en otras tribus pertenecientes a la familia Asteraceae. Más de 16 géneros y 250 especies de las 3200 que integran

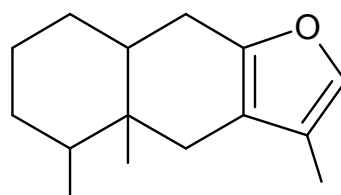
la tribu han sido estudiados para conocer sus metabolitos secundarios y gran parte de estos géneros y especies investigadas sintetizan AP, y sesquiterpenos de tipo furanoeremofilano, los cuales tienen estructuras básicas diversas. En algunos casos, estos últimos son sustituidos por sus precursores o en muchos casos otros tipos de sesquiterpenos son los que predominan (Bohlmann, 1979).

Es importante señalar que en la familia Asteraceae, aparte del género *Senecio* sólo se han encontrado estos alcaloides pirrolizidínicos en cinco especies de la tribu Eupatoriaeae. En el año de 1986 (Morales et al., 1986), a partir de *Chersodoma jodopappa* se aisló la senkirkina, investigación que constituye la primera descripción de AP en este género.

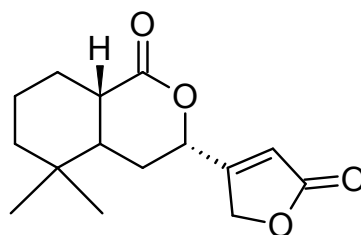
La presencia de sesquiterpenos con un esqueleto de tipo eremofilano y furanoeremofilano, así como las lactónas sesquiterpénicas (Figura 1) constituye otro rasgo quimiotaxonómico importante que caracteriza a la tribu Senecioneae.



Eremofilano



Furanoeremofilano

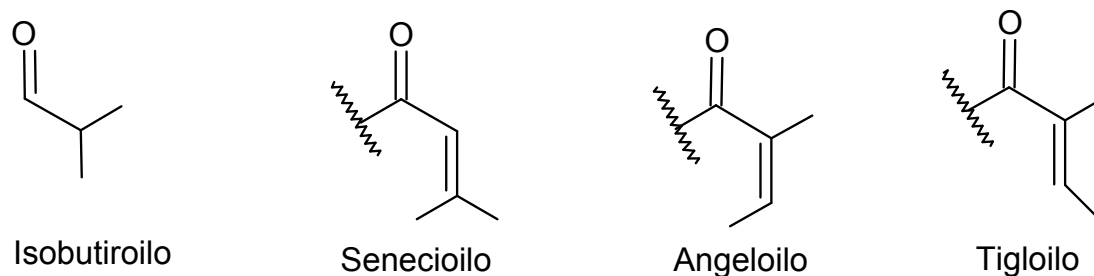


Ricciocarpina B  
Lactona sesquiterpénica

**Figura 1.** Esqueletos básicos de sesquiterpenos tipo eremofilano, furanoeremofilano y lactona sesquiterpénica característicos de la tribu Senecioneae.

Dichas estructuras básicas presentan un gran número de variaciones, como se indica a continuación (Wagner, 1971):

- Formación de lactonas (eremofilanólidas).
- Oxidaciones para introducir funcionalizaciones como grupos hidroxilo (OH), cetona y/o epóxidos.
- Oxidación de metilos para generar ácidos carboxílicos (COOH).
- Esterificación de los grupos hidroxilos por acetato o por acilos alifáticos saturados o insaturados con cuatro átomos de carbono (isobutiroilo) o cinco átomos de carbono (senecioilo, tigloilo y angeloilo) (Figura 2).



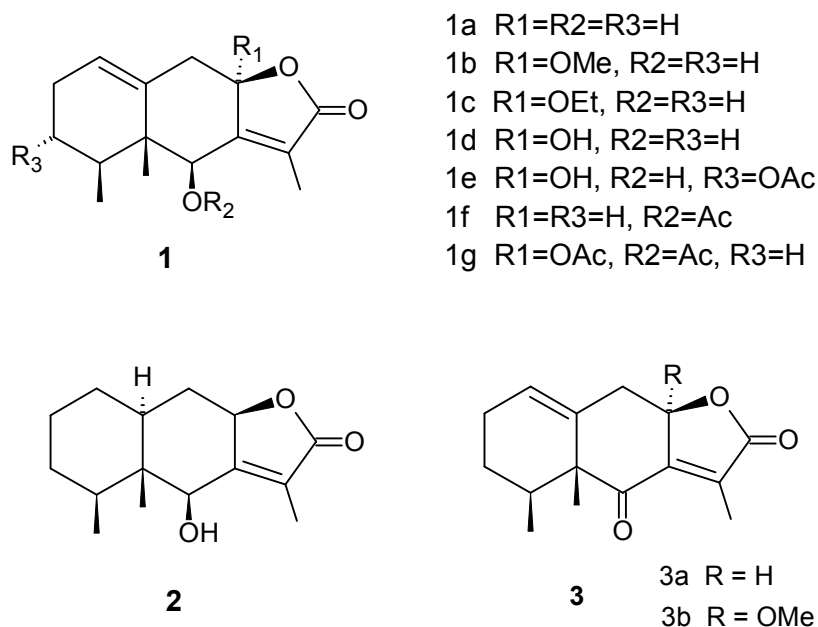
**Figura 2.** Acilos alifáticos presentes en sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae.

El contenido metabólico del género *Senecio* (prototipo de la tribu Senecioneae), define el perfil químico del género *Packera* y de otros géneros filogenéticamente relacionados.

#### 2.4. El género *Packera*

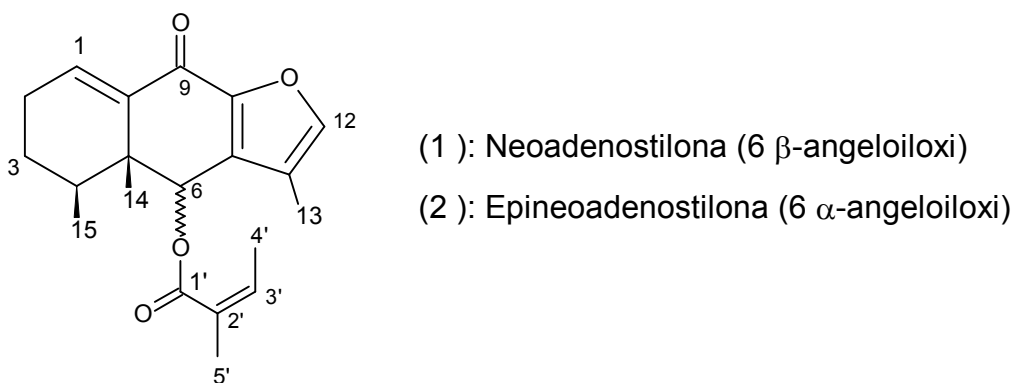
Este pequeño grupo se encuentra estrechamente relacionado con el género *Senecio*. Dentro del género *Packera* se ha aislado previamente una serie de compuestos como alcaloides pirrolizidínicos biológicamente activos, lactonas sesquiterpénicas, derivados fenólicos, sesquiterpenos de tipo furanoeremofilano, entre otros.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de estudios químicos de diversas especies de este género. El análisis químico de las partes aéreas y de las raíces de *Packera toluccana* (*Senecio toluccanus* DC. var. *modestus*), permitió el aislamiento de diez eremofilanólidas (Figura 3), cuatro de estas lactonas (1a, 1c-e), fueron reportadas como nuevos metabolitos secundarios (Pérez et al., 1991).



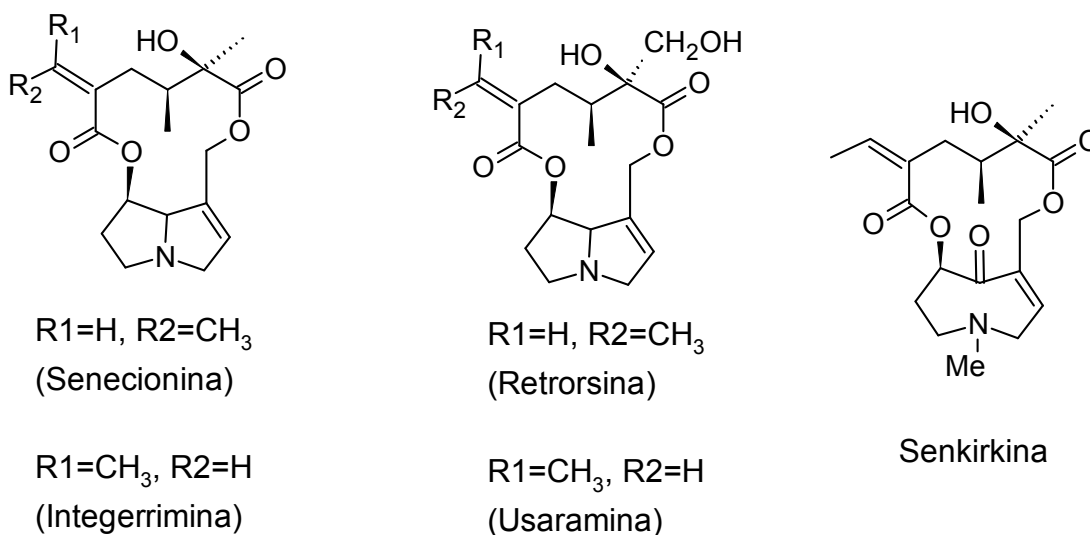
**Figura 3.** Sesquiterpenos aislados de *Packera toluccana* (*Senecio toluccanus* DC. var. *modestus*).

El estudio de las partes aéreas y de las raíces de *Packera candidissima* (Greene) Weber & Love, descrito por Bah (1992) permitió la obtención de una mezcla de dos furanoeremofilanos (Figura 4).



**Figura 4.** Furanoeremofilanos aislados de *Packera candidissima*.

Además de los furanoeremofilanos encontrados en *P. candidissima*, también se identificaron 5 alcaloides pirrolizidínicos: senecionina, integerrimina, retrorsina y usaramina como constituyentes mayoritarios, así como senkirquina (Figura 5).

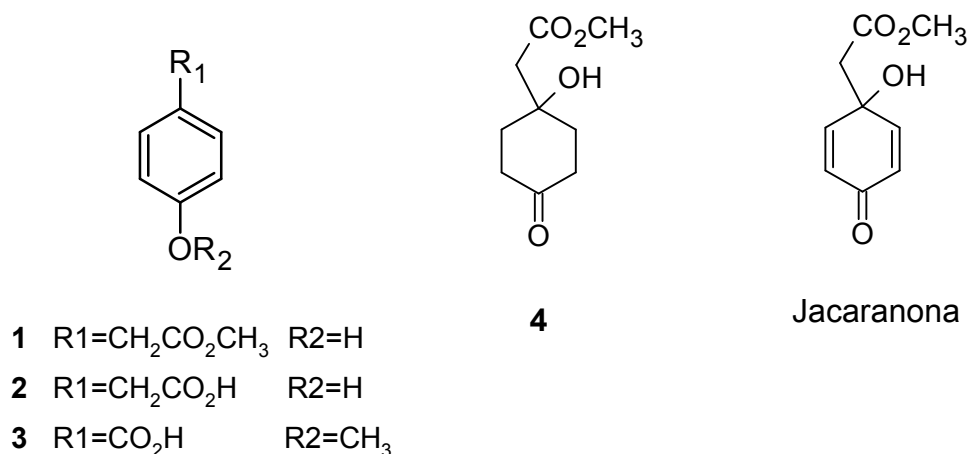


**Figura 5.** Alcaloides pirrolizidínicos identificados en *Packera candidissima*.

En *Packera coahuilensis*, Pérez-Castorena y colaboradores (2001) describieron la presencia de senecionina y retrorsina (Figura 5), además de tres derivados fenólicos (Figura 6), constituyentes que también fueron encontrados en *Packera bellidifolia*.

Otros de los compuestos que se identificaron en *Packera coahuilenses* y *bellidifolia* son el compuesto 4 y la jacaranona previamente aislados de *P. fendleri*, *P. Clevelandii* y *P. anonima* (Figura 6).





**Figura 6.** Constituyentes químicos identificados de *Packera coahuilenses*.

McCoy y colaboradores realizaron en 1983 el primer estudio químico reportado para *Packera multilobata* (*Senecio multilobatus*). Este estudio se enfocó al análisis de contenido alcaloideo de dicha especie ya que en el año de 1982, *Packera multilobata* fue la responsable de la muerte de ganado equino en Colorado. La senecionina se describió como el constituyente alcaloideo mayoritario (Figura 5).

## 2.5. Generalidades sobre *Packera bellidifolia* (Kunth) (WA Weber & A Love)

La planta completa de *Packera bellidifolia* (*Senecio bellidifolius* Kunth., *Senecio vulneraria* DC.) (Pérez-Castorena et al., 2001) tiene usos similares a los reportados para *Packera candidísima* ya que se utiliza como té para males del riñón, como medicina general y para curar dolores, úlceras y malestares vaginales (Bye, 1986). En la Universidad de Harvard existe un ejemplar de herbario con una descripción etnobotánica sobre sus usos para el mal del riñón y los problemas de

vejiga en México. La planta fresca también se mezcla con aceite de olivo y es aplicada como cataplasma para furúnculos, tumores e infecciones (Reis, 1973). Martínez (1989) reporta el uso de esta planta para lavar úlceras de la piel y para el tratamiento de la sífilis.

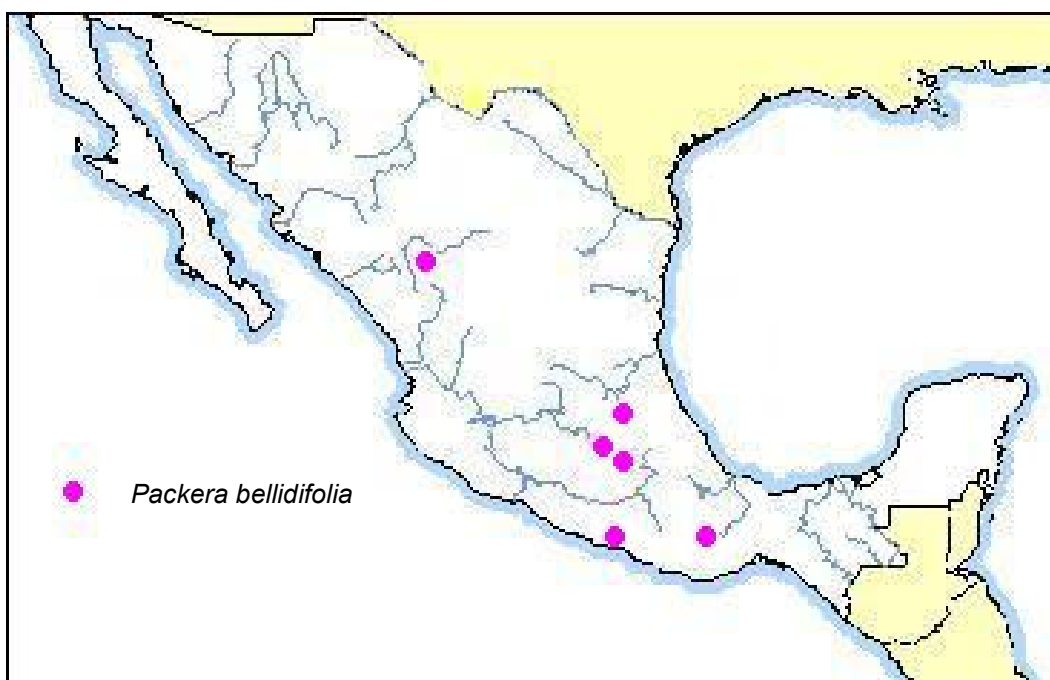
Los nombres comunes para *Packera bellidifolia* son: calancapatle, calancapacle, nanahuapatli, palancapatli o lechugilla y comercialmente se conoce como té milagro (misma denominación para *Packera candidissima*) (Martínez, 1987) (Figura 7).



**Figura 7.** *Packera bellidifolia* (H.B.K.) Weber & Love.

Es una hierba perenne, crece silvestre en lugares templados y fríos, donde predomina el bosque de pino y encino. Dentro del territorio mexicano, calancapatle vegeta en el Valle de México, en los estados de México, Morelos,

Durango además de Tenango, Ayotzingo y otras regiones (Figura 8) (Martínez, 1989). Es una planta herbácea de unos 15 cm de altura, con hojas radiales, alternas en la base y blanquizcas en la cara inferior debido a un tomento que las cubre; las flores se producen en cabezuelas sustentadas por un pedúnculo largo y son de color amarillo. La raíz es corta con largas hebras delgadas (Martínez, 1989).



**Figura 8.** Distribución de *Packera bellidifolia* en México. (Fuente: Missouri Botanical Garden).

## 2.6. Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son metabolitos secundarios derivados del farnesilpírofosfato y, por lo tanto, contienen tres unidades del isopreno, es decir 15 átomos de carbono. Los sesquiterpenos pueden encontrarse en una diversidad de

plantas, hongos, microorganismos e insectos. Algunos de estos compuestos que se han aislado, tienen funciones indispensables desde el punto de vista farmacológico ya que pueden tener actividades antitumorales, contra la migraña, antiinflamatorias, antihelmíticas, entre otras (Heinrich, 1998).

Desde el punto de vista de la fitoquímica, la diversidad estructural de esta clase de compuestos ha generado un gran interés para la búsqueda de nuevas fuentes de sesquiterpenos biodinámicos de origen vegetal. También se han enfocado numerosos esfuerzos destinados a la elucidación estructural de sustancias novedosas, la síntesis, la biosíntesis y, principalmente, a los estudios relacionados con la exploración de su potencial biológico y farmacológico.

La importancia e interés de los sesquiterpenos a nivel industrial se ha visto incrementada notablemente, ya que muchos de estos compuestos se usan cada vez más en la industria alimentaria, farmacéutica, de la perfumería y cosmética; por ejemplo, su uso como fragancias y saborizantes así como aditivos alimenticios (Lixin, 2005). Cabe resaltar que la industria farmacéutica es la que tiene un mayor interés en cuanto a la investigación de la actividad farmacológica de algunos sesquiterpenos para desarrollarlos a futuro como agentes terapéuticos (Castillo, 2001).

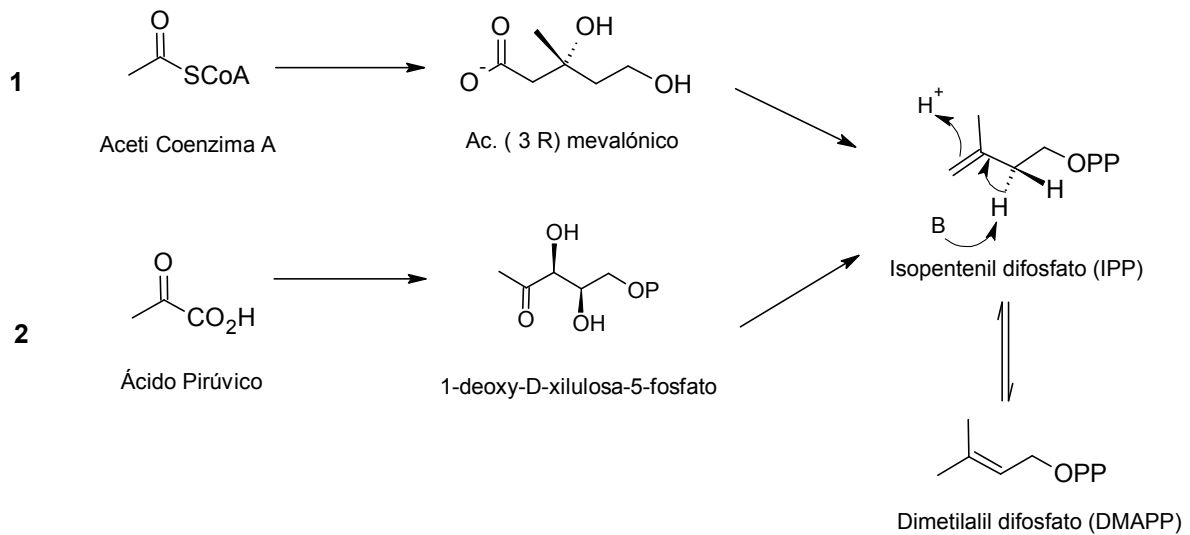
Un grupo importante de este tipo de compuestos químicos que se ha reportado para la familia Asteraceae son las lactonas sesquiterpénicas a las cuales se les atribuye un sabor amargo y picante. Su toxicidad es elevada y

actúan como alérgenos (Wagner, 1971). Algunas de las propiedades que se han reportado para este grupo de sesquiterpenos farmacológicamente activos son entre otras, efectos antiinflamatorios mediados por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, actividad antitumoral, antiulcerosa y cardiotónica; se han demostrado que algunas de ellas son de utilidad para el tratamiento de dolores asociados con la artritis y los dolores de cabeza muy intensos, e.g. la partenólida (Heinrich, 1998).

La extracción de los sesquiterpenos se lleva a cabo generalmente tanto en especímenes frescos como secos; sin embargo, hay que tener cuidado al momento de eliminar los disolventes empleados ya que la temperatura puede favorecer la formación de artefactos y productos de descomposición, además de que algunos pueden polimerizarse (Castillo, 2001).

### **2.6.1. Biogénesis de Sesquiterpenos**

Los terpenoides muestran una gran diversidad estructural y química, sus esqueletos se sintetizan a partir de sólo 2 moléculas de cinco átomos de carbono: difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero altamente electrofílico, difosfato de dimetilalilo (DMAPP). Hay dos rutas conocidas para la biosíntesis de estos dos precursores universales de los terpenoides (Lixin et al., 2005) (Figura 9).



**Figura 9.** Ruta biosintética de IPP y DMAPP (Lixin,2005).

Durante la biosíntesis, la unidad de isopreno activa (IPP) se añade al DMAPP en una secuencia de condensaciones “cabeza-cola” catalizadas por las prenil transferasas, generando el difosfato de geranilo (GPP), como precursor de los monoterpenos. Por último, la unión de una molécula de GPP y una molécula adicional de IPP da origen a la formación de una nueva estructura de 15 átomos de carbono, el difosfato de farnesilo (FPP), precursor biogénico de los sesquiterpenos (Figura 10) (Bruneton, 1999; Lixin,2005).

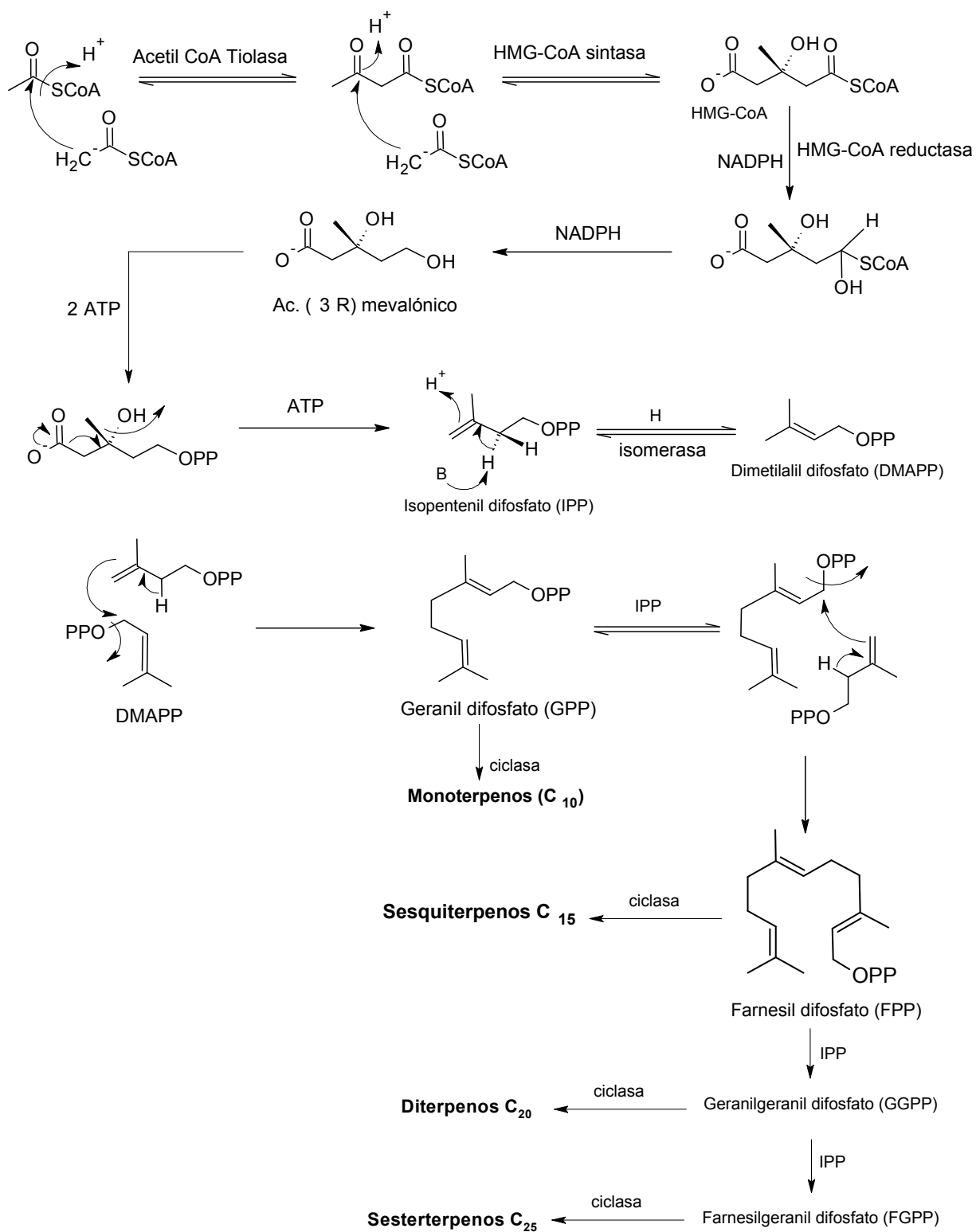


Figura 10. Biosíntesis de terpenos, ruta Acetato-Mevalonato





### 3. Parte Experimental

#### 3.1. Material y Métodos

##### 3.1.1. Material Vegetal

Se compraron cuatro lotes de las partes aéreas de *Packera bellidifolia*, adquiriéndose bajo la denominación de “té milagro”, los días 7 de Junio de 2004, 6 y 13 de octubre de 2005 en el expendio de plantas medicinales “La Magnolia” ubicado en Guatemala No. 6, Col. Centro, México, D.F. La identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

##### 3.1.2. Disolventes Utilizados

Se utilizaron disolventes grado químicamente puros y reactivo analítico previa destilación para todos los procedimientos cromatográficos. El cuadro 2 enumera cada uno de ellos.

**Cuadro 2.** Disolventes utilizados en la columna abierta y en la purificación por HPLC.

<i>Columna Abierta</i>		<i>HPLC</i>	
<i>Disolvente</i>	<i>Marca</i>	<i>Disolvente</i>	<i>Marca</i>
Acetato de etilo	Reproquifin	Acetonitrilo	J.T. Baker
Acetona	Reproquifin	Acetato de Etilo	J.T. Baker
Cloroformo	Reproquifin	Hexano	J.T. Baker
Hexano	Reproquifin		
Metanol	Reproquifin		

### **3.1.3. Métodos Espectroscópicos**

#### *3.1.3.1. Espectroscopía de Infrarrojo*

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla Modelo 1605 marca Perkin-Elmer, a un rango de  $(4000-400)$   $\text{cm}^{-1}$  sobre una ventana de bromuro de potasio usando la técnica de película.

#### *3.1.3.2. Análisis por Cromatografía de Gases—Espectrometría de Masas*

Los espectros de masas se obtuvieron en el equipo Jeol, modelo JMS-SX102A, tipo: doble sector, geometría inversa. Se realizó el análisis por ionización electrónica donde la temperatura de ionización y de la línea de transferencia fue de  $300^{\circ}\text{C}$ , con un rango de masas de 33 a 800 UMA, utilizando como estándar de calibración el perfluoro de queroseno, con introducción directa de la muestra a 70 eV con una sonda de calentamiento DIP a una velocidad de calentamiento de la sonda de  $16^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Los cromatogramas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard, modelo 5890 serie II, con una columna capilar HP-5MS (5% metilfenilsilicona), cuyas dimensiones son: 30 metros de longitud, 0.31 mm de diámetro interno y 0.25 mm de espesor de película. Se utilizó como gas acarreador helio de alta pureza, con una velocidad lineal de 30 cm/s, una relación split de 1:30, temperatura constante a  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos y el gradiente lineal de  $300^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C} / \text{min}$ .

### 3.1.3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) fueron registrados en un equipo Varian *Unity-Inova*, a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$ , los desplazamientos químicos se designaron en partes por millón (ppm), con referencia al tetrametilsilano (TMS).

### 3.1.3.4. Rotación Óptica

Los valores de rotación óptica se obtuvieron en un Polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando como disolvente cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

## 3.1.4. Técnicas Analíticas

### 3.1.4.1. Cromatografía en Capa Fina

Para el monitoreo de las fracciones de interés en la cromatografía en columna, se utilizaron cromatoplasmas de aluminio cubiertas de gel de sílice 60-F<sub>254</sub> (Merck).

### 3.1.4.2. Cromatografía en Columna

La cromatografía en columna abierta se empacó con 603 g de gel de sílice 60 Merck, con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm.

### 3.1.4.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

El análisis por HPLC (por sus siglas en inglés, “*High Pressure Liquid Chromatography*”) se llevó a cabo en un equipo Waters, con detector de arreglo de diodos, modelo 996, se utilizó una columna analítica de sílica  $\mu\text{Porasil}^{\text{TM}}$  ( $3.9 \times$

300 mm) para determinar las condiciones experimentales ideales. A nivel preparativo se utilizó una columna de sílica  $\mu$ Porasil<sup>TM</sup> 10 $\mu$  (19  $\times$  150 mm), la fase móvil que se empleó fue una mezcla de hexano-acetato de etilo (95:5) con un flujo de 0.5 mL/min y 6.0 mL/min para la columna analítica y preparativa respectivamente. Para hacer el escalamiento de la columna analítica a la preparativa se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_{cp} = F_{ca} \left( \frac{l_{cp}}{l_{ca}} \right) \left( \frac{D^2_{cp}}{D^2_{ca}} \right)$$

En donde:

$F_{cp}$ : Flujo que se desea para la columna preparativa.

$F_{ca}$ : Flujo que se tiene en la columna analítica.

$l_{cp}$ : Largo de la columna preparativa.

$l_{ca}$ : Largo de la columna analítica.

$D^2_{cp}$ : Diámetro elevado al cuadrado de la columna preparativa.

$D^2_{ca}$ : Diámetro elevado al cuadrado de la columna analítica.

Ejemplo de cálculo del escalamiento que se realizó:

$$F_{cp} = 0.5 \frac{ml}{min} \left( \frac{150mm}{300mm} \right) \left( \frac{19^2 mm}{3.9^2 mm} \right) = 5.93 \frac{ml}{min} \approx 6 \frac{ml}{min}$$

## **3.2. Diseño Experimental**

### **3.2.1. Extracción y purificación de los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de *Packera bellidifolia***

#### *3.2.1.1 Extracción*

Los cuatro lotes (359.3, 476.7, 478.5 y 952.3 g, respectivamente) se fragmentaron por separado en un molino de cuchillas modelo Thomas Wiley 4, y cada lote se sometió a extracciones sucesivas, primero 3 veces con hexano y posteriormente 3 extracciones con metanol, se evaporaron los disolventes con la ayuda de un rotaevaporador para obtener los extractos totales.

Por comparación cromatográfica se observó que los extractos de cada lote mostraron el mismo comportamiento por lo cual se tomó la decisión de reunir los extractos hexánicos de los 4 lotes. También, los extractos metanólicos se combinaron. De esta forma, se obtuvieron 67.37 g de extracto hexánico y 171.04 g de extracto metanólico.

#### *3.2.1.2. Análisis del extracto hexánico obtenido de las partes aéreas de *Packera bellidifolia**

Los 67.37 g que constituyeron al extracto hexánico se fraccionaron en una columna abierta (Columna 1). La elución se comenzó con hexano y se aumentó la polaridad con cloroformo y acetona como se indica en el cuadro 3. Se recolectaron 263 eluatos de 125 mL cada uno, de los cuales se realizó un monitoreo de su comportamiento por cromatografía en capa fina y se decidió reunirlos en un total de 20 fracciones combinadas. La subfracción combinada

(132–198) a la cual se le denominó con la clave Pcr (21.52 g) se purificó por medio de HPLC (10.5 mg/500  $\mu$ L) con las condiciones experimentales indicadas en la sección 3.1.4.3. Posteriormente se registraron sus espectros de IR, RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , también fue analizada por CG-EM.

**Cuadro 3.** Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de *P. bellidifolia* (Columna 1).

Eluyente	Proporción	Eluatos colectados	Fracciones combinadas	Clave
Hexano		1 – 21	1 – 7	Pca
Hexano- $\text{CHCl}_3$	8:2	22 – 48	8 – 11	Pcb
	7:3	49 – 67	12 – 17	Pcc
	6:4	68 – 85	18 – 24	Pcd
	5:5	86 – 109	25 – 36	Pce
	4:6	110 – 130	37 – 47	Pcf
	3:7	131 – 150	48	Pcg
	2:8	151 – 170	49 – 53	Pch
	1:9	171 – 182	54 – 67	Pci
$\text{CHCl}_3$		183 – 197	68 – 73	Pcj
$\text{CHCl}_3$ – Acetona	95:5	198 – 213	74 – 80	Pck
	8:2	214 – 233	81 – 89	Pcl
	1:1	234 – 243	90 – 96	Pcm
Acetona		244 – 253	97 – 109	Pcn
$\text{CH}_3\text{OH}$		254 – 263	110 – 131	Pcp
			132 – 198	Pcr **
			199 – 204	Pcu
			205 – 232	Pcv-w
			233 – 243	Pcx
			244 – 263	Pcy

\*\* Fracción purificada por HPLC.

---

---

---

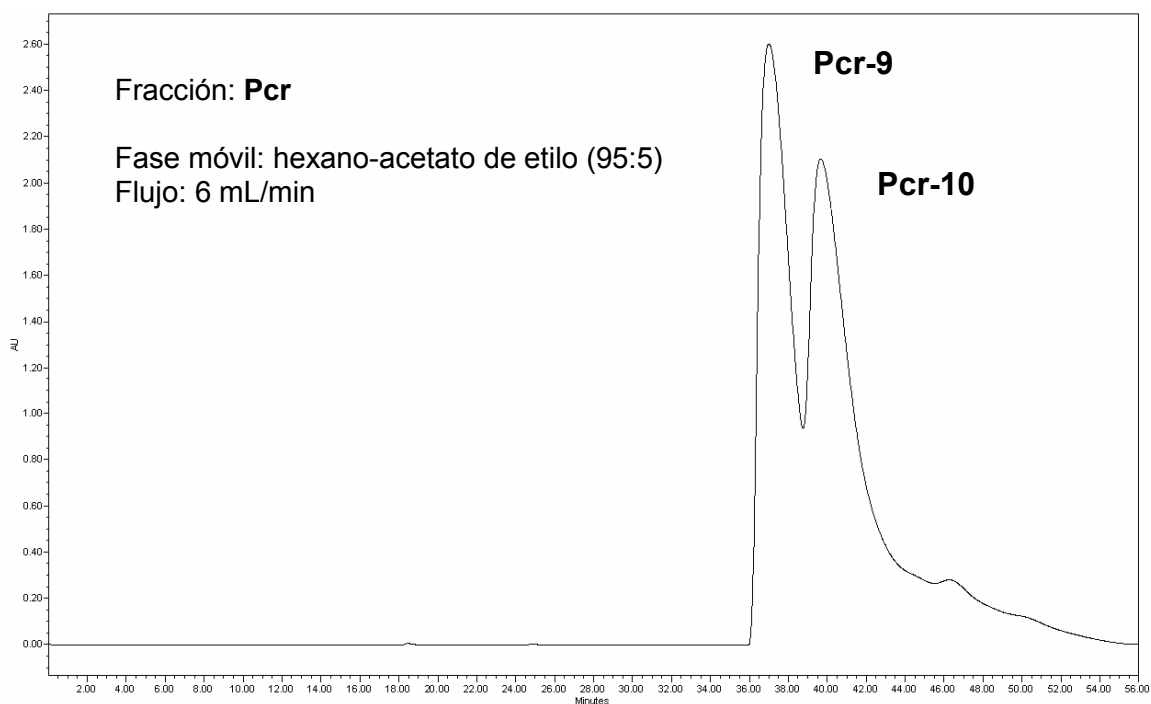
## 4. Resultados y Discusión

Teniendo como objetivo la determinación del contenido metabólico de las partes aéreas de la especie *Packera bellidifolia*, se realizó un estudio preliminar para determinar la complejidad del extracto hexánico derivado de los cuatro lotes del material vegetal, mediante cromatografía en capa fina utilizando sulfato cérico como cromógeno y cloroformo como fase móvil. Los cuatro lotes fueron mezclados debido a su similitud metabólica.

### **4.1. Separación de los compuestos mayoritarios de la fracción Pcr del extracto hexánico**

La subfracción Pcr, (ver sección 3.2.1.2) se seleccionó para purificar después de analizar las cromatoplasmas (absorción en UV marcada) y los espectros de IR. El análisis de esta fracción por cromatografía de gases, acoplada con la espectrometría de masas, indicó que el aceite no presentaba una gran complejidad, por lo que se procedió a purificar los constituyentes mayoritarios por HPLC (ver sección 3.1.4.3), mostrándose en un análisis inicial a nivel analítico, la presencia de dos señales designadas arbitrariamente como Pcr-9 y Pcr-10. Dado que la mejor resolución se obtuvo con la columna de sílica  $\mu$ Porasil<sup>TM</sup> y utilizando como sistema de elución binario hexano-acetato de etilo (95:5) con un flujo de 0.5 mL/min, se realizó posteriormente el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo (Ver sección 3.1.4.3), (Figura 11).



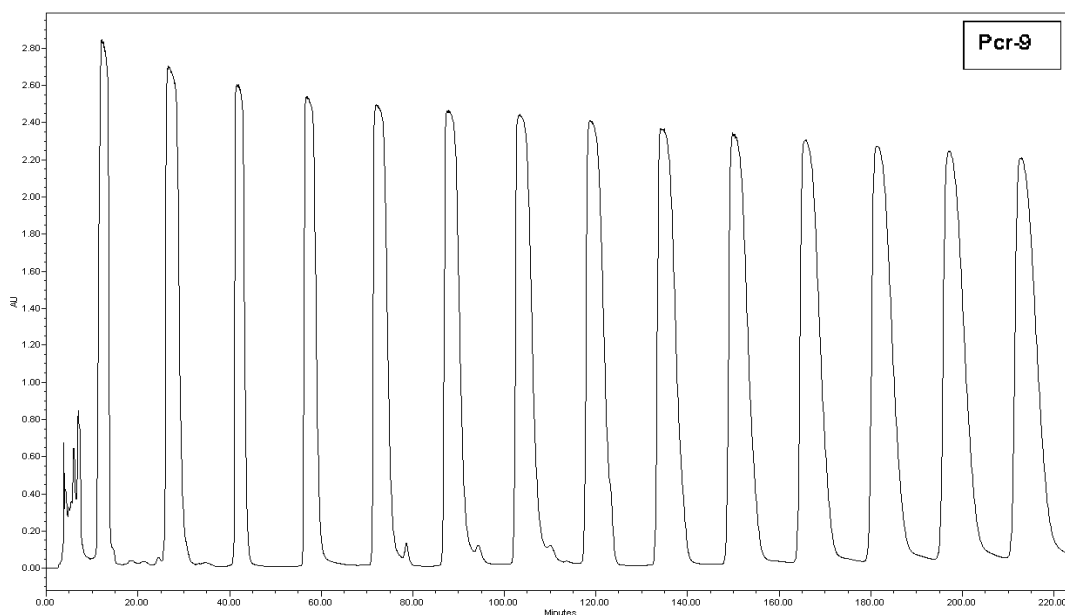


**Figura 11.** Análisis por HPLC a nivel preparativo que muestra la composición binaria de la fracción Pcr.

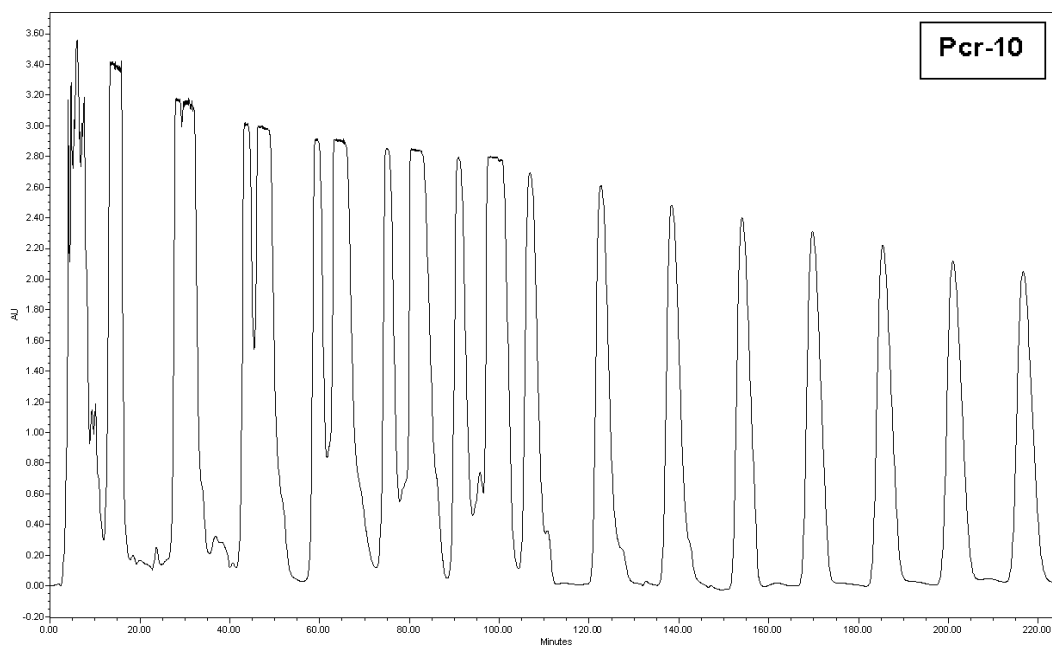
Los compuestos mayoritarios (Pcr-9 y Pcr-10) de la fracción Pcr fueron purificados por medio de HPLC, mostrando unos tiempos de retención de 11 y 11.5 minutos, respectivamente (Figura 12 y 13). Estos compuestos, corresponden a los previamente descritos para *Packera candidissima*, (Bah, 1994), en cuyo trabajo no se logró la separación de los constituyentes individuales; sin embargo, en el presente trabajo se optimizaron las condiciones instrumentales que permitieron la separación de esta mezcla binaria.

Para lograr la completa purificación de estos sesquiterpenos, los dos picos de manera independiente se sometieron a las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra. Para el reciclaje las condiciones instrumentales a nivel

preparativo en el HPLC fueron modificadas, se utilizó para ello, una columna preparativa de fase reversa Nova-Pak HR C18 (7.8 × 300 mm), empleando como fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:1) con un flujo de 2 mL/min, el reciclaje duró 220 minutos para Pcr-9 y 210 minutos para Pcr-10. En las figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas obtenidos al término de una secuencia de ciclos a través de los cuales los picos a purificar se hacen pasar por la columna en sucesivas repeticiones hasta alcanzar la pureza de los picos. Para purificar el pico Pcr-9, fueron necesarios 14 ciclos y, dentro de cada uno de ellos, se fueron eliminando pequeñas impurezas mediante el reciclaje del pico de interés (Figura 12). En cambio, la purificación del pico Pcr-10 fue más compleja; a partir del tercer ciclo, se muestra como se desdobló y fue hasta el ciclo número siete cuando se procedió a cortar y desechar la parte que no era de interés, permitiéndose el reciclaje durante 8 ciclos adicionales del pico Pcr-10 para garantizar su pureza (Figura 13).



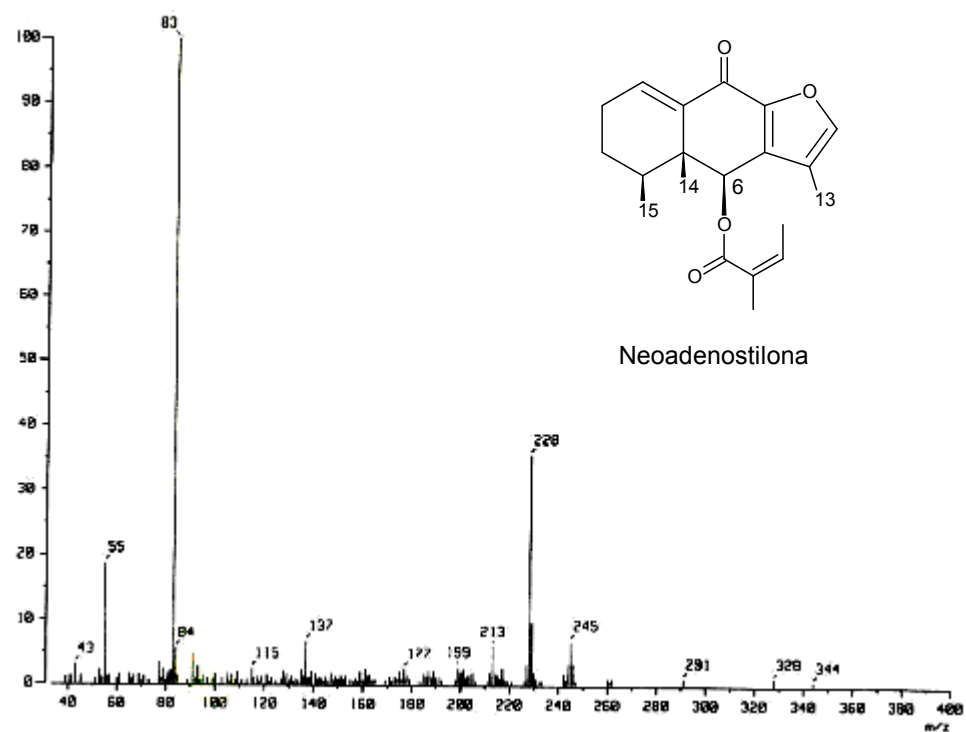
**Figura 12.** Cromatograma correspondiente a la purificación mediante HPLC de Pcr-9, Columna: Nova-Pak HR C18 (7.8 × 300 mm), fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:1), flujo: 2 mL/min.



**Figura 13.** Cromatograma correspondiente a la purificación mediante HPLC de Pcr-10, Condiciones: Nova-Pak HR C18 (7.8 × 300 mm), fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:1), flujo: 2 mL/min.

## 4.2. Identificación y Caracterización de la Neoadenostilona y Epineoadenostilona

La fórmula molecular de los compuestos previamente aislados y purificados, se determinó mediante espectrometría de masas con introducción directa de muestra y por ionización electrónica. El ión molecular observado en 328  $m/z$  para el compuesto Pcr-9 permitió calcular su fórmula molecular  $C_{20}H_{24}O_4$ . (Figura 14).



**Figura 14.** Espectro de masas del compuesto Pcr-9.

La fórmula molecular para el compuesto Pcr-10, es la misma ya que se trata de un epímero de Pcr-9, es decir, sólo difieren en la configuración absoluta de un átomo de carbono. El espectro de IR (Espectro 1, ver sección espectros), mostró las bandas características de un anillo furano en  $1600-1300\text{ cm}^{-1}$ , tres

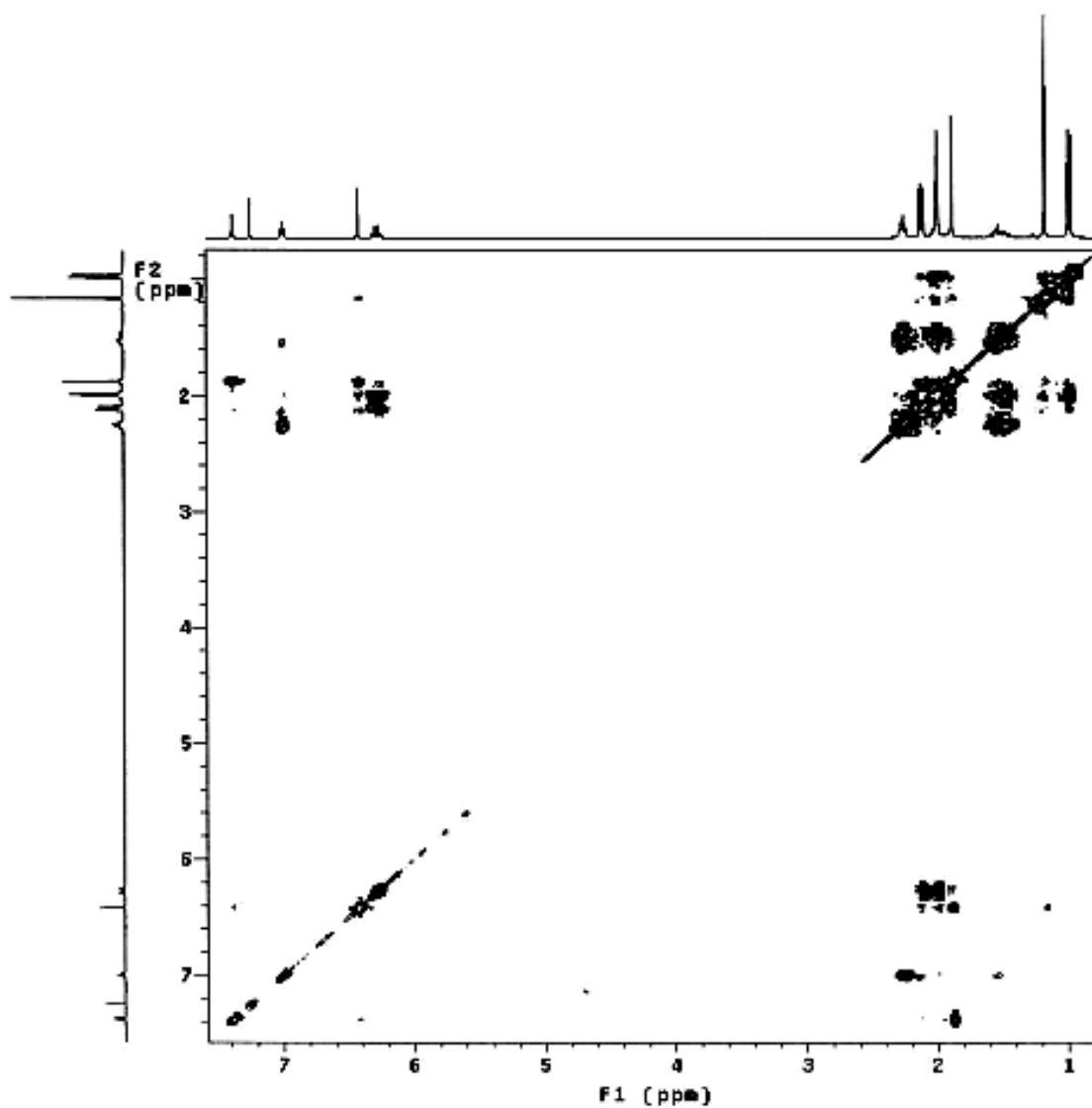
bandas cerca de 1600, 1500 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las ligaduras C=C del anillo, otra señal característica del anillo furano en 885-870  $\text{cm}^{-1}$  además de las bandas correspondientes a una cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta'$ -insaturada en 1673 y 1624  $\text{cm}^{-1}$ , también se observaron las absorciones que corresponden a los alargamientos de carbonilo de un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado en 1720  $\text{cm}^{-1}$ . Se determinó el valor de rotación óptica de los dos furanoeremofilanos neoadenostilona y epineoadenostilona, aislados y purificados de *Packera bellidifolia* (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Valores de rotación óptica de Neoadenostilona y Epineoadenostilona.

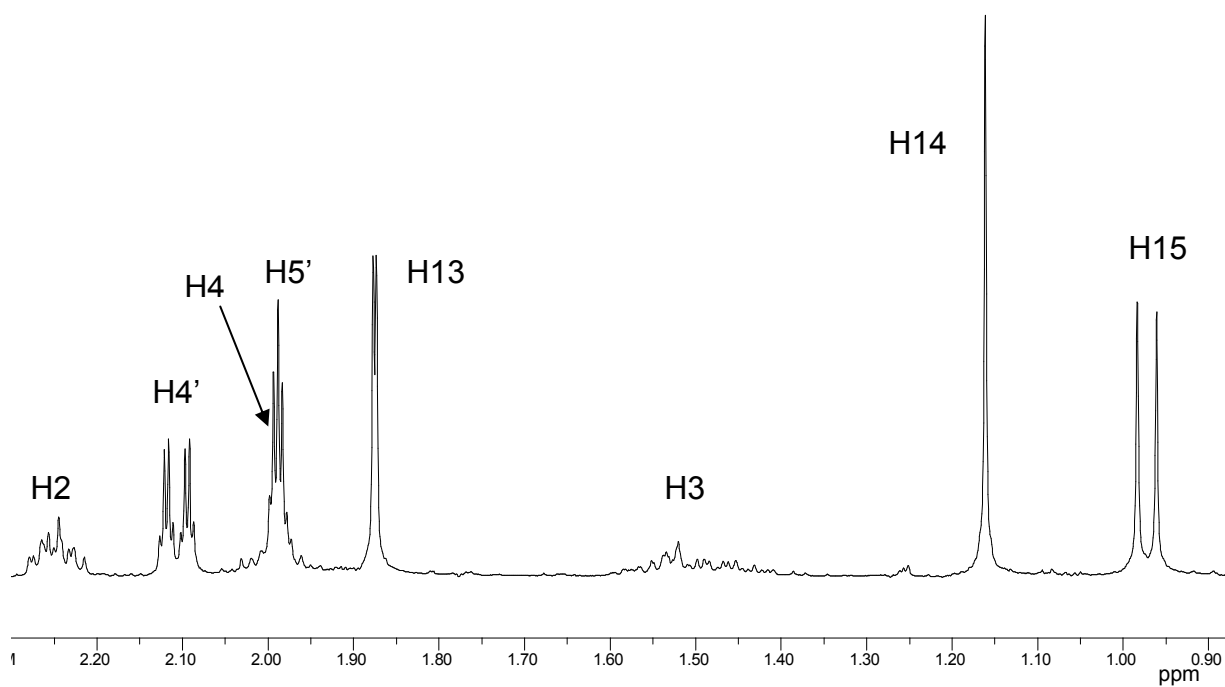
	<b>Neoadenostilona</b>	<b>Epineoadenostilona</b>
$[\alpha]_{\text{D}}^{25^{\circ}\text{C}}$	-32.2	-56
Concentración (g/100 mL)	0.15	0.20

La elucidación estructural de los sesquiterpenos aislados, en primera instancia, se realizó por medio de las técnicas espectroscópicas unidimensionales ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ). Los esqueletos estructurales se propusieron con base en las señales presentes en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , con la ayuda de una correlación bidimensional de protones (2D-COSY) (figura 15), así como con el experimento HSQC (Figura 18) y HMBC (Figura 19), las cuales proporcionaron la información siguiente. La comparación de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  determinó que los compuestos Pcr-9 y Pcr-10 están estrechamente relacionados ya que se trata de dos epímeros; por lo tanto, se presenta a continuación sólo la descripción de la

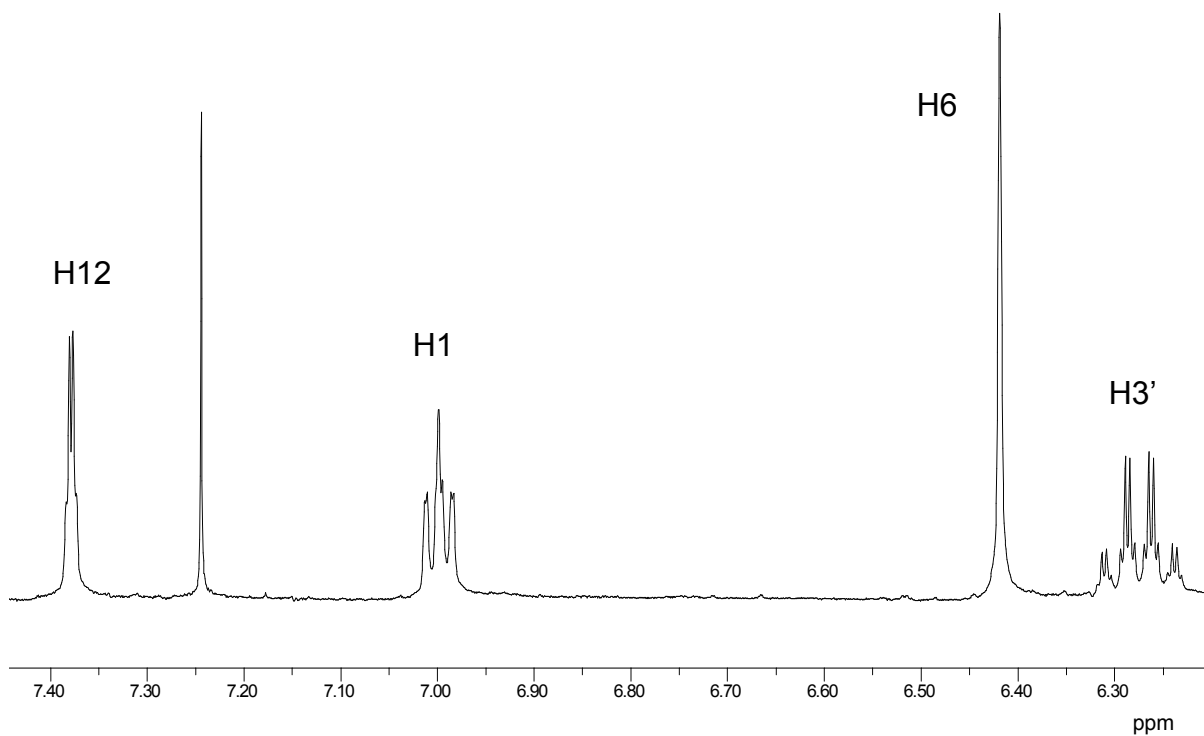
elucidación estructural de uno de ellos. Las mismas asignaciones se pueden extrapolar al segundo compuesto. En la región de campo alto en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para Pcr-9, se observa la presencia de 5 metilos. Se asignó como terciario la señal singulete en 1.16 ppm (3H) correspondiente al C-14. Se identificó un doblete en 0.97 ppm que se asignó al metilo C-15; de igual manera, se identificó la presencia de un grupo angelolo, donde la señal característica de su protón vinílico se encuentra en 6.27ppm. Se observaron también las señales de 2.11 ppm y 1.99 ppm como dobletes cuarteteados, para los metilos de dicho grupo H-4' y H-5', respectivamente. Con ayuda de la correlación bidimensional (2D-COSY) (Figura 15), se realizaron los cuadros de conectividad correspondientes y se pudo ubicar a los protones H-1, H-2, H-3, H-4; H-12, H-13; H-3', H-4' y H-5' (Figura 16 y 17).



**Figura 15.** Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto Pcr-9 (neoadenostilona).



**Figura 16.** Región de campo alto en RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto Pcr-9 (neoadenostilona).

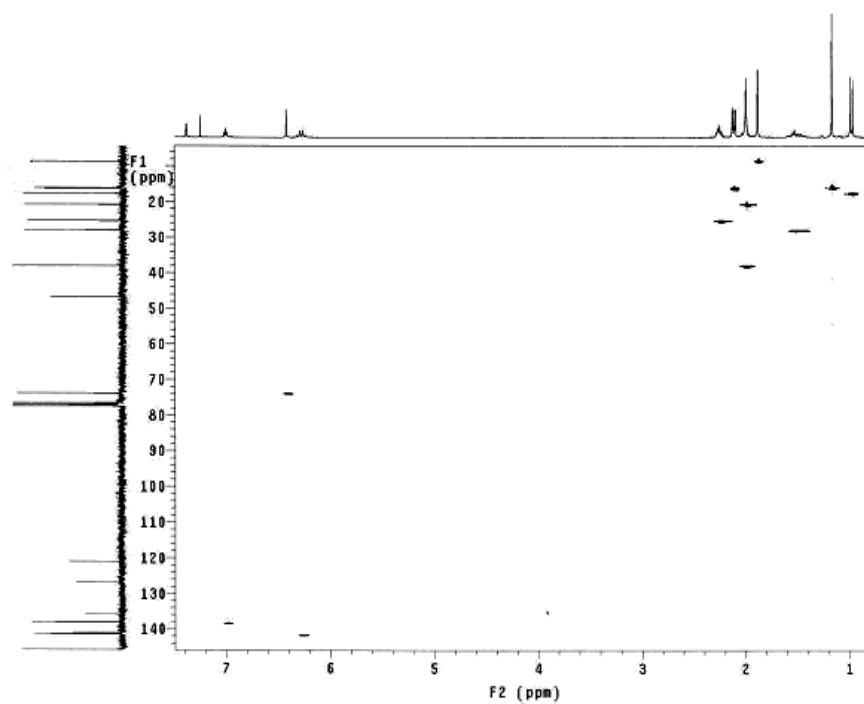


**Figura 17.** Región de campo bajo (región vinílica) del espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto Pcr-9.

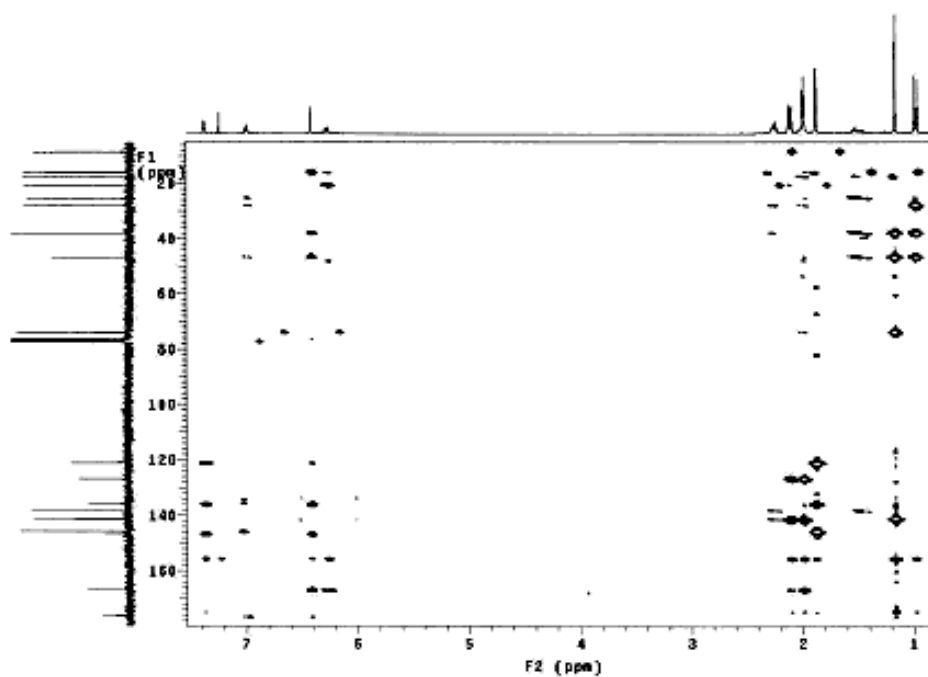


De la región vinílica del espectro de RMN  $^1\text{H}$  para Pcr-9 (Figura 17), se pudo observar la naturaleza insaturada de la estructura de los sesquiterpenos encontrados, ya que se muestra la presencia de un triplete en 7.00 ppm. Debido a su desplazamiento químico y multiplicidad, se atribuye a un protón de una cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, información que permitió ubicar al carbonilo en la posición C-9 del esqueleto. Por otra parte, dentro de la misma región vinílica, se encontró la presencia de un singulete en 6.42 ppm, donde indica la sustitución por el grupo angelolo en la posición C-6. En el desplazamiento químico de esta señal se observa la diferencia principal entre los compuestos Pcr-9 (6.42 ppm) y Pcr-10 (6.35 ppm).

Del espectro de RMN  $^1\text{H}$  y con asistencia del experimento HSQC (Figura 18), se pudo asignar el desplazamiento químico de cada uno de los átomos de carbono; de igual manera, se necesitó la ayuda de otro experimento bidimensional heteronuclear HMBC (Figura 19) el cual fue fundamental para completar la asignación de los espectros ya que permitió el estudio de los acoplamientos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia ( $^{2,3,4}J$ ).



**Figura 18.** Espectro HSQC que permite observar la correspondencia de protones y carbonos del compuesto Pcr-9.



**Figura 19.** Espectro de HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia ( $^{2,3,4}\text{J}$ ).

En los cuadros 5 y 6 se incluyen los valores para los desplazamientos químicos observados en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los compuestos neoadenostilona (Pcr-9) y epineoadenostilona (Pcr-10). Es importante señalar que estos compuestos ya han sido aislados de otras especies de la familia Asteraceae, pero resultan ser identificados por primera vez para *Packera bellidifolia*, de igual manera ya se han reportado por Bah (1992), sus constantes espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$ , determinadas a partir de la mezcla epimérica, sin embargo aquí se presentan sus constantes a partir de los compuestos puros, además de reportar por primera vez las constantes espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  para la epineoadenostilona en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

**Cuadro 5.** Desplazamientos químicos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la Neoadenostilona (ver condiciones experimentales en la sección 3.1.3.3) (espectros 3, 4).

<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>		
<b>Neoadenostilona</b>		
	<b>RMN <math>^{13}\text{C}</math></b>	<b>RMN <math>^1\text{H}</math></b>
<b>1</b>	138.0	7.00 (4.1,4.1) t
<b>2a</b>	25.3	2.24 m
<b>3a</b>	28.0	1.52 m
<b>3b</b>	--	1.53 m
<b>4</b>	38.0	1.99 (1.4,1.6) t
<b>5</b>	46.7	--
<b>6</b>	73.9	6.42 s
<b>7</b>	135.8	--
<b>8</b>	146.5	--
<b>9</b>	173.3	--
<b>10</b>	141.1	--
<b>11</b>	121.0	--
<b>12</b>	145.7	7.38 (1.1) d
<b>13</b>	8.6	1.87 (1.1) d
<b>14</b>	16.2	1.16 s
<b>15</b>	17.7	0.97 (6.9) d
<b>1'</b>	166.7	--
<b>2'</b>	126.8	--
<b>3'</b>	141.4	6.27 (1.4, 2.9, 7.3) cc
<b>4'</b>	16.0	2.11 (1.4, 3.1, 7.3) dc
<b>5'</b>	20.7	1.99 (1.4, 3.0) dc

**Cuadro 6.** Desplazamientos químicos en RMN  $^1\text{H}$  de la Epineoadenostilona (ver condiciones experimentales en la sección 3.1.3.3) (espectros 5, 6).

<b>Epineoadenostilona</b>		
<b>RMN <math>^1\text{H}</math></b>		
	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	<b><math>\text{CD}_3\text{OD}</math></b>
<b>1</b>	6.99 (4.1, 4.1) t	6.99 (3.9, 3.9) t
<b>2a</b>	2.18 s	2.28 m
<b>3a</b>	1.68 m	1.52 m
<b>3b</b>	--	--
<b>4</b>	1.99 (1.7, 1.7) t	1.99 d
<b>6</b>	6.35 s	6.43 s
<b>12</b>	7.41 (1.2) d	7.64 d
<b>13</b>	1.88 (0.9) d	1.88 s
<b>14</b>	1.11 s	1.15 s
<b>15</b>	1.04 (6.6) d	1.00 (6.9) d
<b>3'</b>	6.30 (1.5, 7.5) cc	6.36 cc
<b>4'</b>	2.11 (1.5, 3.0) dc	2.09 (1.4 (1.4, 7.4) dc
<b>5'</b>	1.93 (4.8, 5.6) dc	1.99 d



## 5. Conclusiones

- I. El análisis fitoquímico de las partes aéreas de la especie *Packera bellidifolia* (H.B.K.) Weber & Love permitió establecer que los principales constituyentes de las fracciones lipofílicas son los sesquiterpenos de tipo furanoeremofilano.
  
- II. Estos compuestos corresponden a la adenostilona y la neoadenostilona previamente aisladas de *Packera candidissima*. Por tal motivo, estos constituyentes pueden ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos para la identificación cromatográfica de la droga cruda conocida como té milagro.
  
- III. La técnica cromatográfica utilizada a nivel preparativo para el aislamiento de los furanoeremofilanos constituye el punto de partida para la implementación futura de un procedimiento analítico de identidad para el té milagro.

---

---

---



---

## 6. Bibliografía

- Bah, M., (1992) *Determinación del Contenido Alcaloideo de la Packera candidissima (Greene) Weber & Love Mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas*, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México.
- Bah, M., Bye, R., Pereda-Miranda, R., (1994) Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the Mexican medicinal plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae), *J. Ethnopharm.*, **43**, 19-30.
- Bain, F., Golden, L., (2000) A Phylogeny of *Packera* (Senecioneae; Asteraceae) Based on Internal Transcribed Spacer Region Sequence Data and a Broad Sampling of Outgroups, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16**, 331-338.
- 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, 93-99 pp.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Berger, D., Suwita, A. (1979), Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten, *Phytochemistry*, **18**, 79-93.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Jakupovic, J., Grenz, M., Castro V., King, R., Robinson, H. (1986) Further Pyrrolizidine Alkaloids and Furoeremophilanes from *Senecio* Species, *Phytochemistry*, **25**, 1151-1159.
- Bremer, K. (1994) *Asteraceae. Cladistics & Classification*, Ed. Timber Press, USA, 13-35, 61-70, 112,143 pp.

- Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*, 2a Edición, Lavoisier, NY, 463-471 pp.
- Bye R. (1986) Medicinal Plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants, *Econ. Bot.*, **40**, 103-124.
- Castillo, M. A. (2001) *Monografía sobre Sesquiterpenos, Diterpenos y Sesterterpenos, Manuales 5, 6 y 7 de una serie de 13 sobre Productos Naturales*, Tesis de Licenciatura en Química, UNAM, FES Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex.
- Cifuentes E., Ortega, M. (1990) *Herbolaria y Tradiciones Etnomédicas en un pueblo Nahuatl*, Coordinación de la Investigación Universitaria, 1ª Edición, 7-15 pp.
- Cordell, G. (1995) Changing strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612.
- Cronquist, A. (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*, Ed. Columbia University, Press, USA, 1-20, 851-855, 911,912, 920-924 pp.
- Domínguez, S. (1990) Phytochemistry Methods Frontiers, Special Supplement, *Revista Latinoamericana de Química*, 10, 21.
- Emmart, E.W. (1940) *The Badianus Manuscript (Cosex Barberini, latin 241) Vatican Library. An Aztec Herbal of 1552*. The Johns Hopkins Press: Baltimore, 341 pp.
- Espinoza, M. (2000) *Estudio Químico y Biológico de dos especies vegetales empleadas en la Medicina Tradicional: Aloysia triphilla y Cirsium jorullense*, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México, 2, 3, 85, 86 pp.

- Garduño, M. L., Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., Linares, E., y Delgado, G. **(2001)** New Eremophilanes from the Roots of *Psacalium radulifolium*, *J. Nat. Prod.*, **64**, 432-435.
- Hamburger, M., and Hostettmann, K., **(1991)** Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortíz de Montellano, B., Rodríguez, E. **(1998)** Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 539-565.
- Hostettmann, et.al., **(1995)** *Strategy in the search for new biologically active plant constituents. Phytochemistry of plant used in traditional medicine*, Ed. Oxford University Press, Estados Unidos, 1-45 pp.
- Jeffrey, C., **(1992)** The tribe Senecioneae (Compositae) in the Mascarene Islands with an annotated world check-list of the genera of the tribe. *Notes of Compositae: IV, Kew Bull*, **47**, 49-109.
- Knôs, W., Reuter, B., **(1998)** Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: Occurrence and future prospects, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **73**, 45-52.
- Lixin, Z., et. al., **(2005)** *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press, E.U.A., 197-205 pp.
- Lozoya, X., et. al., **(1999)** *Phytofarmaceuticals and the medicine of the new century*, Symposium 3, IMSS Farmasa, Schawebe, The Phytofarmaceuticals of the next century, México, 19-32 pp.
- Martínez, M., **(1987)** *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*, Fondo de Cultura Económica, México, 665,1215 pp.

- Martínez, M., (1989) *Las Plantas Medicinales de México*, México, 6ª Edición, Botas, 385-387 pp.
- Mata, R., (2000) *Curso Teórico de Farmacognosia*, 2ª versión, UNAM, Facultad de Química, México.
- Mc Coy, 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.
- Morales, G., Bórquez, J., Mancilla, A., Pedreros, S., (1986) Constituents of *Chersodoma jodopappa*, *Journal of Natural Products*, **49**, 1140-1141.
- Penso, G., (1983) *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum*, Organizzazione Editoriale Farmaceutica Milano.
- Pérez, C., Arciniegas, A., Martínez, F., Márquez, C., Villaseñor, J., Romo de Vivar, A. (2001) Chemical Constituents of *Packera coahuilenses* and *Packera bellidifolia*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 203-206.
- Pérez, L, Vidales, P., Cárdenas, J., y Romo de Vivar, A. (1991) Eremophilanolides from *Senecio toluccanus* var. *Modestus*, *Phytochemistry*, **30**, 905-908.
- Reis, A., Siri, V., (1973) *Drugs and foods from Little-Known Plants. Notes on Harvard University Herbaria*, Cambridge, Harvard Univ. Press. 363 p.
- Rohdich, F., (2003) Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of ispDEFGH genes and their cognate enzymes, *Pure Appl. Chem.*, **75**, 393-405.

- Romero, A., Zeinsteger, P., Teibler, P., Montenegro, M., Ruiz de Torrent, R., Ríos, E., Acosta de Pérez, O. **(2001-2002)** Lesiones hepáticas inducidas por componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones, *Rev. Vet.*, 12/13: **1 y 2**, 15-17.
- Wagner, H., Horhammer, L., **(1971)** *Pharmacognosy and Phytochemistry*, Springer-Verlag, Berlín, 93-106 pp.
- Weber, W.A., y Löve, A., **(1981)** New Combinations in the Genus *Packera* (Asteraceae), *Phytologia*, **49**, 44-50.
- Zumlefer, W. B., **(1994)** *Guide Flowering Plant Families*, Ed. Champel Hill & London, USA, 203-209 pp.

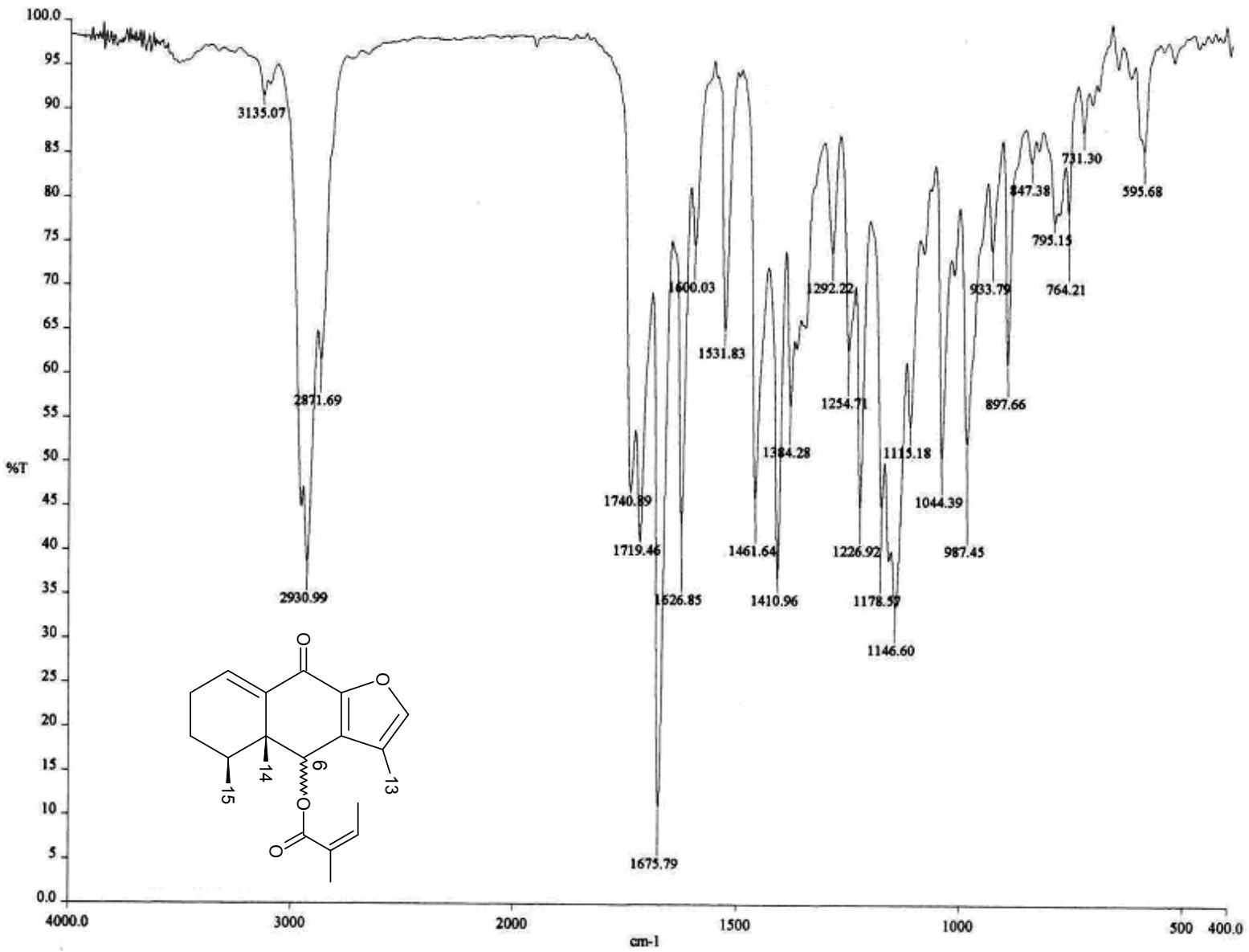
---

---

---

## **7. Apéndice**

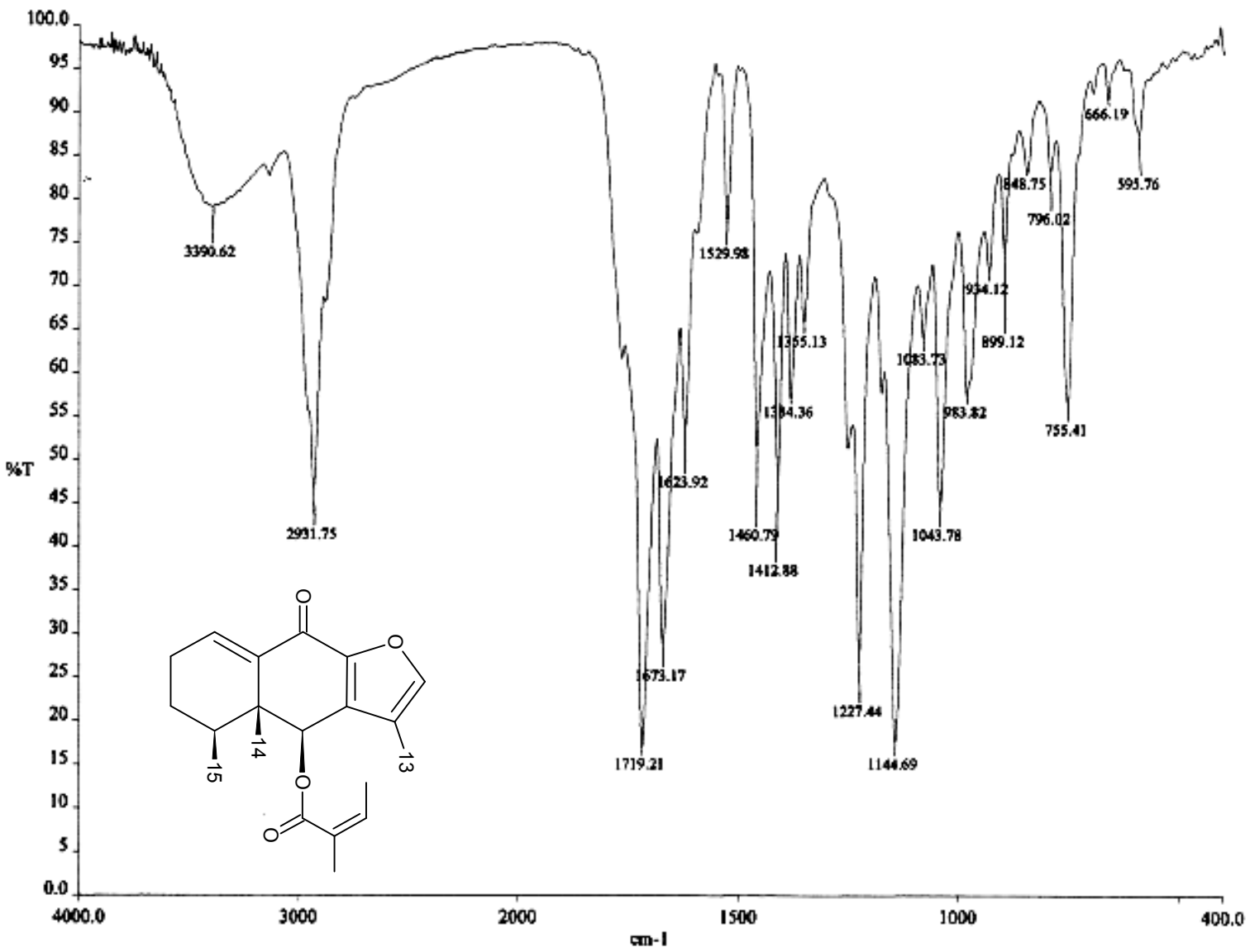
### **7.1. Espectros**

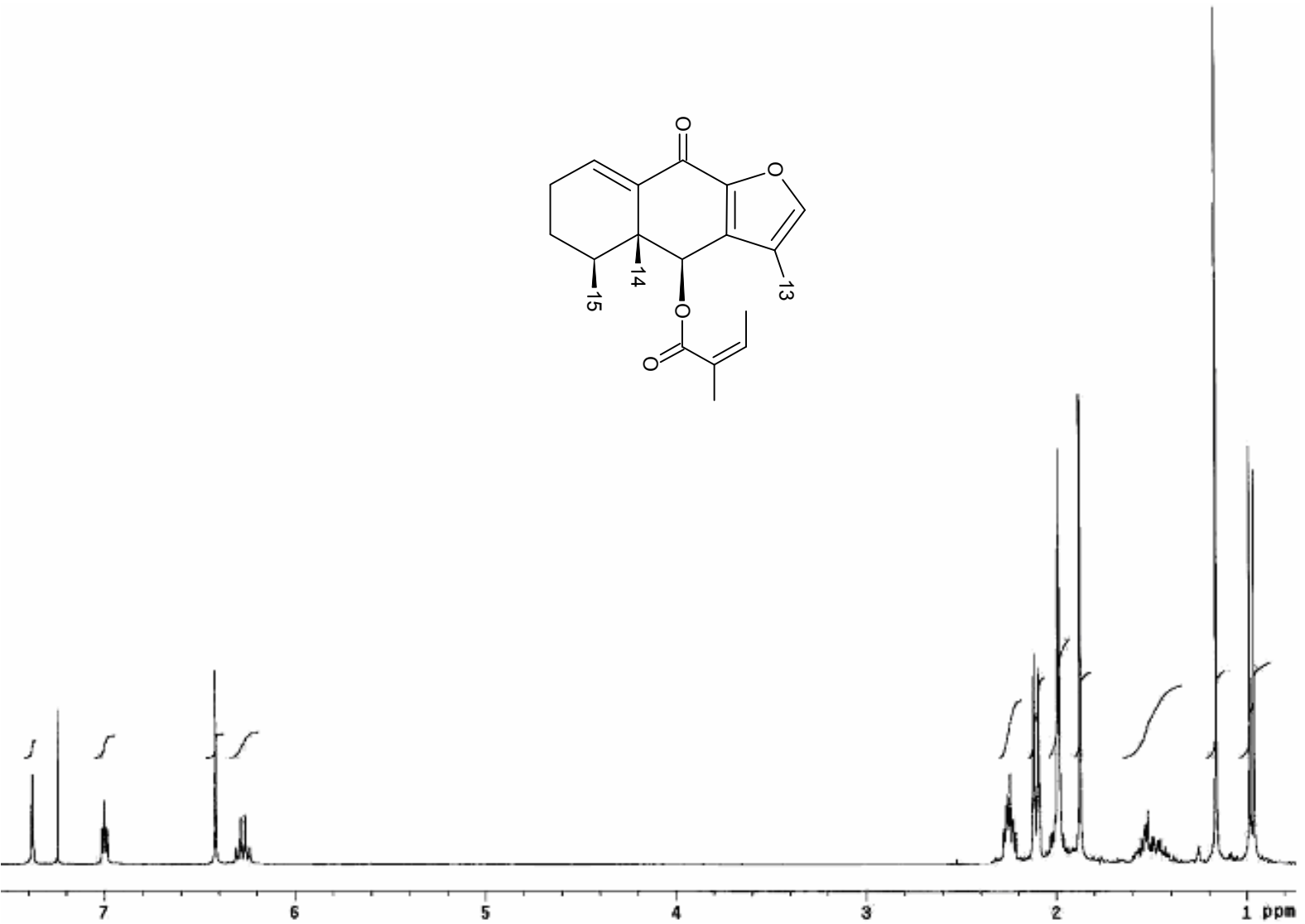


Espectro 1. IR de la mezcla epimérica Neoadenostilona-Epineadenostilona

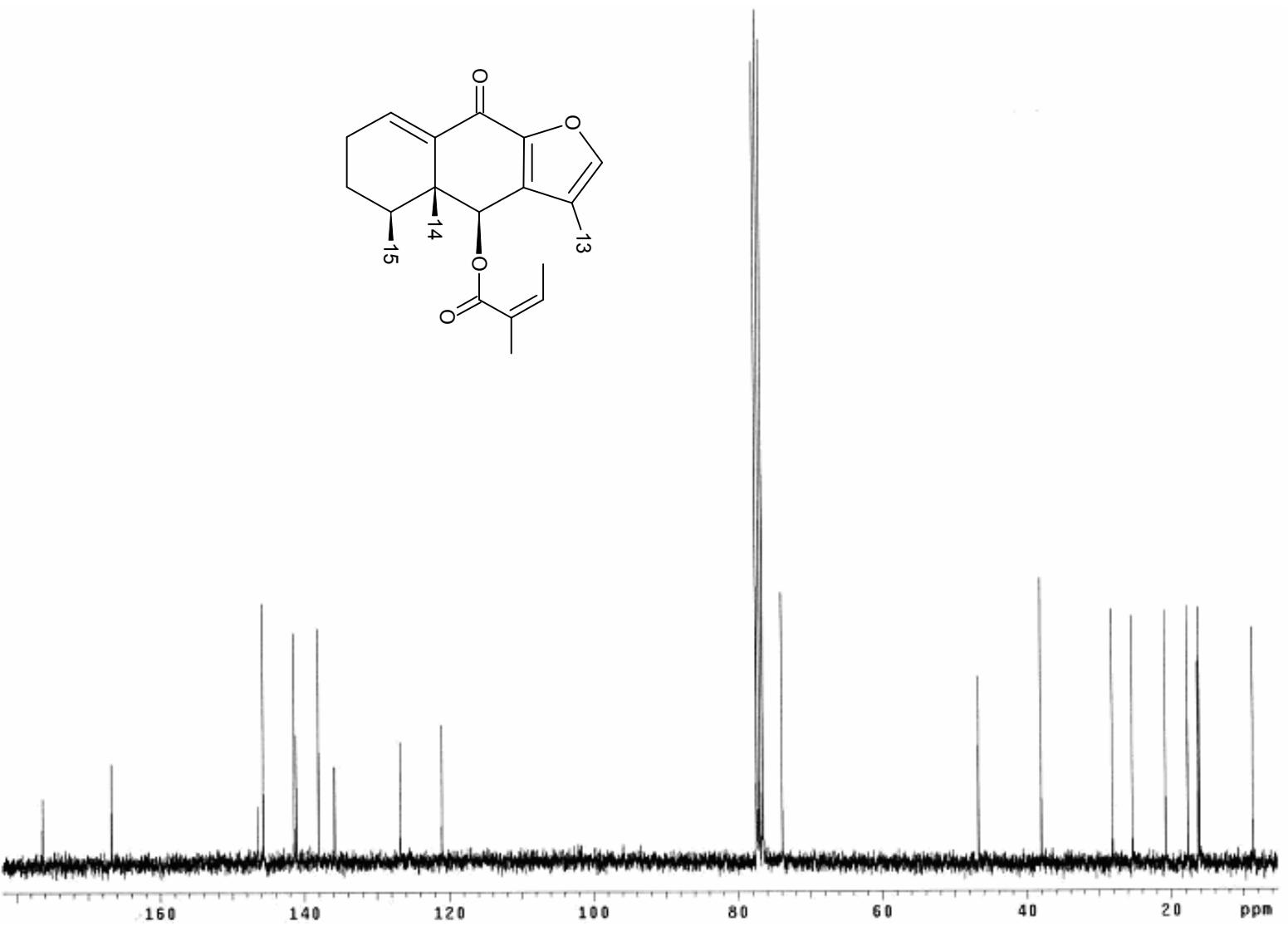


**Espectro 2. IR de Neoadenostilona**

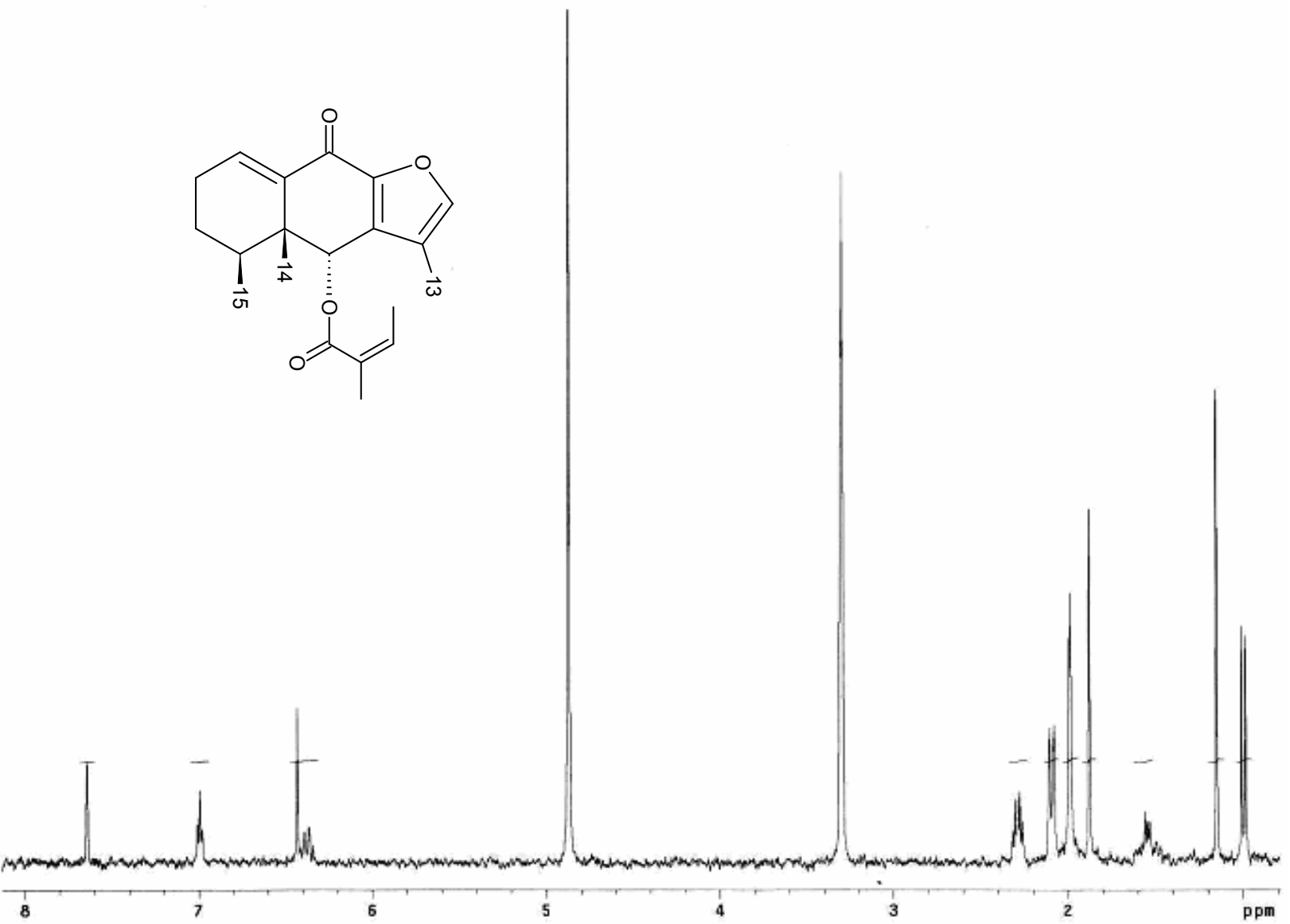




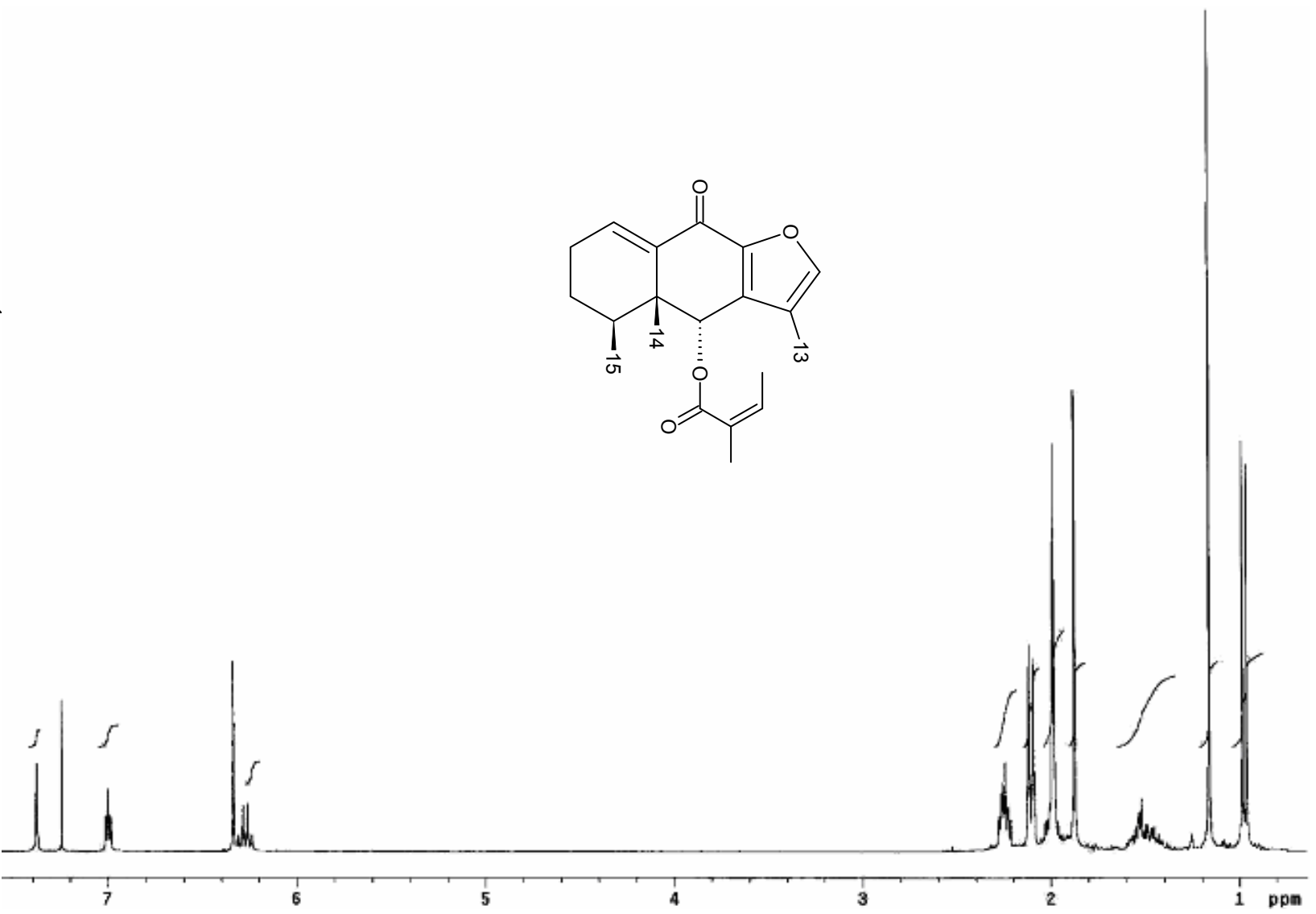
**Espectro 3.** RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  de la Neoadenostilona



**Espectro 4.** RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$  de Neoadenosilona



**Espectro 5.** RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de la Epineoadenosilona



Espectro 6. RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  de la Epineoadenosilona.

