



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE  
PIRROLIZIDINAS HEPATOTÓXICAS MEDIANTE  
CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS EN RODUCTOS  
COMERCIALES DE LA PLANTA MEDICINAL TÉ  
MILAGRO (*Packera candidissima*)**

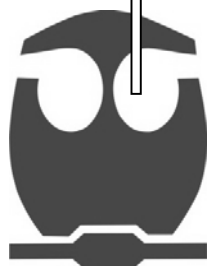
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ SOLIS**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

**VOCAL:** Profesor: MARIA DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRIA

**SECRETARIO:** Profesor: MARIA ELENA BRAVO GOMEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: BLANCA ESTELA RIBERO CRUZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACIA LAB 123 CONJUNTO E.**

---

**ASESOR DEL TEMA: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA**

---

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MABEL FRAGOSO SERRANO**

---

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ SOLIS**

---

(nombre y firma (s) )

Para Lucia Hernández Solís

## “AGRADECIMIENTOS”

### A MI FAMILIA

A toda mi familia padre, madre, hermanos, abuelos, tíos y primos.  
Agradezco el apoyo brindado durante tanto tiempo, en tantas ocasiones.

### A LOS AMIGOS

A todos los amigos de  
Comuna de la Facultad de Medicina  
Club los Alquimistas  
Facultad de Química.  
Agradezco su amistad y compañía en estos años.

### A MI DIRECTOR DE TESIS

Rogelio Pereda Miranda, gracias por su apoyo  
en la elaboración de este trabajo.

### A MI ASESORA TÉCNICA

Mabel Fragoso, agradezco la asesoría técnica mostrada en  
este trabajo que con gusto y paciencia realizo.

A todas las personas que de forma directa o indirecta  
hicieron posible este trabajo y este momento.

“Gracias Totales”

## ÍNDICE

Introducción-----	1
Salud y Plantas Medicinales-----	3
La Medicina Herbolaria en México-----	6
El Mundo Tarahumara -----	7
Te Milagro un Complejo de Plantas-----	7
Generalidades de la Tribu Senecioneae-----	8
Principales Pirrolizidinas Encontradas en el Género Senecio-----	10
Principales Pirrolizidinas Encontradas en el Género Packera-----	10
Alcaloides Pirrolizidínicos-----	13
Biogénesis-----	15
Patologías Asociadas al Consumo y Administración de Alcaloides Pirrolizidínicos -----	16
Plantas que Contienen Alcaloides Pirrolizidínicos y su Consumo en México-----	17
Metabolismo y Activación Metabólica de los Alcaloides Pirrolizidínicos.-----	19
Mecanismos de Toxicidad-----	24
Dosis Máximas Permitidas de Consumo de Alcaloides Pirrolizidínicos.-----	28
Hipótesis de Trabajo-----	31
Obtención de las Muestras-----	32
Procesamiento de las Muestras -----	33
Sustancias de Referencia -----	36
Técnicas Analíticas -----	36
Resultados-----	40
Discusión de Resultados -----	45
Conclusiones -----	49
Bibliografía-----	51

---

## 1 INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de tesis no representa un puntual análisis de resultados y conclusiones obtenido a partir de un trabajo experimental. Este trabajo contiene intenciones premeditadas que a partir de un trabajo experimental buscan reforzarse.

La intención en términos generales de este trabajo es evidenciar lo peligroso e inseguro que puede resultar el consumo de plantas y remedios herbolarios. Aunque existe un gran número de remedios herbolarios en los que se ha demostrado de forma científica que existe una respuesta fisiológica al ingerir el remedio y que, efectivamente, ayuda a curar. En muchos casos la planta contiene adicionalmente al principio activo un gran número de sustancias que pueden provocar efectos no deseados para la salud.

A lo largo de la historia, el hombre ha usado numerosos remedios herbolarios. El método para la selección de las plantas con bondades terapéuticas se basó en el conocimiento empírico. Este conocimiento ha fungido como una característica inherente a la medicina en sus inicios y en su desarrollo.

En estos tiempos la medicina debe apartarse totalmente del empirismo, si bien, los remedios herbolarios siguen aportando un beneficio a la cura de enfermedades y a la salud del hombre, el uso de plantas medicinales debe abordarse bajo la perspectiva científica contemporánea y bajo estos cánones el empleo de la flora medicinal debe enfocarse desde los puntos de vista toxicológico, farmacológico y químico.

En primer lugar se debe demostrar que efectivamente el remedio herbolario en el mejor de los casos presenta algún beneficio para el tratamiento de alguna

---

enfermedad. Una vez hecho esto, se debe identificar la sustancia o sustancias portadoras de este beneficio. A continuación, se debe averiguar el mecanismo por el cual las moléculas llevan a cabo el proceso biodinámico y por último, este conocimiento debe acomodarse con las formas de producción de la industria farmacéutica para poder ser consumido por la sociedad.

En términos particulares y específicos, este trabajo persigue una línea toxicológica y analítica en donde se busca cuantificar los contenidos de pirrolizidinas hepatotóxicas de cierto grupo de remedios herbolarios o fitomedicamentos bien definidos bajo el nombre de té milagro y comparar las concentraciones reportadas con los límites o parámetros de consumo de acuerdo a las instituciones de salud.

El grupo de plantas a partir de los cuales se elaboran el conjunto de fitomedicamentos denominado té milagro son las plantas *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia*.

La *Packera candidissima* o chucaca forma parte de la herbolaria de los tarahumaras (Bye, 1985). Sin embargo su uso no está limitado a este pueblo indígena de México, esta planta es comercializada en gran parte del estado de Chihuahua y también es exportada a las ciudades de Texas, Nuevo México y Arizona. (Bah; Pereda-Miranda, 1993).

La planta *Packera bellidifolia* se comercializa en el centro del país, como sustituto de *Packera candidissima*.



---

## 2 Marco Teórico

### 2.1 Salud y Plantas Medicinales

A pesar de su importancia para la salud de millones de personas alrededor del mundo. El papel que desempeñan las plantas en el cuidado de la salud generalmente ha sido minimizado o menospreciado. La Organización Mundial de Salud (OMS) ha estimado que entre el 70 y 80% de la población en países subdesarrollados se vale de medicinas tradicionales para atender su salud (WHO, 1998).

El número estimado de especies utilizadas con un fin medicinal o terapéutico varía entre las 35,000 y 75,000 especies (Farnsworth y Soejarto, 1991).

Las plantas medicinales son importantes para el cuidado de la salud no solamente en los países pobres bajo un esquema de medicina tradicional, ya que también proveen de materias primas a la industria naturista que esta creciendo rápidamente en países desarrollados y que cada vez se abre mayores espacios a través de la expansión de terapias alternativas. Los productos herbolarios son cada vez mas populares en países desarrollados y es un sector comercial que ha crecido entre 10 y 20% en Europa, Estados Unidos y Canadá en los últimos años (Laird, 1999). El consumo de medicinas de origen natural es un componente en la aparición de las nuevas terapias alternativas para la salud.

Esta tendencia también se ha observado en otros países como México en donde el mercado de plantas medicinales y productos herbolarios también va en ascenso. Según Hersch-Martínez (1996), hay varios factores que están contribuyendo a esta situación, entre ellos el deterioro en las condiciones de vida de los trabajadores, la cobertura insuficiente de los servicios de salud del estado debido a los recortes gubernamentales en este rubro y el acceso limitado a medicinas de patente debido a su alto costo. Esta tendencia es tan seria que el

---

uso de plantas medicinales ha pasado de ser una actividad confinada a yerberos y médicos tradicionales a un negocio próspero en tiendas naturistas y cadenas de supermercados (Hersch-Martínez, 1996).

Estas tendencias sugieren preguntarse las siguientes cuestiones.

¿Porque entre los médicos profesionales mexicanos, existe un rechazo hacia el uso de plantas medicinales?

¿Porque el uso de plantas medicinales y remedios herbolarios es visto como una señal de atraso?

¿Por qué los doctores mexicanos han rechazado a la planta medicinal, aun cuando es un recurso accesible en términos culturales y económicos?

Las respuestas para estas preguntas son sencillas en algunos casos, profundas a veces, pero sin duda existen muchas conclusiones que han provocado la predisposición en contra de la medicina naturista. A continuación se exponen algunos puntos en contra del uso de la medicina herbolaria o naturista.

## **2.1.1 Descripción de Ideas y Factores en Contra del Uso de Medicina Herbolaria.**

### **2.1.1.1 El Factor Filosófico**

El mundo actualmente vive el auge de la ciencia, el hombre persigue descubrir las leyes que gobiernan el universo y jugar con estos conocimientos. Vivimos en una época en donde la ciencia es la religión llevada al extremo. Cualquier ente que no tenga sustento científico por mas vital, sagrado, poderoso y poético que resulte no deja de ser un gigante con pies de papel. La ciencia ha cambiado la forma de pensar, imaginar y soñar del hombre. El pensamiento filosófico científico esta en

---

una cumbre o clímax dentro de la historia del hombre. Y es bajo esta batuta que se desprenden muchos estatutos morales y éticos que rigen el comportamiento social y formas de pensamiento de la sociedad contemporánea.

Bajo estos cánones es que la medicina herbolaria esta condenada a ser proscrita de la historia de la medicina y ser remplazada por la medicina alópata dotada de ingenio científico.

#### **2.1.1.2 El Factor Técnico**

Las plantas tienen un uso medicinal significativo en México en un contexto de medicina tradicional, popular y por ciertos apartados de la industria y el comercio; sin embargo, existe poco estudio de las plantas desde un punto de vista químico, farmacológico y toxicológico.

- Desde el punto de vista químico se desconoce totalmente el amplio espectro de sustancias involucradas en un remedio herbolario, así como su concentración la cual presenta variables multifactoriales difícilmente predecibles.
- Al estar circunscrito una gran diversidad de compuestos químicos también resulta complicado anticipar todas las respuestas fisiológicas y su intensidad ejercida en respuesta al consumo de remedios herbolarios ya que estas dependen directamente de las concentraciones de los principios activos contenidos en el remedio herbolario.
- Aunque el conocimiento empírico de la medicina herbolaria tiene el respaldo de cientos de años, existen puntos débiles, por ejemplo, resulta complicado describir los efectos toxicológicos de cada uno de los compuestos químicos involucrados en un remedio herbolario, debido al gran número de sustancias involucradas y la interacción entre ellas. Por ende, es difícil establecer

---

parámetros confiables de relación dosis-respuesta, en cuestión de su toxicidad crónica, contraindicaciones en diversos grupos de personas, interacción con otros medicamentos, biodisponibilidad de cada una de las presentaciones en que se administran cada uno de los remedios herbolarios.

- Por otra parte, la medicina alópata esta sujeta a altos estándares de calidad, que contrastan con los remedios herbolarios en donde no existe control en cuanto a las concentraciones de cada una de las sustancias involucradas, parámetros microbiológicos y de agentes contaminantes en el producto.

Es por todas estas razones que los remedios herbolarios presentan gran variabilidad en cuanto a la dosis respuesta, toxicidad y efectos secundarios.

## **2.2 La Medicina Herbolaria en México**

En México el sistema de salud esta basado enteramente en medicina alópata y en consecuencia algunas prácticas de la medicina tradicional y alternativa son únicamente toleradas. Esta relación de la salud pública con la medicina tradicional ha creado una especie de vacío legal en la cual conviven paralelamente

En esta dualidad, una gran parte de la población es atendida por médicos tradicionales, sin reconocimiento oficial, ni padrón de practicantes, ni escuelas oficiales; de la misma manera que mucha gente se abastece de plantas medicinales en los puestos de los mercados a lo largo del país, sin que éstas tengan certificados de calidad, autenticidad o sigan normas sanitarias.

En México, el uso de la planta como componente terapéutico lo podemos encontrar principalmente en la medicina tradicional indígena y en la llamada medicina popular o doméstica, que es una práctica híbrida con raíces en la medicina tradicional pero que encontramos en el ámbito familiar (Hersch-Martinez, 1996).

---

### **2.3 El Mundo Tarahumara**

El pueblo Tarahumara cuyos aposentos ocupan una cuarta parte del territorio en el suroeste del estado de Chihuahua (65 mil km<sup>2</sup>) en una de las partes mas altas de la Sierra Madre Occidental, conocida también como la Sierra Tarahumara, la cual alcanza entre los 1500 y 2400 m sobre el nivel del mar (Lumholts, 1987), rinden una veneración hacia las plantas con capacidad de sanar o de ser usadas con fines ceremoniales.

El conocimiento de los tarahumaras de las plantas con actividad fisiológica es extenso. Se calcula que la herbolaria tarahumara conoce alrededor de 300 especies de plantas. De la cuales se tiene o se empieza a construir un perfil químico de las moléculas que contribuyen a generar una respuesta fisiológica. Donde pueden abarcarse dos perspectivas generales que son la farmacología y la toxicología (Bye, 1985).

### **2.4 Te Milagro, un Complejo de Plantas**

De acuerdo a los conocimientos empíricos amarrados en siglos de observación de los Tarahumaras y otros pueblos antiguos en donde crece el conjunto de plantas *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia*, este conjunto de plantas es usada para una amplia variedad de padecimientos como aliviar el dolor de rodillas, combatir las úlceras, es muy bien conocido también por su actividad antiséptica y por su acción contra la diabetes. La forma tradicional de consumir esta planta es generalmente en forma de infusión o aplicando las hojas decocidas sobre alguna herida o infecciones superficiales. Recientemente se han desarrollado varios fitomedicamentos en diversas presentaciones como bolsas de té, pomadas e infusiones. (Bye, 1986).

---

Desde épocas prehispánicas hasta la fecha la población residente del estado de Chihuahua ha usado hojas secas de chucaca en lengua tarahumara o lechuguilla en el castellano. Con fines meramente medicinales, sin que esto generara una sospecha o sugestión clara de que la planta de chacaca o lechuguilla tuviera efectos secundarios significativos (Bye, 1986).

Actualmente se sabe con certeza que estos efectos secundarios son seriamente significativos y tomar de la hierba de chucaca, puede ser peor mal que la enfermedad que se pretende curar (Mattocks, 1986).

En muchas circunstancias resultaría fácil y atinado pensar que un remedio herbolario consumido de forma usual por una sociedad a lo largo de tanto tiempo como lo es el caso de los Tarahumaras que utilizan este remedio desde épocas prehispánicas tenga efectos secundarios importantes. Sin embargo, este tipo de análisis que usa de apoyo la experiencia y costumbres para descifrar que el consumo o administración de cierta sustancia es nociva para la salud suele ser engañoso.

## **2.5 Generalidades de la tribu Senecioneae**

La tribu Senecioneae es la más grande dentro de la familia de las Asteraceae compuesta aproximadamente por 150 géneros y cerca de 300 especies. Esta tribu a su vez se divide en dos subtribus.

### a) Subtribu Biennospermatinae

Que engloba a cuatro géneros no muy bien caracterizados

### b) Subtribu Senecioninae

---

Incluye 96 géneros según Nordenstam (1977) ú 88 géneros de acuerdo con Robins (1977), los cuales derivan de dos géneros principales *Cacalia* y *Senecio*. El complejo del género *Cacalia* se distribuye por México y el este asiático. El vasto género *Senecio* se encuentra esparcido por todo el mundo, pero presenta una relevante diversidad en México y Centroamérica(Romo de Vivar, 2007).

Debido a la gran complejidad que existe para clasificar a las plantas en base a sus características morfológicas, en la actualidad las plantas son clasificadas de acuerdo a estudios citológicos. Cuando se empezaron a realizar estudios de citología para clasificar a las plantas debido a diferencias genéticas hubo un cisma en cuanto a la organización del género *Senecio*. Algunas especies que antes estaban incluidas en el género *Senecio* después del estudio citológico fueron excluidas y muchas de estas fueron incorporadas en el nuevo género *Packera*. De tal forma que 2 de las plantas de estudio de esta tesis *Senecio candidissimus* y *Senecio bellidofilus* se clasificaron como *Packera candidíssima* y *Packera bellidofilia* (Weber y Löve, 1981).

### **2.5.1 Principales pirrolizidinas encontradas en el Género *Senecio***

---

El genero *Senecio* es el principal de la tribu Senecioneae, su perfil químico define de forma general esta tribu y guarda bastante relación con el genero *Packera* en muchos de sus metabolitos incluyendo a los alcaloides pirrolizidínicos En la tabla número 1 se exponen los principales alcaloides pirrolizidínicos (PAs) encontrados en el género *Senecio* (Romo de Vivar, 2007).

Especie	Alcaloides Pirrolizidínicos
<i>S. madrensis</i>	1, 5
<i>S. mairetianus</i>	1, 2
<i>S. prionoapterus</i>	1, 3
<i>S. procumbens</i>	1, 3, 6

**Tabla 1.** Principales PAs encontrados en el género *Senecio*. Los números en la tabla corresponden a las moléculas correspondientes en la figura 1.

### 2.5.2 Principales pirrolizidinas encontradas en el Género *Packera*

El genero *Packera* esta distribuido de México hasta regiones árticas y el este de Siberia.15 especies y 3 variedades de Pakera se han identificado en México .Pero tan solo 7 especies se han estudiado químicamente. Los alcaloides pirrolizidínicos, eremofilanos y quinoles como la jacaranona son los principales metabolitos secundarios aislados de las especies de *Packera* En la tabla número 2 se exponen los principales PAs encontrados en el género *Packera* (Romo de Vivar, 2007).

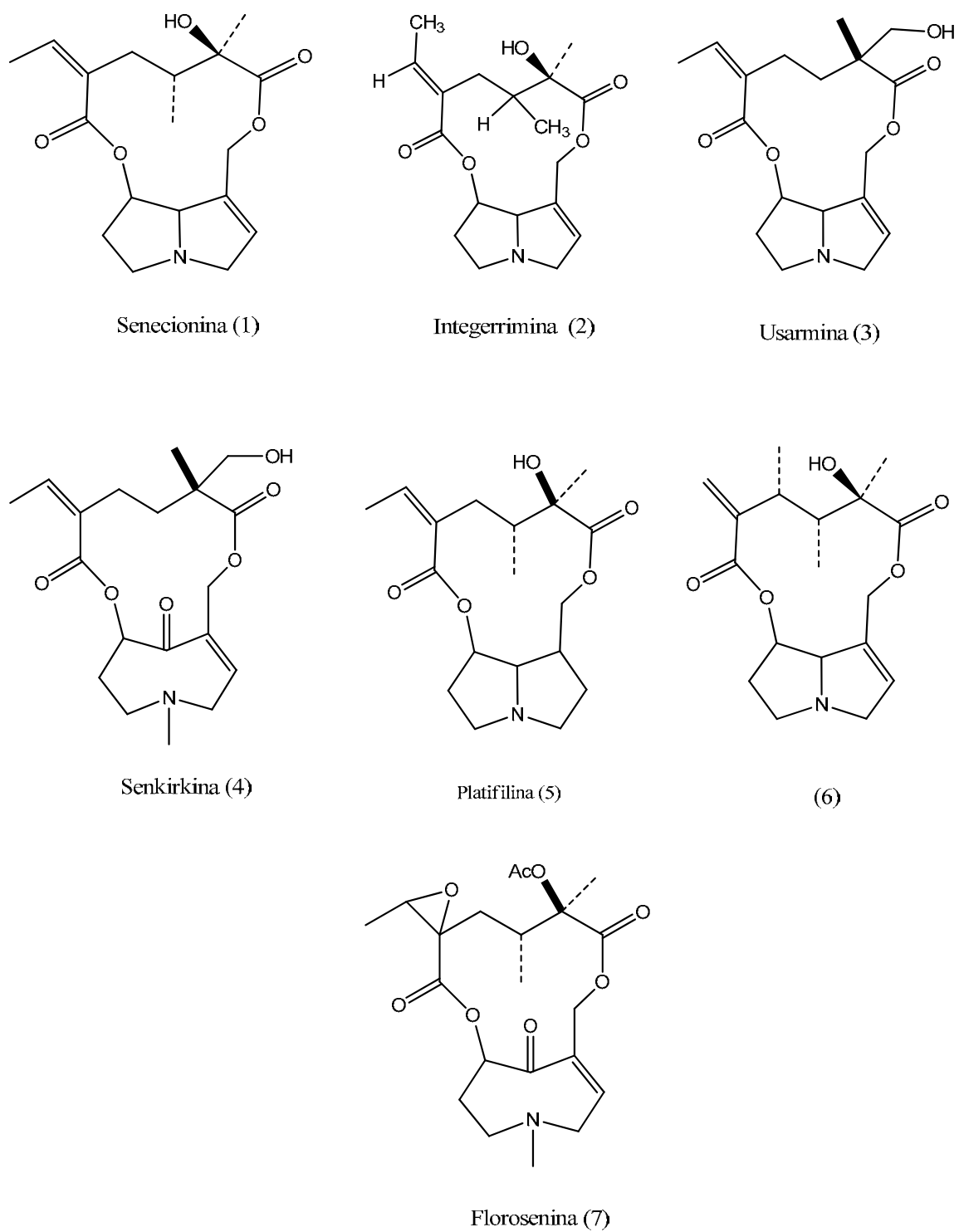


---

---

Espece	Alcaloides Pirrolizidínicos
<i>P. bellidifolia</i>	
<i>P. candidissima</i>	1, 2, 3,4,5
<i>P. coahuilensis</i>	1, 3
<i>P. quebradensis</i>	4, 7

**Tabla 2.** Principales PAs encontrados en el género *Packera*. Los números en la tabla corresponden a las moléculas correspondientes en la figura 1.

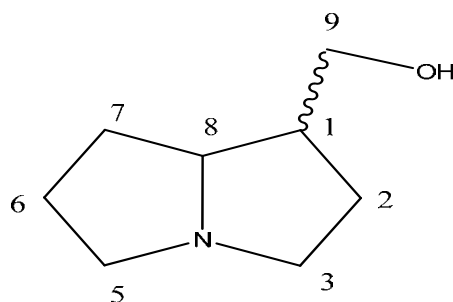


**Figura 1.** Principales PAs encontrados en el género *Senecio* y *Packera*. Tomado de Romo de Vivar, 2007.

---

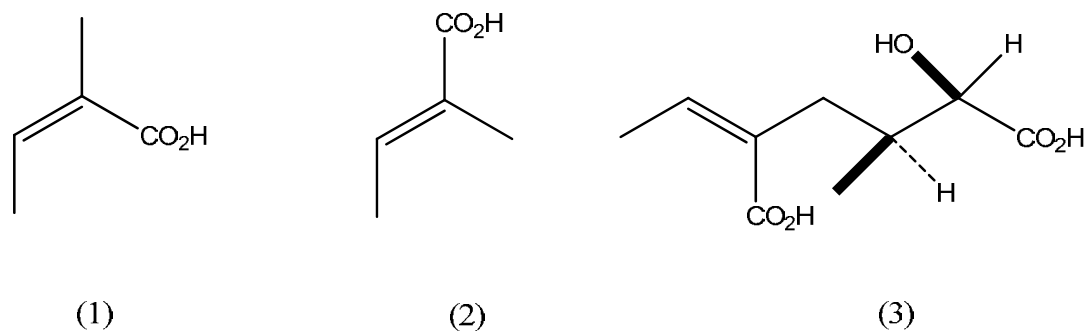
## 2.6 Alcaloides Pirrolizidínicos

Los alcaloides pirrolizidínicos (PAs) son ésteres de cualquiera de los 4 isómeros del 1-hidroximetilpirrolizidina frecuentemente hidroxilado en diversas posiciones del núcleo estructural, siendo la más común la posición del carbono 7. El núcleo básico de aminoalcohol recibe el nombre de necina, mientras que la porción ácida se conoce como ácido néxico. Los alcaloides pirrolizidínicos pueden estar en la naturaleza en forma de bases libres o de N-óxidos (Bah y Pereda-Miranda, 2003). En la figura número 2 se ilustra la estructura de la necina.



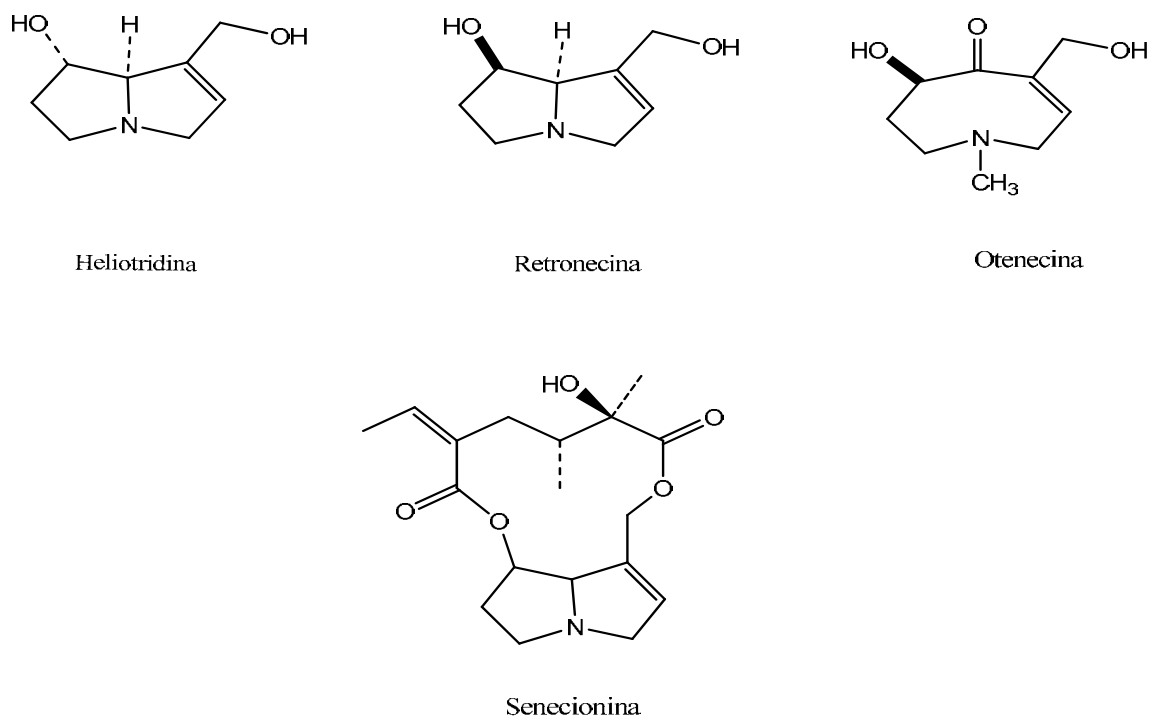
**Figura 2.** Estructura de necina. Tomado de Romo de Vivar, 2007.

Los grupos hidroxilo pueden esterificarse por ácidos monocarboxílicos como el ácido angélico (1), tíglico (2) o por ácidos dicarboxílicos o ácido seneciánico (3) como se ilustra en la figura 3. (Romo de Vivar, 2007).



**Figura 3.** Ácidos comúnmente esterificados en los grupos hidroxilo de las necinas. Tomado de Romo de Vivar, 2007.

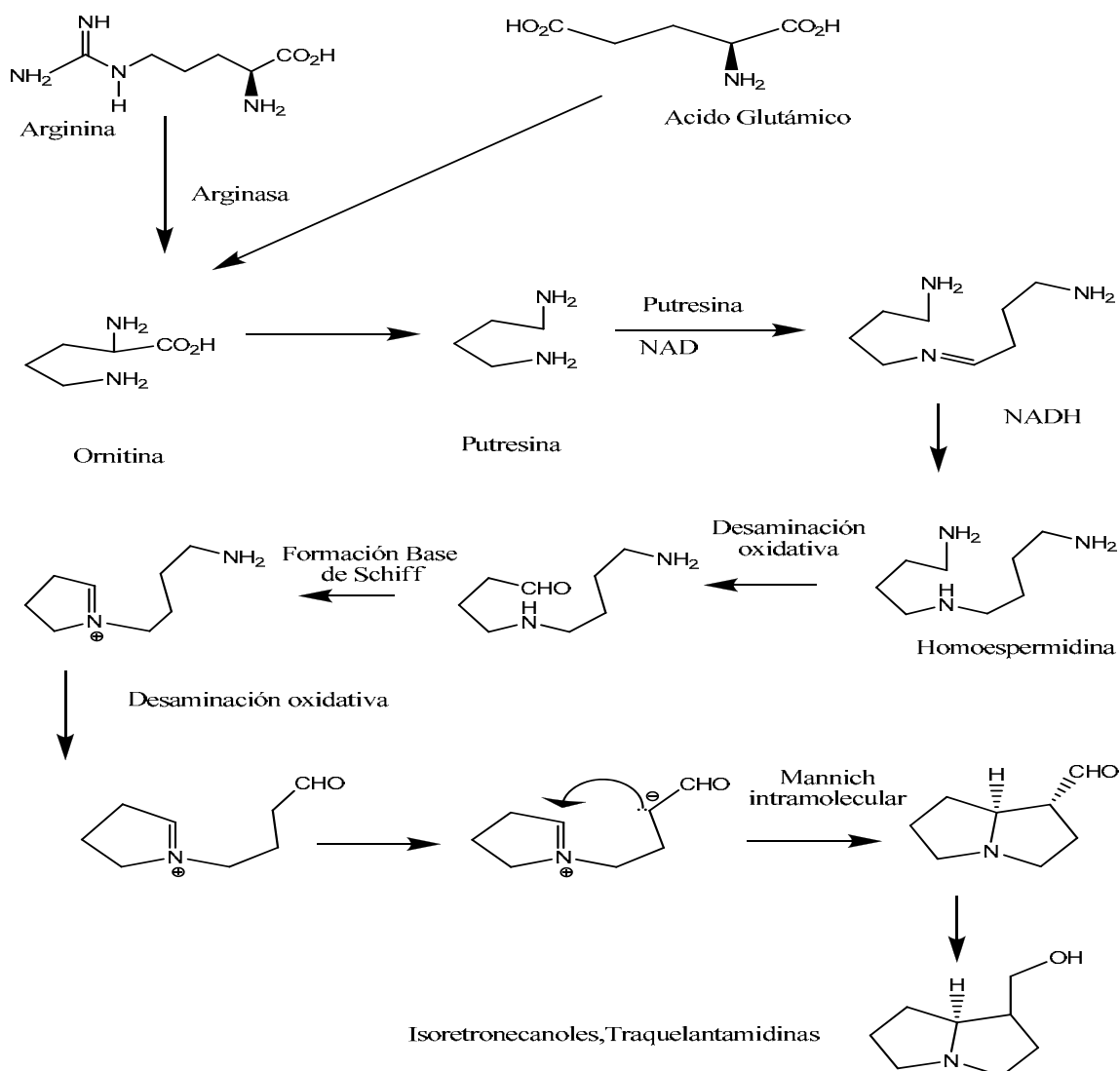
Los alcaloides pirrolizidínicos que contienen en su estructura básica retronecina, otenecina o heliotridina son elevadamente tóxicos. La toxicidad incrementa cuando un ester cíclico esta presente como en el caso de la senecionina, que es el PA más común en Senecioneae. (Romo de Vivar, 2007). Ver figura 4.



**Figura 4.** Ejemplo de alcaloides pirrolizidínicos tóxicos.

## 2.7 Biogénesis

La biogénesis de las necinas se genera durante el metabolismo de los aminoácidos. En los animales la arginina y en las plantas el ácido glutámico siguen las reacciones correspondientes para transformarse en ornitina (Hartmann, 2000). Ver figura 5.



**Figura 5.** Biogénesis de los alcaloides pirrolizidínicos. Tomado de Hartmann 2000.

---

En la figura 5 se describe como la ornitina es descarboxilada dando lugar a la putresina. Dos moléculas de putresina se conjugan y después la molécula se reduce por medio de NADH. La homoespermidina sufre un desaminación oxidativa, el nitrógeno ataca al grupo carbonilo formando subsecuentemente un anillo tipo pirrol. En el extremo amino de la molécula se lleva a cabo otra desaminación oxidativa, el carbono alfa al carbonilo tiene un protón ácido por lo que se forma un carbanión que ataca la doble ligadura de la estructura del pirrol formando de esta manera la estructura base de la necina.

## **2.8 Patologías Asociadas al Consumo y Administración de Alcaloides Pirrolizidínicos**

En el año de 1988 la Organización Mundial de Salud emite un discurso en el cual se manifiesta que hay un riesgo sanitario por el consumo de ciertas plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos. Estas plantas son usadas como remedios herbolarios, fitomedicamentos y en algunas había la contaminación de estos compuestos en alimentos.

La toxicidad de los alcaloides pirrolizidínicos es considerable y afecta a varias especies incluyendo al hombre y la presencia de plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos es global independiente del clima y otros factores ambientales.

El daño provocado al consumir plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos se ha reportado desde los años cincuentas. En la actualidad ya se tiene una buena idea de todo el espectro de enfermedades que pueden devenir del consumo de alcaloides pirrolizidínicos.

---

Se ha reportado que el consumo moderado de alcaloides pirrolizidínicos, induce megalocitosis, veno-oclusión en hígado y pulmones, alargamiento del núcleo con incremento de la cromatina nuclear, pérdida de la función metabólica, inhibición de la mitosis, proliferación del epitelio del tracto biliar, cirrosis hepática, hiperplasia nodular, carcinomas y adenomas (WHO, 1988; Chan, 1993).

La gravedad de estas patologías hace que el consumo y aplicación de alcaloides pirrolizidínicos sea considerado asunto de salud pública a nivel global.

## **2.9 Plantas que Contienen Alcaloides Pirrolizidínicos y su Consumo en México**

En México existe un amplio espectro de plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos. De este complejo de plantas las más importantes debido a su uso son las especies de *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia* ubicadas al noroeste del país primordialmente en el estado de Chihuahua y en el norte de Durango (Freeman,1985). Estas plantas son usadas como remedios herbolarios y también usadas en la elaboración de fitomedicamentos. Ver figura 6.



**Figura 6:** Fotografía de la planta *Packera Candidissima*

---

El uso de estas plantas como plantas medicinales tiene su génesis en tiempos prehispánicos y su uso fue adoptado por la sociedad mexicana contemporánea con mayor relevancia al norte del país y también en la población hispana del sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Bah; Pereda Miranda, 1994).

Este complejo de plantas usado con fines medicinales en ciertos sectores de la población de México recibe el nombre de “Té Milagro”. Los principales usos de este complejo de plantas desde un enfoque medicinal es el uso antiséptico, para aliviar dolores en los riñones, aliviar dolores menstruales, aliviar diversas infecciones de la piel (Weber y Love, 1981) y remedio contra la diabetes (Bye, 1986).

La forma de administración varía, puede tomarse en forma de infusión, en forma de baños cuando existe una infección en la piel y en productos procesados como pomadas y geles ver figura 6.



**Figura 7:** Productos procesados a partir de *Packera candidissima* o *Packera bellidifolia*, comercializados bajo el nombre de “Té Milagro”

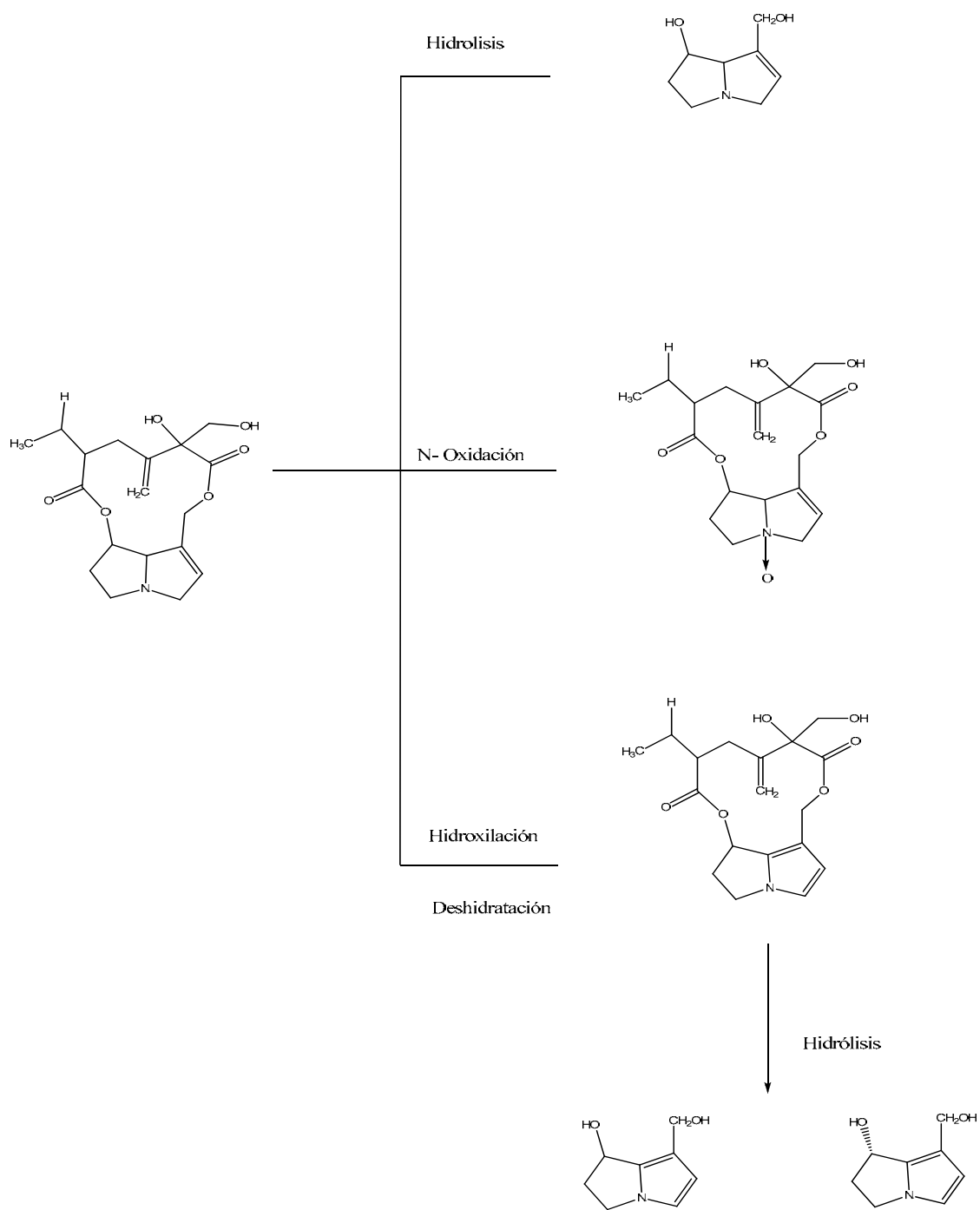


---

## **2.10 Metabolismo y Activación Metabólica de los Alcaloides Pirrolizidínicos.**

Como muchos de los compuestos xenotóxicos, los alcaloides pirrolizidínicos requieren de activación metabólica para poder ejercer el efecto tóxico. Durante las últimas décadas, el metabolismo de los alcaloides pirrolizidínicos ha sido ampliamente estudiado tanto in vivo como in vitro (Fu, 2004).

Existen 3 rutas metabólicas principales, todas realizadas en el hígado (Fu, 2004). Ver figura 6.



**Figura 8.** Rutas metabólicas de los alcaloides pirrolizidínicos. Tomada de (Fu, 2002).

---

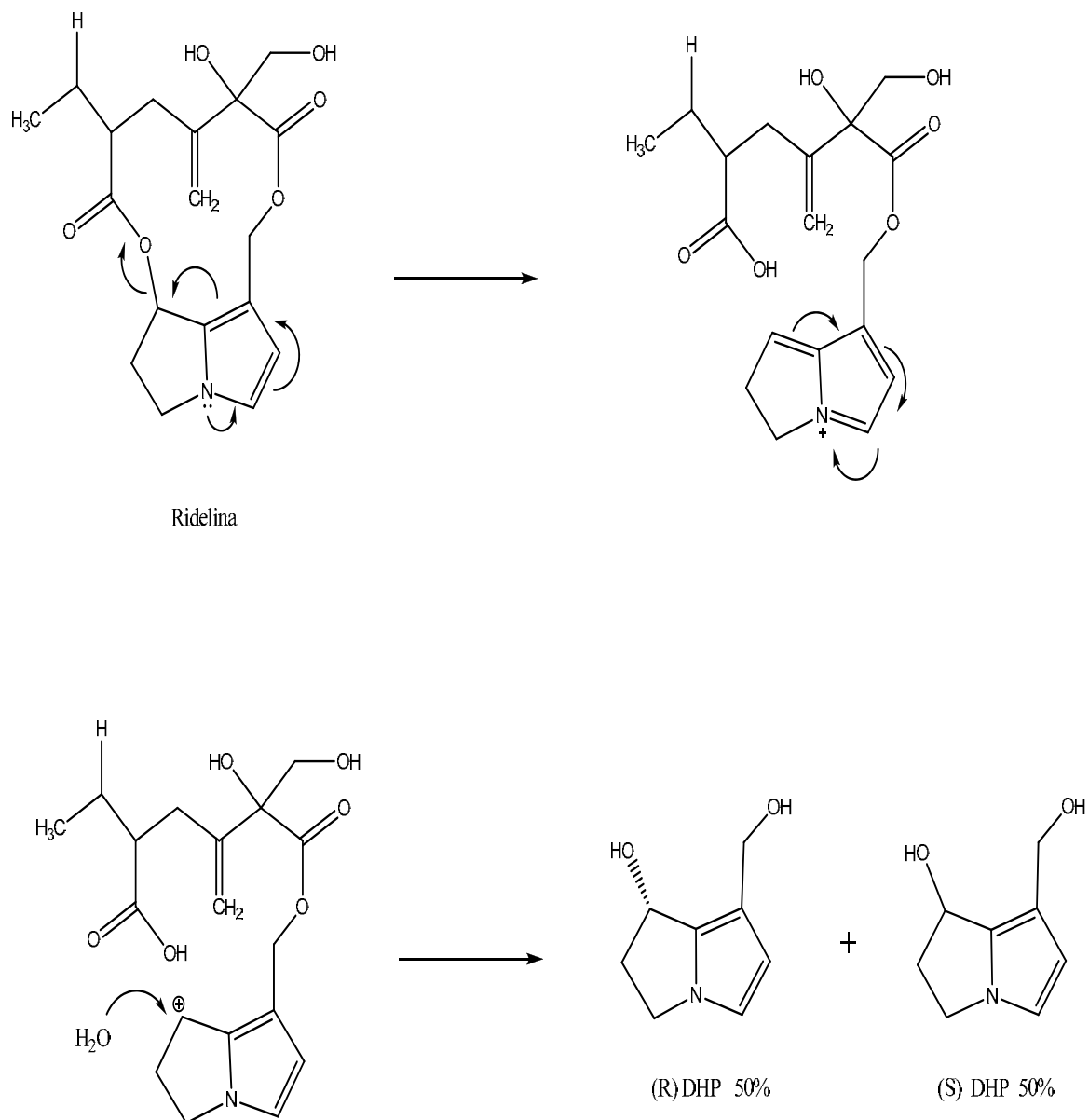
### **2.10.1 Hidrólisis de los Esteres**

Esta ruta metabólica de hidrólisis de los ésteres da lugar a la formación de necinas y ácido néxico. En épocas recientes se ha establecido que la hidrólisis del grupo éster de los alcaloides pirrolizidínicos para formar la base necica es un medio de detoxificación y es catalizado por carboxiesterasas citosólicas del hígado (Dueker, 1992). Esta hidrólisis permite que las pirrolizidinas sean más solubles y por ende sea más fácil su eliminación.

### **2.10.2 Hidroxilación en el Carbono 3 ú 8.**

El metabolismo de los alcaloides pirrolizidínicos a las correspondientes dehidropirrolizinas es catalizado por el citocromo P-450 específicamente por las isoenzimas CYP3A y CYP2B6. Esta ruta metabólica lleva a la formación de metabolitos tóxicos.(Buhler, 1986).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la formación de DHP se expone en la figura 7.(Buhler, 1986).



**Figura 9.** Metabolismo de los alcaloides pirrolizidínicos hidroxilación en el carbono 3 ú 8. Tomada de Buhler 1986.

Los metabolitos pirrólicos formados son capaces de unirse posteriormente con glutatión. Esta reacción enzimática esta catalizada por la glutatión S transferasa (gst). ( Lin, 1998, 2000; White, 1976; Yan CC, 1985). Esta es la

---

vía principal de detoxificación por la toxicidad inducida de los alcaloides pirrolizidínicos.

### **2.10.3 Oxidación de las bases nécicas a los correspondientes N-Oxidos**

El metabolismo de las pirrolizidinas a sus respectivos N-óxidos es catalizado por el citocromos P-450 y flavinas que contienen monooxigenasa. Aunque anteriormente se tenía la idea de los N óxidos son metabolitos no tóxicos, investigaciones subsecuentes han propuesto lo contrario, realizando las siguientes pruebas experimentales. (Fu, 2002).

### **2.11 Relación Estructura Actividad en la Toxicidad de las Pirrolizidinas**

Una vez que se revisaron las principales rutas metabólicas para los alcaloides pirrolizidínicos resulta fácil hacer propuestas en cuanto a la relación estructura actividad para la toxicidad de estos compuestos. Algo que resulta evidente es que los dobles enlaces en la base de la necina son de alta importancia para que procedan las reacciones de hidroxilación y deshidratación y por ende poder formar metabolitos altamente tóxicos (Fu, 2002).

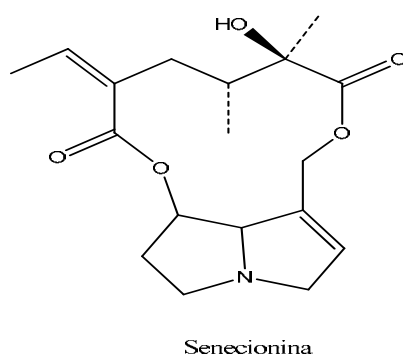
Por otra parte se han encontrado importantes factores de impedimento estérico en las reacciones de hidroxilación, deshidrogenacion e hidrólisis.

El impedimento estérico alrededor de los grupos esteres de la molécula puede evitar la reacción de hidrólisis enzimática. En general los esteres que están junto a un grupo alilo son más fácilmente hidrolizados que los esteres que no presente

---

junto un grupo alílico, ver figura 8. Esto resulta porque el ester alílico presenta menor impedimento estérico y la doble ligadura del grupo alilo facilita la hidrólisis.

Estos factores pueden inducir en cierto porcentaje que una molécula de pirrolizidina siga la ruta metabólica de la hidrólisis enzimática que genera metabolitos menos tóxicos o que siga la vía de la hidroxilación deshidrogenación (Hincks, 1991; Mattocks, 1986).



**Figura 10.** Pirrolizidina con un ester alílico

## 2.12 Mecanismos de toxicidad

Los mecanismos de toxicidad inducidos por las pirrolizidinas han sido estudiados de manera efusiva y amplia. En el presente trabajo de tesis se abordara la toxicidad en 2 enfoques. El primer enfoque será un enfoque directo entre los metabolitos tóxicos de las pirrolizidinas y una interacción directa a nivel bioquímico con las moléculas donde hacen blanco y una respuesta fisiológica a partir de ello. El segundo enfoque será una interacción de las pirrolizidinas y sus metabolitos con el material genético promoviendo un aumento o disminución en la expresión

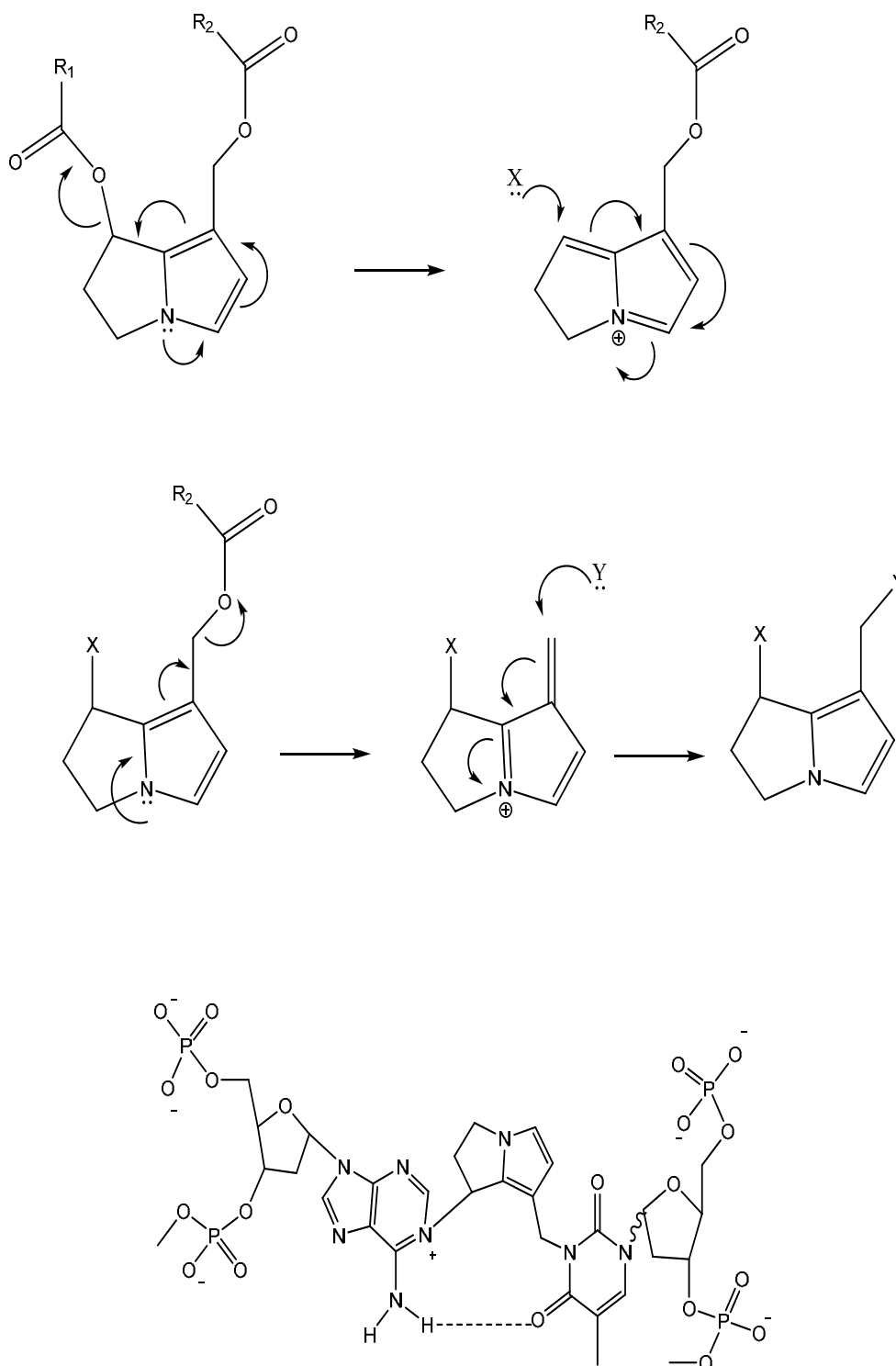
---

de diversos genes que posteriormente desencadenarán una respuesta a nivel fisiológico.

## **2.12.1 Mecanismos de toxicidad nivel bioquímico**

### **2.12.1.1 Formación de aductos con DNA**

Dentro de la investigación que se ha realizado, tratando de averiguar los mecanismos por cuales los alcaloides pirrolizidínicos promueven algunos de sus efectos tóxicos y patologías como la formación de tumores, está el de la formación de aductos con la molécula del ADN. Existe evidencia científica en donde se reporta que la ridelina induce tumores en el hígado, adenomas y carcinomas en ratas, mediante un mecanismo en el que el metabolito tóxico de la ridelina, la DHP, forma aductos con el DNA. Los grupos nucleofílicos de estas macromoléculas reaccionan con los núcleos pirrólicos producidos en el metabolismo de los PAs; estos metabolitos forman iones carbono susceptibles de sufrir ataques de manera predominante en las posiciones C-7 y C-9 (Huxtable, 1990). Ver figura 9.



**Figura 11.** Mecanismo de formación de aductos con el ADN. Tomada de Huxtable 1990



---

### **2.12.1.2 Respuestas secundarias del metabolismo de los PAs**

Las sustancias carcinogénicas pueden exacerbar la formación de tumores mediante mecanismos secundarios como el estrés oxidativo, hipermetilación, inducción de la peroxidación lipídica e inducción de peroxisomas.

Un ejemplo de esto es el trans-4-hidroxi-2-hexenal formado por el metabolismo de la senecionina, en particular de la peroxidación lipídica inducida por la senecionina (Segall, 1985)..

### **2.12.2 Toxicidad a Nivel Genético**

Aparte de que se ha realizado un importante trabajo desde el punto de vista químico, bioquímico y toxicológico para observar todas las repercusiones o respuestas fisiológicas inducidas por la administración de alcaloides pirrolizidínicos, también se ha realizado trabajo experimental para observar las repercusiones a nivel genético que induce la administración de alcaloides pirrolizidínicos (Mei, 2007).

El estudio genético para este tipo de compuestos es bastante significativo ya que se conocen más de 6000 plantas y cerca de 660 PAs y sus N-óxidos han sido identificados, la mitad de ellos han sido catalogado como genotóxicos y tumorigénicos (Fu, 2004).

Este tipo de estudios desprende una cantidad asombrosa de información que ayuda a su vez a explicar una serie de mecanismos de acción por los que algunas sustancias tienen efecto y que anteriormente no eran comprendidos o explicados.

---

Es posible que si se analizaran muchos de los fármacos de hoy en día se encontrarían datos sorprendentes que ayudarían a complementar los mecanismos de acción de los fármacos, explicar los efectos secundarios de los fármacos o encontrar nuevas aplicaciones y por ende desarrollar nuevos fármacos que actuaran exclusivamente a nivel genético para provocar una respuesta fisiológica.

Un ejemplo puntual en el caso de los PAs es que tras su administración se promueve un cambio en la expresión del gen *igfbp1* lo que repercute en una síntesis mas eficiente de insulina (Zhang, 2007). Esto explica el uso que se le atribuye al consumo de *Packera Candidissima* para tratar la diabetes.

### **2.13 Dosis Máximas Permitidas de Consumo de Alcaloides Pirrolizidínicos.**

Se ha demostrado que el consumo de algunos alcaloides pirrolizidínicos puede dar génesis a diversos males como cirrosis hepática y cáncer, entre otros padecimientos. Actualmente se comercializan en México una serie de remedios herbolarios que van desde té de hierbas, soluciones acuosas y pomadas hechas a partir de *Packera candidissima* y/o *Packera bellidofolia*. El curso de las palabras durante la maduración de este texto nos lleva ahora a preguntar.

¿Qué dosis pueden representar una amenaza para la salud del hombre?

¿Que tanto contenido de alcaloides pirrolizidínicos tóxicos tienen estos remedios herbolarios?

Es bueno saber que sobre esto de la dosis respuesta de los alcaloides pirrolizidínicos ya existe bastante información.

---

Se tienen reportado datos de dosis respuesta en humanos para muchas moléculas de alcaloides pirrolizidínicos por separado y sus diferentes cocteles de estos. Un consumo de heliotrina de 4 a 10 mg/Kg de peso corporal por día, por un periodo de 3 a 7 semanas desencadena en necrosis de hígado y venoclusión. Una combinación de croatinina y cronaburnima a dosis menores a 1 mg/Kg de peso corporal por un periodo de varios meses, desencadena de la misma manera en necrosis del hígado y venoclusión (Culvenor, 2003).

Se reporta que para la retrorsina y la ridelina un consumo de 0.7 a 1.5 mg diarios por un periodo de 2 semanas desencadena en necrosis del hígado, fibrosis en hígado y cirrosis (Culvenor, 2003).

Los parámetros que tomaron las organizaciones de salud para establecer la dosis o consumo máximo de alcaloides pirrolizidínicos no esta basado en las dosis mínimas que causan necrosis, fibrosis y cirrosis más un pequeño ajuste estadístico. Los parámetros de consumo máximo de alcaloides pirrolizidínicos en la actualidad se basan en el daño a nivel genético que ocasionan los alcaloides pirrolizidínicos, resultado de varias investigaciones.

Algo que es importante anexar antes de revelar los parámetros de ingesta es que la capacidad de inducir cáncer de los alcaloides pirrolizidínicos varía en gran proporción al analizar cada molécula. Un estudio realizado con la mosca de la fruta y diversos PAs, permitió comparar el potencial de mutagenicidad de diversos PAs que se describe a continuación (Frei, 1992).

senquirquina > monocrotalina > senecifilina > senecionina > 7-acetil intermedina > heliotrina > retrorsina > 7-acetilcopsamina > simphytina > jacolina > simlandina > intermedina > indicina > licopsamina > indicina N-oxide > supinina

---

En las plantas de *Packera senecioninae* y *Packera candidissima* los alcaloides en mayor proporción son los alcaloides retrorsina y senecionina. De acuerdo al estudio de genotoxicidad en mosca de fruta se observa que la senecionina es mas tóxica que retrorsina desde un punto de vista genético.

Los valores de ingesta máximos de acuerdo a las organizaciones de salud son los siguientes:

- El Departamento de Salud de Alemania manifiesta que la dosis diaria de PAs no debe sobrepasar más de 1 microgramo (Bekanntmachung, 1992).
- El departamento de Salud de Alemania señala que para administración tópica la dosis diaria no debe contener más de 100 microgramos de PAs y su uso no debe extenderse más de 6 semanas. Con excepción de mujeres embarazadas y lactantes cuyo consumo debe ser nulo (Bekanntmachung, 1992).
- La American Herbal Products Association (AHPA) recomienda que los productos botánicos que contengan PAs deben describir en la etiqueta solo para uso tópico y no aplicar sobre heridas (American Herbal Association, 2006).
- Por otra parte, la FDA prohibió la comercialización de suplementos alimenticios que contuvieran PAs (FDA, 2001).

---

### 3 Hipótesis de Trabajo

Mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) podrá determinarse la concentración de los alcaloides pirrolizidínicos presentes en diferentes muestras comerciales del té milagro. Por ende se podrá determinar si las concentraciones de PAs están fuera de lo estipulado por las instituciones de salud.

### 4 Objetivos

#### 4.1 Objetivo General:

Cuantificar el contenido de pirrolizidinas hepatotóxicas mediante el uso del HPLC en muestras comerciales que usan para su elaboración las plantas *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia*.

#### 4.2 Objetivos Específicos:

Una vez que se determinaron las concentraciones de alcaloides pirrolizidínicos, se evaluará si las concentraciones encontradas en las muestras representan riesgo para la población de acuerdo a lo sugerido por las instituciones de salud.

Determinar si existe algún compuesto mayoritario presente en el crudo alcaloideo de las muestras para ser usado como marcador.

---

## 5 Parte experimental

### 5.1 Obtención de las muestras

Las muestras para realizar el estudio de este trabajo de tesis fueron recolectadas en varios mercados y tiendas naturistas de los estados de Queretaro y Chihuahua. La forma en la cual se adquirió cada una de ellas se describe a continuación.

Las muestras de “Tisana The Ocotzotl” y el “Extracto Fluido” con el mismo nombre comercial son manufacturadas por la empresa Ocotzotl que produce diversos productos naturistas, estas muestras se adquirieron en la ciudad de Santiago de Querétaro, Qro. Sin embargo, los productos de esta empresa se distribuyen en diversas tiendas naturistas del país y sus productos se anuncian en la red.

Las muestras bajo el nombre “Planta en flor de Campo Sanchez Bocoyna” y “Planta en flor de Campo Noritari”, fueron recolectadas en la localidad de Estación Sánchez y Noritari respectivamente. Ambas ubicadas en el municipio de Bocoyna, Chihuahua.

Las muestras bajo el nombre de “Hierba de té milagro” y “té milagro”, son comercializada por la empresa Plantas Medicinales Arámbula. Ambas muestras fueron adquiridas en la Ciudad de Chihuahua, Chih.

Tres muestras comerciales sin marbete y la “super crema milagro”, fueron adquiridas en un mercado de la Ciudad de Chihuahua, Chih.

---

## **5.2 Procesamiento de las muestras**

Debido al gran número de compuestos químicos involucrados en los productos naturales. Resulta inconveniente realizar un análisis directo de las muestras en el HPLC. Por lo que se opta por ir discriminando la complejidad en la diversidad estructural mediante la selección de moléculas diagnósticas que compartan características fisicoquímicas similares.

### **5.2.1 Extracción**

Un peso conocido de cada muestra se sometió 3 veces a una maceración con hexano por periodos de 2 días, con el fin de desgrasar la muestra. Subsecuentemente, el residuo vegetal se sometió 3 veces a una maceración con MeOH por periodos de dos días. Finalmente, el extracto metanólico se concentró a presión reducida.

### **5.2.2 Obtención del crudo alcaloideo.**

Un peso conocido del extracto metanólico se trató con  $\text{CHCl}_3$  (100 mL por cada 5 gramos de extracto) y se agregó suficiente HCl 1N hasta lograr su resuspensión. A continuación la solución clorofórmica se somete a partición con HCl 1N (50 mL por cada 5 g de extracto, por triplicado).

En este punto se divide el procesamiento de las muestras en dos tangentes. La primera persigue discriminar los PAs en la forma de bases libres. Para esto la mitad de la solución acuosa se ajusta en rango de pH 9-10 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y previendo que bajo estas condiciones de pH, los PAs se encontrarán en forma de bases libres es plausible su extracción con un disolvente aprótico no polar como el  $\text{CHCl}_3$ . La fase orgánica se concentró a presión reducida, ver figura 10 inciso a)

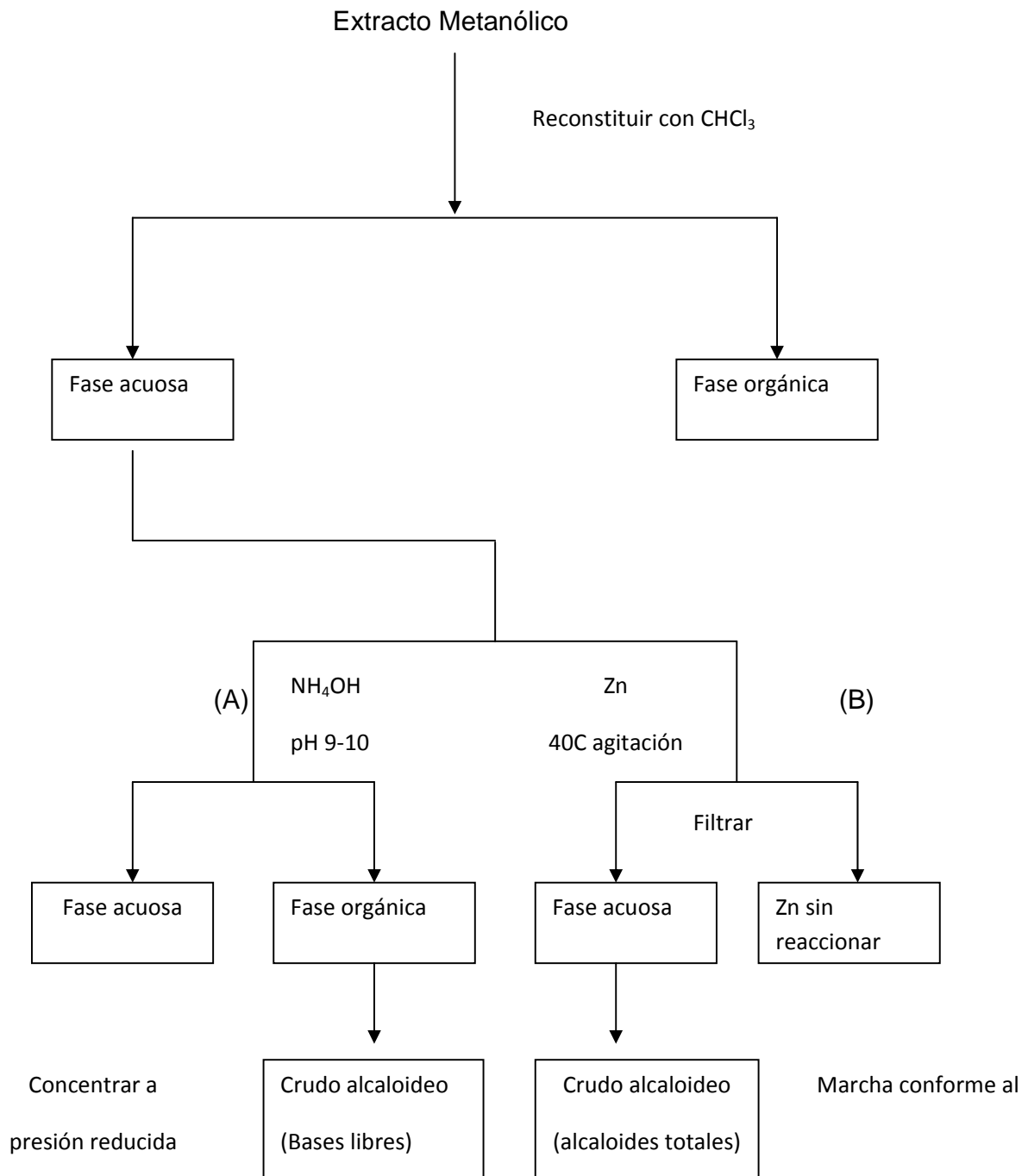
---

La otra mitad de volumen de solución acuosa se sometió a un proceso de reducción con polvo de Zn por 4 horas a 40 °C. Al final de la operación, los PAs en forma de N-óxidos fueron reducidos a bases libres. De igual forma que el proceso seguido para las bases libres la solución se ajusta a un pH en un rango de 9-10, se adiciona  $\text{CHCl}_3$  al sistema y al final la fase orgánica se concentra a presión reducida. Ver figura 10 inciso b).

En el caso de las muestras correspondientes a los extractos fluidos comerciales, éstas se disolvieron en agua destilada, se ajusta el pH a 1 y se siguió la misma metodología descrita anteriormente.

En el caso particular de la súper crema milagro. Se montó una cromatografía de columna de sílica gel y se eluyó con hexano. Al correr la columna se distinguió como se separaban la base grasa de la crema del resto de los componentes de la misma. Los componentes no grasos de la crema se disolvieron en  $\text{CHCl}_3$  y se concentraron a presión reducida para su posterior análisis en el HPLC.





**Figura 10.** Esquema de obtención de los crudos alcaloideos a partir del fraccionamiento del extracto metanólico.

---

### 5.3 Sustancias de Referencia

El presente trabajo de tesis busca identificar y cuantificar dos alcaloides pirrolizidínicos en particular, la senecionina y retrorsina que constituyen los alcaloides mayoritarios descritos en *Packera candidissima* (Bah; Pereda-Miranda, 1994). La identificación de los picos en cada uno de los cromatogramas generados por las muestras problemas se realizará por el método de coelución utilizando los siguientes estándares.

Sustancia de Referencia	Tiempo de Retención (min)
Senecionina Fluka® (Sn)	29.94
Retrorsina Sigma ® (Rr)	27.18
4-hidroxifenilacetato de metilo Aldrich ® (Facme)	15.20

**Tabla 3.** Sustancias de referencia y sus tiempos de retención. Los tiempos de retención fueron obtenidos con el programa de elución descrito en la tabla 11.

### 5.4 Técnicas analíticas

#### 5.4.1 Cuantificación de las pirrolizidinas mediante HPLC.

El análisis de las muestras de trabajo se realizó con un equipo Waters que consistió de una bomba modelo 600 E acoplada a un detector de arreglo de diodos modelo 996. Se utilizó una columna de fase reversa XTerra RP18 (4.6 X 150 mm). Bajo un sistema de elución en gradiente de NH<sub>4</sub>OH (15mM) en CH<sub>3</sub>CN (ver tabla 10 ) a un flujo de 0.4 mL/min por 40 minutos. En todos los casos el volumen de inyección fue de 10 microlitros y se utilizó una longitud de onda de 214 nm. Las respuestas registradas por el equipo fueron interpretadas y procesadas por el software Empower 2. En un análisis preliminar se inyectaron soluciones de referencia que contenían a Sn, Rr y Facme para estimar los tiempos de retención de los estándares.

---

---

Tiempo	% NH <sub>4</sub> OH	% CH <sub>3</sub> CN
0	95	5
20	50	50
25	50	50
28	0	100
33	0	100
36	95	5

**Tabla 4.** Programa de elución en gradiente de la fase móvil.

En la determinación del contenido de PAs en las muestras se trabajó utilizando el método de coelución. Un peso conocido de las muestras del crudo alcaloideo se disolvió en un volumen conocido de metanol R.A. El contenido alcaloideo se determinó por triplicado y posteriormente se añadieron los estándares a la muestra para poder determinar los picos que corresponden a los PAs que se pretende cuantificar.

#### **5.4.2 Curvas Patrón**

En un estudio previo a la elaboración de esta tesis (Castro, 2007) se realizaron estudios de linealidad para la cuantificación de senecionina y retrorsina. 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 fue el siguiente:

a) Senecionina. se preparó una solución de reserva (2 mg /mL) en MeOH RA a partir de esta solución se realizaron diluciones utilizando MeOH RA para obtener concentraciones finales de 1, 0.75, 0.5 y 0.25 mg/mL.

---

b) Retrorsina .se preparó una solución de reserva de (5 mg/mL) en MeOH RA y a partir de esta solución se realizaron diluciones utilizando MeOH RA para obtener concentraciones finales de 3, 1.5 ,1 y 0.5 mg/mL.

Con los datos 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 un criterio de aceptación de la linealidad del sistema analítico, se debe cumplir con un coeficiente de determinación mayor a 0.98.

#### **5.4.3 Análisis de GC-MS**

Los crudos alcaloideos de todas las muestras se sometieron a un estudio de espectroscopia de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) con la finalidad de identificar los APs senecionina y retrorsina. Los resultados obtenidos de este estudio se compararon con espectros registrados en la biblioteca del equipo.

Las especificaciones del equipo son las siguientes:

- Espectrómetro de Masas  
Marca: Thermo-Electrón  
Modelo: DFS (Double Focus Sector)  
Analizador másico: Doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa)
- CG-EM  
Cromatógrafo de Gases:  
Marca: Thermo-Electrón  
Modelo: Trace GC Ultra  
Columna capilar:  
Fase: DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón)  
Dimensiones:

---

Long. 30 m

D.I.: 0.25 mm

Espesor de película: 0.1 micras

Las condiciones de trabajo a las cuales se analizaron las muestras son las siguientes:

Temp. del Horno: 100°C durante 4 min, velocidad de calentamiento de 25°C por minuto hasta llegar a 300°C (15 minutos en esta temperatura final). El barrido de masas fue de 45 a 800 u.

## 6. Resultados

### 6.1 Curvas Patrón

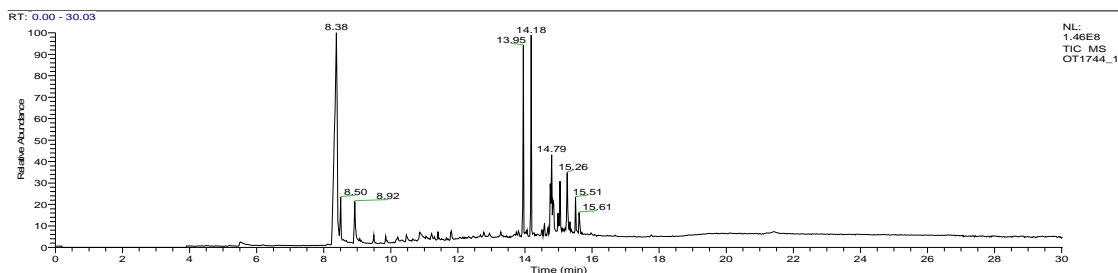
Retrorsina		Senecionina	
Concentración mg/ml	Área	Concentración mg/ml	Área
5	26389712	2	10695010
5	25271334	2	11535153
5	25563870	2	10063204
3	15645427	1	5952633
3	16586564	1	5789654
3	16339898	1	5798651
1.5	9565899	0.75	4042654
1.5	9000382	0.75	3965455
1.5	8836950	0.75	3885611
1	5520510	0.5	2933260
1	5109414	0.5	2854651
1	5365862	0.5	2754189
0.5	2791898	0.25	1863555
0.5	2677331	0.25	1935411
0.5	2713688	0.25	1651615

	Senecionina	Retrorsina
Ecuación Curva Patrón	$y = 5E+06x + 357687$	$y = 5E+06x + 643343$
$r^2$	0.988	0.9947

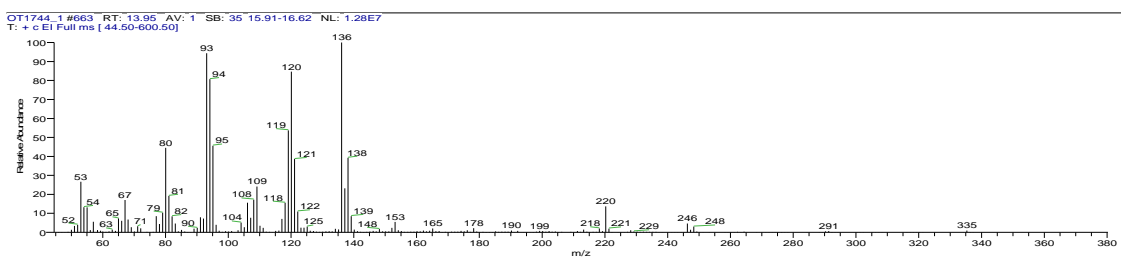
**Tabla 5.** Datos de curva patrón para senecionina y retrorsina

## 6.2 Gases Masas

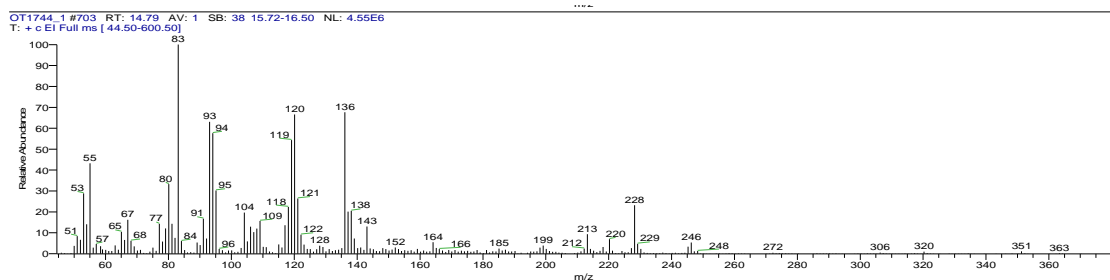
a)



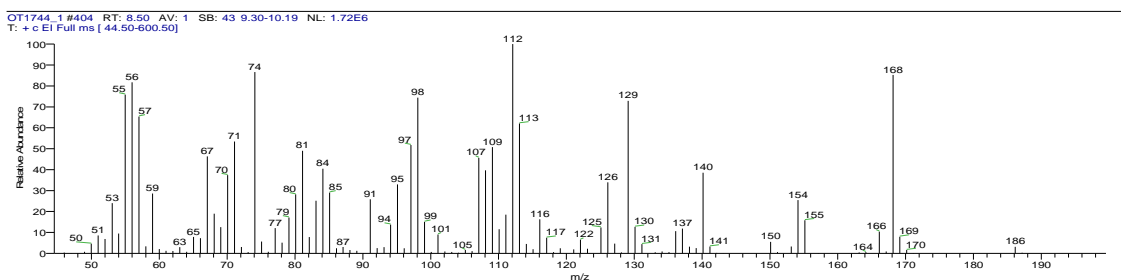
b)



c)

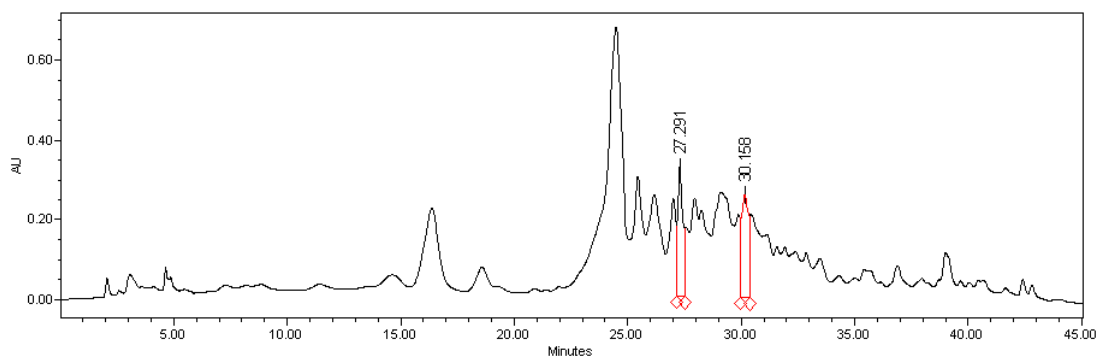


d)

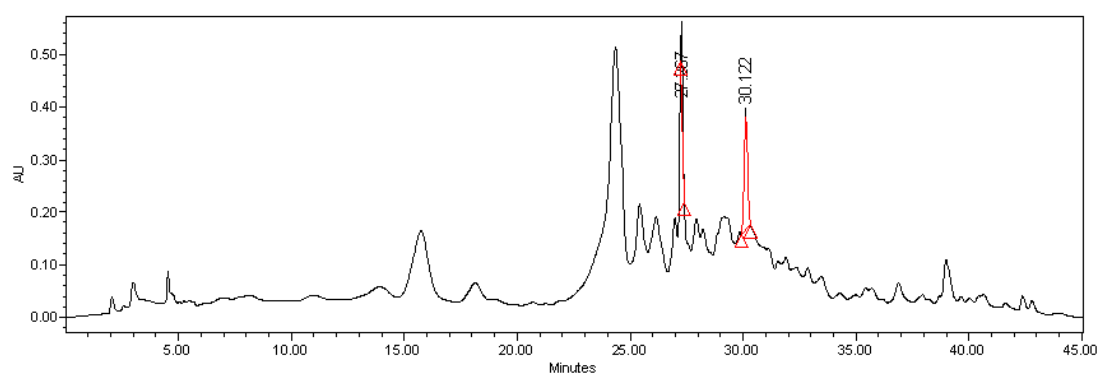


**Figura 13.** Espectro de masas representativo correspondiente a la muestra “Planta en flor de Campo Sánchez Bocoyna”. a) Espectro a un tiempo de retención de 0 a 20 min, b) tiempo de retención de 13.95 min, c) Tiempo de retención de 14.8 min d) Tiempo de retención de 8.5 min

a)



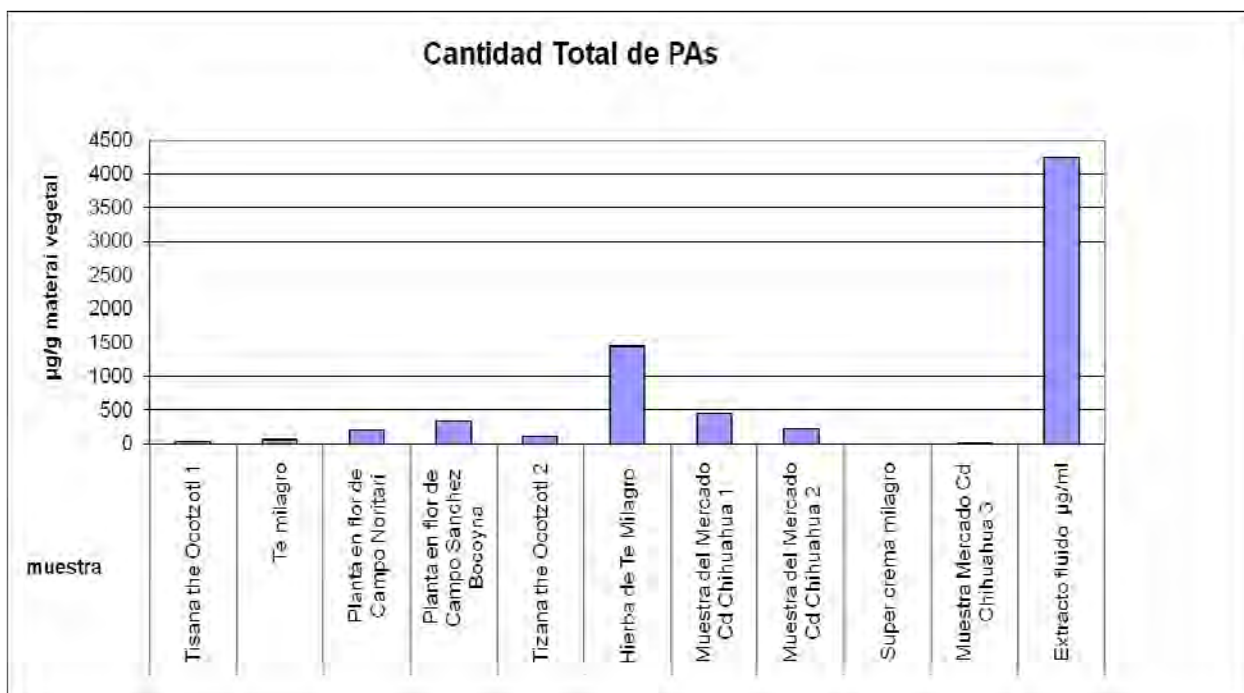
b)



**Figura 14.** Cromatogramas representativos de la cuantificación de PAs de la muestra “Hierba de Té Milagro”. En el inciso a) se muestra el cromatograma sin la adición de estándares, en el inciso b) se muestra el cromatograma con la adición de estándares



### 6.3 Resultados de la Cuantificación de PAs

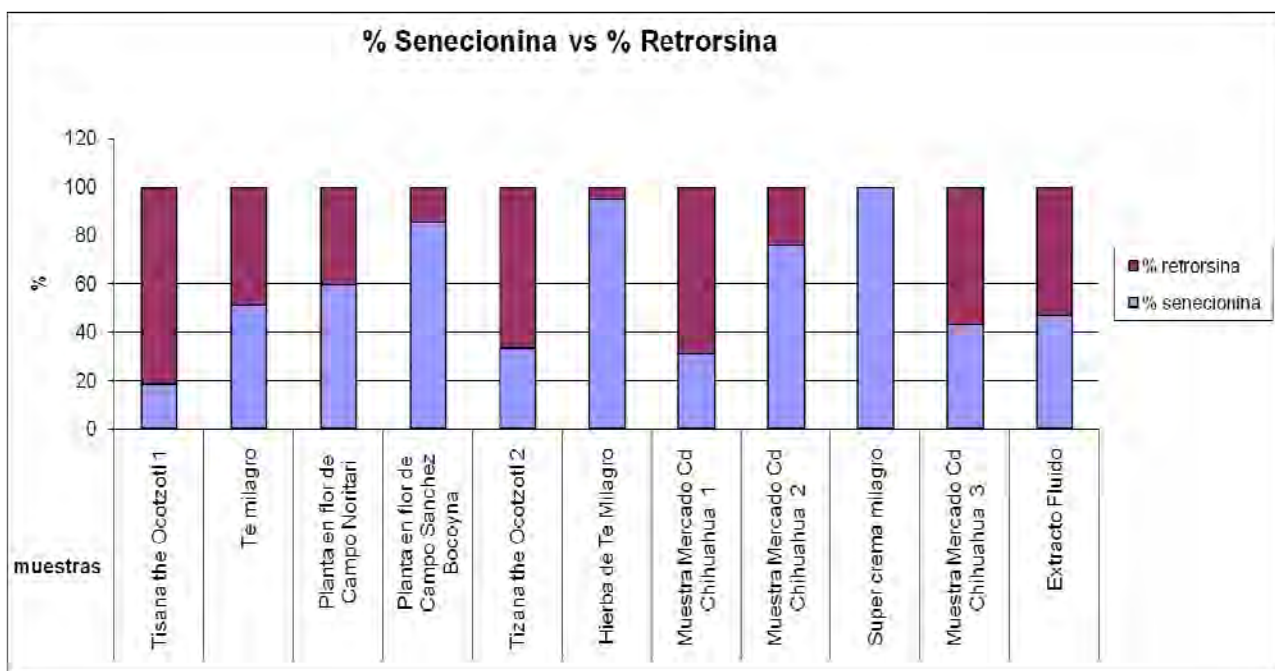


**Gráfica 1.** Cantidad total de PAs en las diferentes muestras

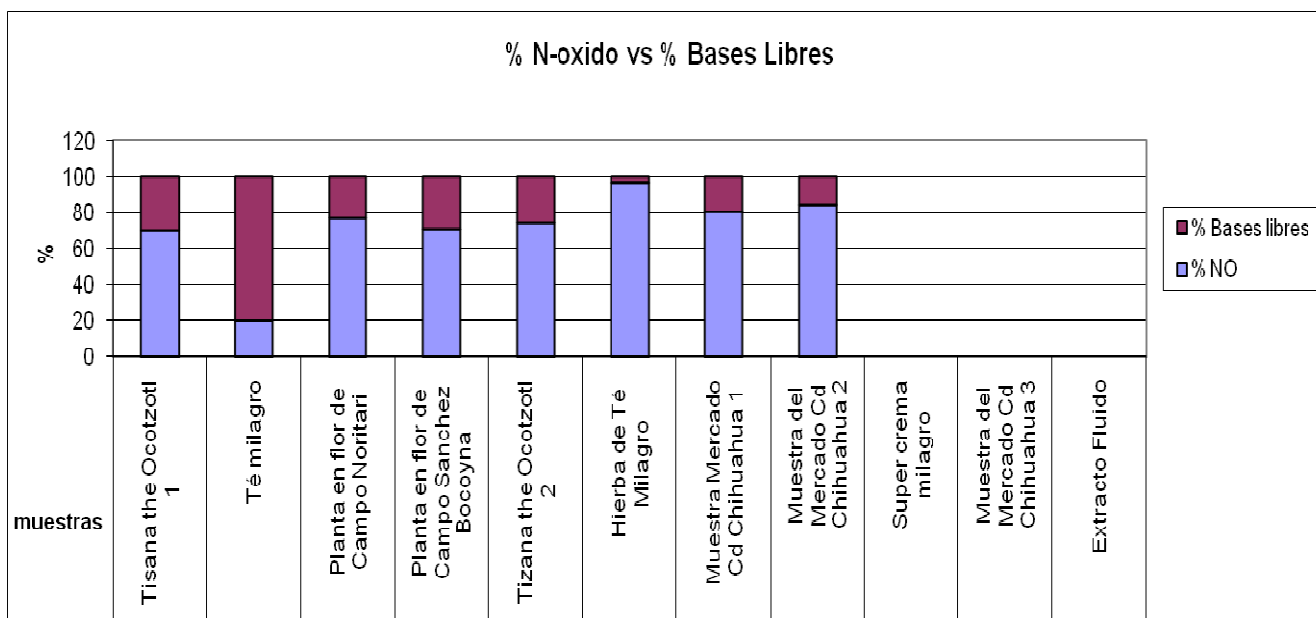
Cantidad Total de PAs

	Muestras	µg PAs /g material vegetal
1	Tisana the Ocotzotl 1	32.2+/- 1.08
2	Te milagro	46.1+/- 1.89
3	Planta en flor de Campo Noritari	207.9 +/- 4.68
4	Planta en flor de Campo Sanchez Bocoyna	334.6 +/- 3.0
5	Tizana the Ocotzotl 2	103.2 +/- 2.26
6	Hierba de Te Milagro	1449.9 +/- 36.81
7	Muestra Mercado Cd Chihuahua 1	449.6 +/- 17.66
8	Muestra Mercado Cd Chihuahua 2	225.8 +/- 4.89
9	Super Crema Milagro	0.047 +/- 0.0015 µg PAs /g de crema
10	Muestra Mercado Cd Chihuahua 3	15.5 +/- 0.01
11	Extracto Fluido	4245 +/- 63 µg /mL

**Tabla 6:** Cantidad total de PAs en las diferentes muestras



**Gráfica 2 .** Comparación entre las cantidades de senecionina y retrorsina en cada muestra.



**Gráfica 3 .** Comparación entre la cantidad de PAs en forma de N-óxidos y en forma de bases libres en cada muestra.

---

## 6 Discusión de Resultados

Al revisar el perfil cromatográfico de las muestras analizadas, se observó que efectivamente era difícil discriminar que picos correspondían a las pirrolizidinas que se buscaba cuantificar, por lo cual se optó por utilizar el método de coelución. Este método consiste en analizar la muestra del crudo alcaloideo por HPLC de la manera tradicional. Posterior a este análisis, se añaden a la muestra analizada las sustancias de referencia en una concentración conocida, que corresponden a las mismas sustancias que se busca cuantificar. Por ende, al realizar la cuantificación con las sustancias de referencia los picos correspondientes a la sustancia por cuantificar incrementan su área bajo la curva.

Una vez identificadas las pirrolizidinas por medio del método de coelución se utilizó la ecuación de la curva patrón de la tabla 11, para poder determinar las concentraciones de las pirrolizidinas. Al mismo tiempo mediante el método de coelución en todos los cromatogramas se identificó la presencia de un pico con un tiempo de retención alrededor de 15 minutos que corresponde al 4-hidroxifenilacetato (Facme).

En el análisis mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a la espectrometría de masas (EM; figura 11) los tiempos de retención para las referencias de senecionina y retrorsina fueron los siguientes:

14.00 minutos para la senecionina

14.84 minutos para la retrorsina

Por lo que se buscaron todos los picos cercanos a estos intervalos de tiempo y que produjeran el mismo patrón de fragmentación observado para las muestras de referencia. Los espectros de masas indicaron la presencia de los picos en valores de  $m/z$  351, 335 y 166 que corresponden a los iones moleculares de la retrorsina, la senecionina y el acetato de 4-hidroxifenilo en las muestras. El estudio de GC-EM corroboró la presencia de estas moléculas previamente identificados en los cromatogramas de líquidos mediante el método de coelución.

Una vez que se determinó la cantidad de pirrolizidinas presentes en cada muestra (gráfica1), fue fácil concluir sobre riesgo en el consumo de los remedios herbolarios a base del complejo de plantas medicinales conocido como té milagro. Como se describió en el capítulo de introducción de esta tesis de acuerdo a las evidencias toxicológicas se fijó un criterio de 1 microgramo de PAs como límite para el consumo diario máximo sin la generación de efectos tóxicos(Bekanntmachung, 1992).

El promedio de pirrolizidinas hepatotóxicas en las muestras analizadas es de 286 µg de PAs/g de material vegetal. La cantidad de pirrolizidinas presentes en un gramo de las muestras supera el límite de consumo de PAs para no desarrollar efectos tóxicos. En este estudio, se encuentran muestras que van desde valores mínimos de 0.01µg de PAs/g como la súper crema milagro y de 15.48 µg de PAs/g en una muestra comercial de planta seca proveniente del mercado de la ciudad de Chihuahua, hasta valores máximos de 4245 µg /mL se detectaron en la muestra del extracto fluido, 1440 µg de PAs/g en la muestra comercial yerba de té milagro, proveniente de Arambula, cd. Chihuahua y 449.65 µg de PAs/g en otra muestra proveniente del mercado de esta ciudad.

	Muestras	µg PAs /g material vegetal
1	Tisana the Ocotzotl 1	32.2+/- 1.08
2	Te milagro	46.1+/- 1.89
3	Planta en flor de Campo Noritari	207.9 +/- 4.68
4	Planta en flor de Campo Sanchez Bocoyna	334.6 +/- 3.0
5	Tizana the Ocotzotl 2	103.2 +/- 2.26
6	Hierba de Te Milagro	1449.9 +/- 36.81
7	Muestra Mercado Cd Chihuahua 1	449.6 +/- 17.66
8	Muestra Mercado Cd Chihuahua 2	225.8 +/- 4.89
9	Super Crema Milagro	0.047 +/- .0015 µg PAs /g de crema
10	Muestra Mercado Cd Chihuahua 3	15.5 +/- 0.01
11	Extracto Fluido	4245 +/- 63 µg /mL

**Tabla 6:** Cantidad total de PAs en las diferentes muestras

---

Esta gran desviación de los datos, que probablemente sea una consecuencia de variaciones estacionales, geográficas y ontogénica, se acentúa inclusive dentro de los lotes de un mismo producto comercial como el producido en el estado de Querétaro, la “Tisana the Ocotzotl”. Si se comparan los 2 lotes procesados de este producto, uno contiene 32 µg de PAs/g y el segundo 103.2 µg de PAs/g de material vegetal seco. Existe una diferencia significativa entre estas dos muestras. Estas diferencias observadas deriva de varias cuestiones como pueden ser las condiciones climáticas en donde se desarrolló la planta, los factores bióticos y abióticos involucrados, la época del año en que germinó y se recolectó el material para la elaboración de los remedios herbolarios. Todos estos parámetros representan un obstáculo para proponer un dato promedio de la cantidad de PAs presentes en las muestras. Sin embargo, los preparados herbolarios a excepción de la super crema milagro rebasan los límites establecidos para evitar la hepatotoxicidad crónica. Esta crema cumple los estándares más rigurosos a nivel global en cuanto al contenido de PAs, que dicta el Departamento de Salud de Alemania, el cual fija una dosis diaria no mayor a 100 µg de PAs en productos de aplicación tópica (Bekanntmachung, 1992).

Otro punto de análisis es la cantidad de senecionina con respecto a la retrorsina. (gráfica 2). En la introducción se mencionó que la senecionina es mas tóxica que la retrorsina. Al revisar los resultados, se aprecia una gran variabilidad entre los porcentajes de senecionina y retrorsina entre cada muestra y por ende no es posible determinar que compuesto se encuentra presente de forma general. Inclusive en diferentes productos de un mismo lote como es el caso de la muestra Tisana the Ocotzotl hay una gran variabilidad entre la relación retrorsina–senecionina.

Con respecto al cantidad de PAs en forma de N-óxidos o bases libres (gráfica 3) de forma general en todas las muestras con excepción de la del té, hay mayor predominio de N-óxidos. Aunque si bien los alcaloides en forma de N-óxidos también son moléculas tóxicas, estas presentan una menor absorción y, por lo tanto, en una menor biodisponibilidad de los PAs (Bah; Pereda-Miranda, 2003).

---

Por otro lado, haciendo una recapitulación y análisis de los alcaloides pirrolizidínicos y su interacción con el organismo, se puntualiza que la toxicidad y los efectos secundarios de las pirrolizidinas son extensos; los mecanismos de genotoxicidad van desde una simple formación de aductos con el ADN hasta la interferencia en los patrones de transcripción de cierto grupo de genes y células, modificando la función y expresión de receptores y en algunos casos, afectando el funcionamiento del sistema inmunológico. Las pirrolizidinas son moléculas que presentan una gran interacción con rutas bioquímicas, procesos genéticos e inmunológicos en el organismo y, de esta forma, se explica su rango de acción para tratar una gran serie de patologías que no están relacionadas (Mei, 2007).

---

## 8 Conclusiones

El propósito de esta tesis fue la cuantificación del contenido de alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos en los remedios herbolarios comercializados bajo el nombre de té milagro elaborados a partir de las plantas medicinales *Packera candidissima* y *Packera bellidifolia*.

Los resultados obtenidos de esta cuantificación indicaron que a las concentraciones encontradas existe un riesgo real en el consumo continuo de los productos herbolarios en estudio ya que pueden provocar el desarrollo de una serie de patologías entre las cuales la más recurrente es la cirrosis hepática.

Desafortunadamente, las personas no saben del peligro de consumir este remedio herbolario. Es responsabilidad de la Secretaria de Salud informar a la población sobre este riesgo y a su vez regular la comercialización de los productos que contengan pirrolizidinas hepatotóxicas.

Desde un punto de vista práctico enfocado a la detección de pirrolizidinas hepatotóxicas en muestras comerciales puede resultar un trabajo laborioso debido a la gran cantidad de moléculas presentes en las muestras y una baja concentración de PAs. En el presente trabajo se observó que la molécula 4-hidroxifenilacetato de metilo está presente en todas las muestras que contienen PAs, por lo que esta molécula puede ser un marcador y de esta manera puede usarse como método de identificación rápida.

En términos generales del consumo de productos herbolarios, la probabilidad de que otros productos presenten sustancias que generen una toxicidad crónica es probable, sin embargo existen pocos remedios herbolarios que generaran la misma o una mayor toxicidad que las PAs de los productos preparados con el té milagro.

El conocimiento empírico del uso de las plantas medicinales es un criterio importante para su evaluar inocuidad, de lo contrario, ya se hubiera levantado algunas sospechas. Aunque cabe resaltar que debido a los niveles

---

socioeconómicos de las personas que consumen este tipo de remedios herbolarios aunado a la baja calidad del sistema de salud público que impera en algunas regiones del país, parte de esta evidencia toxicológica en el consumo de remedios herbolarios puede permanecer oculta.

En el caso particular de la administración del té milagro como remedio herbolario para combatir la diabetes y las infecciones bacterianas, entre otras, resulta una pésima decisión teniendo en cuenta el espectro de medicamentos con los que se cuenta hoy en día para tratar estos males. Por lo cual los preparados comerciales con PAs deben ser retirados del mercado limitándose a los productos de aplicación tópica y que cumplan las normas descritas por las instituciones de salud correspondientes.

Aunque efectivamente las plantas que presentan algún contenido de pirrolizidinas representan un peligro para el hombre y algunos otros animales. La estructura química de esta pirrolizidinas así como su interacción con los diversos componentes celulares puede estudiarse profundamente para la síntesis de nuevas pirrolizidinas con actividades biológicas específicas en su acción y que no presenten toxicidad, para el desarrollo de una serie de nuevos medicamentos.





---

## 9. Bibliografía:

American Herbal Products Association. **(2006)** *Code of Ethics and Business Conduct*.

Bah, M., Bye, R., Pereda-Miranda, R. **(1994)** Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the Mexican medicinal plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae). *Journal of Ethnopharmacology* 43, 19-30.

Bah, M and Pereda- Miranda, R. **(2003)** Alcaloides pirrolizidínicos. En: Oliveira, C.M, Schenkel, Gosmann, G. Palazzo J.C., Auller, L. Petrovick, P.R.[eds.], *Farmacognosia de planta ao medicamento* Ed Da UFRGS/Ed. Da USC . Porto Alegre. Pp.847-868.

Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln BAnz **(1992)** Pharm. Ind. 54 (7), VII/177.

Buhler, D. R., Kedzierski, B **(1986)** The formation of 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxy-methyl-5H-pyrrolizine, a metabolite of pyrrolizidine alkaloids. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 197, 611-620.

Bye, R. **(1986)** Medicinal Plants of the Sierra Madre comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40, 103- 124.

---

Bye, R. **(1985)** Medicinal Plants of *the* Tarahumara Indians of Chihuahua, Mexico, in Tyson, Rose & Daniel Elerick, eds., *Two Mummies From Chihuahua, Mexico*, pp. 77-104, San Diego Museum Paper No. 19, San Diego: San Diego Museum of Man.

Castro, E. **(2007)** Determinacion del contenido de pirrolizidinas hepatotóxicas en el te milagro Tesis de Licenciatura UNAM.

Chan, P. C. **(1993)** NTP Technical Report on Toxicity Studies of Riddelliine *NIH Publication* 94-3350.

Culvenor C,C,J.**(1983)** Estimated intakes of pyrrolizidine alkaloids by humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 11: 625-635.

Dueker, S. R., Lame M. W., Morin, D., Wilson, D. W., Segall, H. J. **(1992)** Hydrolysis of pyrrolizidine alkaloids by guinea pig hepatic carboxylesterases *Toxicology and Applied Pharmacology* 117(1): 116-121.

Farnsworth, N.R. & Soejarto, D.D. **(1991)** *Global importance of medicinal plants. In The conservation of medicinal plants* (eds O. Akerele, V. Heywood & H. Synge), pp. 25-51. Cambridge University Press, Cambridge, UK

FDA (2001) FDA Advises dietary supplement manufacturers to remove comfrey products from the market. *USFDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition*. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/dspltr06.html>

---

Freeman, C.C. **(1985)** *A revisión of the Aureoid species of Senecio (Asteraceae: Senecioneae) in Mexico, with a cytogeographic and phylogenetic interpretation of the Aureoid complex.* Doctoral dissertation. Division of Biology, Kansas State University, USA.

Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, V., Wurgler, F.E., Schlatter, C. **(1992)** Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions* 83, 1-22

Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W. **(2004)** Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews* 36, 1–55.

Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W. **(2002)** Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids—Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity. *International Journal of Molecular Sciences* 3(9): 948-964.

Hartmann, T., Ober, D. **(2000)** Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *In* FJ Leeper, JC Vederas, eds, *Topics in Current Chemistry* 209, 207–244.

Hersch-Martinez, P. **(1997)** Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservation challenge. *Economic Botany* 51(1): 107-120.

---

Hincks, J.R., Kim, H-Y., Segall, H.J., Molyneux, R.J., Stermitz, F.R., Coulombe, R.A. **(1991)** DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology* 111, 90-98.

Huxtable, R.J. **(1990)** Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmacology & Therapeutics* 47, 371-389.

Kedzierski, B., Buhler, D.R. **(1985)** Configuration of necine pyrroles--toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology. Letters* 25, 115-119.

Kedzierski, B., Buhler, D.R. **(1986)** The **formation** of 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxy-methyl-5Hpyrrolizine, a metabolite of pyrrolizidine alkaloids. *Chemico-Biological Interactions* 57, 217-222.

Laird, S. **(1999)** The commercial use of biodiversity. *The botanical medicine industry*. In ten Kate K, Laird SA, eds 78–116.

Lin, G., Cui, YY., Hawes, E.M. **(1998)** Microsomal Formation of a Pyrrolic Alcohol Glutathione Conjugate of Clivorine. Firm Evidence for the Formation of a Pyrrolic Metabolite of an Otonecine-Type Pyrrolizidine Alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 181-184.

Lin, G., Cui, YY., Hawes, E.M. **(2000)** Characterization of Rat Liver Microsomal Metabolites of Clivorine, an Hepatotoxic Otonecine-Type Pyrrolizidine Alkaloid *Drug Metabolism and Disposition* 28, 1475-1483.

---

Mattocks, A.R. (1986). *Chemical properties of pyrrolizidine alkaloids and their dehydro-derivatives*. In: Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids, AR Mattocks (ed). Academic Press, London, pp. 130-157.

Mei, N., Guo, L., Liu, R., Fuscoe, J.C., Chen, T. (2007) Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats *BMC Bioinformatics* 8(7): S4.

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. Academic Press, London, UK. Pp. 799-830.

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.

Romo de Vivar et al (2007) Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae). *Journal of Mexican Chemical Society* 51(3): 160-172.

Segall, H. J., Wilson, D. W., Dallas, J. L., Haddon, W. F. (1985) Trans-4-Hydroxy-2-hexenal: a reactive metabolite from the macrocyclic pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Science* 229(4712): 472-475.

Weber, W.A. y Löve (1981) New Combinations in the Genus *Packera* (Asteraceae). *Phytologia* 45, 44-50.

---

White, I.N.H. (1976) The role of liver glutathione in the acute toxicity of retrorsine to rats. *Chemico-Biological Interactions* 13, 333-342.

WHO (1998) Environmental Health Criteria, Pyrrolizidine alkaloids. 80. Geneva.

Yan CC and Huxtable RJ (1995) Relationship between glutathione concentration and metabolism of pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 130, 132-139.

Zhang, F., Sjöholm, K., Zhang, Q. (2007) Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor binding protein-1 in pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362(1): 152-157.