



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE  
PIRROLIZIDINAS HEPATOTÓXICAS EN EL TÉ MILAGRO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**ERIK CASTRO CARRANZA**



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Dr. Francisco Hernández Luis
1er sup.	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2do sup.	Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema:

---

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Supervisor técnico:

---

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante:

---

Erik Castro Carranza

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por aceptarme dentro de su equipo de trabajo y por toda su confianza para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al SNI por la beca otorgada como Ayudante de Investigador de enero a diciembre de 2006.

Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

A la Dra. Mabel Fragoso por todo el apoyo técnico durante la realización del trabajo de investigación y por su paciencia y ayuda incondicional.

A la Q. Georgina Duarte y Q.F.B. Margarita Guzmán de la USAI, Facultad de Química, por su apoyo y las facilidades otorgadas para los análisis en GC-MS.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones en la revisión del presente proyecto de tesis.

## DEDICATORIAS

A mis padres a los cuales adoro y que siempre tienen su confianza en mí. A mi padre de quien heredé todas las herramientas y habilidades que me han llevado hasta este momento de mi vida. A mi mamá quien me brindó la mejor educación y que simplemente me ha enseñado a vivir.

A mis hermanas Estela, Edith y Elvia y mis primos Saúl y Karla, para que el presente trabajo represente una motivación para ustedes y puedan seguir adelante.

A cada uno de los miembros de mi extensa familia, principalmente a mis primos Beto, Rigo, Adán y Johnny, con quienes he tenido muchos de los momentos más agradables de mi vida.

A mis tíos Saúl y Nora, de quienes he recibido su apoyo total e incondicional y por la confianza que siempre han tenido en mí. Saúl, gracias por haber demostrado ser más que un verdadero amigo a lo largo de toda mi vida.

A mis compañeros en la Facultad de Química: Berny, Nadia, Juan Rodolfo, Alejandra, Susana, Esteban, Roberto Carlos, Gustavo, Christian y a todos aquellos que por descuido olvidé, por su amistad incondicional y por todos los momentos que hicieron más amena mi estancia en la Facultad.

A mis compañeros del Laboratorio 123: Bere, Gaby, Maribel, Israel, Francisco, Daniel, Carolina, Lilia, Edgar y Nadia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por otorgarme una formación académica de primer nivel y, sobretodo, por el perfil como profesionista y la misión de servicio que forjaron en mi.

A Dios, quien me ha ayudado en todo momento en mi vida y que, más que salud, la oportunidad de vivir o cualquier otro beneficio mundano, me ha dado el espíritu en el cual Él se encuentra siempre presente.

---

---

## Índice general

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE GRÁFICAS .....	III
LISTA DE CUADROS .....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	5
2.1. Generalidades de la tribu Senecioneae .....	5
2.2. Perfil químico del género <i>Senecio</i> .....	7
2.3. Alcaloides pirrolizidínicos .....	9
2.3.1. Estructura química .....	9
2.3.2. Distribución .....	11
2.3.3. Biogénesis .....	12
2.3.4. Toxicología .....	18
2.3.5. Aspectos clínicos y patológicos .....	22
2.4. Etnobotánica del “té milagro”, un complejo de plantas medicinales.....	22
2.5. Métodos cromatográficos.....	27
2.5.1. Clasificación de los métodos cromatográficos .....	28
2.5.2. Cromatografía de líquidos.....	31
3. Hipótesis de trabajo .....	34
4. Objetivos .....	34
4.1. Objetivo general .....	34
4.2. Objetivos específicos .....	34
5. Parte experimental .....	35
5.1. Material vegetal y productos analizados .....	35
5.2. Sustancias de referencia.....	38
5.3. Técnicas analíticas.....	38
5.3.1. Análisis mediante HPLC .....	38
5.3.2. Análisis mediante GC-MS .....	39
5.3.3. Cromatografía en capa fina (c.c.f.).....	39

---

---

5.4.	Procesamiento del material vegetal .....	40
5.4.1.	Extracción .....	40
5.4.2.	Obtención del crudo alcaloideo .....	40
5.5.	Análisis cualitativo preliminar .....	41
5.6.	Análisis en GC-MS .....	42
5.7.	Análisis en HPLC .....	43
5.7.1.	Análisis preliminar .....	43
5.7.2.	Validación del método analítico .....	44
5.7.2.1.	Especificidad .....	45
5.7.2.2.	Rango .....	45
5.7.2.3.	Linealidad y exactitud .....	46
5.7.2.4.	Precisión .....	47
5.7.3.	Cuantificación de los AP .....	48
6.	Resultados y discusión .....	50
6.1.	Obtención del extracto metanólico y crudos alcaloideos .....	50
6.2.	Análisis cualitativo en c.c.f. ....	51
6.3.	Análisis de CABL y CAT por GC-MS .....	52
6.4.	Análisis en HPLC .....	56
6.4.1.	Análisis preliminar .....	56
6.4.2.	Validación del método analítico .....	59
6.4.2.1.	Especificidad .....	59
6.4.2.2.	Rango .....	60
6.4.2.3.	Linealidad y exactitud .....	61
6.4.2.4.	Precisión .....	68
6.4.3.	Cuantificación de senecionina, retrorsina y 4-hidroxifenilacetato de metilo .....	69
7.	Conclusiones .....	77
8.	Bibliografía .....	79



---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esqueletos básicos de los sesquiterpenos característicos de la tribu Senecioneae. ....	8
Figura 2. Acilos alifáticos presentes en sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae. ....	8
Figura 3. Constituyentes químicos identificados de <i>Packera coahuilensis</i> . ....	9
Figura 4. Estructura básica de los alcaloides pirrolizidínicos. ....	10
Figura 5. Biogénesis de las necinas. ....	13
Figura 6. Necinas más comunes en los alcaloides pirrolizidínicos. ....	14
Figura 7. Ciclización de ácidos en la senecionina. ....	15
Figura 8. Algunos ejemplos de la diversidad estructural de los AP. ....	17
Figura 9. Rutas metabólicas que conducen a la activación o a la desintoxicación de los alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos. ....	20
Figura 10. Mecanismo de acción de los pirroles con grupos nucleofílicos de las moléculas biológicas. ....	21
Figura 11. Productos comerciales de “té milagro”. ....	24
Figura 12. <i>Packera candidissima</i> . ....	25
Figura 13. <i>Packera bellidifolia</i> . ....	25
Figura 14. Comercialización del “té milagro”. ....	26
Figura 15. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos. ....	32
Figura 16. Esquema de un equipo de HPLC. ....	33
Figura 17. Producto comercial “Thé milagro”. ....	36
Figura 18. Fitomedicamento “Thé Ocotzotl”. ....	36
Figura 19. Fitomedicamento “Té milagro”. ....	37
Figura 20. Preparado fitofarmacéutico “té maravilloso”. ....	37
Figura 21. Esquema de obtención de los crudos alcaloideos a partir del fraccionamiento del extracto metanólico. ....	42
Figura 22. Visualización de los alcaloides pirrolizidínicos en c.c.f. mediante el reactivo de Dragendorff. ....	52
Figura 23. Cromatograma de gases de CAT. ....	54
Figura 24. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico Rr. ....	54

---

---

Figura 25. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico Sn.....	55
Figura 26. Espectro de masas de FAcMe. ....	55
Figura 27. Espectro de masas del acetato de 1-hidroxi-4-oxociclohexilo. ....	56
Figura 28. Cromatograma obtenido en la columna Spherisorb®.....	57
Figura 29. Cromatograma obtenido en la columna XTerra®. ....	57
Figura 30. Diferencia de composición en los cromatogramas de CABL y CAT. ....	58
Figura 31. Espectros de absorción en UV de las soluciones de referencia y solución de CAT. ....	60

---

---

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Curva de calibración de FAcMe. ....	62
Gráfica 2.	Curva de calibración de Rr. ....	62
Gráfica 3.	Curva de calibración de Sn. ....	63
Gráfica 4.	Evaluación de la exactitud y linealidad del método para FAcMe. ....	65
Gráfica 5.	Evaluación de la exactitud y linealidad del método para Rr. ....	66
Gráfica 6.	Evaluación de la exactitud y linealidad del método para Sn. ....	67
Gráfica 7.	Contenido de retrorsina en las muestras analizadas. ....	71
Gráfica 8.	Contenido de senecionina en las muestras analizadas. ....	71
Gráfica 9.	Contenido de 4-hidroxifenilacetato de metilo en las muestras analizadas. ....	72
Gráfica 10.	Contenido de FAcMe, Rr y Sn en función del tipo de muestra analizada. ....	74

---

---

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los métodos cromatográficos.....	29
Cuadro 2. Programa de elución en gradiente de la fase móvil.....	44
Cuadro 3. Rendimientos obtenidos de extracto metanólico, CABL y CAT.....	50
Cuadro 4. Resultados del estudio preliminar en HPLC. ....	59
Cuadro 5. Límites de cuantificación de FAcMe, Rr y Sn. ....	61
Cuadro 6. Datos para las curvas de calibración de FAcMe, Rr y Sn. ....	61
Cuadro 7. Parámetros utilizados para la evaluación de la linealidad del sistema. IC( $\beta_0$ ) con una confianza de 95%. ....	63
Cuadro 8. Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con FAcMe. ....	64
Cuadro 9. Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con Rr. ....	65
Cuadro 10. Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con Sn. ....	66
Cuadro 11. Parámetros utilizadas para la evaluación de la linealidad del sistema. IC( $\beta_0$ ) y IC( $\beta_1$ ) con una confianza de 95%. ....	67
Cuadro 12. Resultados para la evaluación de la repetibilidad. ....	68
Cuadro 13. Resultados para la evaluación de la precisión intermedia.....	69
Cuadro 14. Resultados generales de la cuantificación de Rr, Sn y FacMe.....	70
Cuadro 15. Promedio del contenido de FAcMe, Rr y Sn de acuerdo al tipo de muestra. ....	74
Cuadro 16. Abundancia de las bases libres y N-óxidos de Rr y Sn. ....	75
Cuadro 17. Dosis calculadas de té milagro que producirían efectos tóxicos considerables en humanos.....	75

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AP</b>	Alcaloides pirrolizidínicos
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High-Performance Liquid Chromatography)
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
<b>CABL</b>	Crudo alcaloideo de bases libres
<b>CAT</b>	Crudo de alcaloides totales
<b>c.c.f.</b>	Cromatografía en capa fina
<b>Sn</b>	Senecionina
<b>Rr</b>	Retrorsina
<b>FAcMe</b>	4-Hidroxifenilacetato de metilo
<b>R.A.</b>	Reactivo analítico
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>β<sub>0</sub></b>	Ordenada al origen de la ecuación de regresión lineal
<b>β<sub>1</sub></b>	Pendiente de la ecuación de regresión lineal
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>IC(β<sub>0</sub>)</b>	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
<b>IC(β<sub>1</sub>)</b>	Intervalo de confianza para la pendiente
<b>%r</b>	Porcentaje de recobro
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>IC(μ)</b>	Intervalo de confianza para la media poblacional

## **1. Introducción**

El uso de la medicina tradicional es muy extendido en los países en vías de desarrollo, mientras que el uso de la medicina complementaria y alternativa está aumentando rápidamente en los países desarrollados. Se habla de terapias de la medicina tradicional, si éstas implican el uso de productos naturales a base de hierbas, partes de animales y/o minerales. Los remedios herbolarios incluyen hierbas y materiales elaborados con hierbas, así como los productos y los preparados acabados que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales de plantas o combinaciones de las mismas (OMS, 2002a).

Desgraciadamente, no todas las plantas consumidas con fines terapéuticos o alimenticios son benéficas, se ha visto que numerosas especies vegetales son tóxicas para los vertebrados. En algunas especies de las familias Asteraceae, Boraginaceae y Leguminoseae se atribuye principalmente este efecto a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (AP), dichos compuestos se siguen consumiendo involuntariamente en la medicina tradicional debido a su actividad analgésica a pesar de los efectos secundarios adversos que estos producen como la mutagenicidad, la citotoxicidad, carcinogenicidad, entre otros (Bah, 1992).

En el caso de las culturas del México antiguo, aquellas plantas proveedoras de alimentos y sustancias curativas, fueron un elemento fundamental en la vida

cotidiana. Diversos documentos coloniales tempranos, como los de Martín de la Cruz y Juan Badiano, Bernardino de Sahagún y Francisco Hernández recopilan una amplia variedad de remedios vegetales con diversos usos, unos bajo conceptos médicos nativos consignados en el *Libellus Medicinalibus Indorum Herbis*, de Martín de la Cruz y Juan Badiano y otros a la concepción europea de la acción y la utilidad de las plantas medicinales plasmada en la *Historia de las cosas de la Nueva España*, de Sahagún (Bye, 1999).

La forma de consumo de los productos naturales en la medicina tradicional varía en gran medida de un país a otro y de una región a otra, pues reciben la influencia de factores como la cultura y tradiciones locales, la historia y las actitudes e ideas personales. En muchos casos, la teoría y la aplicación de los remedios herbolarios son muy diferentes a las de la medicina convencional. La utilización a lo largo del tiempo de muchos de sus procedimientos, incluida la experiencia transmitida de generación en generación, ha demostrado aparente inocuidad y eficacia de la medicina tradicional, pero se necesitan investigaciones científicas que aporten pruebas suplementarias al respecto. Con la enorme expansión de la medicina tradicional en todo el mundo, la inocuidad, la eficacia y el control de la calidad de los medicamentos herbarios y de los tratamientos basados en procedimientos tradicionales han suscitado un gran interés entre las autoridades sanitarias y el público consumidor. Diferentes culturas han generado diversos procedimientos terapéuticos de aplicación en la medicina tradicional, sin

la existencia de una formulación paralela a las normas internacionales para la elaboración de fitoremedios y sin la existencia de métodos analíticos apropiados para la evaluación de su calidad (Gaedcke, 2003). Es por lo anterior que la OMS ha definido su papel en la medicina tradicional, desarrollando una estrategia ideada para tratar los temas asociados con la política, la seguridad, la eficacia, la calidad, el acceso y el uso racional de los productos herbolarios (OMS 2002a).

Ahora el imperativo que se plantea es el de velar por que se utilice adecuadamente la medicina tradicional y determinar cómo se debe hacer la investigación y la evaluación de las materias primas de los remedios herbolarios. En este sentido, la OMS ha llevado a cabo una serie de publicaciones con respecto a la medicina tradicional, entre las que destacan: Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional, Pautas para la evaluación de medicamentos herbarios, Pautas de investigación para la evaluación de la inocuidad y la eficacia de los medicamentos herbarios (OMS 2002b).

La investigación científica etnobotánica sobre las plantas medicinales ha tenido una amplia trayectoria a lo largo de la historia contemporánea de México, en especial durante la segunda mitad del siglo pasado. Sin embargo, las investigaciones químicas y farmacológicas han sido relativamente escasas, lo que ha impedido la incorporación de las materias primas vegetales como fitomedicamentos en la medicina moderna. La investigación médica formal de



estos recursos se inició durante la época del Porfiriato, en las dos últimas décadas del siglo XIX. Se fundó el Instituto Médico Nacional, que tuvo como objetivo llevar a cabo el estudio de la flora medicinal mexicana para su incorporación en la terapéutica nacional. Este instituto se clausuró y fue hasta la década de los setenta cuando se retomó la organización multidisciplinaria de la investigación de la flora medicinal creándose el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAN), este instituto dio lugar al Centro de Investigación en Plantas Medicinales del IMSS. Otras instituciones que llevan a cabo investigación sobre la flora medicinal son el Instituto Nacional Indigenista (ahora Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas), así como laboratorios de investigación de diversas instituciones educativas (Rivera, 1999).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Generalidades de la tribu Senecioneae

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

- a) La subtribu Bieniospermatinae la cual engloba a cuatro pequeños géneros con afinidades todavía no bien esclarecidas.
- b) La subtribu Senecioninae que incluye a 96 géneros según Nordenstam (1977) o a 88 géneros de acuerdo con Robins (1977), la mayor parte de los cuales provienen de dos géneros mal definidos, *Cacalia* y *Senecio*. El complejo “cacaloide” se encuentra distribuido en México y en el este asiático, mientras que el “senecioide” es cosmopolita aunque se localiza a nivel endémico en algunas regiones como los Andes, las Indias Occidentales y el África austral y tropical (Nordenstam 1977, Heinrich 1998).

La relación del género *Packera* con la tribu Senecioneae no se encuentra bien establecida desde un punto de vista taxonómico. Algunos estudios 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, Tussilagininae y Senecioninae. Con base en su morfología, hay un acuerdo general de que el género *Packera* es un miembro de la subtribu Senecioninae, pero su posición no está definida con exactitud. Jeffrey (1992) coloca a *Packera* en la subtribu Senecioninae. Según Nordenstam (1977), la subtribu Senecioninae incluye 96 géneros u 85 de acuerdo con Robins (1977).

La mayor parte de las 1500 especies que integran el género *Senecio* está definida en base en estudios citológicos, siendo el parámetro utilizado el número de cromosomas del propio *Senecio* ( $n=10$ ), o múltiplos de este número ( $n=20, 30$ , etc.). Sin embargo, se han encontrado alteraciones en este número básico, particularmente en Norte y Centroamérica, donde varias especies de *Senecio* se han distinguido por la presencia de 23 cromosomas (Nordenstam 1977; Barkley, 1978, 1986, Bain 2000). Debido a estas alteraciones, incluyendo su relación con evidencias morfológicas, se estableció una segunda clasificación (Barkley, 1978), con base en el número de cromosomas  $n=8$ , 51 especies que habían sido incluidas en el género *Senecio* fueron separadas y transferidas al género *Packera* (Weber & Löve, 1981). De esta manera, *Senecio candidissimus* y *Senecio bellidifolius* pasan a clasificarse como *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia*, respectivamente. La transferencia de estas y otras especies se basó en evidencias morfológicas descritas por Barkley (1978) y en evidencias citológicas confirmadas para muchas de estas especies en los estudios realizados por varios autores. Por

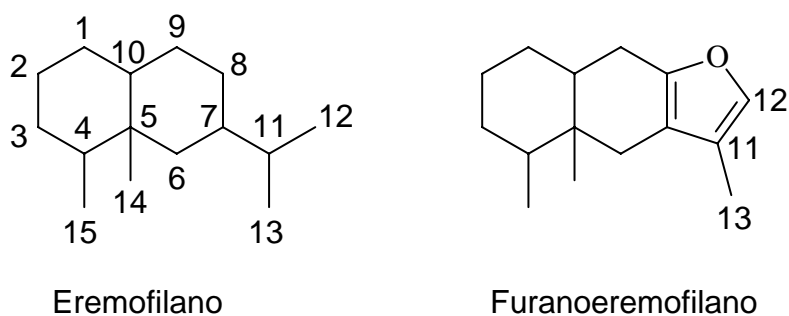
otra parte, la caracterización del perfil metabólico de estos géneros se utiliza también como otro criterio para su clasificación.

## 2.2. Perfil químico del género *Senecio*

Debido a 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*.

Los metabolitos secundarios encontrados en la tribu Senecioneae son totalmente diferentes a los de otras tribus de la familia Asteraceae. Se han estudiado más de 16 géneros y 250 especies de las 3200 que integran la tribu. Un gran número de las especies investigadas sintetizan alcaloides pirrolizidínicos (AP), los cuales tienen estructuras básicas variadas. Sin embargo, los AP se han encontrado en un amplio número de plantas pertenecientes a familias taxonómicamente distantes. Así, 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 (Mattocks, 1986).

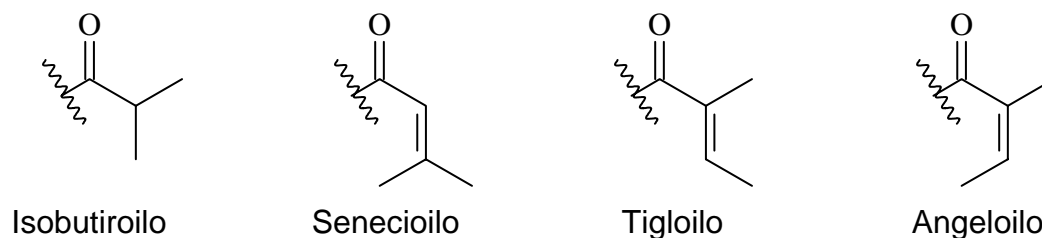
El segundo rasgo quimiotaxonómico más importante de la tribu Senecioneae es la presencia de sesquiterpenoides con esqueleto de eremofilano y furanoeremofilano (Figura 1).



**Figura 1.** Esqueletos básicos de los sesquiterpenos característicos de la tribu Senecioneae.

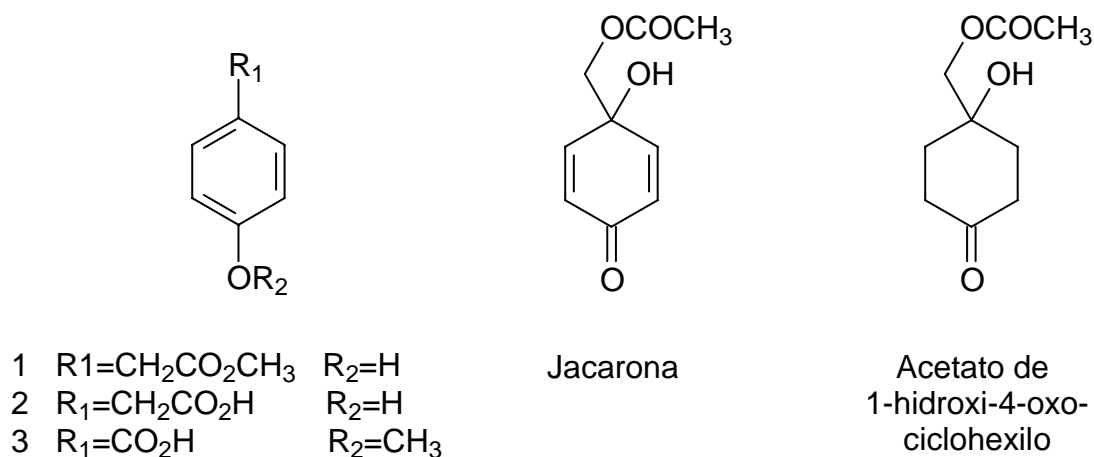
Estas estructuras presentan un gran número de variaciones, tales como:

- a) Oxidaciones en los anillos para introducir grupos hidroxilo, cetona, epóxido.
- b) Oxidación de metilos para dar COOH.
- c) Formación de lactonas (eremofilanólidas).
- d) Esterificación de los OH por ácidos alifáticos saturados o insaturados (Figura 2) con cuatro átomos de carbono (isobutiroilo) o cinco átomos de carbono (senecioilo, tigloilo y angeloilo)



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

En *Packera coahuilensis*, Pérez-Castorena y colaboradores (2001) describieron la presencia de tres derivados fenólicos (Figura 3), constituyentes que también fueron encontrados en *Packera bellidifolia*. Otros de los compuestos que se identificaron en *Packera coahuilensis* son la jacarona (previamente aislada de *P.fendleri*, *P. clevelandii* y *P. anónima*), el acetato de 1-hidroxi-4-oxociclohexilo y el cacalol descrito este último como un constituyente activo de esta especie por Bohlmann (1986).



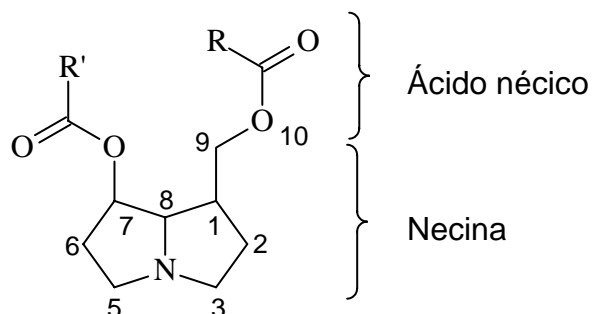
**Figura 3.** Constituyentes químicos identificados de *Packera coahuilensis*.

## 2.3. Alcaloides pirrolizidínicos

### 2.3.1. Estructura química

La mayor parte de los alcaloides pirrolizidínicos (AP) ó pirrolizidinas son ésteres de 1-hidroximetilpirrolizidinas frecuentemente hidroxiladas en diversas posiciones del núcleo estructural, siendo la posición C-7 la más recurrente. El

núcleo básico de aminoalcohol recibe el nombre de necina, mientras que la porción ácida se conoce como ácido néxico (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura básica de los alcaloides pirrolizidínicos.

Se han aislado necinas esterificadas como productos naturales. Varias de estas necinas tienen la característica de poseer una insaturación  $\Delta^{1(2)}$  que representa el requerimiento estructural para que estos alcaloides presenten toxicidad (Mattocks, 1986). Las posiciones C-7 y C-9 en las necinas se encuentran, con algunas excepciones, esterificadas por uno o dos ácidos carboxílicos o por un ácido dicarboxílico para formar, en estos dos últimos casos, un macrólido de 11 a 14 miembros. Los alcaloides pirrolizidínicos pueden encontrarse en la naturaleza en forma de bases libres o de *N*-óxidos (Bah y Pereda-Miranda, 2003).

### 2.3.2. Distribución

Los alcaloides pirrolizidínicos han sido aislados en diversos organismos, incluyendo plantas y animales. Se han identificado gran número de alcaloides pirrolizidínicos en plantas de las familias Asteraceae (Compositae), principalmente en el género *Senecio*, Boraginaceae y Fabaceae (Leguminosae) distribuidas en todo el mundo (Stegelmeier, 1999). También se han aislado de otras familias como Apocynaceae, Casuarinaceae, Ehretiaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Poaceae (Gramineae), Ranunculaceae, Santalaceae y Scrophulariaceae (Justus, 1997).

En cuanto a la localización de la planta, las dos formas en que se encuentran los AP (bases libres y *N*-óxidos) pueden existir de manera simultánea en diferentes partes (semillas, hojas, flores, etc.) y en proporciones muy variadas, dependiendo de la estación del año, del lugar de recolección y de la etapa de desarrollo de la planta. Aunque no se dispone de un inventario total de las plantas productoras de estos metabolitos, un gran número de ellas han formado parte de la herbolaria medicinal o la culinaria regional de varios países, siendo consumidas deliberada o inconscientemente, ya sea como alimentos o como remedios. Con frecuencia, diversas plantas consumidas por humanos, así como pastos utilizados como forraje para el ganado, están contaminados con plantas ricas en AP (Bruneton, 1999), igualmente se ha observado contaminación en leche y miel, por lo que constituye un verdadero problema de salud en muchas regiones,

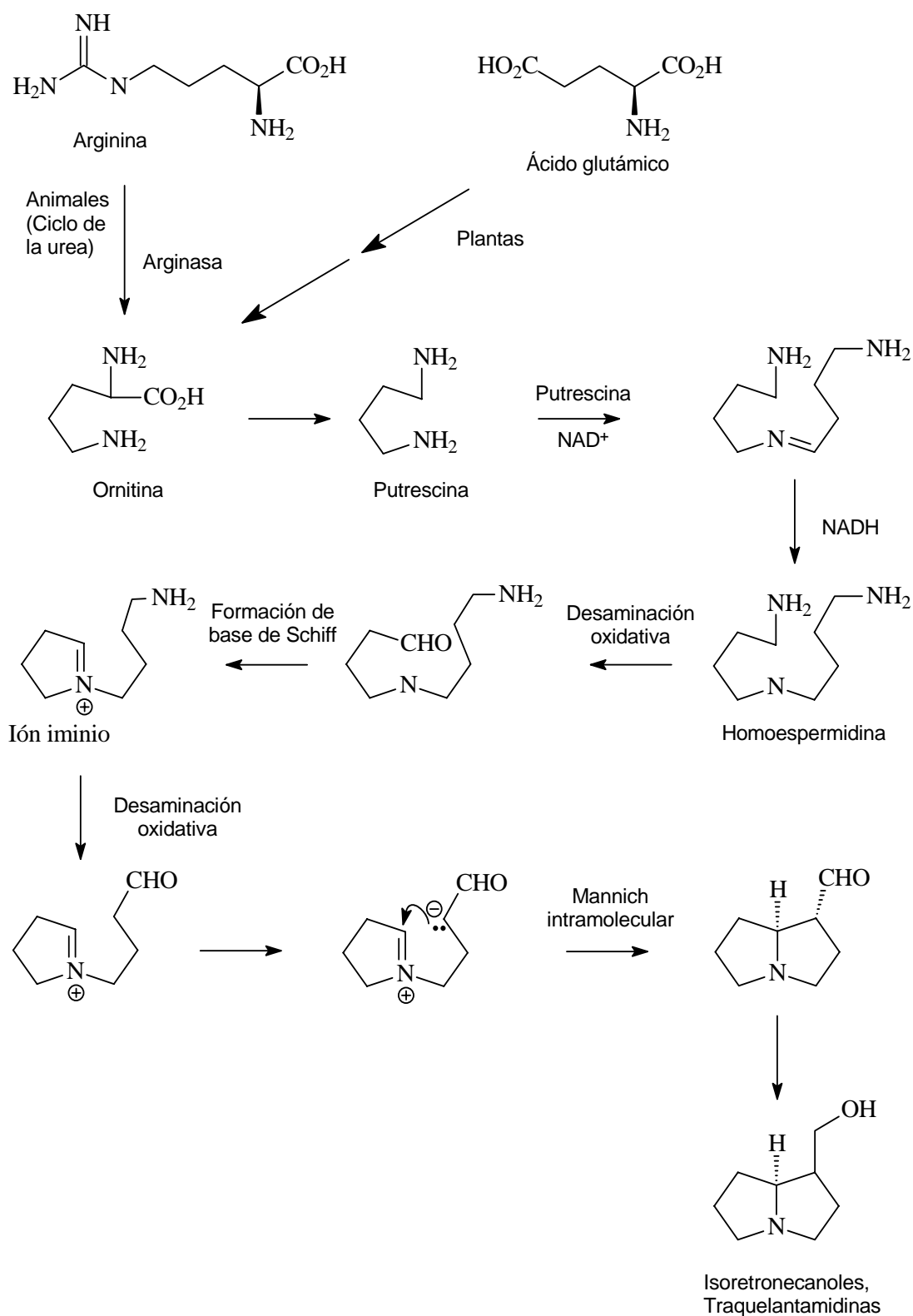


particularmente en países en vías de desarrollo (Deinzer, 1982; Panter, 1990; Molyneux, 1990; Aston, 1996).

En el caso de animales silvestres, los AP se han aislado de ranas (Daly, 1998) e insectos, principalmente. Se presume que estos animales no sintetizan este tipo de alcaloides, sino que secuestran los alcaloides vegetales presentes en sus fuentes alimenticias. Para el caso de los lepidópteros, las pirrolizidinas cumplen una doble función ya que les confieren una protección contra sus depredadores y sirven como precursores de feromonas esenciales (Bah y Pereda-Miranda, 2003).

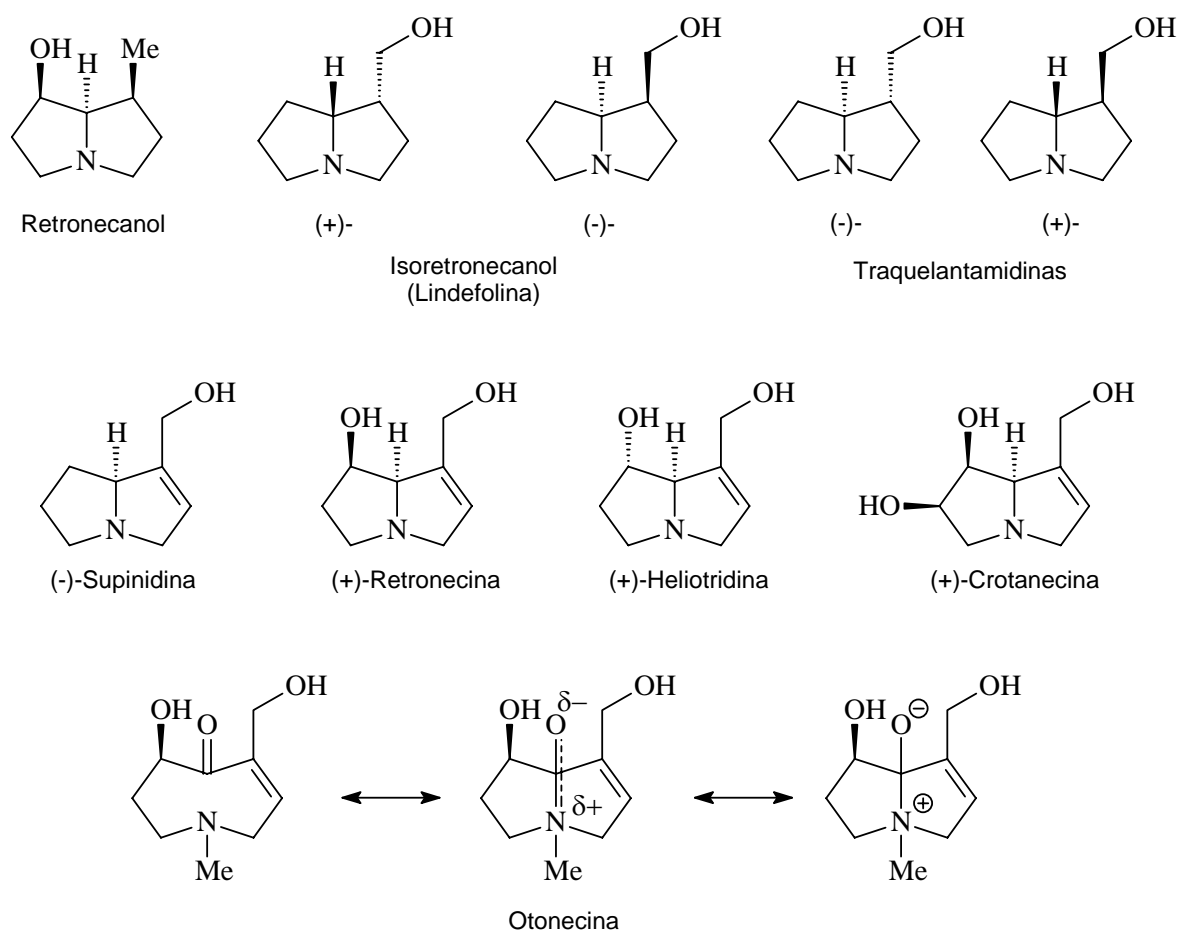
### **2.3.3. Biogénesis**

Las necinas, así como los ácidos néricos, se generan durante el metabolismo de los aminoácidos. En el caso de las necinas, éstas se biosintetizan a partir de la L-ornitina, tal aminoácido se produce tanto en animales como en plantas. En los animales, se origina a partir de la L-arginina durante el ciclo de la urea, en una reacción catalizada por la enzima arginasa, mientras que en las plantas, se forma a partir del ácido L-glutámico. Los intermediarios para este tipo de alcaloides incluyen la putrescina y la homoespermidina (Bah y Pereda-Miranda, 2003) (Figura 5).



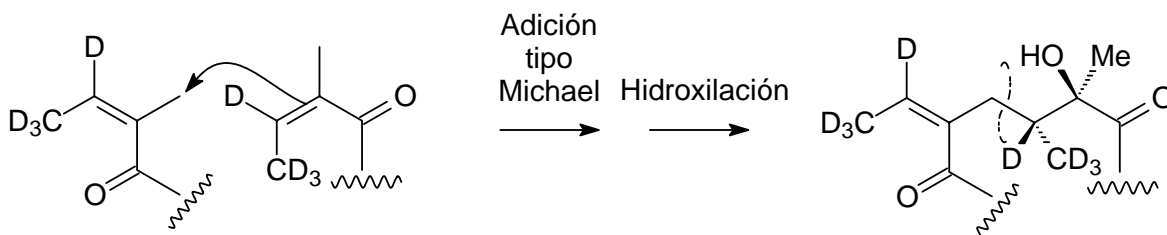
**Figura 5.** Biogénesis de las necinas.

Durante la ruta biosintética, la homoespermidina sufre una serie de oxidaciones y reducciones, así como diversas reacciones intramoleculares que conducen a la formación de los núcleos de (+) y (-)-isorretronecanol y de traquelantamidina, las cuales a su vez se transforman en otras necinas saturadas e insaturadas (Figura 6). Tales transformaciones se llevan a cabo por medio de diversas reacciones entre las que se encuentran la hidroxilación, la deshidratación y la N-metilación.



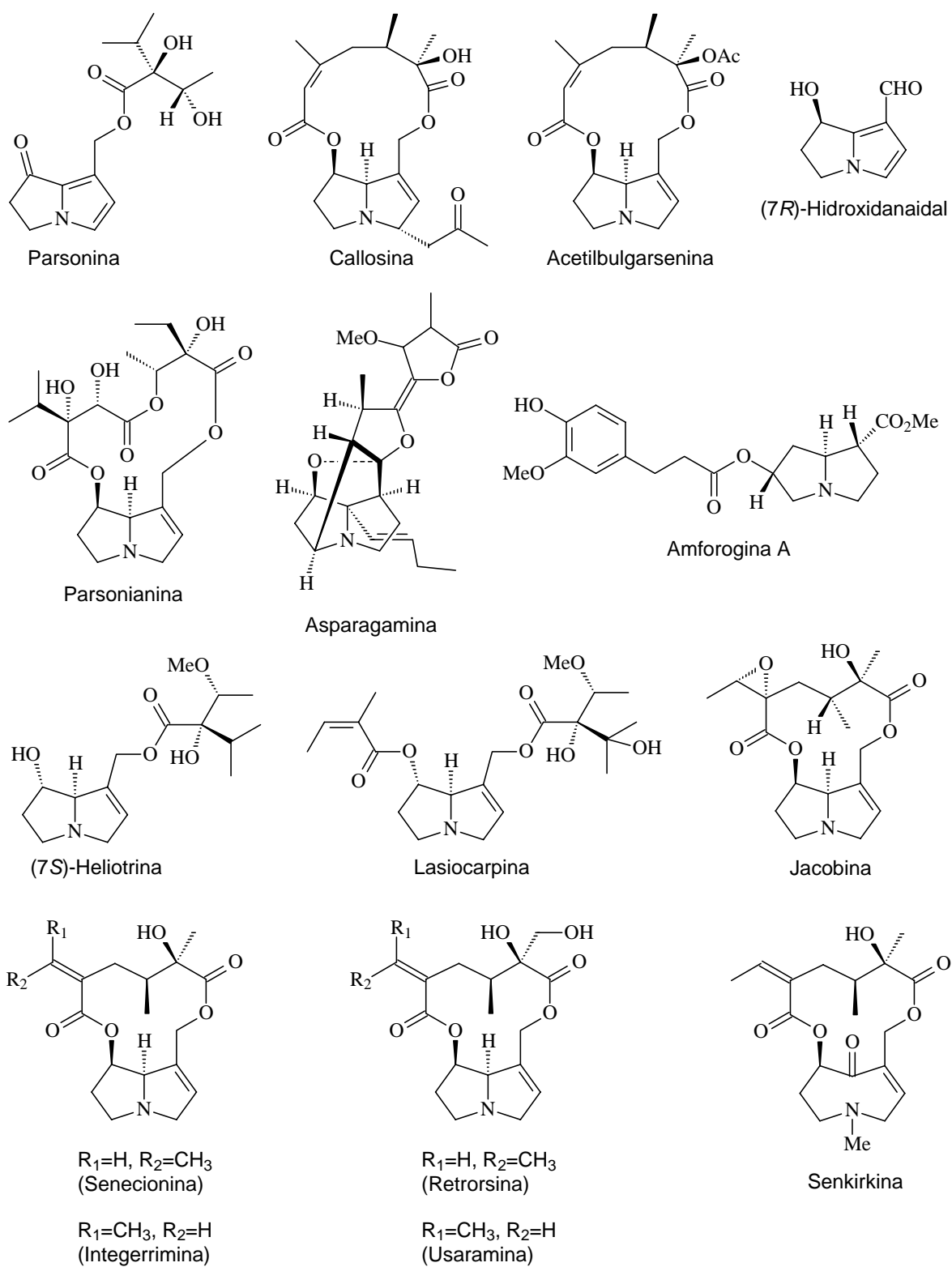
**Figura 6.** Necinas más comunes en los alcaloides pirrolizidínicos.

Por otra parte, en contraste con la biosíntesis de las necinas, los ácidos nécicos se generan a partir de diferentes rutas que involucran a los aminoácidos L-valina, L-leucina y L-isoleucina y el producto secundario de ésta última, la L-treonina. Mediante el metabolismo de la treonina, se biosintetizan los ácidos de cinco átomos de carbono, como el angélico, el tíglico y el sarrasínico, mientras que la valina se convierte en los ácidos senécico (o senecioico) (Herbert, 2001a), viridiflórico y traquelantánico. La formación de los ácidos dicarboxílicos con diez átomos de carbono en la porción ácida de los alcaloides pirrolizidínicos macrocíclicos se lleva a cabo mediante ciclizaciones de los diésteres abiertos. Por ejemplo, Hebert (2001b) observó, utilizando reactivos marcados con deuterio, que la senecionina se forma a partir de la 7,9-diangeloilretronecina mediante una reacción de adición tipo Michael (Figura 7). La porción ácida de los macrólidos de 14 miembros se genera mediante una reacción de esterificación adicional entre los ácidos que se encuentran esterificando las posiciones C-7 y C-9. Los ácidos aromáticos se originan de la ruta del siquimato, tal es el caso del ácido nécico en la amforogina A (Figura 8) el cual es un fenilpropanoide.



**Figura 7.** Ciclización de ácidos en la senecionina.

Una clasificación considera a los alcaloides pirrolizidínicos como saturados o insaturados, de acuerdo a la naturaleza de su necina y como monoésteres o diésteres abiertos o cíclicos, esta clasificación es útil cuando se considera la toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos. Sin embargo, existe una amplia diversidad estructural de estos alcaloides, desde el grado de insaturación en la parte de la necina hasta el tipo de sustituyentes que contienen (Figura 8).



**Figura 8.** Algunos ejemplos de la diversidad estructural de los AP.

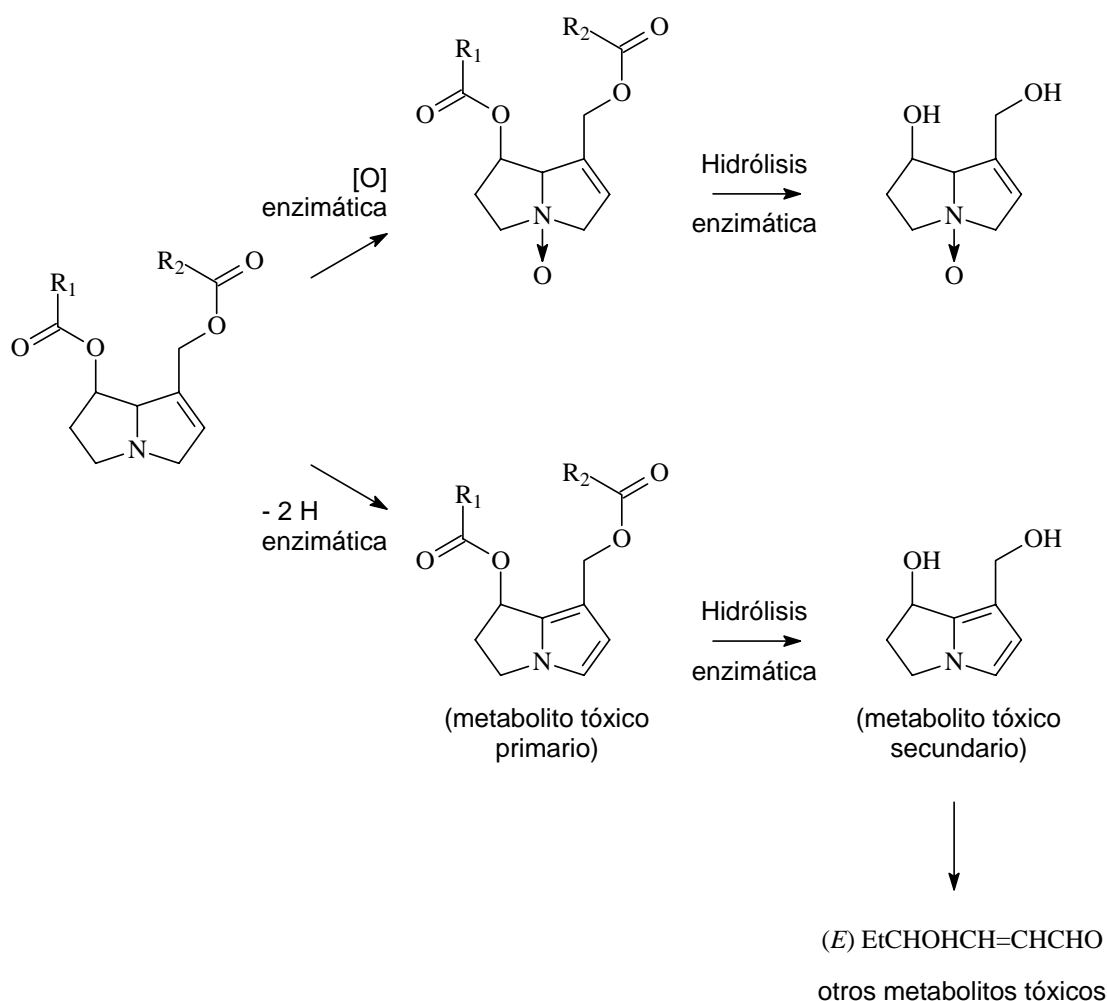
### **2.3.4. Toxicología**

El aspecto más importante de las especies vegetales que sintetizan alcaloides pirrolizidínicos está asociado con la alta toxicidad demostrada por estos metabolitos. La Organización Mundial de la Salud emitió una alerta sobre los efectos dañinos de algunos remedios a través de la publicación en 1988 de una lista de 248 especies medicinales pertenecientes a más de 40 diferentes géneros, 60 de las cuales sintetizan alcaloides pirrolizidínicos (WHO, 1988). Esta toxicidad se manifiesta principalmente en efectos hepatotóxicos, aunque también se han establecido sus efectos citotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, entre otros. Se demostró que los alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos son las necinas que contienen el doble enlace entre las posiciones C-1 y C-2, así como la presencia de los mono- o diésteres. En principio los *N*-óxidos presentan la misma toxicidad que las bases libres insaturadas, dado que se reducen en el tracto intestinal, aunque por su solubilidad en el agua, tienden a excretarse (Bah y Pereda-Miranda, 2003).

Se ha demostrado que la toxicidad se debe a los metabolitos y no a los propios alcaloides aislados en sus fuentes naturales. En los mamíferos los alcaloides pirrolizidínicos se metabolizan en el hígado y, como una consecuencia, este órgano resulta sumamente dañado, independientemente de la vía de administración. La estimulación de las enzimas microsomales del hígado por el pretratamiento con fenobarbital incrementa la susceptibilidad de los animales a los

alcaloides pirrolizidínicos, debido a una aceleración de las rutas metabólicas para la formación de los metabolitos tóxicos (Yang, 2001). En el organismo, los AP siguen diversas vías de metabolismo y sus efectos biológicos dependen del balance de cada una de ellas. Las principales rutas metabólicas consisten en la hidrólisis enzimática de los ésteres, la conversión de los alcaloides pirrolizidínicos a sus respectivos *N*-óxidos y la deshidrogenación para formar derivados pirrólicos (dihidropirrolizidinas). Las dos primeras rutas se consideran como de desintoxicación, éstas se llevan a cabo 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. Por su parte, la formación de pirroles se asocia a la toxicidad de estos alcaloides (Figura 9).

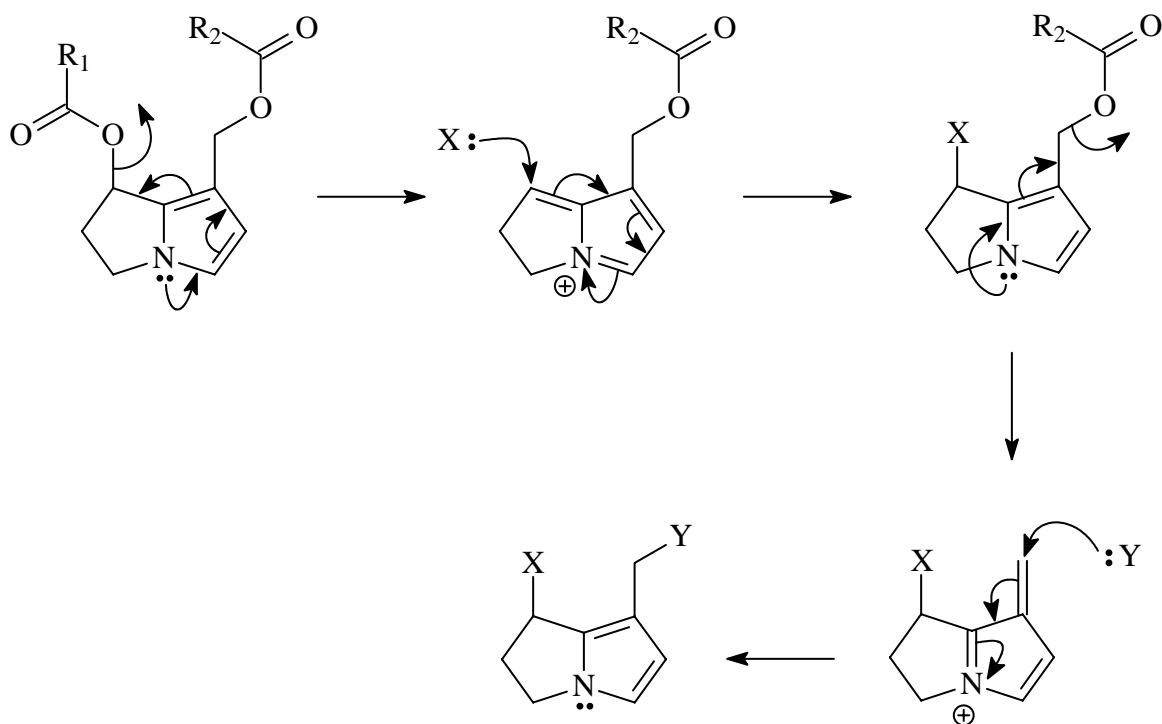




**Figura 9.** Rutas metabólicas que conducen a la activación o a la desintoxicación de los alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos.

La toxicidad de los pirroles está asociada a su elevada reactividad como agentes alquilantes de los constituyentes químicos de los tejidos, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los grupos nucleofílicos de estas macromoléculas, como el sulfhidrilo, el hidroxilo o los aminos, como en las purinas y las pirimidinas, reaccionan con los núcleos pirrólicos producidos en el metabolismo de los AP; tales metabolitos forman iones carbonio susceptibles de

sufrir ataques nucleofílicos en sus posiciones C-7 y C-9 e inclusive en otras posiciones (Huxtable, 1990) (Figura 10).



**Figura 10.** Mecanismo de acción de los pirroles con grupos nucleofílicos de las moléculas biológicas.

La doble alquilación puede dar como resultado un enlazamiento entrecruzado irreversible de las hebras del ADN o del ARN. 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 estos metabolitos. Aunque el metabolismo de los alcaloides pirrolizidínicos a pirroles ocurre casi exclusivamente en el hígado, se han encontrado trazas de sus metabolitos en los pulmones, los riñones y el bazo de animales de laboratorio (Mattocks, 1986).

### **2.3.5. Aspectos clínicos y patológicos**

La “enfermedad del *Senecio*” se observa una vez transcurridos varios días después de haber consumido los AP. Los primeros síntomas consisten en náuseas, dolores de estómago, ascitis acompañada de una dilatación de las venas del abdomen y fiebre. Los mayores efectos de los AP se manifiestan en el hígado obstruyendo las venas hepáticas y dilatando el hígado, los pulmones también pueden presentar edemas. La ingestión de pequeñas cantidades de AP durante periodos prolongados produce malestar agudo y que a la larga conduce al estado crónico, éste último se caracteriza por una fibrosis en el hígado que se convierte en una cirrosis indistinguible de otros tipos de cirrosis por lo que es difícil asociar esta enfermedad directamente al consumo de AP.

Desde el punto de vista patológico, se estableció que los metabolitos producidos en el hígado dañan las células parenquimales hepáticas, causando una megalocitosis caracterizada por la presencia de células anormales gigantes (WHO 1988).

### **2.4. Etnobotánica del “té milagro”, un complejo de plantas medicinales**

Un complejo de plantas medicinales consiste de un conjunto de remedios herbolarios que no están relacionados taxonómicamente a nivel de especie, género o incluso familia pero que comparten una misma aplicación terapéutica, un

mismo nombre común (popular) y algunas características organolépticas y anatómicas distintivas. Dentro del complejo, la especie que se considera como más efectiva se denomina con el nombre de dominante y se emplea ampliamente, llegando en muchos casos, a presentar una distribución comercial mayor a la de su área geográfica natural. Las especies subordinadas son aquellas consideradas como de menor calidad y se utilizan cuando la especie dominante no se encuentra disponible. (Linares y Bye, 1987; Pereda-Miranda et al., 2006).

El “té milagro” es un remedio herbolario ampliamente comercializado en nuestro país y que se exporta al sur de los Estados Unidos (Kay, 1996). Este complejo de plantas se utiliza con diversos propósitos, primordialmente se destacan los usos como antiséptico. Este complejo incluye las especies *Packera candidísima* (Greene) W.A. Weber & A. Löve (Sin: *Senecio candidissimus*), la especie dominante en el norte de país, y *Packera bellidifolia* (H.B.K.) W.A. Weber & A. Löve (*Senecio bellidifolius* H.B.K., *Senecio vulneraria* DC, *Senecio vulnerarius* Sessé & Moc, *Senecio lactucella* Sessé & Moc.) que se comercializa en la zona central bajo el mismo nombre comercial de “té milagro” (Figura 11). Otros nombres populares con los que se conoce a esta última especie son: calancapatle, calancapacle, nanahuapatli, palancapatli o lechugilla (Martínez, 1989).



**Figura 11.** Productos comerciales de “té milagro”.

La *Packera candidisima* es una hierba perene perteneciente a la familia de las compuestas (Astereceae) con una distribución que se limita exclusivamente a las montañas centrales de la Sierra Tarahumara en el estado de Chihuahua (Figura 12). Esta especie es utilizada por los Tarahumaras quienes la llaman “chucaca”. En los mercados de plantas locales se le conoce como “lechuguilla de la sierra” o “té milagro” (Figura 14).



**Figura 12.** *Packera candidissima*.



**Figura 13.** *Packera bellidifolia*.



**Figura 14.** Comercialización del “té milagro”.

El “té milagro” se utiliza con diversos propósitos medicinales, destacándose los usos como agente antiséptico. Las raíces y las hojas de la planta se aplican en forma de cataplasmas para el tratamiento de las úlceras y las heridas de la piel. Las infusiones se utilizan contra la diabetes, los dolores de riñón y de la vagina (Bye, 1985, 1986). La planta seca y pulverizada se mezcla con poca agua en el tratamiento de heridas, ampollas, úlceras, o inclusive, como baño medicinal. Un cataplasma, formado por la planta fresca mezclada con aceite de oliva, se aplica varias veces al día en ampollas, tumores e infecciones. La raíz se aplica en caries dentales para el alivio del dolor de muelas y para el tratamiento de abscesos dentales. 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 “tres 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.

## **2.5. Métodos cromatográficos**

En general, los métodos para el análisis químico son, en el mejor de los casos, selectivos; pocos, si es que los hay, son verdaderamente específicos. En consecuencia, la separación del compuesto de interés de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados a partir de mezclas complejas que con otros métodos resulta imposible.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria, según su afinidad. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a



la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia final de la distinta afinidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Hostettmann, 1998).

### **2.5.1. Clasificación de los métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto; en la cromatografía de columna, un tubo contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión o gravedad; en la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad. La otra clasificación, más fundamental, de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de la fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los analitos entre las fases. De esta manera se pueden citar tres clases generales: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos; en el Cuadro 1 se hace mención de la fase móvil correspondiente para cada tipo de cromatografía.

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un sólido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

**Cuadro 1.** Clasificación de los métodos cromatográficos.

En la cromatografía de elución de columna, la elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continua de una nueva fase móvil. Una única porción de la muestra se introduce en la parte inicial de la columna, después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases. La introducción de fase móvil adicional (el *eluyente*) hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde

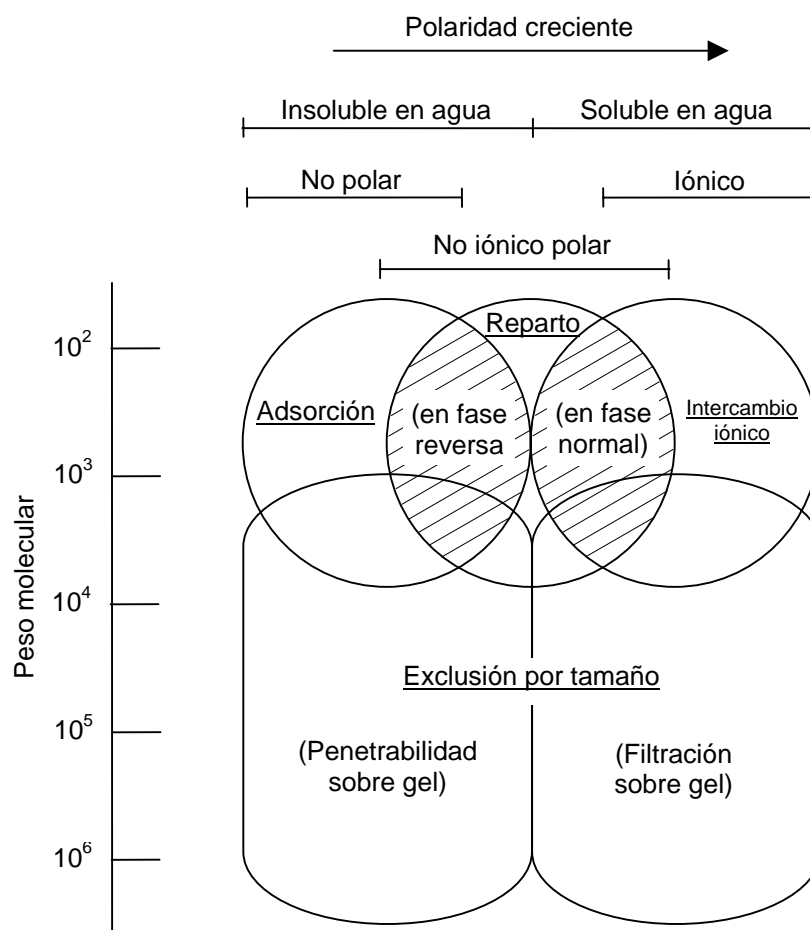
tiene lugar un posterior equilibrio entre la fase móvil y las porciones frescas de fase estacionaria a las que accede. Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra. Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas del soluto por la columna en una serie de transferencias continuas entre las fases estacionaria y móvil. Sin embargo, debido a que el movimiento de los solutos sólo puede ocurrir en la fase móvil, la “velocidad” media a la que una zona de soluto migra en la columna depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente en la fase estacionaria y es más grande cuando es más probable la retención en la fase móvil. En el mejor de los casos, las diferencias de velocidad que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas, o zonas, que se localizan a lo largo de la columna. Evidentemente, el movimiento de avance por la columna aumenta la distancia entre dos bandas, sin embargo, al mismo tiempo tiene lugar un ensanchamiento de ambas zonas, lo que disminuye la eficiencia de la columna como sistema de separación. Aunque el ensanchamiento de banda es inevitable, pueden encontrarse condiciones en las que ocurra más lentamente que la separación de las bandas. Si un detector que responde a la concentración del soluto se coloca al final de la columna, y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido), se obtiene un gráfico compuesto por una serie de picos al que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo (tiempos de retención,

$t_R$ ) puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

### **2.5.2. Cromatografía de líquidos**

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, entre otras razones, por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, muchos campos de la ciencia y la sociedad en general. Algunos ejemplos de estas sustancias son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, entre otras.

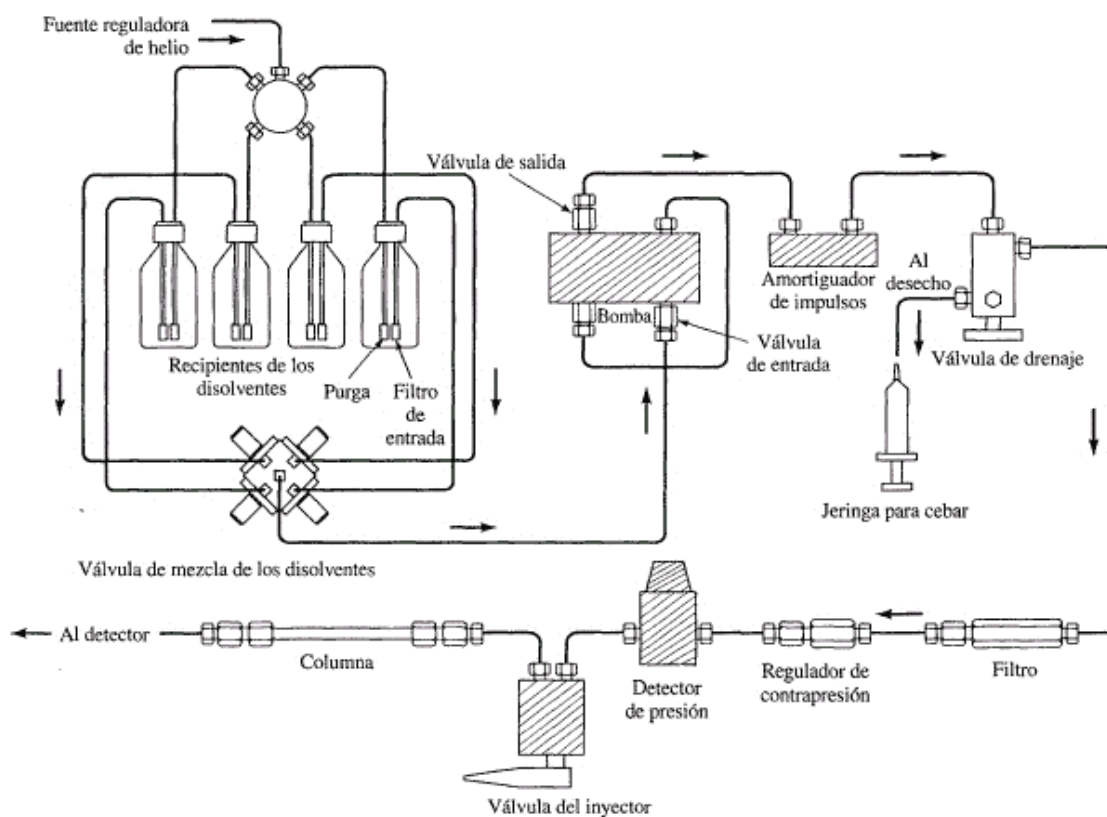
La Figura 15 pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios en lo que a sus campos de aplicación, los cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de la moléculas de prueba, en especial de su polaridad y la solubilidad en disolventes orgánicos polares y mezclas acuosas.



**Figura 15.** Aplicaciones de la cromatografía de líquidos.

En las primeras etapas del desarrollo de cromatografía de líquidos se observó que se pueden conseguir grandes aumentos en la eficiencia de la columna disminuyendo el tamaño de las partículas del empaque, con objeto de alcanzar un flujo del sistema de elusión razonable con el empleo de partículas de tamaño entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se requieren presiones elevadas, por lo que el equipo para HPLC tiende a ser más complejo. En términos generales, las partes fundamentales del equipo utilizado en HPLC son: recipientes para la fase móvil y

sistemas para el tratamiento de los disolventes, sistema de bombeo, sistema de inyección de la muestra, columna(s), detector(es). La Figura 16 muestra con más detalle las partes mencionadas (Skoog 2001).



**Figura 16.** Esquema de un equipo de HPLC.

### 3. Hipótesis de trabajo

Mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se podrá desarrollar una técnica analítica para cuantificar los alcaloides pirrolizidínicos presentes en muestras de *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia* y así determinar su potencialidad toxicológica; además, mediante el empleo técnicas espectroscópicas y espectrométricas podrán identificarse otros compuestos mayoritarios presentes en el crudo alcaloideo obtenido de tales muestras para utilizarlos como posibles compuestos marcadores.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo general

Establecer el contenido de pirrolizidinas hepatotóxicas en el complejo de especies conocido como té milagro mediante HPLC.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Desarrollar y validar una técnica en cromatografía para cuantificar pirrolizidinas hepatotóxicas y observar el perfil para ambas especies.
- Realizar el análisis químico de los extractos alcaloideos.

## 5. Parte experimental

### 5.1. Material vegetal y productos analizados

Se compraron cuatro lotes (muestras 1-4) de la planta conocida como “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. Los cuatro lotes corresponden a *Packera bellidifolia*.

Un lote (muestra 5) de “chucaca” o “lechuguilla de la sierra” se adquirió en el local conocido como “el Chinito” en el mercado La Reforma en la ciudad de Chihuahua, Chih. el 23 de agosto de 1989. Este lote corresponde a *Packera candidissima*.

Se recolectó un lote (muestra 6) de *Packera candidissima*, cerca de la Estación Sánchez al oeste de Creel, Chih., el 31 de agosto de 2006.

Se recolectó un lote (muestra 7) de *Packera candidissima* procedente de la Sierra Tarahumara en la ciudad de Chihuahua, Chih. el 22 de octubre de 2006.

Un lote de “té milagro” (muestra 8, Figura 17) se adquirió en el mercado municipal de Fresnillo, Zac., con procedencia de Monterrey el 27 de octubre de 2006. Este lote corresponde a *P. candidissima*.





**Figura 17.** Producto comercial “Thé milagro”.

Se adquirió un preparado fitofarmacéutico (muestra 9, Figura 18) conocido como “Thé Ocotzotl” en una tienda de productos naturistas de la ciudad de Santiago de Querétaro, Qro. el 20 de agosto, 2006 (Lote L0609422). Este producto consistía en una solución líquida de color café y un olor característico.



**Figura 18.** Fitomedicamento “Thé Ocotzotl”

Se compró un fitomedicamento conocido como “té milagro” (muestra 10, Figura 19) en Chihuahua Chih., el 22 de octubre de 2006. Este producto presentaba las mismas características organolépticas que el “Thé Ocotzotl”.



**Figura 19.** Fitomedicamento “Té milagro”.

Se compró una caja del preparado fitofarmacéutico conocido como “te maravilloso” (muestra 11) en Chihuahua, Chih. el 22 de octubre de 2006 (Linares 1811). Este producto estaba compuesto por diversas especies de plantas secas y trituradas y presentaba un olor aromático característico (Figura 20).



**Figura 20.** Preparado fitofarmacéutico “té maravilloso”.

La identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

## **5.2. Sustancias de referencia**

Como sustancias de referencia para el desarrollo y validación del método analítico fueron utilizados los siguientes reactivos:

- Senecionina Fluka® (denominada Sn).
- Retrorsina Sigma® (denominada Rr).
- 4-hidroxifenilacetato de metilo Aldrich® con pureza del 99% (denominada FAcMe)

## **5.3. Técnicas analíticas**

### **5.3.1. Análisis mediante HPLC**

El análisis por HPLC se llevó a cabo en un equipo Waters®, con detector de arreglo de diodos modelo 996, se utilizaron dos columnas analíticas Waters®, ambas de fase reversa, Spherisorb® S10 ODS2 (4.6 x 250mm) y XTerra® RP18 (4.6 × 150 mm). La fase móvil consistió en una mezcla en gradiente de NH<sub>4</sub>OH (15 mM)-CH<sub>3</sub>CN con un flujo de 0.4 mL/min. Los cromatogramas fueron obtenidos y procesados por medio del software Empower 1 desarrollado por Waters®.

### **5.3.2. Análisis mediante GC-MS**

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases (Agilent® Mod. 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador Tiempo de Vuelo (TOF) marca LECO® modelo Pegasus 4D.

Condiciones GS: Se utilizó una columna capilar DB5-MS (10 m x 0.18 mm), espesor de película 0.18 µm. Inyector automático Agilent® modelo 7683B. Helio de alta pureza como gas acarreador con flujo de 50 mL/min. Temperatura isotérmica a 40 °C por un minuto; gradiente lineal de temperatura de 20 °C/min hasta llegar a 280 °C; tiempo a la temperatura final 10 min.

Condiciones MS: Temperatura de ionización 200 °C. Voltaje del detector 1650 V. Velocidad de escaneo 20 spectra/s, rango de masas 45-800 u.

### **5.3.3. Cromatografía en capa fina (c.c.f.)**

Se utilizaron cromatoplasmas de aluminio cubiertas de gel de sílice 60-F254 (Merck). Como eluyente se utilizó una mezcla CH<sub>3</sub>Cl:MeOH:NH<sub>4</sub>OH(25%) (85:14:1). Para revelar las cromatoplasmas, se utilizaron los reactivos de Dragendorff y Ehrlich.

## **5.4. Procesamiento del material vegetal**

### **5.4.1. Extracción**

Para cada lote analizado, un peso conocido de material vegetal, seco y fragmentado, que incluía las partes aéreas de la planta así como las raíces de ésta, se sometió a un proceso de eliminación de grasas por medio de una maceración con hexano por dos días (3 veces). Posteriormente, el residuo vegetal se extrajo por maceración con MeOH por dos días (3 veces). El extracto obtenido se filtró y concentró a sequedad mediante presión reducida.

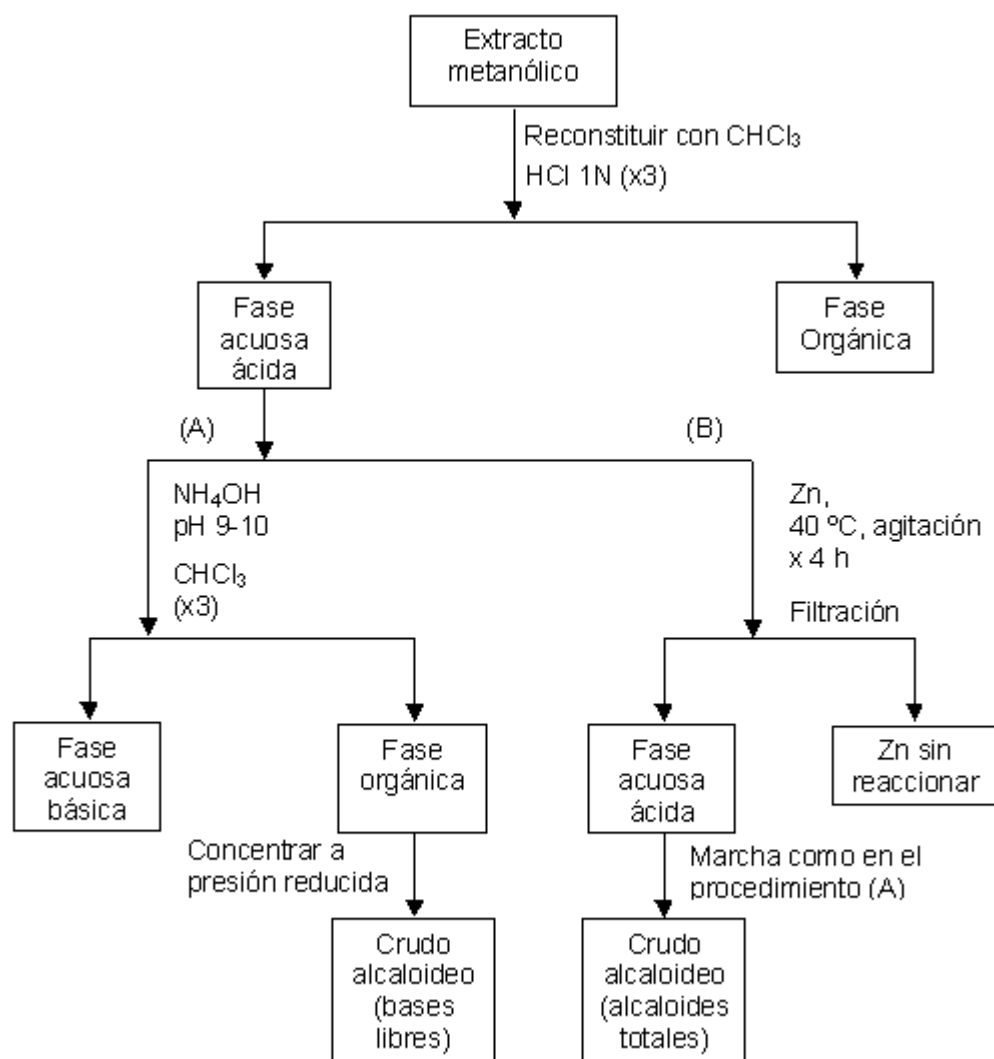
### **5.4.2. Obtención del crudo alcaloideo**

Un peso conocido de cada extracto metanólico se trató con  $\text{CHCl}_3$  (100 mL por cada 5 g de extracto) hasta resuspenderlo, para facilitar este proceso se utilizó un poco de HCl 1N. La solución clorofórmica se sometió a partición con HCl 1N (50 mL por cada 5 g de extracto, 3 veces). A partir del volumen total de la solución ácida obtenida, un volumen conocido se procesó de acuerdo al procedimiento A (Figura 21) en el que por medio de un fraccionamiento ácido-base se obtuvo un crudo alcaloideo que contiene aquellas pirrolizidinas presentes en el material vegetal como bases libres (denominado con la clave CABL). En un procedimiento paralelo, el volumen restante de la solución ácida se sometió a un proceso de reducción (Figura 21, parte B) utilizando para ello polvo de zinc al 10% con

respecto al peso del extracto metanólico fraccionado, esto con objeto de reducir aquellos alcaloides presentes como *N*-óxidos y obtener al final un crudo que contenga los alcaloides totales (denominado con la clave CAT), es decir, los AP presentes como bases libres así como los *N*-óxidos. Para el caso de los fitomedicamentos analizados, éstos se disolvieron en agua destilada y se ajustó a pH 1, a partir de esta solución ácida se procedió a fraccionar de acuerdo a la misma metodología.

### **5.5. Análisis cualitativo preliminar**

Cada extracto metanólico y crudo alcaloideo obtenido se sometió a un análisis cualitativo en cromatografía en capa fina (c.c.f.) para observar la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en cada lote de prueba, el sistema de elución utilizado fue una mezcla  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}(25\%)$  (85:14:1).



**Figura 21.** Esquema de obtención de los crudos alcaloideos a partir del fraccionamiento del extracto metanólico.

## 5.6. Análisis en GC-MS

Todos los crudos alcaloideos obtenidos fueron sometidos a un análisis de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) con la finalidad de identificar los AP presentes, así como lograr la identificación de

cualquier otro compuesto mayoritario en las muestras de prueba. Los componentes individuales se identificaron por medio de comparación de los espectros contenidos en la biblioteca del equipo, así como con los obtenidos con las sustancias de referencia.

## **5.7. Análisis en HPLC**

### **5.7.1. Análisis preliminar**

Se utilizó como fase móvil una mezcla en gradiente de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (15mM): $\text{CH}_3\text{CN}$  por 40 minutos (Cuadro 2), utilizando como fase estacionaria tanto la columna Spherisorb® como la XTerra®, el volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  (Mroczek, 2004). Se inyectó una solución de referencia que contenía Sn, Rr y FAcMe, además de otras soluciones preparadas con CABL y CAT. En esta etapa preliminar, se identificaron las longitudes de absorción máxima (para poder definir la longitud de trabajo en UV), y los tiempos de retención característicos de los estándares de Sn, Rr y FAcMe, además se comparó el desempeño de las columnas utilizadas.



Tiempo (min)	%A NH <sub>4</sub> OH (15 mM)	%B CH <sub>3</sub> CN
0	95	5
20	50	50
25	50	50
28	0	100
33	0	100
36	95	5

**Cuadro 2.** Programa de elución en gradiente de la fase móvil.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa preliminar, se decidió realizar los análisis en una longitud de 214 nm.

### 5.7.2. Validación del método analítico

Se evaluaron los criterios incluidos en la Guía de Harmonización Tripartita referente a la Validación de procedimientos analíticos (ICH Q2R) (ICH, 2005). Los parámetros evaluados, según el tipo de método desarrollado y por sugerencia de esta guía, fueron linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), especificidad y rango. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS® Ver.12.0 desarrollado por The Apache Software Foundation®.

### **5.7.2.1. Especificidad**

Se observó el espectro de absorción de UV de una solución de cada sustancia de referencia (Sn, Rr y FAcMe a 100 ppm) en un rango de 190 a 350 nm. Por otro lado, se preparó una solución de CAT (analizando previamente la solución por GC-MS para garantizar la presencia de los tres analitos de interés en esta muestra). De esta manera, el criterio para poder identificar inequívocamente cada analito se basa en la similitud del perfil de absorción en UV (longitud de máxima absorción y perfil del espectro) de los compuestos de interés en el crudo alcaloideo con respecto a los obtenidos con las soluciones de referencia.

### **5.7.2.2. Rango**

El rango se determinó de manera empírica preparando una solución primaria de cada sustancia de referencia con una concentración de 5 mg/mL, a partir de esta solución se prepararon por dilución otras soluciones con concentraciones finales de 2.5, 1.25, 0.5, 0.05, 0.005 y 0.0005 mg/mL. Se analizaron todas las soluciones anteriores determinando el posible rango en el que se tuviera una linealidad confiable.

### 5.7.2.3. Linealidad y exactitud

La linealidad del sistema se determinó por medio de la elaboración de una curva de calibración preparando, por triplicado, soluciones para cada sustancia de referencia. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

a) 4-hidroxifenilacetato de metilo. Se preparó una solución de 2.4 mg/mL en MeOH R.A., a partir de esta solución se prepararon otras soluciones con concentraciones finales de 1.2, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 mg/mL.

b) Senecionina. Se preparó una solución de 2 mg/mL en MeOH R.A., a partir de esta solución se prepararon otras soluciones con concentraciones finales de 1, 0.75, 0.5 y 0.25 mg/mL.

c) Retrorsina. Se preparó una solución de 5 mg/mL en MeOH R.A., a partir de esta solución se prepararon otras soluciones con concentraciones finales de 3, 1.5, 1 y 0.5 mg/mL.

Con los datos de respuesta obtenidos, se graficó el área bajo la curva de los picos de interés contra la concentración de cada solución, indicando la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal simple así como el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Como criterios de aceptación de linealidad, se debe cumplir con un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y el intervalo de confianza de la pendiente  $IC(\beta_1)$  no debe incluir el cero.

La linealidad y exactitud del método se evaluaron en un procedimiento paralelo en el que se prepararon una serie de soluciones (por triplicado, para cada sustancia de referencia) mediante la adición de una cantidad conocida del compuesto de interés a una matriz de trabajo. La matriz de trabajo consistió en una solución metanólica de CAT a una concentración de 1 mg/mL. Se prepararon cinco soluciones con 500  $\mu$ L de la matriz de trabajo y se adicionaron diferentes concentraciones de cada sustancia de referencia aforando a 1 mL con metanol; adicionalmente, se preparó y se analizó una solución que contenía sólo la matriz de trabajo. Con los resultados obtenidos, se graficó la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada indicando la ecuación obtenida así como el valor de  $r^2$ . Se calculó el intervalo de confianza para la ordenada al origen  $IC(\beta_0)$  y intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$ . También se calculó el porcentaje de recobro (%r) por medio de la relación de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada y el intervalo de confianza para la media poblacional  $IC(\mu)$  del porcentaje de recobro. Para asegurar la linealidad del método,  $r^2$  debe ser mayor a 0.98,  $IC(\beta_0)$  incluir el cero y  $IC(\beta_1)$  incluir la unidad. Los criterios para establecer la exactitud del método requieren que  $IC(\mu)$  incluya el 100%.

#### **5.7.2.4. Precisión**

Para la determinación de la repetibilidad (precisión del sistema) se preparó, por dilución a partir de una solución primaria, un sextuplicado de soluciones a una misma concentración (para cada sustancia de referencia). Se

registró la respuesta obtenida para cada solución y se calculó el CV, el cual no debe ser mayor 1.5% para asegurar la repetibilidad.

La precisión intermedia (precisión del método) se evaluó analizando por triplicado una misma solución de los compuestos de interés en dos días diferentes y por analistas diferentes. Se calculó el CV considerando que este no debe ser mayor de 2%.

### **5.7.3. Cuantificación de los AP**

El contenido alcaloideo presente en cada muestra de CABL y CAT se determinó por triplicado empleando la metodología descrita en el inciso 5.7.1. Se utilizó la columna XTerra® debido a que en los análisis preliminares presentó un mejor desempeño para la separación de los componentes presentes. Los análisis se llevaron a cabo a una longitud de 214 nm.

Para llevar a cabo los análisis de cuantificación, se prepararon soluciones de CABL y CAT disolviendo 5 mg en MeOH R.A. hasta un aforo de 2 mL para obtener una solución con concentración final de 2.5 mg de CABL o CAT por cada mililitro de solución. La cuantificación se llevó a cabo utilizando las ecuaciones de regresión lineal de las curvas de calibración obtenidas en la sección 6.4.2.3., se calculó entonces el contenido alcaloideo (en términos de la cantidad de Sn y Rr presente) para cada lote analizado, así como la cantidad de FAcMe, debido a que

este último constituyó un compuesto mayoritario en las muestras analizadas. Los rendimientos de los compuestos analizados se llevaron a cabo por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{mg_{analito}}{\mu L} * \frac{\mu L}{mg_{crudoalcaloideo}} * \frac{mg_{crudoalcaloideo}}{g_{extractome\ tan\ \acute{o}lico}} * \frac{g_{extractome\ tan\ \acute{o}lico}}{g_{materialvegetal}} = \frac{mg_{analito}}{g_{materialvegetal}}$$

Concentración de analito obtenida con las curvas patrón	Concentración de la solución de CAT o CABL analizada	mg de CAT o CABL obtenidos por cada g de extracto metanólico	g de extracto metanólico obtenidos por cada g de material vegetal	mg de analito obtenidos por cada g de material vegetal
---	---	--	---	---

Para el caso de los AP, se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de *N*-óxidos presentes en cada muestra (a partir del contenido de bases libres y de alcaloides totales):

$$\% N - \acute{o}xidos = \frac{Alcaloides\ totales - Bases\ libres}{Alcaloides\ totales} * 100$$

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Obtención del extracto metanólico y crudos alcaloideos

Los extractos metanólicos presentaban un color verde oscuro, mientras que los crudos alcaloideos eran de color marrón y olor acre característico. Se calculó el rendimiento porcentual de extractos metanólicos y crudos alcaloideos en relación a la cantidad de materia prima procesada (% g/g) (Cuadro 3).

Muestra	% Rendimiento (g/g)		
	%(Extracto metanólico)	%(CABL)	%(CAT)
1	18,08	0,216	0,264
2	12,51	0,119	0,206
3	13,01	0,366	0,205
4	13,34	0,565	0,306
5	25,76	0,942	0,480
6	16,89	0,813	0,555
7	27,23	0,178	0,276
8	22,37	0,174	0,291
9	-	-	0,010
10	-	-	0,006
11	16,33	0,046	0,055

**Cuadro 3.** Rendimientos obtenidos de extracto metanólico, CABL y CAT.

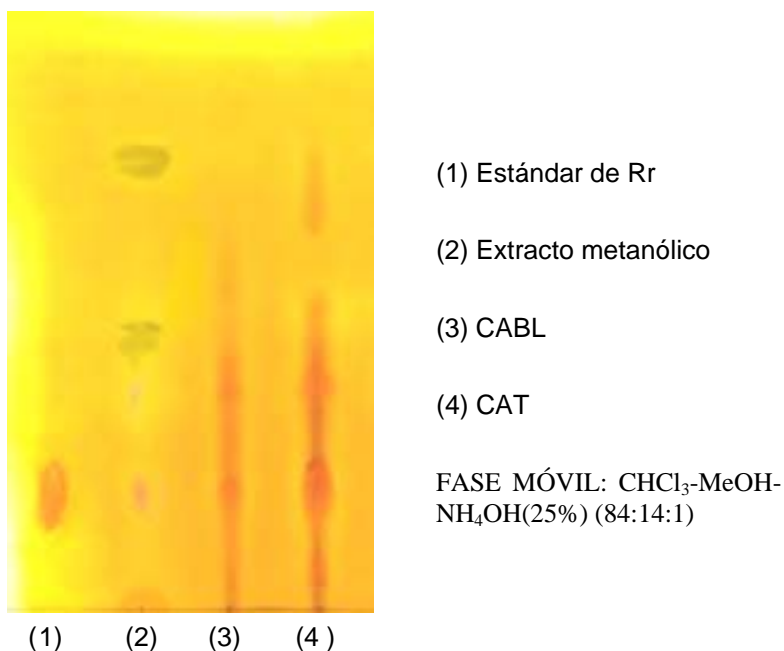
Los rendimientos obtenidos son variables y puede deberse en parte a que hubo variabilidad en las fechas y formas de obtención (compra o recolecta) de los

diferentes lotes de material vegetal analizados, de manera que las condiciones de almacenaje y desecación pudieron haber influido en las condiciones finales que presentaba la droga, y esto a su vez, pudo verse reflejado en la eficacia del proceso de extracción. Para el caso de los fitomedicamentos, sólo se obtuvo el CAT debido a que en los estudios preliminares en c.c.f. de estos productos se observaban cantidades de AP considerablemente menores con respecto a las obtenidas con los distintos lotes de material vegetal, de igual manera esto se refleja en los bajos rendimientos de CAT obtenidos a partir de estos productos.

## **6.2. Análisis cualitativo en c.c.f.**

En todos los lotes de plantas analizados, se observó la presencia de alcaloides, mediante el sistema de elución indicado en la sección 5.3.3. Por medio del revelado con el reactivo de Dragendorff (Figura 22) se observaron bandas de color anaranjado intenso que indica la presencia de alcaloides en las muestras; mientras que el revelado con el reactivo de Ehrlich, al ser específico para AP insaturados, permitió evidenciar la presencia de pirrolizidinas. En el caso de la muestra 11, no se observó la coloración azulada debida a la formación del complejo formado por el reactivo de Ehrlich con los AP insaturados.





**Figura 22.** Visualización de los alcaloides pirrolizidínicos en c.c.f. mediante el reactivo de Dragendorff.

Como se observa en la Figura anterior, los AP son perceptibles en forma diluida en la muestra del extracto metanólico. En cambio, la muestra de CABL presenta, como era de esperar, una mayor concentración de alcaloides y ésta se incrementa en la correspondiente a CAT.

### 6.3. Análisis de CABL y CAT por GC-MS

Mediante el empleo de GC-MS se realizó la identificación de los compuestos presentes en las distintas muestras de CABL y CAT (Figura 23). Se identificó la presencia de las pirrolizidinas Rr y Sn a 690 s y 706 s (11.5, 11.8 min) respectivamente, como alcaloides en común en todos los lotes de *P. bellidifolia* y

*P. candidissima* analizados. Esta observación se comprobó mediante la comparación de los espectros de masas (tiempo de retención y mismo patrón de fragmentación) obtenidos a partir de una solución de referencia que contenía Sn y Rr (Figuras 24 y 25). Adicionalmente, en todos los lotes se observaron dos señales significativamente predominantes, una a  $t_R$  421 s (7.0 min) y la otra a 437 s (7.3 min), por medio de los espectros de masas obtenidos (Figuras 26 y 27) se identificó el acetato de 1-hidroxi-4-oxociclohexilo y el 4-hidroxifenilacetato de metilo (FACMe), respectivamente, como los metabolitos responsables de estas señales. Debido a la predominancia de FACMe y a su capacidad de absorción en UV por las características aromáticas de su estructura, se decidió cuantificar también a este compuesto en las muestras analizadas. Para el caso del preparado fitofarmacéutico denominado “té maravilloso” no se detectó ningún AP como tampoco el acetato de 1-hidroxi-4-oxociclohexilo y FACMe.

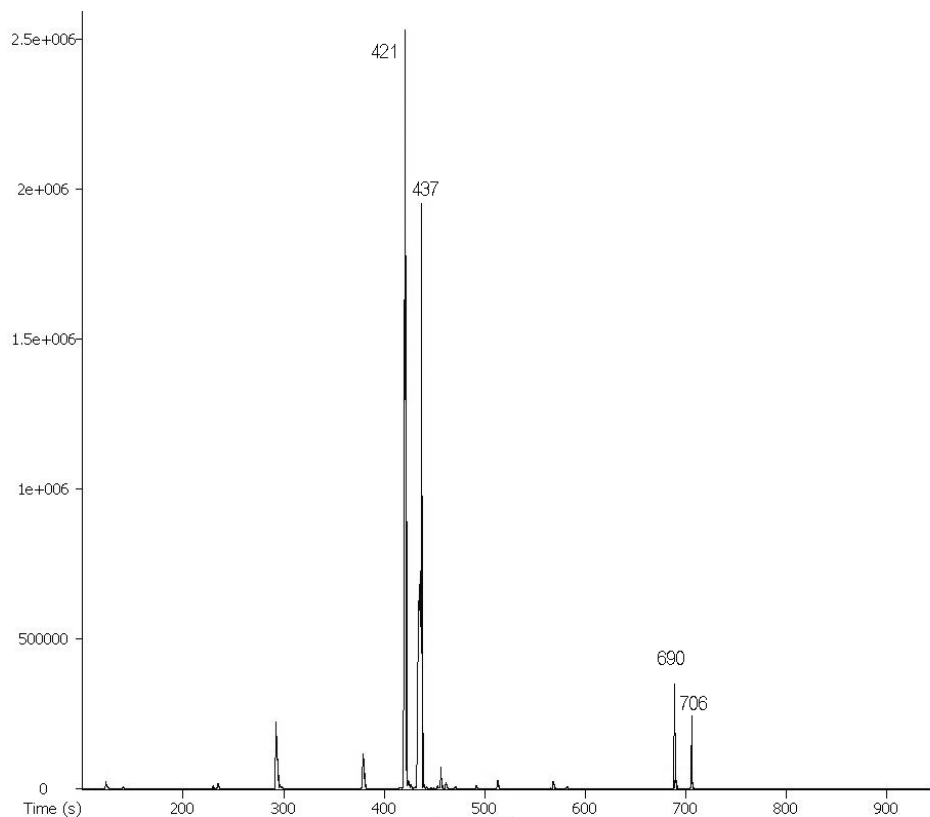


Figura 23. Cromatograma de gases de CAT.

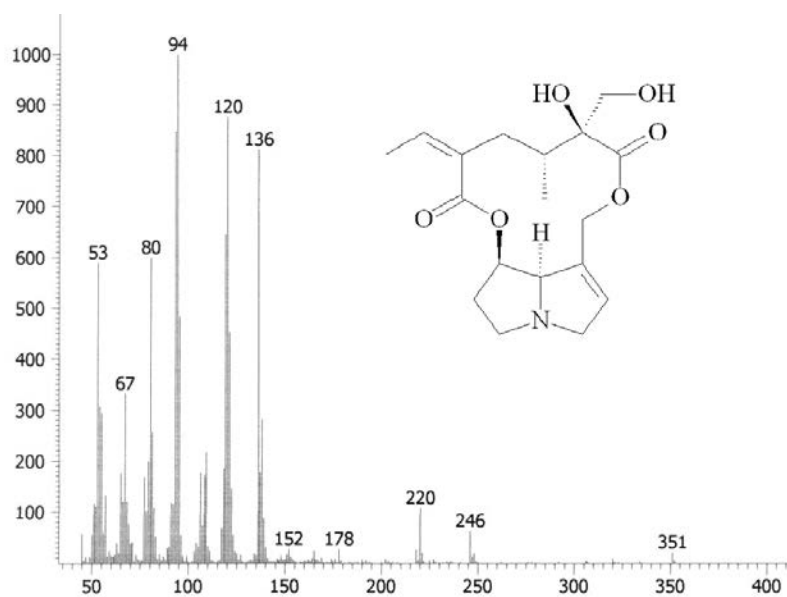


Figura 24. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico Rr.

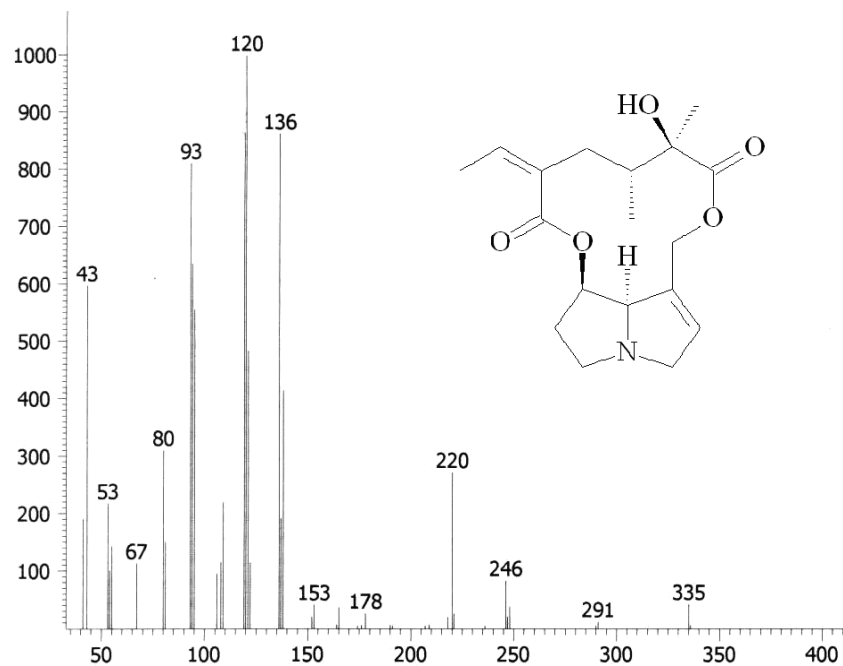


Figura 25. Espectro de masas del alcaloide pirrolizidínico Sn.

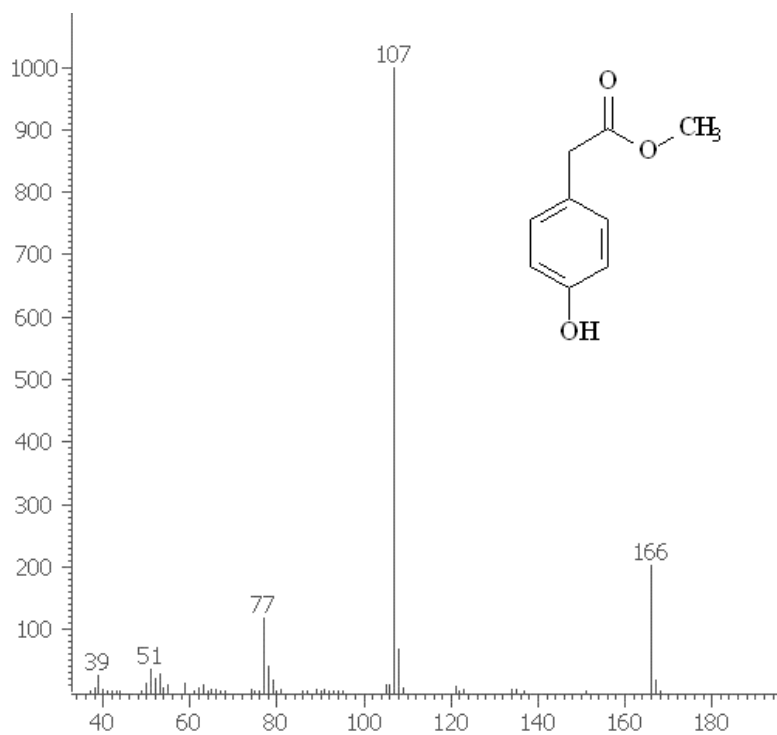
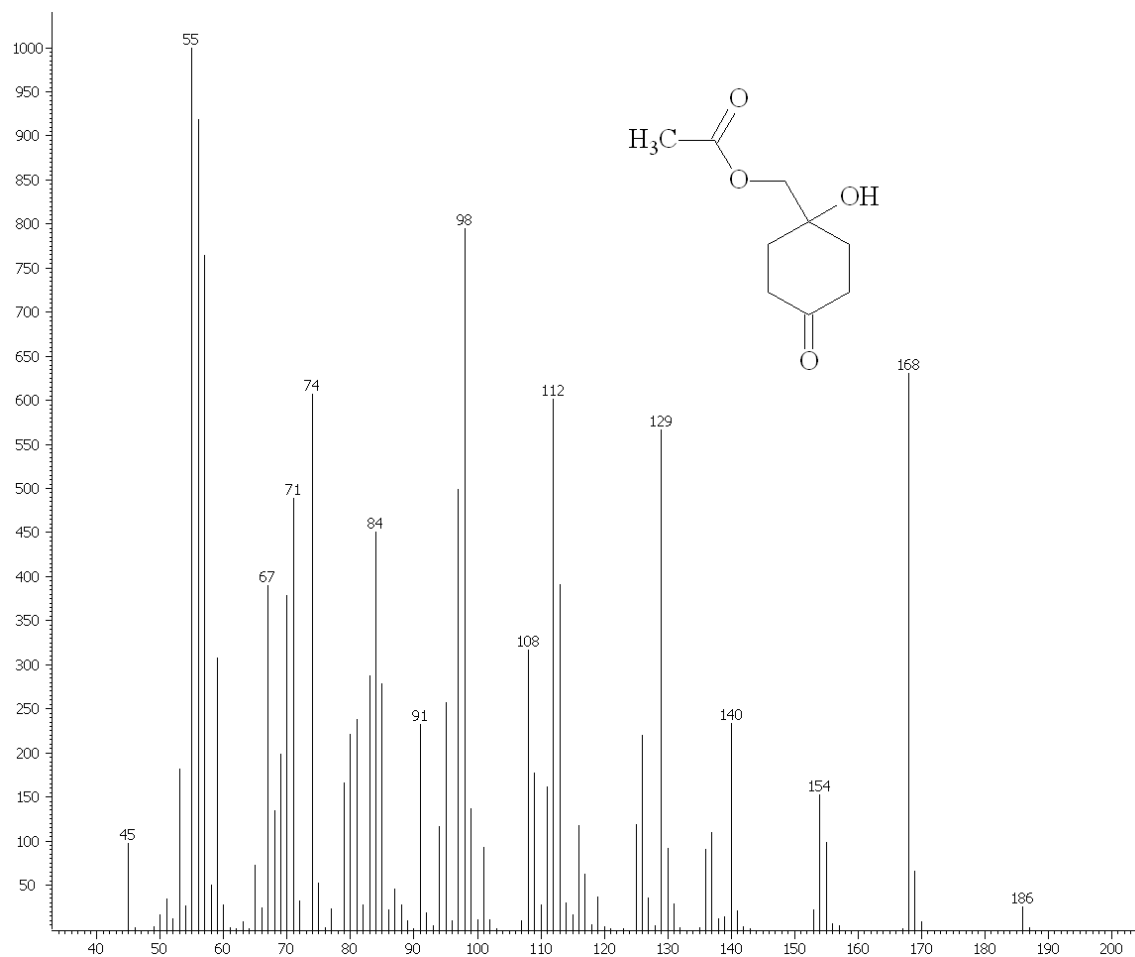


Figura 26. Espectro de masas de FAcMe.

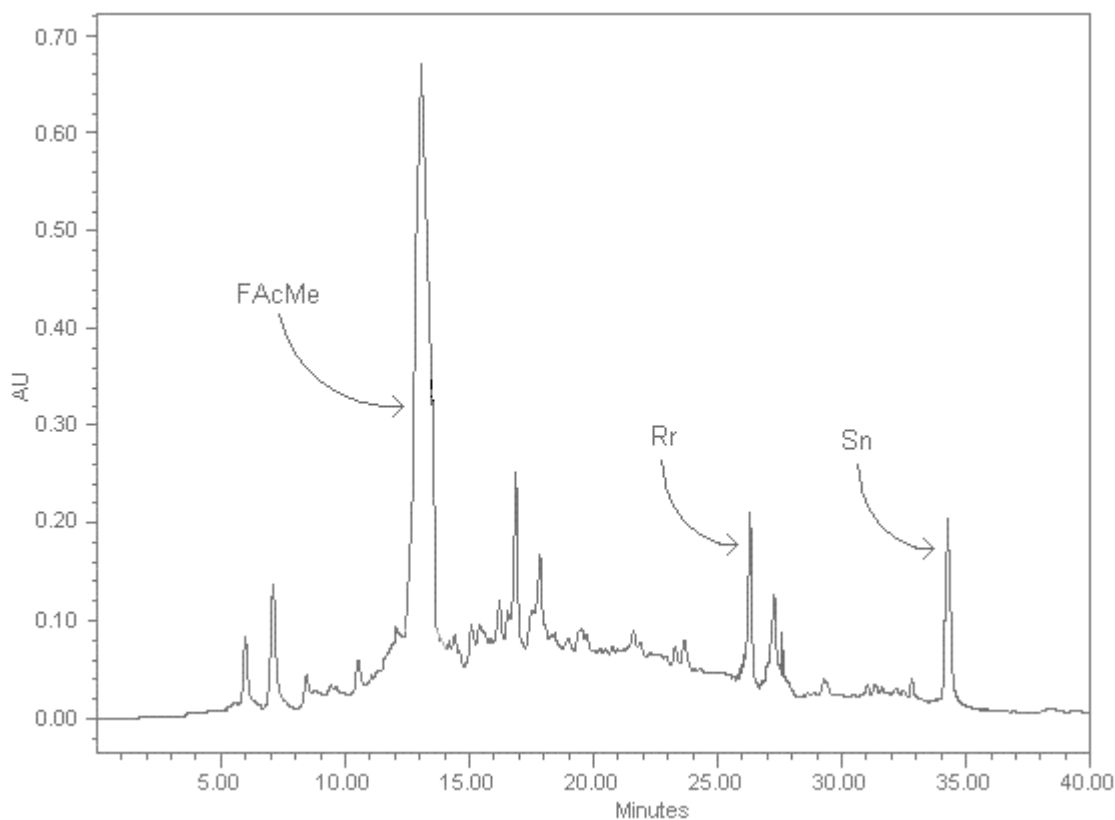


**Figura 27.** Espectro de masas del acetato de 1-hidroxi-4-oxociclohexilo.

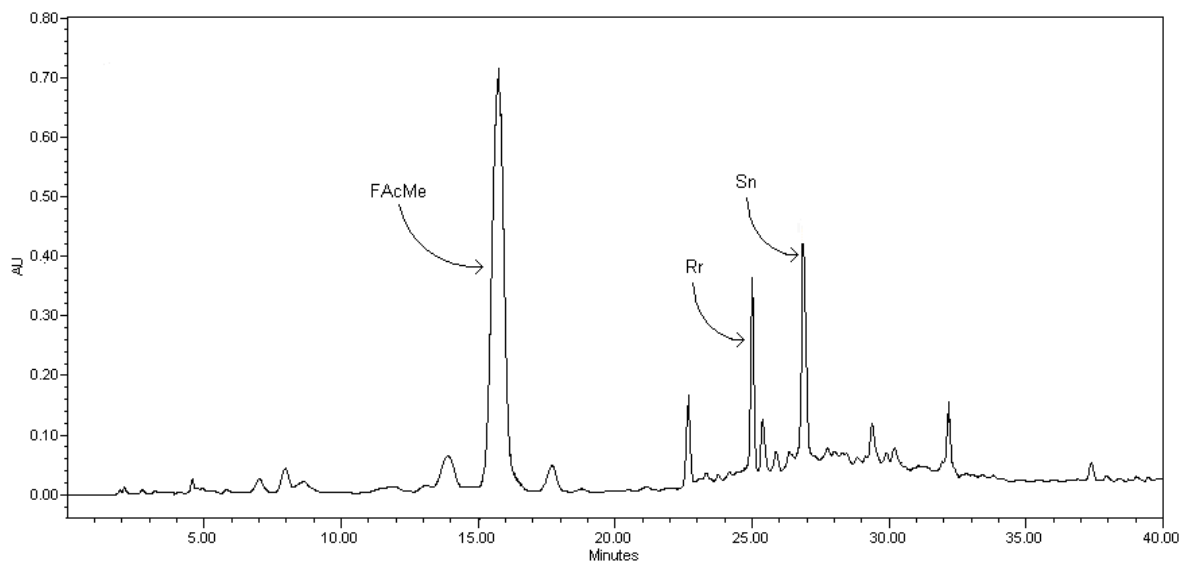
## 6.4. Análisis en HPLC

### 6.4.1. Análisis preliminar

Se observó una mejor separación de los compuestos de CABL y CAT con el uso de la columna XTerra® con respecto a la Spherisorb® utilizando las condiciones indicadas en la sección 5.7.1., las Figuras 28 y 29 corresponden a los cromatogramas obtenidos con dichas columnas.

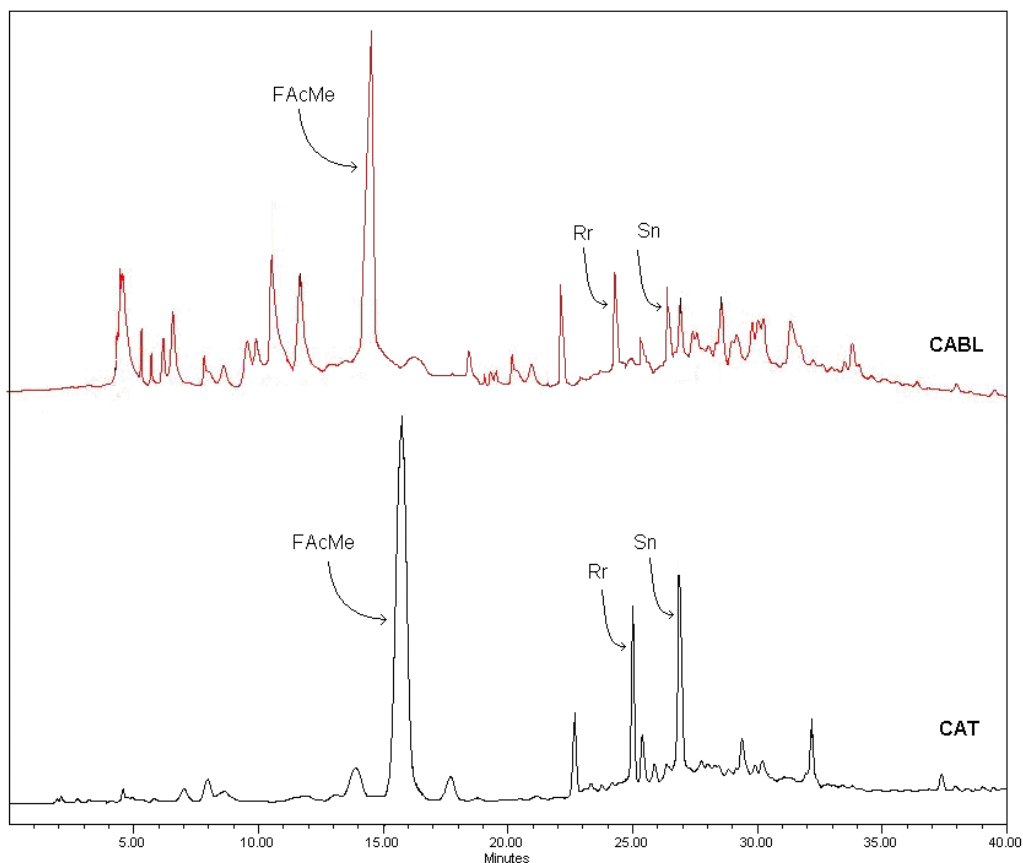


**Figura 28.** Cromatograma obtenido en la columna Spherisorb®.



**Figura 29.** Cromatograma obtenido en la columna XTerra®.

En términos generales, se observó que las muestras de CAT contenían un número menor de componentes con respecto a CABL (Figura 30). Este resultado posiblemente se deba a que durante el proceso de reducción con Zn se formaron nuevas especies químicas diferentes a las bases libres de los AP.



**Figura 30.** Diferencia de composición en los cromatogramas de CABL y CAT.

Para identificar los tres compuestos de interés en los cromatogramas, se inyectó una solución de CABL y otra de CAT adicionadas con las tres sustancias de referencia (Sn, Rr y FAcMe) para identificar las señales producidas por estos compuestos. De esta forma, se registró el tiempo de retención ( $t_R$ ) característico

para cada uno. Así mismo, se identificaron las longitudes máximas de absorción de las sustancias de referencia. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente Cuadro:

Compuesto	$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$
FAcMe	15,20	196,4
Rr	25,30	214,0
Sn	27,75	214,0

**Cuadro 4.** Resultados del estudio preliminar en HPLC.

La longitud de onda que se eligió para llevar a cabo los análisis fue de 214 nm debido a que Sn y Rr presentan su máxima absorbancia en este punto. FAcMe no presenta un máximo de absorbancia a la longitud de onda elegida, sin embargo, este compuesto presenta una absorción adecuada en esta longitud de onda que permite su detección como se muestra en la Figura 31.

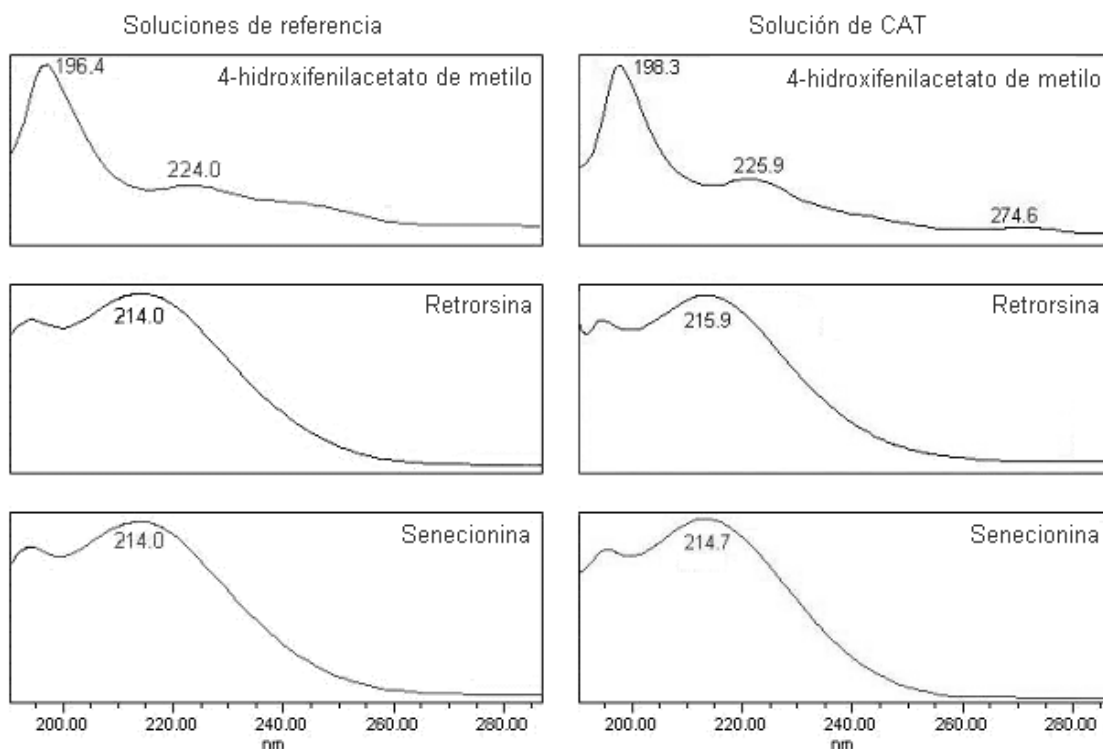
## 6.4.2. Validación del método analítico

### 6.4.2.1. Especificidad

La comparación de los espectros de absorción de las sustancias de referencia utilizadas con los obtenidos en el análisis de la muestra de CAT no



presentaron diferencias significativas longitud de absorción máxima y en la forma del espectro (Figura 31).



**Figura 31.** Espectros de absorción en UV de las soluciones de referencia y solución de CAT.

#### 6.4.2.2. Rango

Los resultados obtenidos que muestran una concordancia lineal entre la respuesta medida (absorbancia) y la concentración para el rango se encuentran en el Cuadro 5.

Compuesto	Lim. inferior (mg/mL)	Lim. superior (mg/mL)
FacMe	0,0005	1,25
Rr	0,0005	5
Sn	0,0005	5

**Cuadro 5.** Límites de cuantificación de FAcMe, Rr y Sn.

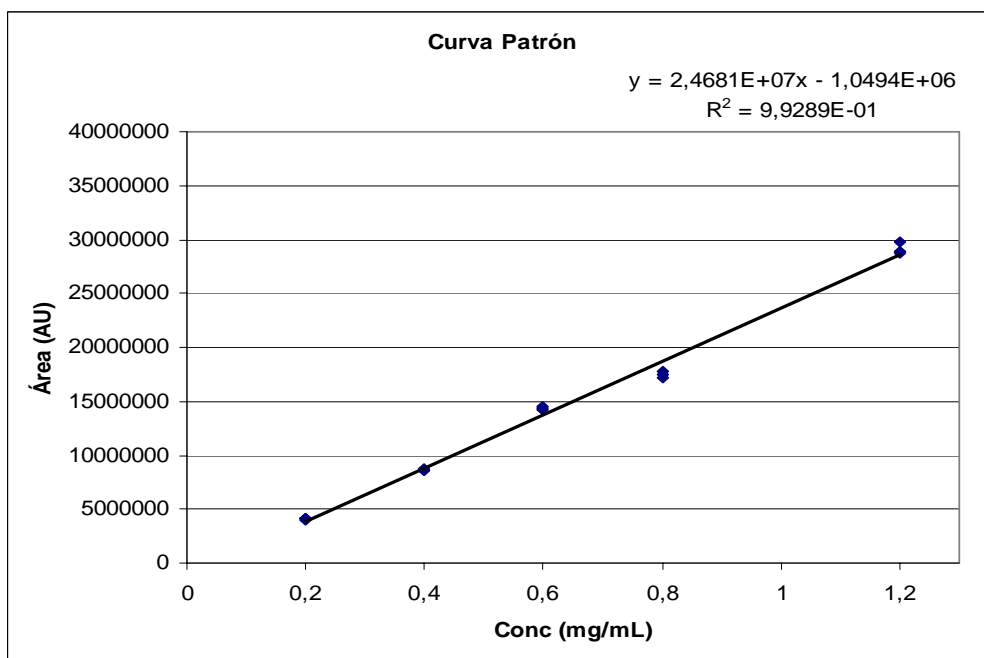
### 6.4.2.3. Linealidad y exactitud

A continuación se presentan los resultados y gráficas obtenidos.

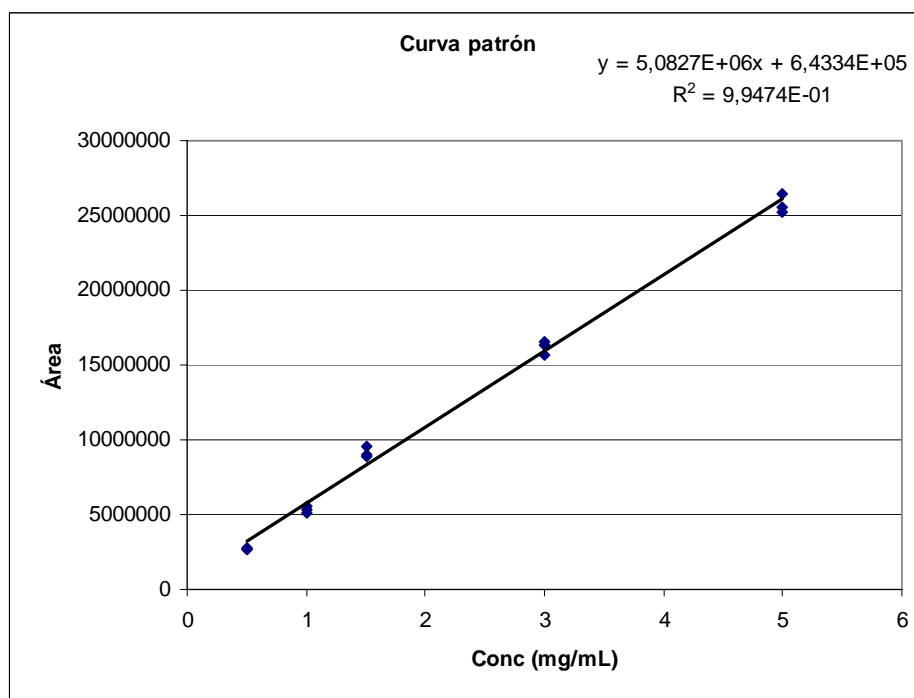
#### a) Generación de las curvas de calibración y linealidad del sistema

FAcMe		Rr		Sn	
Conc (mg/mL)	Área (AU)	Conc (mg/mL)	Área (AU)	Conc (mg/mL)	Área (AU)
1,2	28896062	5	26389712	2	10695010
1,2	28721791	5	25271334	2	11535153
1,2	31712006	5	25563870	2	10063204
0,8	17157227	3	15645427	1	5952633
0,8	17768625	3	16586564	1	5789654
0,8	17417262	3	16339898	1	5798651
0,6	14286391	1,5	9565899	0,75	4042654
0,6	14490700	1,5	9000382	0,75	3965455
0,6	14302143	1,5	8836950	0,75	3885611
0,4	8662074	1	5520510	0,5	2933260
0,4	8599617	1	5109414	0,5	2854651
0,4	8693890	1	5365862	0,5	2754189
0,2	4209545	0,5	2791898	0,25	1863555
0,2	4219190	0,5	2677331	0,25	1935411
0,2	4057674	0,5	2713688	0,25	1651615

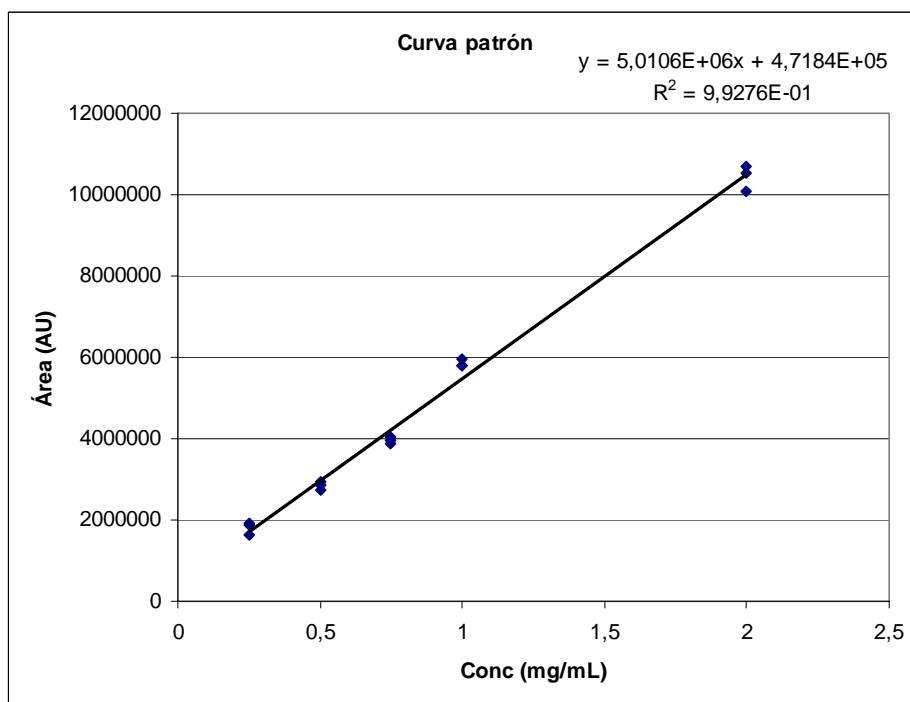
**Cuadro 6.** Datos para las curvas de calibración de FAcMe, Rr y Sn.



Gráfica 1. Curva de calibración de FAcMe.



Gráfica 2. Curva de calibración de Rr.



**Gráfica 3.** Curva de calibración de Sn.

Compuesto	Parámetro	
	$r^2$	IC( $\beta_0$ )
FAcMe	0,9917	$(2,4681 \pm 0,1251) \times 10^7$
Rr	0,9962	$(5,0827 \pm 0,2214) \times 10^6$
Sn	0,9959	$(5,0106 \pm 0,2563) \times 10^6$

**Cuadro 7.** Parámetros utilizados para la evaluación de la linealidad del sistema. IC( $\beta_0$ ) con una confianza de 95%.

De acuerdo a los resultados del Cuadro anterior, en todos los casos  $r^2$  es mayor al 98% y la evaluación de la linealidad IC( $\beta_0$ ) no incluye al cero, por lo que se acepta la linealidad del sistema para las tres sustancias de referencia

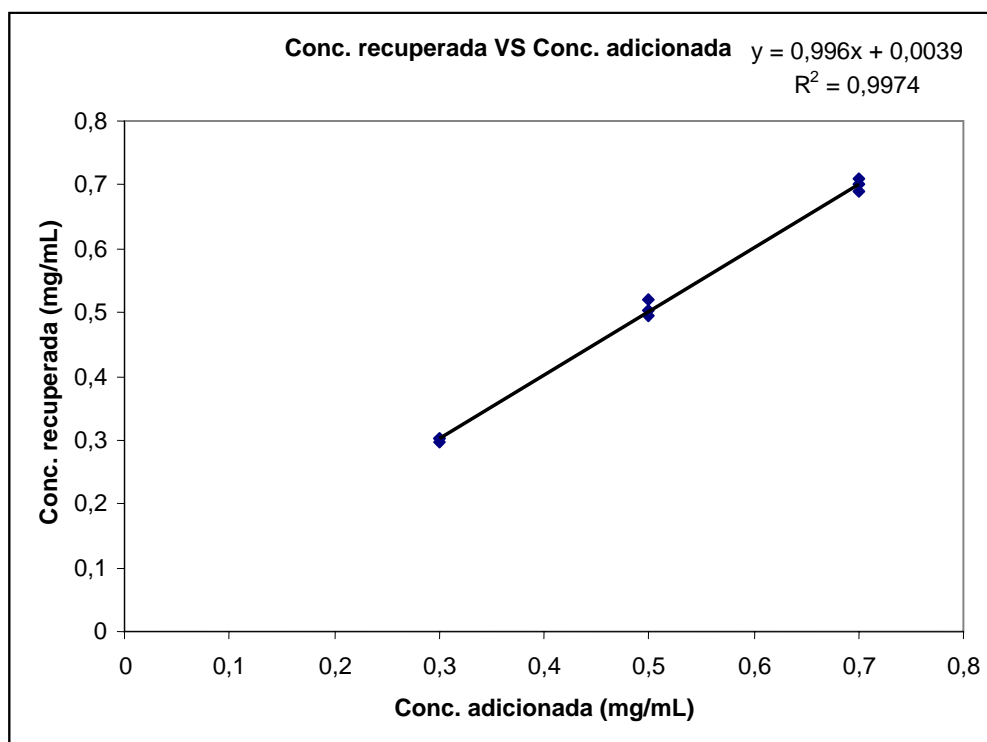
utilizadas, por lo tanto, se acepta que los resultados obtenidos (incluidos dentro de los rangos de concentración mencionados con anterioridad) son directamente proporcionales a la concentración.

## b) Linealidad y exactitud del método

La linealidad del método se evaluó por medio de un análisis de regresión lineal para una serie de soluciones preparadas a partir de la matriz de trabajo adicionada con las distintas sustancias de referencia. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

Solución	Área (AU)	Conc. Calculada (mg/mL)	Conc. Adicionada (mg/mL)	Conc. Recuperada (mg/mL)	%recobro
Matriz	12046546				
Matriz	11482109				
Matriz	12654646				
Prom matriz	12061100,3	0,5312	0		
1	19354204	0,8267	0,3	0,2955	98,50
2	19546501	0,8345	0,3	0,3032	101,10
3	19546541	0,8345	0,3	0,3033	101,10
4	24895410	1,0512	0,5	0,5200	104,00
5	24445704	1,0330	0,5	0,5018	100,36
6	24302052	1,0272	0,5	0,4960	99,19
7	29054655	1,2197	0,7	0,6885	98,36
8	29345484	1,2315	0,7	0,7003	100,04
9	29546540	1,2397	0,7	0,7085	101,21

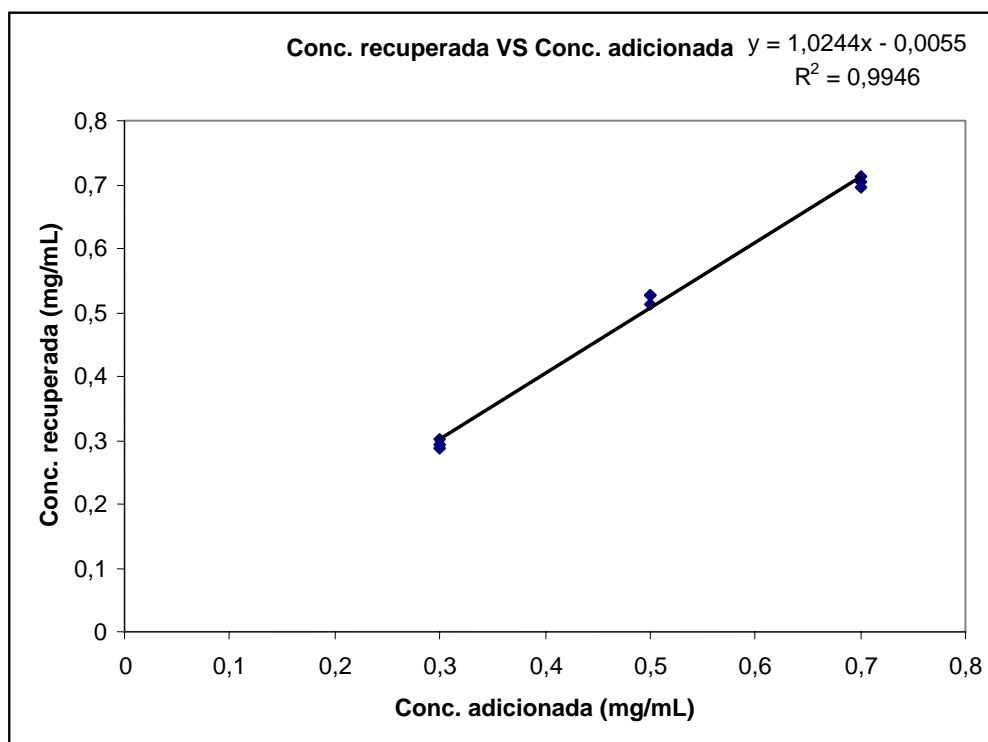
**Cuadro 8.** Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con FAcMe.



**Gráfica 4.** Evaluación de la exactitud y linealidad del método para FAcMe.

Solución	Área (AU)	Conc. Calculada (mg/mL)	Conc. Adicionada (mg/mL)	Conc. Recuperada (mg/mL)	%recobro
Matriz	3311811				
Matriz	3110770				
Matriz	3098454				
Prom matriz	3173678,33	0,4978			
1	4630545	0,7845	0,3	0,2866	95,54
2	4709500	0,8000	0,3	0,3022	100,72
3	4668710	0,7920	0,3	0,2942	98,05
4	5779840	1,0106	0,5	0,5128	102,55
5	5847441	1,0239	0,5	0,5261	105,21
6	5846545	1,0238	0,5	0,5259	105,18
7	6795002	1,2103	0,7	0,7125	101,78
8	6746545	1,2008	0,7	0,7030	100,42
9	6715089	1,1946	0,7	0,6968	99,54

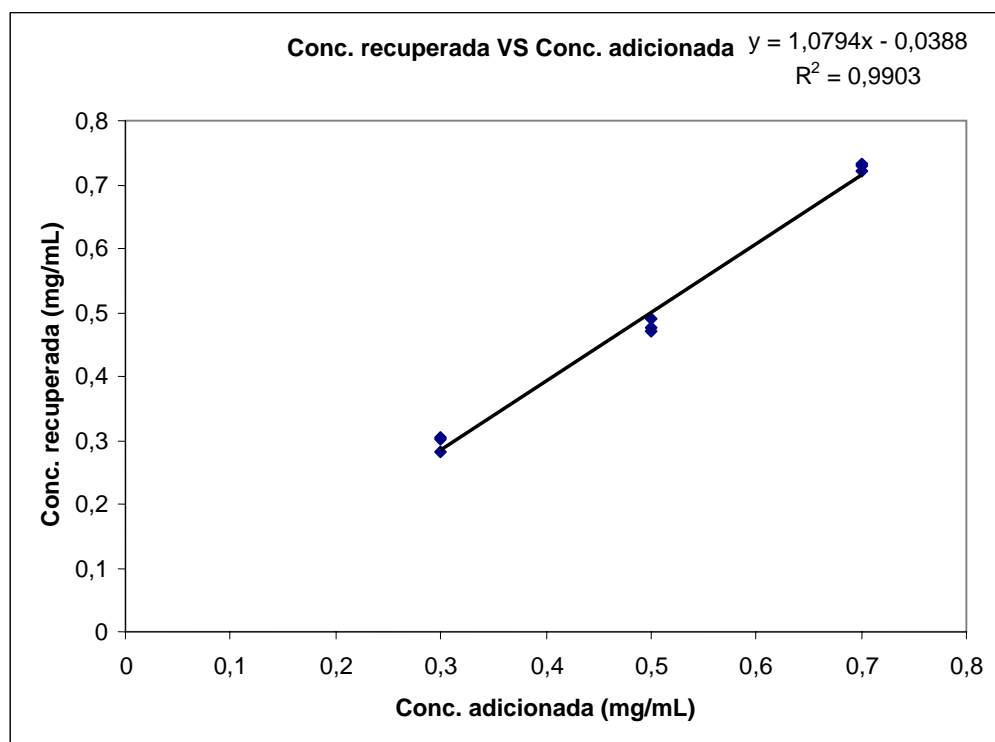
**Cuadro 9.** Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con Rr.



**Gráfica 5.** Evaluación de la exactitud y linealidad del método para Rr.

Solución	Área (AU)	Conc. Calculada (mg/mL)	Conc. Adicionada (mg/mL)	Conc. Recuperada (mg/mL)	%recobro
Matriz	2904165				
Matriz	2877366				
Matriz	2911873				
Prom matriz	2897801,33	0,4842			
1	4412377	0,7864	0,3	0,3023	100,76
2	4418653	0,7877	0,3	0,3035	101,18
3	4311122	0,7662	0,3	0,2821	94,02
4	5355981	0,9748	0,5	0,4906	98,12
5	5279841	0,9596	0,5	0,4754	95,08
6	5259851	0,9556	0,5	0,4714	94,28
7	6505140	1,2041	0,7	0,7199	102,85
8	6572008	1,2175	0,7	0,7333	104,76
9	6555005	1,2141	0,7	0,7299	104,27

**Cuadro 10.** Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de matriz adicionada con Sn.



**Gráfica 6.** Evaluación de la exactitud y linealidad del método para Sn.

Compuesto	Parámetro			
	$r^2$	$IC(\beta_0)$	$IC(\beta_1)$	$IC(\mu)$
FAcMe	0,9974	$0,004 \pm 0,024$	$0,996 \pm 0,046$	$100,43 \pm 0,552$
Rr	0,9946	$-0,0055 \pm 0,036$	$1,0244 \pm 0,067$	$101,00 \pm 2,419$
Sn	0,9903	$-0,0388 \pm 0,050$	$1,0794 \pm 0,095$	$99,48 \pm 3,269$

**Cuadro 11.** Parámetros utilizadas para la evaluación de la linealidad del sistema.  $IC(\beta_0)$  y  $IC(\beta_1)$  con una confianza de 95%.

En todos los casos  $r^2$  es mayor al 98%,  $IC(\beta_0)$  incluye al cero y  $IC(\beta_1)$  incluye la unidad, por lo que se acepta la linealidad del método para las tres sustancias de referencia utilizadas. También, el intervalo de confianza para el %r



incluye el 100%, con esto se deduce que el método permite cuantificar de manera exacta a los compuestos de interés presentes en la muestra, es decir, existe una concordancia entre los valores obtenidos empleando el método y los valores de referencia.

#### 6.4.2.4. Precisión

##### a) Repetibilidad

El Cuadro 12 muestra los resultados obtenidos para las soluciones de referencia que contenían las distintas sustancias de referencia.

Inyección	Área (AU) FAcMe	Área (AU) Rr	Área (AU) Sn
1	25797813	5605611	5815232
2	25598640	5598742	5816151
3	25508633	5605422	5756210
4	25621411	5598444	5805466
5	25598416	5595841	5815862
6	25622941	5588521	5826330
PROM	25624642,3	5598763,5	5805875,17
CV	0,36949637	0,10434509	0,39640474

**Cuadro 12.** Resultados para la evaluación de la repetibilidad.

En todos los casos el CV es menor a 1.5%, lo que indica que existe precisión en el sistema (reproducibilidad). Por lo tanto, existe un grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales al aplicar repetidamente el procedimiento a diferentes porciones de una misma muestra homogénea.

**b) Precisión intermedia**

		Área (AU)		Área (AU)		Área (AU)	
		FACMe		Rr		Sn	
		Analista		Analista		Analista	
		1	2	1	2	1	2
Día	1	25794565	26069854	5654111	5495654	5605611	5779852
		26589940	25447156	5801199	5798651	5466523	5615982
		25508633	26389410	5816566	5813232	5468956	5618981
	2	26048944	25951433	5698301	5684652	5615651	5555654
		26471710	26584463	5795120	5807113	5506535	5605487
		25619894	26849162	5559989	5821652	5631813	5618979
PROM		26110430,3		5728853,33		5590835,33	
CV (%)		1,782		1,937		1,51890293	

**Cuadro 13.** Resultados para la evaluación de la precisión intermedia.

En todos los casos el CV es menor a 2%, por lo que puede decirse que el método presenta precisión intermedia, es decir, existe una concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas en distintos días.

#### 6.4.3. Cuantificación de senecionina, retrorsina y 4-hidroxifenilacetato de metilo

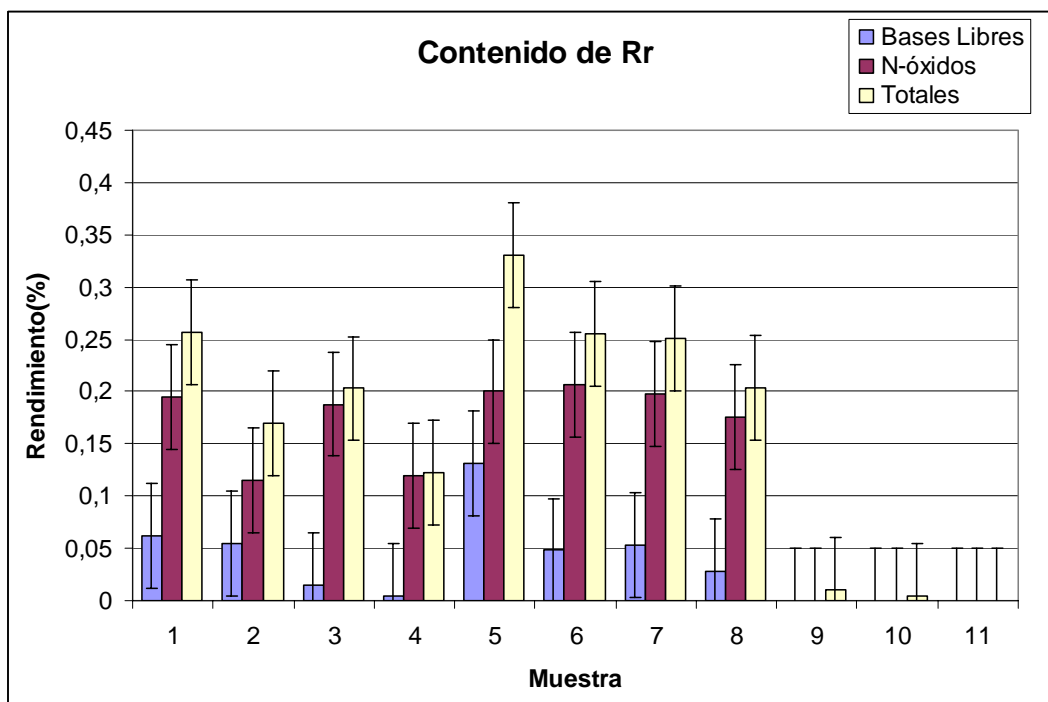
Una vez que fue demostrada la validez del método analítico desarrollado, se procedió a analizar las muestras de CABL y CAT obtenidos a partir de los distintos lotes de material vegetal, fitomedicamentos y el preparado fitofarmacéutico para poder cuantificar los tres compuestos de interés. Tales

análisis se llevaron a cabo manteniendo las condiciones descritas en la sección 5.7.1. y bajo las cuales el método analítico fue validado.

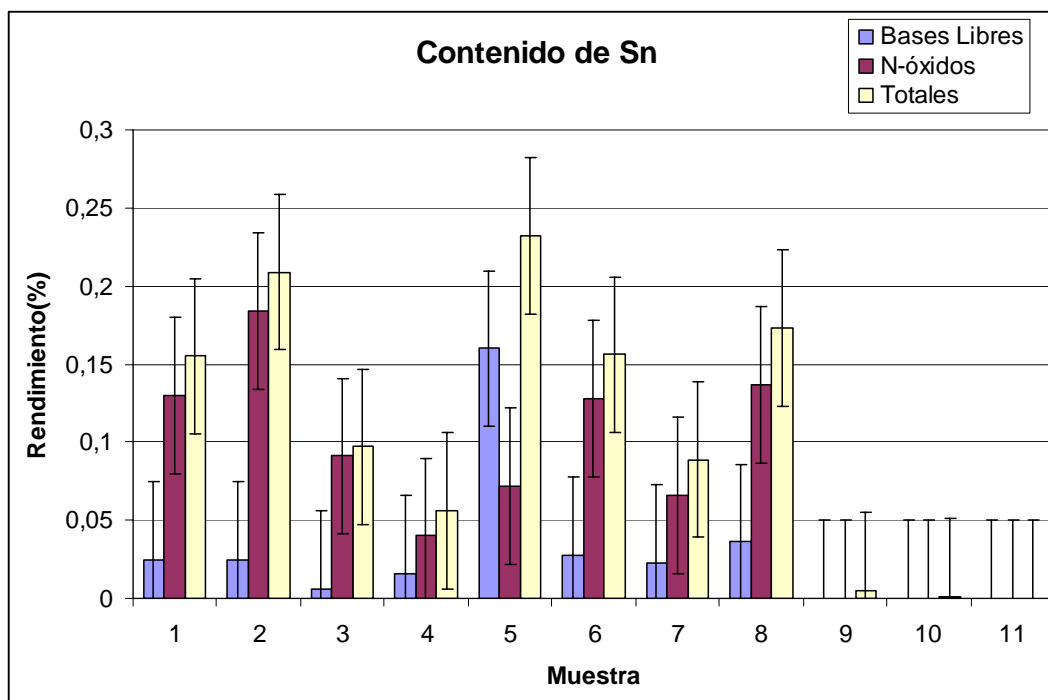
Para el caso de los fitomedicamentos sólo se obtuvieron y analizaron muestras de CAT de cada uno de ellos, esto debido a la baja concentración de los compuestos de interés en tales productos. Del análisis al producto denominado “té maravilloso” (muestra 11) se obtuvo un cromatograma que no presentaba claramente los señales características de los compuestos de interés puesto que mostró picos que no estaban bien resueltos entre sí, por lo que no pudo realizarse la cuantificación. El Cuadro 14 y las Gráficas 7-9 muestran los rendimientos obtenidos (en relación de miligramos del compuesto de interés con respecto al peso de cada lote de material vegetal (mg/g) y al volumen para el caso del fitomedicamento analizado (mg/mL)).

Muestra	% Rendimiento (mg/g ó mg/mL)						
	Bases libres		N-óxidos		Alcaloides totales		FACMe
	Rr	Sn	Rr	Sn	Rr	Sn	
1	0,062	0,025	0,195	0,13	0,257	0,155	0,258
2	0,055	0,025	0,115	0,184	0,17	0,209	0,199
3	0,015	0,006	0,188	0,091	0,203	0,097	0,171
4	0,004	0,016	0,119	0,04	0,123	0,056	0,232
5	0,131	0,16	0,2	0,072	0,331	0,232	0,561
6	0,048	0,028	0,207	0,128	0,255	0,156	0,253
7	0,053	0,023	0,198	0,066	0,251	0,089	0,155
8	0,028	0,036	0,176	0,137	0,204	0,173	0,278
9	-	-	-	-	0,01	0,005	0,03
10	-	-	-	-	0,005	0,001	0,015
11	-	-	-	-	-	-	-

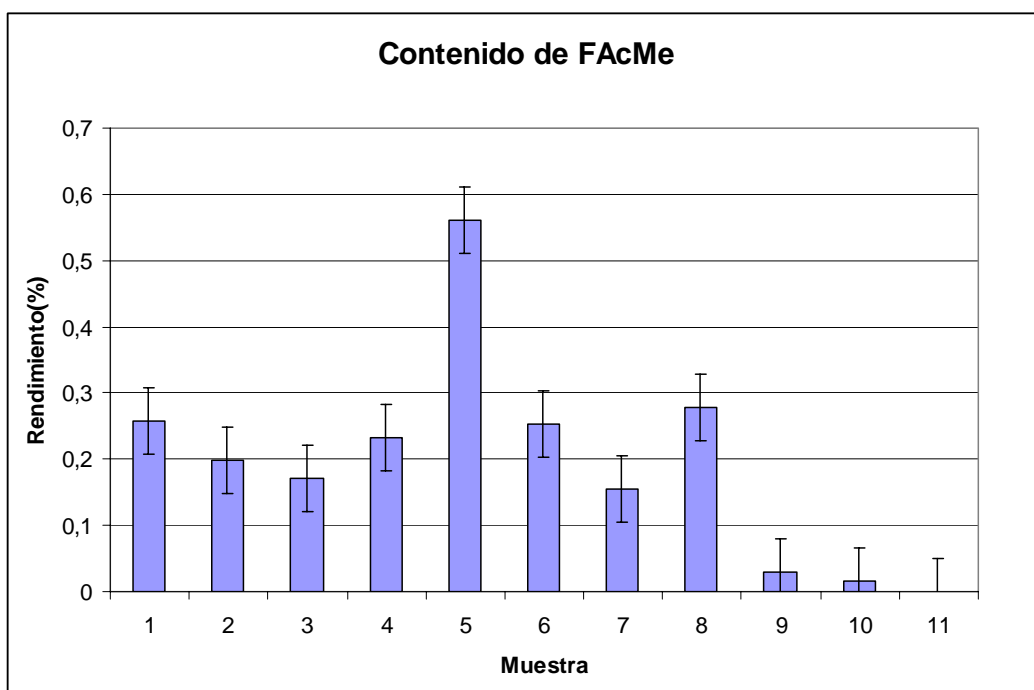
**Cuadro 14.** Resultados generales de la cuantificación de Rr, Sn y FacMe.



Gráfica 7. Contenido de retrorsina en las muestras analizadas.



Gráfica 8. Contenido de senecionina en las muestras analizadas.



**Gráfica 9.** Contenido de 4-hidroxifenilacetato de metilo en las muestras analizadas.

Como se observa en las Gráficas 7 y 8, existe una clara predominancia en la forma de los alcaloides como *N*-óxidos, mientras que en algunos casos la proporción de bases libres calculada resultó significativamente menor a la de la forma oxidada. Para las muestras 9 y 10, que correspondían a los fitomedicamentos, se obtuvieron cantidades de Rr y Sn considerablemente más pequeñas en comparación con las obtenidas a partir de los lotes de la droga cruda, esto puede deberse a que se son fabricados con cantidades muy pequeñas de extracto y que éste a su vez se encuentra poco concentrado con los compuestos de interés. En el caso del producto fitofarmacéutico (muestra 11) no se pudo determinar ninguno de los analitos debido a que no se obtuvo un

cromatograma con picos resueltos para que se pudiese llevar a cabo la cuantificación, además presentó un perfil cromatográfico completamente diferente al que se observó con las muestras de CABL o CAT.

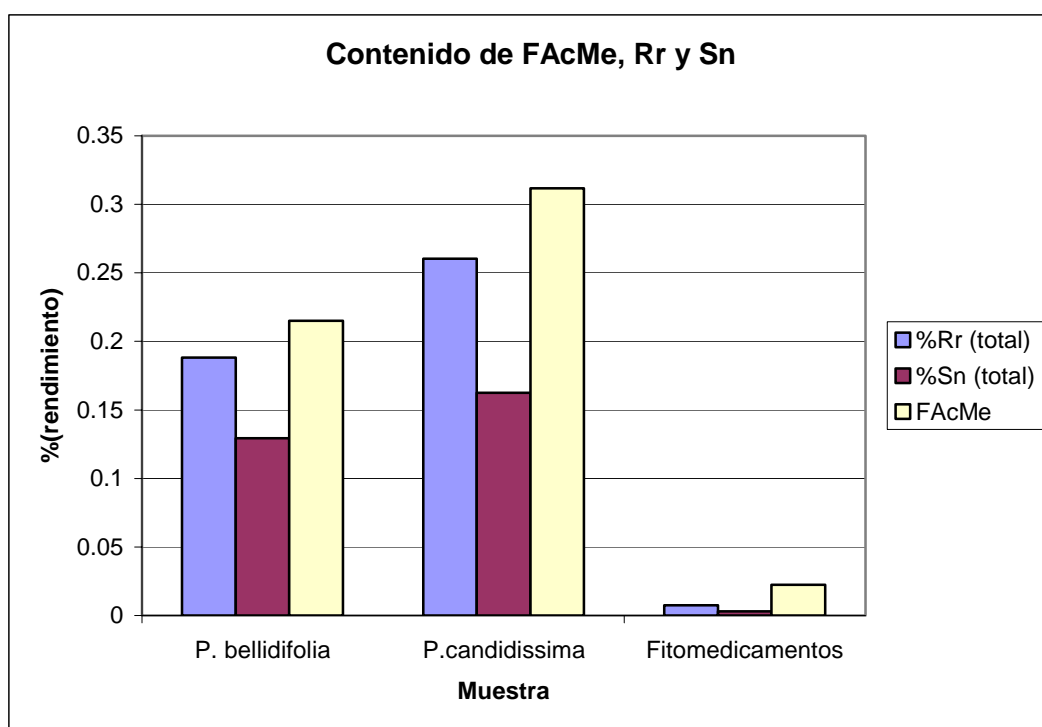
Para el caso de la determinación de FAcMe se obtuvieron cantidades variables siendo la muestra 5 aquella que contuvo la mayor cantidad de este metabolito, de igual forma, en los fitomedicamentos se obtuvieron cantidades muy pequeñas de FAcME en relación con los lotes de materia prima.

Las variaciones en el contenido de los compuestos de interés en las distintas muestras analizadas (sobretudo para los lotes de droga cruda), pueden deberse a las diferencias en las condiciones de tratamiento del material vegetal, por ejemplo, el cultivo, la recolección, el desecado, la fragmentación o el almacenamiento, estos son factores que en conjunto pueden contribuir a la inconsistencia del contenido metabólico en las plantas.

En el Cuadro 15 y Gráfica 10 se resumen los resultados obtenidos de acuerdo al tipo de muestra analizada. Se observa una mayor cantidad de alcaloides en las muestras correspondientes a *P. candidísima* con respecto a *P. bellidifolia*, en cuanto a los fitomedicamentos, se obtuvieron cantidades pequeñas de los compuestos de interés.

Muestra	% Rendimiento (mg/g ó mg/mL)						FACMe
	Bases libres		N-óxidos		Total		
	Rr	Sn	Rr	Sn	Rr	Sn	
<i>P. bellidifolia</i>	0.034	0.018	0.154	0.111	0.188	0.129	0.215
<i>P. candidissima</i>	0.065	0.062	0.195	0.109	0.260	0.163	0.312
Fitomedicamentos	0	0	0	0	0.008	0.003	0.023

**Cuadro 15.** Promedio del contenido de FACMe, Rr y Sn de acuerdo al tipo de muestra.



**Gráfica 10.** Contenido de FACMe, Rr y Sn en función del tipo de muestra analizada.

En el Cuadro 16 se presenta la relación en porcentaje de bases libres y *N*-óxidos de Rr y Sn en las muestras 1-8 con respecto a la cantidad total presente de estos AP. Puede observarse el predominio de la forma de *N*-óxido con respecto a la forma de base libre.

Muestra	%Rr		%Sn	
	Base libre	N-óxido	Base libre	N-óxido
1	24.12	75.88	16.13	83.87
2	32.35	67.65	11.96	88.04
3	7.39	92.61	6.19	93.81
4	3.25	96.75	28.57	71.43
5	39.58	60.42	68.97	31.03
6	18.82	81.18	17.95	82.05
7	21.12	78.88	25.84	74.16
8	13.73	86.27	20.81	79.19

**Cuadro 16.** Abundancia de las bases libres y N-óxidos de Rr y Sn.

Con la finalidad de determinar la potencial toxicología del complejo de especies conocido como “té milagro” a través de la determinación del contenido de pirrolizidinas hepatotóxicas, se presenta en el Cuadro 17 (considerando los resultados generales del cuadro Cuadro 15), la cantidad que sería necesaria para provocar envenenamientos agudos y/o malestares crónicos en humanos en niños y adultos, se expresa de manera hipotética la dosis de 10 mg/kg de alcaloides que producen un envenenamiento agudo en humanos (Stillman, 1977).

Persona	DOSIS				
	mg/kg	mg	Material seco (g)		Volumen (mL)
			<i>P. bellidifolia</i>	<i>P. candidissima</i>	Fitomedicamento
Niño de 10 kg	10	100	15.17	11.17	66.51
Adulto de 60 kg	10	600	910.4	67.05	399.06

**Cuadro 17.** Dosis calculadas de té milagro que producirían efectos tóxicos considerables en humanos.



Es necesario administrar una dosis única considerablemente grande de fitomedicamento para presentarse una intoxicación por AP, mientras que para el caso de las drogas crudas, tendría que consumirse una gran cantidad de material vegetal seco (considerablemente mayor a la utilizada como uso tradicional). Cabe destacar que el cuadro anterior muestra los resultados para dosificaciones únicas y que los efectos tóxicos por AP pueden presentarse incluso con dosis pequeñas por periodos prolongados.

## 7. Conclusiones

El presente trabajo constituye una aportación al conocimiento sobre el género *Packera* y más específicamente sobre aquellas especies de este género que conforman el complejo conocido como “té milagro” ya que debido a su popularidad y al uso frecuente en la zona norte del país, aunado al hecho de que se exportan preparados fitofarmacéuticos y fitomedicamentos de esta planta al sur de los Estados Unidos, resultó indispensable evaluar la seguridad en el consumo del “té milagro” mediante la estandarización de una técnica analítica que permitiera la cuantificación del contenido de alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos.

Se desarrolló una metodología analítica en HPLC para determinar el contenido de AP en la droga cruda y en fitomedicamentos elaborados con esta planta, la cual proporcionó resultados consistentes durante la evaluación de once muestras comerciales o ejemplares silvestres. El procedimiento analítico se validó demostrando que es selectivo, preciso, exacto y lineal. La técnica analítica desarrollada puede tener un aplicación potencial para la detección y la cuantificación de AP en otras especies vegetales de interés alimenticio y para la detección de posibles adulterantes.

Los resultados de cuantificación de AP muestran una gran variabilidad en el contenido de estos metabolitos que puede estar asociado a la ontogenia de las

dos especies que constituyentes el complejo del té milagro. Sin embargo, se demostró una clara diferencia en el contenido de AP ya que *Packera candidissima* (especie dominante) presenta una concentración superior a la cuantificada para *Packera bellidifolia* (especie subordinada).

Las concentraciones bajas de AP cuantificadas en los fitomedicamentos de prueba permiten suponer que éstos no constituyen un serio problema para la salud si se considera que su dosificación no sea prolongada. En tanto que el consumo de los productos fitofarmacéuticos (i.e., los preparados herbolarios denominados genéricamente con el nombre de té milagro) elaborados con las especies medicinales de este complejo presentan niveles de concentración apropiados para provocar un daño hepático crónico como resultado de su consumo prolongado. Por lo tanto, debe advertirse a las entidades gubernamentales adecuadas sobre la regulación necesaria para el consumo y la distribución comercial de estos productos “naturistas”.

Por otro lado, la detección del 4-hidroxifenilacetato de metilo como compuesto mayoritario en las muestras analizadas y la validación de su cuantificación en el método analítico desarrollado abre el camino para que éste pueda ser utilizado como compuesto marcador y por consiguiente, ser utilizado en el control de calidad de las especies analizadas.

---

---

## 8. Bibliografía

- Aston, N., Morris, P. and Tanner S. **(1996)**. Retrorsine in breast milk influences copper handling in suckling rat pups. *Journal of Hepatology* 25 (5), 748-755.
- Bah, M., **(1992)** *Determinación del Contenido Alcaloideo de la Packera candidissima (Greene) Weber & Löve Mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas*, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México.
- Bah, M. and Pereda-Miranda R. **(2003)** Alcaloides pirrolizidínicos. En: Oliveira, C.M, Schenkel, E.P., Gosmann, G. Palazzo J.C., Auller, L. e Petrovick, P.R. [eds.], *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Ed. Da UFRGS / Ed. da USC. Porto Alegre. Pp. 847-868.
- Bain, J.F. and Golden, J.L. **(2000)**. A Phylogeny of *Packera* (Senecioneae; Asteraceae) Based on Internal Transcribed Spacer Region Sequence Data and a Broad Sampling of Outgroups. *Molec. Phylog. and Evol.*,16 (3), 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, USA, Pp. 93-99.
  - Bohlmann, F., Zdero, C., Jakupovic, J., Grenz, M., Castro, V., Kino, R.M., Robinson, H. and Vincent, L.P.D., **(1986)** Further Pyrrolizidine Alkaloids and Furoeremophilanes from *Senecio* Species, *Phytochemistry*, 25, 1151-1159.
  - Bremer, K., **(1994)** Asteraceae. *Cladistics & Classification*. Ed. Timber Press, USA. Pp. 13-35, 61-70, 112,143.
  - Bruneton, J. **(1999)**. *Toxic Plants. Dangerous to Humans and Animals*. Ed. Lavoisier USA. Pp. 164-177.
  - 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. 77-704.
  - Bye, R. **(1986)** Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative Study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*, 40, 103-124.
  - Bye, E y Linares E. **(1999)** Plantas Medicinales del México Prehispánico. *Arqueología Mexicana*, VII(39), 4-13.

- 
- 
- Daly, J.M. **(1998)** Thirty years of discovery arthropod alkaloids in amphibian skin. *J. Nat. Prod.* 61, 162-172.
  - Deinzer, M.L., Arbogast, B.L., Buhler, D.R. and Cheeke, P.R. **(1982)**. Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. *Anal. Chem.*, 54, 1811-1814.
  - Gaedcke, F., Steinhoff, B. **(2003)** *Herbal medicinal products. Scientific and regulatory basis for development, quality assurance and marketing authorisation.* Medpharm GmbH Scientific Publishers. Germany. Pp. 37-44.
  - Herbert, R.B. **(2001b)**. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18, 50-65.
  - Herbert, R.B. **(2001a)**. Biosynthesis. In: Grundon M.F. *The alkaloids.* The Chemical Society. Vol. 6. London. Pp. 1-53.
  - Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz, B.R. **(1998)** Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 539-565.
  - Hostettmann, K., Marston, A., Hostettman, M. **(1998)**. *Preparative Chromatography Techniques.* Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pp.1-13, 67-71.

- 
- 
- Huxtable, R.J. **(1990)** Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacol. Ther.*, 47, 371-389.
  
  - ICH International Conference of Harmonisation **(2005)**. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1).
  
  - 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.
  
  - Justus M., Witte L. y Hartmann T. **(1997)** Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry* 44(1), 51-57
  
  - Martínez, M. **(1989)** *Las Plantas Medicinales de México*. Fondo de Cultura Económica, 6ª Edición. México. Pp. 385-387.
  
  - Mattocks, A.R., **(1986)**. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. Ed. Academic Press. Pp. 1-10, 284-286, 294-302.
  
  - Molyneux R.J. and James L.F **(1990)**. Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.*, 32, 94-103.
  
  - Mroczek, T., Ndjoko, K., Glowniak, K. and Hostettmann, K. **(2004)** On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and

- 
- 
- Emilia coccinea* by liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1056, 91-97.
- Nordenstam, B. **(1977)** Senecioneae and Liabeae—systematic review. En: Heywood, V.H, Harborne, J.B. and Turner B.L[eds.], *The biology and chemistry of the Compositae*, vol. 2, Academic Press, London, UK. Pp. 799–830.
  - OMS. Organización Mundial para la Salud. **(2002a)** *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional*. WHO/EDM/TRM/2002.1
  - OMS. Organización Mundial para la Salud. **(2002b)** *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*. WHO/EDM/TRM/2000.1
  - Panter K.E. and James L.F. **(1990)**. Natural plant toxicants in milk: a review. *J. Anim Sci.*, 68(3), 892-904.
  - Pérez-Castorena, A.L., Arciniegas, A., Martínez, F., Marquez, C., Villaseñor, J.L. and Romo de Vivar A. **(2001)** Chemical Constituents of *Packera coahuilenses* and *Packera bellidifolia*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 203-206.
  - Rivera, E. **(1999)** Investigación reciente sobre plantas medicinales mexicanas *Arqueología Mexicana*, VII(39), 54-59.



- 
- 
- Robins, D. J. **(1977)** Senecioneae-chemical review. En: Heywood, V.H., Harbone, J.B., and Turner B.L. (eds.). *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press. New York. Pp. 831-850.
  - Skoog, D. A, Holler, F. J. y Nieman, T. A. **(2001)** *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill. Madrid. Pp. 730-734, 785-794.
  - Stegelmeier, B.L., Edgar, J.A., Colegate, S.M., Gardner, D.R., Schoch T.K., Coulombe, R.A. y Molyneux, R.J. **(1999)** Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J. Nat. Toxins*, 8(1):95-116.
  - Stillman, A.E., Hustable, R., Consroe, P., Kohnen, P. y Smith, S. **(1977)** Hepatic veno-occlusive disease of the liver due to pyrrolizidine poisoning in Arizona. *Gastroenterology*, 73, 349-352.
  - Weber, W. A. y Löve, A. **(1981)** New Combinations in the Genus *Packera* (Asteraceae). *Phytologia*, 49, 44-50.
  - WHO **(1988)** Environmental Health Criteria, *Pyrrolizidine alkaloids*. 80. Geneva.
  - Yang, Y.C., Yang. J., Doerge, D.R., Chan, P.C., Fu, P.P. and Chou, M.W. **(2001)** Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 101-109.