



110  
2EJM  
11261  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS SUPERIORES  
FACULTAD DE MEDICINA**

**ENSAYO BIOLÓGICO DE EXTRACTOS CRUDOS  
DE DOS ARTEMISIAS MEXICANAS PARA  
BUSCAR ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA**

**T E S I S  
Q U E P R E S E N T A L A  
M. C. JUDITH DEL R. VAZQUEZ GOMEZ  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(AREA PARASITOLOGIA)**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1993**



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 está 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.

## I N D I C E

### MARCO TEORICO

Antecedentes.....	1
El parásito	
Taxonomía.....	3
Desarrollo y biología.....	4
Antimaláricos	
Historia.....	20
Clasificación de los antimaláricos por su tipo de acción.....	23
Clasificación de los antimaláricos de acuerdo a su estructura química.....	28
Resistencia.....	40
Artemisias.....	45
OBJETIVO.....	54
MATERIALES Y METODOS	
Selección de artemisias.....	55
Colecta e identificación taxonómica.....	55
Elaboración de extractos.....	56
Extracto etanólico.....	57
Extracto acuoso.....	57
Extracto clorofórmico.....	57
Extracto diclorometánico.....	58
Cromatografía.....	59

Pruebas de solubilidad.....	60
Pruebas de toxicidad	
Determinación de la dosis mínima mortal.....	60
Determinación de la dosis letal (DL50).....	61
Ensayo biológico	
Preparación del inóculo de parásitos.....	62
Prueba profiláctica.....	63
<b>RESULTADOS</b>	
<u>Artemisia ludoviciana</u>	
Extracto etanólico, planta fresca.....	66
Extracto etanólico, planta seca.....	69
Extracto acuoso, planta fresca.....	73
Extracto acuoso, planta seca.....	76
Extracto diclorometánico, planta seca.....	79
Extracto clorofórmico, planta fresca.....	82
<u>Artemisia klotzchiana</u>	
Extracto clorofórmico, planta fresca.....	88
Extracto clorofórmico, planta seca.....	91
Extracto etanólico, planta seca.....	94
Extracto etanólico, planta fresca.....	97
DISCUSION.....	104
Rendimiento de las extracciones.....	108
Pruebas de solubilidad.....	119
Toxicidad.....	112
Ensayo biológico.....	113
CONCLUSIONES.....	117
REFERENCIAS.....	119

## MARCO TEORICO

### ANTECEDENTES

El hombre, ha utilizado diferentes elementos existentes en la naturaleza, para el tratamiento de sus enfermedades, entre ellos los vegetales. Los chinos emplearon los polvos de Ch'ang shan para el tratamiento sintomático de la malaria. Esos polvos se preparaban con las raíces de Dichoa febrifuga cuyo principio activo es el alcaloide de la febrifugina.<sup>1,2</sup> En América, en el Perú precolombino, se conocía el uso de la corteza del árbol de la quina-quina, también preparada en forma de polvos para el tratamiento de las fiebres. En 1649 la congregación de San Ignacio de Loyola introdujo su uso en Europa en donde se le llegó a conocer como "el polvo de los Jesuítas".<sup>2</sup> Los químicos Pelletier y Conventou aislaron la quinina en 1820, alcaloide que contiene el principio activo de los polvos de la quina. Desde entonces la quinina se constituyó en el antimalárico de uso más generalizado hasta la Segunda Guerra Mundial.<sup>3</sup>

En China se ha usado, desde hace 2 mil años, el Quinghao para el tratamiento empírico de las fiebres. Se obtiene de Artemisia annua, planta que crece en forma silvestre. En tiempos relativamente recientes se aisló e identificó el principio activo presente en esta planta. El compuesto fue llamado artemisina y es distinto en su estructura molecular a los compuestos antimaláricos conocidos. Para utilizarlo en humanos, se hicieron pruebas

farmacológicas, toxicológicas y pruebas clínicas, llegando a la conclusión de que es un esquizonticida sanguíneo mucho más potente que la cloroquina o la quinina.<sup>4</sup>

La búsqueda de nuevos antimaláricos se ha visto influenciada por la aparición de resistencia, principalmente de P. falciparum hacia la cloroquina. Esta situación ha ocasionado que se establezcan programas para la búsqueda de nuevos compuestos. La resistencia surgió en 1959 en Thailandia y se ha extendido ampliamente por Africa, América y Asia ocasionando un serio problema en el control de la malaria. Además, existe alarma por la aparición de resistencia hacia la cloroquina, de Plasmodium vivax, confirmado en varias partes del mundo.<sup>5</sup>

En México crecen en forma silvestre varias especies del género Artemisia. De todas ellas sólo Artemisia ludoviciana ha sido usada en el tratamiento empírico de las intermitentes.<sup>6,7</sup>

Se considera importante reconocer si alguna de las artemisias mexicanas, contiene algun principio activo antimalárico en cantidad suficiente para justificar un estudio en todas sus fases.

## EL PARASITO

### TAXONOMIA

Los parásitos causantes de la malaria son protozoarios que pertenecen al Phylum Apicomplexa<sup>8</sup>. Los miembros de este Phylum se caracterizan por tener un complejo apical, formado por una serie de organelos (anillos polares, conoide, micronemas, roptrias y túbulos subpeliculares) visibles únicamente por microscopía electrónica; también poseen microporo y sexualidad por singamia. No presentan cilios; todas las especies son parásitas. Para que un protozoario se clasifique dentro de este Phylum debe tener complejo apical en alguna etapa de su desarrollo. Algunos de estos organelos son fundamentales para la invasión a la célula huésped.<sup>9</sup>

La familia Plasmodiidae incluye todos aquellos protozoarios parásitos que llevan a cabo esquizogonia exoeritrocítica y eritrocítica con producción de pigmento en vertebrados y un estadio sexual seguido de esporogonia en mosquitos y consta de un sólo género, el género Plasmodium.

En especies del género Plasmodium, la esquizogonia tiene lugar en eritrocitos y también en células tisulares de sus huéspedes vertebrados (mamíferos, aves y reptiles); la reproducción sexual se efectúa en los insectos que actúan como vectores. En todas las especies de este género bajo condiciones naturales, la infección empieza en el huésped vertebrado, cuando el esporozoito es inoculado por un vector. P. vivax, P. malariae, P. falciparum y P. ovale son las especies que infectan al hombre.

## DESARROLLO Y BIOLOGIA

Los parásitos del género Plasmodium tienen dos hospederos uno vertebrado y otro invertebrado (Fig 1). La introducción del parásito al hospedero vertebrado se efectúa a través de un vector. En el caso de la malaria humana este vector es la hembra de algunas especies de mosquito del género Anopheles, la cual al alimentarse, es capaz de introducir al huésped vertebrado la forma infectante del parásito, el esporozoito.

El esporozoito es una célula de forma alargada, con un extremo afilado y un extremo romo, que de acuerdo con la especie puede medir de 9 a 16 $\mu$ m de largo, y de 0.4 a 2.7 $\mu$ m de ancho y posee un núcleo central de forma oval, el cual se puede observar íntegro o fragmentado, en el extremo romo se pueden observar gránulos, los cuales se tiñen de color oscuro.<sup>10</sup> La estructura fina ha sido investigada por varios autores como se describe a continuación: la película del esporozoito se encuentra formada por una membrana externa delgada, una membrana interna gruesa y una capa de microtúbulos subpeliculares en número de 15 a 16,<sup>11</sup> que nacen en la región anterior del parásito y corren hacia la parte media, desapareciendo en su región posterior. Su función además de estructural, puede estar asociada a la movilidad del parásito. La membrana interna puede presentar discontinuidad. La membrana externa está formada casi en su totalidad por una sola proteína, denominada proteína circunsporozoítica, la cual está constituida por una secuencia repetida de aminoácidos, que varían en número y



composición de acuerdo a la especie de que se trate. En P. falciparum la proteína circunesporozoítica se encuentra formada por la repetición en 36 ocasiones de 4 aminoácidos que son, la asparagina, alanina, aspargina y prolina (NANP). Se ha observado que al bloquear a la proteína circunesporozoítica con anticuerpos monoclonales, el esporozoito pierde su infectividad. Al parecer, también se encuentra involucrada en la interacción entre el esporozoito y la membrana del hepatocito que infecta, y además confiere propiedades inmunogénicas al parásito.<sup>12,13</sup> Posee un citostoma, organelo que fue descrito originalmente en esta etapa del parásito por Garnham y col., en 1960; se le encuentra localizado en la región media del parásito y tiene la forma de un poro circular con una depresión media, la cual se forma por la unión de la membrana externa con la interna, mide de 50-80m $\mu$  en la parte interna y 140m $\mu$  en la parte externa, algunos autores han intentado clasificar a los plasmodios de acuerdo al tamaño del citostoma.<sup>14,15</sup> También posee un complejo apical el cual se encuentra formado por 3 anillos polares, y unos organelos denominados roptrias y micronemas. Las roptrias son dos elementos de forma alargada, que pueden llegar hasta la parte media del parásito, se les observa homogéneamente electrodensas; los micronemas son numerosos y se encuentran distribuidos tanto en la región anterior como en la parte media del esporozoito.<sup>14</sup> Al parecer los micronemas se encuentran comunicados con las roptrias y producen un material electrodenso, el cual es transportado por las roptrias hacia la región anterior del parásito;<sup>14</sup> se piensa que este material es

importante para la penetración del parásito en la célula huésped<sup>14</sup>.

Las mitocondrias de esporozoitos fueron observados inicialmente en parásitos de aves por Garnham y col.<sup>16</sup> y más tarde también se encontraron en *P. falciparum*, distribuidos a través de su citoplasma, son de forma redonda u oval y miden cerca de 60m $\mu$  de diámetro, se encuentran formadas por una doble membrana una interna y otra externa. La membrana interna forma crestas microtubulares en la matriz mitocondrial.

El núcleo presenta una doble membrana porosa y su cromatina se encuentra agrupada en la periferia; no se ha observado nucleolo<sup>14,16</sup>.

El esporozoito se encuentra localizado en las glándulas salivales de la hembra del mosquito vector y cuando ésta se alimenta, el parásito es inoculado al torrente circulatorio del huésped vertebrado. Arrastrado por el torrente sanguíneo llega al hígado e invade al hepatocito en un lapso de 20 - 30 minutos. Para llegar a ésta, su célula blanco, tiene que atravesar al espacio de Disse a través de las células de Kuffer.<sup>17</sup> Se menciona que los hepatocitos pueden tener receptores para el esporozoito,<sup>18</sup> actuando como un sistema de reconocimiento. En el interior del hepatocito el parásito se encuentra rodeado por la vacuola parasitófora la cual es formada por la membrana de la misma célula huésped.<sup>16</sup> Dentro de la vacuola se efectúa la esquizogonia exoeritrocítica. Después de la invasión del hepatocito, los parásitos empiezan a sufrir modificaciones, los microtúbulos se fragmentan, desaparecen las estructuras que forman el complejo apical, las mitocondrias se

replican, aumenta el retículo endoplásmico y se empiezan a observar fragmentaciones de la cromatina, que alcanzan al 7º día entre 800 a 1000 fragmentos y al 10º día se observan los esquizontes maduros,<sup>19,20</sup> a veces hasta con 10,000 merozoitos. Posteriormente se rompen los esquizontes con la salida de los merozoitos los cuales alcanzan la luz de los vasos sanguíneos.<sup>21</sup>

Además de la formación de los esquizontes, existen otras formas intrahepáticas que se originan a partir de esporozoitos, únicamente en las especies de *P. vivax* y *P. ovale*, denominadas hipnozoitos, o formas durmientes. Estos hipnozoitos son estructuras uninucleadas las cuales miden de 4 a 5µm de diámetro, y son los causantes de las recaídas.

Las recaídas son definidas como la aparición de signos y síntomas de un cuadro clínico de malaria, semanas o meses después de haber desaparecido el ataque primario de la enfermedad. Las recaídas se han observado hasta 8 meses después del ataque primario, aunque este tiempo puede variar de acuerdo con la cepa de *Plasmodium* de que se trate.<sup>18</sup> El origen de este fenómeno se vió envuelto en el más completo misterio, para explicarlo se postularon diferentes hipótesis: la presencia de una infección eritrocítica prolongada que aparece cuando la respuesta inmune disminuye, o bien la existencia de partenogénesis en los gametocitos; o la existencia de un ciclo paraeritrocítico en el cual se pensó que algunos de los merozoitos (criptozoitos) tenían la capacidad de invadir a otros hepatocitos y de esta manera mantener la infección. En 1946 Shute propuso la existencia de un estado postesporozoito "el cuerpo X"

como causante de las recaídas. Recientemente Krotoski logró por inmunofluorescencia identificar unas estructuras en hepatocitos de chimpances a las 36 y 40 h después de haber sido infectados con esporozoitos de *P. cynomolgi*, denominándolas hipnozoitos. Estas estructuras son las que más se asemejan al cuerpo X propuesto por Shute<sup>22</sup>. Los hipnozoitos se identificaron como estructuras uninucleares intracitoplasmáticas en el hepatocito, que alcanzaron hasta 5µm de diámetro al séptimo día postinfección. El mismo autor aplicó primaquina, un esquizonticida tisular que evita las recaídas, a los monos en los cuales había observado esquizontes como hipnozoitos, encontró que después de la aplicación de éste antimalárico ya no se observaron hipnozoitos, este hecho apoya este descubrimiento.

Los merozoitos hepáticos que han invadido al torrente sanguíneo, utilizan a los eritrocitos como células huésped, iniciando así otra etapa dentro del ciclo de vida del parásito. En esta fase del ciclo se presenta el cuadro clínico característico de la malaria.

El merozoito es otro estadio del parásito con capacidad invasora. Se caracteriza por ser una estructura unicelular de forma ovoide o alargada que puede medir 1.5µm por 0.8µm y posee un núcleo localizado centralmente cuya cromatina se encuentra distribuida o agrupada en la periferia; no existe nucléolo. Su citoplasma se tiñe de un color azul<sup>10</sup>. La estructura fina del merozoito tiene semejanza con la del esporozoito por lo cual se mencionan únicamente las

diferencias existentes entre ellos. La película del merozoito esta formada por 3 capas, la membrana interna tiene un grosor de 150Å, formada por segmentos discontinuos que varían en longitud,<sup>14</sup> el citoesqueleto está formado únicamente por 5 microtúbulos subpeliculares, con un curso lineal o espiral.<sup>23</sup> La membrana citoplasmática del merozoito esta compuesta por moléculas de glicoproteínas o proteínas cuyo peso molecular puede variar de 35 a 250kDa,<sup>23</sup> las cuales son capaces de reconocer a la célula huésped. Esta membrana se encuentra formada también por una gran cantidad de fosfolípidos cuya función aun no es muy clara. Existe una cubierta en la superficie de la membrana denominada glicocalix, con un espesor de 15-20nm y conformada por pequeñas moléculas de glicoproteínas denominadas "Y" o "T" que se originan a partir de la membrana plasmática. En este estadio el citostoma del merozoito al parecer si desempeña su función de ingerir nutrientes del citoplasma de la célula huésped y de esta manera obtener aminoácidos principalmente a partir de la hemoglobina, utilizando varias proteasas como la catepsina D, endopeptidasa que degrada a los polipéptidos en péptidos pequeños y finalmente las aminopeptidasas, las cuales son capaces de degradar a estos péptidos en aminoácidos y el grupo Hem.<sup>24</sup>

La invasión del eritrocito por el parásito va a depender de factores propios del parásito así como de la célula huésped. En el parásito es fundamental la presencia del complejo apical, el citoesqueleto y algunos componentes de la membrana citoplasmática como proteínas ricas en prolina, glicina y carbohidratos.<sup>23,25</sup> En la

célula huésped la presencia de receptores en su superficie como el grupo Duffy y sus determinantes  $Fy^a$ ,  $Fy^b$  y  $Fy^3$  para *P. vivax* y los oligosacáridos de las glicoforinas para *P. falciparum*.<sup>25</sup> Se ha observado que si no existen estos receptores en el eritrocito, son refractarios a la invasión del merozoito. En aquellos eritrocitos que son Duffy positivos, cuando se les trata enzimáticamente y se elimina a estos receptores, la invasión a los merozoitos no se efectúa. Al inicio de la penetración del parásito al interior de la célula huésped existe un contacto temporal entre los receptores de ambas células, posteriormente ocurre la reorientación del parásito con una rotación en la cual el complejo apical queda unido en forma más estrecha a la membrana del eritrocito. Durante este fenómeno se menciona que las proteasas del parásito vertidas a través de las roptrias, juegan un papel importante, con una acción semejante a la tripsina o quimotripsina, quedando al descubierto los sitios de unión en la superficie del eritrocito, por ejemplo las partes más internas de las glicoforinas. Esta unión entre el parásito y la célula huésped se piensa que se da como un movimiento de cierre, existiendo pequeñas conexiones entre ambas; se ha observado que el citoesqueleto del eritrocito sufre modificaciones aparentemente por cambios en la espectrina. La membrana plasmática de la célula huésped sufre una depresión que aumenta hasta que el parásito queda cubierto por ella para formar la vacuola parasitófora.<sup>23,25,26</sup> Se debe mencionar que el glicocalix no penetra al eritrocito.<sup>25</sup> La interiorización se efectúa aproximadamente en 30 segundos, y la membrana de la célula huésped cierra totalmente

el orificio de entrada.

Además de lo ya mencionado existen otros factores que participan aparentemente en la invasión celular, como es el papel que juega la calmodulina (enzima dependiente del calcio).<sup>27,28</sup> Se conoce que la calmodulina interactúa con varias proteínas del citoesqueleto del eritrocito como son la espectrina y la ATPasa. Se ha observado que existen grandes concentraciones de calmodulina y calcio en el parásito.<sup>29,30</sup> Al parecer esta enzima interviene en forma directa en la liberación del contenido de las roptrias, hacia la membrana del eritrocito, también se cree que puede actuar en la movilidad de los túbulos subpeliculares, y en el ensamblaje y desensamblaje de estos microtúbulos. Al inhibir la calmodulina se evita la invasión del parásito.<sup>27</sup>

Después de la invasión del eritrocito, el parásito empieza a sufrir modificaciones, las cuales van a requerir de un importante aporte de energía y el parásito lo obtiene a partir de la glucosa, siguiendo la ruta de Embden Meyerhoff hasta la formación de lactato; se han identificado en ellos algunas enzimas que participan en esta ruta metabólica, como la exoquinasa, la fosfoglucosa isomerasa y la piruvato quinasa. Adquiriendo inicialmente la forma llamada trofozoito, en las fases jóvenes tiene una forma anillada cuyo citoplasma se tiñe de color azul y su núcleo de color rojo, al madurar, el trofozoito adquiere una configuración amebode. El núcleo se observa como una masa única compacta, aunque en algunos casos como en *P. falciparum*, se puede observar doble cromatina. En *P. malariae* los trofozoitos se

observan de forma anillada o en banda; con microscopía electrónica se han observado los cambios que sufre el merozoito al transformarse en trofozoito. Estos cambios se inician con la fragmentación de los túbulos subpeliculares y anillos polares con la consiguiente desaparición del complejo apical. Los parásitos tienen la capacidad de modificar la membrana de los eritrocitos, al alterar las proteínas y los lípidos, así como insertar nuevas proteínas, esto ocasiona cambios morfológicos en dicha membrana como complejos de vesícula y caveola y chipotes (knobs)<sup>31</sup>. En cuanto a la descripción de la estructura fina del trofozoito, únicamente se mencionarán las diferencias importantes que se presentan en esta etapa del parásito: la película del trofozoito se encuentra formada únicamente por una membrana; el citostoma es semejante al del esporozoito pero en este caso si desempeña su función; se pueden observar ribosomas abundantes, que miden 360Å de largo y 250Å de ancho, formadas por una subunidad única, se pueden encontrar agrupados en número de 4-6; el retículo endoplásmico es escaso, se encuentra formado por vesículas pequeñas o canalículos cortos; en el núcleo se observa una mayor cantidad de gránulos finos o filamentos de cromatina.

El inicio de la esquizogonia eritrocítica se ve enmarcado con las modificaciones que sufre el trofozoito, como son la fragmentación de su núcleo. Para la síntesis de DNA y RNA el Plasmodium utiliza purinas y pirimidinas. El parásito no es capaz de sintetizar a las purinas, por ello las obtiene de la célula



huésped y las pirimidinas si son sintetizadas por el propio parásito o bien las obtiene de la célula huésped. El esquizonte presenta más de una masa de cromatina rodeada de citoplasma y conforme madura se diferencia hasta la formación de merozoitos, los cuales varían en número de acuerdo con la especie. Para *P. vivax* y *P. falciparum* son generalmente 16 y para *P. malariae* y *P. ovale* de 8 a 12. Con microscopía electrónica durante la esquizogonia se pueden observar algunos eventos importantes que ocurren en el parásito como son: la división nuclear por mitosis y diferenciación de los organelos citoplasmáticos, el mitocondrion aumenta de tamaño fragmentándose por fisión para dar origen a varias mitocondrias, se forman los microtúbulos, las roptrias, anillos polares y micronemas dando así origen al complejo apical de cada uno de los merozoitos.<sup>14</sup>

Los eritrocitos parasitados por esquizontes de *P. falciparum*, presentan deformaciones en su membrana citoplasmática que reciben el nombre de knobs o protrusiones observables con microscopía electrónica. La formación de los chipotes es un proceso dinámico, en donde ocurre una reorganización y redistribución de los constituyentes de la membrana especialmente de las proteínas del citoesqueleto.<sup>32</sup> Los knobs tienen un diámetro de 160-110nm y una densidad variable, su origen al parecer, está relacionado con proteínas del mismo parásito, insertadas en la membrana del eritrocito, estos knobs hacen del eritrocito un cuerpo pegajoso, que se adhiere fácilmente a los capilares viscerales, sitio en donde los eritrocitos infectados con formas tempranas se fijan y

completan su desarrollo,<sup>32</sup> este hecho ocasiona que los esquizontes de esta especie no se observen en la sangre periférica.

Al madurar, el esquizonte rompe al eritrocito, libera los merozoitos y completa su ciclo asexual eritrocítico, el cual se cumple en distinto tiempo dependiendo de la especie; cada 48 h en *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* y cada 72 h en *P. malariae*. Cada uno de los merozoitos liberados tiene la capacidad de invadir a otro eritrocito, iniciando así otro ciclo eritrocítico.

Algunos merozoitos dan origen a los gametocitos o formas sexuales del parásito. El macrogametocito o célula femenina cuando se tiñe con Giemsa tiene un citoplasma de color azul intenso, con pigmento fino en abundancia; su núcleo es compacto y excéntrico. El microgametocito tiene un citoplasma que se tiñe de azul o rojizo en forma tenue, sus gránulos de pigmento se encuentran distribuidos en forma irregular pero alejados de la zona nuclear; la cromatina de su núcleo se encuentra distribuida en forma difusa. A la microscopía electrónica los gametocitos muestran una película formada por una triple membrana, la membrana externa bien definida mide de 70-80Å, la membrana intermedia no se puede definir con exactitud con un diámetro de 40Å y la membrana interna la cual es la más ancha mide 140Å. Ocasionalmente, en sus formas más tempranas de desarrollo se puede observar una capa de microtúbulos por debajo de la membrana interna, el citoplasma con ribosomas, en mayor número en los macrogametocitos. Las células sexuadas en general poseen numerosas mitocondrias, las cuales muestran su matriz con

una electrodensidad mayor que en las formas asexuales, se desconoce la causa de este fenómeno. Poseen citostoma funcional con el cual ingerieren citoplasma de la célula huésped. Se localizan vacuolas alimenticias esparcidas en el citoplasma del parásito, en las especies que infectan mamíferos estas vacuolas se observan más pequeñas que las vacuolas de los parásitos de aves y reptiles. También se han observado intracitoplasmáticamente cuerpos osmiofílicos (electrodensos) en gametocitos maduros, los cuales, al parecer están relacionados con el escape del parásito del eritrocito. El núcleo está cubierto por una doble membrana, con poros a intervalos regulares. Los macrogametocitos presentan un núcleo haploide y un nucléolo prominente. Los microgametocitos o células masculinas desarrollan un núcleo octaploide, y quedan con poco retículo endoplásmico.<sup>11</sup>

Ambos gametocitos tienen como función la reproducción sexual y son los responsables de la transmisión del parásito del vertebrado al vector. Generalmente, permanecen por períodos cortos en la circulación y tienen una vida media que varía de horas a días, después de haber alcanzado la madurez. Por ejemplo *P. falciparum* tiene una vida media de 2.5 días y *P. vivax* de 2 a 3 días.<sup>33</sup>

El ciclo del parásito continúa cuando los gametocitos son ingeridos por la hembra del mosquito del género *Anopheles*, el cual actúa como huésped definitivo y vector del parásito. Las etapas en el invertebrado son las menos estudiadas. La gametogénesis se inicia en la luz del intestino medio del mosquito; este fenómeno

consta de dos hechos simultáneos e independientes, el escape de la célula huésped y la maduración de gametas. La salida de los gametocitos del eritrocito es mediada por la secreción del contenido de los cuerpos osmiofílicos, dentro de la vacuola parasitófora que ocasiona la ruptura de la célula huésped más no la del parásito.<sup>33</sup> El macho da origen a 8 microgametos por medio de la exflagelación y la hembra a un sólo macrogameto. La duración de la gametogénesis es dependiente de la temperatura y especie del parásito.

Los microgametos tiene una vida media corta de aproximadamente 0.5-2h, en este lapso de tiempo se debe efectuar la fertilización, de preferencia durante los primeros 20 minutos. Durante este tiempo el microgameto tiene diferentes patrones de conducta, inicialmente presenta una actividad intensa de movimientos, que después va regulando, en patrones rápidos y movimientos lentos hasta llegar a una fase de menor movilidad. Se dice que los movimientos rápidos son de menor amplitud y menor longitud, mientras que los movimientos lentos tienen una mayor amplitud y una mayor longitud. Se menciona que los movimientos rápidos impulsan al microgameto en una sola dirección y los movimientos lentos ocasionan giros y cambios de dirección.<sup>33</sup>

Se piensa que la quimiotaxis juega un papel importante en la fertilización puesto que con este fenómeno las gametas logran encontrarse y entrar en contacto y después de algunos segundos se fusionan ambas membranas y forman un mosaico de componentes; el

microgameto queda sin membrana citoplasmática y su citoplasma su cromatina y su axonema se hunden en el citoplasma del macrogameto.<sup>33</sup>

Dentro del citoplasma de la hembra fecundada se observan ciertos cambios, el axonema desnudo del microgameto retorna a su actividad cíclica de movimientos, aunque esta movilidad posteriormente disminuye. El núcleo del macho se separa del axonema y se fusiona con el núcleo de la hembra, formándose de esta manera el cigoto.<sup>33</sup>

Los primeros cambios observados en el cigoto son la polarización del núcleo y la aparición de microtúbulos subpeliculares, posteriormente la formación de anillos polares dan origen al complejo apical. El cigoto se transforma en un ooquineto, el cual es una célula móvil que mide aproximadamente 15 a 22µm de largo y de 3µm de ancho, de forma alargada y encurvada, más ancha en un extremo; su citoplasma se tiñe de un azul intenso, los gránulos de pigmento se pueden localizar en un extremo, también pueden existir pequeñas vacuolas. Su núcleo es de forma irregular y no está totalmente central.<sup>10</sup> En cuanto a su estructura fina, únicamente se mencionaran las diferencias con las otras formas invasoras. La membrana interna de la película no presenta discontinuidades y la capa de microtúbulos está conformada por 60 unidades, estas estructuras se encuentran colocadas a intervalos regulares.<sup>14</sup>

El ooquineto posee micronemas y roptrias largas. Sus mitocondrias y el núcleo tienen características similares a las observadas en otras formas del parásito. En ooquinetos de aves se

han observado cuerpos cristaloides de  $1\mu\text{m}$  de diámetro. Se ignora su función. Se piensa que podrían ser partículas virales.<sup>14</sup>

Por su región anterior, el ooquinetto empuja hacia un lado las microvellosidades del epitelio de las células del intestino del transmisor y perfora la pared intestinal, localizándose entre la capa muscular y la lamina interna acelular del intestino del vector; ahí pierde su movilidad, crece y se transforma en ooquiste.<sup>33</sup>

El ooquiste es una estructura que se empieza a formar 24 a 48h después de que se ha alimentado el mosquito; de forma redonda, su tamaño puede variar de acuerdo al día en que se le observe, al llegar a su madurez alcanza  $50\mu\text{m}$  aproximadamente.<sup>10</sup> El núcleo se fragmenta, el citoplasma se separa y forma citómeros multinucleados, los que darán origen a los esporozoitos.<sup>10</sup>

Con microscopía electrónica se observa que el ooquiste se encuentra rodeado por una cápsula electrodensa de  $1\mu\text{m}$  de espesor, sin citostoma, con abundantes ribosomas, retículo endoplásmico, mitocondrias, con características semejantes a las observadas en otras etapas del parásito, e inclusiones esféricas de muy variable densidad que al parecer son pigmento. Además, se observan vacuolas, las cuales pueden coalescer y sufrir fisuras dando origen posteriormente a 1, 2 ó más esporoblastos. El desarrollo de estos esporoblastos no es sincrónico. De cada esporoblasto se originan los esporozoitos, los cuales al madurar adquieren una forma de "S" alargada con superficie lisa.<sup>14,34</sup> La esporogonia se lleva a cabo

rápidamente, aunque no en forma sincrónica. En cada ooquiste se pueden llegar cerca de 10,000 esporozoitos en un tiempo de 9 a 14 días; en algunas especies se han observado numerosos microporos en la pared de los ooquistes, se piensa que por estos orificios escapan los esporozoitos o bien a través de ellos entran los nutrientes, aunque algunos autores piensan que la salida de los esporozoitos se debe a la ruptura de la pared del ooquiste.<sup>34</sup> Posteriormente, los esporozoitos rompen o escapan por los poros del ooquiste y viajan a la hemolinfa a través de la membrana acelular, invaden diferentes órganos del mosquito, principalmente las glándulas salivales, son almacenados y conservan su capacidad infectante, incluso hasta por 59 días. La hembra al alimentarse nuevamente, inocula los esporozoitos al huésped vertebrado.<sup>34</sup>

No todos los mosquitos infectados sobreviven, ya que la penetración del ooquinetto puede ocasionar daño a los tejidos intestinales del mosquito que lo llevan a la muerte. Además el desarrollo de los ooquistes también ocasiona cambios en su metabolismo que van a repercutir en la longevidad, capacidad de oviposición, y distancia de vuelo.<sup>35</sup>

## ANTIMALARICOS

### Historia

Hipócrates describió y clasificó a las fiebres tercianas y cuartanas de la malaria. Durante muchos años la etiología de la malaria fue desconocida para el hombre, Hipócrates pensó que la causa era la bilis, posteriormente se llegó a creer que la infección procedía de las emanaciones pestilentes y del vapor de las zonas pantanosas aledañas a las poblaciones. El parásito fue observado por primera vez en 1880, por Louis Alphonse Laveran, quien concluyó que la fiebre palúdica es producida por la presencia en sangre de elementos parásitos que tienen diferentes formas.<sup>36</sup>

A pesar de que no se conocía la causa de la malaria, se intentaba encontrar la forma de controlar las fiebres palúdicas. Ricardo Palma en sus Tradiciones Peruanas describió que por el año de 1630 en Perú, se empezó a usar una cascarilla obtenida de la corteza del árbol de la quina-quina para el tratamiento de las fiebres. Esta cascarilla fue conocida como "la corteza de los Jesuitas" porque en 1649 la congregación de San Ignacio de Loyola, introdujo su uso en Europa.<sup>2</sup>

Los químicos Pelletier y Coventou aislaron la quinina en 1820, alcaloide que contiene el principio activo de los polvos del árbol de la quina. Desde entonces la quinina se constituyó en el antimalárico de uso más generalizado hasta la II Guerra Mundial.

Después del aislamiento de la quinina, el más importante descubrimiento fue hecho por Ehrlich y Gutman en 1891; ellos



observaron que el azul de metileno, un colorante sintético, tenía una ligera actividad antimalárica en el hombre. Encontraron que se unía fuertemente a los plasmodios, mostrando una toxicidad relativamente baja. Efectuaron pruebas en pacientes que padecían malaria y observaron algunos efectos benéficos.<sup>3</sup> A partir de este momento empezó a surgir el interés de obtener compuestos sintéticos. Con modificaciones hechas a la quinina y al azul de metileno se obtuvieron dos grandes grupos de antimaláricos, las 4 y 8 aminoquinoleínas.

Durante y después de la II Guerra Mundial, se realizó un programa de investigación para la búsqueda de nuevos antimaláricos, se analizaron compuestos conocidos y compuestos nuevos, se ensayaron 16,000 compuestos utilizando un modelo de malaria aviar. Posteriormente estos fármacos fueron evaluados con estudios toxicológicos, farmacológicos y clínicos. De este programa surgió la pentaquina, isopentaquina, y la primaquina<sup>37,38</sup>. Además, se revaloró el uso de la cloroquina como antimalárico, ya que este compuesto había sido descartado, debido a que sus descubridores, los alemanes, pensaron que tenía una gran toxicidad.

En 1943, un grupo de investigadores ingleses logró obtener la pirimetamina, compuesto sintetizado a partir de la pirimidina, y el proguanil en 1949.<sup>3</sup>

En 1963 se inició un intenso programa de investigaciones para el desarrollo de nuevos antimaláricos. Se analizaron aproximadamente 250,000 compuestos, de entre ellos se obtuvo una quinolina metanólica derivada de la quinina, la mefloquina.<sup>39</sup>

Por los años 70, los chinos iniciaron un programa de investigaciones para la búsqueda del principio activo antimalárico, presente en Artemisia annua, planta silvestre que había sido utilizada en forma empírica, en su país, durante miles de años para el tratamiento de la malaria. A partir de ella se obtuvo un nuevo antimalárico, la artemisinina, cuya estructura química es diferente a la de los compuestos actualmente conocidos.<sup>4</sup> Cada uno de los antimaláricos juega un papel importante en el control de la malaria.

## Clasificación de los antimaláricos por su tipo de acción

De acuerdo a la etapa de desarrollo del parásito sobre la que actúan los antimaláricos se pueden clasificar en esquizonticidas, gametocitocidas, esporozoitocidas y esporontocidas (Cuadro 1).

**Esquizonticidas.** Son medicamentos que actúan contra las formas de desarrollo asexual de los plasmodios. Pueden actuar en sangre o en tejidos.

**Esquizonticidas sanguíneos.** Son aquellos antimaláricos que actúan contra formas sanguíneas asexuales, entre ellos tenemos a la quinina, cloroquina, amodiaquina, proguanil, pirimetamina, mefloquina, y artemisinina.

**Esquizonticidas tisulares.** Actúan contra formas asexuales que se desarrollan en hepatocitos; también tienen la capacidad de destruir a los hipozoitos. El único medicamento que en la actualidad se usa es la primaquina; existen otros medicamentos como la pamaquina o pentaquina, que debido a su gran toxicidad se dejaron de utilizar.

**Gametocitocidas.** Destruyen a los gametocitos o formas sexuales del parásito. Dosis pequeñas de primaquina eliminan los gametocitos de las cuatro especies de *Plasmodium* que afectan al hombre.

**Esporozoitocidas.** No existe medicamento que actúe contra esporozoitos (Cuadro 1).

**Esporontocidas.** Medicamentos que impiden la esporogonia del parásito en el mosquito, al transformar a los gametocitos en no infecciosos. Los medicamentos que se usan con tal efecto son

primaquina, pirimetamina y cloroguanida.<sup>3,37</sup>

**Tratamiento quimioprolifático.** Es la medida que intenta prevenir la infección del hombre por el parásito con la aplicación de una droga.

La forma infectante del parásito para el hombre es el esporozoito, y por lo tanto un tratamiento quimioprolifático sería aquel capaz de destruir esporozoitos y evitar así la infección, sin embargo no existe ningún medicamento que actúe sobre el esporozoito y por esto no podemos hablar de la existencia de la quimioprolifaxis verdadera en malaria.

La quimioprolifaxis como se concibe en malaria, es un tratamiento que evita el desarrollo de las formas asexuadas a nivel de eritrocitos, más no evita el desarrollo de los esquizontes tisulares y mucho menos afecta al esporozoito. En el caso de la malaria producida por *P. malariae* y *P. falciparum*, todos los esporozoitos se desarrollan en el hígado, convirtiéndose en esquizontes y al final los merozoitos que se producen salen a la circulación, sin dejar formas en estado estacionario, es por ello, que el tratamiento preventivo con un esquizonticida sanguíneo es suficiente para destruir al parásito y evitar las manifestaciones clínicas de la infección; pero en el caso de *P. vivax* o *P. ovale*, por ser parásitos que producen hipnozoitos, el mismo tratamiento sólo prolonga el tiempo de presentación de la sintomatología y sólo se evitaría la aparición de los síntomas si se administra además un esquizonticida tisular como la primaquina. En estas dos especies se podría pensar que la profilaxis ideal se conseguiría con la

administración de primaquina por el tiempo que fuese necesario; sin embargo esta droga por su gran toxicidad, no puede ser administrada por tiempo prolongado debido a que su vida media es corta; para mantener niveles adecuados de la droga se tendría que administrar cada 4 -6 h, con un alto riesgo de sufrir intoxicación.<sup>2,37</sup>

En malaria el tratamiento quimioproláctico puede ser administrado tanto en forma colectiva como en forma individual.

Quimioprofilaxis colectiva. El tratamiento colectivo produce la ausencia temporal de parasitemias de la población o cuando menos una gran reducción de ellas. Generalmente se ha utilizado como un complemento del rociado con insecticidas residuales y control larvario de los criaderos del vector,<sup>37,40,41</sup> en la etapa de ataque. Se aplica a la población de una zona determinada, o bien a grupos nómadas, las dosis y el tiempo de administración dependen de las condiciones epidemiológicas de la zona y el medicamento a usar. Se puede administrar una vez por semana o cada dos semanas, también se pueden administrar dos medicamentos en forma simultánea.

La droga que se seleccione debe ser un compuesto que difícilmente produzca resistencia del parásito.

La cloroquina se administra en dosis de 300mg base, cada semana, se puede asociar con 25-50mg de pirimetamina o 20mg de cloroguanida. En 1952 se aplicó el método de Pinotti, el cual consiste en la administración de medicamentos, en aditamentos alimentarios consumidos por gran parte de la población, como es la sal de cocina.<sup>41</sup> Los medicamentos que más se han utilizado de esta manera han sido la cloroquina, la piremnetamina y la amodiaquina.

Los primeros ensayos prácticos sobre la utilización de la sal medicamentosa, conteniendo 0.3% de cloroquina base, se efectuaron en Brasil, en 1952 y más tarde también se han utilizado en Camboya, Ghana, Nueva Guinea, y Guayana Británica. Se calcula que una persona que consume 10-15mg de sal diariamente, con esta concentración del compuesto, recibe una dosis de 210-315mg de cloroquina base por semana. La pirimetamina se ha utilizado en una concentración de 0.05-0.07% y se pretende que cada individuo reciba una dosis de 25mg por semana. Tanto la cloroquina como la pirimetamina se pueden administrar combinadas en la sal de cocina.<sup>37,42</sup>

Para administrar el tratamiento se debe saber cual especie de Plasmodium se localiza en la región, y si ésta es sensible o resistente al medicamento por usar. Para las zonas endémicas de P. falciparum, generalmente se utiliza la cloroquina a razón de 500mg por semana por vía oral, para adultos. En caso de que exista resistencia, se puede administrar la combinación de varios medicamentos como la cloroquina combinada con pirimetamina y dapsona las cuales se administran semanalmente, o bien la administración de mefloquina más cloroquina, las cuales también se administran semanalmente.<sup>43</sup> En caso de P. vivax y P. ovale, además de los tratamientos ya mencionados, también se debe administrar un esquizotocida tisular como la primaquina.

Quimioprofilaxis individual. La quimioprofilaxis individual se puede administrar a viajeros que se introducen a una zona malárica con un alto riesgo de adquirir la infección. El régimen seleccionado

será de acuerdo a la especie de Plasmodium que predomine en esa zona. El medicamento se puede administrar una vez por semana como único medicamento o la combinación de varios. En aquellas zonas donde no haya resistencia de P. falciparum o en donde predomine P. vivax se puede administrar cloroquina o amodiaquina a la misma dosis que en la quimioprolifaxis colectiva. Y en aquellas zonas donde existe riesgo de resistencia de P. falciparum principalmente hacia la cloroquina, se puede administrar cloquina 500mg semanariamente y proguanil 400mg diariamente, también se emplea pirimetamina y dapsona más cloroquina una tableta semanariamente o bien administrar mefloquina 250mg semanariamente.<sup>44,45</sup>

**Tratamiento supresivo.** Es aquel que suprime los síntomas clínicos, mediante la administración de medicamentos que actúan contra las formas hemáticas asexuadas del parásito, ocasionando que el individuo quede libre del cuadro clínico de la malaria, más no necesariamente de la infección.

Son medicamentos supresivos la cloroquina, cloroguanida, amodiaquina, mefloquina y artemisinina,<sup>2,37</sup> y actúan contra las cuatro especies de Plasmodium que afectan al hombre. Las dosis y el tiempo de administración varía de acuerdo con cada medicamento. Un tratamiento supresivo es curativo en P. malariae y P. falciparum y es solo supresivo en P. vivax y P. ovale.

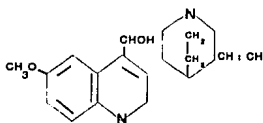
Tratamiento radical. Es aquel que se asocia al tratamiento supresivo cuando las especies causantes de la malaria son *P. vivax* y *P. ovale*, y va dirigido a eliminar las formas latentes o hipnozoitos, albergadas en el hígado. Este tratamiento se efectúa con esquizotónicas tisulares como la primaquina.

### Clasificación de los antimaláricos de acuerdo a su estructura química

#### I. Alcaloides de la quinina

Se obtienen de la corteza del árbol de la quinina, originario de América del Sur, actualmente se le cultiva extensamente en el Congo e Indonesia. Los alcaloides más importantes son la quinina, la quinidina, la cinconina y la cinconidina. De estos la quinina es la que tiene mayor actividad antimalárica. Este compuesto fue aislado en 1820 por Pelletier y Coventou.

#### Quinina.



Estructura química. La quinina tiene un grupo quinolínico, unido por un alcohol secundario a un anillo de quinuclidina, una cadena lateral metoxi unida al anillo quinolínico y un grupo vinilo el cual se encuentra unido a la quinuclidina.



**Mecanismo de acción.** El grupo alcohol secundario es esencial para su efecto antipalúdico, no así los radicales metoxi y vinil. Al parecer tiene un efecto inhibitor sobre el DNA.

**Efectos farmacológicos.** La quinina como antimalárico tiene una acción esquizonticida eritrocítico, de acción rápida; actúa contra las cuatro especies de Plasmodium cuando no existe resistencia. Tiene acción contra gametocitos de P. vivax y P. malariae más no contra gametocitos de P. falciparum (Cuadro 2).

**Absorción y eliminación.** Se absorbe por vía digestiva y se elimina por vía urinaria, a las 24h sus concentraciones plasmáticas son insignificantes.

**Efectos adversos.** Puede ocasionar cinchonismo, náuseas, vómitos, excitación y confusión. No se debe administrar en pacientes con antecedentes hemolíticos, tinnitus o neuritis óptica.

**Dosis y vía de administración.** La dosis usual es de 325mg cada 6h por 7 días y en niños 7.5mg/kg de peso por 7 días, por vía oral (Cuadro 2).

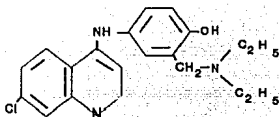
## II. 4 aminoquinolinas

Dentro de este grupo encontramos a la quinacrina, amodiaquina y cloroquina.

**Quinacrina.** Fue sintetizada en 1930 por Mietzch y Maus, su uso estuvo limitado principalmente al período de la II Guerra Mundial, siendo sustituida por otros antimaláricos menos tóxicos.

**Amodiaquina.** Fue sintetizada en 1946 por Burckhalter, se utilizó intensamente después de la II Guerra Mundial. En la

actualidad se usa en algunas zonas, administrándola sola o combinada con otros fármacos.



**Estructura química.** 7-cloro-4 (3'-dietilamino metil,4'-hidroxianilino) quinoleína.

**Mecanismo de acción.** No se conoce.

**Efectos farmacológicos.** Es un esquizonticida eritrocítico, actúa contra las 4 especies humanas de *Plasmodium*, se utiliza para aliviar los accesos palúdicos, controla rápidamente la parasitemia y es agente curativo únicamente contra *P. malariae* y *P. falciparum*.

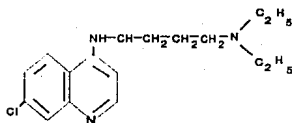
**Absorción y eliminación.** Se absorbe adecuadamente por vía oral y se elimina por vía urinaria.

**Efectos adversos.** Diarrea, vómito y vértigo.

**Dosis y vía de administración.** Se administra por vía oral en un esquema de 3 dosis. El primer día 10mg/kg la primera dosis y a las 6h 5mg/kg, el segundo día 5mg/kg, y el tercer día 5mg/kg. Cuando existe resistencia de *P. falciparum* hacia la cloroquina se puede administrar en combinación con tetraciclina.<sup>45</sup>

**Cloroquina.** Fue sintetizada por los alemanes en 1934, dándole el nombre de resoquina, se pensó que era un compuesto muy tóxico, motivo que ocasionó que se abandonara su uso. Después de la Segunda

Guerra Mundial fue revalorada llegando a la conclusión de que es un excelente agente supresivo contra las cuatro especies de Plasmodium que afectan al hombre y agente curativo contra P. malariae y P. falciparum y desde entonces su uso se generalizó.<sup>37</sup>



Estructura química. Sulfato o difosfato de 7 cloro 4 (4 dietil amino 1 metibutil amino) quinoleína. Es decir se encuentra formada por un anillo quinoléínico, un grupo cloro en el C 7 y una cadena amínica terciaria en el C 4.

Mecanismo de acción. Existen tres hipótesis que tratan de explicar el efecto antipalúdico a nivel molecular de la cloroquina. La primera señala que el cloro (electronegativo) en la posición 7 se une al grupo 2 amino de la guanina (electropositivo) del DNA. La cadena lateral diamínica se une por enlace iónico con los grupos fosfatos del DNA, dando como resultado que la molécula del DNA del parásito no se pueda separar y sirva como molde para su replicación. La segunda sostiene que la cloroquina se fija a la hemoglobina y el parásito al degradar esta molécula, produce ferroprotoporfirina, complejo altamente tóxico para el propio parásito. La tercera indica que la cloroquina puede inhibir la catepsina D, enzima del parásito capaz de degradar la molécula de la hemoglobina en péptidos.<sup>24</sup>

**Efectos farmacológicos.** Es un esquizonticida eritrocítico, actúa contra todas las especies humanas de Plasmodium, no actúa contra gametocitos. Controla rápidamente la parasitemia y los síntomas clínicos, a las 48h los pacientes se encuentran totalmente afebriles, y los frotis son totalmente negativos a las 48 ó 72 h. Tiene un efecto supresivo contra las cuatro especies de Plasmodium además contra P. malariae y P. falciparum tiene un efecto curativo. La cloroquina además de tener efecto antimalárico posee propiedades antiinflamatoria y se ha utilizado también en el control del lupus eritematoso discoide, en la porfiria cutanea, la urticaria solar y demás reacciones fotoalérgicas (Cuadro 2).

**Absorción y eliminación.** Se absorbe adecuadamente por vía oral y en menor proporción por vía parenteral. Se elimina principalmente por la orina en un 70% como cloroquina y en escasa cantidad por las heces.<sup>46</sup> Se ha observado que se elimina pobremente por la leche materna. Su vida media es de 7 días.

**Efectos adversos:** Puede ocasionar anorexia, vómito, diarrea, visión borrosa, convulsiones epileptiformes, alteraciones de la retina con pigmentación macular.<sup>1,2,3,47</sup> También se le ha asociado con alteraciones psiquiátricas como psicosis, esquizofrenia y depresión<sup>48</sup> (Cuadro 2).

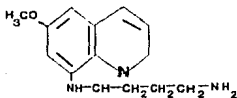
**Dosis y vía de administración.** Se puede administrar por vía oral o bien por vía parenteral. Existen tabletas de 250 y 500mg de difosfato de cloroquina base o en ampolletas de 50mg/ml. El tratamiento oral se administra por 3 días: el primer día se inicia con la administración de 10 mg/kg y 6h más tarde se administran

5mg/kg, el segundo día 5mg/kg de peso y el tercer día se repite la misma dosis. En el caso de malaria cerebral se puede administrar por vía intramuscular a una dosis de 200mg cada 6h, no debe rebasar los 800mg en 24h. Como profiláctico este compuesto se administra a la dosis de 500mg/semana en una sola toma (Cuadro 2).

### III. 8 aminoquinoleínas

En la década de los cuarenta, durante las investigaciones realizadas por los EEUU para desarrollar compuestos mas eficaces y menos agresivos, surgieron algunos antimaláricos como la pentaquina y la primaquina, que fueron sintetizados por Elderfield en 1946. Se caracterizan por ser esquizonticidas tisulares, es decir, destruyen las formas exoeritrocíticas produciendo una cura radical. Actúa contra *P. vivax* y *P. ovale*. En la actualidad únicamente se utiliza la primaquina ya que la pentaquina es mucho muy tóxica.

Primaquina.



Estructura química. Fosfato o difosfato de 6 metoxi 8 (4 amino-1-metilbutil)-aminoquinolina es decir formada por un anillo quinolinico con un grupo metoxi en el C 6 y una cadena amínica terciaria en el C 8. Se ha observado que al sustituir algunos de los radicales o aumentar el número de éstos o bien modificar su

posición, puede aumentar o disminuir su actividad antimalárica o su toxicidad. Por ejemplo si se agrega un grupo metoxi, amino o vinil en el C 2, se observa una menor actividad y un menor efecto tóxico. Si existen sustituciones múltiples aumenta la actividad pero también la toxicidad.<sup>7</sup>

**Mecanismo de acción.** Se piensa que actúa a nivel de DNA, al parecer se intercala en la molécula de este impidiendo su replicación.

**Efectos farmacológicos.** Es un esquizotocida tisular y además actúa contra los hipnozoitos causantes de las recaídas.<sup>22</sup> Actúa contra los gametocitos de las cuatro especies de P.falciparum que afectan al hombre (Cuadro 2).

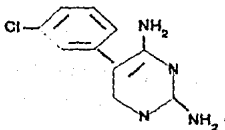
**Absorción y eliminación.** Se absorbe bien por vía digestiva, y se elimina totalmente a las 24h por la orina y las heces. Tiene una vida media de 4h.<sup>49</sup>

**Efectos adversos.** La anemia hemolítica es el efecto tóxico más grave que produce en sujetos con eritrocitos deficientes en glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. En menor porcentaje produce vómito y cefalea. No se debe aplicar en pacientes con antecedentes hemolíticos o anemia (Cuadro 2).

**Dosis y vía de administración.** Se presenta en forma de tabletas o cápsulas que contienen 26.3mg de la sal, equivalentes a 15mg base. La dosis usual es de 15mg base por día y generalmente se administra por vía oral por 14 días. Se absorbe bien por vía digestiva.

#### IV. Derivados de la pirimidina

Pirimetamina. Es el único antimalárico derivado de la pirimidina. Fue sintetizado en 1949 por Hitching.



**Estructura química.** Su estructura molecular es la de una 2-4 diaminopirimidina.

**Mecanismo de acción.** Inhibe la síntesis de ácido fólico, a través del bloqueo de la enzima dihidrofolato reductasa.

**Efectos farmacológicos.** Es un esquizonticida eritrocítico. Debido a su vida media tan prolongada, generalmente, se usa como profiláctico en zonas donde existen cepas multirresistentes de *P. falciparum*. Se administra en forma combinada con otras drogas, tratando de evitar la aparición de resistencia hacia el medicamento (Cuadro 2).

**Absorción y eliminación.** Se absorbe bien por vía digestiva tiene una vida media de 4 días y se elimina lentamente por la orina aunque también se le puede encontrar en la leche materna.

**Efectos adversos.** A dosis altas se puede producir anemia megaloblástica, debido a que inhibe al ácido fólico. Los antifolatos pueden ser potencialmente tóxicos para el feto, por lo

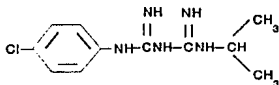
que se recomienda no usarlos durante el embarazo.

**Dosis y vía de administración.** Se presenta en tabletas de 25mg, se combina con 100 mg de dapsona y también existe combinación con 500 mg de sulfadoxina,<sup>50</sup> (Cuadro 3). Estos compuestos se administran semanalmente por vía oral. Recientemente se ha observado que la eficacia de la combinación con dapsona ha disminuido. En 1967 en Tailandia, se obtenía una curación hasta del 89.5%, y en 1980 se redujo hasta un 14%.<sup>51</sup>

#### V. Biguanidas

En este grupo se encuentran la cloroguanida y el cloroproguanil, la primera es la que se usa con mayor frecuencia.

**Cloroguanida.** Es un antimalárico que fue sintetizado en 1945 por Curd.



**Estructura química.** Es un clorhidrato de N'-p-clorofenil-N5 isopropilbiguanida.

**Mecanismo de acción.** Inhibe la síntesis del ácido fólico al bloquear la enzima dihidrofolato reductasa.

**Efectos farmacológicos.** Es un medicamento supresivo para P. vivax, y P. ovale no actúa a nivel de formas exoeritrocíticas de



estas especies. En *P. falciparum* y *P. malariae* produce cura radical (Cuadro 2).

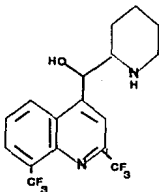
**Absorción y eliminación.** Se absorbe en forma lenta pero adecuada por vía oral. Las concentraciones máximas se alcanzan a las 4h y es eliminada casi totalmente a las 24h por la orina. La actividad de este compuesto se debe a un metabolito, la triazina.

**Efectos adversos.** A las dosis recomendadas carece de efectos desfavorables, pero a dosis mayores puede producir vómito, dolor abdominal y evacuaciones diarréicas (Cuadro 2).

**Dosis y vía de administración.** Se presenta en forma de tabletas de 25, 100 y 300mg de clorohidrato de cloroguanida. Se recomienda una dosis inicial de 300mg, con dosis subsecuentes de 300mg por día por 4 a 10 días.

## VI. Nuevos Antimaláricos

**Mefloquina.** Se originó en EEUU a partir de una serie de investigaciones en las cuales se analizaron 250,000 compuestos con potencialidad antimalárica.<sup>39</sup> Fue sintetizada en 1971 por Ohnmach y col.



**Estructura química.** Es un derivado de la 4 quinolina metanol,

se encuentra químicamente relacionada con la quinina.

Mecanismo de acción. Se ignora.

Efectos farmacológicos. Actúa como esquizonticida eritrocítico contra las 4 especies de Plasmodium que afectan al hombre, en los casos de P. vivax y P. falciparum produce una curación en el 98% de los casos. Cuando se administra para tratar los casos de malaria producidos por P. vivax, se debe agregar primaquina para completar el esquema terapéutico, porque la mefloquina no posee actividad esquizonticida a nivel tisular.<sup>52,53</sup> También actúa contra P. malariae<sup>50</sup> (Cuadro 2).

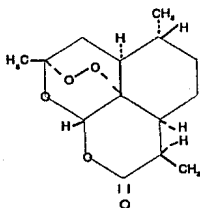
Se han encontrado casos de resistencia tipo I de P. falciparum hacia la mefloquina, se piensa que la causa puede ser la aplicación de dosis menores a las recomendadas.<sup>54</sup> Aunque en otras zonas se ha observado resistencia cruzada con la quinina.

Absorción y eliminación. Se absorbe bien por vía digestiva, se distribuye extensamente en el organismo, pero alcanza mayores concentraciones en el tracto gastrointestinal, hígado y pulmones.<sup>55</sup> Tiene una gran solubilidad en los lípidos, se acumula en grandes concentraciones en los eritrocitos y se une a las proteínas del plasma. La concentración plasmática se alcanza en horas y se mantiene por varios días, su vida media es de 14 días.<sup>54</sup> Se elimina principalmente por heces entre un 70% y 77%.<sup>55</sup>

Efectos adversos. A dosis altas puede producir cuadros diarréicos, así como lesiones en tejido linfoide y en el hígado, las cuales desaparecen después de suspender el tratamiento.<sup>56,57</sup> No es una droga teratogénica ni carcinogénica.<sup>54</sup>

Dosis y vía de administración. Se presenta en tabletas de 250mg, se administra por vía oral, en una dosis de 1500mg, en niños se administra de 20 a 30mg/kg en dosis única.<sup>54</sup> Debido a su larga vida media se le puede utilizar como profiláctico a dosis de 1500mg cada semana por el tiempo que sea necesario.

Artemisinina. Este nuevo compuesto los chinos lo aislaron en 1971 a partir de Artemisia annua planta silvestre perteneciente a la familia de las compuestas.



Estructura química. Es un sesquiterpeno lactona, con un grupo peróxido, que le da propiedades antimaláricas.

Mecanismo de acción. En P. berghei induce cambios en las membranas de diversos organelos como la vacuola digestiva, mitocondria, núcleo y la capa interna de la membrana citoplasmática.<sup>58</sup> En P. falciparum provoca cambios semejantes excepto a nivel de mitocondrias.<sup>58</sup> Estas observaciones indican que quizás la artemisinina bloquea la síntesis de proteínas. Otros autores han encontrado un aumento de radicales libres que inhiben el crecimiento del parásito.<sup>59</sup>

Efectos farmacológicos. Actúa como esquizonticida

eritrocítico, no tiene efecto contra formas exoeritrocíticas y al parecer no actúa contra gametocitos.<sup>4</sup> Se le puede administrar contra las cuatro especies de Plasmodium que afectan al hombre.

En malaria cerebral se obtuvo curación en el 92% de 197 casos que fueron tratados.<sup>4</sup>

**Absorción y eliminación.** Se absorbe bien por vía oral, tiene una vida media corta de 4h aproximadamente, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y la placenta.<sup>42,60</sup> Se elimina principalmente por vía urinaria.

**Efectos adversos.** Los efectos tóxicos sólo se manifiestan cuando se aplica en grandes dosis. En perros cuando se administra en dosis de 400-800mg/kg se presenta reticulocitosis moderada, degeneración grasa del hígado y edema cerebral. Estas alteraciones desaparecen cuando se suspende el tratamiento.<sup>42</sup>

**Dosis y vía de administración.** Es un medicamento que se administra generalmente en una sola dosis de 1g por vía oral.

#### Resistencia

La resistencia que presentan los plasmodios contra algunas drogas es definida por la OMS "como la aptitud de los parásitos de una cepa para sobrevivir o multiplicarse, a pesar de la administración y la absorción de un medicamento en dosis iguales o superiores a las que se prescriben habitualmente, pero comprendidas dentro de los límites del enfermo, en cuanto a la tolerancia".<sup>42</sup>

El problema de la resistencia hacia los antimaláricos como la

quinina, pirimetamina, proguanil y cloroquina, ha aumentado considerablemente, sobre todo en aquellos países que se encuentran ubicados al sur del Ecuador en los continentes americano, asiático y africano.

En 1910 en Brasil se reportó por primera vez resistencia de P. falciparum hacia la quinina.<sup>61</sup> En 1948 resistencia de P. falciparum y P. vivax hacia el proguanil en Malaya, Indonesia y Vietnam. En 1952 resistencia de P. falciparum, P. malariae, y P. vivax hacia la pirimetamina en Africa Oriental (Kenia y Nigeria) y Venezuela. En 1959, 1961, 1962 se presentó resistencia de P. falciparum hacia la cloroquina en Tailandia, Colombia, Venezuela, Brasil, Camboya y hasta 1978 en Africa (Tanzania y Kenia)<sup>37,61</sup> (Cuadros 5 y 6).

Actualmente la resistencia de P. falciparum hacia la cloquina en América se encuentra distribuída en Brasil, Ecuador, Colombia, Venezuela, las Guayanas, Perú, Bolivia y Panamá. En Asia: Pakistan, India, Birmania, Laos, Vietnam, Camboya, Malasia, Filipinas, Nueva Guinea. Y en Africa: Angola, República del Congo, Zambia, Tanzania, Kenia, Uganda, Sudan y República de Malgache (Mapa 1).

Existen diferentes tipos de resistencia, de acuerdo con la respuesta de la cepa hacia el antimalárico. La OMS la ha clasificado en grado I, II, III. En el grado I la parasitemia asexual desaparece, recrudesciendo en forma inmediata o tardía. En el grado II hay notable reducción de la parasitemia asexual, sin desaparecer en forma completa y en el grado III no hay reducción notable en la parasitemia asexual (Cuadro 4).

Tradicionalmente se han utilizado los modelos in vivo de aves roedores o monos para valorar los diferentes compuesto, en la búsqueda de drogas profilácticas, esquizonticidas sanguíneos, y esquizonticidas tisulares. Además, estos modelos también se utilizan para corroborar la resistencia o multirresistencia hacia los diferentes antimaláricos.<sup>42</sup> La aparición de los cultivos in vitro de P. falciparum<sup>62</sup> ha facilitado este análisis, porque el uso de microtécnicas con microdosis, permite valorar diferentes compuestos en poco tiempo. Con este método se estima el crecimiento y la maduración del parásito, al marcar la diferencia entre las cepas testigos susceptibles y resistentes, con las cepas que se desean valorar.<sup>63</sup>

Para tratar de evitar la aparición de cepas resistentes o multirresistentes se ha venido introduciendo el tratamiento antimalárico a base de combinación de drogas. Se han aislado cepas de P. falciparum y P. vivax multirresistentes que pueden presentar resistencia cruzada hacia la cloroquina, quinacrina, cloroquanida y pirimetamina.<sup>42,61</sup>

En 1959 Hurley utilizó la pirimetamina con la sulfonamida,<sup>39</sup> en 1968 Wellcome Foundation ensayó la pirimetamina con la dapsona.<sup>39</sup> En 1970 se empezó a utilizar la pirimetamina con una sulfonamida de acción prolongada como la sulfadoxina. Después de la aparición de la mefloquina se introdujo una nueva combinación de drogas combinándose la pirimetamina, sulfadoxina y mefloquina.<sup>39</sup> Pero a pasar de esta medida desde mediados de los años 70 en Campuchea, Tailandia, Vietnam, Colombia y Brasil, P. falciparum y P. vivax han

presentado resistencia hacia esta combinación de drogas<sup>61,64</sup> (Cuadro 3).

Las alternativas de tratamiento en casos de resistencia no son muchas. Se puede usar amodiaquina o Fansidar en la resistencia moderada de *P. falciparum* hacia la cloroquina, o bien cuando existe multirresistencia se recomienda la administración de pirimetamina sulfadoxina y mefloquina<sup>65</sup> (Cuadro 3). En algunas regiones se utilizan la quinina y las tetraciclinas combinadas con otras drogas; la tetraciclina se combina con amodiaquina o bien con quinina.<sup>65</sup>

Se piensa que son varios los factores que influyen en el establecimiento de la resistencia. Se ha mencionado la mutación espontánea con la selección de mutantes resistentes, la mutación extranuclear (por ejemplo a nivel de mitocondrias) y la transferencia de factores de resistencia a pesar de que esto no se ha demostrado.<sup>61</sup>

Peters sugiere que el uso en gran escala de la cloroquina ha influido en la aparición y diseminación de cepas resistentes.<sup>61</sup> Payne observó que la resistencia a la cloroquina aparece en forma simultánea con el uso de sal medicamentosa.<sup>65</sup> Los lugares en donde surgió la resistencia son geográficamente independientes pero tienen un común denominador, que es el uso prolongado de la cloroquina en forma masiva.<sup>65</sup> La administración de sal medicamentosa se estableció en 1952 incorporando cloroquina a la sal común en una concentración del 0.33-0.38%.<sup>42,65</sup> El uso de esta sal formó parte de los programas de erradicación de la malaria durante los siguientes

años en América, sureste de Asia y Africa. En Brasil se administró a 3,800 personas, en Tanzania a 3,000 y en Uganda a 23,000 empleados de los ingenios azucareros entre 1964-1965.<sup>42</sup> Esta forma de administrar la cloquina se ha usado en algunos países hasta por 12 años.

Quizá el uso indiscriminado de la cloroquina ha ocasionado la aparición de resistencia por presión selectiva. Experimentalmente se ha observado que algunas cepas de P. berghei resistentes a la cloroquina, vuelven a ser susceptibles cuando se suprime la presión de la droga.<sup>66</sup>

La resistencia que presenta, principalmente P. falciparum hacia los antimaláricos, es uno de los factores que han influido en el fracaso de los programas de erradicación a nivel mundial.



## ARTEMISIAS

El género Artemisia está formado por 300 especies, las cuales tienen una distribución cosmopólita.

De las 300 especies, 55 existen en Europa y el resto se distribuyen en Asia, África y América del Norte. En América del Sur no se ha reportado información de su existencia.<sup>67</sup> Las plantas que se clasifican dentro del género Artemisia tienen las siguientes características: son plantas herbáceas, aromáticas, con hojas alternas, enteras o pinatífidas, algo tomentosas; con capítulo pequeño; péndulo, racimoso o paniculado, raramente solitario. Involucro ovoide, acampanado o hemisférico; con las bracteas imbrincadas, membranosas en el margen. Receptáculo hemisférico, desnudo o ciliado. Flores todas tubulares. Aquenios ovoides, comprimidos sin vilano.<sup>68,69</sup>

A. annua es un género que se le localiza en Asia, Europa y América del Norte. En Europa se le localiza al suroeste de ese continente, en Bulgaria, Rumania, Alemania<sup>68</sup> y Hungría<sup>69</sup> y en Asia se le encuentra en China, Taiwan, Hainan y en Corea<sup>70</sup> y en América del Norte.

Algunas de las especies de Artemisias han sido agrupadas de acuerdo a características genéticas y morfológicas en un complejo denominado complejo de A. vulgaris en Norteamérica. A. ludoviciana forma parte de este complejo y dentro de esta especie, se encuentra ubicada una subespecie A. ludoviciana mexicana.<sup>71</sup>

En la República Mexicana existen ocho especies de Artemisias. A. frigida se le localiza en Nuevo Leon; A. dracunculoides en Baja

California; A. filifolia en Chihuahua; A. absintium en Michoacan; A. tridentata en Baja California; A. californica en Baja California; A. klotzchiana en Hidalgo, Edo. de México; A. ludoviciana mexicana en el Distrito Federal, Edo. de México y Morelos<sup>72</sup> (Mapa 2).

A. ludoviciana, cuyo nombre común es estafiate o iztauhyatl, es una planta herbácea, olorosa, con hojas alternas sesiles y tomentosas. Flores en cabezuela dispuestas en racimo. Florece de Agosto a Octubre.

A. klotzchiana es una planta herbácea, anual o perene, mide 1.2 m de alto, muy aromática al estrujarse, hojas hasta de 2cm de largo, cabezuelas erectas, agrupadas en panículas, angostas, densas y foliosas, flores periféricas. También se le conoce como estafiate.<sup>73</sup>

HOMBRE

MOSQUITO

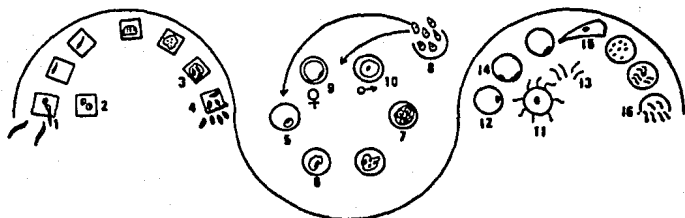


Fig. 1. CICLO DE VIDA DE Plasmodium sp.

- |    |                        |     |                     |
|----|------------------------|-----|---------------------|
| 1. | ESPOROZOITO            | 9.  | MACROGAMETOCITO     |
| 2. | HIPNOZOITO             | 10. | MICROGAMETOCITO     |
| 3. | ESQUIZONTE HEPATICO    | 11. | CUERPO EXFLAGELANTE |
| 4. | MEROZOITO HEPATICO     | 12. | MACROGAMETO         |
| 5. | TROFOZOITO ANULAR      | 13. | MICROGAMETO         |
| 6. | TROFOZOITO AMEBOIDE    | 14. | FECUNDACION         |
| 7. | ESQUIZONTE ERITOCITICO | 15. | OOQUINETO           |
| 8. | MEROZOITO              | 16. | OOQUISTE            |



MAPA 1. DISTRIBUCION MUNDIAL DE *P. falciparum* CLOROQUINO RESISTENTE



MAPA 2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE ESPECIES DEL GENERO Artemisia EN MEXICO

1. A. ludoviciana mexicana (D.F., Edo. de Méx., Morelos)
2. A. klotzchiana (Hidalgo, Edo. de México)
3. A. filifolia (Chihuahua)
4. A. absintium (Michoacán)
5. A. dracunculoides (Baja California)
6. A. californica (Baja California)
7. A. frigida (Nuevo León)
8. A. tridentata (Baja California)

**CUADRO 1**

**CLASIFICACION DE LOS ANTIMALARICOS  
SEGUN LA FASE DEL CICLO VITAL  
DE LOS PLASMODIOS SOBRE LA  
QUE ACTUAN**

FASE	TIPO DE ACCION	FARMACO
Esporozoito	Esporozoitocida	Ninguno
Asexual hepática	Esquizonticida tisular	Primaquina
Asexual eritrocítica	Esquizonticida sanguíneo	Cloroquina Quinina Amodiaquina Cloroguanida Sulfonas Sulfonamidas Mefloquina Artemisinina
Sexual	Gametocitocida	Primaquina

**CUADRO 2**  
**TRATAMIENTO ESQUIZONTICIDA**  
**SANGUINEO**

FARMACO	ACTUA CONTRA	DOSIS Y VIA	FARMACOCINETICA	EFFECTOS ADVERSOS	PRESENTACION
Quinina	<u>P. vivax</u> <u>P. falciparum</u> <u>P. malariae</u> <u>P. ovale</u>	300 mg/6 horas por 7 días	Se absorbe por vía digestiva. Se elimina a las 24 horas por riñón	Cinchonismo, náuseas, excitación y confusión	Tabletas o cápsulas de 325 mg
Cloroquina	<u>P. vivax</u> <u>P. falciparum</u> <u>P. malariae</u> <u>P. ovale</u>	25 mg/kg dosis total 1 <sup>o</sup> día 10 mg/kg, 6 h después 5 mg/kg 2 <sup>o</sup> día 5 mg/kg 3 <sup>o</sup> día 5 mg/kg	Se absorbe por vía oral, se elimina principalmente por orina. Vida media de 7 días	Anorexia, vómitos, cólicos, diarreas, visión borrosa, pigmentación macular leucopenta.	Tabletas de 250 a 300 mg de difosfato de cloroquina. Aspoletas de 50 mg/ml de clorhidrato de cloroquina
Cloroquinida	<u>P. vivax</u> <u>P. falciparum</u> <u>P. malariae</u> <u>P. ovale</u>	300 mg/24 h/ por 10 días, vía oral	Absorción lenta por vía digestiva, se elimina en 24 h por la orina	Dolor abdominal, hematuria	Tabletas de 25, 100 y 300 mg
Mefloquina	<u>P. vivax</u> <u>P. falciparum</u> <u>P. malariae</u>	1-1.5 g, dosis única	Buena absorción gastrointestinal. Vida media 14 días	Dosis altas: diarreas, lesión en hígado y tejido linfóide	Tabletas de 250 mg

**TISULAR**

FARMACO	ACTUA CONTRA	DOSIS Y VIA	FARMACOCINETICA	EFFECTOS ADVERSOS	PRESENTACION
Primaquina	<u>P. vivax</u> y <u>P. ovale</u>	15 mg base/24 h/14 días. Niños: 5 mg/kg/24 h/14 días	Buena absorción por vía oral. Se concentra principalmente en hígado, pulmón y corazón. Se elimina en 24 horas por la orina	Anorexia, vómito, cefalea, anemia hemolítica	Tabletas o cápsulas con 26.3 mg de la sal. (equivalente a 15 mg base)

CUADRO 3

TRATAMIENTO ANTIMALARICO CONTRA  
P. falciparum, CLOROQUINA RESISTENTE

Fármaco	Dosis	Presentación
Sulfadoxina con pirimetamina (Fansidar*)	25 mg/kg 1.5 mg/kg (dosis única)	Tabletas de 500 mg de sulfadoxina y 25 mg de pirimetamina
Mefloquina con sulfadoxina con pirimetamina (Fansimef*)	12.5 mg/kg 25 mg/kg 1.5 mg/kg (dosis única)	Tabletas de 250 mg de mefloquina, 500 mg de sulfadoxina y 25 mg de pirimetamina
Amodioquina con tetraciclina	25 mg/kg (3 días) 4 mg/kg (7 días)	Tabletas de 200 mg Cápsulas de 250 mg
Quinina con tetraciclina	30 mg/kg (7 días) 4 mg/kg (7 días)	Tabletas de 200 mg Cápsulas de 250 mg

Ann Soc Belge Med Trop 1985,65, suppl 2 155-163

\* = Nombre comercial

CUADRO 4

TIPOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMALARICOS

Respuesta	Símbolo	Signos observados
Sensibilidad	S	Desaparece la parasitemia asexual en los 7 días siguientes al tratamiento, sin recaídas.
Resistencia	I	Desaparición de la parasitemia asexual; recrudece en forma inmediata o tardía.
	II	Notable reducción de la parasitemia asexual, sin desaparecer en forma completa.
	III	No hay reducción notable en la parasitemia asexual.

Org. Mund. Salud Ser. Inf. Tecn. 1967, 375.



CUADRO 5

FECHA Y LUGAR DE APARICION DE  
RESISTENCIA DE *P. falciparum*

FARMACO	FECHA	LUGAR
Quinina	1910	Brasil
Pirimetamian	1952	Africa Oriental
Fansidar	Mediados de los 70s	Kampuchea Tailandia Colombia Brasil
Cloroquina	1957	Tailandia
	1961	Colombia
	1962	Venezuela Brasil Camboya
	1978	Tanzania Kenia

Org Mund Salud Serv Inf Tecn. 1967  
Experiencia 1984:40;375

CUADRO 6

FECHA Y LUGAR DE APARICION DE  
RESISTENCIA DE *P. vivax*

FARMACO	FECHA	LUGAR
Cloroguanida	1948	Malaya Vietnam
Pirimetamina	1954	Kenia Nigeria Venezuela
Cloroquina	1989	Nueva Guinea

Transactions of the Royal Society of Tropical  
Medicine and Hygiene (1992) 86, 121-122

## OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo es, determinar si los extractos crudos de dos especies de Artemisia nativas de la República Mexicana (A. ludoviciana y A. klotzchiana) presentan actividad antimalárica y además, contribuir al conocimiento científico de las plantas de uso medicinal que son empleadas en ciertas regiones de nuestro país.

## MATERIALES Y METODOS

### SELECCION DE ARTEMISIAS

Se recopiló información en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM sobre la existencia, distribución y caracteres taxonómicos de especies autóctonas del género Artemisia en la República Mexicana. Una vez que se reconocieron las 8 especies registradas para el país, se procedió a realizar una búsqueda bibliográfica para saber si a alguna de esas especies se le había conferido actividad antimalárica, ya fuese por consejas populares o por experimentación. De esta manera se encontró que de las 8 especies sólo una, A. ludoviciana ssp mexicana, tuvo antecedentes de haber sido utilizada empíricamente para el tratamiento de las fiebres recurrentes.<sup>6,74</sup>

Para propósitos del presente estudio se seleccionaron dos especies, A. ludoviciana ssp mexicana y A. klotzchiana. La primera por sus antecedentes de uso empírico como antimalárico ya referidos, y la segunda por pertenecer al grupo de artemisias no relacionadas con el tratamiento popular de la malaria.

### COLECTA E IDENTIFICACION TAXONOMICA

Para la colecta de A. ludoviciana ssp mexicana se seleccionó una zona aledana al pueblo de Milpa Alta en el D.F. y para A. klotzchiana los alrededores de Actopan, Hidalgo. Se colectaron algunos ejemplares de esas especies, los cuales fueron prensados en

papel periódico y secados por varios días. Posteriormente fueron montados en papel cartoncillo y llevados al Herbario Nacional en donde fueron identificados taxonómicamente por el jefe del Herbario Dr. José Luis Villaseñor.

Después de la identificación de las plantas, se volvió al mismo lugar en donde fueron colectadas y se efectuó, ésta vez, una colecta masiva. Las plantas colectadas se colocaron en costales de tela, para ser transportadas al laboratorio. El volumen total de la colecta fue dividida en 2 porciones, una de ellas fue procesada inmediatamente, para elaborar los diferentes extractos con planta fresca, y la otra porción se sometió a un proceso de secado con calor solar por varios días, para elaborar posteriormente los extractos con planta seca. Se repitieron las colectas en diferentes meses y años.

#### ELABORACION DE EXTRACTOS

De cada una de las especies de Artemisia se elaboraron tres diferentes tipos de extractos, con cloroformo, etanol y agua, como disolventes, en el caso de la planta seca de A. ludoviciana en lugar de cloroformo se utilizó diclorometano. Para cada especie se hicieron tres extractos de planta fresca y tres de planta seca, siendo referidos como extractos clorofórmicos (en un solo caso extracto diclorometánico), etanólicos y acuosos. En todos los casos las plantas (fresca o seca) fueron fragmentadas en pequeñas porciones incluyendo tallos, hojas y flores, pero no raíces.

#### **EXTRACTO ETANOLICO**

Los fragmentos de la planta fresca o seca se colocaron en un matraz, y se les agregó alcohol etílico al 96% en una proporción de 4ml/g de planta. El matraz se envolvió en papel aluminio, y se dejó a temperatura ambiente por 48h.<sup>58</sup> Pasado el tiempo de extracción, el solvente conteniendo el extracto se pasó por papel filtro y los fragmentos de la planta fueron descartados. Posteriormente el solvente se eliminó con rotavapor durante 48h. El residuo fue pesado, envasado en recipiente color ámbar y envuelto en papel aluminio y refrigerado hasta el momento de su uso.

#### **EXTRACTO ACUOSO**

Los fragmentos de la planta seca o fresca se colocaron en un recipiente, y se les agregó agua destilada en una proporción de 10ml/g de planta. El recipiente fue envuelto en papel aluminio, dejándose por 48h a temperatura ambiente. El extracto se pasó por papel filtro y los fragmentos de la planta se eliminaron. Las sustancias extraídas con el agua se recuperaron por liofilización durante 72h. El extracto en polvo, adherido a las paredes del matraz, se colectó por raspado con una espátula. El polvo obtenido fue pesado, envasado en frasco ambar y envuelto en papel aluminio y mantenido en refrigeración hasta su uso.

#### **EXTRACTO CLOROFORMICO**

Los fragmentos de la planta seca o fresca se colocaron en un recipiente el cual fue cubierto con papel aluminio, se agregó

cloroformo en una proporción de 10ml/g de planta. Y se dejó a temperatura ambiente por 48h. El extracto se filtró y los fragmentos de la planta se eliminaron. El cloroformo se eliminó con rotavapor durante 24h. El residuo se pesó, y se le agregó aceto nitrilo en una proporción de 15ml/g de residuo para separar las ceras, esta mezcla se filtró con papel filtro eliminando la porción no soluble en el aceto nitrilo. El filtrado se colocó en un rotavapor durante 3h aproximadamente para eliminar el aceto nitrilo. Para estar totalmente seguros de la eliminación de este solvente, se colocó el residuo en una campana con extracción al vacío durante 3 días.

#### EXTRACTO DICLOROMETANICO

Utilizando el método de aislamiento que Klayman y col.<sup>58</sup> emplearon para aislar artemisinina de *A. annua* colectada en Virginia EEUU se efectuó la extracción diclorometánica de *A. ludoviciana* sp mexicana planta seca para tratar de obtener la artemisinina en este extracto. La extracción se efectuó de la siguiente manera: a 10kg de la planta se le agregó hexano en una proporción 1:10 durante 10 días con el fin de desengrasar la planta, el hexano se eliminó, el residuo fue tratado con cloruro de metilo en una proporción 1:10 por una semana, el extracto diclorometánico resultante se concentró en un rotavapor. Al residuo se le agregó aceto nitrilo en una proporción de 1:3 para eliminar residuos de grasa, obteniéndose 234g de extracto de los cuales, una porción de 10g de este extracto fue pesada y envasada en frasco

ámbar, cubierto con papel aluminio y refrigerado para las pruebas biológicas.

#### CROMATOGRAFIA

Con el extracto diclorometánico se efectuó cromatografía en columna y en capa fina: a 100g del extracto se le efectuó cromatografía en columna con sílica gel para la separación de sus componentes, se obtuvieron 14 sustancias. Este estudio fitoquímico se efectuó en el Instituto de Química de la UNAM. De estas 14 sustancias a 7 se les efectuaron pruebas biológicas *in vitro* con cepas de *P. falciparum* en la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres. Las sustancias analizadas fueron las siguientes: 3a-hidroxi-reynosina, ludovicina A, santamarina, armefolina, estafiatina, crisartemina B y arglanina.<sup>75</sup>

Los extractos diclorometánico, etanólico y acuoso de la planta seca de *A. ludoviciana* y los extractos clorofórmicos y etanólico planta seca de *Artemisia klotzchiana* fueron sometidos a cromatografía en capa fina utilizando como muestras de referencia a artemisinina y dehidroartemisinina las cuales fueron donadas por el Dr. David Warhurts del Departamento de Farmacología de la Escuela de Medicina Tropical de Londres. Las placas que se utilizaron fueron cromatofólios de 5X10 cm con espesor de capa de 0.02mm de sílica gel 60 GF254, utilizando diferentes sistemas de elusión (H:AE 8:2, corrida 3 veces; H 10, corrida 3 veces; H:AE 7:3, corrida 3 veces) y como agente revelador sulfato sérico amoniacoal.<sup>76</sup>

#### PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para efectuar las pruebas biológicas se requirió de vehículos solubilizantes que permitieran preparar soluciones a distintas concentraciones, para tal efecto se buscó el vehículo que mejor solubilizara cada extracto. Se ensayaron ocho diferentes soluciones: soluciones hidroalcohólicas al 1% y al 2%, aceite de maíz, aceite de maíz al 1% en alcohol de 96°, Tween 80 al 2% y al 5%, aceite de maíz al 5% en Tween 80 y solución salina isotónica. La prueba se hizo colocando 1mg del extracto a ensayar, en cada uno de los ocho tubos de ensaye. Se le agregó a cada tubo 0.1ml del vehículo a probar, se agitó con una espátula hasta conseguir una mezcla homogénea, y se observó el grado de solubilización alcanzado. Cuando ésta no fue satisfactoria se agregó otro volumen de 0.1ml del vehículo, pudiendo aumentar la cantidad hasta 1ml como volumen máximo. Se seleccionó como vehículo a la solución que solubilizó el extracto adecuadamente con el menor volumen.

#### PRUEBAS DE TOXICIDAD

En todos los ensayos se utilizaron ratones de la cepa CDI, entre 25-30 g de peso.

#### DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA MORTAL

Esta prueba se realizó en el laboratorio con el objetivo específico de determinar la dosis de referencia a usarse como la dosis máxima en la prueba de Dosis Letal 50 (DL50) de cada extracto.



En todos y para cada uno de los extractos se escogieron en forma arbitraria cinco dosis diferentes calculadas por kg de peso. Cada dosis del extracto ensayado se solubilizó en el vehículo previamente seleccionado para dicho extracto, usando un volumen equivalente a la centésima parte del peso del ratón inoculado. Cada dosis del extracto ensayado se aplicó por duplicado en ratones por vía intraperitoneal (IP). Para valorar cual era la dosis mínima mortal, se tomó en cuenta la muerte del 100% de los ratones. Se consideró como dosis mínima mortal, la dosis mas baja que fue capaz de matar al 100% de los ratones inoculados, dentro de la siguiente hora de observación.

#### DETERMINACION DE DOSIS LETAL 50 (DL50)

Para esta prueba se utilizaron 6 lotes de 10 ratones cada uno, (un lote testigo y 5 lotes problema).

Cada lote problema recibió una dosis diferente del extracto a probar por vía IP y al grupo testigo únicamente se le aplicó el vehículo. La selección del vehículo se realizó de acuerdo al criterio ya establecido, y el volumen que se aplicó a cada ratón correspondió a la centésima parte de su peso.

Las cinco dosis utilizadas se calcularon de la siguiente manera: la dosis máxima fue aquella que se obtuvo como dosis mínima mortal y la dosis mínima se seleccionó en forma arbitraria. De estos valores se obtuvo logaritmo base 10; el logaritmo de la dosis mínima se le restó al logaritmo de la dosis máxima y la diferencia obtenida fue dividida entre 4; el resultado obtenido se convierte

en un factor que permite calcular todas las dosis a partir de la primera como sigue: para la segunda dosis, el valor del factor se resta al logaritmo de la dosis máxima o primera dosis, para la tercera dosis el valor del factor se resta al logaritmo de la segunda dosis y así sucesivamente hasta obtener los logaritmos de las diferentes dosis a utilizar. Posteriormente a estos valores se les calculó antilogaritmo y los resultados obtenidos se consideraron como las dosis a ensayar.

Se realizó el ensayo y se determinó el porcentaje de ratones muertos en cada grupo, y con base en los datos obtenidos, se calculó la DL50 del extracto de acuerdo con el método de Litchfield y Wilcoxon.<sup>77</sup> Estos datos también fueron utilizados para calcular la DL10.

#### ENSAYO BIOLOGICO

El modelo experimental estuvo conformado por ratones CDI de 25-30 g y la cepa de Plasmodium berghei yoeli (Pby), obtenida de la Escuela de Medicina Tropical de Londrés por cortesía del profesor P.C.C. Garnham y el Dr. Davison y mantenida en pases sucesivos ratón-ratón.

#### PREPARACION DEL INOCULO DE PARASITOS

Se infectaron cinco ratones con Pby; al tercer día postinfección se les cuantificó en un frotis de sangre la parasitemia en porciento, seleccionando al ratón que presentó entre un 25 y 30% de eritrocitos parasitados. Al ratón seleccionado se le

cuantificó el número de eritrocitos por milímetro cúbico, de la siguiente manera: se le tomó sangre de la cola con una pipeta de Thoma hasta la marca 0.5 y se le agregó un diluyente hasta la marca 101 (dilución 1:200), de esta dilución se colocaron algunas gotas en la cámara de Neubauer y se procedió al conteo de eritrocitos de acuerdo al método descrito por Lynch.<sup>78</sup> Conociendo el porcentaje de eritrocitos infectados y el número de eritrocitos por milímetro cúbico, se estimó la cantidad aproximada de eritrocitos infectados por milímetro cúbico. La preparación de los inóculos se calculó con el volumen de sangre necesario para el experimento en turno; se tomó la sangre de la cola del ratón, en el volumen calculado, con una micropipeta volumétrica, cuya punta se introdujo previamente en una solución de citrato de sodio al 3% para evitar su coagulación. La muestra obtenida se agregó a un vehículo, el cual se preparó con suero fetal bovino al 10% y glucosa al 0.2% en solución salina isotónica. El inóculo fue administrado inmediatamente después de su preparación, y durante el tiempo que duró esta aplicación el recipiente con el inóculo se colocó en baño frío.

#### **PRUEBA PROFILACTICA**

Se formaron seis lotes de 10 ratones cada uno, cinco lotes problema y un lote testigo.

Se calcularon cinco dosis para cada uno de los extractos, la DL10 se consideró como la dosis máxima para este propóístico y la dosis mínima fue determinada arbitrariamente. El resto de las dosis fueron calculadas con el mismo procedimiento utilizado en la prueba

de la DL50. Cada una de las cinco dosis se aplicó a un lote problema y el lote testigo únicamente recibió el vehículo. En todos los casos el inóculo de parásitos se aplicó tanto a ratones de lotes problema, como a testigos, por vía I.V. a razón de 25000 eritrocitos parasitados diluidos en 0.2ml de vehículo por ratón. De cada uno de los extractos, la dosis correspondiente se administró cuatro veces por vía I.P. a intervalos de 24h a los ratones problema, iniciando la primera aplicación a las 4h de haber inoculado el parásito. Los ratones testigo recibieron vehículo por la misma vía, en el mismo volumen y a los mismos intervalos de tiempo. Al 5o. día se les tomó frotis sanguíneo a todos los ratones, se calculó el porcentaje de parasitemia individual, el rango, la media de parasitemia y su desviación estandar, también se calculó la mediana por grupo. En base a las medias de parasitemia se calculó el porcentaje de efectividad de cada una de las dosis de cada extracto.

El % de efectividad se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efectividad} = \frac{\text{Media de parasitemia Grupo testigo} - \text{Media de parasitemia Grupo tratado}}{\text{media de parasitemia Gpo. testigo}} \times 100$$

A cada uno de los extractos se le calculó gráficamente la Dosis Efectiva 50 (DE50). En el eje de las "y" se colocó el porcentaje de efectividad de cada una de las dosis convertido a Probits (conversión de porcentajes en unidades de probabilidad), y

en el eje de las "X" se colocaron los valores de las dosis en logaritmos base 10. Se debe de entender a la DE50 como la dosis necesaria de un fármaco, para provocar un efecto farmacológico determinado en el 50 % de los individuos de una población.

También se calculó el Margen de Seguridad 50 (MS50), que depende de la relación que existe entre la dosis que produce un efecto indeseable como es la DL50 y la dosis que produce un efecto deseable como es la DE50. En general un fármaco puede considerarse seguro si su margen de seguridad tiene un valor de 10 ó mayor. No obstante, en muchas circunstancias se utilizan fármacos con un margen de seguridad menor de 3 siempre y cuando se utilice con cuidado.<sup>79</sup>

#### ENSAYOS in vitro

De los extractos diclorometánico planta seca y etanólico planta seca de A. ludoviciana ssp. mexicana, se efectuaron pruebas in vitro con cultivos de P. falciparum por la Dra. Dorothy H. Bray de la Escuela de Medicina Tropical e Higiene de Londres.

## RESULTADOS

### A. ludoviciana

#### a. EXTRACTO ETANOLICO, PLANTA FRESCA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 7.8g de extracto por 100g de planta procesada, de color verde oscuro, consistencia pastosa y olor a hierba fresca (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. El mejor solubilizante para este extracto resultó ser el Tween 80 al 5%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: etanol al 1% y al 2% en agua, aceite de maíz al 1% en etanol al 96%, Tween 80 al 2% y aceite de maíz al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante: el aceite de maíz y la solución salina (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 5000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 2698 mg/kg (1755-4148). La DL10 fue de 1897 mg/kg (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El lote testigo presentó una media de parasitemia del  $11.3\% \pm 9.7$ . De los lotes problema, el que recibió 1800 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.26\% \pm 0.19$  y una efectividad del 97.7%. El lote que recibió 1554 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.30\% \pm 0.14$  y una efectividad del 97.3%. El lote que recibió 1341 mg/kg

del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.32\% \pm 0.24$  y una efectividad del 97.1%. El lote que recibió 1158 mg/kg, presentó una media de parasitemia del  $0.5\% \pm 0.5$  y una efectividad del 95.9%. Y el lote que recibió 1000 mg/kg, del extracto, presentó una media de  $1.4\% \pm 1.3$  y una efectividad del 87.6% (Cuadro 7, Gráfica 1A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 371 mg/kg (Cuadro 16, Gráfica 1B).

El MS50 de este extracto fue de 7.2 (Cuadro 16), el promedio de sobrevida del grupo testigo fue de 12 días, mientras que la sobrevida para cada una de las dosis, de la mayor a la menor fue de: 17.8 días, 18.8 días, 16.4 días, 14.9 días y 14 días (Cuadro 7).

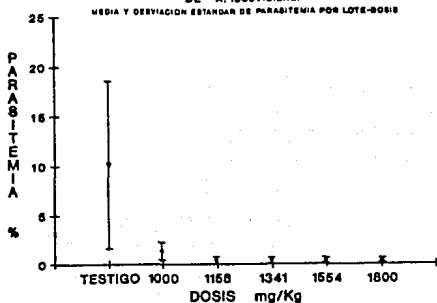
#### CUADRO 7

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana* EXTRACTO ETANOLICO PLANTA FRESCA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

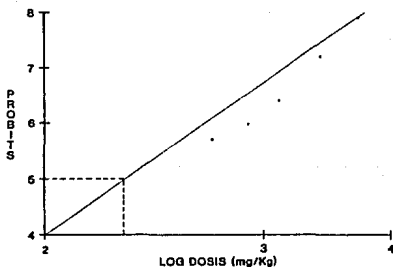
EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA			SOBREVIDA	
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	% de Efectividad	Promedio por grupo en días
Testigo	1.5-31.8	11.3±9.7	9.0	0.0	12.0
1800	0.04-0.59	0.26±0.19	0.18	97.7	17.8
1554	0.16-0.61	0.27±0.14	0.26	97.3	18.8
1341	0.06-0.72	0.32±0.24	0.28	97.1	16.4
1158	0.09-1.76	0.5±0.5	0.26	95.0	14.9
1000	0.2-2.5	1.4±1.3	1.1	87.6	14.0

DE = DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Graf.1A PRUEBA PROFILACTICA. EXT.ETANOLICO PLANTA FRESCA  
DE *A. ludoviciana*.



Graf.1B RELACION DOSIS-EFECTO EXT.ETANOLICO PLANTA FRESCA  
DE *A. ludoviciana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.



## b. EXTRACTO ETANOLICO, PLANTA SECA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 1.6g de extracto por 100g de planta procesada, de color verde oscuro, consistencia pastosa, olor a hierba fresca (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. Soluble en Tween 80 al 5%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: Tween 80 al 2% y aceite de maíz al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante: el etanol al 1% y 2% en agua, aceite de maíz, aceite de maíz al 1% en etanol al 96% y solución salina isotónica (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 3000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron 839 mg/kg (675-1043). La DL10 de 466.5 mg/kg (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El lote testigo presentó una media de parasitemia del  $2.6\% \pm 3$ . De los lotes problema, el que recibió 450 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.003\% \pm 0.003$ , con una efectividad del 99.8%. El lote que recibió 259 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.034\% \pm 0.10$ , con una efectividad del 98.6%. El lote que recibió 149 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.226\% \pm 0.44$ , con una efectividad del 92.3%. El lote que recibió 86 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.43\% \pm 0.71$ , con una efectividad del 83.4%. Y el lote que recibió 50 mg/kg del

extracto, presentó una media de parasitemia del  $0.62\% \pm 0.86$ , con una efectividad del  $76.9\%$  (Cuadro 8, Gráfica 2A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de  $29.2 \text{ mg/kg}$  (Gráfica 2B).

El MS50 de este extracto fue de  $38.7$  (Cuadro 16). El promedio de sobrevivencia para los ratones testigo fue de  $15.7$  días, mientras que la sobrevivencia para cada una de las dosis de la mayor a la menor fue de  $11.0$  días,  $19.2$  días,  $14.0$  días,  $17.9$  días y  $20$  días. En los lotes de los ratones que recibieron el extracto, algunos no presentaron parasitemia: el lote que recibió  $400 \text{ mg/kg}$  nueve ratones no presentaron parasitemia, el que recibió  $250 \text{ mg/kg}$  cinco ratones no presentaron parasitemia, el que recibió  $149 \text{ mg/kg}$  seis ratones no presentaron parasitemia, el lote que recibió  $86 \text{ mg/kg}$  dos ratones no presentaron parasitemia y el lote que recibió  $50 \text{ mg/kg}$  seis ratones no presentaron parasitemia (Cuadro 8).

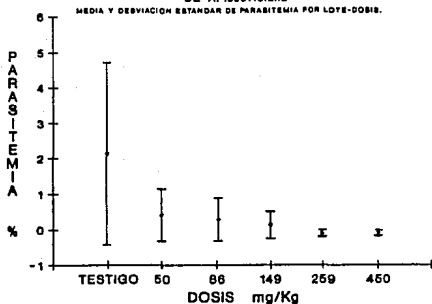
CUADRO 8

RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana*  
EXTRACTO ETANOLICO PLANTA SECA EN RATONES  
INFECTADOS CON *E. berghei yoelii*

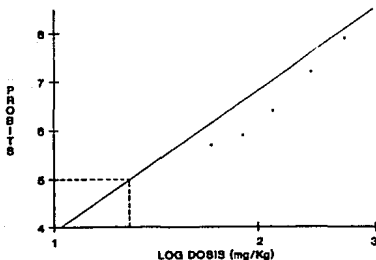
EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITERIA				SOBREVIDA Promedio por grupo en días
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	% de Efectividad	
Testigo	0.09-8.1	2.6±3	1.4	0.0	15.7
450	0.0-0.05	0.003±0.009	0.0	99.8	11.0
259	0.0-0.34	0.054±0.10	0.0	98.6	19.2
149	0.0-1.1	0.226±0.44	0.0	92.3	14.0
86	0.0-1.0	0.43±0.71	0.03	83.4	17.9
50	0.0-1.8	0.62±0.86	0.32	76.9	20.0

DE = DESVIACION ESTANDARD

**Graf.2A PRUEBA PROFILACTICA. EXTRACTO ETANOLICO PLANTA SECA DE *A. ludoviciana***



**Graf.2B RELACION DOSIS-EFECTO EXT. ETANOLICO PLANTA SECA DE *A. ludoviciana***



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

**c. EXTRACTO ACUOSO, PLANTA FRESCA**

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvo 21.8 g de extracto por 100g de planta procesada, de color café oscuro, consistencia granular, sin olor característico (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. Soluble en agua. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: soluciones hidroalcohólicas al 1 y 2%. No mostraron acción solubilizante: aceite de maíz, aceite de maíz al 1% en etanol al 96%, Tween 80 al 2 y al 5% y aceite de maíz al 5% en Tween 80 (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 2000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 390 mg/kg (263-578) (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del  $3.7\% \pm 2.9$ . De los lotes problema, el que recibió 63 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $2.02\% \pm 1.09$  y una efectividad del 45.9%. El lote que recibió 39.7 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $2.27\% \pm 1.5$  y una efectividad del 40.6%. El lote que recibió 25mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $3.0\% \pm 2.7$ , y una efectividad del 19%. El lote que recibió 15 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $3.2\% \pm 2.4$  y una efectividad del 13.6 %. Y el lote que recibió 10 mg/kg del extracto, presentó

una media de parasitemia del  $3.5\% \pm 2.9$  y una efectividad del  $5.5\%$  (Cuadro 9, Gráfica 3A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 63.9 mg/kg (Cuadro 16, Gráfica 3B).

El MS50 para este extracto fue de 6.1. El promedio de sobrevivida para los ratones testigo fue de 9.7 días, mientras que la sobrevivida para cada una de las dosis, de la mayor a la menor fue de: 11.9 días, 12.3 días, 11.2 días, 12.5 días y 10.9 días (Cuadro 9).

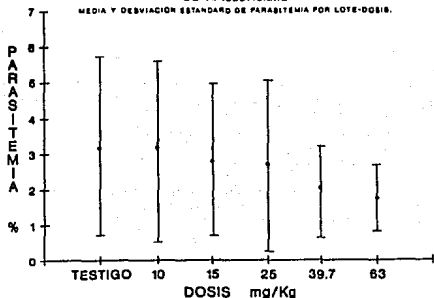
#### CUADRO 9

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana* EXTRACTO ACUOSO PLANTA FRESCA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

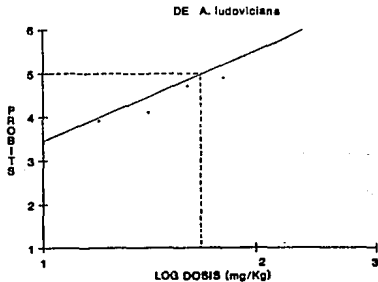
EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA				SOBREVIDA
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	X de Efectividad	Promedio por grupo en días
Testigo	1.7-5.7	3.7±2.9	2.65	0.0	9.7
63.0	0.53-3.4	2.0±1.09	1.90	45.9	11.9
39.7	0.28-4.8	2.2±1.5	2.10	40.6	12.3
25.0	0.8-9.2	3.0±2.7	2.05	19.0	11.2
15.0	0.9-8.2	3.2±2.4	5.30	13.6	12.5
10.0	1.9-11.2	3.5±2.9	2.45	5.5	10.9

DE = DESVIACION ESTANDARD

Graf.3A PRUEBA PROFILACTICA. EXTRACTO ACUOSO PLANTA FRESCA  
DE *A. ludoviciana*



Graf.3B RELACION DOSIS-EFECTO EXT. ACUOSO PLANTA FRESCA



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

#### d. EXTRACTO ACUOSO, PLANTA SECA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 2.6g del extracto, por 100g de planta procesada de color café oscuro, de consistencia granular sin olor característico (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. Soluble en agua. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: soluciones hidroalcohólicas al 1 y 2%. No mostraron acción solubilizante: aceite de maíz solo y al 1% en etanol al 96% y al 5% en Tween 80 y en Tween 80 al 2 y al 5% (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 2000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 697 mg/kg (563-863). La DL10 de 331 mg/kg (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El lote testigo presentó una media de parasitemia del 16.4%  $\pm$  8.5. El lote que recibió 300 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 5.0%  $\pm$  3.2 y una efectividad del 69.5%. El lote que recibió 191 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 5.8%  $\pm$  2.5, con una efectividad del 64.6%. El lote que recibió 122 mg/kg del extracto presentó una media de parasitemia del 6.0%  $\pm$  1.8, con una efectividad del 63.4%. El lote que recibió 78 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 7.7%  $\pm$  3.7, con una efectividad del 53.0%. Y el lote que recibió 50 mg/kg del extracto



presentó una media de parasitemia del  $8.0\% \pm 3.8$ , con una efectividad del  $51.3\%$  (Cuadro 10, Gráfica 4A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 47 mg/kg (Cuadro 16, Gráfica 4B).

El MS50 para este extracto fue de 14.8. El promedio de sobrevivida para los ratones testigo fue de 9.8 días y mientras que la sobre vida para cada una de las dosis de la mayor a la menor fue de 13.2 días, 13.0 días, 14.0 días, 12.7 días y 13.8 días (Cuadro 10).

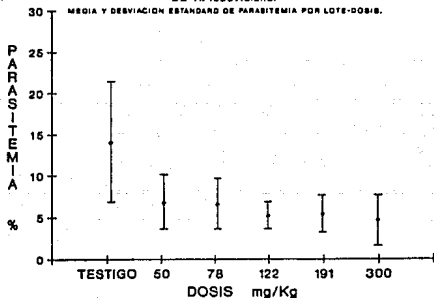
#### CUADRO 10

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana* EXTRACTO ACUOSO PLANTA SECA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

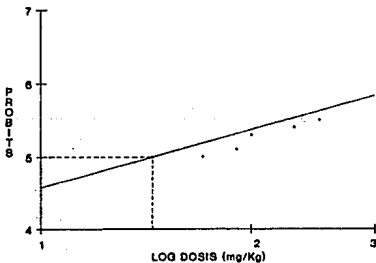
EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA				SOBREVIDA
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	% de Efectividad	Promedio por grupo en días
Testigo	5.8-27.5	16.4±8.5	17.5	0.0	9.8
300	2.5-13.3	5.0±3.2	4.3	69.5	13.2
191	1.5-10.4	5.8±2.5	5.3	64.6	13.0
122	3.5-7.3	6.0±1.8	6.0	63.4	14.0
78	1.1-15.4	7.7±3.7	7.1	53.0	12.7
50	1.3-13.7	8±3.8	8.3	51.2	13.8

DE = DESVIACION ESTANDARO

Graf.4A PRUEBA PROFILACTICA. EXTRACTO ACUOSO PLANTA SECA  
DE *A. ludoviciana*.



Graf.4B RELACION DOSIS-EFECTO EXT. ACUOSO PLANTA SECA  
DE *A. ludoviciana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La absisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

**e. EXTRACTO DICLOROMETANICO, PLANTA SECA**

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 2.6g del extracto, por 100 de planta procesada, de color café oscuro, consistencia pastosa, con olor a menta (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. El extracto fue soluble en aceite de maíz con alcohol etílico al 1%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, en aceite de maíz solo y al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante: Tween 80 al 2% y solución salina (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 300 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 162 mg/kg (139-188). La DL10 de 72.44 mg/kg (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del  $37.9\% \pm 5.3$ . De los lotes problema el que recibió 74 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $27.4\% \pm 3.4$ , con una efectividad del 27.7%. El lote que recibió 59 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $28.0\% \pm 5.6$ , con una efectividad del 26.1%. El lote que recibió 47 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $28.9\% \pm 2.6$ , con una efectividad del 23.7%. El lote que recibió 37 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $30.5\% \pm 7.5$ , con una efectividad del 19.5%. Y el lote que recibió 30 mg/kg del

extracto, presentó una media de parasitemia del  $34.8\% \pm 10.7$ , con una efectividad del  $8.1\%$  (Cuadro 11, Gráfica 5A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 131 mg/kg (Cuadro 16, Gráfica 5B).

El MS50 para este extracto fue de 1.2. El promedio de sobrevida de los ratones testigo fue de 7.8 días, mientras que la sobrevida para cada una de las dosis, de la mayor a menor fue de: 8.7 días, 8.2 días, 8.4 días, 8.3 días y 8.7 días (Cuadro 11).

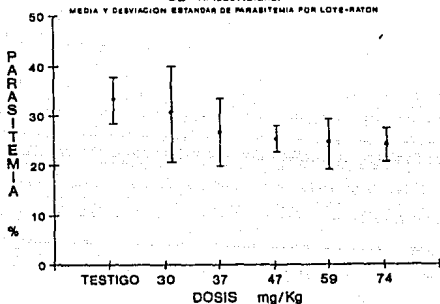
CUADRO 11

RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana*  
EXTRACTO DICLOROMETANICO PLANTA SECA EN RATONES  
INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

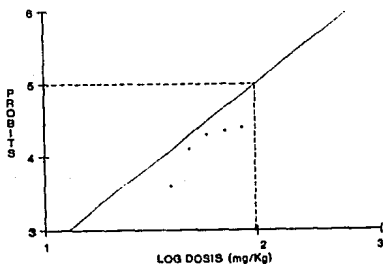
EXTRACTO	PARASITEMIA				SOBREVIDA
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	X de Efectividad	
Testigo	32.6-51.2	37.9±5.3	37.3	0.0	7.8
74	18.5-30.6	27.4±3.4	28.4	27.7	8.7
59	19.1-36.9	28.0±5.6	27.5	26.1	8.2
47	26.3-35.1	28.9±2.6	28.5	23.7	8.4
37	12.2-38.8	30.5±7.5	32.2	19.5	8.3
30	8.3-41.6	34.8±10.7	36.7	8.1	8.7

DE = DESVIACION ESTANDARD

Graf.5A PRUEBA PROFILACTICA. EXT.DICLOROMETANICO PLANTA SECA  
DE *A. ludoviciana*.



Graf.5B RELACION DOSIS-EFECTO EXT.DICLOROMETA. PLANTA SECA  
DE *A. ludoviciana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

## f. EXTRACTO CLOROFORMICO, PLANTA FRESCA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 2g del extracto, por 100g de planta procesada, de consistencia oleosa y olor a acetona (Cuadro 13).

2. Prueba de solubilidad. El extracto fue soluble en aceite de maíz con etanol al 1%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: aceite de maíz solo y al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, Tween 80 al 2 y 5% y solución salina (Cuadro 14).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 500mg/kg, la DL50 y sus límites de confianza fueron de 246 mg/kg (27.2-22.38). La DL10 de 75.8 mg/kg (Cuadro 15).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del  $28.6\% \pm 4.7$ . De los lotes problema el lote de ratones que recibió 75 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $7.9\% \pm 3.4$ , con una efectividad del 79.0%. El lote que recibió 53 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $11.4\% \pm 6.9$ , con una efectividad del 60.0%. El lote que recibió 38 mg/kg, presentó una media de parasitemia del  $13.0\% \pm 7.6$  con una efectividad del 54.5%. El lote que recibió 27 mg/kg del extracto, presentó una media de la parasitemia del  $14.0\% \pm 9.1$ , con una efectividad del 51.0%. Y el lote que recibió 20 mg/kg del

extracto, presentó una media de parasitemia del  $18.3\% \pm 7.6$ , con una efectividad del  $36.0\%$  (Cuadro 12, Gráfica 6A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 31 mg/kg (Cuadro 16, Gráfica 6B).

El MS50 para este extracto fue de 7.9. El promedio de sobrevivida de los ratones testigo fue de 8.5 días, mientras que la sobrevivida para cada una de las dosis, de la mayor a la menor fue de: 18.3 días, 15.3 días, 14.9 días, 12.9 días y 11.9 días (Cuadro 12).

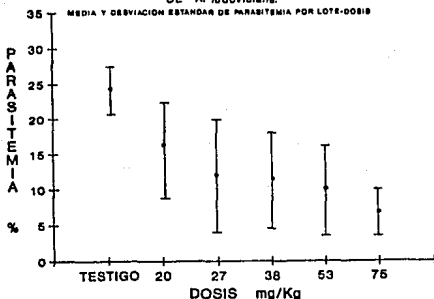
CUADRO No 12

RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. ludoviciana*  
EXTRACTO CLOROFORMICO PLANTA FRESCA EN RATONES  
INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

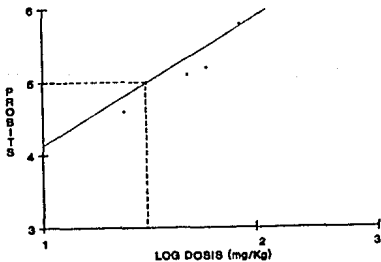
EXTRACTO	PARASITEMIA				SOBREVIDA
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	X de Efectividad	
Testigo	19.3-37.8	28.6±4.7	28.5	0.0	8.5
75	3.5-15.7	7.9±3.4	7.8	79.0	18.3
53	1.4-20.7	11.4±6.9	13.5	60.0	15.3
38	3.8-27.7	13.0±7.6	13.1	54.5	14.9
27	1.6-28.5	14.0±9.1	12.7	51.0	12.9
20	7.6-35.7	18.3±7.6	17.2	36.0	11.9

DE = DESVIACION ESTANDARD

Gráf.6A PRUEBA PROFILACTICA. EXT.CLOROFORMICO PLANTA FRESCA  
DE *A. ludoviciana*.



Gráf.6B RELACION DOSIS-EFECTO EXT.CLOROFORMICO PLANTA FRESCA  
DE *A. ludoviciana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.



Para valorar la significancia de los resultados obtenidos en cada uno de los extractos se efectuó un análisis de varianza, encontrándose que el extracto etanólico planta seca de A. ludoviciana presentó significancia estadística de  $P < 0.003$ .

CUADRO 13

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *A. ludoviciana*  
CON DISTINTOS DISOLVENTES EN g DE EXTRACTO  
OBTENIDO POR 100g DE PLANTA EXTRACTADA

Disolvente	Planta fresca	Planta seca
Alcohol etílico al 96%	7.8	1.6
Agua	21.8	2.6
Cloroformo	2.0	no se empleó
Diclorometano	no se empleó	2.0

CUADRO 14

RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DE LOS  
EXTRACTOS DE *A. ludoviciana* ssp. mexicana

Disolvente	Etanólico		Acuoso		Diclorometánico	Clorofórmico
	PS	PF	PS	PF	PS	PF
Alcohol etílico al 1% en agua	-	+	+	+	+	-
Alcohol etílico al 2% en agua	-	+	+	+	+	-
Aceite de maíz	-	-	-	-	+	+
Aceite de maíz al 1% en etanol al 96%	-	+	-	-	++	++
Tween 80 al 2%	+	+	-	-	-	-
Tween 80 al 5%	++	++	-	-	+	-
Aceite de maíz al 5% en Tween 80	+	+	-	-	+	+
Solución salina	-	-	++	++	-	-

(-) = No disolvió  
(+) = Disolvió poco  
(++) = Disolvió adecuadamente  
PF = Planta fresca  
PS = Planta seca

CUADRO 15

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD DE  
Artemisia ludoviciana ssp. mexicana EN  
 RATONES MACHOS CDI

TIPO DE EXTRACTO	DL 50 (mg/kg)	DL 10 (mg/kg)
Diclorometánico planta seca	162.3	72.4
Clorofórmico planta fresca	246.0	75.8
Etanólico planta seca	839.0	466.0
Etanólico planta fresca	2698.0	1897.0
Acuoso planta seca	697.0	331.0
Acuoso planta fresca	390.0	61.0

DL10 = Dosis letal 10

DL50 = Dosis letal 50

CUADRO 16

ACTIVIDAD DE DIVERSOS EXTRACTOS DE  
A. ludoviciana ssp. mexicana CONTRA  
P. berghei yoelii IN VIVO

TIPO DE EXTRACTO	DE 50 (mg/kg)	MS 50
Diclorometánico planta seca	131.0	1.2
Clorofórmico planta fresca	31.0	7.9
Etanólico planta seca	29.2	28.70
Etanólico planta fresca	371.0	7.2
Acuoso planta seca	47.0	14.8
Acuoso planta fresca	63.9	6.1

DE 50 = Dosis efectiva 50

MS = Margen de seguridad 50

## **A. klotzchiana**

### **a. EXTRACTO CLOROFORMICO, PLANTA FRESCA**

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 16.5g del extracto, por 100g de planta procesada, de color café, olor a menta y consistencia granular (Cuadro 21).

2. Prueba de solubilidad. El extracto fue soluble en mezcla de aceite de maíz al 5% en Tween 80. Los solubilizantes de acción intermedia, no hubo ninguno. No mostraron acción solubilizante: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, aceite de maíz solo y al 1% en etanol al 96%, en Tween 80 al 2 y al 5% y en solución salina (Cuadro 22).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 500 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 57.7 mg/kg (27-122). La DL10 de 16.62 mg/kg (Cuadro 23).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del 35.8%  $\pm$  7.7. De los grupos problema, el que recibió 16 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 34.8%  $\pm$  10.7 y una efectividad del 2.7%. El lote que recibió 9.5 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 35.0%  $\pm$  4.4 y una efectividad del 2.2%. El lote que recibió 5.6 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 35.2%  $\pm$  4.6 y una

efectividad del 1.6%. El lote que recibió 3.3 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 35.8%  $\pm$  4.5 y una efectividad del 0%. Y el lote que recibió 2 mg/kg, presentó una media de parasitemia del 39.9%  $\pm$  8.6 y una efectividad del 0% (Cuadro 17, Gráfica 7A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 35 mg/kg (Cuadro 24, Gráfica 7B).

El MS50 para este extracto fue de 1.6. El promedio de sobrevivida de los ratones testigo fue de 11.8 días, mientras que la sobrevivida para cada una de las dosis, de la mayor a la menor fue de: 13.2 días, 10.4 días, 12.4 días, 10.9 días y 9.3 días.

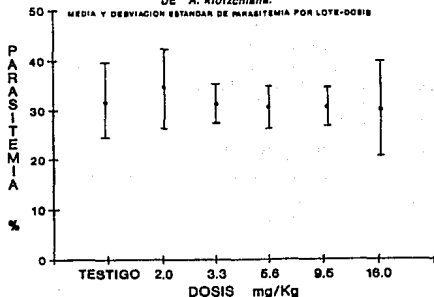
#### CUADRO 17

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. klotzschiana* EXTRACTO CLOROFORMICO PLANTA FRESCA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA				SOBREVIDA Promedio por grupo en días
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	X de Efectividad	
Testigo	21.5-42.8	35.8 $\pm$ 7.7	39.0	0.0	11.8
16.0	8.3-41.6	34.8 $\pm$ 10.7	36.7	2.7	13.2
9.5	24.6-40.8	35.0 $\pm$ 4.4	38.8	2.2	10.4
5.6	24.0-40.8	35.2 $\pm$ 4.6	35.7	1.6	12.4
3.3	24.3-40.8	35.8 $\pm$ 4.5	35.8	0.0	10.9
2.0	27.7-54.7	39.9 $\pm$ 8.6	39.8	0.0	9.3

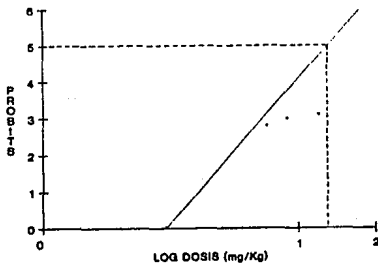
DE = DESVIACION ESTANDARD

Graf.7A PRUEBA PROFILACTICA. EXT.CLOROFORMICO PLANTA FRESCA  
DE *A. klotzchiana*.



Graf.7B RELACION DOSIS-EFECTO EXT.CLOROFORMICO PLANTA FRESCA

DE *A. klotzchiana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

## b. EXTRACTO CLOROFORMICO, PLANTA SECA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 4.6g del extracto, por 100g de planta procesada, de color café, consistencia granular y olor a menta (Cuadro 21).

2. Prueba de solubilidad. El extracto fue soluble en mezcla de aceite de maíz al 5% en Twenn 80. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: el aceite de maíz. No mostraron acción solubilizante: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, aceite de maíz al 1% en etanol al 96% y al 5% en Tween 80 y en Tween 80 al 2 y al 5% (Cuadro 22).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 300 mg/kg. La DL50 y límites de confianza fueron de 28.5 mg/kg (14-55). La DL10 de 15 mg/kg (Cuadro 23).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del 39.7%  $\pm$  11.3. De los lotes testigo el que recibió 15 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 24.7%  $\pm$  11.3, con una efectividad del 37.7%. El lote que recibió 11.3 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 34.5%  $\pm$  11, con una efectividad del 13.0%; el lote que recibió 8.6 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 35.5%  $\pm$  9.1, con una efectividad del 10.5%. El lote que recibió 6.5 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del 37.1%  $\pm$  10, con una

efectividad del 6.8%. El lote recibió 5 mg/kg del extracto, presentó una media de parasitemia del  $39\% \pm 10$ , con una efectividad del 1.7% (Cuadro 18, Gráfica 8A). Por extrapolación se determinó una DE de 20.5 mg/kg (Cuadro 24, Gráfica 8B).

El MS50 para este extracto fue de 1.4. El promedio de sobrevida para los ratones testigo fue de 8.5 días, mientras que la sobrevida para cada una de las dosis, de la mayor a la menor fue de: 13.5 días, 15.2 días, 14.7 días, 11.0 días y 12.2 días (Cuadro 18).

#### CUADRO 18

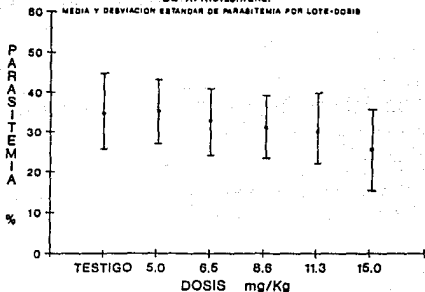
#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. klotzchiana* EXTRACTO CLOROFORMICO PLANTA SECA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA			SOBREVIDA	
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	X de Efectividad	Promedio por grupo en días
Testigo	17.7-55.0	39.7±11.3	40.75	0.0	13.0
15.0	17.2-46.7	24.7±11.3	22.5	37.7	13.5
11.3	15.0-52.8	34.5±11.5	31.4	13.0	15.2
8.6	19.9-50.9	35.5±9.10	35.2	10.5	14.7
6.5	13.7-45.5	37.1±10.0	41.9	6.8	11.0
5.0	13.8-44.5	39.0±10.0	44.7	1.7	12.2

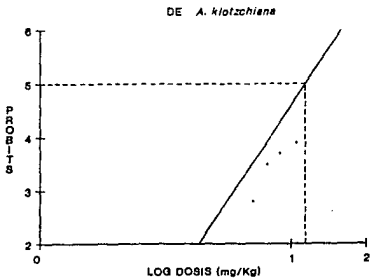
DE = DESVIACION ESTANDARO



Graf.8A PRUEBA PROFILACTICA. EXT.CLOROFORMICO PLANTA SECA  
DE *A. Klotzchiana*.



Graf.8B RELACION DOSIS-EFECTO EXT. CLOROFORMICO PLANTA SECA



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La absisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

### c. EXTRACTO ETANOLICO, PLANTA SECA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 2g de extracto, por 100g de planta procesada de color café oscuro, olor a menta y consistencia dura (Cuadro 21).

2. Prueba de solubilidad. El extracto fue soluble en Tween 80 al 5%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: Tween 80 al 2% y aceite de maíz al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante fueron: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, aceite de maíz solo y con etanol del 96% al 1% y solución salina (Cuadro 22).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 1000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 317 mg/kg (92-1093) (Cuadro 23).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia de  $23.5\% \pm 5.7$ . De los grupos problema, el lote de ratones que recibió 100 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $16.3\% \pm 10$  y una efectividad del 30.6%. El lote que recibió 56.2 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $22.6\% \pm 3.8$  y una efectividad del 3.8%. El lote que recibió 31.6 mg/kg presentó una media de parasitemia del  $23.6\% \pm 5.2$  con una efectividad del 2.1%. El lote que recibió 17.7 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $34.6\% \pm 8$  y una efectividad del 0%. Y el lote que recibió 10 mg/kg

presentó una media de parasitemia de  $35\% \pm 4.4$ , con una efectividad del 0% (Cuadro 19, Gráfica 9A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 120 mg/kg (Cuadro 24, Gráfica 9B).

El MS para este extracto fue de 2.6. El promedio de sobrevivida de los ratones testigo fue de 8.5 días, mientras que la sobrevivida para cada una de las dosis, de la mayor a menor fue de: 9.8 días, 9.2 días, 7.3 días, 9.8 días y 7.0 días (Cuadro 19).

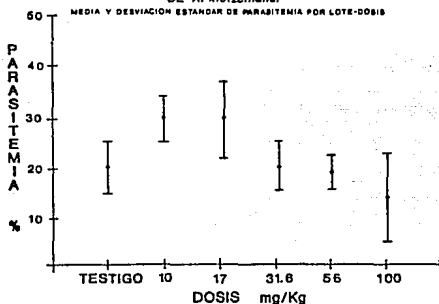
#### CUADRO 19

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. klotzchiana* EXTRACTO ETANOLICO PLANTA SECA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

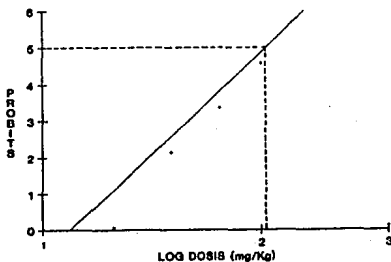
EXTRACTO	PARASITEMIA				SOBREVIDA
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	% de Efectividad	Promedio por grupo en días
Testigo	13.2-34.0	23.5±5.7	22.5	0.0	8.5
100.0	0.6-34.3	16.3±10.0	16.9	30.6	9.8
56.2	17.0-28.2	22.6±3.80	13.3	3.8	9.2
31.6	11.4-29.9	23.6±5.20	26.7	2.1	7.3
17.7	22.6-45.7	34.6±8.0	16.8	0.0	9.8
10.0	34.6-40.8	35.0±4.40	38.8	0.0	7.0

DE = DESVIACION ESTANDARD

Graf.9A PRUEBA PROFILACTICA, EXT. ETANOLICO PLANTA FRESCA  
DE *A. klotzchiana*.



Graf.9B RELACION DOSIS-EFECTO EXT.ETANOLICO PLANTA SECA  
DE *A. klotzchiana*.



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La abscisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

#### d. EXTRACTO ETANOLICO, PLANTA FRESCA

1. Rendimiento de la extracción. Se obtuvieron 4.8g de extracto, por 100g de planta procesada, de color verde oscuro consistencia pastosa y olor menta (Cuadro 21).

2. Prueba de solubilidad. Fue soluble en Tween 80 al 5%. Los solubilizantes de acción intermedia fueron: Tween 80 al 2% y aceite de maíz al 5% en Tween 80. No mostraron acción solubilizante: soluciones hidroalcohólicas al 1 y al 2%, aceite de maíz solo y al 1% en etanol del 96% y solución salina isotónica (Cuadro 22).

3. Prueba de toxicidad. La dosis mínima mortal fue de 2000 mg/kg. La DL50 y sus límites de confianza fueron de 1569 mg/kg (563-4375). La DL10 de 782 mg/kg (Cuadro 23).

4. Prueba biológica. El grupo testigo presentó una media de parasitemia del  $17.7\% \pm 8.6$ . De los grupo problema, el que recibió 600 mg/kg presentó una media de parasitemia  $16.1\% \pm 4.2$  y una efectividad del 9.5%. El lote que recibió 322 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $17.1\% \pm 6.7$  y una efectividad de 3.9%. El lote que recibió 173 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $18.8\% \pm 17.8$  y una efectividad del 0%. El lote que recibió 93 mg/kg presentó una media de parasitemia del 20.2% y una efectividad del 0%. Y el lote que recibió 50 mg/kg presentó una media de parasitemia de  $26.8\% \pm 5.9$  y una efectividad del 0% (Cuadro 20,

Gráfica 10A). Gráficamente por extrapolación se determinó una DE50 de 143 mg/kg (Cuadro 24, Gráfica 10B).

El MS50 para este extracto fue de 1.09. El promedio de sobrevivida de los ratones testigo fue 14.3 días, mientras que la sobrevivida para cada una de las dosis de la mayor a menor fue de: 17.0 días, 18.4 días, 18.0 días, 15.9 días y 14.2 días (Cuadro 20).

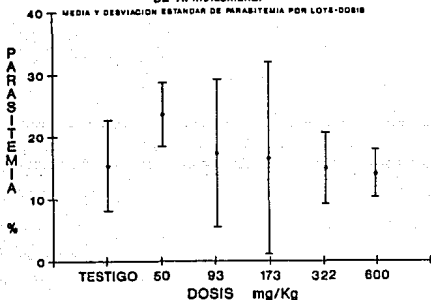
#### CUADRO 20

#### RESULTADOS DE LA PRUEBA PROFILACTICA DE *A. klotzchiana* EXTRACTO ETANOLICO PLANTA FRESCA EN RATONES INFECTADOS CON *P. berghei yoelii*

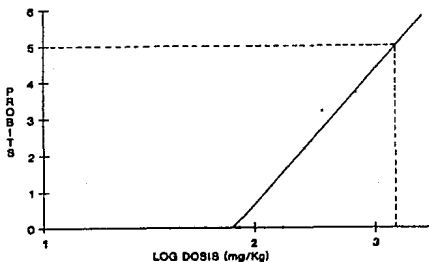
EXTRACTO Dosis (mg/kg)	PARASITEMIA				SOBREVIDA Promedio por grupo en días
	Rango	Media (X) y DE	Mediana	% de Efectividad	
Testigo	1.4-28.0	17.7±8.6	20.1	0.0	14.3
600	10.7-28.8	16.1±4.2	18.9	9.5	17.0
322	6.30-25.7	17.1±6.7	18.5	3.9	18.4
173	0.1-43.3	18.8±17.8	28.5	0.0	18.0
93	2.2-50.0	20.2±13.7	18.2	0.0	15.9
50	19.9-34.7	26.8±5.9	25.0	0.0	14.2

DE = DESVIACION ESTANDARD

Graf.10A PRUEBA PROFILACTICA. EXT. ETANOLICO PLANTA FRESCA  
DE *A. klotzchiana*.



Graf.10B RELACION DOSIS-EFECTO EXT. ETANOLICO PLANTA FRESCA  
DE *A.klotzchiana*



Gráfica que representa la curva dosis-efecto del extracto sobre la parasitemia. La ordenada muestra el porcentaje de efectividad (en probits) del extracto. La absisa muestra, las dosis del extracto en escala logarítmica. La línea interrumpida indica por extrapolación, el punto en que se alcanza la dosis efectiva 50.

CUADRO 21

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE *A. klotzchiana*  
 CON DISTINTOS DISOLVENTES EN g DE EXTRACTO  
 OBTENIDO POR 100 g DE PLANTA EXTRACTADA

Disolvente	Planta fresca	Planta seca
Alcohol etílico al 96 %	4.8	2.0
Cloroformo	16.5	4.6

CUADRO 22

RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DE LOS  
 EXTRACTOS DE *A. klotzchiana*

Disolvente	Etanólico		Clorofórmico	
	PS	PF	PS	PF
Alcohol etílico al 1% en agua	-	-	-	-
Alcohol etílico al 2% en agua	-	-	-	-
Aceite de maíz	-	-	+	-
Aceite de maíz al 1% en etanol al 96%	-	-	-	-
Tween 80 al 2%	+	+	-	-
Tween 80 al 5%	++	++	-	-
Aceite de maíz al 5% en Tween 80	+	+	++	++
Solución salina	-	-	-	-

(-) = No disolvió  
 (+) = Disolvió poco  
 (++) = Disolvió adecuadamente  
 PF = Planta fresca  
 PS = Planta seca



CUADRO 23

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD  
DE *Artemisia klotzchiana* EN RATONES  
MACHOS CD1

TIPO DE EXTRACTO	DL 50 (mg/kg)	DL 10 (mg/kg)
Clorofórmico planta seca	28.5	15.0
Clorofórmico planta fresca	57.7	16.6
Etanólico planta seca	317.0	104.0
Etanólico planta fresca	1560.0	782.0

DL10 = Dosis letal 10

DL50 = Dosis letal 50

CUADRO 24

ACTIVIDAD DE DIVERSOS EXTRACTOS DE *A. klotzchiana*  
CONTRA *P. berghei yoelii* IN VIVO

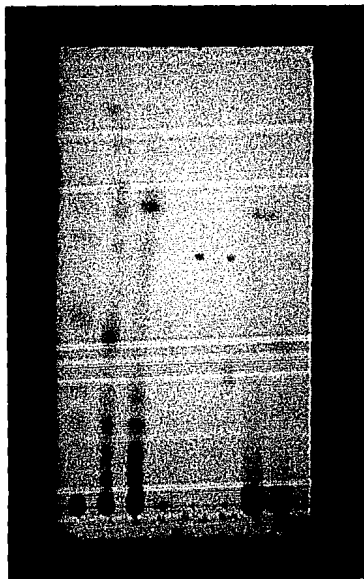
TIPO DE EXTRACTO	DE 50 (mg/kg)	MS 50
Clorofórmico planta seca	20.5	1.4
Clorofórmico planta fresca	35.0	1.6
Etanólico planta seca	120.0	2.6
Etanólico planta fresca	143.0	1.09

DE = Dosis efectiva 50

MS = Margen de seguridad 50

## RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

No se detectó la presencia de Artemisinina ni Dihidroartemisinina en los extractos etanólico, diclorometánico y acuoso de planta seca de *A. ludoviciana*, mediante esta cromatografía en capa fina, utilizando las muestras de referencia, en el sistema de elución ya mencionado.



1. Extracto etanólico planta fresca *A. ludoviciana*
2. Extracto etanólico planta seca *A. ludoviciana*
3. Extracto diclorometánico planta seca *A. ludoviciana*
4. Extracto acuoso planta seca *A. ludoviciana*
- R-3 Artemisinina (referencia)  
R-4 Dehidroartemisinina (referencia)
5. Extracto clorofórmico planta seca *A. klotzchiana*
6. Extracto etanólico planta seca *A. klotzchiana*

## RESULTADOS DE LOS ENSAYOS in vitro

El extracto diclorometánico de planta seca de *A. ludoviciana* ssp *mexicana* presentó una Concentración Inhibitoria 50 (CI50) de 50µg/ml y el extracto etanólico de la misma planta presentó una CI50 de 5µg/ml. Este último resultado corresponde a una actividad similar al que se reporta para el extracto etanólico de *A. annua*.

De las sustancias aisladas del extracto diclorometánico y que fueron analizadas in vitro contra cultivos de *P. falciparum* se reportaron los siguientes datos: 3 $\alpha$ -hidroxireynosina fue inactiva 50µg/ml. La estafiatina presentó una CI50 de 0.795µg/ml, ludovicina A presentó una CI50 de 5µg/ml, santamarina presentó una CI50 de 2.530µg/ml, armefolina presentó una CI50 de 3.580µg/ml, crisartemina B presentó una CI50 de 0.640µg/ml y arglanina presentó una CI50 de 0.390µg/ml. La CI50 para la artemisinina fue de 4µg/ml.

## DISCUSION

A partir de plantas se han obtenido diferentes productos como aceites, perfumes y medicamentos. Entre los últimos se han identificado esteroides, codeína, atropina, reserpina, digoxina, etc., etc. Se considera que las plantas son una fuente importante de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas y terapéuticas de gran utilidad para el hombre.

Farnsworth y Bingel (1975) señalan el aislamiento de 1650 compuestos de estructura nueva y 3077 compuestos de estructura ya definida. Algunos de estos compuestos han presentado propiedades antihelmínticas, antibacterianas, antimicóticas o antiprotozoarias y algunos con propiedades antivirales.<sup>80</sup>

La búsqueda de un efecto o propiedad biológica predeterminada, en plantas, ha seguido dos caminos, en algunos casos la propiedad se busca en plantas al azar como ocurre en el National Cancer Institute de USA institución que busca compuestos con propiedades antineoplásicas.<sup>81</sup> Por lo general, esta búsqueda al azar ocasiona una considerable inversión de tiempo y utiliza grandes recursos económicos.

El segundo camino es la búsqueda de la propiedad biológica a partir de plantas a las que tradicionalmente las comunidades humanas, de alguna región, les confiere alguna actividad biológica, este es el caso de la búsqueda exitosa que los chinos hicieron a partir de extractos de *A. annua*. En este segundo camino, la búsqueda es dirigida a la demostración de la existencia de la

propiedad señalada por la experiencia de su uso. Esa actividad biológica no siempre se encuentra, pero las posibilidades de hallarla son muy superiores a la búsqueda al azar, lo cual reduce tiempo y costos.

Una vez seleccionada la planta, la propiedad biológica buscada puede ponerse al descubierto mediante ensayos con extractos crudos o con cada uno de los compuestos que se aislen de dichos extractos. Con el extracto crudo, generalmente un solo ensayo puede definir si la planta contiene o no la propiedad buscada, aunque no se puede precisar la clase o tipo de compuesto, sin embargo, este método ahorra tiempo y costo. La relativa sencillez del método permite, una vez establecido el sistema, el estudio de gran número de plantas en breve tiempo y en forma simultánea. Aquellas plantas que presentan la propiedad biológica requerida se someten a una segunda etapa, con separación y ensayo de sus diferentes compuestos para identificar el compuesto que posee el principio activo.

El ensayo biológico ya sea de extracto crudo o compuesto puro se puede efectuar in vitro o in vivo.<sup>82,83,84,85</sup> En los ensayos in vitro, se usan parásitos mantenidos bajo condiciones de cultivo, los cuales se someten a la acción de los compuestos o extractos a ensayar, midiendo la capacidad de multiplicación del parásito con o sin el preparado. En estos ensayos habitualmente se utiliza P. falciparum.<sup>86,87,88</sup> Este tipo de ensayo tiene como ventajas: ser cuantificables, reproducibles, requieren poco material,<sup>88</sup> y además se pueden efectuar varios ensayos a la vez. Un ejemplo de esto es el análisis que se efectuó con extractos crudos

de plantas que se han empleado por la medicina tradicional como antimaláricos en alguna región del mundo como A. annua en China, Brucea javanica, en Thailandia, Castela nicholson en USA, Picrosma antidesma en Honduras y Simaba cedron en México y después se procedió a efectuar el aislamiento de los compuestos del extracto que haya ocasionado efecto inhibitorio en la multiplicación del parásito.<sup>89</sup> Los ensayos in vitro presentan las siguientes desventajas: cuando existe efecto del preparado ensayado sobre la multiplicación del parásito el ensayo no dice sobre si tal efecto es un efecto antiparasitario específico o se trata de un efecto citotóxico general es decir que de igual forma que afecta al parásito, afectará a cualquier célula.

Los modelos in vivo se utilizan para valorar un efecto determinado en compuestos puros o extractos de plantas.<sup>90</sup> Farnsworth y col. reportan ensayos con extractos crudos, buscando propiedades antiinflamatorias, antiulcerosas etc. En la búsqueda de antiinflamatorios, en algunos de esos ensayos, se analizaron los extractos crudos de 163 plantas con modelos in vivo encontrándose un efecto inhibitorio de la inflamación que va desde un 25% hasta un 79%.<sup>90</sup> Cletus y col. utilizaron extractos etanólicos, clorofórmicos y acuosos de Pyrenacantha staudtii en modelos in vivo para buscar efecto antiulceroso gástrico, encontraron que el extracto etanólico posee este efecto, y lo interesante es, que a partir de este extracto se pudieron aislar compuestos como las saponinas cuyo efecto antiulceroso es semejante al de la cimetidina.<sup>91</sup>

El Instituto Médico Nacional, en nuestro país efectuó ensayos clínicos con algunas de las plantas que la conseja popular ha utilizado para el tratamiento de las fiebres, encontrando que el Heliotropium peruvianum poseía algunas propiedades antimaláricas.<sup>92,93,94</sup> Sin embargo, por razones no especificadas claramente estos trabajos clínicos se descontinuaron, dejando una gran incógnita sobre la existencia real de tal efecto.

Las ventajas que presenta el trabajar con modelos in vivo pueden ser las siguientes: se valora el efecto deseado en forma directa, puesto que se esta trabajando con organismos vivos, también se puede valorar la mejor vía de administración del compuesto<sup>95,96</sup> o extracto y además se determina si existe un efecto tóxico inespecífico de evolución aguda o crónica. Dentro de las desventajas que se podrían mencionar es la extrapolación de datos, es decir una información que se obtiene en un modelo de roedor no podrá ser extrapolada como real en un modelo humano. Esta situación se puede observar en malaria, en donde los parásitos presentan especificidad de especie. Se ha observado que la sensibilidad hacia los fármacos varía de acuerdo con la especie del parásito, fármacos que han sido analizados en especies diferentes a la humana al ser aplicados en el hombre ya no presentan el mismo efecto. En relación al modelo aquí usado, Peters ha encontrado que existe una respuesta semejante de P. berghei y P. falciparum<sup>97,98</sup> hacia algunos antimaláricos como la cloroquina. En modelos con P. berghei y P. cynomolgi y la artemisinina como antimalárico se ha observado que tiene una buena actividad como esquizonticida sanguíneo, hecho que

se ha podido extrapolar a la malaria humana.<sup>4</sup>

#### RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

En igualdad de circunstancias el rendimiento de los extractos de A. ludoviciana fue mayor al de A. klotzchiana. Con los extractos de planta fresca y seca se observa que los extractos etanólicos y acuosos de planta fresca de ambas especies presentaron un mayor rendimiento que los extractos de la planta seca, esta diferencia se observa en forma muy marcada con los extractos acuosos de A. ludoviciana en donde el rendimiento del extracto de la planta fresca es 8 veces mayor que el extracto de la planta seca. Los extractos clorofórmicos y diclorometánico de ambas especies tanto de planta fresca como de planta seca mostraron un rendimiento semejante. No se observa una relación directa entre el rendimiento de la planta y la solubilidad del extracto. Existe una relación inversa entre el rendimiento de la planta y su toxicidad, es decir, a mayor rendimiento menor toxicidad. No existe una relación directa entre el rendimiento y la efectividad inhibitoria de la parasitemia.

El rendimiento de una planta esta influido, por la cantidad de componentes que puedan ser extraídos por un disolvente con una determinada polaridad. Además, existen otros factores que influyen en este rendimiento como son, la época del año en que es colectada la planta, la región donde se efectúa la colecta y la parte de la planta que es utilizada. No se efectuó un análisis de la influencia de estos factores en el rendimiento de nuestros extractos.



El mayor rendimiento de la planta fresca seguramente está determinado por la gran cantidad de clorofila y otros compuestos hidrosolubles, ya que el agua extrae la mayor parte de los compuestos existentes en el material vegetal, debido a su capacidad para formar puentes de hidrógeno. El etanol, disolvente de menor polaridad que el agua, extrae componentes de mediana polaridad. La clorofila y algunos otros componentes como los aceites esenciales son eliminados cuando la planta se encuentra deshidratada.<sup>99</sup>

El rendimiento de los extractos clorofórmicos y diclorometánico fue semejante, porque ambos disolventes son de muy poca polaridad y, por lo tanto además extraen compuestos de baja polaridad que se encuentren tanto en planta fresca como en la planta seca.

La solubilidad dependerá de la cantidad de compuestos polares y poco polares presentes en el extracto, pero también depende del vehículo utilizado y es independiente del rendimiento de la planta.

El efecto inhibitorio de la parasitemia esta dado por la clase de compuestos aislados en cada extracto, más no por el rendimiento de la planta, por lo tanto, el hecho de que el efecto inhibitorio mayor o menor de un extracto se asocie con mayor o menor rendimiento de su extracción, es puramente accidental.

#### PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Los extractos mostraron patrones de solubilidad diferentes, los cuales estuvieron en relación al tipo de extracción que los originó, e independientes de la especie de Artemisia de procedencia

o del estado fresco o seco del material extraído. Todos los extractos etanólicos de ambas plantas fueron totalmente solubles en Tween 80. Los extractos clorofórmicos y diclorometánico fueron adecuadamente solubles en las mezclas aceite de maíz-etanol y aceite de maíz-Tween 80. Los extractos acuosos de planta fresca y seca de *A. ludoviciana* fueron únicamente solubles en agua. No existe una relación directa entre la solubilidad y el rendimiento de la planta. Pero si existe una relación inversa entre la solubilidad y toxicidad de los extractos en ambas plantas, todos los extractos que se disolvieron en la mezcla donde estuvo presente el aceite de maíz fueron los más tóxicos. La efectividad para inhibir la parasitemia de cada extracto no esta relacionada con su solubilidad.

La diversidad de los patrones de solubilidad que fue observada en ambas plantas, se podría explicar por la polaridad de los compuestos aislados en cada extracto, el aislamiento esta directamente determinado por la polaridad del disolvente utilizado. Así los extractos con compuestos muy polares únicamente podrán disolverse en sustancias muy polares o en sustancias con propiedades anfotéricas y los extractos con compuestos poco polares únicamente podrán disolverse en sustancias poco polares. Los extractos etanólicos los cuales extraen compuestos de mediana polaridad fueron solubles en Tween 80 debido a que este es un agente tensoactivo con un valor hidrofílico-lipofílico alto y por ello la gran mayoría de los compuestos polares que son extraídos con el etanol, se disuelven con mayor facilidad en este agente.

Según la escala de Griffin, la cual explica el balance hidrofílico-lipofílico de un agente tensoactivo, el Tween 80 tiene un valor de 15.

Los extractos clorofórmicos y diclorometánico que seguramente contienen compuestos poco polares, únicamente fueron solubles en las mezclas aceite de maíz-etanol y aceite de maíz-Tween 80 que poseen un balance hidrofílico-lipofílico bajo, por ello tienen la capacidad para disolver únicamente los compuestos poco polares o no polares.

Los extractos acuosos fueron solubles en disolventes de gran polaridad como el agua y muy poco solubles en otros solventes por la gran cantidad de compuestos polares que contiene, razón por la cual se prefirió utilizar al agua como vehículo, aunque se pudieron haber utilizado agentes tensoactivos con un valor elevado de balance hidrofílico-lipofílico alto como el lauril sulfato de sodio cuyo valor, en la escala de Griffin es de 40.

Los extractos que mostraron mayor rendimiento fueron los extractos etanólicos y acuosos de planta fresca, estos extractos presentaron una solubilidad semejante a la de los extractos de planta seca, esto nos estaría hablando de que la solubilidad esta determinada por la clase de compuestos extraídos, mas que por la cantidad obtenida de los extractos.

Otros autores que han trabajado con extractos de plantas, no han tenido problema para solubilizar sus extractos, por ejemplo Cletus y col. utilizaron soluciones de Tween 80 como único vehículo para extractos clorofórmicos acuosos y etanólicos de Pyrenacantha

staudtii y obtuvieron una adecuada solubilidad.<sup>91</sup> Otros autores han utilizado soluciones hidroalcohólicas al 1% tanto para extractos acuosos y clorofórmicos como para etanólicos de diferentes plantas, con buenos resultados.<sup>89</sup> Con nuestros extractos tuvimos que usar un mayor número de vehículos, situación que nos indica la dificultad para solubilizarlos y como se ha mencionado este fenómeno probablemente se deba a la diversidad de compuestos extraídos.<sup>96,100,101</sup>

#### TOXICIDAD

De las 2 especies de plantas, A. klotzchiana resultó ser más tóxica que la A. ludoviciana en la mayoría de sus extractos. Los extractos menos tóxicos de ambas plantas fueron los etanólicos. Los extractos mas tóxicos fueron los extractos clorofórmicos y el diclorometánico. Los extractos acuosos quedaron con un valor intermedio. Los extractos etanólicos de A. ludoviciana y acuosos de planta fresca, de ambas plantas, que presentaron un mayor rendimiento, también demostraron ser los menos tóxicos. Existe una relación inversa entre la toxicidad y la solubilidad del extracto. Los extractos etanólicos de A. ludoviciana fueron los menos tóxicos y los que demostraron una mayor efectividad para inhibir la parasitemia.

El efecto tóxico de los extractos se explica por la cantidad y clase de compuestos aislados en cada extracto, así el efecto tóxico de los extractos de planta fresca con un mayor rendimiento, es menor que los extractos de planta seca, debido a la gran

cantidad de clorofila y otras enzimas que están presentes en la planta no deshidratada y que exhiben escasa toxicidad. Por esta razón en igualdad de peso los extractos de planta seca resultan más tóxicos que los de planta fresca. La mayor toxicidad observada, se presenta en aquellos extractos cuyo disolvente es poco polar y que además fueron solubles únicamente en las mezclas, en donde estuvo presente el aceite de maíz, esto indica que probablemente las sustancias extraídas son muy tóxicas, como las sesquiterpeno lactonas.<sup>94</sup> Además, estos extractos tóxicos mostraron una escasa capacidad para inhibir la parasitemia.

#### ENSAYO BIOLOGICO

Existe diferencia de comportamiento de los extractos entre ambas plantas, en cuanto a su efecto inhibitorio sobre el parásito, medido a través de la inhibición de la parasitemia. La diferencia en comportamiento esta dada por la especie de la planta empleada y por el tipo de disolvente utilizado para la extracción, así como del estado seco o fresco de la planta usada. Los extractos de A. ludoviciana demostraron una mayor efectividad para inhibir la parasitemia que los extractos de A. klotzchiana. Los extractos etanólicos de A. ludoviciana demostraron una efectividad mayor para inhibir la parasitemia. De todos los extractos el que demostró una mayor efectividad fue el extracto etanólico planta seca de A. ludoviciana. Los márgenes de seguridad cincuenta (MS50) mas altos, se observan en los extractos acuosos y etanólicos de planta seca de ambas especies. Existe una relación inversa entre la toxicidad de

los extractos y su efecto inhibitorio de la parasitemia. No existe ninguna relación entre la solubilidad de los extractos y su efecto inhibitorio.

El efecto inhibitorio de cada especie de planta y de cada extracto, esta determinado por la clase y cantidad de compuestos extraídos. Cada especie de Artemisia tendrá compuestos con propiedades biológicas afines o distintas a otras especies del mismo género. Algunos de estos compuestos ya han sido valorados, como por ejemplo, la artemisinina extraída de A. annua la cual posee un efecto antimalárico, la tamaulipina, sesquiterpeno lactona aislada de A. hispanica con posible efecto antitumoral<sup>101</sup> y algunos extractos de A. absintium que han sido utilizados como antipiréticos con buenos resultados.<sup>102</sup>

Uno o más compuestos que se encuentran en A. ludoviciana tienen efecto antimalárico, y al parecer se encuentran mas concentrados en los extractos etanólicos y acuosos de planta seca que en los extractos de planta fresca, situación que es deducible al comparar la inhibición de la parasitemia de cada uno de estos extractos. El análisis de varianza demostró que la inhibición de la parasitemia de este extracto tiene una significancia estadística de  $P < 0.003$ . La DE50 del extracto etanólico de A. ludoviciana planta seca (29.2 mg/kg) corresponde a la menor de todas las DE50 obtenidas en todos los extractos. Afortunadamente, este extracto etanólico presentó una menor toxicidad y por ello obtiene un margen de seguridad alto.

De los extractos clorofórmicos de ambas plantas se puede

mencionar lo siguiente, el más efectivo para inhibir la parasitemia de los tres extractos fue el de la planta seca de A. klotzchiana, con una efectividad para inhibir la parasitemia hasta del 37%, pero es un extracto con una toxicidad alta, y con un MS50 menor de 10. El extracto clorofórmico planta fresca de A. klotzchiana fue el menos potente de los tres extractos, únicamente produjo una efectividad del 2.7% para reducir la parasitemia en la dosis máxima. con un MS50 menor de 10.

Los MS50 están relacionados directamente con el efecto inhibitorio y la toxicidad de cada extracto. Así, un margen de seguridad dado nos estará indicando el número de veces que se necesita aplicar la DE50 para producir un efecto tóxico.<sup>79</sup> Finalmente, este margen de seguridad esta relacionado con la clase de compuestos aislados en cada extracto, ya que estos determinan la efectividad y toxicidad. El MS50 del extracto etanólico planta seca fue de 28.7, lo cual nos estaría indicando que se necesita aplicar 28.7 veces la DE50 para presentar un efecto tóxico.<sup>103,104</sup>

El compuesto o compuestos con propiedad antimalárica, extraídos del extracto de A. ludoviciana, tiene una estructura diferente a la artemisinina debido a: los extractos que fueron extraídos con disolventes semejantes a los utilizados, para aislar artemisinina, no presentaron efecto inhibitorio importante, hecho que si se observó con los extractos obtenidos con disolvente de mayor polaridad.<sup>101</sup> La cromatografía en capa fina del extracto etanólico, no mostró la presencia de artemisinina y los ensayos in vitro de dicho extracto contra P. falciparum realizados, en

Inglaterra, señalan que posee un efecto inhibitorio de la parasitemia cuantitativamente semejante a A. annua.

En cuanto a la sobrevida de los ratones, únicamente en los extractos etanólicos de A. ludoviciana se observó una diferencia de sobrevida, entre los grupo control y los grupo testigo. En el resto de lo extractos no hubo diferencias entre los grupos testigo y grupos problema de cada uno de los extractos de ambas plantas.



## CONCLUSIONES

1. Los diferentes extractos de A. klotzchiana no tuvieron efecto inhibitorio sobre la multiplicación de P. berghei.
2. Existe actividad antimalárica en A. ludoviciana.
3. El efecto antimalárico se obtiene sólo del extracto etanólico.
4. El efecto antiparasitario del extracto etanólico de A. ludoviciana es cuantitativamente equiparable al que exhiben extractos etanólicos de A. annua, en ensayos *in vitro* con P. falciparum.
5. El compuesto o compuestos que poseen actividad antimalárica no se identifican con la artemisinina.
6. El compuesto o compuestos activos contra P. berghei de A. ludoviciana, podrán ser sesquiterpeno lactonas distintas a la artemisinina, o bien ser otros compuestos no relacionados con esas moléculas.

7. El extracto que mostró actividad antimalárica es poco tóxico, activo a concentraciones bajas y tiene un margen de seguridad alto.
  
8. Es imperativo continuar con el análisis de los extractos alcohólicos de *A. ludoviciana*, para aislar el compuesto que produce el efecto inhibitorio de la parasitemia. Aislado e identificado, tal compuesto, ya en estado puro, deberá ser sujeto a nuevos ensayos como antimalárico y ser valorado farmacológicamente, para determinar su efecto biológico general sobre la economía de los animales experimentales, y su toxicidad crónica, antes de decidir, si se justifica la realización de ensayos, en la fase uno, con voluntarios humanos.

## REFERENCIAS

1. Korolkovas A. Compendio esencial de química farmacéutica. 4ª Ed. México: Editorial Reverte, 1979:519-537.
2. Goodman A, Goodman L. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 7ª Ed. México: Editorial Interamericana, 1986: 1021-1042.
3. Powell R D. The chemotherapy of malaria. Clin Pharmacol Therap 1965; 7:48-73.
4. WHO. The development of quinaosou and its derivates as antimalarial drugs. TDR/Chemal-SWG4, 1981.
5. Schuurkamp G, Spicer P, Kereu R, Bulungol P, Rieckmann K. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86:121-122.
6. Ruiz L E. Clasificación y reseña histórica de algunas plantas que el vulgo usa en la República para curar las intermitentes. Anal Inst Med Nac 1905; 7:114-132.
7. Grewal R S. Pharmacology of the 8 aminoquinolines. Bull WHO 1981; 59:397-406.
8. Levine N D, Corliss J O, Cox J O y col. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980; 27:37-58.
9. Scholtyssek E. Fine structure of parasitic protozoa. New York: Springer-Verlag, 1979:15-29.

10. Garnham P C C. Malariae parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific Publications Oxford, 1966; 116,117,216,217,258.
11. Sinden R E. The biology of Plasmodium in the mosquito. *Experientia* 1984; 40:1330-1342.
12. Nussenzweig R S, Nussenzweig V. Development of a sporozoite vaccine. *Parasitol Today* 1985; 1:150-152.
13. Brown G V. Prospects for vaccine against malaria. *Med J Aust* 1989; 144:703-704.
14. Aikawa M. Parasitological review. *Exp Parasitol* 1971; 30: 284-319.
15. Matsumoto Y, Matsuda S, Yoshida Y. Ultrastructure of erythrocytic stages of Plasmodium ovale in humans. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:689-696.
16. Garnham P C C, Berd R G, Baker, J R, Bray R S. Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1961; 55:98-102.
17. Hollingdale M R. Malaria and the liver. *Hepatology* 1985; 5:335-337.
18. Verhave J P, Meis J F G M. The biology of tissue forms and other asexual stages in mammalian plasmodia. *Experientia* 1984; 40:1317-1329.
19. Shortt H E, Garnham P C C. The pre-erythrocytic development of P. cynomolgi and P. vivax. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 41:785-789.

20. Meis J F, Verhave J P, Jop P H K, Meuweissen H E. Transformation of sporozoites of Plasmodium berghei into exoerythrocytic forms in the liver of its mammalian host. Cell Tissue Res 1985; 241:353-360.
21. Shortt H E, Garnham P C C. Demonstration of a persisting exoerythrocytic cycle in P. cynomolgi and its bearing on the production of relapse. Br Med J 1948; 1:1225-1228.
22. Krotoski W A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:1-11.
23. Sinden R E. A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:598-605.
24. Charet P, Slomianny C, Prensier G, Moreau S. Plasmodium sp. et degradation de l'hémoglobine: mecanisme et relations avec les antimalariques. Ann Biol 1984; 23:31-60.
25. Jungery M. Studies on the biochemical basis of the interaction of the merozoites of P. falciparum and the human red cell. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1985; 79:591-597.
26. Yuthavong Y. Alterations of the erythrocyte membrane in malaria infection. J Sci Soc Thailand 1985; 11:53-65.
27. Weiss B, Prozialec W C, Wallace T L. Interaction of drug with calmodulin. Biochem Pharmacol 1982; 31:2217-2226.
28. Matsumoto Y, Perry G, Scheibel L W, Aikawa M. Role of calmodulin in P. falciparum implications for erythrocyte invasion by the merozoite. Eur J Cell Bioll 1987; 45:36-43.

29. Tanabe K, Mikkelsen R B, Wallach D F H. Calcium transport of P. chabaudi infected erythrocytes. J Cell Biol 1982; 93:680-684.
30. Sherman I W. Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. Parasitology 1985; 91:609-645.
31. Preetti U, Carter T, Peiris J, Peter H. Immunoelectron microscopy of schüffner's dots in P. vivax-infect human erythrocytes. Am J Pathol 1988; 131:48-52.
32. Gruenberg J, Allred D R, Sherman I. Scanning electron microscope analysis of the protrusiones (knobs) present on the surfase of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. J Cell Biol 1983; 97:795-802.
33. Sinden R E. Sexual development of malaria parasites. Adv Parasitol 1983; 22:153-210.
34. Pei-Hui Ch, Sui Ch, Hong W, Yung-ling S. Scanning electron microscopic observations of the oocyst sporoblast and sporozoite of Plasmodium yoelii yoelii. J Parasit 1984; 70:902-906.
35. Mair W A, Feldman H B, Seitz H M. Pathology of malaria infected mosquitoes. Parasitol Today 1987; 3:216-218.
36. Garnaham P C C. The present state of malaria research: an historical survey. Experientia 1984; 40:1305-1310.
37. OMS. Quimioterapia del paludismo. Serv Inf Tec 1961; 226: 44-50.

38. OMS. Comité de Expertos en Paludismo. Serv Inform Tecn 1957; 6o Inf:123.
39. Peters W. The problem of drug resistance in malaria. Parasitology 1985; 90:705-707.
40. OPS-OMS. Situación de los programas de la malaria en las Américas. Informe XXXVI 1988; Agosto: 1-132.
41. Pampana E. Erradicación de la Malaria. D.F.: Ed. Limusa, 1966:286.
42. OMS. Quimioterapia del paludismo. Serv Inf Tecn 1967; 375: 7-9 y 36.
43. Bradley A J, Phillips P A. Prophylaxis against malaria for travellers from the United Kingdom. Br Med J 1989; 299:1087-1089.
44. Herwaldt B, Krogstad D J, Schlesinger P H. Antimalarial agents: specific chemoprophylaxis regimens. Anti Agens Chemo 1988; 32:953-956.
45. Wernsdorfer W H. Alternative treatment of drug resistant Falciparum malaria with particular reference to Africa south of the Sahara. Ann Soc Belge Med Trop 1985; 65:155-163.
46. Chesney E W, Fasco M J, Banks W F. The metabolism of chloroquine in man during and after repeated oral dosage. J Pharmacol Ther 1967; 158:323-331.
47. Litter M. Farmacología experimental y clínica. 7a Ed. México: El Ateneo 1977:614-630.

48. Bhatia M S, Singhal P K, Dhar N K. Psychiatric complications of chloroquine. *Ann Nat Acad Med Sci* 1988; 24:223-228.
49. Strother A, Fraser I M, Allahyari R, Tilton B E. Metabolism of 8 aminoquinolines antimalarial agents. *Bull WHO* 1981; 59:413-425.
50. Dixon K E, Pitaktong U, Bamnetpandh, Teopepethapom S, Nakon A. Treatment of an acute case Plasmodium malariae with mefloquine. *Am J Trop med Hyg* 1983; 32:631-632.
51. Klinkaewnarong W, Chongsuphajaisiddhi T, Sabchareon A, Brockelman C R. In vitro sensitivity of P. falciparum to sulfadoxine and pyrimethamine. *Southeast Asian. J Trop Med Pub HLTH* 1985; 16:296-301.
52. Boulard Y, Landau I, Miltgen F, Peters W, Ellis D S. The chemotherapy of rodent malaria XLI. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80:577-580.
53. Sweeney T R. Efficacy of mefloquine against malaria parasites in animal models. *WHO/ Mal* 1981; 82:1-11.
54. Jiang T B, Guo X B, Li G Q, Kong Y CH, Arnold K. Antimalarial activity of mefloquine and quinghaosu. *Lancet* 1982; 2:285-288.
55. Schwartz D, Jauch R. Pharmacokinetics and metabolism of mefloquine. *WHO/Mal* 1979; 82:1-9.
56. Dixon K E, Pitaktong U, Phintuyothin P. A clinical trial of mefloquine in the treatment of P. vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:435-437.
57. Weinke T, Trautmann T, Weber G. Neuropsychiatric side effects after the use of mefloquine. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45:86-91.



58. Kleyman D L, Lin T J, Acton N, Scovill J P y col. Isolation of Artemisine (Qinghaosu) from *A. annua* growing in the Unites States. J Nat Produc 1984; 47:715-717.
59. Lavander O V, Ager A L, Morris V C. Quinghaosu dietary vitamin E selenium and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *P. yoelii*. Am J Clin Nutr 1989; 50:546-552.
60. WHO. Development of mefloquine as an antimalarial drug. Bull WHO 1983; 61:169-178.
61. Doberstyn E B. Resistance of *P. falciparum*. Experientia 1984; 40:1311-1316.
62. Trager W, Jensen J B. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193:673-675.
63. Riekman K L, Sox L J, Campell G H, Mrema L E. Drug sensitivity of *P. falciparum* 1978; 7:22-23.
64. Stürcheler D. Malaria prophylaxis in travellers: the current position. Experientia 1984; 40:1357-1362.
65. Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *P. falciparum*? Parasitol Today 1988; 4:112-115.
66. Peters W. Drug resistance in *P. berghei* Vincke and Lips 1948, I chloroquine resistance. Exp Parasitol 1965; 17:80-89.
67. Mabberly D J. The plant book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge: Balth Press, 1987:45.
68. Tutin T B, Heywood V H, Burges N A y col. Flora Europea: plantaginaceae to compositae. Cambridge: Cambridge University, 1976:4:178,185.

69. Moore D M. Flora Europea. Cambridge: Cambridge University, 1982:247-249.
70. Mori T. An enumeration of plants. Hitherto know from Corea. Seoul: Published by the Government of Chosen, 1922:342.
71. California Academy of Sciences. A revision of the *A. vulgaris* complex in North America. Proc Calif Acad Sc 1946; 25:421-468.
72. Rzedowski J, Calderon G. Flora fanerogámica del valle de México. México: INP e Instituto de Ecología, 1985:2:430 y 593.
73. Sánchez O. La flora del valle de México. 6a. Ed. D.F.: Editorial Herrero S.A., 1980:432.
74. Diaz J L. Monografía Científica: Usos de las plantas medicinales en México. D.F. IMEPLAN; 1976: vol II: 159-161.
75. Rufz A. Análisis fitoquímico de *A. ludoviciana* en busca de sustancias con propiedades antimaláricas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Química Orgánica) UNAM, 1991. 102 y 131.
76. Fthal E. Thin layer chromatografy. Berlin: Ed. Bolliger, 1969:10-15.
77. Litchfield J T, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose effect experiments. J Pharm Exp ther 1949; 96:99-113.
78. Lynch M J, Stanley S R, Mellor L D, Spare P D. Métodos de laboratorio. 2a ed. México: Interamericana, 1985:708-713.
79. Goldstein A, Lewis A Sumner M. Farmacología. D.F.: Ed. Limusa, 1977:425-471.

80. Farnsworth N R, Bingel A S. Problems and prospects of discoverign new drugs from higher plants by pharmacological screenning. En Wagner H and Wolf ed. Proceeding of the Firts International Congress on Medicinal Plant Research. Munich: University of Munich, 1976:1-22.
81. Malone M H. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity: Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. En Wagner H, Wolf P, ed Proceeding of the First International Congress on Medical Plant. University of Munich: Proceeding in Life Sciences, 1976:24-27.
82. Peters W. The chemotherapy of rodent malaria XXII. The value of drug resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontoicidad activity. Ann Trop Med Parasitol 1975; 69:155-177.
83. Bhattacharya B K, Sen B. A rapid method for screening compounds in experimental protozoal infections. Arch Int Pharmacodyn 1962; 137:61-75.
84. Osdone T S, Russell P B. 2,4,4 triamino 5 ortho substituted arylpteridines. A new series of potent antimalarial agents. J Med Chem 1967; 10:431-434.
85. Irwin S. Drug screening and evaluative procedures. Science 1962; 136:123-128.
86. O'Neill M, Bray D, Boardman P y col. Plants as source of antimalarial drugs: *In vitro* antimalarial activities of some quassinoids. Anti Agen Chemother 1986; 30:101-104.

87. López F, Wersdorfer W. In vitro response of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum to mefloquine. Bull WHO 1979; 57:665-665.
88. Khalid S, Farouk A, Geary T, Jensen J. Potential antimalarial candidates from african plants: an in vitro approach using Plasmodium falciparum. J Ethnopharmacol 1986; 15:201-209.
89. Neill M J O', Bray D H, Boordman P, Phillipson J D, Warhurst D C. Plants as source of antimalarial drugs. Part 1 In vitro test method for the evaluation of crude extract from plants. Planta Med 1985 sin/vol: 400-410.
90. Aguwa C. Pharmacologic effects of an aqueous extract of Rhigiocarya racemifera. J Ethnopharmacology 1986; 15:145-151.
91. Cletus N, Aguwa C, Okunji C. Gastrointestinal studies of Pyrenacantha staudtii leaf extracts. J Ethnopharmacol 1986; 15:45-55.
92. Martínez del Campo J. Notas sobre pretendidas propiedades antipalúdicas de alguna plantas. Anal Inst Med Nac 1897; 1: 376-381.
93. Martínez M. Las plantas medicinales de México 4ª Ed. México: Ediciones Botas, 1958:150-151.
94. Villaseñor F. Método general de análisis de los vegetales, seguido por el suscrito en el estudio de las plantas, cuyo análisis le ha sido encomendada en el Instituto Médico Nacional. An Ins Med Nac 1897; 1:154-163.
95. AMA Department of drugs. AMA drug evaluations. 4a Ed. USA Ed. American Medical Association, 1980:40-41.

96. Malone M, Robichaud R. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 1962; 25:320-332.
97. Peters W. Rational methods in search for antimalarial drug. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1967; 61:400-410.
98. Rozman R, Canfield C. New experimental antimalarial drugs. *Ad Pharma Chemo* 1979; 16:1-46.
99. Thomson R. *Química Orgánica D.F.:* Edit. Fondo Educativo Interamericano, 1976:30-40.
100. Mata R, Delgado G, Romo A. Sesquiterpene lactones of *A. klotzchiana*. *Phytochemistry* 1985; 24:1515-1519.
101. Morris S, Eakin M, Thomas A. Tumor inhibitor. Structure Citotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J Med Chemist* 1971; 14:1147-1152.
102. Gulkhattak S, Gilani N, Ikram M. Antipyretic, studies of some indigenous Pakistani medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1985; 14:45-51.
103. Levine Ruth. *Farmacología Barcelona:* Edit. Salvat, 1982:165-199.
104. Bevan J. *Fundamentos de Farmacología. 2a. Ed. D.F.:* Harla, 1982:43-51.