



**UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**

**DE UN DERIVADO NATURAL DE
HELIOTRIDINA AISLADO DE
*CHROMOLAENA PULCHELLA***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A:

ANAYELI MARTÍNEZ SIMÓN



ASESOR:

D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ

HURTADO

Morelia, Michoacán. Junio, 2012.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Síntesis Química del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D.Q Mario Armando Gómez Hurtado y con el apoyo económico 2.40 otorgado por la CIC-UMSNH.

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Farmacognosia y Alcaloides	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Alcaloides pirrolizidínicos	5
2.1.1 Estructura general de los alcaloides pirrolizidínicos	5
2.1.1.1 Necina	6
2.1.1.2 Ácido néxico	6
2.2. Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos	7
2.3 Metabolismo y toxicidad	9
2.4 Farmacología	12
2.5 Asteraceae	14
2.6 Género <i>Chromolaena</i>	15
2.7 <i>Chromolaena pulchella</i>	17
2.7.1 Descripción morfológica	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. METODOLOGÍA	20

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	21
6.1. Colecta e identificación de la especie	21
5.3. Obtención de los extractos	21
5.4. Extracción selectiva de alcaloides	21
5.5. Análisis químico del extracto crudo de alcaloides	21
7. CONCLUSIONES	32
8. PARTE EXPERIMENTAL	33
8.1. Procedimientos generales	33
8.2. Muestra vegetal	33
8.3. Extracción y aislamiento	33
9. BIBLIOGRAFÍA	35

δ	Desplazamiento químico
$\Delta\delta$	Diferencia de desplazamiento químico
$[\alpha]_D^{25}$	Rotación Específica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A.C.	Asociación civil
Ac	Grupo acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
<i>c</i>	Concentración
<i>C.</i>	<i>Chromolaena</i>
cm	Centímetro
COSY	Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlación homonuclear)
DHP	Dehidro pirrolizidina
EMIE	Espectro de masas por impacto electrónico
eV	Electrón volt
Et	Grupo etilo
Exp.	Experimental
FMO	Flavin monooxigenasa
GST	Glutación S-transferasa
Hz	Hertz
int. rel.	Intensidad relativa
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenosa
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
M	Metro
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz

mL	Militros
mm	Milímetro
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida
Nu	Nucleófilo
No.	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de iones de hidrógeno
ppm	Partes por millón
®	Marca registrada
R _f	Relación de frente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PA	Pyrrrolizidine Alkaloid (alcaloide pirrolizidínico)
T.A.	Temperatura ambiente
TMS	Trimetilsilano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VOD	Enfermedad veno-oclusiva



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Farmacognosia y Alcaloides.

Se conoce que las plantas medicinales constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos que pueden ser utilizadas como principios activos y que en algunos casos son extraídos directamente para su empleo en terapéutica, y en otros son la base para la obtención por síntesis de fármacos análogos. Los alcaloides forman un grupo de productos naturales particularmente interesante por su diversidad estructural y el abanico de sus actividades farmacológicas, lo que hace de ellos uno de los grupos más importantes para la búsqueda de nuevos principios activos.¹ De estos compuestos nitrogenados de origen natural, se han descrito sus aplicaciones desde analgésicos potentes como la morfina (**1**), hasta antitumorales exitosos en el tratamiento contra distintas clases de cáncer, un ejemplo de ello el paclitaxel (taxol[®]) (**2**) y cabazitaxel (Jevtana[®]) (**3**), siendo este último aprobado y comercializado a partir de 2010 (Figura 1.1).²

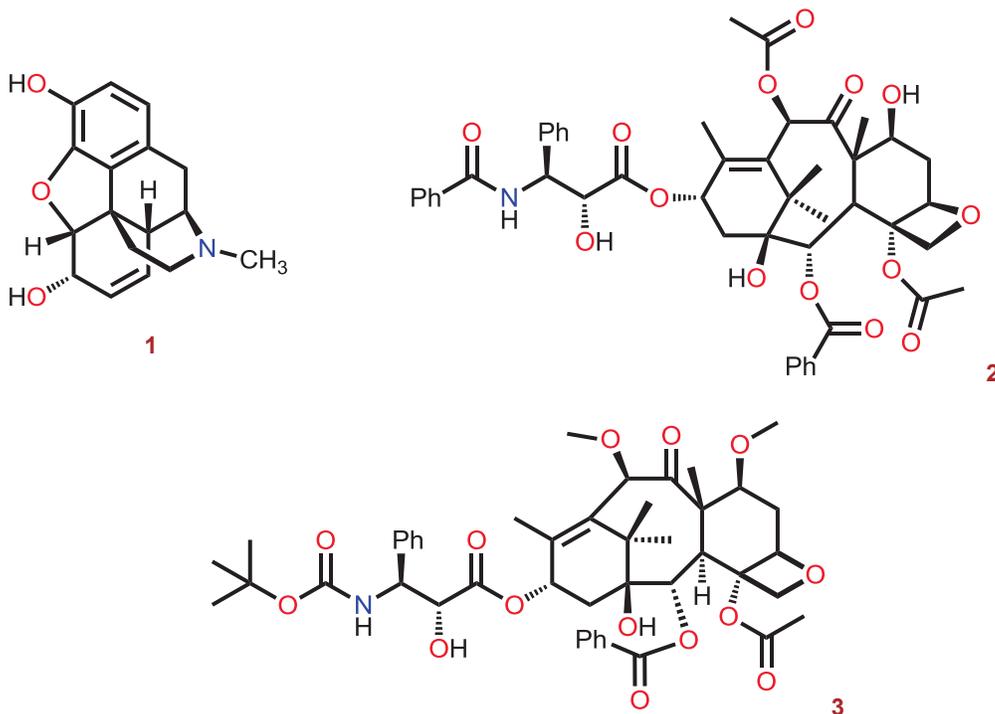


Figura 1.1. Alcaloides de uso terapéutico.



Un alcaloide es un compuesto orgánico nitrogenado de origen natural, encontrado en vegetales, hongos, bacterias, así como en especies marinas y presentan propiedades farmacológicas a bajas dosis. Se debe señalar que esta definición excluye el criterio de actividad, haciendo hincapié en que no importa que el compuesto administrado a dosis suficiente tendrá un efecto sobre un organismo vivo. Desde el punto de vista semisintético, estos compuestos desempeñan un valioso papel en la obtención de fármacos.³

En su estructura química uno o más átomos de nitrógenos están presentes, lo cual le confiere su carácter básico por lo que de ahí deriva su nombre (*alkali*= base) aunque existen alcaloides neutros y aminas cuaternarias. Estos compuestos se clasifican en varios grupos de acuerdo a los aminoácidos involucrados en su biosíntesis dentro de los cuales están los tropánicos, pirrolizidínicos, piperidínicos y quinolizidínicos (la ornitina y lisina); feniletilamínicos e isoquinoleínicos (ácido nicotínico, tirosina y fenilalanina); indólicos y quinoleínicos (triptófano); quinazolininas (ácido antranílico) e imidazólicos (histidina). Otros compuestos que también intervienen en la biosíntesis de alcaloides son el ácido shikímico, acetato y fosfato de deoxixilulosa. También es conocido que en ocasiones un átomo de nitrógeno es donado por un aminoácido a un grupo shikimato, acetato o a un terpenoide lo que da origen a “pseudoalcaloides”.^{4,5}

Si bien la noción de alcaloide es relativamente reciente, el conocimiento de la toxicidad, las propiedades de las plantas y de las drogas que poseen alcaloides es muy antiguo; entre las plantas conocidas por su actividad farmacológica y su acción toxicológica se encuentran: el opio el cual contiene a **1**, la planta de coca de donde se obtiene cocaína (**4**), el acónito que biosintetiza aconitina (**5**), la belladona la cual contiene atropina (**6**), el colchico que presenta colchicina (**7**), la quina que sintetiza quinina (**8**), la ipecacuana la cual contiene emetina (**9**), entre otras, las cuales se utilizan desde hace siglos. (Figura 1.2).

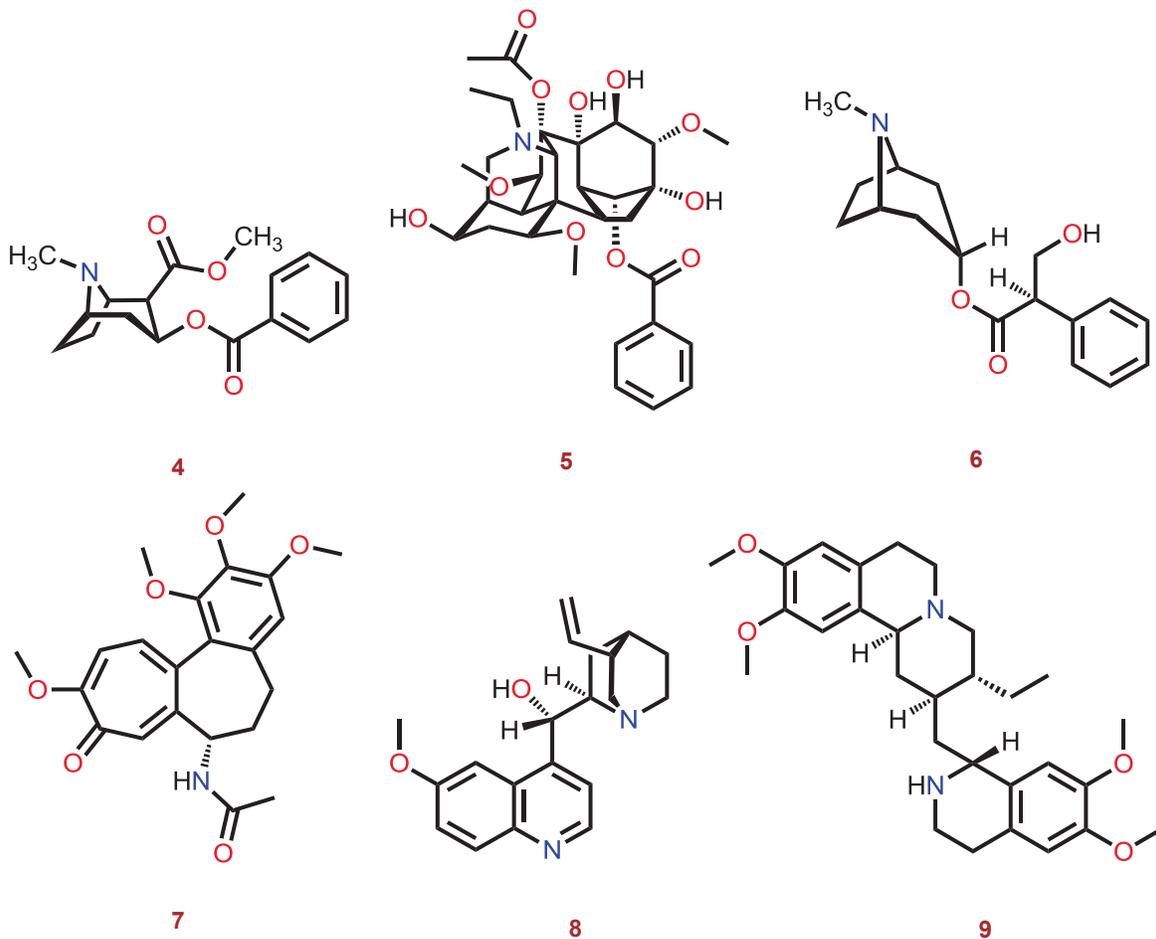


Figura 1.2. Alcaloides de especies vegetales con actividad biológica.

A lo largo de la primera mitad del siglo XIX se aislaron los primeros alcaloides. Derosne en 1803, fue el primero en obtener un álcali de origen natural; a partir de extractos del opio extrajo a **1**; la cuál fue aislada posteriormente por Sertürner en 1805 a partir de *Papaver somniferum*. Entre 1817 y 1820 Pelletier y Caventou aislaron la estricnina (**10**) de la nuez vómica y a **8** de la corteza de quina. Posteriormente se aisló coniina (**11**).¹

Además, es importante señalar que los primeros pasos de la farmacología experimental se iniciaron con el estudio de alcaloides. Magendie (1783-1855) fue el primero en estudiar la actividad farmacológica de algunos de estos compuestos en animales de experimentación; centró principalmente sus trabajos en **10**, que es un estimulante neuronal muy tóxico y se utiliza todavía como raticida. Otros

ensayos también fueron desarrollados, como los de Claude Bernard (1813-1878) quien estudió la actividad farmacológica de compuestos nitrogenados como los que se encuentran en el curare, la nicotina del tabaco y alcaloides del opio. Por otra parte, el primer alcaloide que se sintetizó fue **11** en 1886 (Figura 1.3).⁶

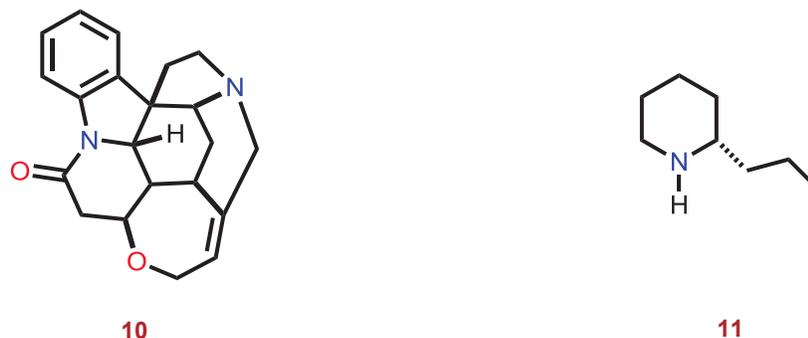


Figura 1.3. Primeros alcaloides con estudio farmacológico aislado de especies vegetales.

A partir de los compuestos aislados por Pelletier y Caventou, entre 1817 y 1820, se buscó determinar la elucidación estructural de estas moléculas lográndose solamente en **11**, por Schiff en 1870, en otros casos, como el esqueleto policíclico de estricnina **10** hubo que esperar hasta la segunda mitad del siglo XX, casi 130 años más. En la actualidad las avanzadas técnicas espectroscópicas y la espectrometría de rayos X, permiten abordar las estructuras más complejas.^{1,7}



2. ANTECEDENTES

2.1 Alcaloides pirrolizidínicos.

Los alcaloides pirrolizidínicos (PAs), representan una clase de compuestos, pertenecientes a metabolitos secundarios, producidos por numerosas especies de plantas. Se han aislado principalmente dentro de las familias Asteraceae, Boraginaceae y Fabaceae; y más esporádicamente en las familias Aponaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Poaceae, Santalaceae.^{8,9}

2.1.1 Estructura general de los alcaloides pirrolizidínicos.

La gran mayoría de estos son ésteres formados entre aminoalcoholes y uno o dos ácidos alifáticos carboxílicos.

Los aminoalcoholes, designados también con el nombre de necinas, derivan de la pirrolizidina, siendo el nitrógeno el responsable del carácter alcalino que por lo general estos presentan; esta propiedad se encuentra estrechamente ligada a la disponibilidad del par de electrones libres del nitrógeno, los agrupamientos electro-atrayentes al átomo de nitrógeno disminuyen la basicidad y los agrupamientos electro-donadores la exaltan.

En general los alcaloides pirrolizidínicos constan de dos partes, la necina (amino alcohol) que es la base, y el ácido néxico (Figura 2.1).^{1,10}

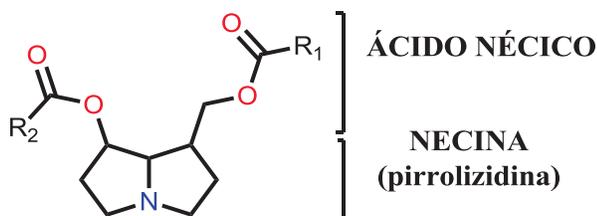


Figura 2.1. Estructura general de los alcaloides pirrolizidínicos.

2.1.1.1 Necina.

Está basada en dos anillos que comparten un átomo de nitrógeno (azabíciclo). En la naturaleza por lo general los anillos tienen como sustituyentes grupos hidroximetileno en la posición C-1 y grupos hidroxilos en C-7; las bases de necinas más comunes (**12-19**) se muestran en la figura 2.2.^{11,12}

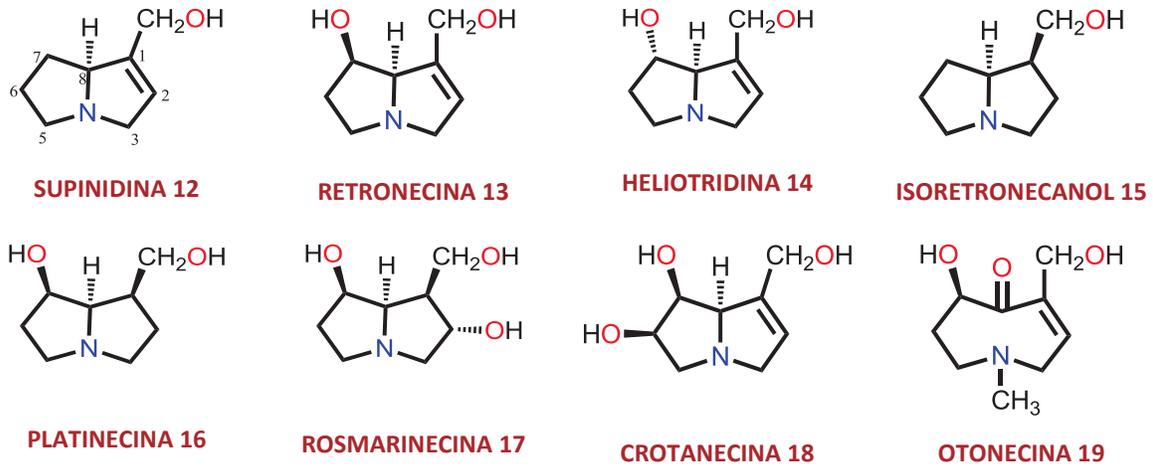


Figura 2.2. Ejemplo de núcleos de necinas.

2.1.1.2 Ácido néxico.

Se denomina así a cualquier ácido esterificado a un núcleo de necina. Comúnmente, los ácidos son alifáticos de C-5, C-7, C-8 o C-10, a veces son simples, normalmente son específicos de este tipo de alcaloides. Pueden ser ácidos mono o di-carboxílicos con cadenas de carbono ramificadas, teniendo como sustituyentes hidroxilo, epoxilo, carboxilo, metoxilo u otros grupos alcoxilo. Por lo tanto, puede tener numerosos derivados estereoisómeros. Los más comunes que se han detectado en alcaloides pirrolizidínicos se muestran en la figura 2.3.^{1,13}

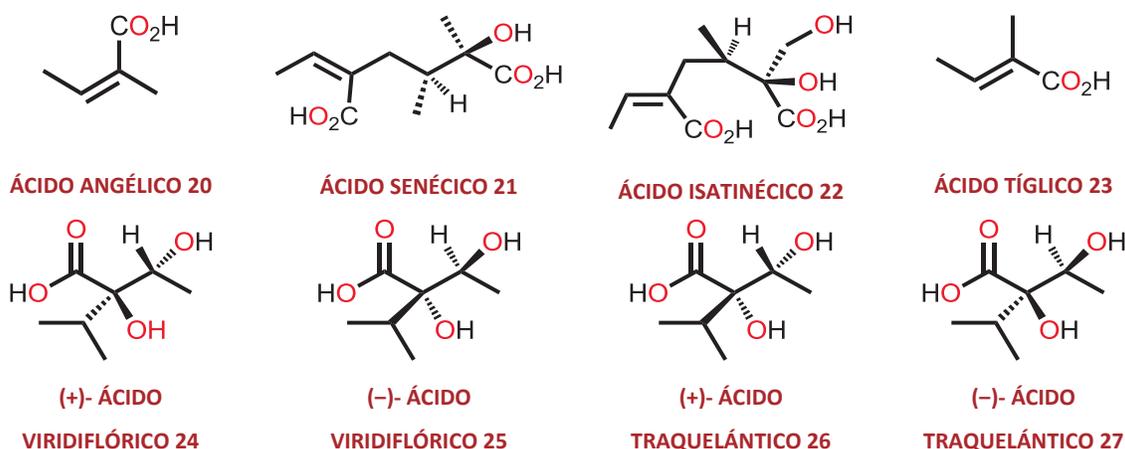
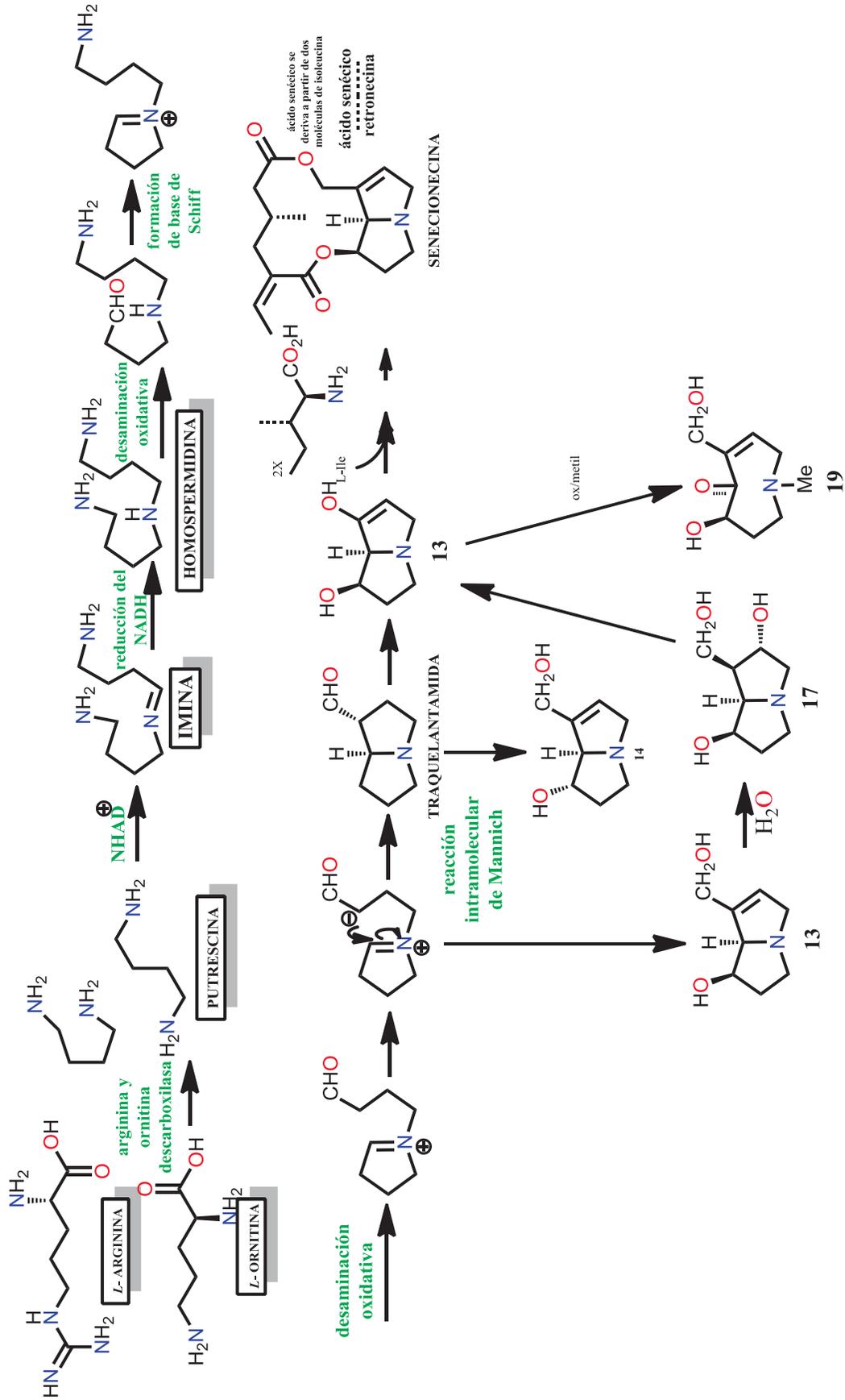


Figura 2.3. Ácidos nécticos comunes en alcaloides pirrolizidínicos.

2.2. Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos.

Los primeros estudios con trazadores realizados en los laboratorios de Robins y Spenser mostraron que el esqueleto de carbono de la base necina se origina de los aminoácidos *L*-ornitina y *L*-arginina. La biosíntesis comienza con la descarboxilación de estos aminoácidos por la acción de arginina y ornitina descarboxilasa que conduce a la formación de putrescina que es catalizada por la homospermidina sintetasa, una enzima que cataliza la transferencia de un grupo diaminobutil ya sea putrescina o espermidina a una segunda putrescina. Dos moléculas de putrescina se condensan en un Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD⁺)-dependiente de reacción para dar la imina, que se convierte luego en homospermidina por reducción de Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido (NADH). Tanto la putrescina y espermidina directamente proporcionan el esqueleto C₄N, este intermediario simétrico se cicla siguiendo una secuencia clásica de desaminación oxidativa, formación de una base de Schiff, nueva desaminación oxidativa y reacción intramolecular de Mannich generando necinas dihidroxiladas. La hidroxilación posterior y deshidratación genera a **13** que suele ser un componente básico de los alcaloides de pirrolizidina. Por otro lado, los alcaloides de tipo **19**, se produce a partir de **13** presumiblemente por hidroxilación adicional y la formación de un grupo cetónico con escisión simultánea del enlace NC y N-metilación (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Biosíntesis de alcaloides pirrolizidínicos.

Los ácidos néricos se derivan de aminoácidos alifáticos como isoleucina, treonina y valina a partir de una descarboxilación y desaminación para permitir, por ejemplo ácidos C-5 tales como **20** o **21**. Los alcaloides de pirrolizidína del tipo *N*- óxido de licopsamina (**28**) contienen un único ácido alifático heptacarbonado (Figura 2.4). En la biosíntesis de senecionina (**29**), el ácido dicarboxílico C-10, se deriva de dos moléculas de isoleucina, las cuales se esterifican a **13**. El ácido traquelántico proviene de la rama de la biosíntesis de valina.¹⁴⁻¹⁶

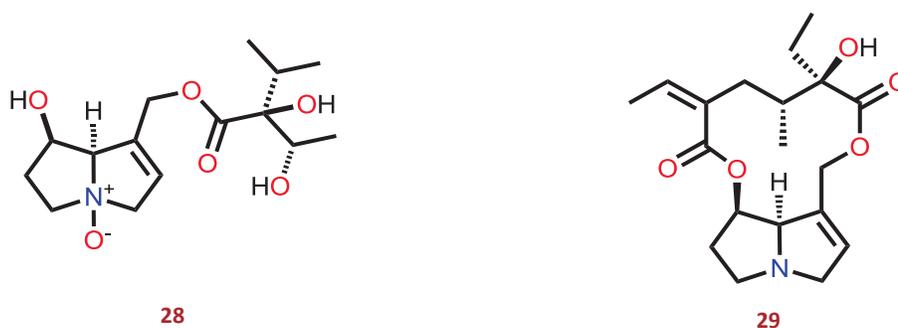


Figura 2.4. Pirrolizidínas mono- y disustituidas.

2.3 Metabolismo y toxicidad.

Aunque se conoce desde hace varias décadas que los alcaloides pirrolizidínicos son genotóxicos,* no todos ellos poseen esta actividad. Existe una relación estructura-actividad relativa de toxicidad. Por regla general, los monoésteres son menos tóxicos que los diésteres acíclicos y éstos menos tóxicos que los diésteres macrocíclicos. Para poseer toxicidad, el alcaloide debe estar deshidrogenado en la posición 1,2 y al menos monoesterificado (figura 2.5). Los verdaderos responsables de la toxicidad son los derivados pirrólicos que resultan de la oxidación de las

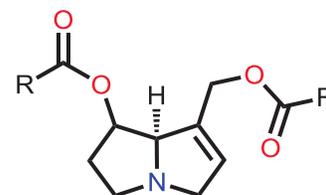


Figura 2.5 PA tóxico.

* Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las [enzimas](#) involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, [mutaciones](#) que pueden o no desembocar en un cáncer.¹⁷

pirrolizidinas a nivel de los microsomas hepáticos; estas estructuras pirrónicas se comportan como agentes alquilantes frente a macromoléculas nucleicas y proteicas. Se ha establecido que la hidrólisis del grupo éster de los alcaloides de pirrolizidina para formar la base necina es una vía de desintoxicación y esta vía es catalizada por el hígado mediante enzimas carboxiesterasa citosólicas y microsomales. Con respecto al enlace C-O en la posición C-7, tipo **13** y **14**, los cuales son diastereoisómeros, se convierten en los carbocationes ubicados en el C-7 y la reacción del ion carbonio con agua genera una adición en ambos lados del plano de la necina para formar el dehidro pirrolizidina (DHP) racémica. Los metabolitos pirrónicos son capaces de unirse con glutatión para formar conjugados y esta reacción enzimática, catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) puede ser la vía de desintoxicación más importante para la toxicidad inducida por pirrolizidinas.

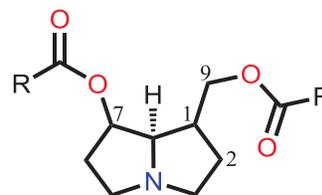


Figura 2.6. PA no tóxico.

Los alcaloides de pirrolizidina tipo **16**, las cuales no contienen un enlace doble en la base, han demostrado no tener características genotóxicas (figura 2.6). Las características estructurales, en particular el impedimento estérico, son factores importantes en la degradación de estas sustancias. El efecto estérico alrededor del grupo funcional éster de la molécula puede inhibir el proceso de hidrólisis enzimática. En general, el grupo éster alílico en algunos compuestos diéster (por ejemplo, **29**), en C-7 se lleva a cabo la hidrólisis más fácilmente que el grupo éster al otro lado de la molécula (C-9); esto es porque el éster alílico en C-7 es menos impedido estéricamente. En el caso del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico ARN, los grupos amino de purina y bases de pirimidina pueden funcionar como nucleófilos (Nu), los cuales se alquilan y los productos resultantes (proteínas y nucleósidos con aductos DHP) no pueden realizar sus funciones normales, a menudo vitales. En el caso del ADN resultan mutaciones causando daño tisular considerable en el hígado y trastornos en los procesos bioquímicos normales, generando así su toxicidad (hepatotoxicidad y tumorigenicidad) (Esquema 2.2).¹⁸⁻²⁰

En 1988 la Organización Mundial de la Salud (OMS), concluyó que en el hombre, el envenenamiento por alcaloides pirrolizidínicos se manifiesta normalmente como una enfermedad veno-oclusiva (VOD) aguda, caracterizada por un dolor continuo sordo en la parte superior abdominal derecha, ascitis con rápida acumulación de líquido dando lugar a distensión abdominal pronunciada y a veces asociada con oliguria y efusión pleural masiva. También puede manifestarse como enfermedad subaguda con síntomas imprecisos y hepatomegalia persistente. Los niños son especialmente vulnerables. Muchos casos progresan a cirrosis y en algunos más se ha demostrado que un sólo episodio de enfermedad aguda progresa a cirrosis, pese a que se ha eliminado del paciente la fuente de exposición tóxica y se le ha administrado tratamiento sintomático. La mortalidad puede ser elevada debido a insuficiencia hepática en la fase aguda o hematemesis por várices esofágicas quebradas producidas por cirrosis.²¹

2.4 Farmacología.

Aunque algunos de los alcaloides pirrolizidínicos se caracterizan por su toxicidad, se han realizado estudios biológicos con el fin de encontrar en ellos actividad farmacológica logrando esto a diferentes dosis, puesto que de esta depende en muchos casos la actividad farmacológica o tóxica, así mismo su vía de administración debido a que estos alcaloides como tal no son tóxicos, sin embargo al bioactivarse en el hígado podrían serlo. Algunos ejemplos de estas aplicaciones son los siguientes (Figura 2.7):

- **Monocrolatina (30)**. Aislada de *Senecio*. Ha inducido a la hipertrofia ventricular derecha en cobayos recién nacidos, y esto puede servir como modelo para enfermedades humanas congénitas del corazón asociados con la hipertensión pulmonar.²²
- **3'-Acetiltraquelantina (31)**. Aislada de *Heliotropium floridum*, genera moderada actividad antifúngica frente a *Fusarium moniliforme*.
- **Floridinina (32)**. Muestra moderada actividad antifúngica frente a *Fusarium moniliforme*.²³

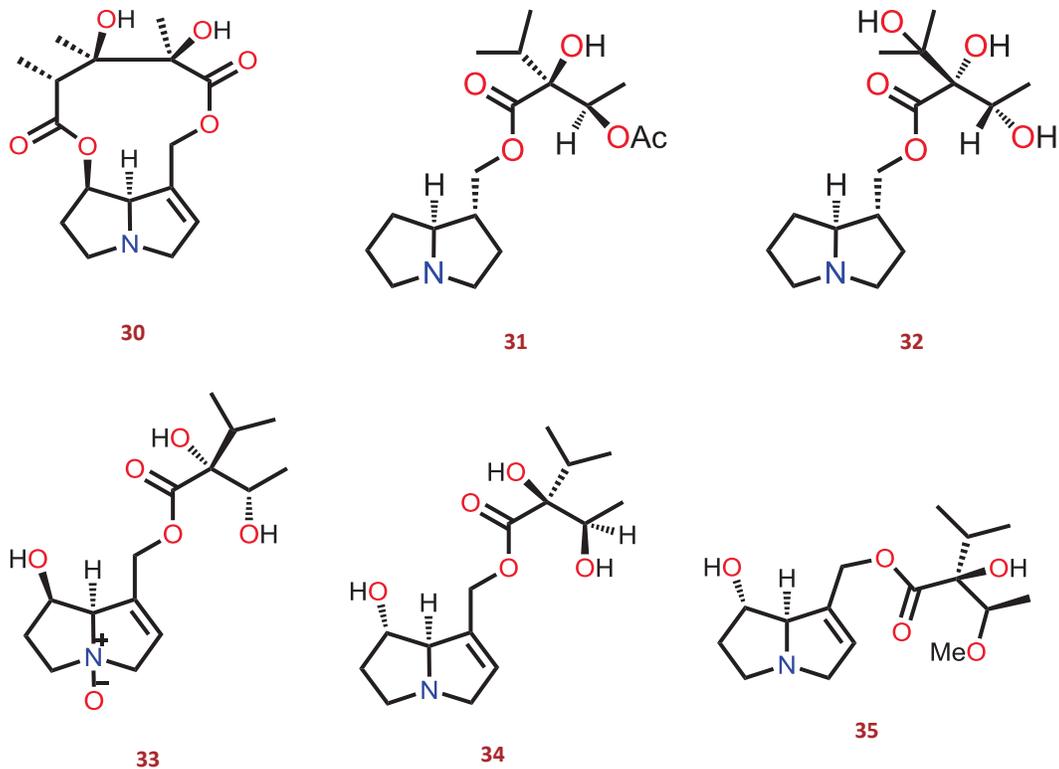


Figura 2.7. Ejemplo de alcaloides con actividad farmacológica.

- En el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), se han realizado estudios clínicos con la indicina (**33**), intermedina (**34**), licopsamina (**28**) y sus respectivos *N*-óxidos contra la leucemia generando resultados significativos. Los principales efectos secundarios vistos hasta la fecha son la mielosupresión severa y hepatotoxicidad. La *N*-óxido de **33** es un fármaco con buena aceptación por parte del paciente, ya que no causa náuseas, vómitos, fiebre, erupciones cutáneas, u otras afecciones vistas con muchos agentes anticancerígenos utilizados en quimioterapia. El mecanismo de la actividad antitumoral de la *N*-óxido de **33** no es claro en este momento. Se ha sugerido que mientras que la reducción de la *N*-óxido de **33** se produce sólo en una pequeña medida después de la administración intra peritoneal (ip) a ratones o conejos, o de la administración intravenosa (iv) en monos o humanos en células hepáticas sanas, podría aumentar la reducción de *N*-óxido de **33** en las células tumorales hipóxicas, lo que lleva a la

especificidad de sitio producción de pirroles metabólicos y la selectividad hacia el tumor que a las células normales.²⁴

- Senecionina (**29**), retronecina (**13**), heliotrina (**35**), y monocrotalina (**30**); han demostrado tener actividad antitriposoma importante.²⁵
- Algunas pirrolizidinas también han sido evaluadas investigadas para su uso como agentes quimioterápicos en infecciones por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).²³

2.5 Asteraceae.

En la familia Asteraceae se ha descrito la presencia de alcaloides de distintas clases como lo son: los derivados de pirrolizidina, piperidina, piridina, tropano, indolizidina, quinolizidina, quinolina, indol, terpénicos, entre otros; así como distintos metabolitos secundarios tales como terpenos y flavonoides. Esta familia se distribuye en todos los continentes excepto en la Antártida.

Esta familia es una de las más exitosas evolutivamente, la continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos de supervivencia (alcaloides, conductos laticíferos, olores, entre otros).

México es el País con más especies de Asteraceae en el mundo y representan el 12-15% de la flora vascular mexicana. Las Asteraceae están distribuidas en todos los biomas de México aunque son especialmente abundantes en zonas con una marcada alternancia entre episodios húmedos y secos.^{26,27}

Los Estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Jalisco y Michoacán cuentan con el 46.6% del total de la población de especies de esta familia en el País y el 72% de esta población es de especies endémicas.^{28,29}

El uso de estas especies en la medicina tradicional es muy amplio; entre estos se encuentran las aplicaciones como antiinflamatorios, antimicrobianos, etc., lo que se ha demostrado en estudios biológicos sobre extractos de estas especies.^{30,31}

De los alcaloides aislados de Asteraceae se han descrito actividades biológicas importantes.^{25,32,34} Aunque esta clase de compuestos (o la mayoría de ellos) son conocidos por su toxicidad, hoy en día se están ensayando biológicamente con el fin de determinar la dosis, efectividad y tiempo adecuado de exposición de estas sustancias para su posible aplicación farmacológica.³⁴ Otras especies de esta familia recientemente han sido exploradas en la identificación de compuestos nitrogenados, como es el caso de *Stevia rebaudiana*, la cual ha demostrado tener alcaloides de naturaleza indolizidínica como la steviamina (**37**)³⁵ lo que promueve la búsqueda de estos metabolitos en el género (Figura 2.8). Algunas especies aunque han sido reportadas como productoras de alcaloides como lo es *Eupatorium semialatum* que produce la tussilagina (**36**), no han sido investigadas ampliamente desde el punto de vista farmacológico a pesar de que se han descrito como especies no tóxicas.³⁶

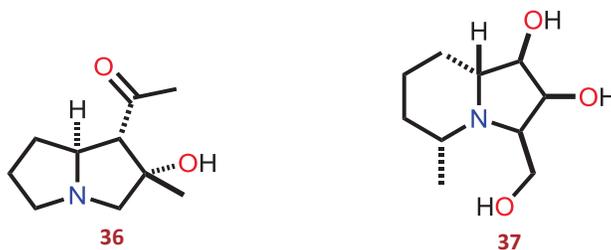


Figura 2.8. Alcaloides aislados de especies de la familia Asteraceae.

2.6 Género *Chromolaena*.

Uno de los géneros de Asteraceae es *Chromolaena*, el cual consta de 165 especies y está catalogado dentro de la tribu Eupatorieae.

Del género *Chromolaena* se han aislado diferentes compuestos tales como: triterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, ácidos grasos cíclicos, lactonas sesquiterpénicas, derivados del labdano, *ent*-clerodanos, prostaglandinas provenientes de ácidos grasos libres, germacranólidos y alcaloides pirrolizidínicos.³⁷ De esta última clase de compuestos se han reportado en *C. odorata* los compuestos monosustituidos aislados en forma libre y como *N*-óxidos 7-angeloilretronecina (**38**), 9-angeloilretronecina (**39**), intermidina (**40**), rinderina

(41), licopsamina (28), echatina (42), 3'-acetilrinderina (43) y supinina (44);^{19,38,39} y recientemente en las raíces de *C. pulchella* se encontraron a las pirrolizidinas novedosas denominadas diviriflorato de necina (45) y triviridiflorato de necina (46)⁴⁰ (Figura 2.9).

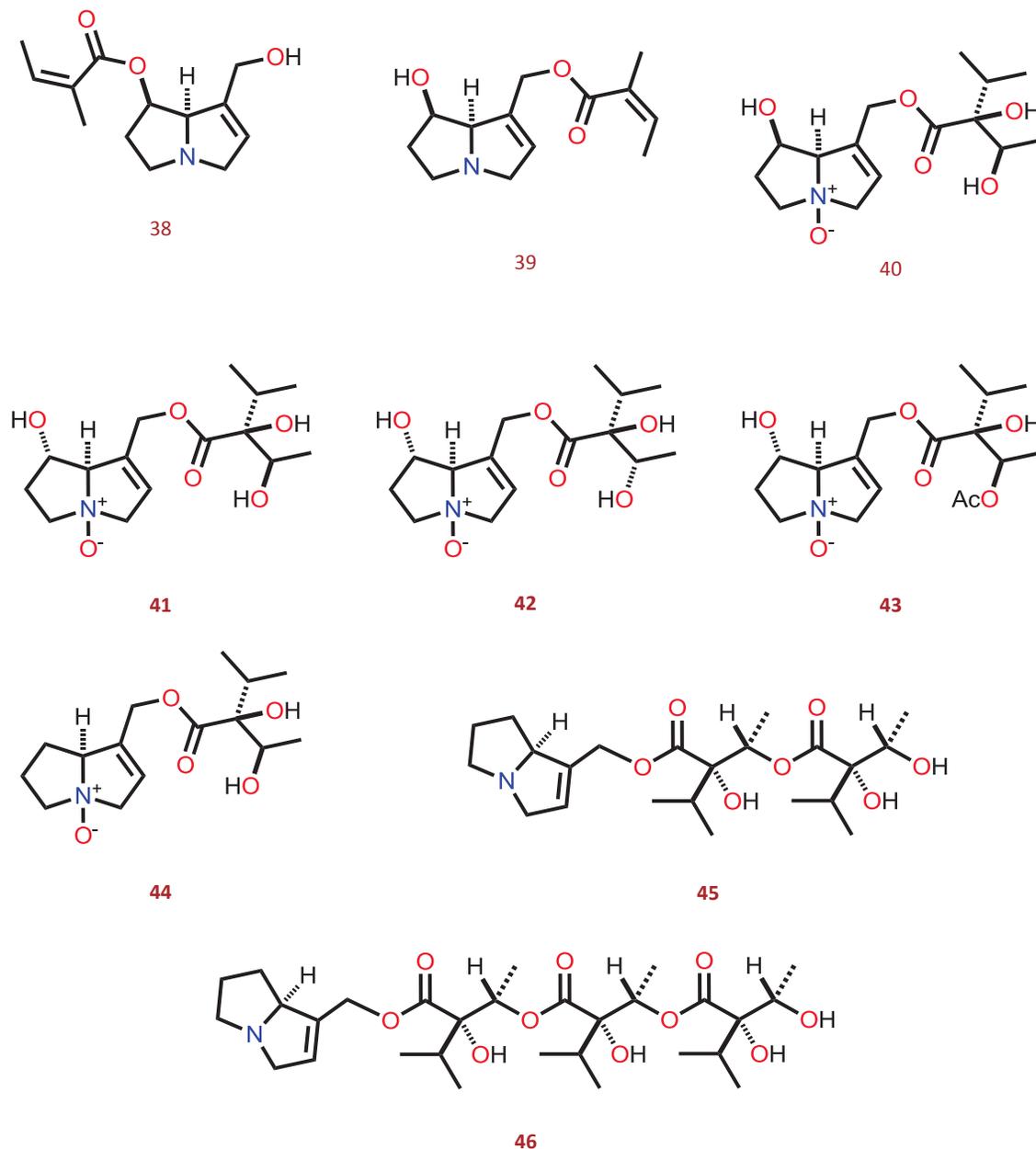


Figura 2.9. Alcaloides aislados de especies del género *Chromolaena*.

2.7 *Chromolaena pulchella*.

2.7.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA:

Hábito y forma de vida: hierba o arbusto.

Tamaño: de hasta 1,5 m de altura.

Tallo: erguido, cilíndrico, de 4 a 5 mm de diámetro, densamente puberulento, café-grisáceo o café-amarillento.

Hojas: alternas, lámina oblongo-lanceolada, de 3 a 6 cm de longitud por 1 a 1,5 cm de ancho, ápice agudo, borde aserrado, base cuneada, haz puberulento, envés pubescente y con abundantes glóbulos resinosos, con un nervio central prominente y dos que salen cerca de la base pero poco conspicuos; peciolo de 2 a 3 mm de largo, pubescente.

Inflorescencia: numerosos capítulos de unos 12 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos pubescentes.

Cabezuela/Flores: involucro cilíndrico, de aproximadamente 8 mm de largo por 3 mm de ancho, ligeramente más corto que las flores, las brácteas dispuestas en cinco series de diferente longitud, las externas ovadas, las internas linear-oblongas, todas con ápice obtuso, verdes con tinte rojizo en el ápice, estriadas, sin pelos, ciliadas. Flores: de 10 a 13;

corola de 5 a 6,5 mm de largo, blanca en la base y morada en el ápice, glabra.

Frutos y semillas: aquenio de 3,5 a 4 mm de largo, piloso en las costillas y cubierto de glóbulos resinosos, vilano del largo de la corola, cerdas blancas con ligero tinte rojizo en el ápice.

Hábitat: de Chihuahua a Guerrero, en el Distrito Federal, Estado de México y Puebla, en sitios con pastizal y bosques de pino y encino.⁴¹⁻⁴³



Imagen 2.1. *Chromolaena pulchella*



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Aislar y caracterizar a los alcaloides presentes en las flores de *Chromolaena pulchella*.

3.2 Objetivos específicos.

-
- Colectar la especie vegetal.
 - Obtener el extracto metanólico de las flores.
 - Obtener el extracto crudo de alcaloides a partir del extracto metanólico de las flores.
 - Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto crudo de alcaloides.
 - Identificar a los compuestos aislados mediante métodos físicos y espectroscópicos.



4. JUSTIFICACIÓN

En la literatura se describen dos reportes de presencia de alcaloides en el género *Chromolaena*; en 1994 se reportan por primera vez compuestos nitrogenados de naturaleza pirrolizidínica en las flores de la especie *C. odorata*. Diecisiete años después, nuestro grupo de investigación reporta pirrolizidinas multisustituidas obtenidas a partir de la raíz de *C. pulchella*.^{19,38-40}

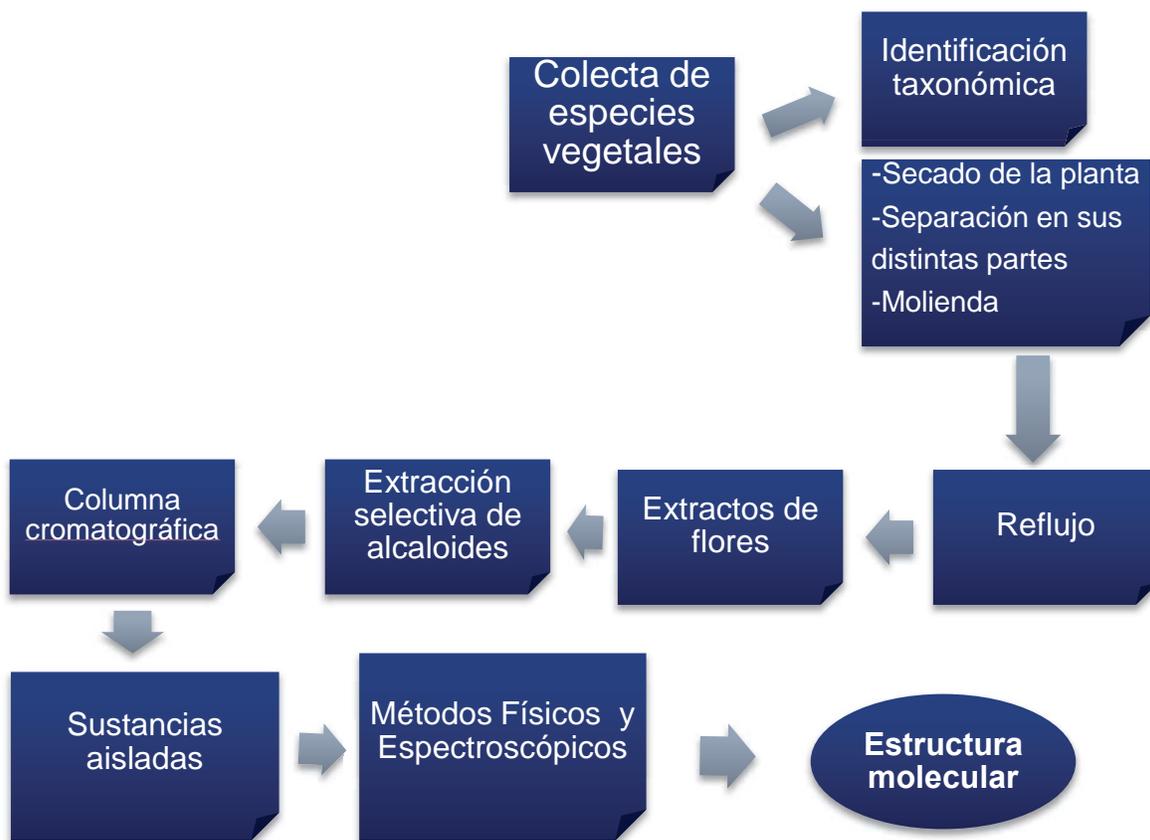
Con base en los antecedentes descritos se plantea encontrar metabolitos secundarios nitrogenados en las flores de *C. pulchella* y resulta interesante determinar la naturaleza y variedad de los alcaloides que pudiesen ser aislados.

El estudio químico de las flores de *C. pulchella* dirigido a la búsqueda de alcaloides permitirá ampliar y enriquecer los conocimientos fitoquímicos del género; de igual manera podrá permitir la obtención de compuestos de interés desde el punto de vista químico y farmacológico.



5. METODOLOGÍA

La metodología que se siguió para el desarrollo del proyecto se muestra en el Esquema 5.1 e involucra la recolección de la especie, su clasificación botánica, el secado de la muestra vegetal, la separación y molienda de las flores, la obtención de extractos con distintos disolventes, la extracción selectiva de alcaloides, la separación mediante métodos cromatográficos y el análisis de las sustancias a partir de métodos físicos y espectroscópicos.



Esquema 5.1. Metodología empleada para el desarrollo del proyecto.



6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1. Colecta e identificación de la especie.

Chromolaena pulchella se colectó el mes de Octubre del 2005 en el kilómetro 61 de la carretera Morelia-Zacapu, cerca del poblado denominado Constitución en el Estado de Michoacán, México. Una muestra se preparó y se envió al Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán (No. 192522) para su identificación botánica por parte del Profesor Jerzy Rzedowski.

6.2. Obtención de los extractos.

La especie se separó en sus distintas partes (flores, hojas, tallos y raíces), se secaron a la sombra durante 15 días, de las flores se obtuvieron los extractos de hexano, diclorometano y metanol por reflujo.

6.3. Extracción selectiva de alcaloides.

Tras realizar una prueba cualitativa de alcaloides en el extracto metanólico de las flores con el reactivo de Dragendorff y confirmar la presencia de éstos, se procedió a su extracción selectiva⁴⁴ con la cual se lograron obtener 730 mg de extracto crudo de alcaloides.

6.4. Análisis químico del extracto crudo de alcaloides.

El extracto crudo de alcaloides fue sometido a separación cromatográfica. De las fracciones 21 y 22 se obtuvo una miel amarilla con R_f de 0.5 a una polaridad de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (7:3) la cual, en su espectro de masas mostró un ion molecular de 300 m/z ; en el patrón de fragmentación se observó un ion de 138 m/z con una intensidad relativa del 100%; esta señal junto con otras más (Figura 5.1) sugirieron la presencia de un sistema pirrolizidínico monoinsaturado (Esquema 5.2)

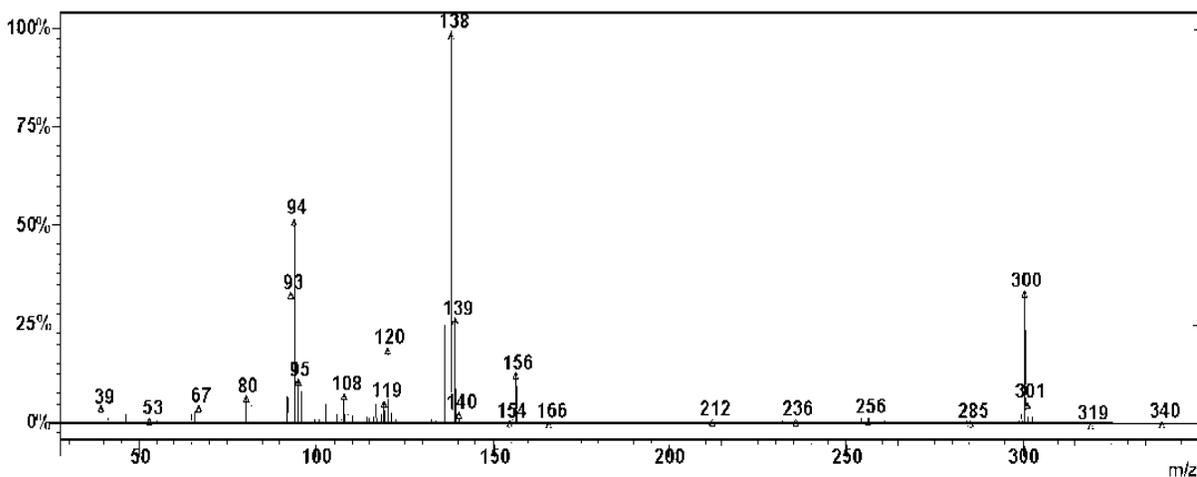
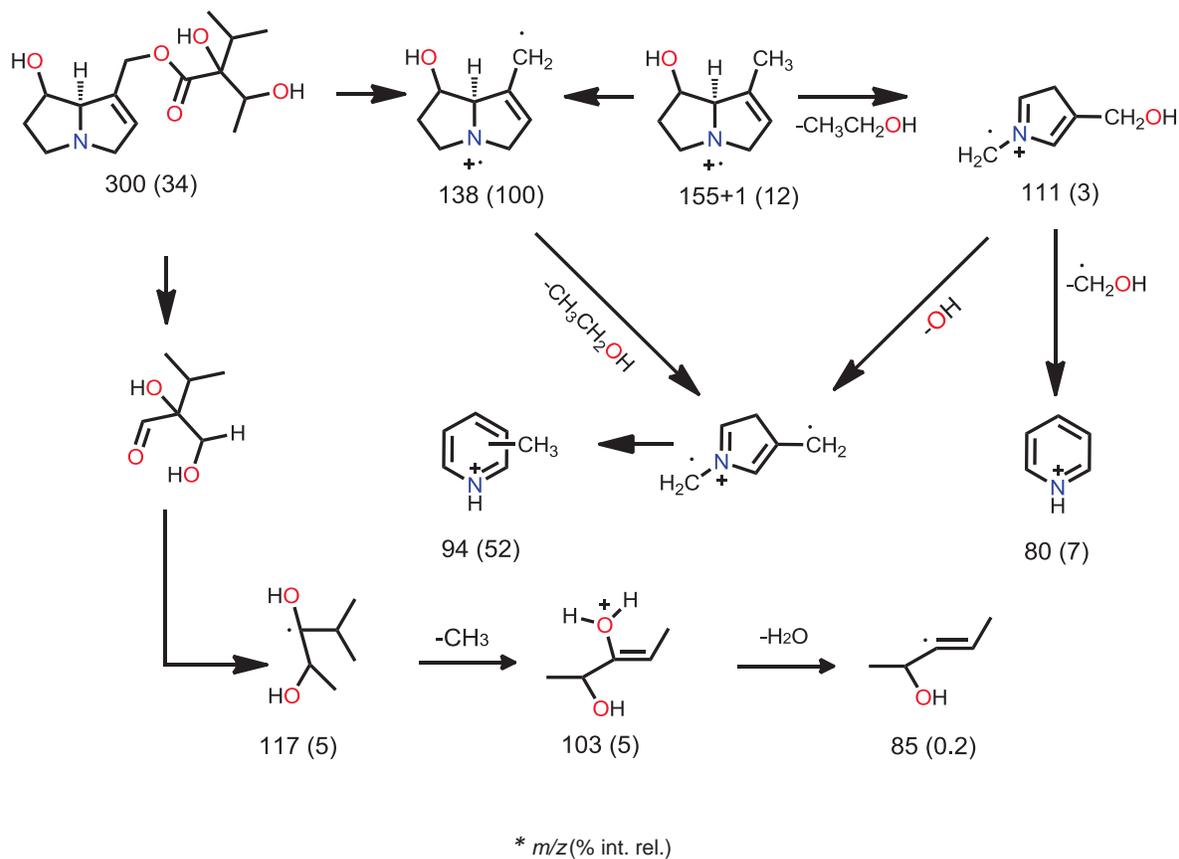


Figura 5.1. Espectro de masas de la fracción 21-22.



Esquema 5.2. Patrón de fragmentación de la fracción 21-22.

En su espectro de RMN de ^1H se apreció una señal simple ancha en 5.74 ppm perteneciente a un protón vinílico, de igual manera en 4.92 y 4.87 ppm se observaron dos señales dobles ($J= 13.2$ Hz) correspondientes a un sistema *AB* de un metileno base de oxígeno; en 4.23 ppm se observó una señal doble de triples ($J= 4.0, 5.6$ Hz), en 4.16 ppm se apreció una señal simple ancha, en 4.13 ppm se observó una señal cuádruple ($J= 6.4$ Hz), en 4.03 ppm apareció una señal doble de cuádruples ($J= 16.0$ y 2.0 Hz), en 3.38 ppm se mostró una señal doble ancha ($J= 16$ Hz), en 3.42 ppm se apreció una señal doble de triples ($J= 10.8$ y 5.2 Hz), en 2.71 ppm se observó una señal doble de triples ($J= 10.8$ y 6.8 Hz), todas estas señales fueron correspondientes a protones base de heteroátomo; en 2.01 ppm se apreció una señal múltiple atribuida a un grupo metileno mientras que en 1.93 ppm se mostró una señal séptuple ($J= 6.4$ Hz) perteneciente a un metino de isopropilo, en 1.22 ppm apareció una señal doble ($J= 6.4$ Hz) correspondiente a un metilo secundario, finalmente se observaron dos señales dobles en 0.95 y 0.94 ppm ($J= 6.4$ Hz) atribuidas a grupos metilo de isopropilo (Figura 5.2). Estos datos demostraron la presencia de un sistema pirrolizidínico 1,2-insaturado, sustituido en la posición C-7 y esterificado en C-9 (Figura 5.2).

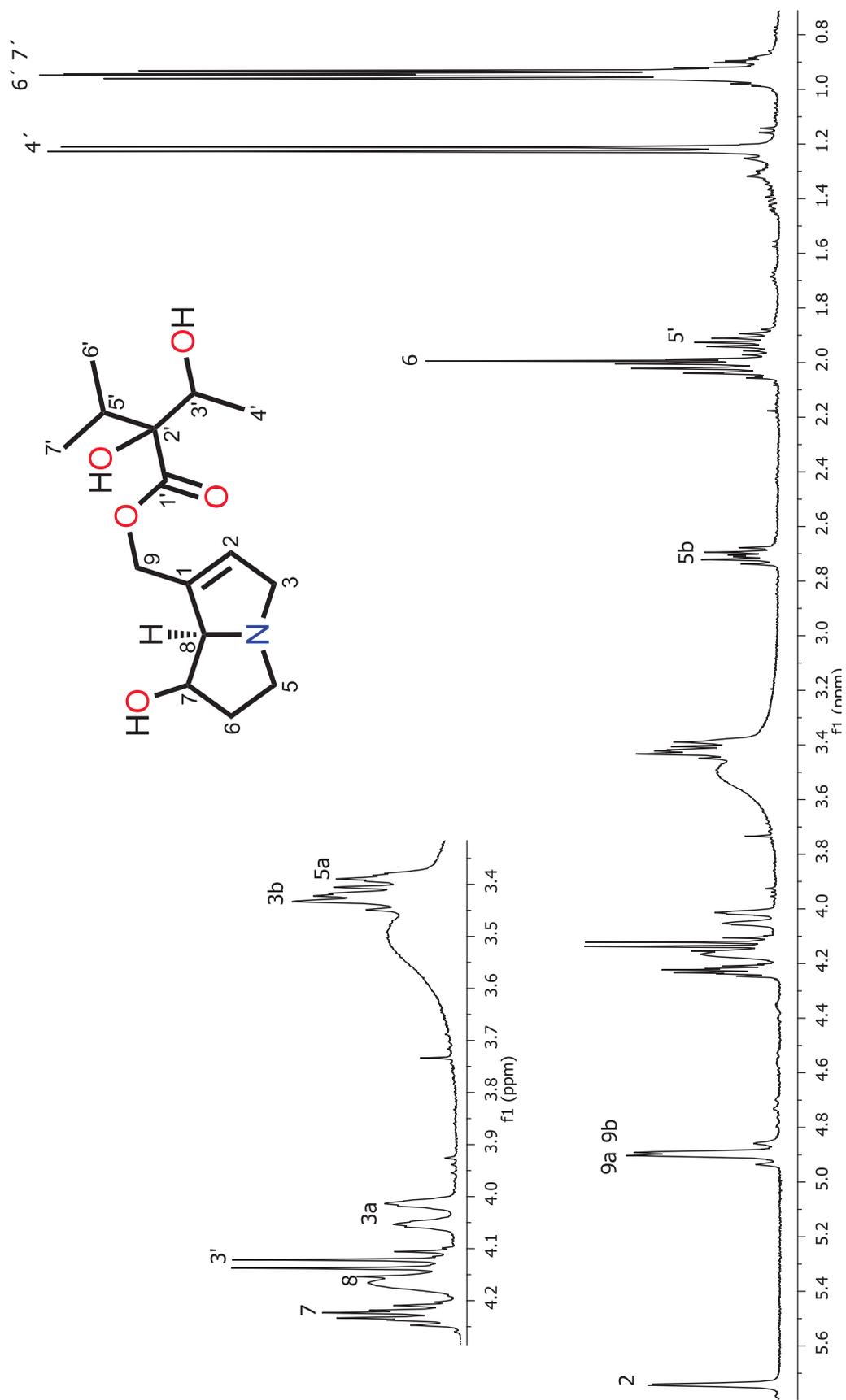


Figura 5.2. Espectro de RMN ^1H de la fracción 21-22 (400 MHz, CDCl_3).

En el espectro bidimensional COSY se apreciaron correlaciones que confirmaron la presencia de un núcleo necina (Figura 5.3) así como las correlaciones correspondientes a un grupo isopropilo presente en el ácido néxico que esterifica al azabicyclo (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Correlaciones observadas en espectro COSY.

H (δ en ppm)	Correlación H-H
H-2 (5.74)	9a*, 9b*, 8*, 3a, 3b
H-3a (3.38)	8*, 3b
H-3b (4.03)	8*, 3a
H-5a (2.71)	6, 5b
H-5b (3.42)	6, 5a
H-6 (2.01)	7, 5a, 5b
H-7 (4.23)	8, 6
H-8 (4.16)	7, 3a*, 3b*
H-9a (4.87)	9b, 8*, 3a*, 3b*, 2*
H-9b (4.92)	9a, 8*, 3a*, 3b*, 2*
H-3' (4.13)	4'
H-4' (1.22)	3'
H-5' (1.93)	6', 7'
H-6' (0.95)	5',
H-7' (0.94)	5'

* Correlaciones a larga distancia (alílicas o transanulares).

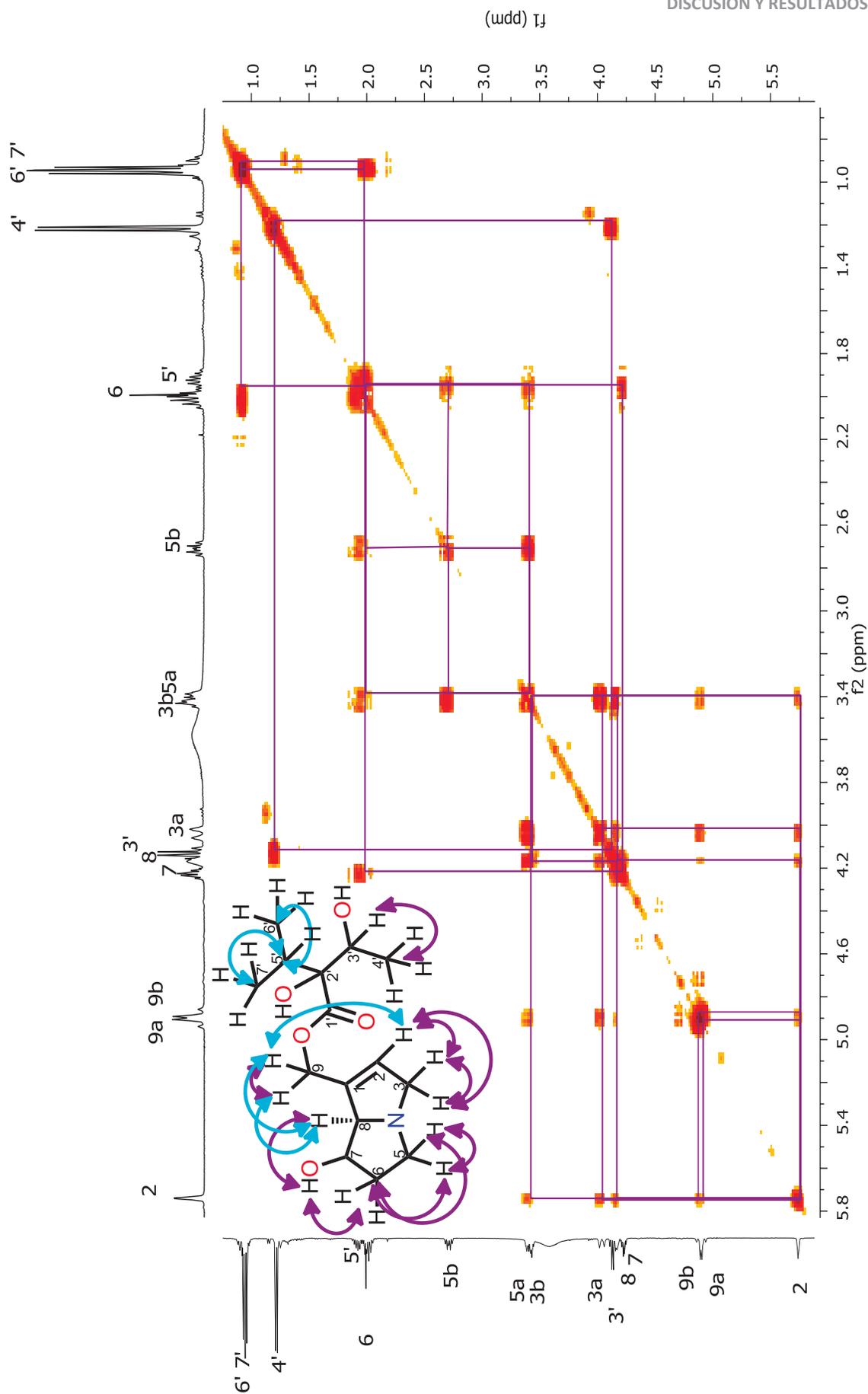


Figura 5.3. Espectro COSY de la fracción 21-22 (CDCl₃).

Con base en la biosíntesis de pirrolizidinas descrita en Asteraceae con la que se sabe que la configuración de C-8 es *R* cuando C-7 se encuentra hidroxilado y con la información anteriormente descrita, cabe la posibilidad de tener uno de ocho posibles estereoisómeros de necina en la fracción 21-22, debido a que existe la (7*S*,8*R*)-7-hidroxinecina (heliotridina) **14** así como la (7*R*,8*R*)-7-hidroxinecina (retronecina) **13** y de igual manera se conoce la existencia de cuatro posibles estereoisómeros de tipo ácido 2,3-dihidroxi-2-isopropil butanoico (ácido (±)-traquelántico y ácido (±)-viridiflórico) **24-27**. (Figura 5.4).

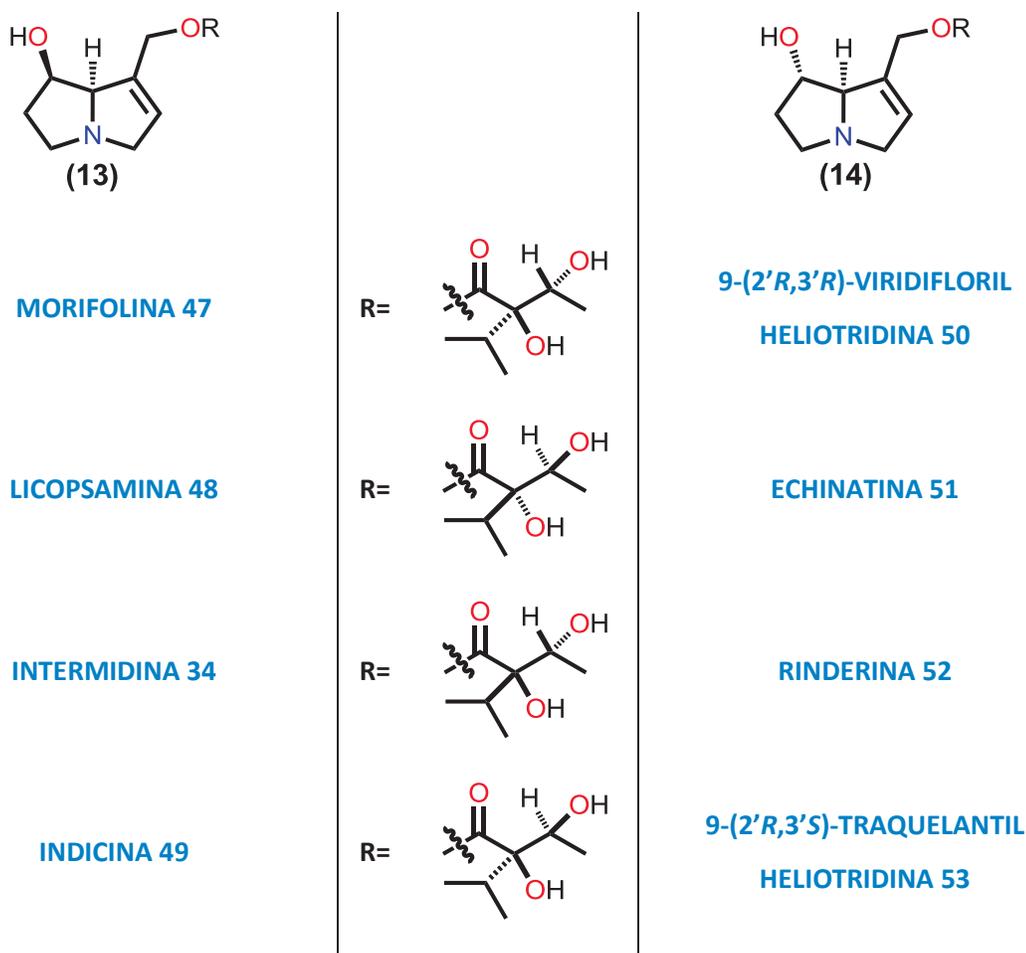
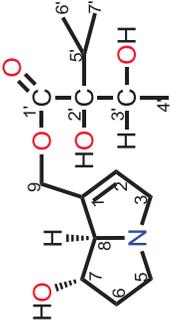
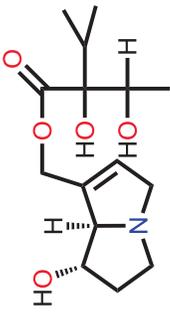
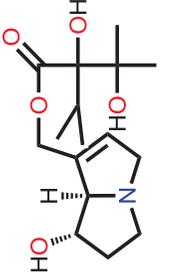
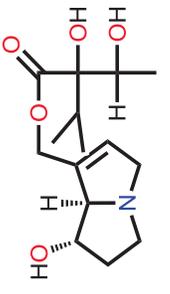


Figura 5.4. Posibles estereoisómeros de Necina.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.5) se lograron observar quince señales, de las cuales, se apreció una en 175.1 ppm típica de un carbonilo de éster, de igual manera aparecieron las señales atribuidas a carbonos de un enlace doble en 135.7 ppm y 126.4 ppm; entre 83.4 ppm y 54.2 ppm se observaron siete señales correspondientes a carbonos base de heteroátomo; y entre 33.6 ppm y 17.0 ppm se apreciaron cuatro señales pertenecientes a carbonos alifáticos. Al analizar el desplazamiento de C-7 (74.2 ppm) y compararlo con los datos reportados de los ocho posibles estereoisómeros de necina, se confirmó que el núcleo de necina correspondía al de tipo heliotridina **14**, pues el desplazamiento reportado varía entre 74.1 ppm y 74.9 ppm (Tabla 5.2) mientras que el desplazamiento de C-7 reportado para retronecina **13** esterificada con derivados del ácido 2,3-dihidroxi-2-isopropil butanóico (ácido (\pm)-traquelantico y ácido (\pm)-viridiflorico) **24-27** se encuentra alrededor de 70.0 ppm; la diferencia de desplazamiento del carbono C-7 en las dos posibles necinas **13** y **14** es aproximadamente de 5 ppm⁴⁵⁻⁴⁷. Con estos datos se pudo confirmar el centro estereogénico presente en el núcleo de pirrolizidina que estaba en duda; sin embargo, la quiralidad presente en el residuo esterificado a la necina es indefinida, y aunque el número de posibles isómeros de la estructura problema disminuyó a cuatro, aún se debía conocer la estereoquímica exacta de la molécula presente en las flores de *C. pulchella*.

Tabla 5.2. Desplazamientos de RMN de ^{13}C experimental y de la literatura de derivados de heliotridina.

C	EXP.	RINDERINA (+) ácido traquelántico	TRAQUELANTELIL HELIOTRIDINA (-) ácido traquelántico	VIRIDIFLORIL HELIOTRIDINA (+) ácido viridiflorico	ECHINATINA (-) ácido viridiflorico
					
		47	48	49	50
1	135.66	135.89	135.86	135.87	136.08
2	126.40	126.84	126.92	125.45	126.32
3	61.60	61.78	61.79	61.88	61.66
5	54.22	54.11	54.27	54.16	54.25
6	33.63	33.96	33.77	33.59	33.79
7	74.24	74.90	74.13	74.06	74.64
8	80.03	79.82	80.05	79.62	79.84
9	61.87	62.41	62.14	61.59	61.87
1'	175.09	175.10	175.22	173.72	174.29
2'	83.37	83.82	83.38	83.98	83.97
3'	69.53	69.29	69.51	71.36	71.59
4'	17.11	17.23	16.91	17.40	17.53
5'	33.08	33.03	33.12	17.87	32.16
6'	17.05	17.19	17.13	32.28	17.77
7'	16.97	17.04	17.13	15.79	15.88

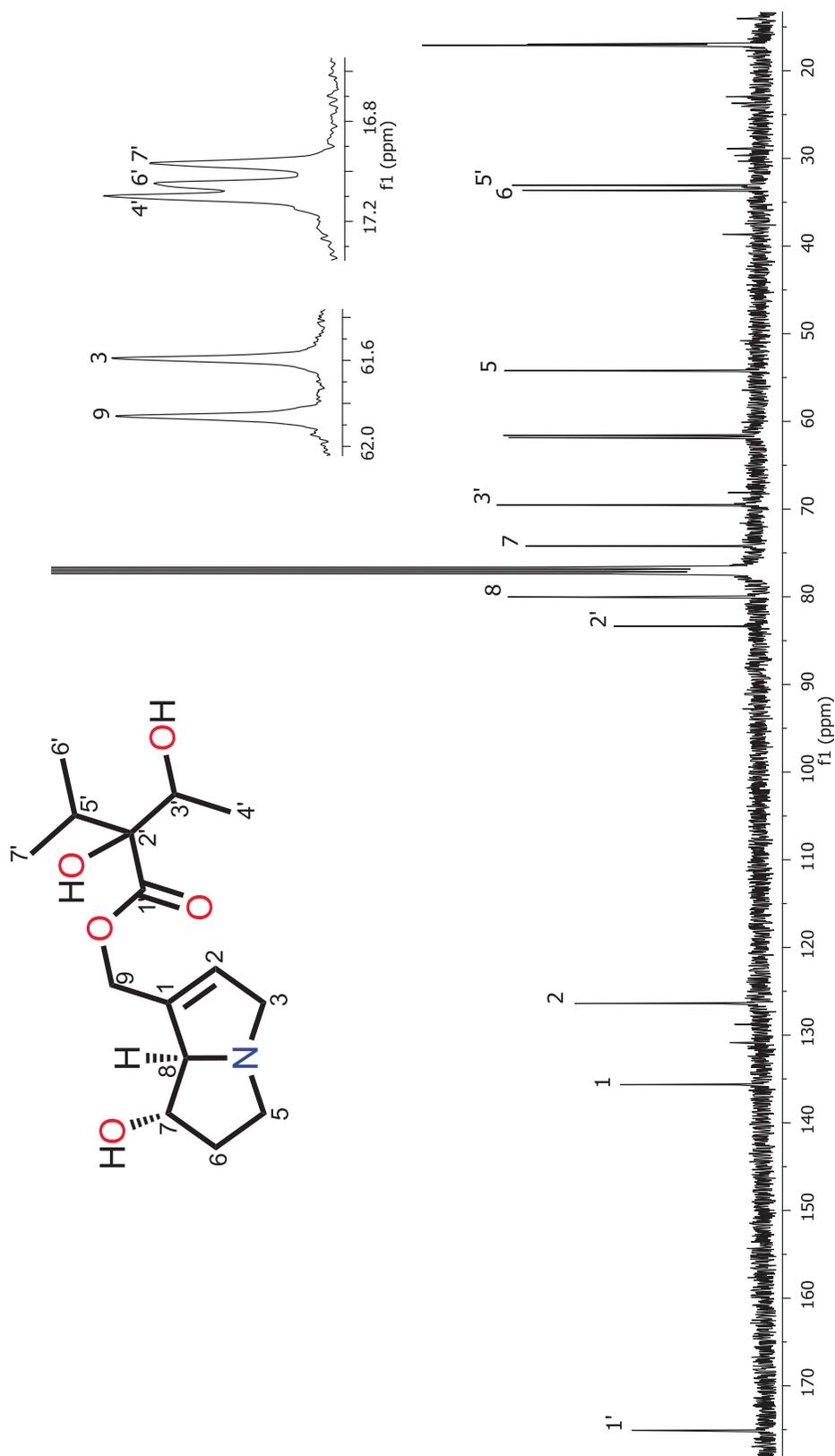


Figura 5.5. Espectro de RMN ^{13}C de la mfracción 21-22 (100 MHz, CDCl_3).

Asibal y colaboradores (1989) reportaron los cuatro posibles estereoisómeros de 2,3-dihidroxi-2-isopropil butanoato esterificados con heliotridina en la posición C-9, y discute que pueden diferenciarse estos ésteres de necina con ácido traquelántico de aquellos que están esterificados con ácido viridiflórico, solo deben analizarse los Δ_δ de H-9a-b, así como los Δ_δ de C-6'-C-7'; cuando existe traquelantato en la estructura el Δ_δ de H-9a-b oscila entre 0.02 ppm y 0.031 ppm y Δ_δ de C-6'-C-7' varía entre 0.0 ppm a 0.1 ppm; pero si existe viridiflorato entonces el Δ_δ de H-9a-b oscila entre 0.22 ppm y 0.30 ppm y Δ_δ de C-6'-C-7' varía entre 1.9 ppm a 2.1 ppm. Dicho análisis fue realizado en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la fracción 21-22, en los cuales se observó un Δ_δ de H-9a-b de 0.033 ppm y un Δ_δ de C-6'-C-7' de 0.08 ppm. Con estos datos se redujo la posibilidad a únicamente dos estereoisómeros de heliotridina, siendo estos la rinderina (**47**) o bien la 9-(2'R,3'S)-traquelantil heliotridina (**48**). Finalmente la determinación de la rotación específica de la fracción 21-22 generó un valor de $[\alpha]_D^{25} +7.0$ (c 0.37, EtOH), con lo que se definió que en esta fracción se encontraba la 9-(2'S,3'R)-traquelantil heliotridina **48**⁴⁸ (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Valores de la rotación específica experimental y de la literatura de los estereoisómeros de 9-traquelantil heliotridina (en EtOH).

Experimental	47	48
$[\alpha]_D^{25}$	+7.0	+18.3
	(c 0.37)	(c 1.32)
		+9.0
		(c 1.1)



7. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de alcaloides en el extracto metanólico de las flores de *Chromolaena pulchella* mediante una prueba cualitativa utilizando el reactivo de Dragendorff.
- Se logró obtener una mezcla compleja de alcaloides a partir del extracto metanólico de las flores de *C. pulchella* mediante una técnica selectiva encontrada en la literatura.
- A partir de métodos cromatográficos se logró aislar al componente mayoritario presente en la mezcla compleja de alcaloides.
- Mediante un análisis espectroscópico y con ayuda de la rotación específica se determinó la presencia de la 9-(2'R,3'S)-traquelantil heliotridina **48** en la fracción 21-22.
- Este es el primer reporte en el que se describe a **48** en el género *Chromolaena*.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Procedimientos generales.

Las separaciones cromatográficas se realizaron mediante cromatografía con una columna de 1.0 cm de diámetro, como fase estacionaria se utilizó gel de sílice 60 (230-400 mallas); se usaron mezclas de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$) como eluyente en orden de polaridad creciente.

El espectro de masas se determinó en un equipo Varian modelo Saturn 2000 mediante impacto electrónico a 70 eV. La rotación óptica del compuesto aislado se determinó en un polarímetro Perkin Elmer modelo 341 en EtOH.

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz, así como el espectro bidimensional COSY se midieron con un equipo Varian Mercury 400, utilizando como disolvente CDCl_3 y TMS como referencia interna.

8.2. Muestra vegetal.

Chromolaena pulchella fue colectada en Octubre del 2005 en el kilómetro 61 de la carretera Morelia-Zacapu, en el Estado de Michoacán, México. Una muestra fue enviada al Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán (No. 192522) y fue identificada por el Profesor Jerzy Rzedowski.

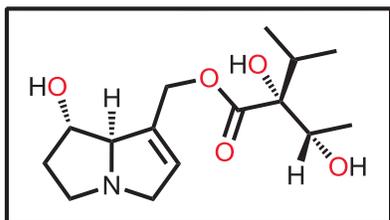
8.3. Extracción y aislamiento.

La especie se separó en sus distintas partes (flores, hojas, tallos y raíces), que fueron secadas a la sombra durante 15 días, posteriormente se obtuvieron los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las flores por reflujo durante 6 horas.

Tras confirmar la presencia de alcaloides utilizando el reactivo de Dragendorff se llevó a cabo la siguiente metodología para su extracción selectiva: 10.2 g del extracto metanólico se disolvieron en 100 mL de HCl al 3%, se adicionaron 10 g de Zn^0 , se dejó en agitación por 12 horas a temperatura ambiente, se filtró y se basificó con NH_4OH a $\text{pH}= 10$, se extrajo con 300 mL de

AcOEt (3 x 100 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en el rotavapor.⁴⁴ Con esta técnica se lograron obtener 730 mg de crudo de alcaloides.

(-)-traquelantil heliotridina (48)



730 mg del extracto crudo de alcaloides se cromatografiaron utilizando gel de sílice 60 (230-400 mallas) y como eluyente mezclas de CHCl₃-MeOH-NH₄OH en orden de polaridad creciente obteniéndose 25 fracciones. En la polaridad CHCl₃-MeOH-NH₄OH (14:6:1) se obtuvieron las fracciones 21 y 22 (16 mg) las cuales contenían una miel amarilla; $[\alpha]_D^{25} +7.0$ (c 0.37, EtOH); EMIE 70 eV [M+1] (%) = 300 *m/z* (33.5), 154 (0.5), 138 (100), 94 (52), 80 (6.8); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ H-0.94 (d, *J*= 6.8, H-7'), 0.95 (d, *J*= 6.8, H-6'), 1.22 (dt, *J*= 6.4, H-4'), 1.93 (sept, *J*= 6.4, H-5'), 2.01 (m, H-6), 2.71 (td, *J*= 5.2, 10.8, H-5a), 3.38 (da, H-3a), 3.42 (td, *J*= 6.8, 10.8, H-5b), 4.03 (qda, *J*= 2.0, 16.0, H-3b), 4.13 (q, *J*= 6.4, H-3'), 4.16 (sa, H-8), 4.23 (dt, *J*= 4.0, 5.6, H-7), 4.87 (da, *J*= 13.2, H-9a), 4.92 (da, *J*= 13.2, H-9b), 5.74 (sa, H-2), RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 16.97 (C-7'), 17.05 (C-6'), 17.11 (C-4'), 33.08 (C-5'), 33.63 (C-6), 54.22 (C-5), 61.6 (C-3), 61.87 (C-9), 69.53 (C-3'), 74.24 (C-7), 80.03 (C-8), 83.37 (C-2'), 126.4 (C-2), 135.66 (C-1), 175.09 (C-1') ; correlación bidimensional homonuclear (COSY) ver en tabla 5.1.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bruneton J. Fitoquímica Plantas Medicinales. Farmacognosia. Zaragoza (España): ACRIBIA, **2001**, 4: 775-792, 825-830.
2. Newman D. J., Cragg G. M. Journal of Natural Products: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **2012**, 75: 311-335.
3. Durango E., Osorio J. Antioquia: Aspectos básicos de farmacognosia, **2009**, 34-40.
4. Avalos García A., Perez-Urria Carril E. Reduca (Biología). Serie Fisiología vegetal: Metabolismo secundario de plantas, **2009**. 2: 119-145.
5. Waksmundzka-Hajnos, Sherma J., Kowalska T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Ed Taylor & Francis Group, United States of America, **2008**.
6. Carretero E., Accame M. Alcaloides: Aspectos generales. Panorama Actual Med, **2001**. 125.
7. Kouznetsov V. Scientia et technica: Desarrollo de estrategias tácticas en la síntesis de los alcaloides y sus análogos, **2007**. 33: 1-4.
8. Hartmann T. Chemical and Biological Perspectives: biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids, **1995**. 9: 155-233.
9. Dorothee L., Dietrich O. Phytochemistry: Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for stabilization, **2011**. 72: 1576–1584.
10. Logie C. G., Grue M. R., Liddell J. R. Pytochemistry: Proton NMR spectroscopy of pirrolizidine alkaloids, **1994**. 37: 43-109.
11. Watson D. Natural Toxicants in Food, Ed. Sheffield Academic Press. Londres, **1998**.
12. Fu P. P., Ya Y. C., Qingsu X., Chou M.W., Cui Y.Y., Lin G. International Journal of Molecular Sciences: Genotoxic pyrrolizidine alkaloids — mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity, **2002**. 3: 948-964.



13. Roeder E. Current Organic Chemistry: Analysis of pyrrolizidine alkaloids, **1999**, 3: 557- 576.
14. Hartmann T. Planta: Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids, **1999**. 207: 483-495.
15. Böttcher F., Adolp R., Hartmann T. Phytochemistry: Homospermidine synthase, the first pathway specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, **1992**. 32: 679-986.
16. Dewick P. M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. 3er edición. Ed. Wiley United Kingdom, **2009**.
17. greenfacts. [Online] Cogeneris sprl, Mayo 14, 2012. [Citado: Junio 2, 2010.] <http://www.greenfacts.org/es/glosario/ghi/genotoxico-genotoxicidad.htm>.
18. Fattorusso E., Tagliatela-Scafati. Modern alkaloids. Structure, isolation, synthesis and biology. Ed. Wiley-VHC. Alemania, **2008**.
19. Chen T., Nan M., Fu P. Journal of Applied Toxicology: Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids, **2010**. 30: 183-193.
20. Roeder E., Wiedenfeld H. Pharmazie: Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Mongolia, Nepal and Tibet, **2009**. 64: 699-716.
21. Codex alimentarius. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias, **2011**. 5.
22. Liddell J. R. Natural Product Reports: Pyrrolidine alkaloids, **1998**. 14: 653-660.
23. Liddell J. R. Natural Product Reports: Pyrrolizidine alkaloids, **1999**. 16: 499-507.
24. Zalkow L. H., Glinski J. A., Gelbaum L. T., Fleischmann T. J., McGowan L. S. Journal of Medicinal Chemistry: Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermidine, lycopsamine, and analogs and their *N*-oxydes. Potenteial antitumor agents, **1985**. 28: 687-694.
25. Nibreta E., Sporera F., Asresb K. Journal of pharmacy and pharmacology: Antitrypanosomal and cytotoxic activities of pyrrolizidine alkaloid-producing plants of Ethiopia, **2009**. 61: 801–808.
26. Castelo E., Ricalde O., Panero J. Catálogo de autoridades de asteráceas mexicanas y actualización de tribus Heliantheae y Eupatorieae. University

- of Texas. Base de datos . Mexico, D.F., **2005**. SNIB-CONABIO proyectos V004, AE012 y CS011.
27. Villaseñor J.L., Ibarra G., Ocaña D. Conservation Biology: Strategies for the conservation of Asteraceae in Mexico, **1998**. 12: 1066-1075.
28. Heinrich M., Robles M., West J., Ortiz de M. B., Rodriguez E. Annual Review of Pharmacology and Toxicology: Ethnopharmacology of mexican Asteraceae, **1998**. 38: 539-565.
29. Cué-Bär E., Villaseñor J.L., Arredondo-Amezcuca L., Cornejo-Tenorio G., Ibarra Manríquez G. Boletín de la Sociedad Botánica de México: La flora arborea de Michoacán-México, **2006**. 78: 47-81.
30. Petrovi S., Dobri S., Mimica-Duki N., Simin N., Kuki J., Niketi M. Phytotherapy Research: The Antiinflammatory, Gastroprotective and antioxidant activities of *Hieracium gymnocephalum* extract, **2008**. 22: 1548-1551.
31. Zhang M., Zhang J., Hou C., Gu Y., Shi Q. Chemistry & Biodiversity: Chemical constituents of plants from the genus *Cacalia*, **2010**. 7: 105-115.
32. Beroa J., Frederichb M., Quetin-Leclercq J. Journal of Pharmacy and Pharmacology: Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine, **2009**. 61: 1401-1433.
33. Newton S. M., Lau C., Wright Colin W. Phytotherapy Research: A review of antimycobacterial natural products, **2000**. 14: 303-322.
34. Molyneux Russell, Lee Stephen, Gardner Dale, Panter Kip, James Lynn. Phytochemistry: Phytochemicals: the good, the bad and the ugly?, **2007**. 68: 2973–2985.
35. Michalik A., Hollinshead J., Jones L., Fleet G., Yu C., Huc X., Van W. R., Horne G., Wilson F., Kato A., Jenkinson S., Nash R. Phytochemistry Letters: Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*, **2010**. 3: 136-138.
36. Lang G., Passreiter C. M., Medinilla B., Castillo J.J., Witte L. Biochemical Systematics and Ecology: Non-toxic pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium semialatum*, **2001**. 29: 143-147
37. Rodríguez O. E. Ruben D, Torrenegra G. Scientia et Technica: Química y actividad biológica de *Chromolaena perglabra*, **2007**. 13: 267-270.

38. Biller A., Boppré M., Witte L., Hartmann T. Phytochemistry: Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoecological aspects, **1994** . 35: 615-619.
39. Apori S. O, Long R. J, Orskov E. R. Grass and Forage Science: Chemical composition and nutritive value of leaves and stems of tropical weed *Chromolaena odorata*, **2000**. 55: 77-81.
40. Gómez- Hurtado M. A., Torres- Valencia J. M., Manriquez-Torres J. J., Cerda-Garcia-Rojas C. M., del Río R. E., Motilva V., García Mauriño S., Talero E., Ávila J., Joseph-Nathan P. Latioamericana de Química: Nuevas pirrolizidinas de *Chromolaena pulchella*, **2011**. Vol. suplemento especial. 39.
41. Rojo A., Rodriguez J. La flora del pedregal de San Jose México: INE, **2002**.
42. Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. Canabio. *Canabio*. [En línea] 13 de junio de **2009**. [Citado el: 17 de marzo de 2012.] <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/eupatorium-pulchellum/fichas/ficha.htm#9>.
43. King M. R., Robinson H. Phytología: Studies in the Eupatorieae (Compositae), **1970**. 20: 196-209.
44. Pérez-Castorena A.L., Arciniegas A., Castro A., Villaseñor J. L., Toscano R. A., Romo de Vivar A. Journal of Natural Products: Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio roseus* and *Senecio helodes*, **1997**. 60: 1322- 1325.
45. Biozentrum, Frankfurt M. Pharmazie: Pharmazeutisches Institut der Universita, **2009**. 64: 415-416.
46. Souza J. S., Machado L.L., Pessoa O. D. L., Braz-Filho R., Overk C. R., Yao P., Cordell G. A., Lemos T.L.G. Journal of the Brazilian Chemical Society: Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*, **2005**. 16: 1410-1414.
47. Zalkow C. F., Asibal J. G., Lesliet. Gelbaum, Leon H. Journal of Natural Products: Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum cretzcum* synthesis of the pyrrolizidine alkaloids Echinatine, **1989**. 52: 109-118.
48. Rashkes Y. V., Abdullaev U. A. Plenum Publishing Corporation: Mass spectra of pyrrolizidine alkaloids, **1978**. 2: 153-170.