



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS.**

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES
SESQUITERPÉNICOS MAYORITARIOS DEL TÉ MILAGRO ”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ.



Tutor: Dr. Rogelio Pereda Miranda

Año: 2008.



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	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Secretario	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
1er. Suplente	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
2do. Suplente	Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Gabriela Figueroa González

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de Agosto del 2006 – Agosto del 2008 y por el apoyo económico brindado a través del proyecto 45861-Q.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN 208307-3) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- Al M. en C. Atilano Gutiérrez de la Universidad Autónoma Metropolitana por la determinación de los espectros de RMN.
- Al Dr Carlos Martín Cerda Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por el registro de las rotaciones ópticas, cromatogramas de gases y espectros de masas.
- A la M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química y al personal del Instituto de Química por el registro de los espectros de masas.
- A los Miembros del jurado por sus observaciones y disposición que me permitieron corregir y dar forma a esta tesis.
- Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su gran apoyo, atenciones, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de la presente tesis.
- A la Dra. Mabel Fragosó Serrano por su apoyo, confianza, sugerencias y buena disposición en la realización de esta investigación.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por ser mi segundo hogar, por mi formación profesional y a quién debo gran parte de lo que soy.



A mis padres, hermano, abuelitos, demás familia y amigos por siempre estar conmigo, por su amor y apoyo incondicional, por hacerme sonreír en los momentos más difíciles...

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE CUADROS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Características de la Familia Asteraceae.....	5
3.2. Tribu Senecioneae	7
3.3. Perfil Químico del Género <i>Senecio</i>	8
3.4. Género <i>Packera</i>	10
3.5. Generalidades sobre <i>Packera bellidifolia</i> (Kunth) (WA Weber & A Love) y <i>Packera candidissima</i>	13
3.6. Sesquiterpenos	15
3.6.1. Biogénesis de Sesquiterpenos	17

4. PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1. Materiales y Métodos	21
4.1.1. Material Vegetal.....	21
4.1.2. Disolventes Utilizados.....	21
4.1.3. Métodos Espectroscópicos	21
4.1.3.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas	21
4.1.3.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	21
4.1.3.3. Rotación Óptica	21
4.1.4. Técnicas Analíticas	22
4.1.4.1. Cromatografía en Capa fina.....	22
4.1.4.2. Cromatografía en Columna Abierta.....	23
4.1.4.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	23
4.2. Diseño Experimental	24
4.2.1. Extracción y Purificación de los Constituyentes Mayoritarios de las Partes Aéreas de <i>Packera bellidifolia</i>	24
4.2.1.1. Extracción	24
4.2.1.2. Análisis del Extracto Hexánico.....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1. Separación y Purificación del Compuesto Mayoritario de la Fracción Pcr del Extracto Hexánico	30

5.2. Separación y Purificación de los Compuestos Mayoritarios de las Fracciones R8 y R10 del Extracto Hexánico.	31
5.2.1. Fracción R8	32
5.2.2. Fracción R10	34
5.4. Elucidación Estructural de los Compuestos Aislados	37
5.4.1. Compuesto I (Neoadenostilona).....	37
5.4.2. Compuesto II (10 β -hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona)	41
5.4.4. Compuesto III (2 β -hidroxineoadenostilona).....	49
6. CONCLUSIONES	60
7. REFERENCIAS	61

Lista de Figuras

Figura 1. Esqueletos básicos de sesquiterpenos tipo eremofilano, furanoeremofilano y lactona sesquiterpénica característicos de la tribu Senecioneae.	9
Figura 2. Acilos alifáticos presentes en sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae.	10
Figura 3. Sesquiterpenos aislados de <i>Packera toluccana</i> (<i>Senecio toluccanus</i> DC. var. <i>modestus</i>).	11
Figura 4. Furanoeremofilanos aislados de <i>Packera candidissima</i> y <i>Packera bellidifolia</i>	11
Figura 5. Alcaloides pirrolizidínicos identificados en <i>Packera candidissima</i>	12
Figura 6. Constituyentes químicos identificados de <i>Packera coahuilenses</i>	13
Figura 7. <i>Packera bellidifolia</i> (H.B.K.) Weber & Love.	14
Figura 8. Distribución de <i>Packera bellidifolia</i> en México. (Fuente: Missouri Botanical Garden).	15
Figura 9. Rutas biosintéticas para la generación de las unidades IPP y DMAPP (Lixin,2005).	17
Figura 10. Biosíntesis de terpenos, ruta acetato-mevalonato.	20
Figura 11. Perfil cromatográfico del extracto hexánico I.	28
Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto hexánico II.	29
Figura 13. Perfil cromatográfico del extracto hexánico III.	29
Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto hexánico IV.	30
Figura 15. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de neoadenostilona.	31
Figura 16. Cromatoplasmas de las fracciones combinadas a) R8 y b) R10 de la Columna II.	32
Figura 17. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R8.	33
Figura 18. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de R8b.	33
Figura 19. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R10.	34
Figura 20. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R10-5.	35
Figura 21. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de R10-5.3.	35
Figura 22. Espectro de masas de la neoadenostilona.	37

Figura 23. Región de campo alto en RMN- ¹ H para la neoadenostilona	38
Figura 24. Región de campo bajo en RMN- ¹ H para la neoadenostilona.....	39
Figura 25. Espectro de RMN- ¹³ C de la neoadenostilona.	39
Figura 26. Cromatograma de gases del compuesto II (10β-hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona).....	41
Figura 27. Espectro de masas por IE-CG del compuesto II.	42
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto II.	43
Figura 29. Espectro HSQC del compuesto II.	43
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto II.	44
Figura 31. Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto II.	45
Figura 32. Expansión en campo alto del espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamiento ¹ H- ¹³ C a larga distancia (^{2,3,4} J) del compuesto II.....	46
Figura 33. Expansión en campo bajo del espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamiento ¹ H- ¹³ C a larga distancia (^{2,3,4} J) del compuesto II.....	47
Figura 34. Acoplamiento a larga distancia observados en el compuesto II.....	48
Figura 35. Cromatograma de gases del compuesto III (2β-hidroxineoadenostilona).	49
Figura 36. Espectro de masas por ID-IQ del compuesto III.....	50
Figura 37. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto III.	51
Figura 38. Espectro HSQC que permitió observar la correspondencia de protones y carbonos del compuesto III.	51
Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto III.	53
Figura 40. Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto II	54
Figura 41. Espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamiento ¹ H- ¹³ C a larga distancia (^{2,3,4} J) del compuesto III.	55
Figura 42. Acoplamiento a larga distancia observados en el compuesto III	58

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de la familia Asteraceae.	6
Cuadro 2. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de <i>Packera bellidifolia</i> (Columna I).	25
Cuadro 3. Fraccionamiento por cromatografía en columna de la subfracción Pcv-w proveniente de la columna I.	26
Cuadro 4. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C de la neoadenostilona.	40
Cuadro 5. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto II.	48
Cuadro 6. Acoplamientos a larga distancia observados en el compuesto III.	57
Cuadro 7. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto III.	58

Lista de Abreviaturas

AP	Alcaloides Pirrolizidínicos
ATP	Trifosfato de Adenosina
c	Cuarteto
cc	Cuarteto de Cuartetos
CD₃OD	Metanol Deuterado
CDCl₃	Cloroformo Deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
CH₂Cl₂	Cloruro de Metileno
CH₃CN	Acetonitrilo
CH₃OH	Metanol
CHCl₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
d	doblete
dc	Doble de cuádruple
ddd	Doble de doble de doble
DIP	Direct Insertion Probe
DMAPP	Pirofosfato de Dimetilalilo
eV	Electrón Volts
FPP	Pirofosfato de Farnesilo
GPP	Pirofosfato de Geranilo
H₂O	Agua
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy
IPP	Pirofosfato de Isopentenilo
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
m/z	Relación Masa-Carga

MHz	Megahertz
MVA	Ácido Mevalónico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenín Dinucleótido
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Singulete
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UMA	Unidad de Masa Atómica
UV	Ultravioleta

1. Introducción

En el centro y sur de México, el uso de las plantas medicinales está ligado al desarrollo de las culturas mesoamericanas más importantes y en dichas regiones abundan las fuentes autóctonas para el conocimiento de su botánica medicinal como pictografías, códices, libros sagrados, pinturas murales, esculturas, etc.

El registro escrito más antiguo sobre plantas medicinales, mal llamado “*Códice Badiano*”, es el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Opúsculo Acerca de las Hierbas Medicinales de los Indios), dictado en Náhuatl en 1552 por el médico indígena Martín de la Cruz de Tlatelolco, traducido y escrito al latín por otro indígena xochimilca, Juan Badiano. Esta obra contiene 185 ilustraciones a color de las plantas y menciona el uso de 270 especies vegetales (Emmart, 1940). De igual forma, en el siglo XVI el monje franciscano Fray Bernardino de Sahagún escribió su obra “*Historia General de las Cosas de la Nueva España*”, también conocida como el *Códice Florentino*; este texto fue escrito en español y náhuatl y contiene información sobre aproximadamente 250 plantas medicinales, acompañado por numerosas ilustraciones delineadas y coloridas.

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

gente especializada como son los botánicos, químicos y farmacólogos, entre otros (Hostettmann, 1995).

Con la enorme expansión del uso de la medicina tradicional, principalmente en los países en vías de desarrollo, la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de los medicamentos herbolarios y de los tratamientos basados en procedimientos tradicionales han despertado un gran interés en las autoridades sanitarias y el público consumidor. Se 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 fitorremedios así como de métodos analíticos apropiados para la evaluación de su calidad (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

La preocupación por los altos costos de la atención médica especializada y la complejidad en el acceso a los servicios de salud ha incitado a que las instituciones responsables impulsen el estudio y la aplicación de los elementos de la medicina tradicional que pudieran tener utilidad terapéutica. Sin embargo, cabe resaltar que existe aún gran diferencia en cuanto al uso apropiado de la terapéutica moderna, ya que ésta, en muchos casos, simboliza la diferencia entre la enfermedad, la salud o la muerte, dependiendo del uso o abuso que se tenga de ella.

Desgraciadamente, no todas las plantas consumidas con fines terapéuticos o alimenticios son benéficas ya que se ha visto que muchas plantas son tóxicas. En algunas especies de las familias Asteraceae, Boraginaceae y Leguminoseae se atribuye principalmente este efecto a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (AP), dichas especies se siguen utilizando en la

medicina tradicional debido a su actividad analgésica a pesar de los efectos secundarios adversos a largo plazo que éstos producen como mutagénicos, citotóxicos, carcinogénicos, entre otros (Bah, 1992). Debido a este tipo de acontecimientos, la OMS ha desarrollado una estrategia 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), además de destacar la necesidad de iniciar programas de identificación, evaluación, preparación, cultivo y conservación de las plantas utilizadas en la medicina tradicional. De esta forma, la medicina tradicional ha adquirido un auge considerable, desde los consumidores habituales, en su mayoría la población rural, hasta la población urbana mundial (Cifuentes, 1990).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Contribuir al establecimiento del perfil químico del contenido metabólico de naturaleza sesquiterpénica de la especie *Packera bellidifolia* (H.B.K.) Weber & Love.

2.2. Objetivos Específicos

- Aislar y purificar mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia aquellos constituyentes mayoritarios del tipo furanoeremofilano presentes en el extracto hexánico de las partes aéreas de *Packera bellidifolia*.
- Elucidar la estructura de los constituyentes aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

3. Antecedentes

Debido al aumento en el uso y la comercialización de los productos herbolarios, se ha enfatizado la importancia de la denominada **fitoterapia** definida como la prevención y el tratamiento de las enfermedades humanas mediante el uso de partes o preparaciones de plantas. Es importante distinguir entre un **preparado fitofarmacéutico** y un **fitomedicamento** o **agente fitoterapéutico**; el primero es una preparación que se obtiene sometiendo la droga cruda a diversos tratamientos (extracción, fraccionamiento, purificación, etc.) dando como resultado extractos, aceites esenciales, tinturas o infusiones. Los **fitomedicamentos**, en cambio, son preparaciones estandarizadas de plantas que consisten en una mezcla compleja de una o más plantas usadas para el tratamiento de diversas enfermedades (Calixto, 2000; Gaedcke y Steinhoff, 2003; Barnes, 2003).

3.1. Características de la familia Asteraceae

Las especies pertenecientes a la familia Asteraceae generalmente son hierbas anuales o perennes, algunas especies son arbustos y raras veces son árboles pequeños. Tienen hojas principalmente alternas pero a menudo también opuestas o verticiladas, simples o compuestas, variadas en forma, tamaño y disposición (Cronquist, 1981; Bremer, 1994; Zumlefer, 1994).

La familia Asteraceae se subdivide en diversas tribus, las cuales tienen diferentes características químicas. Como se resume en el Cuadro 1, dentro de la clasificación de la familia Asteraceae (Compositae), la subfamilia Asteroideae comprende 10 tribus dentro de las cuales se encuentra la Senecioneae.

Cuadro 1. Clasificación de la familia Asteraceae.

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

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

Además de la importancia en la industria farmacéutica que tiene la familia Asteraceae, también se distingue su gran número de especies en México y su amplio contenido de metabolitos secundarios biodinámicos que son útiles en el tratamiento de malestares que han afectado a los habitantes de México, principalmente a la población rural (Heinrich, 1998).

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

3.2. Tribu Senecioneae

La tribu Senecioneae, que contiene alrededor de 3000 especies, es la más grande de las 13 tribus que comprende la familia Asteraceae (Romo de Vivar, 2007). Diversos estudios de géneros y especies pertenecientes a esta tribu han demostrado que se encuentran metabolitos secundarios completamente diferentes a los encontrados en otras tribus pertenecientes a la familia Asteraceae. En gran parte de estos estudios se ha visto que sintetizan alcaloides pirrolizidínicos, y sesquiterpenos de tipo furanoeremofilano, los cuales tienen estructuras básicas diversas. En algunos casos, estos últimos son sustituidos por sus precursores o en muchos casos otros tipos de sesquiterpenos son los que predominan (Bohlmann, 1979).

La relación del género *Packera* con la tribu Senecioneae no se encuentra bien establecida desde un punto de vista taxonómico. Bremer (1994) y Jeffrey, (1992) demostraron que los géneros *Packera* y *Senecio* no son idénticos, pero ambos autores reconocen tres subtribus: Blennospermatinae, Tussilaginatae y Senecioninae. Con base en su morfología, hay un acuerdo general de que el género *Packera* es un miembro de la subtribu Senecioninae. Sin embargo, su clasificación taxonómica aún no está bien definida. Jeffrey (1992) coloca a *Packera* en la subtribu Senecioninae y enfatiza su falta de relación con otros géneros (Bain, 2000).

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

3.3. Perfil químico del género *Senecio*

El género *Senecio* incluye alrededor de 1500 especies, las cuales se encuentran distribuidas en todo el mundo, sin embargo, la región Mesoamericana tiene un centro importante de diversificación (Romo de Vivar, 2007). Según Barkley (1996), en un estudio realizado de Senecioneae se reconocen 9 géneros y la mayoría de ellos segregados de *Senecio* como *Barkleyanthus*, *Packera*, *Pittocaulon*, *Psacalium*, *Pseudogynoxys*, *Robinsonecio*, *Roldana* y *Telanthophora*.

El género *Senecio* es considerado como venenoso debido a reportes de que algunas especies resultan tóxicas al ganado y a humanos. Esta toxicidad se le atribuye a los alcaloides pirrolizidínicos, los cuales junto con sesquiterpenos con un esqueleto de tipo eremofilano y furanoeremofilano, así como las lactonas sesquiterpénicas (**Figura 1**) constituyen un rasgo

quimiotaxonómico importante que caracteriza a este género. Es importante señalar que en la familia Asteraceae, aparte del género *Senecio*, sólo se han encontrado estos alcaloides pirrolizidínicos en cinco especies de la tribu Eupatorieae. En el año de 1986 (Morales et al., 1986), se aisló la senkirina (**Figura 5**) a partir de *Chersodoma jodopappa*, investigación que constituye la primera descripción de AP en este género.

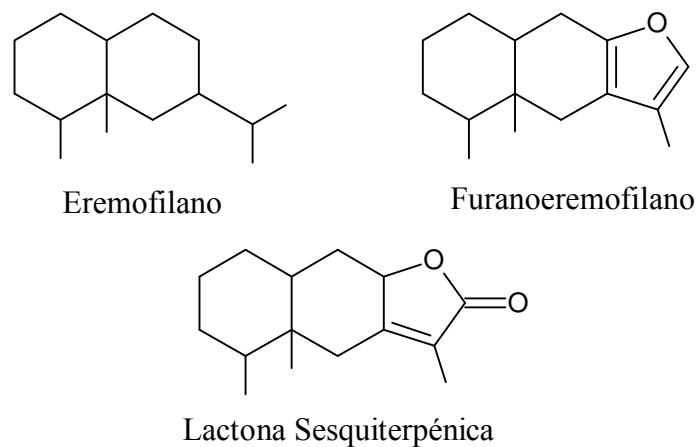


Figura 1. Esqueletos básicos de sesquiterpenos tipo eremofilano, furanoeremofilano y lactona sesquiterpénica característicos de la tribu Senecioneae.

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

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

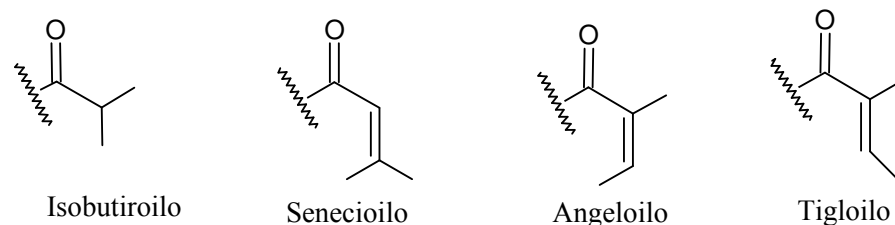


Figura 2. Principales acilos alifáticos u olefínicos presentes en sesquiterpenos aislados de la tribu Senecioneae.

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

3.4. Género *Packera*

Este pequeño grupo se encuentra estrechamente relacionado con el género *Senecio* que contiene especies anuales y perennes. Dentro del género *Packera* se ha aislado previamente una serie de compuestos como alcaloides pirrolizidínicos hepatotóxicos, eremofilanos y quinoles biodinámicos, considerándose a éstos últimos responsables de sus propiedades antitumorales (Pettit, 1980).

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

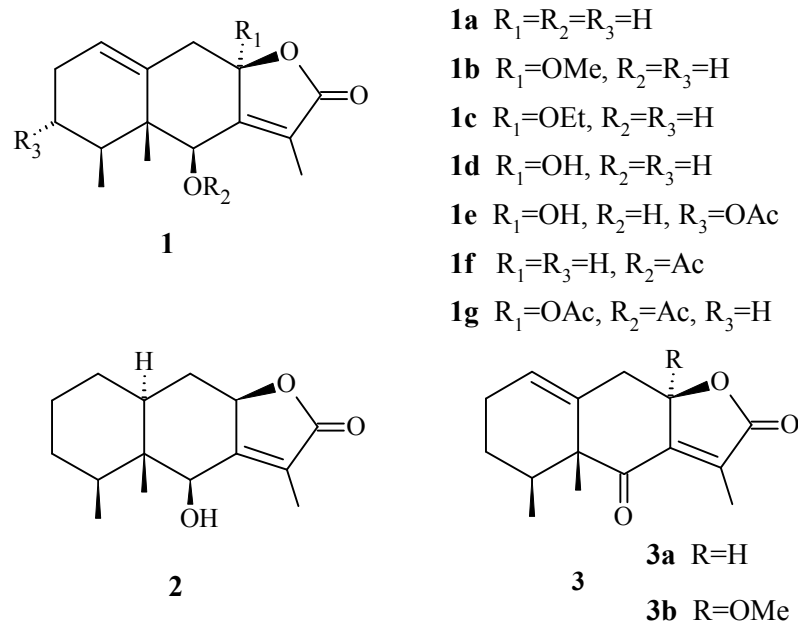


Figura 3. Sesquiterpenos aislados de *Packera toluccana* (*Senecio toluccanus* DC. var. *modestus*).

El estudio de las partes aéreas y de las raíces de *Packera candidissima* (Greene) Weber & Love, descrito por Bah (1992), permitió la obtención de una mezcla de dos furanoeremofilanos (**Figura 4**), mismos compuestos reportados para *Packera bellidifolia* (Figueroa, 2007).

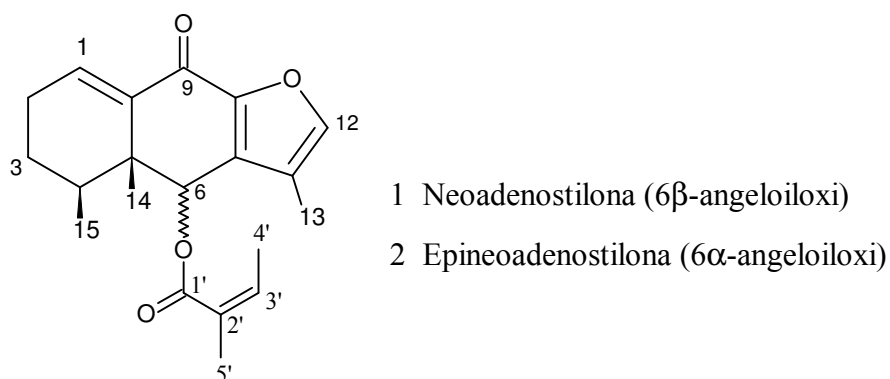


Figura 4. Furanoeremofilanos aislados de *Packera candidissima* y *P. bellidifolia*.

Además de los furanoeremofilanos encontrados en *P. candidissima*, también se identificaron 5 alcaloides pirrolizidínicos: senecionina, integerrimina, retrorsina y usaramina como

constituyentes mayoritarios, así como senkirkina, de los cuales sólo 2 alcaloides (retrorsina y senecionina) se identificaron en *Packera bellidifolia* (Castro, 2007).

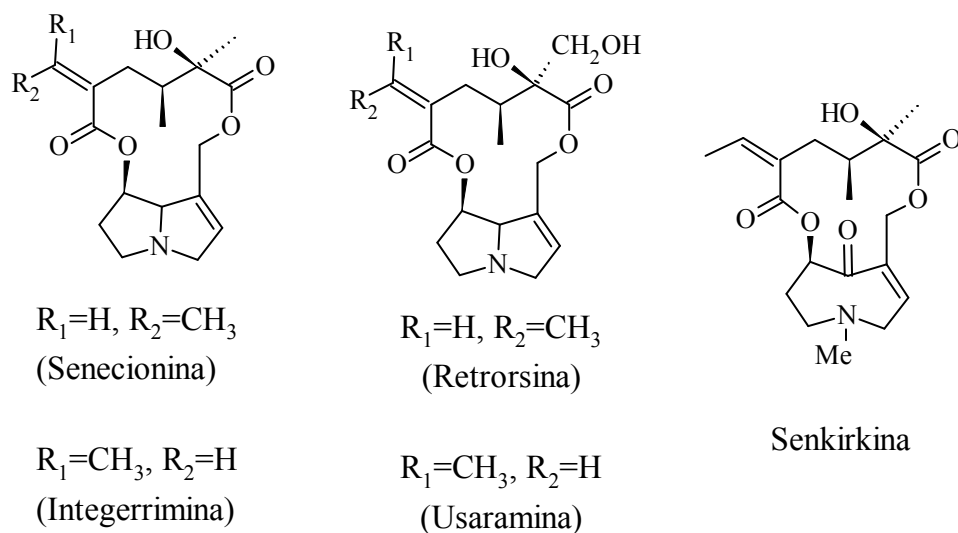


Figura 5. Alcaloides pirrolizidínicos identificados en *Packera candidissima*.

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

Otros de los compuestos que se identificaron en *Packera coahuilensis* y *Packera bellidifolia* son una ciclohexanona (**4**) y la jacaranona previamente aislados de *P. fendleri*, *P. clevelandii* y *P. anonima* (**Figura 6**).

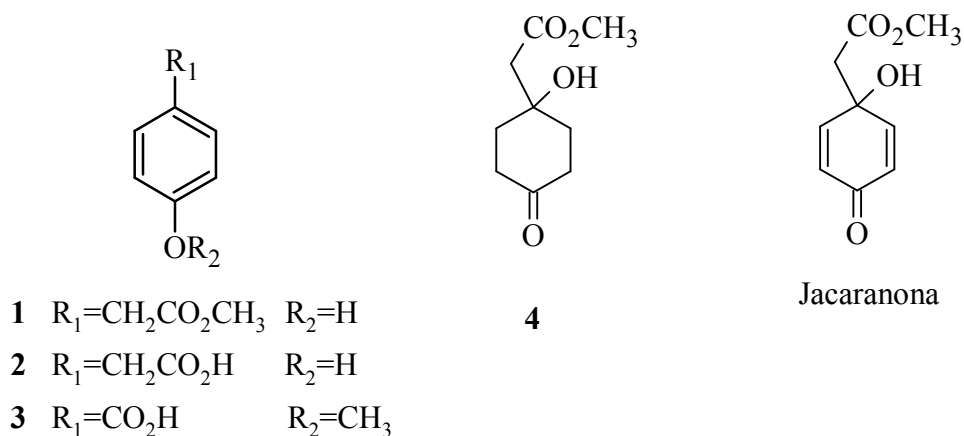


Figura 6. Constituyentes químicos identificados de *Packera coahuilenses*.

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

3.5. Generalidades sobre *Packera bellidifolia* (Kunth) (WA Weber y A Love) y *Packera candidissima*.

La planta completa de *Packera bellidifolia* (*Senecio bellidifolius* Kunth., *Senecio vulneraria* DC.) (Pérez-Castorena et al., 2001) tiene usos similares a los reportados para *Packera candidissima*, ya que se utiliza como té para males del riñón, como medicina general y para curar dolores, úlceras y malestares vaginales (Bye, 1986). La planta fresca también se mezcla con aceite de olivo y es aplicada como cataplasma para furúnculos, tumores e infecciones (Reis, 1973). Martínez (1989) reporta el uso de esta planta para lavar úlceras de la piel y para el tratamiento de la sífilis. Esta especie es la que se comercializa en el Distrito Federal con el

nombre del “té milagro” ya que la especie dominante en el norte del país es *Packera candidissima*.

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



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

Packera bellidifolia es una hierba perenne, crece silvestre en lugares templados y fríos, donde predomina el bosque de pino y encino. Dentro del territorio mexicano, calancapatle vegeta en el Valle de México, en los estados de México, Morelos y Durango principalmente (**Figura 8**) (Martínez, 1989). Es una planta herbácea de unos 15 cm de altura, con hojas radiales, alternas en la base y blanquizcas en la cara inferior debido a un tomento que las cubre; las flores se producen en cabezuelas sustentadas por un pedúnculo largo y son de color amarillo. La raíz es corta con largas hebras delgadas (Martínez, 1989).

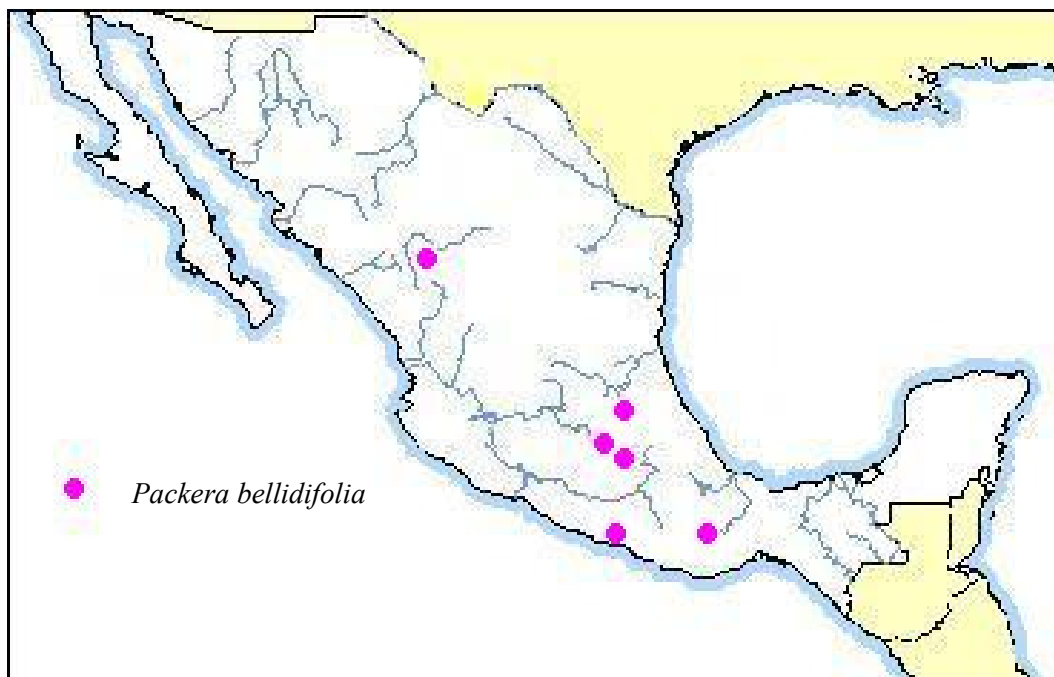


Figura 8. Distribución de *Packera bellidifolia* en México. (Fuente: Missouri Botanical Garden).

3.6. Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son metabolitos secundarios derivados del pirofosfato de farnesilo y, por lo tanto, contienen tres unidades del isopreno, es decir 15 átomos de carbono. Los sesquiterpenos pueden encontrarse en una diversidad de plantas, hongos, microorganismos e insectos.

Algunos de los compuestos tienen funciones indispensables desde el punto de vista farmacológico ya que pueden tener actividad antitumoral, antimigrañosa, antiinflamatoria y antihelmítica, entre otras (Heinrich, 1998).

Desde el punto de vista químico, la diversidad estructural de esta clase de compuestos ha generado un gran interés para la búsqueda de nuevas fuentes de sesquiterpenos biodinámicos de origen vegetal. También se han enfocado numerosos esfuerzos destinados a la elucidación estructural de sustancias novedosas, la síntesis, la biosíntesis y, principalmente, a los estudios relacionados con la exploración de su potencial biológico y farmacológico (Lixin, 2005).

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

Un grupo importante de este tipo de compuestos químicos que se ha descrito para la familia Asteraceae son las lactonas sesquiterpénicas, a las cuales se les atribuye un sabor amargo y picante. Su toxicidad es elevada y actúan como alérgenos (Wagner, 1971). Algunas de las propiedades que se han reportado para este grupo de sesquiterpenos farmacológicamente activos, son entre otras, efectos antiinflamatorios mediados por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, actividad antitumoral, antiulcerosa y cardiotónica; se han demostrado que

algunas de ellas son de utilidad para el tratamiento de dolores asociados con la artritis y los dolores de cabeza muy intensos, e.g. la partenólida (Heinrich, 1998).

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

3.6.1. Biogénesis de Sesquiterpenos

Los terpenoides muestran una gran diversidad estructural y química, sus esqueletos son sintetizados a partir de sólo dos moléculas de cinco átomos de carbono: pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero altamente electrofílico, pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Hay dos rutas conocidas para la biosíntesis de estos dos precursores universales (Lixin, 2005), la ruta mevalónica y la que involucra a la 1-desoxi-D-xilulosa fosfato (**Figura 9**).

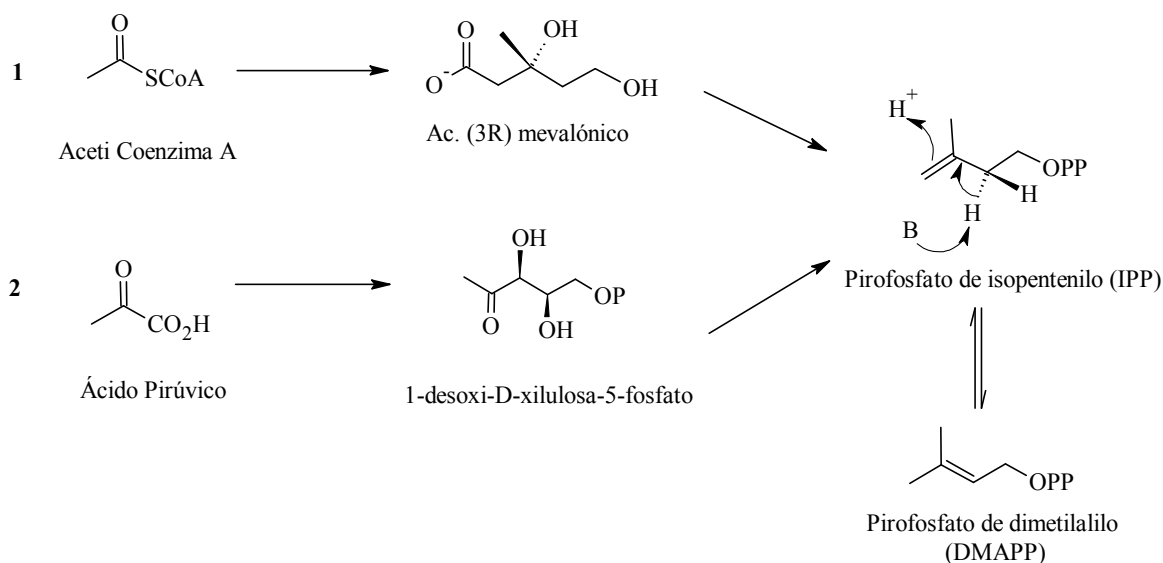


Figura 9. Rutas biosintéticas para la generación de las unidades IPP y DMAPP (Lixin, 2005).

Los sesquiterpenos se originan mediante la ruta del acetato-mevalonato y se biosintetizan a partir de unidades de cinco átomos de carbono (unidad isopreno) y esta última a su vez se forma al condensarse dos moléculas de acetil coenzima A (Acetil CoA) involucrándose la enzima acetil coenzima A tiolasa, generando así una estructura de 4 átomos de carbono. Dicha estructura, reacciona después con una molécula más de Acetil CoA con lo que genera, gracias a la intervención de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintasa (HMG-CoA), la unidad isopreno antes mencionada. Esta molécula vía tioacetal, es reducida después a una molécula de ácido mevalónico (MVA). La enzima HMG-CoA reductasa cataliza la reducción de NADPH-dependiente como resultado de la conversión de HMG-CoA a MVA, además de ser considerada como la enzima clave en la vía acetato mevalonato (Bruneton, 1999; Knôs, 1998).

El estereoisómero *R* del ácido mevalónico (3*R*-MVA) es el que participa en la biosíntesis del isopreno. Este estereoisómero es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para formar el pirofosfato de isopentenilo (IPP), el cual se isomeriza gracias a la adición y eliminación de un protón generando así el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y originando un equilibrio. El DMAPP es altamente reactivo ya que genera una especie electrofílica estabilizada por resonancia que es susceptible a un ataque nucleofílico en C1, con la salida simultánea de un grupo pirofosfato. El ataque puede ser por IPP o por otra molécula reactiva nucleofílica (Bruneton, 1999).

Durante la biosíntesis, la unidad de isopreno activa (IPP) se añade al DMAPP o al prenil pirofosfato en una secuencia de condensaciones cabeza-cola catalizadas por las

preniltransferasas, generando así al pirofosfato de geranilo (GPP), como precursor de los monoterpenos. Por último, la unión de una molécula de GPP y una molécula de IPP da origen a la formación de una nueva estructura de 15 átomos de carbono y que constituye el precursor biogénico de los sesquiterpenos (pirofosfato de farnesilo FPP) (**Figura 10**), (Bruneton, 1999; Lixin, 2005).

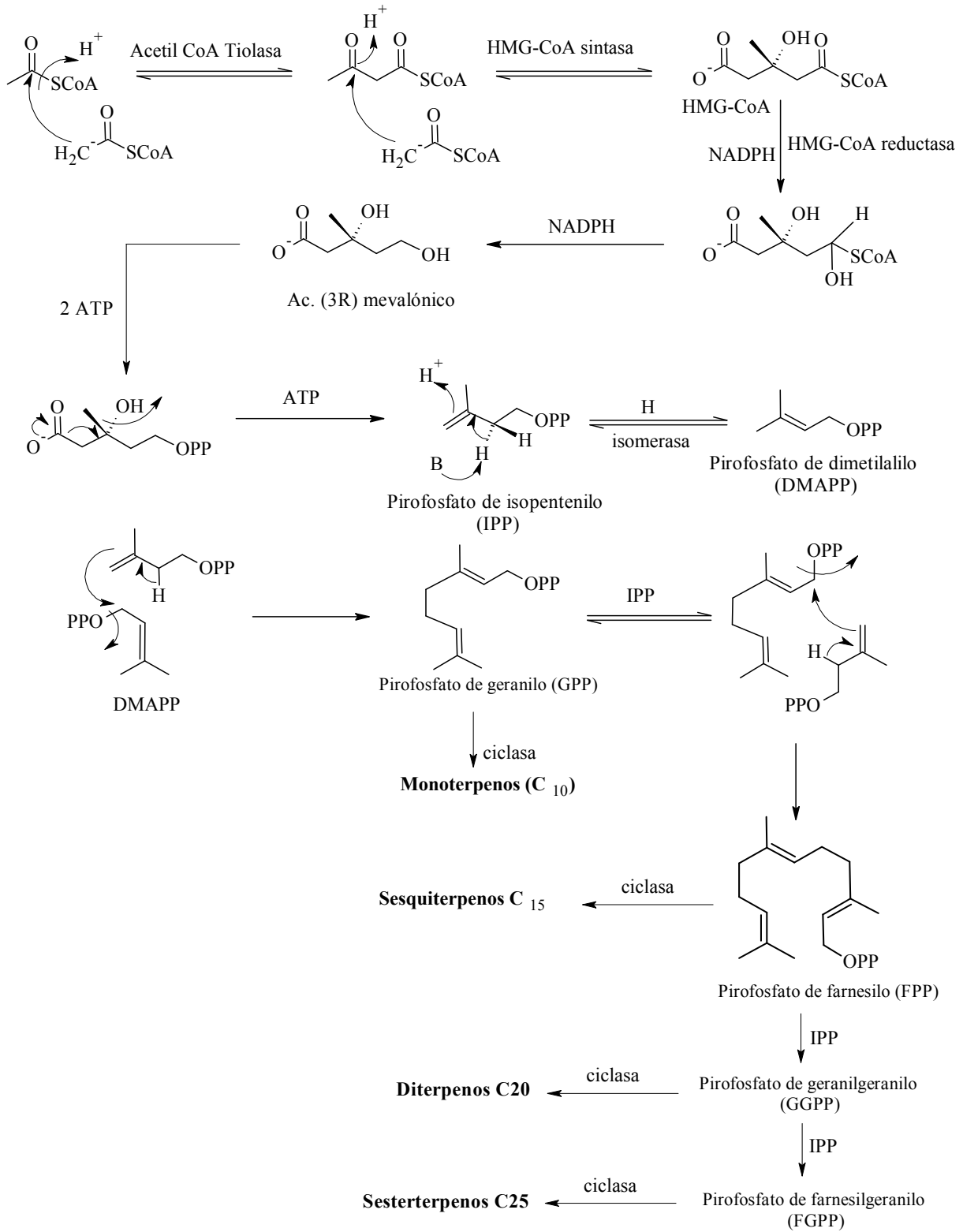


Figura 10. Biosíntesis de terpenos, ruta Acetato-Mevalonato.

4. Parte Experimental

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Material Vegetal

Se compraron cuatro lotes de las partes aéreas de *Packera bellidifolia* bajo la denominación de “té milagro”, los días 7 de Junio de 2004, 6 y 13 de octubre de 2005 en el expendio de plantas medicinales “La Magnolia” ubicado en Guatemala No. 6, Col. Centro, México, D.F.

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

4.1.2. Disolventes Utilizados

Se utilizaron disolventes grado químicamente puro para los procesos de extracción y fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta y grado reactivo analítico, previa destilación y filtración para todos los procedimientos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

4.1.3. Métodos Espectroscópicos

4.1.3.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Jeol, modelo AX505HA, tipo: doble sector, geometría inversa. El análisis por ionización química se realizó con una temperatura de ionización y línea de transferencia de 319.5 °C, con un rango de masas de 65.49 a 794.51 UMA, utilizando como estándar de calibración el perfluoro de queroseno, con introducción

directa de la muestra a 70 eV con una sonda de calentamiento DIP a una velocidad de calentamiento de la sonda de 16 °C/min.

Los cromatogramas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases Varian Saturn 2000, con una columna VF-1ms de Varian, cuyas dimensiones son: 30 metros de longitud, 0.39 mm de diámetro interno. Se utilizó como gas acarreador helio de alta pureza. Se empleó una rampa de calentamiento de 70°C a 250°C con una velocidad lineal de 30 °C/min

4.1.3.2. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H), de carbono-13 (RMN-¹³C) y bidimensionales COSY, HSQC y HMBC fueron registrados en un equipo Varian *Unity-Inova*, a 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C y un equipo Bruker DMX-500 operando a una frecuencia de 500 MHz en ¹H y 125 MHz en ¹³C en CDCl₃, los desplazamientos químicos se designaron en partes por millón (ppm) y están referidos al tetrametilsilano (TMS).

4.1.3.3. Rotación Óptica

Los valores de rotación óptica se obtuvieron en un Polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando como disolvente cloruro de metileno (CH₂Cl₂).

4.1.4. Técnicas Analíticas

4.1.4.1. Cromatografía en Capa Fina

Para el monitoreo de las fracciones de interés en la cromatografía en columna, se utilizaron cromatoplacas de aluminio cubiertas de gel de sílice 60-F₂₅₄ (Merck).

4.1.4.2. Cromatografía en Columna Abierta

La columna abierta I se empacó con 603 g de gel de sílice 60 Merck y un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, mientras que la segunda columna se empacó con 165 g de gel de sílice 60 Merck, con tamaño de partícula y 0.040-0.063 mm.

4.1.4.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La purificación de los constituyentes mayoritarios de los extractos hexánicos de *Packeria bellidifolia* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizó empleando las siguientes columnas:

Columna analítica de fase reversa C-18 (4.6×300 mm, 5 μ m).

Columna preparativa de fase reversa C-18 (19×300 mm, 7 μ m).

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para la purificación de PCr-9 y R10-5.3 se llevó a cabo en un equipo Waters, utilizando un detector de arreglo de diodos, modelo 996, mientras que la purificación de R8b se realizó con una bomba (Waters 600 controller) y un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), un refractómetro diferencial Waters 410 e integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell).

El control de los equipos, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hicieron a través del software Empower 2 (Waters).

4.2. Diseño Experimental

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

4.2.1.1. Extracción

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

Por comparación cromatográfica (**Figura 11 a 14**, ver sección 5) se observó que los extractos de cada lote mostraron el mismo comportamiento, por lo cual se tomó la decisión de reunir los extractos hexánicos de los 4 lotes y de esta forma, se obtuvieron 67.37g de extracto hexánico.

4.2.1.2. Análisis del extracto hexánico

El extracto hexánico (67.37 g) se fraccionó en una columna abierta (Columna I). La elución se comenzó con hexano y se aumentó la polaridad con cloroformo y acetona como se indica en el **Cuadro 2**. Se recolectaron 263 eluatos de 125 mL cada uno, de los cuales se realizó un monitoreo de su comportamiento por cromatografía en capa fina y se decidió reunirlos en un total de 20 fracciones combinadas.

Cuadro 2. Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de *Packera bellidifolia* (Columna I).

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

** Fracción purificada por CLAE

La subfracción combinada 132–198, denominada con la clave Pcr (21.52 g), se purificó por medio de CLAE, las condiciones óptimas de separación CH₃CN:H₂O (75:25) se determinaron utilizando una columna analítica y se realizó el escalamiento a nivel preparativo (40 mg/500

μL). Posteriormente se registraron sus espectros de RMN de ¹H y de ¹³C y también se analizó por CG-EM.

Los 7.13 g obtenidos de la subfracción Pcv-w provenientes de la columna I se sometieron a un segundo fraccionamiento (Columna II) y se recolectaron 108 eluatos de 200 mL cada uno, comenzando la elución con un sistema binario constituido por la mezcla hexano-AcOEt e incrementando la polaridad hasta metanol como se resume en el **Cuadro 3**. Se decidió reunirlos en 12 fracciones combinadas por medio del monitoreo por cromatografía en capa fina de cada uno de los eluatos.

Cuadro 3. Fraccionamiento por cromatografía en columna de la subfracción Pcv-w proveniente de la columna I.

<i>Eluyente</i>	<i>Proporción</i>	<i>Eluatos colectados</i>	<i>Fracciones combinadas</i>	<i>Clave</i>
Hexano - AcOEt	6:4	1 – 47	1 – 3	R1
	4:6	48 – 63	4 – 6	R2
	2:8	64 – 79	7 – 8	R3
AcOEt	100	80 – 93	9 – 12	R4
CH ₃ OH	100	94 - 108	13 – 14	R5
			15 – 22	R6
			23 – 25	R7
			26 – 36	R8**
			37 – 47	R9
			48 – 63	R10**
			64 – 84	R11
			85 – 108	R12

** Fracción purificada por CLAE

Las subfracciones combinadas con las claves R8 y R10 provenientes de la segunda columna, se purificaron mediante CLAE cuyas condiciones ideales de separación se muestran en la sección 5.2.

5. Resultados y Discusión

Teniendo como objetivo la determinación del contenido metabólico de las partes aéreas de la especie *Packera bellidifolia*, se realizó un estudio preliminar para determinar la complejidad del extracto hexánico derivado de los cuatro lotes del material vegetal, mediante cromatografía de gases cuyas condiciones experimentales se muestran en la sección 4.1.3.1. Los cuatro lotes fueron reunidos debido a su similitud metabólica como se puede apreciar en las **Figuras 11 a 14**.

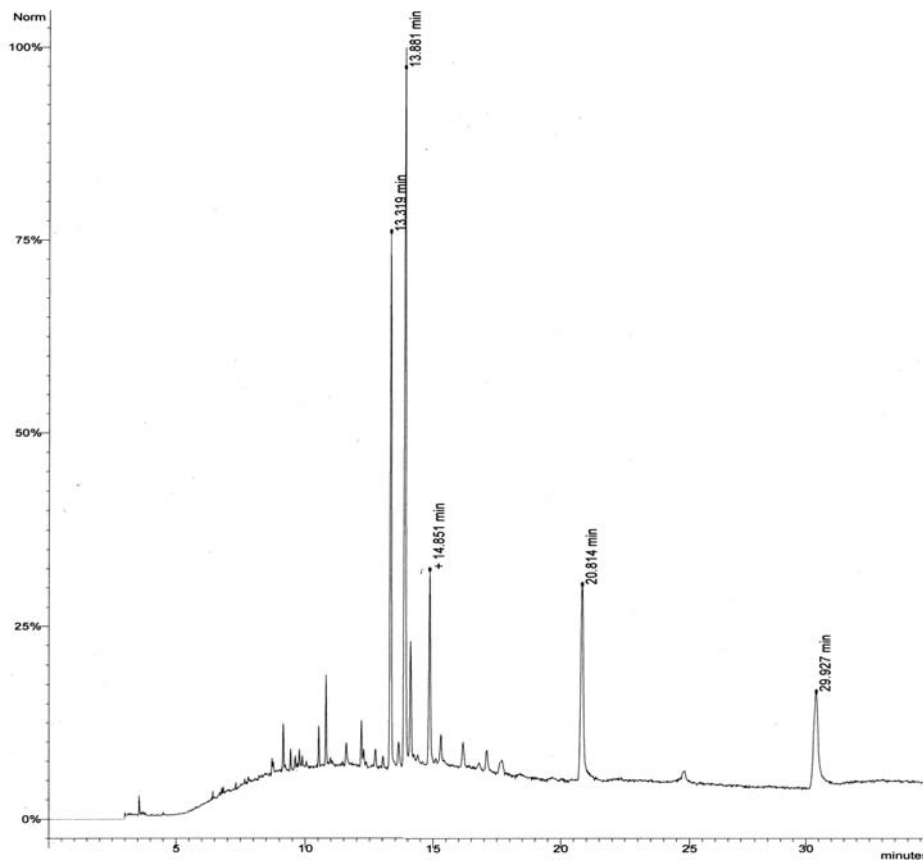


Figura 11. Perfil cromatográfico del extracto hexánico I

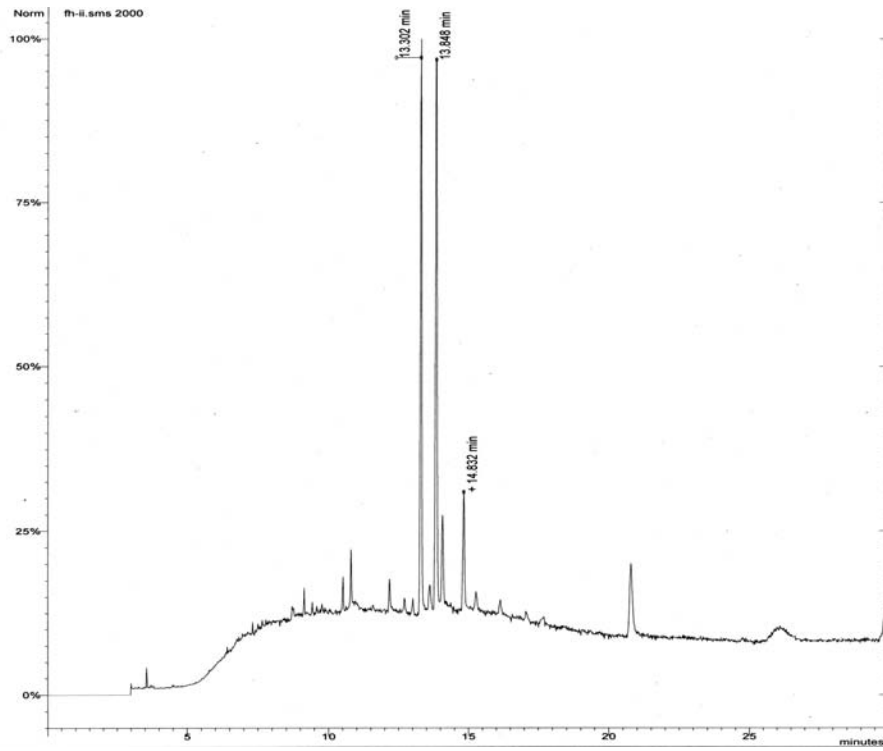


Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto hexánico II

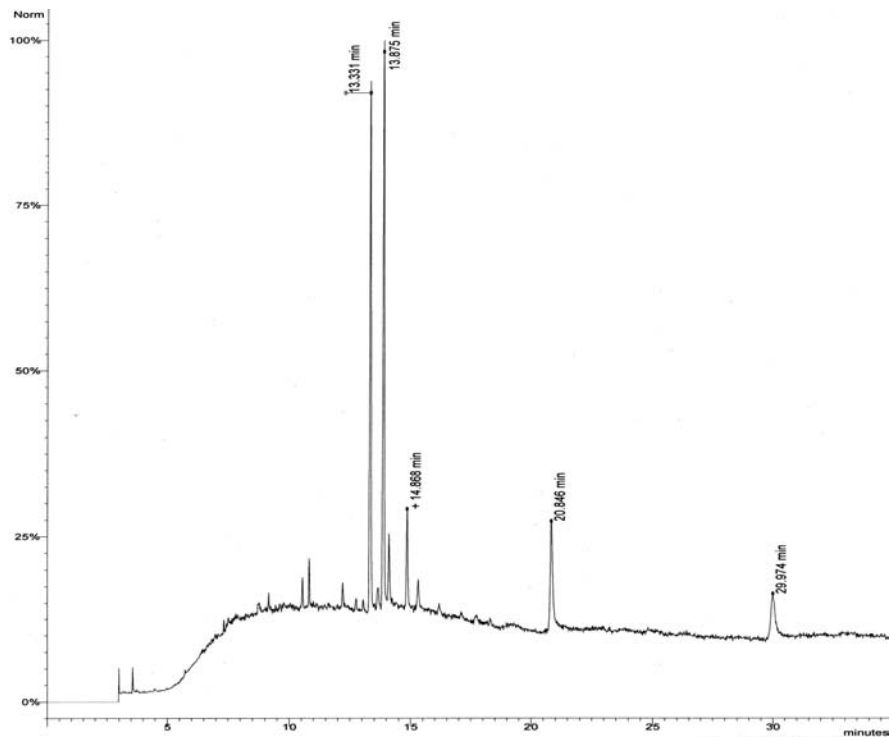


Figura 13. Perfil cromatográfico del extracto hexánico III

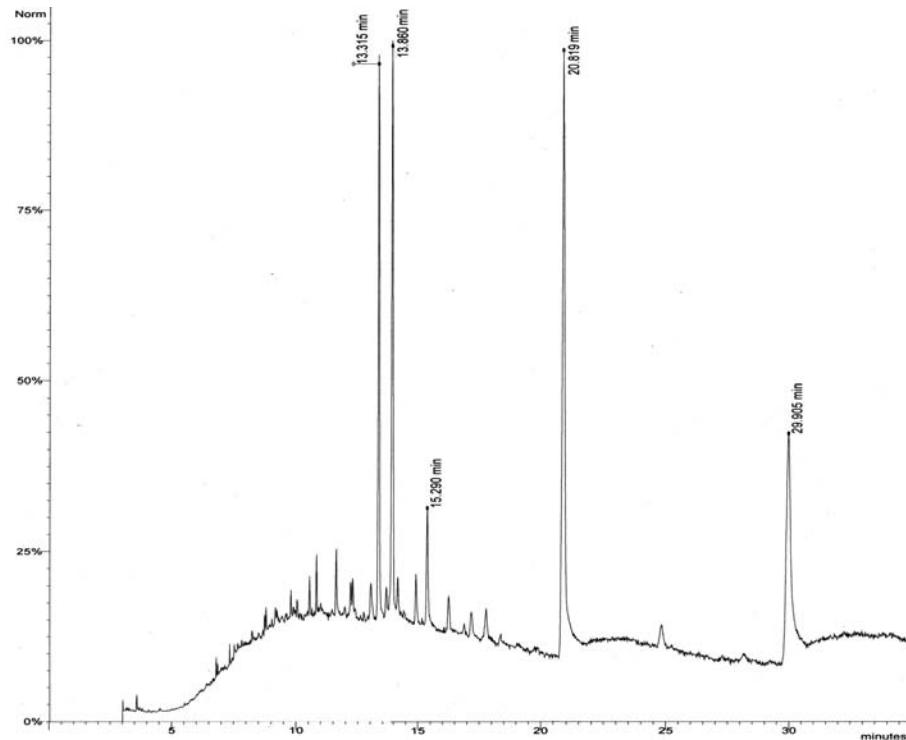


Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto hexánico IV

5.1. Separación y purificación del compuesto mayoritario de la fracción Pcr del extracto hexánico

Se seleccionó la subfracción Pcr para purificar la neoadenostilona, encontrándose las condiciones instrumentales que permitieron optimizar la separación de este compuesto previamente descrito para *Packera candidissima* (Bah, 1994) y *Packera bellidifolia* (Figueroa, 2007).

La separación y la purificación se realizó por CLAE, utilizando una columna preparativa de fase reversa C-18 (19 × 300 mm, 7 μm), un sistema de elución binario CH₃CN:H₂O (75:25) y un flujo de 9 mL/min. Para lograr la completa purificación del compuesto con $t_r = 48$ min, se sometió a las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra, este último con una

duración de 650 minutos. En la **Figura 15** se muestra el cromatograma obtenido al término de una secuencia de 12 ciclos.

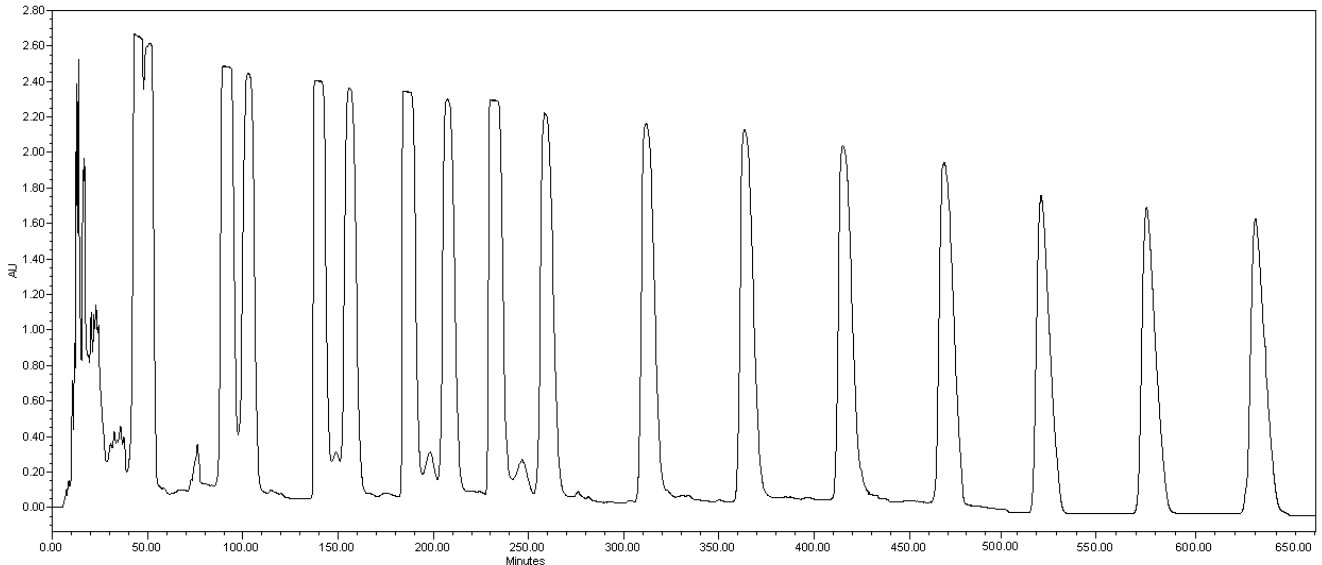


Figura 15. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de neoadenostilona, Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃CN-H₂O (75:25), flujo: 9 mL/min, inyección: 40 mg/500 μ L.

5.2. Separación y purificación de los compuestos mayoritarios de las fracciones R8 y R10 del extracto hexánico.

Las fracciones R8 y R10 provenientes de la segunda columna abierta (fracción Pcv-w) fueron elegidas debido a su marcada absorción en UV, la cual sugiere la presencia de conjugación considerable en la molécula. Además, su análisis por cromatografía en capa fina (**Figura 16**) indicó que estas mezclas de alta viscosidad no presentaban gran complejidad, debido a lo anterior, se procedió a purificar los constituyentes mayoritarios por CLAE; determinando en un análisis preliminar a nivel analítico las condiciones ideales para la purificación de las dos fracciones.

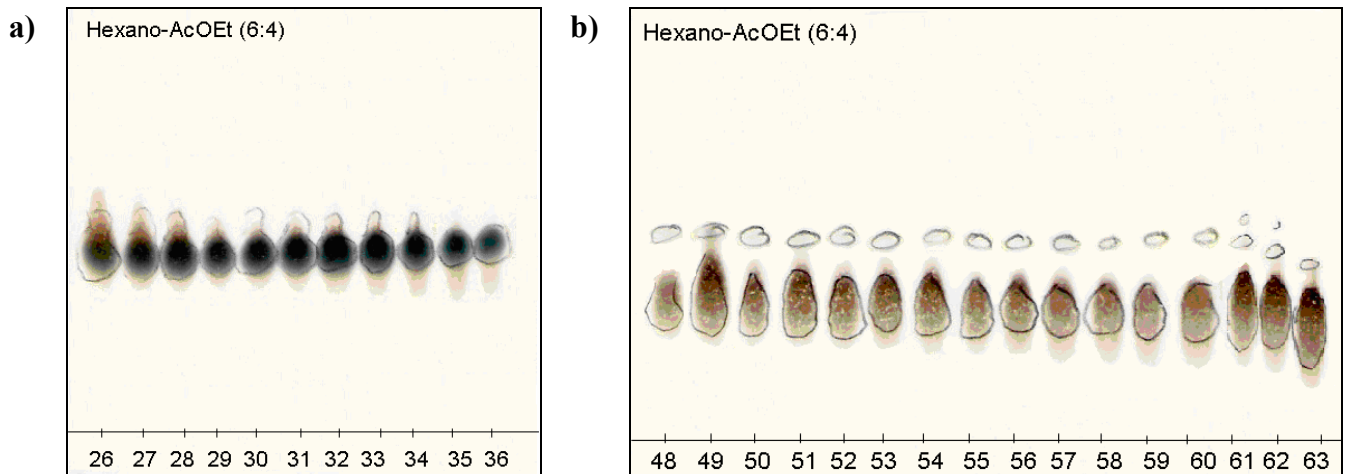


Figura 16. Cromatoplasmas de las fracciones combinadas a) R8 y b) R10 de la Columna II.

5.2.1. Fracción R8

Se buscaron las condiciones instrumentales óptimas para lograr la mejor resolución en el cromatógrafo de líquidos utilizando el detector de UV. Sin embargo, su elevada absorción a 254 nm dificultó la identificación del pico de interés ya que se observa un cromatograma muy complejo, por lo que la estandarización de las mejores condiciones se realizó con el empleo del detector de índice de refracción (ver sección 4.1.4.3.) y consistieron en un sistema de elución binario $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (94:6) con un flujo de 0.43 mL/min a nivel analítico y de 9 mL/min para el escalamiento a nivel preparativo. El cromatograma que muestra la complejidad de la fracción R8 se ilustra en la **Figura 17**, donde se colectaron 2 partes: R8a y R8b, de las cuales el R8b, por ser el compuesto mayoritario de la fracción con un $t_r = 8$ min, se sometió a las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra, este último con una duración de 77 minutos. En la **Figura 18** se muestra el cromatograma obtenido al término de una secuencia de 10 ciclos durante los cuales se garantizó la pureza del compuesto.

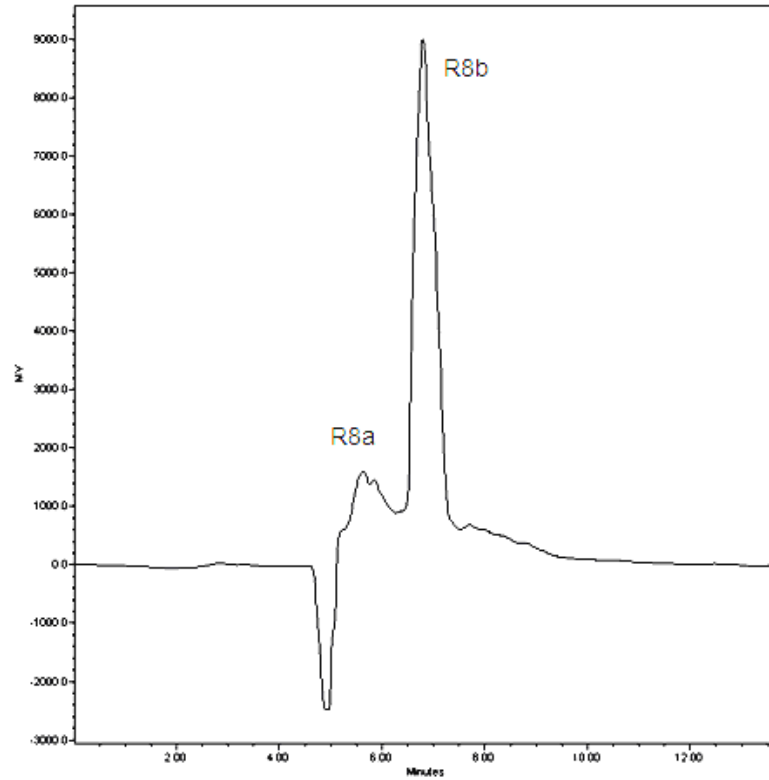


Figura 17. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R8. Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃CN-H₂O (94:6), flujo: 9 mL/min, inyección: 40 mg/500 μ L.

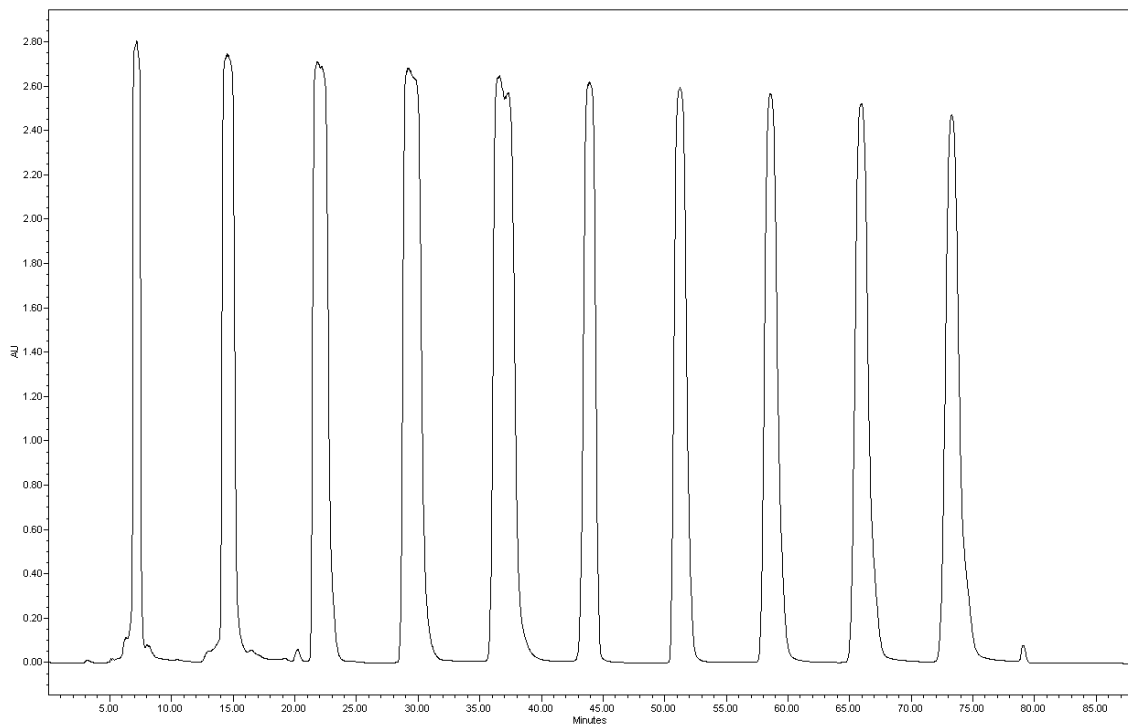


Figura 18. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de R8b, Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃CN-H₂O (98:2), flujo: 9 mL/min, inyección: 25 mg/500 μ L.

5.2.2. Fracción R10

Las condiciones ideales para la separación y purificación de esta fracción consistieron en un sistema de elución binario CH₃OH:H₂O (1:1) con un flujo de 0.43 mL/min a nivel analítico y de 9 mL/min para el escalamiento a nivel preparativo. El cromatograma que muestra la composición de la fracción se ilustra en la **Figura 19**, donde se puede apreciar la presencia de más de 5 picos, pero para fines prácticos se realizaron 5 cortes: R10-1 a R10-5. Al buscar las condiciones ideales para la purificación del pico R10-5 (pico mayoritario) a nivel analítico, se puede observar la complejidad de la fracción en la **Figura 20**, por lo que se decidió cortar el pico 10-5.3 ($t_r = 18.7$ min), siendo éste el mayoritario y someterlo posteriormente a las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra, este último procedimiento con una duración de 300 minutos (**Figura 21**)

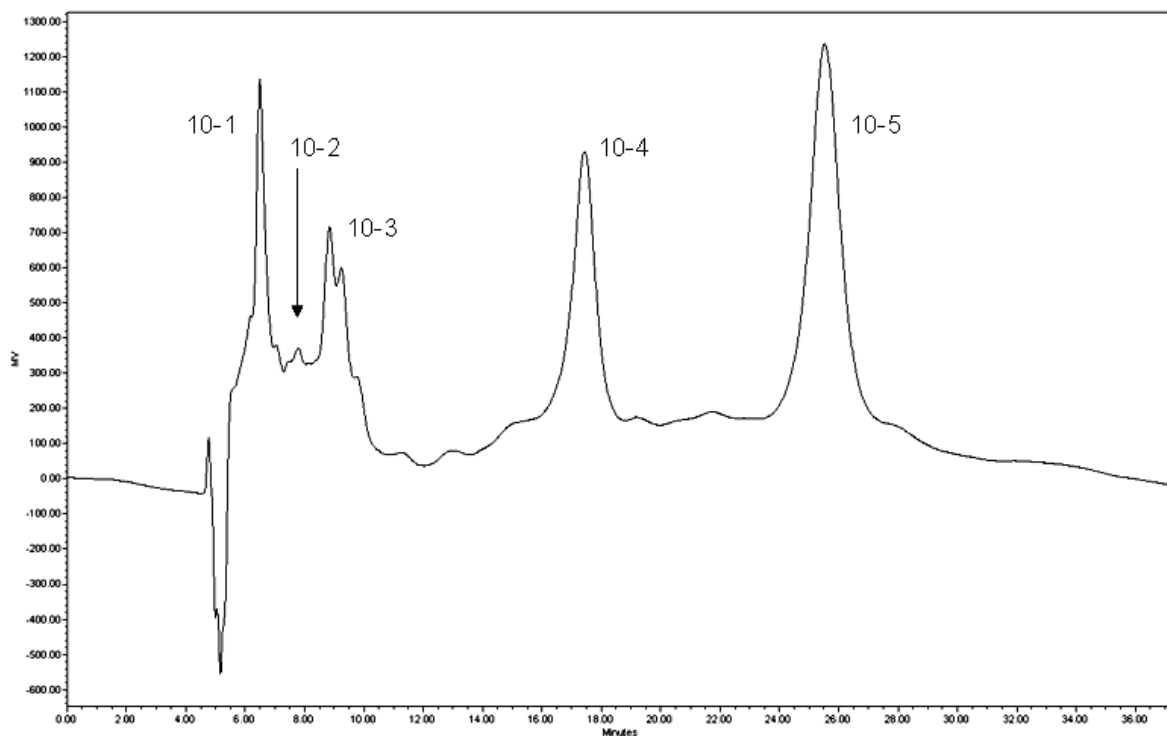


Figura 19. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R10. Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃OH-H₂O (1:1), flujo: 9 mL/min, inyección: 40 mg/500 μ L.

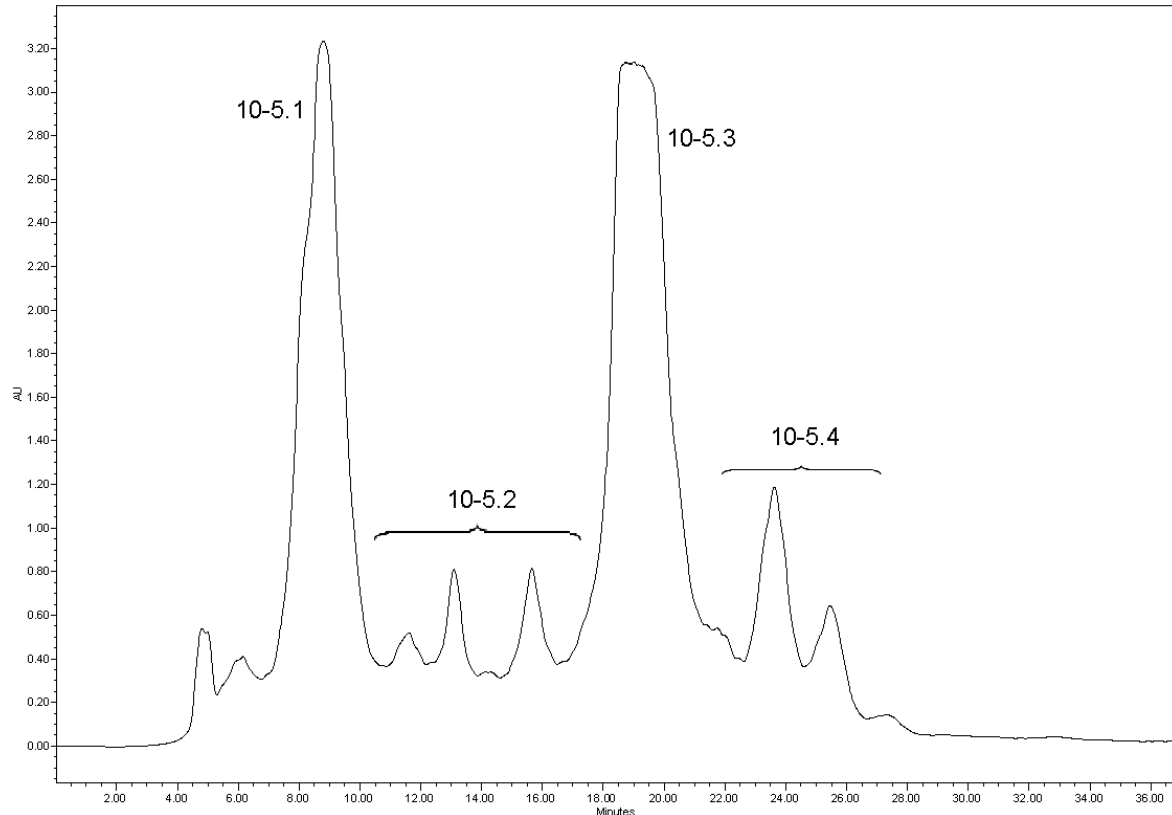


Figura 20. Análisis por CLAE a nivel preparativo que muestra la composición de la fracción R10-5. Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃OH-H₂O (7:3), flujo: 9 mL/min, inyección: 40 mg/500 μ L

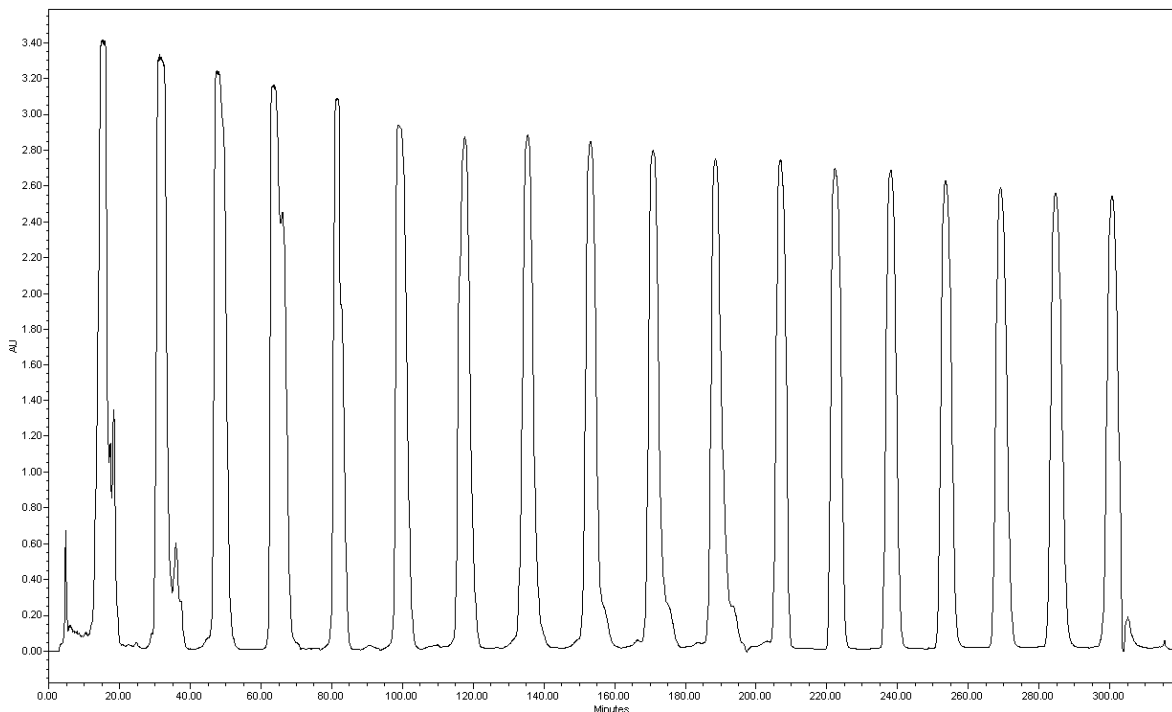
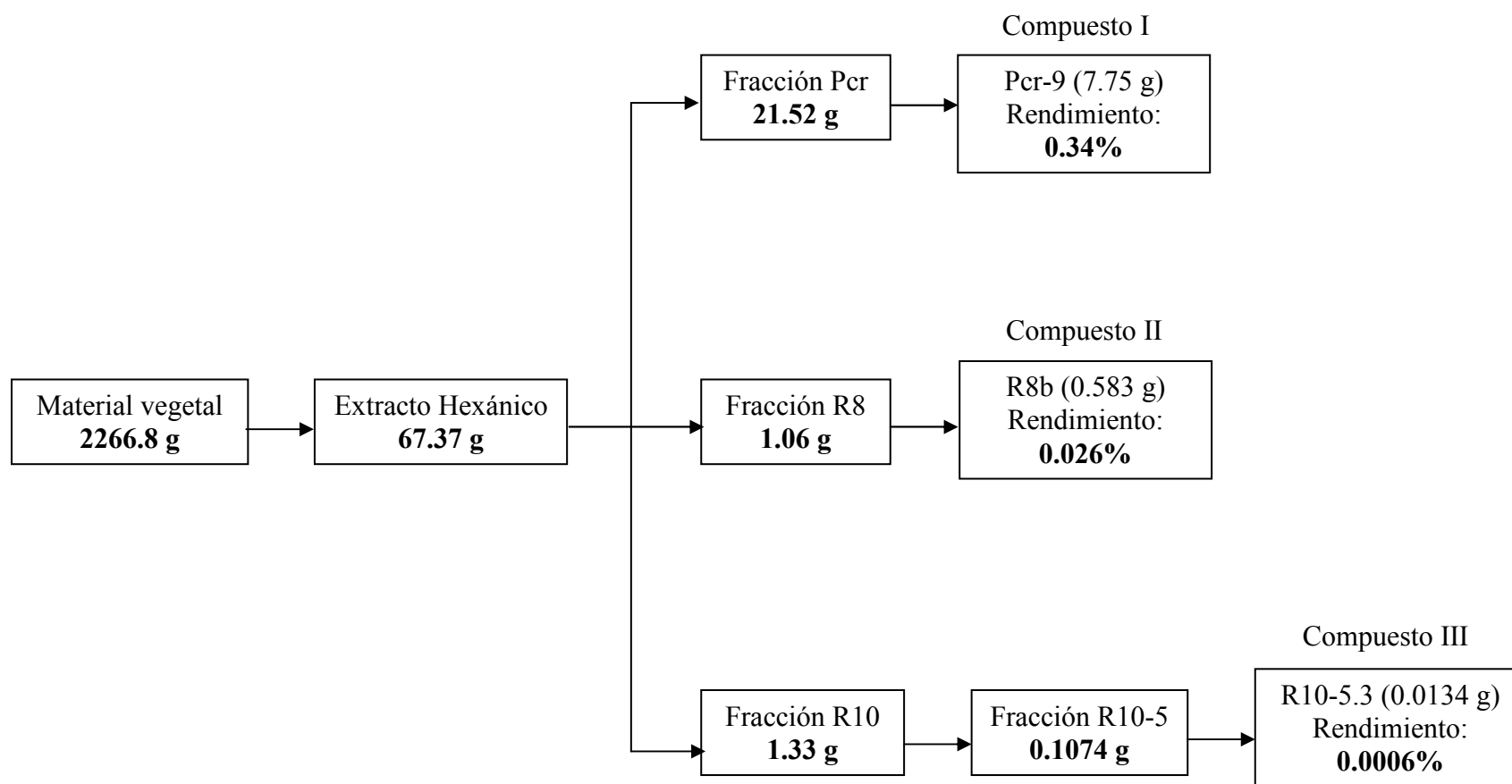


Figura 21. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE de R10-5.3, Columna fase reversa C18 (19 x 300 mm, 7 μ m), fase móvil: CH₃CN-H₂O (73:27), flujo: 9 mL/min, inyección: 10 mg/500 μ L

Metabolitos obtenidos de las partes aéreas de *Packera bellidifolia*.

5.4. Elucidación estructural de los compuestos aislados

5.4.1. Compuesto 1 (Neoadenostilona)

Este compuesto ha sido reportado previamente en la literatura, aislado de varios géneros de la familia Asteraceae, como de *Packera*, *Senecio* y *Psacalium*. En el caso de *Packera bellidifolia*, éste es el segundo reporte que se tiene de la identificación de este compuesto por lo que su estructura se elucidó por comparación de sus datos espectroscópicos reportados por Figueroa (2007).

La fórmula molecular de la neoadenostilona se determinó mediante espectrometría de masas (Figura 22), con introducción directa de la muestra y por impacto electrónico. El ión molecular observado en 328 m/z permitió calcular la fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_4$.

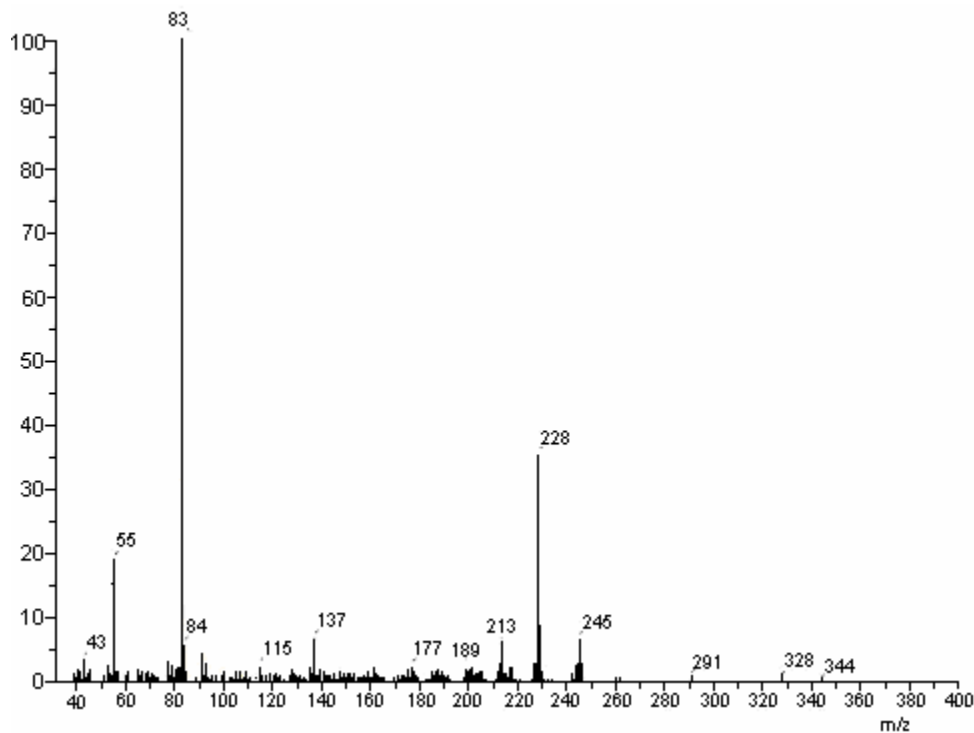


Figura 22. Espectro de masas de la neoadenostilona.

Para confirmar que efectivamente se aisló y purificó la neoadenostilona, se procedió a registrar su espectro de RMN ^1H , en el cual podemos visualizar que en la región de campo alto (**Figura 23**) se observa la presencia de 5 grupos metilo con la siguiente asignación: el singulete que aparece en 1.16 ppm corresponde al C-14, mientras que para el C-15 se asigna al doblete de 0.97 ppm.

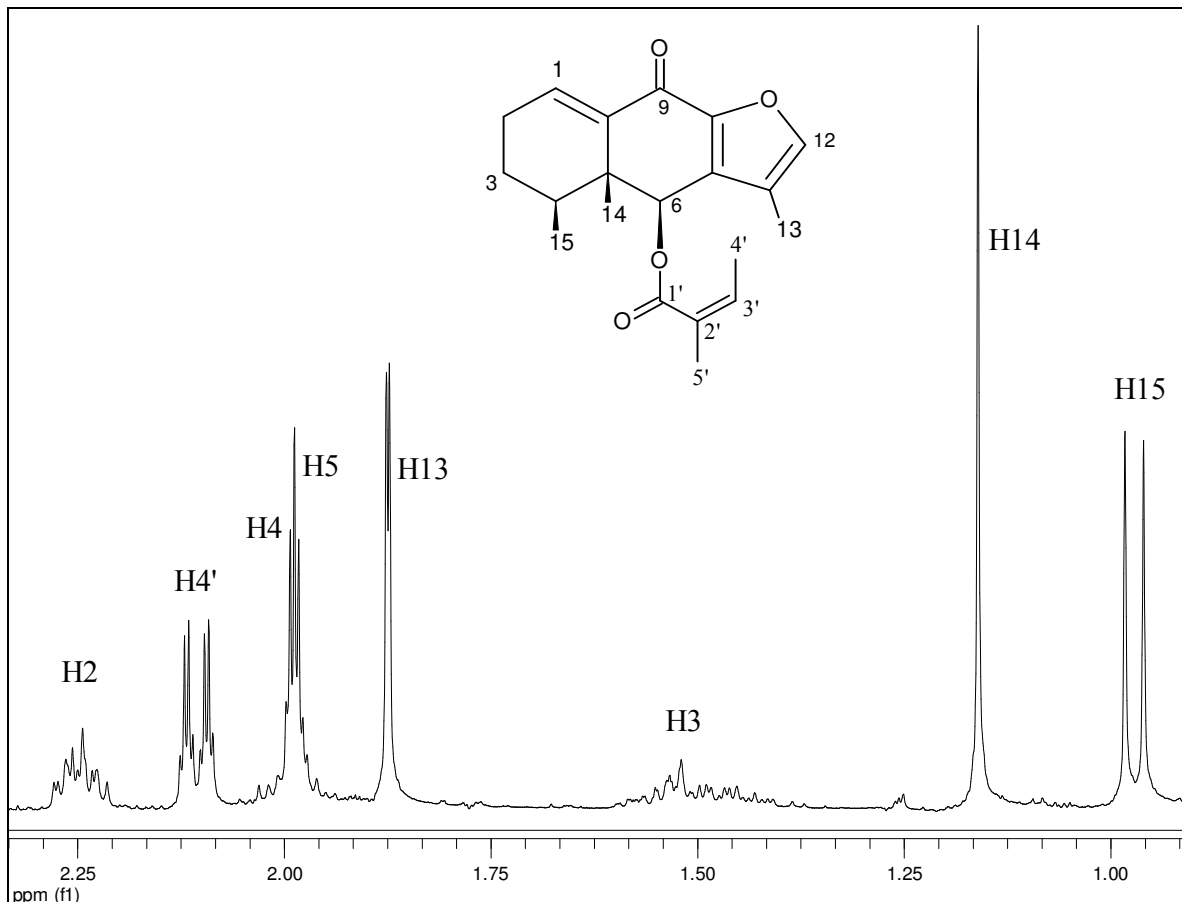


Figura 23. Región de campo alto en RMN- ^1H para la neoadenostilona

De igual manera, claramente se observa la presencia de un grupo angeloililo mostrando la señal característica en 6.27 ppm, correspondiente al protón vinílico de dicho grupo (**Figura 24**).

Se identificaron también las señales de 2.11 y 1.99 ppm como dobles de cuádruples para los metilos C-4' y C-5' del grupo angeloililo. Una señal que es indicativa de que existe el anillo furano es la que aparece en campo bajo a 7.38 ppm, la cual pertenece al protón del C-12 (Bah, 1994).

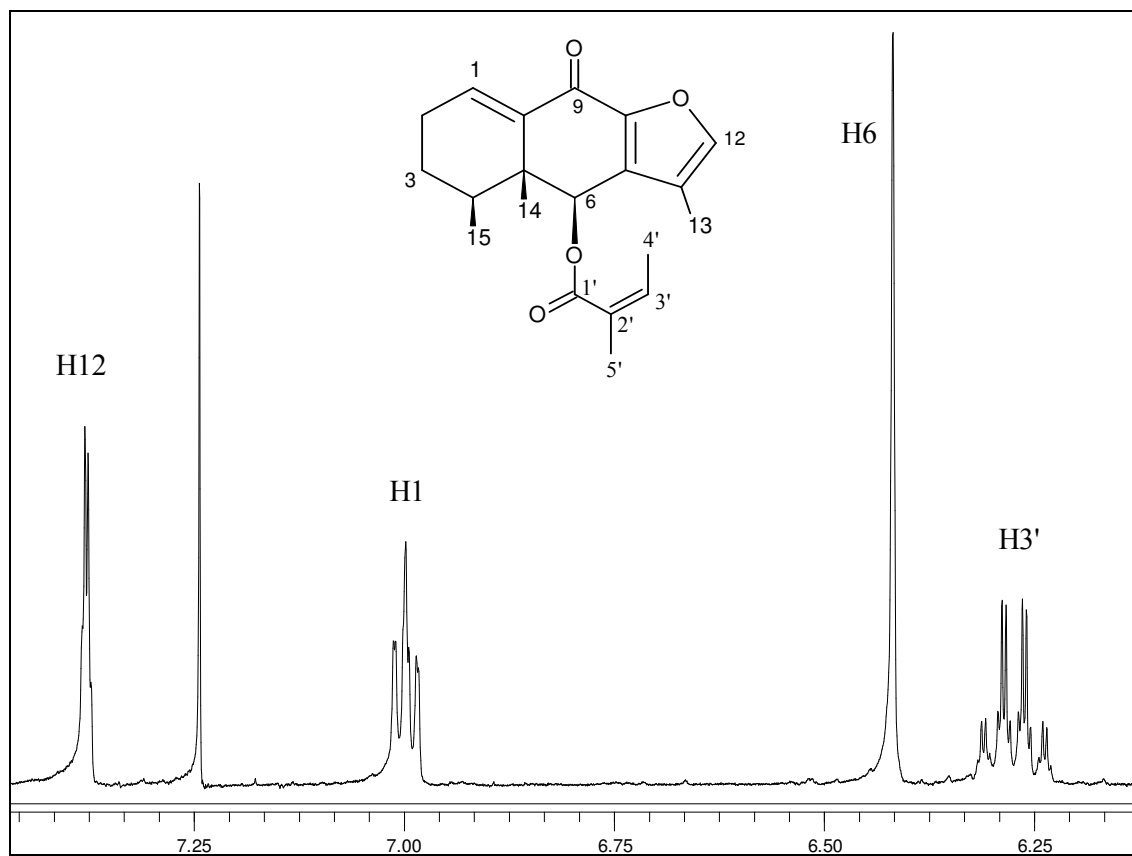


Figura 24. Región de campo bajo en RMN ^1H para la neoadenostilona.

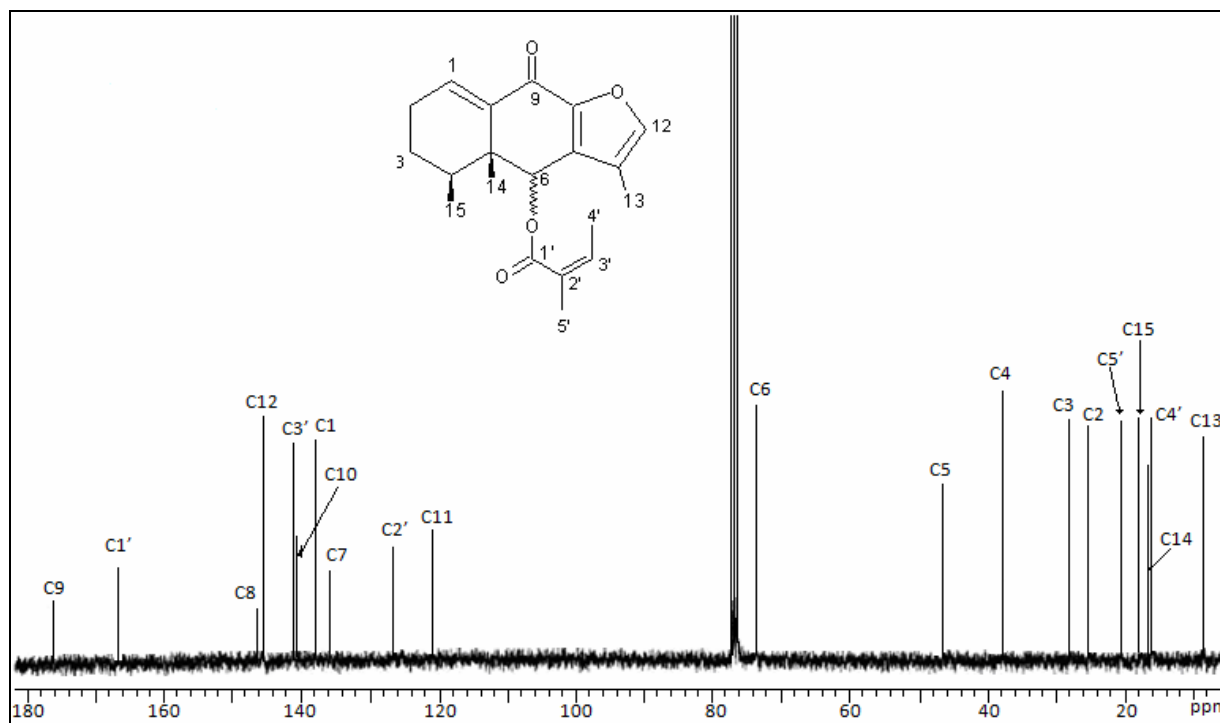


Figura 25. Espectro de RMN- ^{13}C de la neoadenostilona.

Cuadro 4. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C de la neoadenostilona (ver condiciones experimentales en la sección 4.1.3.2)

CDCl_3
neoadenostilona

	RMN ^{13}C	RMN ^1H
1	138.0	7.00 (4.1,4.1) t
2a	25.3	2.24 m
3a	28.1	1.52 m
3b	--	1.53 m
4	38.0	1.99 m
5	46.7	--
6	73.9	6.42 s
7	135.8	--
8	146.5	--
9	176.3	--
10	141.1	--
11	121.0	--
12	145.7	7.38 (1.1) d
13	8.6	1.87 (1.1) d
14	16.2	1.16 s
15	17.7	0.97 (6.9) d
1'	166.7	--
2'	126.8	--
3'	141.4	6.27 (1.51,7.21) cc
4'	16.0	2.11 (1.65, 7.41) dc
5'	20.7	1.99 (1.5,1.5) dc

Constantes Físicas:

Compuesto	$[\alpha]_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}}$	Aspecto	UV (nm)
Neoadenostilona	-32.2 (c 0.15, CH_2Cl_2)	Aceite amarillo	241 y 323

5.4.2. Compuesto II (10 β -hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona)

Por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases y utilizando la técnica de impacto electrónico, se registró el cromatograma donde se muestra la pureza del compuesto II con un tiempo de retención de 12.28 min (**Figura 26**). En el espectro de masas modalidad impacto electrónico (**Figura 27**), pareciera darnos el ión molecular con una relación m/z de 246. Sin embargo, con la ayuda de los análisis espectroscópicos realizados en resonancia magnética nuclear de ^{13}C se descartó esta propuesta, asignando esta masa a un fragmento equivalente a la pérdidas sucesivas de un radical hidrógeno $[\text{M}-1]^+$ y un radical metilo $[\text{M}-15]^+$.

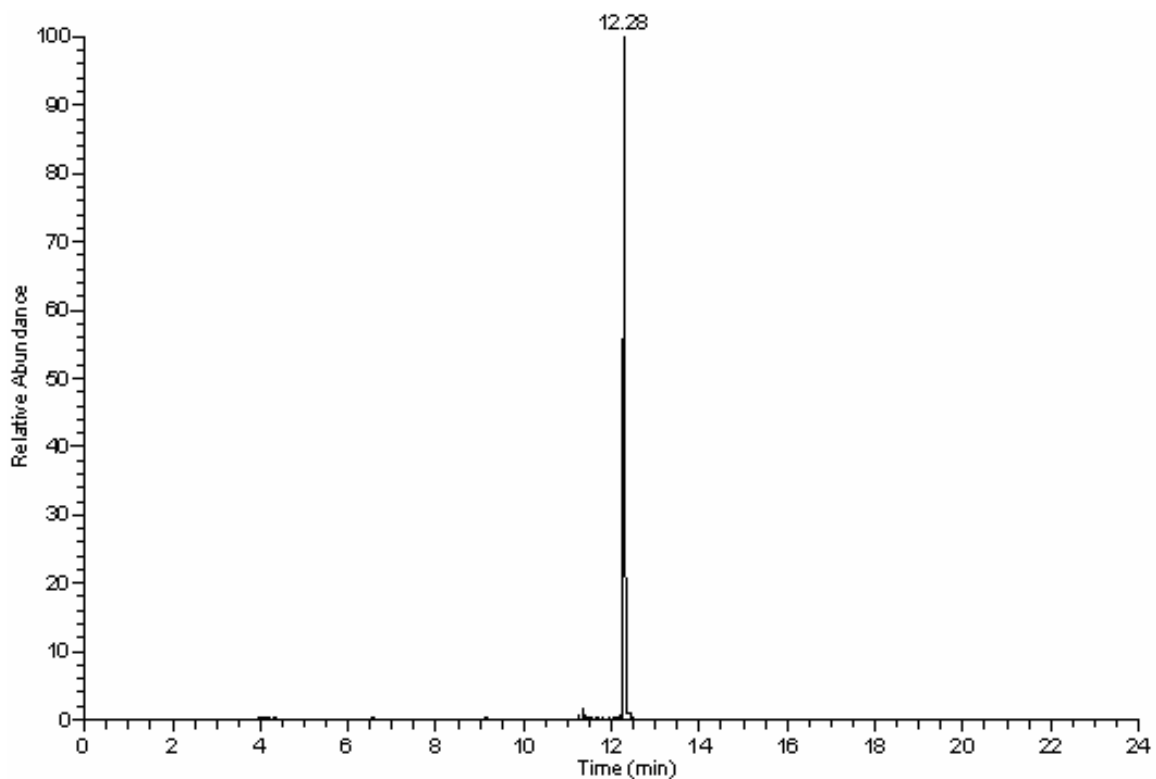


Figura 26. Cromatograma de gases del compuesto II (10 β -hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona).

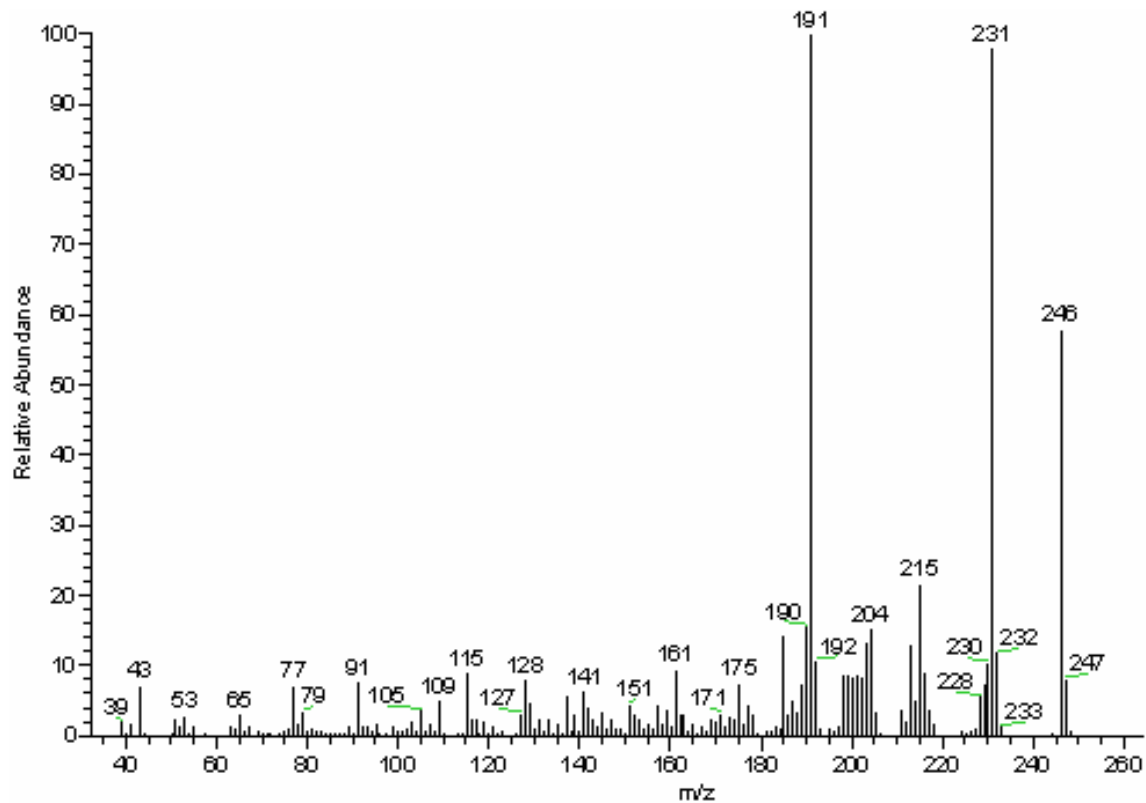


Figura 27. Espectro de masas por IE-CG del compuesto II.

Los espectros DEPT y RMN- ^{13}C (Figura 28) nos permitieron establecer la presencia de 3 metilos, 3 metilenos, 2 metinos y 7 carbonos cuaternarios, y gracias a la ayuda del espectro HSQC (Figura 29), se pudo observar la correspondencia de protones con carbonos del compuesto R8b.

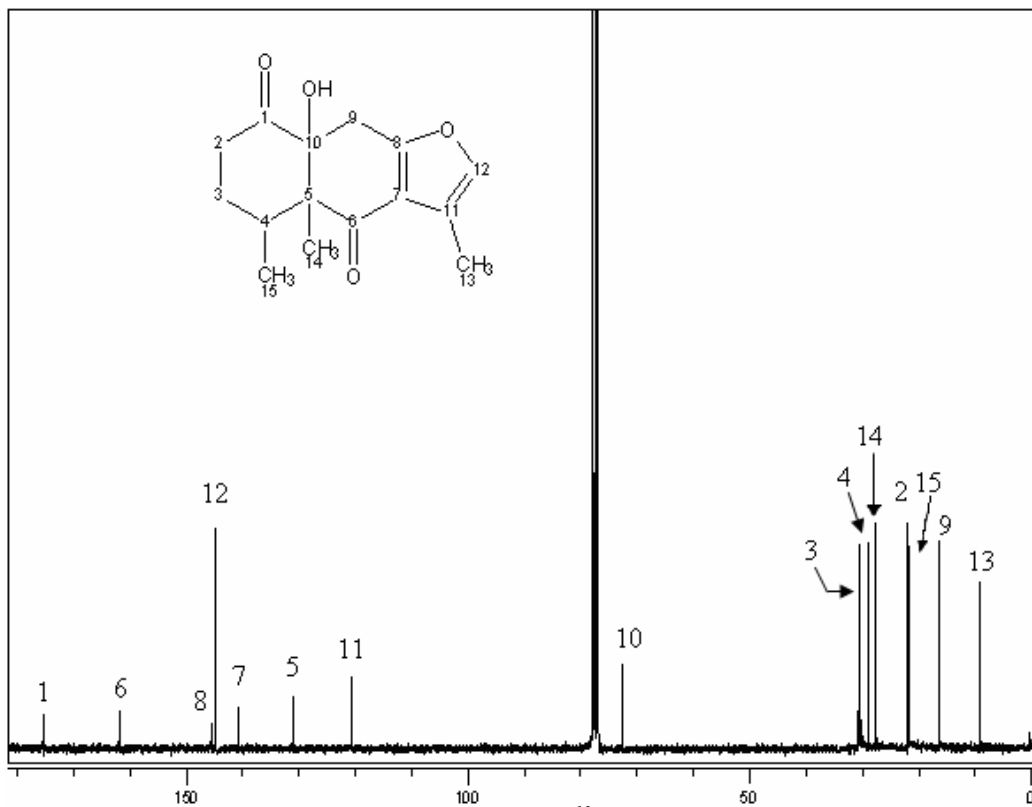


Figura 28. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto II.

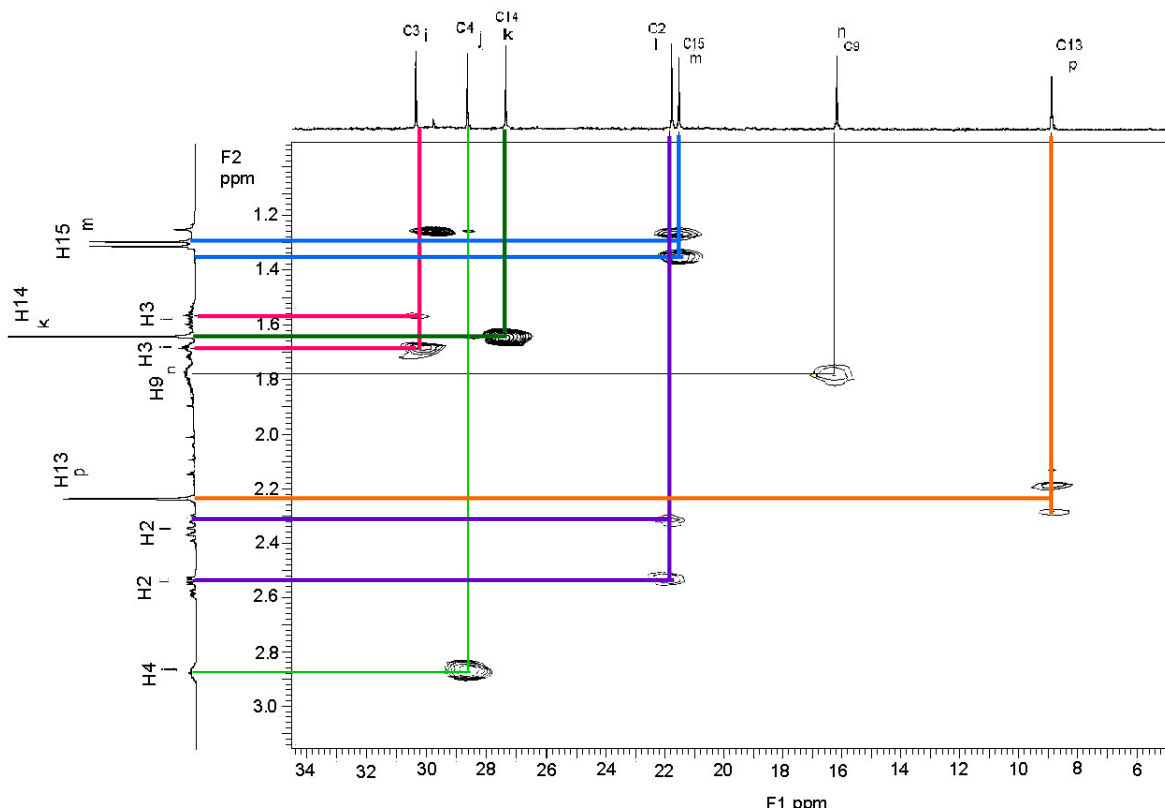


Figura 29. Espectro HSQC que permitió observar la correspondencia de protones y carbonos del compuesto II.

En la región de campo alto del espectro de RMN- ^1H (**Figura 30**) se observan las dos señales para los metilos 14 y 15 características de un compuesto del tipo eremofilano, la primera aparece como un singlete a 1.64 ppm, mientras que la correspondiente al metilo 15 se localiza como un doblete a 1.31 ppm, ésta última señal en el espectro de correlación bidimensional de hidrógeno (2D-COSY) (**Figura 31**) muestra claramente una correlación con el hidrógeno del C-4 al cual está unido.

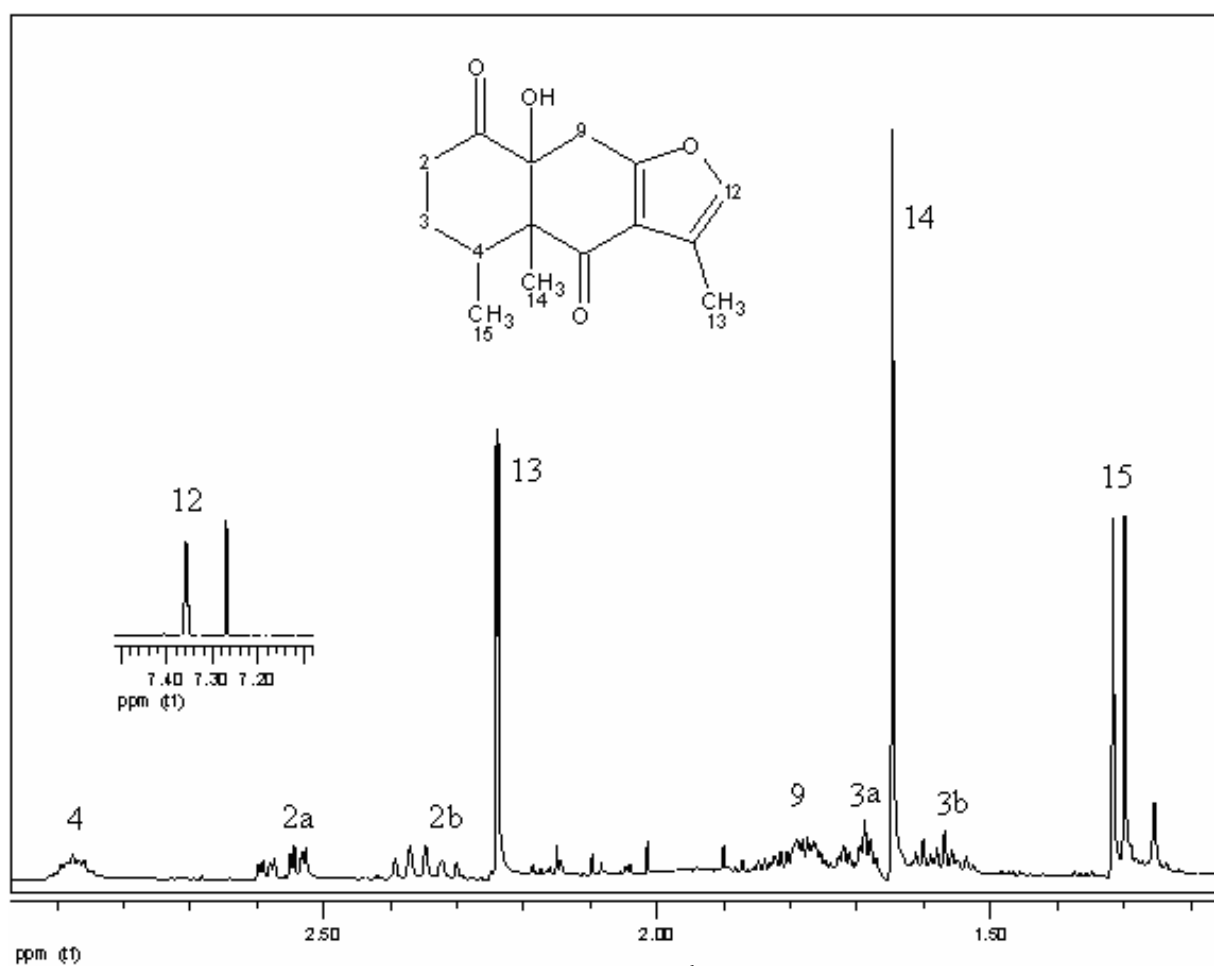


Figura 30. Espectro de RMN- ^1H del compuesto II.

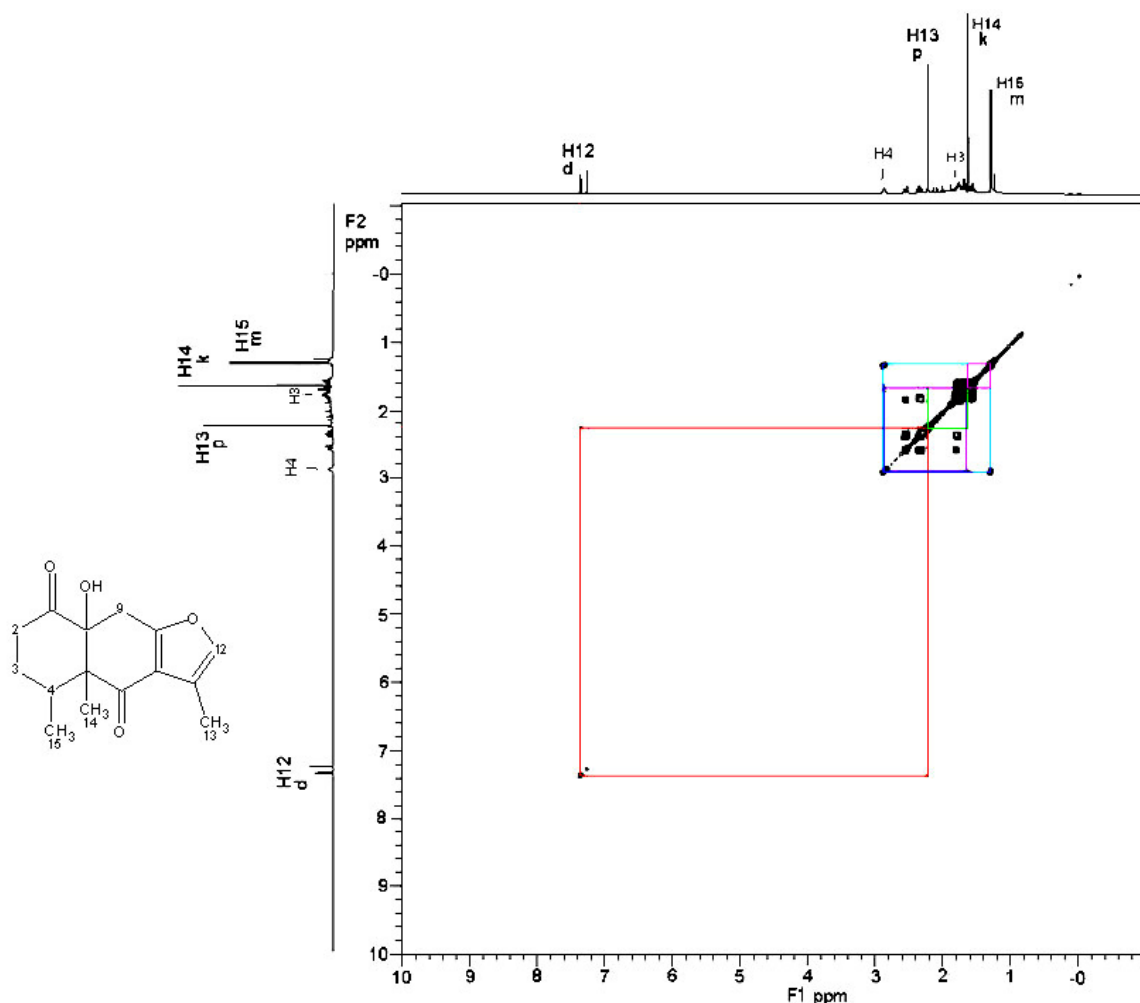


Figura 31. Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto II.

Además de estas dos señales características, se observa también en RMN- ^1H , una señal típica del protón perteneciente al C-12 del anillo furano a 7.33 ppm, este protón en el espectro COSY (**Figura 31**) muestra un acoplamiento alílico con una señal a 2.23 ppm la cual integra para 3 hidrógenos, esta señal se asigna al metilo 13. Esta correlación se corroboró en el experimento HMBC (**Figura 32 y 33**).

Adicionalmente en el espectro de RMN- ^{13}C se observa la presencia de 2 grupos carbonilo con desplazamientos de 175.03 y 161.5 ppm, además de otro carbono cuaternario unido a un

heteroátomo (oxígeno en este caso), dicho carbono aparece a 72.31 ppm y, por lo tanto, su desplazamiento permite asignarlo a carbono unido a un grupo hidroxilo.

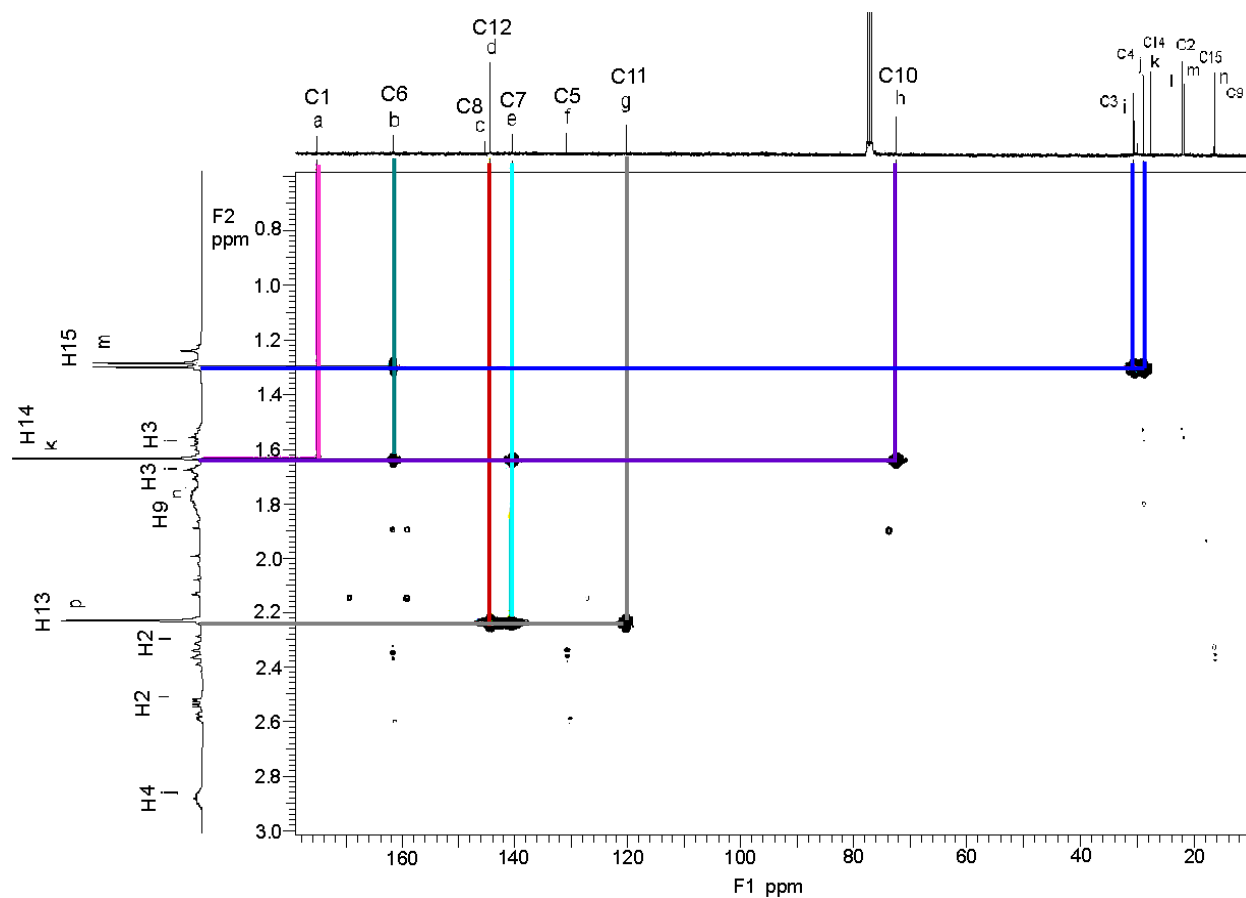


Figura 32. Expansión en campo alto del espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia ($^{2,3,4}J$) del compuesto II.

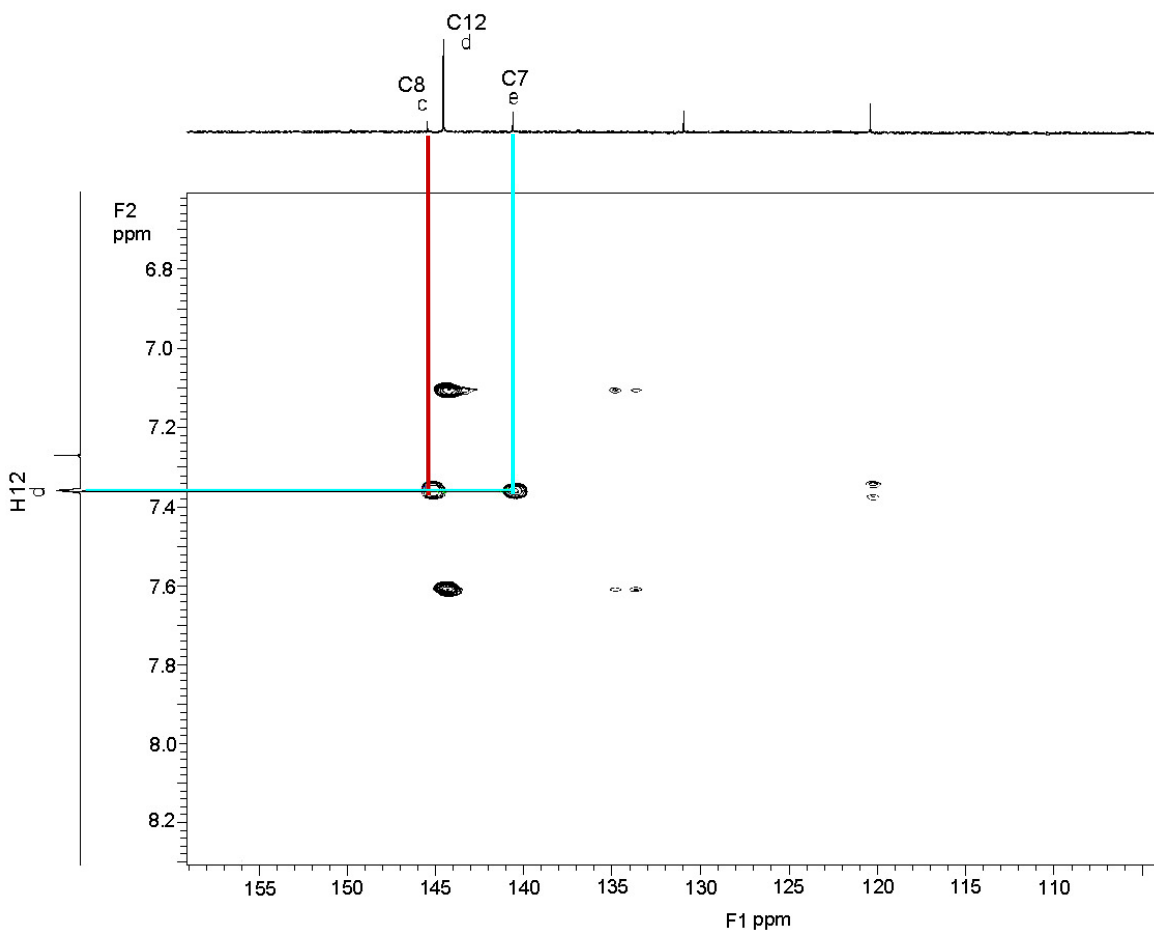


Figura 33. Expansión en campo bajo del espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia ($^{2,3,4}\text{J}$) del compuesto II.

De acuerdo con la información reunida hasta el momento, el compuesto R8b se trata de una molécula de naturaleza sesquiterpénica del tipo furanoeremofilano, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (PM 262), dicha molécula posee 7 grados de insaturación, 3 provenientes de los anillos, 2 dobles ligaduras del anillo furano y 2 pertenecientes a las 2 cetonas.

Para completar la asignación de las señales fue fundamental relacionar la información proveniente de los experimentos en dos dimensiones homonuclear (COSY) y del bidimensional heteronuclear (HMBC). Este último permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia ($^{2,3,4}\text{J}$) del compuesto en estudio (**Figura 34**).

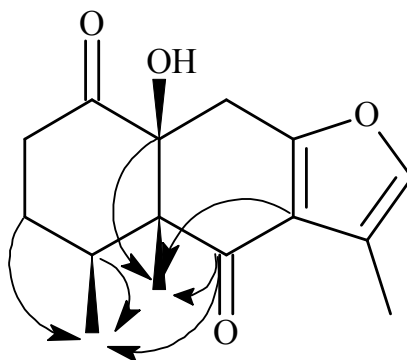


Figura 34. Acoplamiento a larga distancia observados en el compuesto II

Cuadro 5. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto II (CDCl_3)

CDCl_3
Compuesto II

	RMN ^{13}C	RMN ^1H
1	175.03	---
2a	21.60	2.26-2.38 m
2b	---	2.54(2.6, 6.9, 18.9) ddd
3a	30.26	1.60 m
3b	---	1.68 m
4	28.52	2.88 m
5	130.73	---
6	161.50	---
7	140.41	---
8	145.22	---
9	16.04	1.76 m
10	72.31	---
11	120.17	---
12	144.33	7.33 (0.9) c
13	8.78	2.23 (0.9) d
14	27.22	1.64 s
15	21.36	1.31(6.9)d

Constantes Físicas:

Compuesto	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$	Aspecto	UV (nm)
10 β -hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona	-40.3 (c 0.20, CH ₂ Cl ₂)	Aceite amarillo	234 Y 281

5.4.4. Compuesto III (2 β -hidroxineoadenostilona)

Para la elucidación estructural de este compuesto, primero se procedió a registrar su cromatograma de gases (**Figura 35**), donde se muestra la pureza del compuesto a un tiempo de retención de 8.3 min. La fórmula molecular fue determinada mediante espectrometría de masas por ionización química (**Figura 36**). Se observa como ión molecular y como pico base la señal de 345 m/z . Se observa adicionalmente el fragmento de 327 m/z que muestra la pérdida de un OH como agua; también se observa respectivamente una relación m/z de 263 y 244 asignada a los fragmentos generados por la eliminación de una cetena y del ácido angélico a partir del ión molecular.

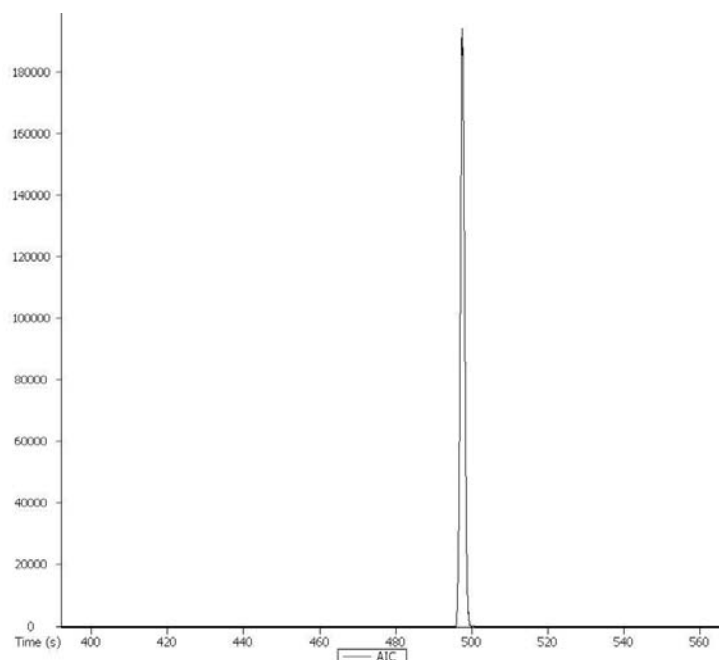


Figura 35. Cromatograma de gases del compuesto IV (2 β -hidroxineoadenostilona).

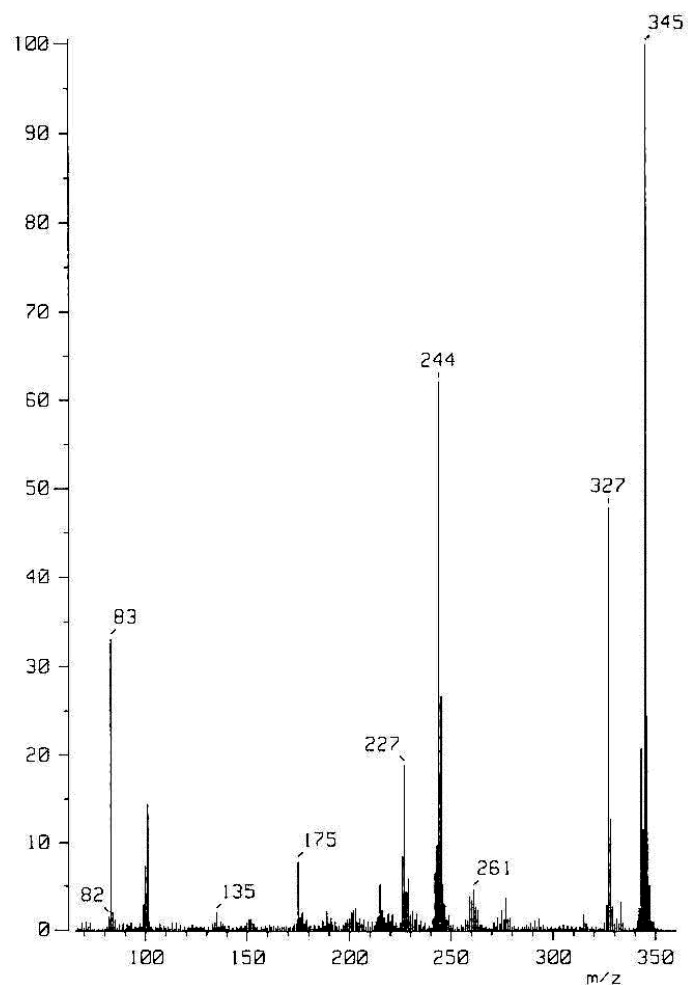


Figura 36. Espectro de masas por ID-IQ del compuesto III.

Los espectros RMN-¹³C y HSQC editado (**Figura 37 y 38**) nos permitieron establecer la presencia de 5 metilos, 1 metileno, 6 metinos y 8 carbonos cuaternarios, observando la correspondencia de protones con carbonos del compuesto R10-5.3, además de ver claramente la presencia de 2 carbonos a campo bajo pertenecientes a 2 carbonilos de una cetona y 2 carbonos que por su desplazamiento entre 60 y 80 ppm son bases de oxígeno.

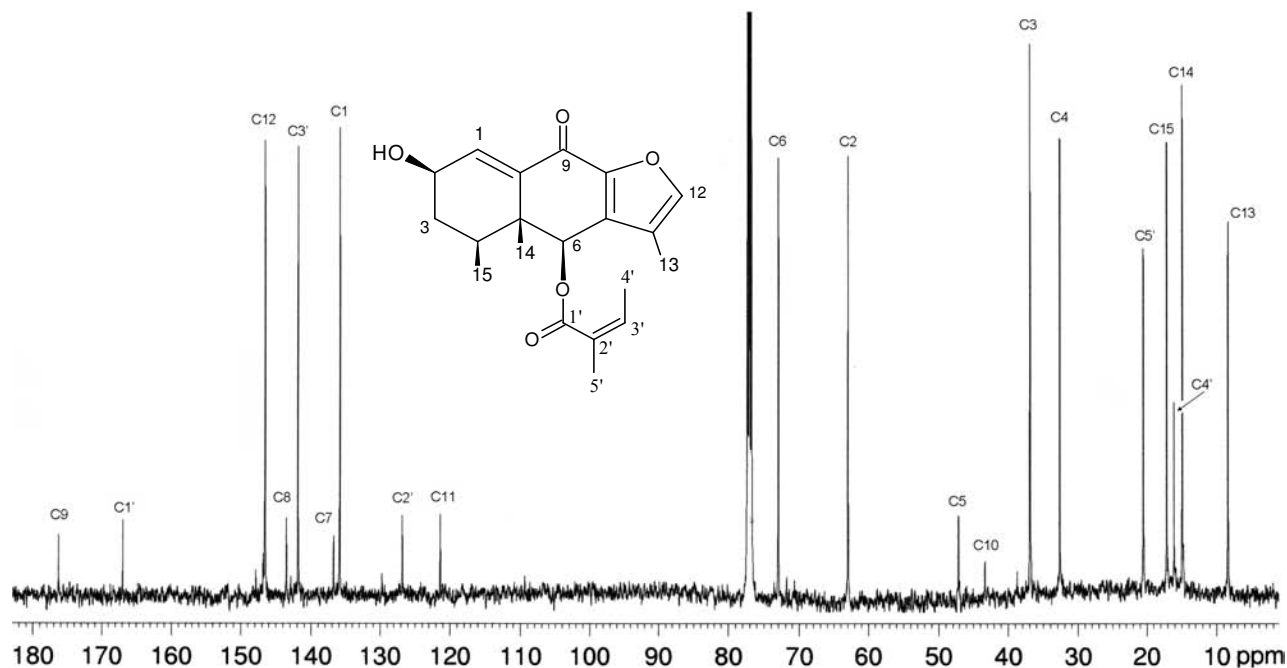


Figura 37. Espectro de RMN-¹³C del compuesto III.

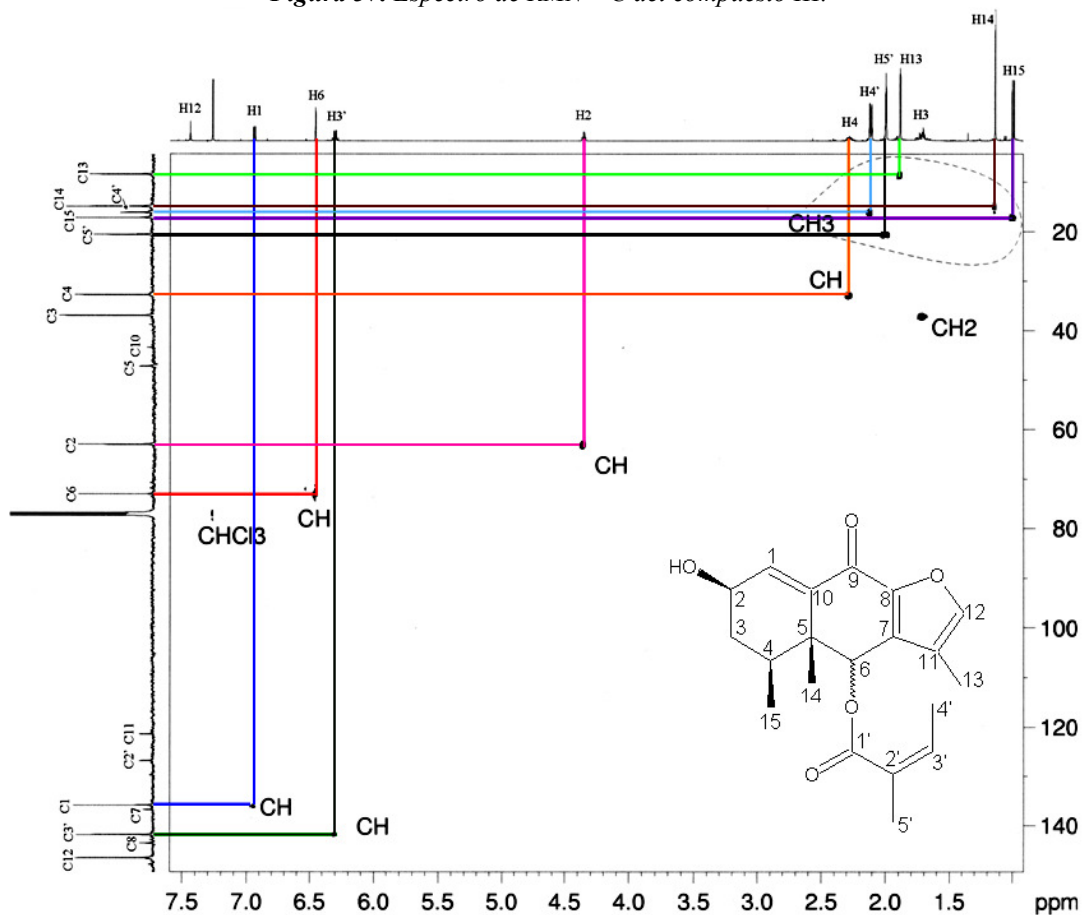


Figura 38. Espectro HSQC que permitió observar la correspondencia de protones y carbonos del compuesto III.

Podemos visualizar que en la región de campo alto del espectro de RMN- ^1H (**Figura 39**) se observa la presencia de 5 metilos con la siguiente asignación: el singulete que aparece en 1.13 ppm corresponde al C-14, mientras que para el C-15 se asigna al doblete de 0.99 ppm. Esta última señal en el espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) (**Figura 40**) muestra claramente una correlación con el hidrógeno del C-4 al cual está unido. De igual manera, claramente se observa la presencia de un grupo angeloililo mostrando la señal característica en 6.29 ppm, correspondiente al protón vinílico de dicho grupo (**Figura 39**).

Se identificaron también las señales de 2.11 y 1.99 ppm como dobles de cuádruples para los metilos C-4' y C-5' del grupo angeloililo. Una señal que es indicativa de que existe el anillo furano es la que aparece en campo bajo a 7.43 ppm, la cual pertenece al protón del C-12, el cual en el espectro COSY (**Figura 40**) muestra un acoplamiento alílico con una señal a 1.88 ppm la cual integra para 3 hidrógenos, esta señal se asigna al metilo 13, corroborándose esto en el experimento HMBC (**Figura 41**).

Con respecto al cuarteto localizado a 4.35 ppm es necesario señalar que por su desplazamiento se trata de un protón unido a heteroátomo (en este caso unido al OH), asignado al carbono 2 mediante el análisis del espectro bidimensional COSY, el cual nos muestra claramente la secuencia de los protones 2, 3 y 4 como se aprecia con los cuadros de conectividad de la **Figura 40**.

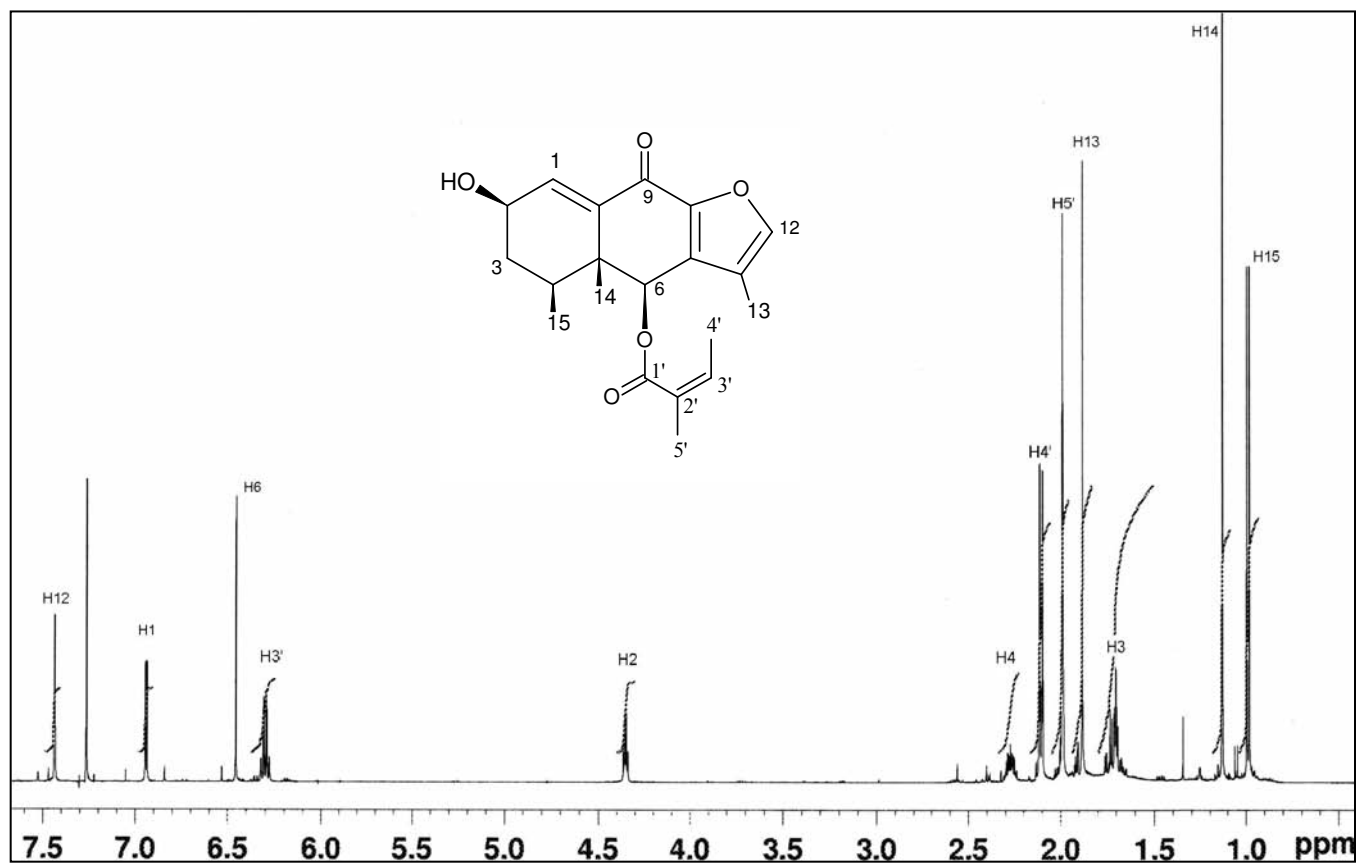


Figura 39. Espectro de RMN ¹H del compuesto III.

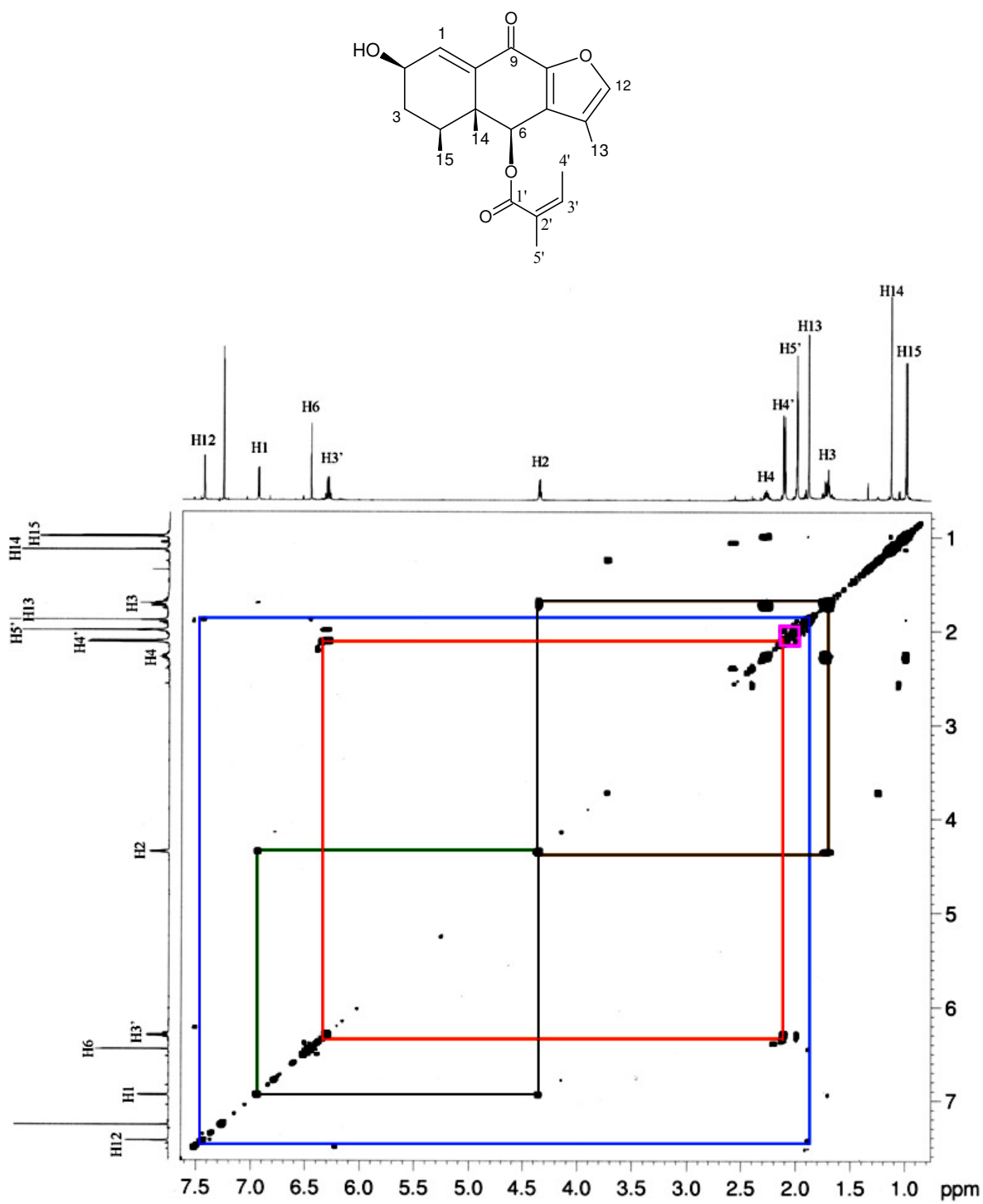


Figura 40. Espectro de correlación bidimensional de protones (2D-COSY) del compuesto III.

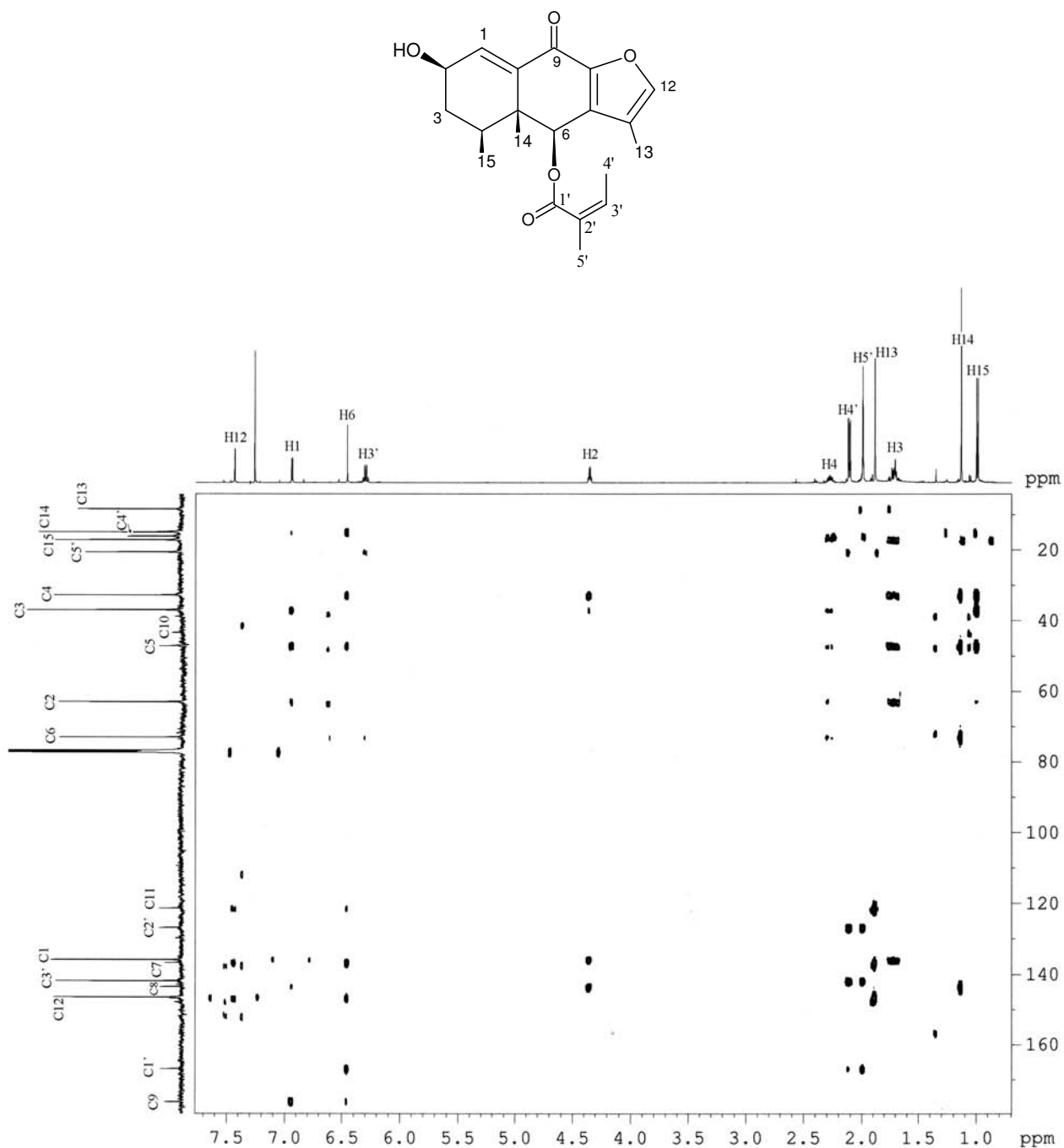


Figura 41. Espectro HMBC que permitió el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia (2,3,4J) del compuesto III.

Con la información que se cuenta hasta el momento se puede decir que se trata de una molécula de naturaleza sesquiterpénica del tipo furanoeremofilano, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5$

(PM: 344), dicha molécula posee 9 grados de insaturación, 3 provenientes de los anillos, 4 dobles ligaduras y 2 pertenecientes a las 2 cetonas.

Para completar la asignación de las señales fue indispensable relacionar la información proveniente de experimento en dos dimensiones homonuclear (COSY) y del bidimensional heteronuclear (HMBC). Este último permitiéndonos el estudio de los acoplamiento ^1H - ^{13}C a larga distancia ($^{2,3,4}\text{J}$) del compuesto en estudio, los cuales se muestran en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Acoplamientos a larga distancia observados en el compuesto III

<i>Posición</i>	HMBC		
	$^2J_{C-H}$	$^3J_{C-H}$	$^4J_{C-H}$
1	2	3	
2	1, 3	4	15
3	2, 4	1, 15	
4	3, 15	6, 2, 14	
5	6, 4, 14	1, 3, 15	
6		4, 14	
7	6	12, 13	
8			1
9		1	6
10			
11	12, 13	6	
12		13	6
13			
14		6	1, 15
15	4	3	14
1'		6, 5'	
2'	5'	4'	
3'	4'	5'	
4'			5'
5'		3'	4'

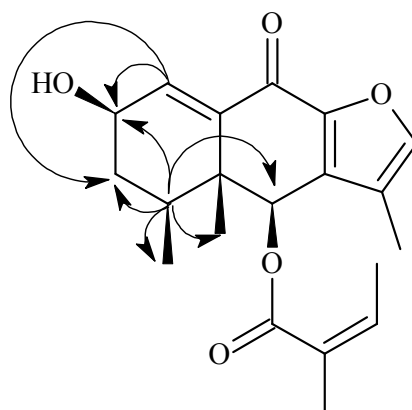


Figura 42. Acoplamiento a larga distancia observado en el compuesto III

Cuadro 7. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del compuesto III (ver condiciones experimentales en la sección 4.1.3.2)

CDCl_3
Compuesto III

	RMN ^{13}C	RMN ^1H
1	135.84	6.94 (5.0)d
2a	62.95	4.35 (4.5,4.5,4.5) ddd
3a	36.89	1.71 m
4	32.67	2.27 m
5	47.12	--
6	72.98	6.45 s
7	136.72	--
8	143.5	--
9	176.29	--
10	43.3	--
11	121.39	--
12	146.51	7.44 (1.0) d
13	14.73	1.88 (1.0) d
14	14.88	1.13 s
15	17.12	0.99 (6.5) d
1'	166.89	--

2'	126.79	--
3'	141.84	6.30 (1.5,7.5) cc
4'	16.06	2.11 (1.5,7.5) dc
5'	20.54	1.99 (1.5) q

La configuración β del grupo hidroxilo en la posición C2 se determinó a partir de las constantes de acoplamiento observadas para los protones en C2 y C3 con un valor de 4.5 Hz, por lo que evidenciaron una interacción axial-ecuatorial y una ecuatorial-ecuatorial (Lambert, et.at., 1998).

Constantes Físicas:

Compuesto	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$	Aspecto	UV (nm)
2 β -hidroxi-neoadenostilona	-117.5 (c 0.08, CH ₂ Cl ₂)	Aceite amarillo	239 Y 281

6. Conclusiones

- I. El análisis fitoquímico de las partes aéreas de la especie *Packera bellidifolia* (H.B.K.) Weber & Love permitió establecer que los principales constituyentes del extracto hexánico son los sesquiterpenos de tipo furanoeremofilano.
- II. Se identificaron y caracterizaron dos sesquiterpenos novedosos que corresponden a la 10 β -hidroxifuranoeremofilan-1,6-diona y a la 2 β -hidroxineoadenostilona, aportando así mayor conocimiento sobre el perfil químico del contenido metabólico de la especie *Packera bellidifolia*.
- III. Se identificó también a la neoadenostilona, previamente aislada de *Packera bellidifolia* y *Packera candidísima*.
- IV. Estos constituyentes de naturaleza sesquiterpénica pueden ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos para la identificación cromatográfica de la droga cruda conocida como té milagro, aunque es necesario continuar con el estudio de otras especies de este complejo.
- V. La utilización de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el aislamiento de los furanoeremofilanos constituye el punto de partida para la implementación futura de un procedimiento analítico que permita la estandarización, identidad y calidad del té milagro.

7. Referencias

- Bah, M., (1992) *Determinación del Contenido Alcaloideo de la Packera candidissima (Greene) Weber & Love Mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas*, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México.
- Bah, M., Bye, R., Pereda-Miranda, R., (1994) Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the Mexican medicinal plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae), *J. Ethnopharm.*, **43**, 19-30.
- Bain, F., Golden, L., (2000) A Phylogeny of *Packera* (Senecioneae; Asteraceae) Based on Internal Transcribed Spacer Region Sequence Data and a Broad Sampling of Outgroups, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16**, 331-338.
- Barkley, T.M. (1978) *Senecio*, *North American Flora*. Ser. II, Part 10, 50-139.
- Barkley, T.M. (1986) *Senecio in Great Plains Flora Association, Flora of the Great Plains*, Lawrence, K.S. University Press of Kansas, 93-99 pp.
- Barkley, T.M., Clark, B.L., Funston, A.M., (1996) Proceedings of the International Compositae Conference, *Key Gardens, 1994*, Hind D.J.M. Editor, *Royal Botanical Gardens Kew*, **1**, 613-620.
- Barnés, J., (2003) Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I, Regulation and Quality, *Journal of Clinical Pharmacology*, **55**, 226-233.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Berger, D., Suwita, A. (1979) Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten, *Phytochemistry*, **18**, 79-93.

-
- Bohlmann, F., Zdero, C., Jakupovic, J., Grenz, M., Castro V., King, R., Robinson, H. (1986) Further Pyrrolizidine Alkaloids and Furoeremophilanes from *Senecio* Species, *Phytochemistry*, **25**, 1151-1159.

 - Bremer, K. (1994) *Asteraceae. Cladistics & Classification*, Ed. Timber Press, USA, 13-35, 61-70, 112,143 pp.

 - Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*, 2a Edición, Lavoisier, NY, 463-471 pp.

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

 - Calixto, J.B.,(2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 179-189.

 - Castillo, M. A. (2001) *Monografía sobre Sesquiterpenos, Diterpenos y Sesterterpenos, Manuales 5, 6 y 7 de una serie de 13 sobre Productos Naturales*, Tesis de Licenciatura en Química, UNAM, FES Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex.

 - Castro, E., (2007) *Determinación del contenido de pirrolizidinas hepatotóxicas en el té milagro*, Tesis de Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México.

 - Cifuentes E., Ortega, M. (1990) *Herbolaria y Tradiciones Etnomédicas en un pueblo Nahua*, Coordinación de la Investigación Universitaria, 1ª Edición, 7-15 pp.

 - Cordell, G. (1995) Changing strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612.

-
- Cronquist, A. (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*, Ed. Columbia University, Press, USA, 1-20, 851-855, 911,912, 920-924 pp.
 - Domínguez, S. (1990) *Phytochemistry Methods Frontiers, Special Supplement, Revista Latinoamericana de Química*, 10, 21.
 - Emmart, E.W. (1940) *The Badianus Manuscript (Cosex Barberini, latin 241) Vatican Library. An Aztec Herbal of 1552*. The Johns Hopkins Press: Baltimore, 341 pp.
 - Espinoza, M. (2000) *Estudio Químico y Biológico de dos especies vegetales empleadas en la Medicina Tradicional: Aloysia triphilla y Cirsium jorullense*, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM, Facultad de Química, México, 2, 3, 85, 86 pp.
 - Figueroa, G., (2007) *Caracterización de los componentes lipofílicos del té milagro*, Tesis de Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México.
 - Gaedcke, F. And Steinhof, B.(2003) *Herbal Medicinal Products*, Medpharm., Stuttgart, 200pp.
 - Garduño, M. L., Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., Linares, E., y Delgado, G. (2001) *New Eremophilanes from the Roots of Psacalium radulifolium*, *J. Nat. Prod.*, **64**, 432-435.
 - Hamburger, M., and Hostettmann, K., (1991) *Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine*, *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
 - Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortíz de Montellano, B., Rodríguez, E. (1998) *Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae)*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 539-565.

- Hostettmann, et.al., (1995) *Strategy in the search for new biologically active plant constituents. Phytochemistry of plant used in traditional medicine*, Ed. Oxford University Press, Estados Unidos, 1-45 pp.
- Jeffrey, C., (1992) The tribe Senecioneae (Compositae) in the Mascarene Islands with an annotated world check-list of the genera of the tribe. *Notes of Compositae: IV, Kew Bull*, **47**, 49-109.
- Knôš, W., Reuter, B., (1998) Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: Occurrence and future prospects, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **73**, 45-52.
- Lambert J.B., et. al., (1998) *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice Hall, E.U.A., 72, 73 pp.
- Lixin, Z., et. al., (2005) *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press, E.U.A., 197-205 pp.
- Lozoya, X., et. al., (1999) *Phytofarmaceuticals and the medicine of the new century*, Symposium 3, IMSS Farmasa, Schawebe, The Phytofarmaceuticals of the next century, México, 19-32 pp.
- Martínez, M., (1987) *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*, Fondo de Cultura Económica, México, 665,1215 pp.
- Martínez, M., (1989) *Las Plantas Medicinales de México*, México, 6ª Edición, Botas, 385-387 pp.
- Mata, R., (2000) *Curso Teórico de Farmacognosia*, 2ª versión, UNAM, Facultad de Química, México.

-
- Mc Coy, J.W., Roby, M.R., Stermitz, F.R., (1983) Analysis of plants alkaloid mixtures by ammonia chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Natural Products*, **46**, 894-900.

 - Morales, G., Bórquez, J., Mancilla, A., Pedreros, S., (1986) Constituents of *Chersodoma jodopappa*, *Journal of Natural Products*, **49**, 1140-1141.

 - 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

 - Penso, G., (1983) *Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum*, Organizzazione Editoriale Farmaceutica Milano.

 - Pérez, C., Arciniegas, A., Martínez, F., Márquez, C., Villaseñor, J., Romo de Vivar, A. (2001) Chemical Constituents of *Packera coahuilenses* and *Packera bellidifolia*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 203-206.

 - Pérez, L, Vidales, P., Cárdenas, J., y Romo de Vivar, A., (1991) Eremophilanolides from *Senecio toluccanus* var. *Modestus*, *Phytochemistry*, **30**, 905-908.

 - Pettit, G.R., Einck, J.J., Brown, P., Harvey, T.B., Ode, R.H., Pase, C.P., (1980) *Journal of Natural Products*, **43**, 609-616.

 - Reis, A., Siri, V., (1973) *Drugs and foods from Little-Known Plants. Notes on Harvard University Herbaria*, Cambridge, Harvard Univ. Press. 363 p.

- Rohdich, F., (2003) Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of ispDEFGH genes and their cognate enzymes, *Pure Appl. Chem.*, **75**, 393-405.

- Romero, A., Zeinstege, P., Teibler, P., Montenegro, M., Ruiz de Torrent, R., Ríos, E., Acosta de Pérez, O. (2001-2002) Lesiones hepáticas inducidas por componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones, *Rev. Vet.*, *12/13: 1 y 2*, 15-17.

- Romo de Vivar, A., Pérez-Castorena, A.L., Arciniegas, A., Villaseñor, J.L., (2007), Secondary Metabolites from Mexican Species of the Tribe Senecioneae (Asteraceae), *Journal of the Mexican Chemical Society*, **51(3)**, 160-172.

- Wagner, H., Horhammer, L., (1971) *Pharmacognosy and Phytochemistry*, Springer-Verlag, Berlín, 93-106 pp.

- Weber, W.A., y Löve, A., (1981) New Combinations in the Genus *Packera* (Asteraceae), *Phytologia*, **49**, 44-50.

- Zumlefer, W. B., (1994) *Guide Flowering Plant Families*, Ed. Champel Hill & London, USA, 203-209 pp.