

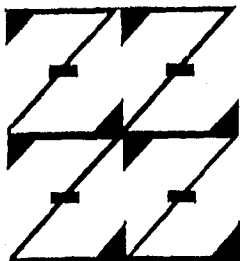


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

3  
21

**Estudio químico y biológico de**  
*Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*



T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
**JOSE LUIS BALDERAS LOPEZ**

DIRECTOR: Q ARTURO EDUARDO CANO FLORES

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Estudio químico y biológico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

Este trabajo se desarrolló en el  
**Laboratorio de Química de Productos Naturales L-314**  
**de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**  
bajo la asesoría de  
M. en C. Alejandro Ruiz Cancino  
Quím Arturo Eduardo Cano Flores.

El presente trabajo forma parte del proyecto:  
“ **Búsqueda etnobotánica, caracterización química y  
evaluación farmacológica de constituyentes antimicrobianos presentes  
en plantas selectas utilizadas en medicina tradicional** ”.  
Financiado por la DGAPA. Proyecto IN208094

**DEDICATORIA.**

---

A mis padres José Luis y Juana quienes a base de esfuerzos y sacrificios han podido darme una educación.

A Myrna por su cariño y apoyo incondicional en todo momento.

A mi maestro y amigo M. en C. Alejandro Ruíz Cancino por su apoyo, orientación y sobre todo por su amistad.

---

**AGRADECIMIENTOS.**

---

Se agradece al Dr. Guillermo Delgado Lamas y al personal técnico académico del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades brindadas en la realización de este trabajo.

Se agradece a la M. en C. Ma. de Lourdes Hernández de Jesús de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por su apoyo y asesoría en la realización de los ensayos antimicrobianos.

Se agradece a Enrique Serrano Saldaña y a todas aquellas personas que de alguna o de otra manera me ayudaron en la realización de este trabajo.

Los resultados derivados del presente proyecto se han presentado en los siguientes foros:

- **Primer Congreso Internacional de Ciencias e Ingenierías del Área Químico-biológicas (I CICIAQB).** Cholula, Puebla. Marzo de 1995.
- **XII Seminario Científico del Centro Nacional de Investigaciones Científicas.** Ciudad de La Habana, Cuba. Junio de 1995.
- **XXI Simposio de Estudiantes de Posgrado en Química "Fernando Romo".** Puebla, Puebla. Noviembre de 1995.
- **Certamen Nacional Juvenil de Ciencia y Tecnología 1995 (Primer lugar en el área Ciencias Exactas, categoría AA).** Xalapa, Veracruz. Noviembre de 1995.

*" Mi sueño como científica experimental  
era ir al laboratorio con el anhelo  
de aprender cada vez algo  
que nadie supiera hasta entonces.  
Muy pocas fueron las ocasiones  
en que esto realmente aconteció,  
pero el sueño continuó  
a lo largo de mi carrera. "*

**Rosalyn S. Yalow**

*" La palabra es fascinación.  
La ciencia es un desafío sin límite  
-siempre demandante, frustrante y a veces satisfactoria.  
Es una manera de vivir y de pensar.  
La investigación es la búsqueda de lo desconocido  
pero no de lo inconocible.  
El desafío de la investigación radica en plantear  
preguntas contestables pero impredecibles.  
Opté por la ciencia debido al desafío.  
A lo largo de los años he visto algunos de nuestros  
resultados  
incorporados a la estructura del conocimiento biológico.  
Esto es gratificante y placentero,  
pero el verdadero desafío siempre queda adelante "*

**Ruth Sager**



*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*



## INDICE.

<b>Indice.</b>	i
<b>Notaciones empleadas.</b>	vii
<b>Resumen.</b>	1
<b>Introducción.</b>	3
<b>Fundamentación teórica.</b>	6
<b>A. Generalidades sobre el género <i>Artemisia</i> L.</b>	7
<b>Cuadro I. Principales tipos de metabolitos secundarios encontrados en diferentes especies del género <i>Artemisia</i> L.</b>	8
<b>Figura I. Ejemplos de metabolitos secundarios encontrados en diferentes especies de <i>Artemisia</i>.</b>	9
<b>A.1. Actividades biológicas del género <i>Artemisia</i> L.</b>	11
<b>Cuadro II. Actividades biológicas reconocidas de algunas especies del género <i>Artemisia</i> L.</b>	12
<b>B. Generalidades sobre <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	14
<b>Cuadro III. Especies del género <i>Artemisia</i> que se encuentran distribuidas en México.</b>	14
<b>B.1. Usos medicinales de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	15
<b>Cuadro IV. Propiedades curativas atribuidas a <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> a través del tiempo.</b>	15
<b>B.2. Constituyentes químicos de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	17
<b>Cuadro V. Metabolitos secundarios aislados hasta el momento de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	18
<b>Figura II. Metabolitos secundarios aislados hasta el momento de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	21
<b>C. Generalidades sobre las lactonas sesquiterpénicas.</b>	26
<b>Figura III. Principales esqueletos carbocíclicos presentes en las lactonas sesquiterpénicas.</b>	26
<b>Figura IV. Anillos <math>\alpha</math>-metil-<math>\gamma</math>-lactona y <math>\alpha</math>-metil-<math>\gamma</math>-lactona.</b>	27

<b>Cuadro VI. Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas y su respectiva fuente vegetal.</b>	28
<b>Figura V. Estructuras de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica.</b>	30
<b>D. Generalidades sobre los ensayos biológicos.</b>	33
<b>D.1. Bioensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i> L.</b>	34
<b>Cuadro VII. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> L. de compuestos bioactivos conocidos.</b>	35
<b>D.2. Ensayo antimicrobiano de Mitscher para extractos de plantas y productos naturales.</b>	36
<b>Cuadro VIII. Algunos productos naturales probados con el método de Mitscher.</b>	37
<b>Cuadro IX. Extractos etanólicos de algunas especies vegetales probadas con el método de Mitscher.</b>	38
<b>Planteamiento del problema.</b>	39
<b>Objetivos.</b>	41
<b>A. Generales.</b>	42
<b>B. Específicos.</b>	42
<b>Hipótesis de trabajo.</b>	43
<b>Metodología.</b>	45
<b>A. Materiales.</b>	46
<b>B. Procedimientos.</b>	50
<b>B.1. Estudio químico.</b>	50
<b>Figura VI. Diagrama de flujo seguido en el estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>.</b>	52
<b>Figura VII. Obtención de la <math>\beta</math>-pirazolina de la Arglanina.</b>	53
<b>B.2. Estudio biológico.</b>	54
<b>a) Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L.</b>	54
<b>b) Pruebas antimicrobianas.</b>	55

Figura VIII. Esquema que muestra la forma de sembrado de los microorganismos en cada caja Petri.	55
<b>Resultados.</b>	57
<b>A. Estudio químico.</b>	58
Tabla I. Sustancias aisladas del extracto etanólico de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> en este estudio.	58
Figura IX. Estructuras de las sustancias aisladas del extracto etanólico de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> en el presente estudio.	59
Propiedades espectroscópicas de las sustancias aisladas del extracto etanólico.	60
Tabla II. Datos de RMN <sup>1</sup> H de algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas en este estudio.	61
<b>B. Estudio biológico.</b>	62
<b>B.1. Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L.</b>	62
Tabla III. Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L. de los diferentes extractos y sustancias aisladas del extracto etanólico de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> .	62
<b>B.2. Pruebas antimicrobianas.</b>	63
Tabla IV. Resultados de la evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> .	63
Tabla V. Resultados de la evaluación antimicrobiana de algunas fracciones del extracto etanólico de hojas y tallo.	64
Tabla VI. Resultados de la evaluación antimicrobiana de algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto etanólico de hojas y tallo.	65
<b>Discusión de resultados.</b>	66
<b>A. Estudio químico.</b>	67
Figura X. Disposición espacial de los hidrógenos H-5, H-6 y H-7.	67
Figura XI. Lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano.	68
Figura XII. Posición de los hidrógenos H-13a y H-13b y efecto de anisotropía sobre H-13b.	68

fracciones [191-223].	69
Figura XIV. Arglanina (II).	69
Figura XV. Espectro COSY donde se muestra la interacción de H-1 y del hidrógeno del hidroxilo (espectro 5).	71
Figura XVI. Estructura parcial de la sustancia obtenida de las fracciones [109-169(231-267)].	71
Figura XVII. Ludovicina A (I).	72
Figura XVIII. Armefolina (III).	72
Figura XIX. Posición de la cetona $\alpha,\beta$ -insaturada en el anillo A de la sustancia en discusión.	74
Figura XX. Posición definitiva del hidróxilo en el anillo A sin estereoquímica definida.	75
Tabla VII. Comparación de los datos descritos para la Ludovicina C y los determinados en la sustancia en discusión.	75
Tabla VIII. Desplazamientos químicos de los carbonos de la sustancia aislada.	76
Figura XXI. Efecto $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-14 de la Reynosina y de la sustancia en discusión.	77
Figura XXII. Ausencia del efecto $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-5 de la Arbusculina.	77
Figura XXIII: Efecto $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-5, y ausencia del mismo en el C-14 de la Ludovicina B.	78
Figura XXIV. Reacción de oxidación de la Armefolina (III).	79
Figura XXV. Armexifolina (IV).	79
Tabla IX. Bandas principales de absorción IR de las sustancias aisladas en las fracciones más polares del extracto etanólico.	81
<b>B. Estudio biológico.</b>	82
<b>B.1. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> L.</b>	82
<b>B.2. Pruebas antimicrobianas.</b>	83
<b>Conclusiones.</b>	87

<b>Sugerencias.</b>	89
<b>Figura XXVI. Propaganda distribuida por Nutricorp International (C.E. Jamieson &amp; Company Limited) del Canadá, acerca del medicamento contra la migraña, Tanacet 125.</b>	91
<b>Espectros de las sustancias.</b>	92
<b>Espectro 1. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la Arglanina (II).</b>	93
<b>Espectro 2. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Arglanina (II).</b>	94
<b>Espectro 3. Espectro COSY (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Arglanina (II).</b>	95
<b>Espectro 4. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Ludovicina A (I).</b>	96
<b>Espectro 5. Espectro COSY (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Ludovicina A (I).</b>	97
<b>Espectro 6. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O, TMS) de la Ludovicina A (I).</b>	98
<b>Espectro 7. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la Armexifolina (IV).</b>	99
<b>Espectro 8. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).</b>	100
<b>Espectro 9. Espectro COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).</b>	101
<b>Espectro 10. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).</b>	102
<b>Espectro 11. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).</b>	103
<b>Espectro 12. Espectro IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [109-169(511-526)].</b>	104
<b>Espectro 13. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS) de la sustancia aislada de la fracción [109-169(511-526)].</b>	105

<b>Espectro 14. Espectro IR (KBr) del sólido 1 de la fracción [109-169(527-541)].</b>	<b>106</b>
<b>Espectro 15. Espectro IR (KBr) del sólido 2 de la fracción [109-169(527-541)].</b>	<b>107</b>
<b>Espectro 16. Espectro IR (película) de la sustancia aislada de la fracción [233-281].</b>	<b>108</b>
<b>Espectro 17. Espectro IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [502-520].</b>	<b>109</b>
<b>Espectro 18. Espectro IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [557-573].</b>	<b>110</b>
<b>Espectro 19. Espectro IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [608-615].</b>	<b>111</b>
<b>Espectro 20. Espectro IR (suspensión en nujol) de la sustancia aislada de la fracción [636-697].</b>	<b>112</b>
<b>Espectro 21. Espectro IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [397.501].</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía.</b>	<b>114</b>

**NOTACIONES EMPLEADAS.**

---

AST	agar de soya tripticaseína
ATCC	American Type Culture Collection
C-k , C <sub>k</sub>	carbono número k
CCF	cromatografía en capa fina
CCP	cromatografía en capa preparativa
CCV	cromatografía en columna por elución a vacío
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CH <sub>3</sub> -k	metilo correspondiente al carbono número k
CH <sub>3</sub>	metilo
CH <sub>2</sub>	metileno
CH	metino
CL <sub>50</sub>	concentración letal media
COSY	correlación espectroscópica bidimensional (Correlated Spectroscopy)
CrO <sub>3</sub>	óxido de cromo (VI)
CST	caldo de soya tripticaseína
d	doblete
dd	doble de doblete
dt	doble de triplete
dq	doble de cuarteto
DEPT	distorsión reducida por una transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
D <sub>2</sub> O	agua deuterada
EM(IE)	espectrometría de masas por impacto electrónico
EP	éter de petróleo

EtOH	etanol
Et <sub>2</sub> O	éter etílico
H <sub>2</sub> O	agua
Hz	Hertz
H-k , H <sub>k</sub>	hidrógeno unido a la posición número k
IR	espectroscopía de infrarrojo
J	constante de acoplamiento
m	multiplete
Me	metilo
MeOH	metanol
m/z	relación masa/carga
MHz	MegaHertz
M <sup>+</sup>	ión molecular
ppm	partes por millón
Py	piridina
RMN <sup>13</sup> C	espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	singulete
SNC	sistema nervioso central
sp.	especie
ssp.	subespecie
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
<i>ax</i>	<i>α-axial</i>
<i>ec</i>	<i>α-ecuatorial</i>
<i>βax</i>	<i>β-axial</i>
<i>βec</i>	<i>β-ecuatorial</i>
δ	desplazamiento químico
Ω	número de insaturaciones
ν <sub>máx</sub>	número de onda donde se observa un máximo de absorbaucia



**Resumen.**

---

### RESUMEN.

---

En el presente trabajo se describe el estudio químico y biológico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, vegetal utilizado en la Medicina Tradicional Mexicana. Del estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas se aislaron y caracterizaron cuatro lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de eudesmano: Ludovicina A, Arglanina, Arnefolina y Armexifolina. De esta última, se hicieron algunas correcciones a sus datos de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C informados anteriormente en la literatura.

Del estudio biológico, se observó que los extractos diclorometánico y etanólico de hojas y tallo presentaron el menor valor de CL<sub>50</sub>, que indica su mayor toxicidad con respecto a los demás; mientras que en el primero se observó una actividad antimicrobiana ligeramente mayor. Esto indica que no hay una relación entre toxicidad en *Artemia salina* y actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana y toxicológica mostrada por los demás extractos y sustancias es discutida.

**Introducción.**

## INTRODUCCIÓN.

---

México es el decimocuarto país más grande del Mundo y el tercero en megadiversidad vegetal. Su posición geográfica lo sitúa en la interfase del reino neotropical con elementos florísticos tropicales cálidos y del reino holoártico con componentes florísticos de temperatura fría<sup>1</sup>. Esto hace que nuestro país sea vasto y diverso en recursos vegetales, donde las plantas de uso medicinal tienen una gran importancia.

Dicha importancia de las plantas medicinales<sup>(1)</sup>, puede ser evaluada por su frecuencia de uso, debido a que es el recurso terapéutico para muchos mexicanos y, cuya riqueza es estimada por el número de especies -alrededor de 2000- utilizadas en las prácticas médicas populares<sup>1,3-4</sup>.

El conocimiento empírico que posee la población mexicana acerca de las propiedades curativas de las plantas medicinales, es un patrimonio cultural legado desde épocas ancestrales y aún cuando se han empleado desde entonces; no fue sino hasta principios del siglo XIX cuando nació la inquietud de estudiarlas<sup>3,5</sup>.

Uno de los propósitos principales del estudio químico de las plantas medicinales es el aislamiento de los principios activos que supuestamente deben existir, y que son responsables de sus propiedades curativas. Esto proporciona en gran medida las bases que permiten convalidar o refutar las propiedades medicinales atribuidas a la planta<sup>3,5</sup>.

Estos principios activos no son más que los metabolitos secundarios de las plantas, los cuales aparentemente, son sustancias que no desempeñan una función importante dentro de los procesos metabólicos esenciales de la misma<sup>6</sup>. Sin embargo, en el género *Artemisia* L. desempeñan una función de protección o defensa para la preservación del género<sup>6-7</sup>.

---

<sup>(1)</sup> Según la OMS, las plantas medicinales son aquellas que introducidas o puestas en contacto con un organismo humano o animal, desarrollan en éste un beneficio terapéutico con el menor número de inconvenientes<sup>2</sup>.

Los metabolitos secundarios más importantes del género *Artemisia* L. son las lactonas sesquiterpénicas quienes, además de ser los marcadores taxonómicos del mismo, se ha encontrado que presentan una diversidad de actividades biológicas que podrían llegar a tener alguna aplicación farmacológica en medicina<sup>6-7</sup>.

De ahí la importancia del estudio de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, planta muy apreciada en la medicina tradicional mexicana. Se le conoce comúnmente como *estafiate*<sup>8</sup>, y se le han atribuido varias actividades terapéuticas -antihelmíntico, antipirético, contra la disentería y el vómito, etc.<sup>9-11</sup>; lo que hace de este vegetal un objeto de estudio muy interesante, por su posible potencialidad como fuente de moléculas con actividad terapéutica.

**Fundamentación teórica.**

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

### A. GENERALIDADES SOBRE EL GÉNERO *Artemisia* L.

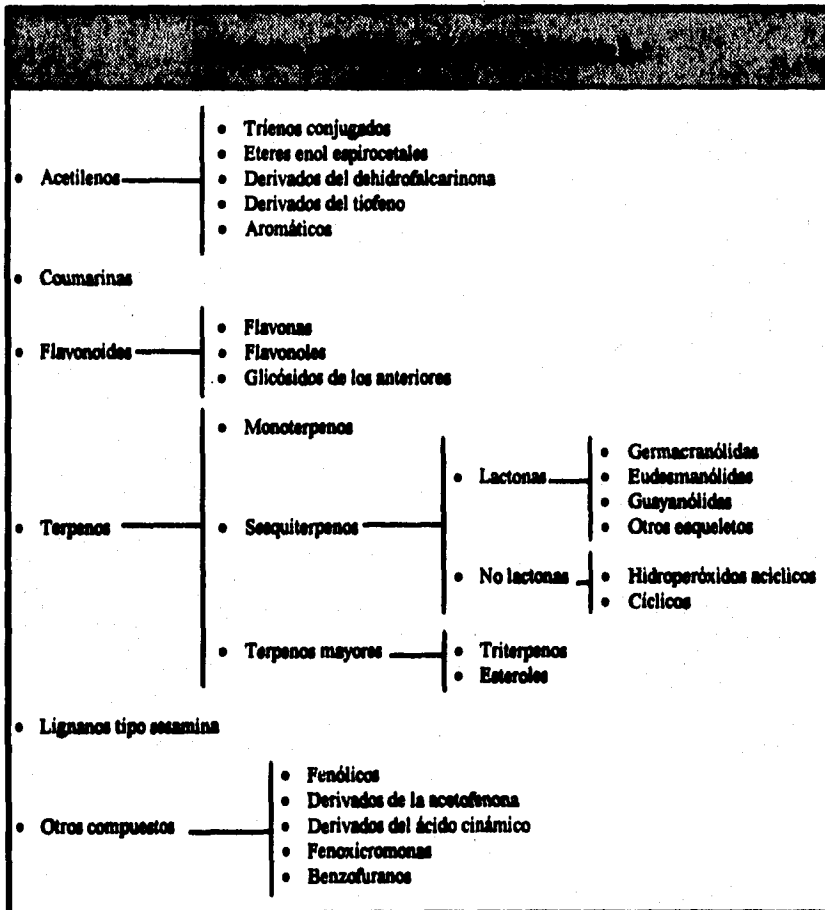
*Artemisia* L. es un género cosmopolita, el cual se localiza predominantemente en las regiones septentrionales del mundo como Norteamérica, Europa, Asia y Norte de África, y se extiende hacia el Sur hasta los trópicos donde existe una precipitación pluvial anual de 0-50 centímetros cúbicos<sup>12,13</sup>. Perteneció a la familia *Compositae* (*Asteraceae*) que comprende cerca de 1000 géneros y 20,000 especies divididas en 13 tribus. Dentro de esta familia, *Artemisia* L. está incluida en la tribu *Anthemideae* y comprende por sí misma un número variable de especies<sup>12</sup>, el cual oscila entre 200 y 400, de acuerdo con diferentes autores<sup>12,14</sup>.

El género *Artemisia* L. es fuente de una cantidad considerable de productos nuevos e interesantes, con diferentes tipos de estructuras (Cuadro I, Figura 1), muchos de los cuales no han sido encontrados en otros géneros; donde los metabolitos secundarios más interesantes son las lactonas sesquiterpénicas, muchas veces consideradas como los principales marcadores taxonómicos de este género<sup>12</sup>.

Varios sistemas de subclasificación han sido propuestos, el más frecuentemente utilizado es el de Besser y DeCandolle<sup>13</sup>; en el cual se divide al género *Artemisia* L. en cuatro subgéneros: *Abrotanum*, *Absinthium*, *Dracunculus* y *Seriphidium*<sup>12-15</sup>. Poljakov combina los subgéneros *Abrotanum* y *Absinthium* para formar un sólo subgénero denominado *Artemisia*<sup>13,15</sup>, y Rydberg adiciona un nuevo subgénero, denominado *Tridentatae*, creado por la segregación de una parte de las especies americanas del subgénero *Seriphidium*<sup>12-13</sup>.

<sup>12</sup> Muchas de las especies son probablemente sinónimos, es decir, varios nombres pueden corresponder a la misma entidad vegetal<sup>12</sup>.

<sup>13</sup> El sistema de subclasificación se basa en las diferencias morfológicas de la estructura floral<sup>13</sup>.



Cuadro I. Principales tipos de metabolitos secundarios encontrados en diferentes especies del género *Artemisia* L.<sup>12</sup>.



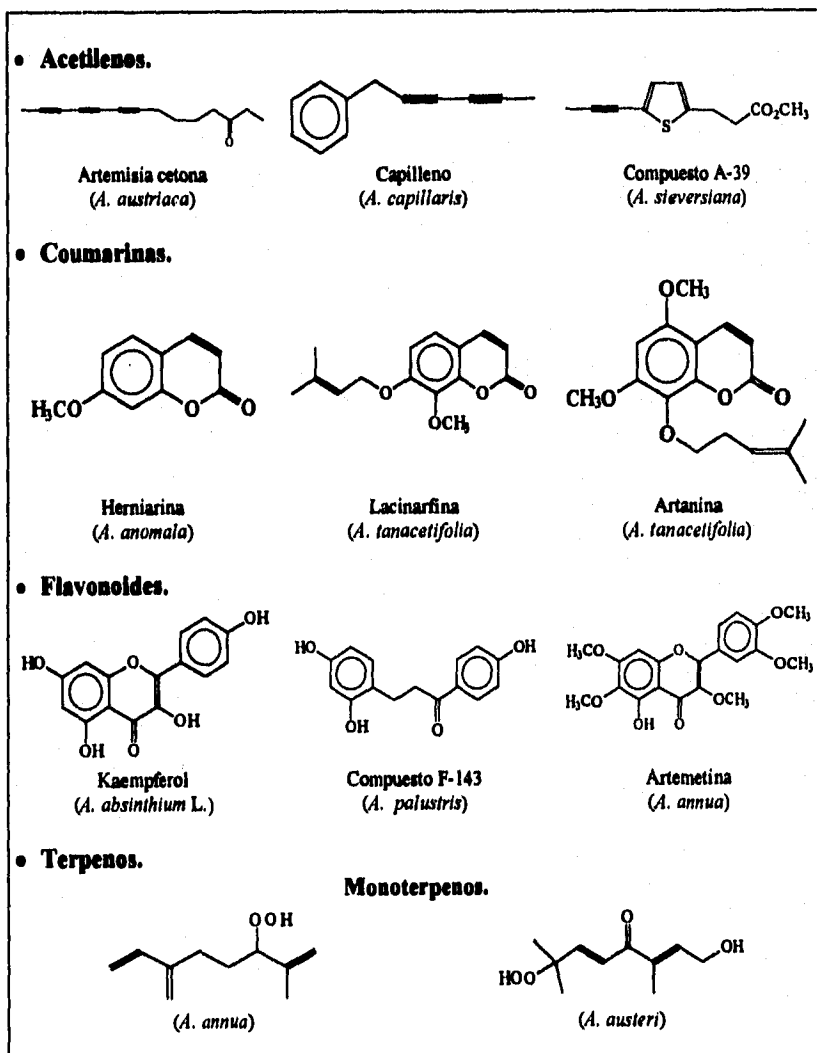


Figura I. Ejemplos de metabolitos secundarios encontrados en diferentes especies de *Artemisia*<sup>12</sup>.

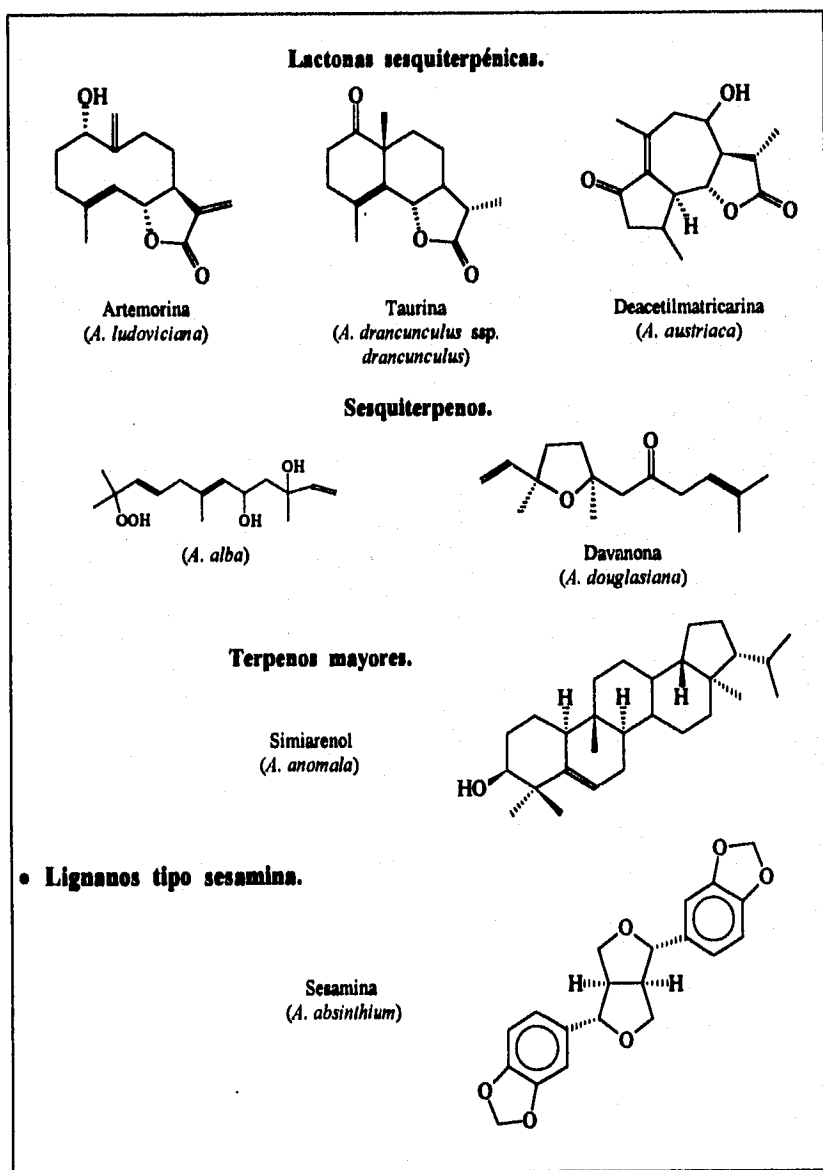


Figura I. (Continuación).

## • Otros compuestos.

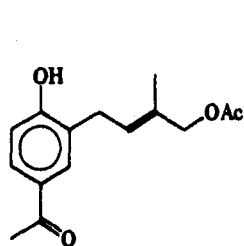
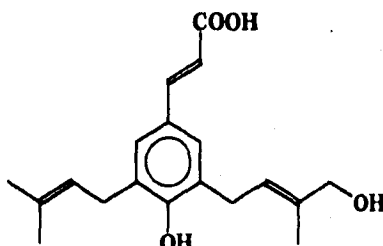
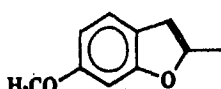
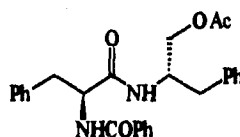
*(A. campestris)**(A. capillaris)**(A. absinthium)*Acetato de Aurantiumida  
*(A. anomala)*

Figura I. (Continuación).

A.1. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Artemisia* L.

El género *Artemisia* L. consiste en aproximadamente 400 especies, muchas de las cuales presentan una potente actividad biológica, y sólo de algunas de ellas se han aislado las sustancias responsables de dicha actividad<sup>7</sup>.

Este género, además de tener una aplicación en la medicina tradicional, ha sido fuente de: especias, saborizantes, repelentes de insectos y fragancias<sup>7</sup>. Actualmente, se están estudiando intensamente diversas especies de *Artemisia* para determinar su potencial como fuente de sustancias biológicamente activas.

En el Cuadro II, se enlistan las actividades biológicas encontradas hasta ahora de diversas especies del género *Artemisia*; cabe señalar que las actividades biológicas se

determinaron en algunos casos en los extractos crudos, así como en las sustancias puras aisladas de los mismos

Actividades biológicas de diversas especies del género <i>Artemisia</i> L.	
Actividad biológica	Especies
Antimalárica	<i>Artemisia annua</i> <i>Artemisia abrotanum</i>
Antitumoral y citotóxica	<i>Artemisia cana</i> <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Artemisia douglasiana</i> <i>Artemisia ludoviciana</i> <i>Artemisia canariensis</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Artemisia xanthocroa</i> <i>Artemisia sieversiana</i>
Incremento del flujo biliar	<i>Artemisia capillaris</i> <i>Artemisia scoparia</i>
Insecticida	<i>Artemisia vulgaris</i> <i>Artemisia monosperma</i> <i>Artemisia kurramensis</i> <i>Artemisia vachanica</i> <i>Artemisia courifolia</i> <i>Artemisia capillaris</i>
Antimicrobiana	<i>Artemisia sublessingiana</i> <i>Artemisia herbalba</i> <i>Artemisia nilagirica</i> <i>Artemisia pallens</i> <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Artemisia parviflora</i> <i>Artemisia vestita</i> <i>Artemisia coerulescens</i> <i>Artemisia haplaphila</i> <i>Artemisia maritima</i> <i>Artemisia moorcruftiana</i> <i>Artemisia roxburghiana</i>

Cuadro II. Actividades biológicas reconocidas de algunas especies del género *Artemisia* L.<sup>16-18</sup>

Actividad biológica	Especies
Antihepatotóxica	<i>Artemisia capillaris</i>
Hipotensiva	<i>Artemisia scoparia</i>
Antihelmíntica	<i>Artemisia capillaris</i> <i>Artemisia sieversiana</i>
Antidiabética	<i>Artemisia abyssinica</i> <i>Artemisia herbalba</i>
Antiadherente	<i>Artemisia capillaris</i>
Anticoagulante	<i>Artemisia herbalba</i>
Anticonvulsinante	<i>Artemisia vulgaris</i>
Antipirética	<i>Artemisia absinthium</i> <i>Artemisia coerulesens</i>
Fitotóxica	<i>Artemisia annua</i> <i>Artemisia vulgaris</i>
Analgésica	<i>Artemisia capillaris</i>
Relajante del músculo liso	<i>Artemisia absinthium</i>
Estimulación de la germinación	<i>Artemisia parviflora</i>
Cambio de la permeabilidad capilar	<i>Artemisia paniculata</i>
Antiinflamatoria	<i>Artemisia capillaris</i>

Cuadro II. (Continuación).

**B. GENERALIDADES SOBRE *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.**

En México existen 16 especies de *Artemisia* distribuidas en la región norte del mismo<sup>19</sup> (Cuadro III). Entre éstas destaca *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*<sup>(4)</sup> especie vegetal muy apreciada en la medicina tradicional mexicana; la cual se desarrolla principalmente en las regiones templadas de nuestro país, donde es conocido como estafiate; aunque también se le ha nombrado como iztauhyatl, sal amarga, ajeno del país, artemisa, estayate e istafiate. Su descripción morfológica y su forma de uso en la Medicina Tradicional se encuentra bien detallada en la literatura<sup>8,11,20</sup>.

<b>Especies de <i>Artemisia</i> mexicana.</b>	
Especie	Localidad
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Michoacán
<i>Artemisia albula</i> Wooten	Coahuila
<i>Artemisia drancunculoides</i> Pursh	Chihuahua, Baja California
<i>Artemisia filifolia</i> Torr	Chihuahua
<i>Artemisia frigida</i> Willd	Nuevo León
<i>Artemisia franservides</i> Greene	Chihuahua, Sonora
<i>Artemisia graphaloides</i>	Chihuahua
<i>Artemisia heterophylla</i> Nutt	Baja California
<i>Artemisia klotzschiana</i> Bess	Hidalgo
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>albula</i>	Baja California
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Distrito Federal
<i>Artemisia mexicana</i> var. <i>angustifolia</i>	Hidalgo
<i>Artemisia palmeri</i> (A. Gray)	Baja California
<i>Artemisia redolens</i> Gray	Chihuahua
<i>Artemisia tridentata</i> Nutt	Baja California Norte
<i>Artemisia tridentata angustifolia</i> Gray	Baja California Norte

**Cuadro III.** Especies del género *Artemisia* que se encuentran distribuidas en México<sup>19</sup>.

<sup>(4)</sup> Son sinónimos *Artemisia mexicana mexicana*, *Artemisia mexicana* Willd, *Artemisia ludoviciana* Nuttall ssp. *mexicana* (Willd) Keck.

**B.1. USOS MEDICINALES DE *Artemisia ludoviciana* SSP. *mexicana*.**

*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* es una planta nativa de México<sup>8</sup> y es una de las especies con mayor difusión, siendo su uso igualmente compartido y coincidente en todas las regiones donde se localiza, se emplea principalmente en el tratamiento de padecimientos digestivos<sup>4</sup>. Además se le han atribuido a través del tiempo, una serie de propiedades curativas o terapéuticas, muchas de las cuales no han sido comprobadas científicamente; debido a que los estudios realizados hasta ahora se han centrado principalmente al conocimiento de la estructura molecular de sus metabolitos secundarios<sup>11,19</sup>.

En el Cuadro IV, se muestran las propiedades curativas atribuidas a esta planta desde el tiempo de los Aztecas<sup>51</sup> hasta nuestros días.

Usos de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> a través del tiempo.				
Dolencia, enfermedad o uso.	Usos Aztecas	Usos no Aztecas <sup>8</sup>	Usos coloniales	Usos modernos
• Fiebre acuática	✓		✓	
• Fiebre y exceso de flemas	✓			
• Demencia	✓			
• Epilepsia	✓		✓	
• Males debidos a opresión del corazón	✓			
• Gota, parálisis y entumecimiento	✓		✓	
• Recaídas	✓			
• Escupimiento de sangre	✓			
• Diurético	✓			
• Hinchazones y ampollas	✓	✓		
• Dolores por frío	✓		✓	✓

Cuadro IV. Propiedades curativas atribuidas a *Artemisia ludoviciana* a través del tiempo<sup>4,8,11,20-21</sup>.

<sup>51</sup> Esta planta conocida como *Iztauhyatl* por los Aztecas, era utilizada también en una serie de ritos dedicados al dios Tláloc, que según ellos, era el causante de los males -enfermedades- curados por el *Iztauhyatl*<sup>21</sup>.

Dolencia, enfermedad o uso.	Usos Aztecas	Usos no Aztecas*	Usos coloniales	Usos modernos
• Tos y nariz seca	✓		✓	✓
• Empacho y cólico	✓		✓	✓
• Edema			✓	
• Obstrucción del riñón			✓	
• Vómito		✓	✓	✓
• Parasitosis		✓	✓	✓
• Purgativo			✓	
• Provocación de la menstruación		✓	✓	
• Reumatismo		✓	✓	✓
• Expulsión de flemas		✓	✓	
• Susto				✓
• Diarrea				✓
• Parálisis más reumatismo				✓
• Sordera		✓		
• Disenteria		✓		✓
• Obstrucción del hígado		✓		
• Tratamiento de heridas		✓		
• Dolor intestinal		✓		
• Rabia		✓		
• Escorbuto		✓		
• Inflamación de genitales		✓		
• Obstrucción del bazo		✓		
• Dolores del pecho		✓		
• Modificador de la sensibilidad				✓
• Aperitivo				✓

\* Estos usos no tienen un origen definido y presumiblemente provengan de la medicina galénica<sup>21</sup>.

Cuadro IV. (Continuación).

Al final de los años 80 y principios de los 90, y a raíz de la determinación de la estructura del *Qinghaosu*<sup>[6]</sup> -metabolito secundario aislado de *Artemisia annua* L.<sup>[7]</sup>, el cual demostró tener una gran actividad antimalárica, surgió en nuestro país un gran interés por el

[6] Recibe también los nombres de Qing hau sau, Arteannuina y Artemisinina, fue aislada en 1972 y su estructura fue determinada en 1979. Su índice terapéutico es mayor que el de la Cloroquina frente a *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*<sup>22-24</sup>.

[7] Planta autóctona de China, utilizada por siglos como antimalárica en la medicina tradicional de ese país<sup>22</sup>.



estudio químico y farmacológico de *Artemisia ludoviciana*, con la finalidad de determinar su potencialidad como una posible fuente de agentes antimaláricos<sup>22-25</sup>.

Los resultados de estos estudios demostraron que el extracto diclorometánico de *Artemisia ludoviciana* presentaba una ligera actividad antimalárica<sup>26</sup>; mientras que el extracto etanólico demostró, en pruebas *in vitro*, poseer una actividad antimalárica similar al Qinghaosu<sup>27</sup>. Sin embargo, no se detectó la presencia de dicha sustancia, por lo que se cree que es(son) otra(s) la(s) sustancia(s) responsable(s) de dicha acción<sup>19</sup>.

Como se indica más adelante, algunas sustancias aisladas de dicha especie han presentado actividad antimalárica, pero aún muy lejos de la mostrada por el Qinghaosu<sup>19</sup>.

Por lo anterior, se puede atribuirle a *Artemisia ludoviciana* una propiedad farmacológica adicional a las ya enlistadas en el Cuadro IV; la cual radica en su potencialidad como posible fuente de agentes antimaláricos.

## **B.2. CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE *Artemisia ludoviciana* SSP. *mexicana*.**

En estudios químicos previos de *Artemisia ludoviciana*, se ha informado el aislamiento de una gran diversidad de sustancias, los cuales presentan estructuras químicas interesantes y novedosas dentro de la química de los productos naturales; que permitirán en un futuro establecer definitivamente sus relaciones taxonómicas<sup>18</sup> a nivel de género, especie y familia.

En el Cuadro V, se enlistan los extractos y las sustancias químicas aisladas hasta el momento de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

---

<sup>18</sup> El objetivo de la clasificación taxonómica es la construcción de un arreglo que refleje las relaciones de evolución entre los grupos estudiados, siendo en algunas ocasiones fundamental los caracteres químicos del vegetal<sup>14</sup>.

Sustancias aisladas hasta el momento de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> .					
Sustancia	Estructura	Extracto	Lugar de colecta	Tipo	Ref.
Estafiatina	1	CHCl <sub>3</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 28, 34
Douglasina	2	CHCl <sub>3</sub>	Arizona	Lactona	19, 29, 33
Ludovicina A	3	CHCl <sub>3</sub>	Arizona	Lactona	18, 29, 33
Ludovicina B	4	CHCl <sub>3</sub>	Arizona	Lactona	29
Ludovicina C	5	CHCl <sub>3</sub>	Arizona	Lactona	29
Armexina	6	EtOH	México, D.F.	Lactona	19, 30
Artemorina	7	CHCl <sub>3</sub>	México, D.F.	Lactona	30, 33
Diacetilmatricarina	8	CHCl <sub>3</sub>	Nuevo León	Lactona	31
Achillina	9	Eter de petróleo ligero	Nuevo León	Lactona	19, 31
Aicanfor	10	Destilación	Nuevo León	Monoterpeno	31
Borneol	11	Destilación	Nuevo León	Monoterpeno	31
Felandreno	12	Destilación	Nuevo León	Monoterpeno	31
$\alpha$ -Pino	13	Destilación	Nuevo León	Monoterpeno	31
Vainillina	14	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	-	32
Naringenina	15	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Flavonoide	32
Ridentina B	16	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
Rupicolina A	17	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
Rupicolina B	18	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
Rupina A	19	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	20	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	21	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	22	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	23	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	24	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32

Cuadro V. Metabolitos secundarios aislados hasta el momento de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

Sustancia	Estructura	Extracto	Lugar de colecta	Tipo	Ref.
-	25	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	26	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	27	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	28	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	29	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	30	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	31	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	32	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	33	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	34	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	35	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	36	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	37	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	38	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	39	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	40	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	41	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	42	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Lactona	32
-	43	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Deriv. Janona	32
-	44	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Deriv. Janona	32
-	45	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Monoterpeno	32
-	46	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Monoterpeno	32
-	47	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Monoterpeno	32
-	48	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Monoterpeno	32
-	49	MeOH/Et <sub>2</sub> O/EP	Texas	Monoterpeno	32
β-Sitosterol	50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Esterol	19, 33
Estigmasterol	51	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Esterol	19

Cuadro V. (Continuación).

Sustancia	Estructura	Extracto	Lugar de colecta	Tipo	Ref.
1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Dihidroarbusculina	52	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Santamarina	53	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Arglanina	54	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33, 34
Crisartemina B	55	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Arnefolina	56	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Ridentina	57	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Eupatilina	58	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Flavonoide	19, 33
Jaceosidina	59	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Flavonoide	19, 33
3 $\alpha$ -Hidroxiireynosina	60	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	19, 33
Crisartemina A	61	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	México, D.F.	Lactona	34

Cuadro V. (Continuación).

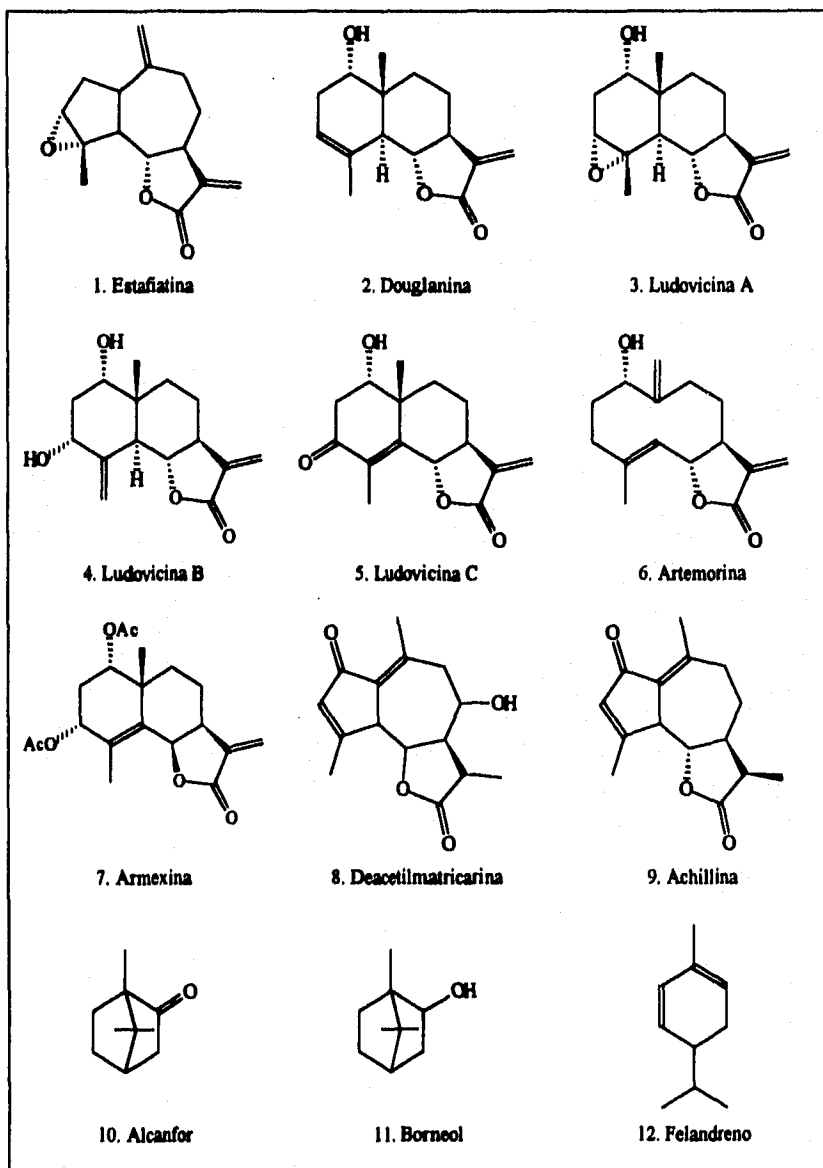


Figura II. Metabolitos secundarios aislados hasta el momento de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

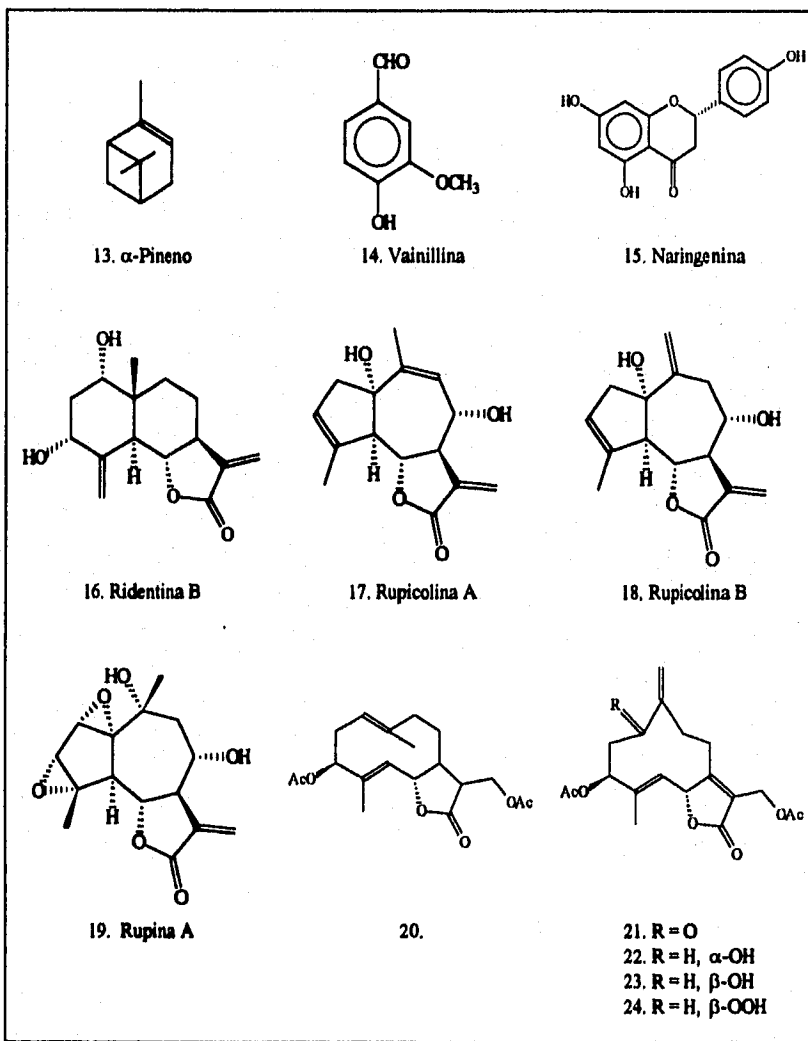


Figura II. (Continuación).

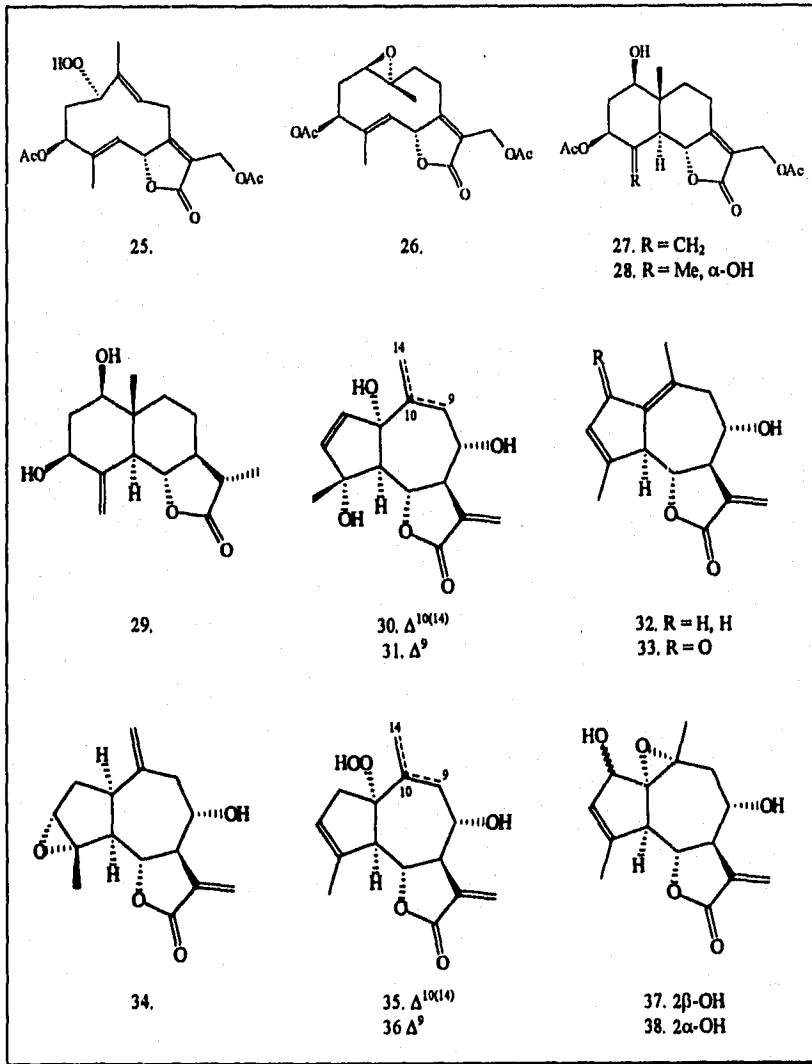


Figura II. (Continuación).

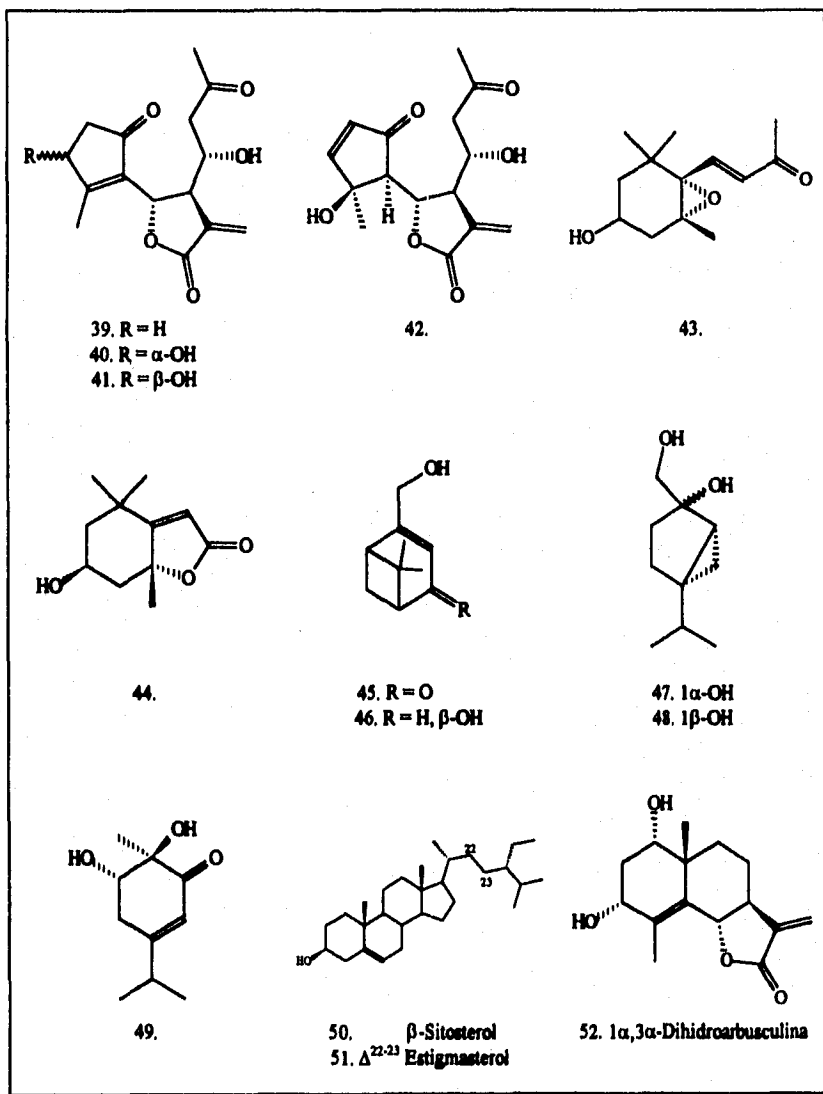


Figura II. (Continuación).



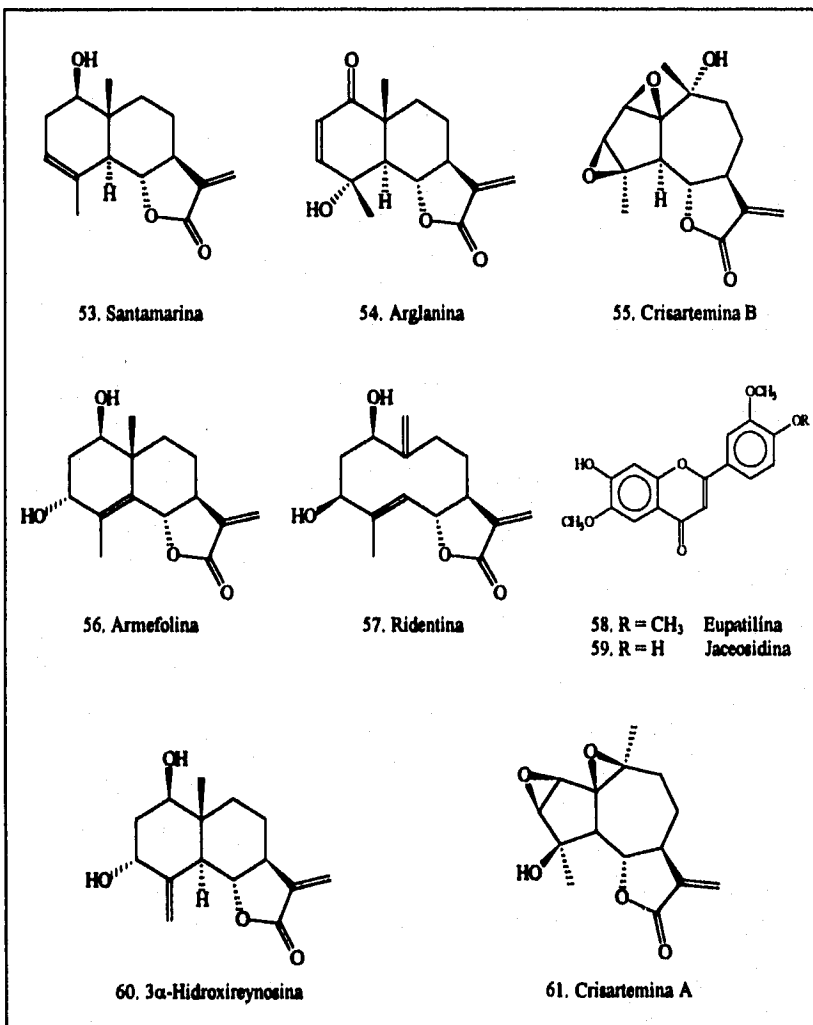


Figura II. (Continuación).

### C. GENERALIDADES SOBRE LAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS.

Las lactonas sesquiterpénicas son productos naturales con quince átomos de carbono, formados por la unión de tres unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno)<sup>35-36</sup>, son incoloras, de sabor amargo y relativamente estables. Sus constituyentes son biogenéticamente derivados del *trans,trans*-farnesilpirofosfato y su biosíntesis se encuentra bien detallada en la literatura<sup>37-38</sup>.

Las lactonas sesquiterpénicas presentan una distribución botánica bastante esporádica<sup>19</sup>, y la gran mayoría se localiza en una sola familia: *Compositae*<sup>39</sup>. En esta familia, y principalmente en el género *Artemisia* L., son considerados como los principales marcadores quimiotaxonómicos<sup>12</sup>.

La clasificación de las lactonas sesquiterpénicas, de acuerdo a sus esqueletos carbocíclicos, ha dado no más de 30-35 tipos de esqueletos, pero la gran mayoría de ellas se encuentra dentro de uno de los cuatro grupos principales: germacranólidas (con un anillo de 10 miembros), eudesmanólidas (compuestos 6/6-bicíclicos), guayanólidas y pseudoguayanólidas (ambas, compuestos 5/7-bicíclicos)<sup>12,40</sup>. En la figura III, se muestran dichos esqueletos.

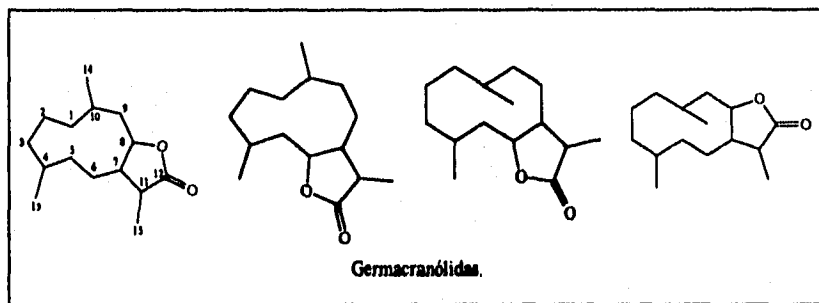


Figura III. Principales esqueletos carbocíclicos presentes en las lactonas sesquiterpénicas<sup>12,40</sup>.

<sup>19</sup> Se ha reportado que se encuentran, esporádicamente, en géneros de las familias *Umbelliferae*, *Magnoliaceae*, *Lauraceae*, *Winteraceae*, *Illiciaceae*, *Aristolochiaceae*, *Menispermaceae* y *Acanthaceae*<sup>37</sup>.

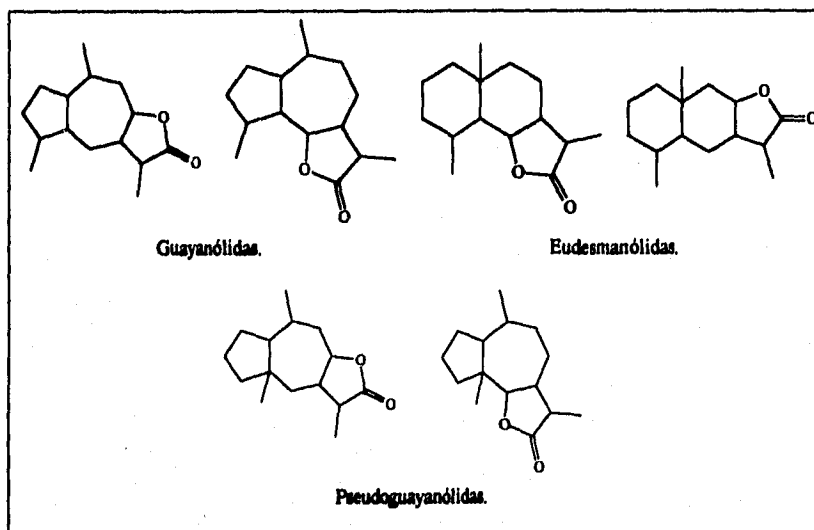
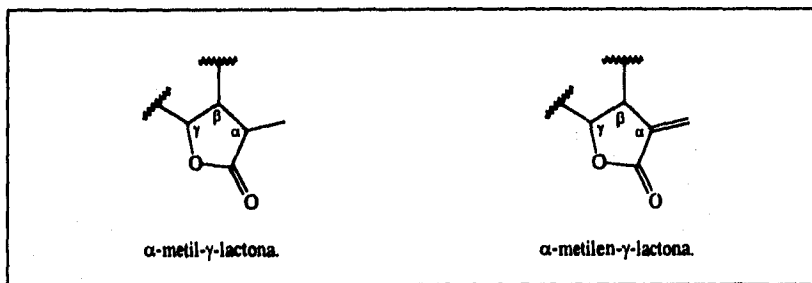


Figura III. (Continuación).

Una característica importante, y común, de las lactonas sesquiterpénicas es la presencia de un anillo  $\gamma$ -lactona (cerrado hacia el C-6 ó C-8), presentando en muchos casos un grupo  $\alpha$ -metileno (Figura IV). Entre otras modificaciones, la incorporación de grupos hidroxilos o grupos hidroxilos esterificados son comunes. Pocas lactonas sesquiterpénicas se encuentran en forma glicosídica y algunas incorporan en su estructura base átomos de halógenos o azufre<sup>40</sup>.

Figura IV. Anillos  $\alpha$ -metil- $\gamma$ -lactona y  $\alpha$ -metilén- $\gamma$ -lactona.

La mayoría de las lactonas sesquiterpénicas aisladas de la familia *Asteraceae*, han sido aisladas de los vástagos de la planta (principalmente de las hojas y de las cabezuelas de las flores), donde pueden constituir arriba del 5% del peso seco. Las raíces usualmente no contienen, o en muy poca cantidad, lactonas sesquiterpénicas<sup>40</sup>.

La gran diversidad de estructuras químicas que presentan, va acompañada de un espectro amplio de actividades biológicas; esto ha hecho que las investigaciones sobre las relaciones estructura-actividad de las lactonas sesquiterpénicas se incrementen en número. De ahí que los resultados de dichas investigaciones se tornan muy interesantes y atractivos para aquellos grupos de investigación en el área de los productos naturales<sup>40</sup>. En el Cuadro VI, se presentan algunas lactonas sesquiterpénicas con su correspondiente actividad biológica.

Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas.				
Lactona sesquiterpénica	Fuente vegetal	Estructura	Actividad biológica*	Ref.
Bakkenólida A	<i>Petasis albus</i>	62	A	37, 40
Helenalina	<i>Helenium autumnale</i>	63	A, B, H	37, 40, 41
Partenina	<i>Parthenium hysterophorus</i>	64	A, C, H, K	40, 42
Xantatrina	<i>Xanthium pennsylvanicum</i>	65	B, C	40
Mikanólida	<i>Mikania monogasensis</i>	66	B, C	40
Cnicina	<i>Cnicus benedictus</i>	67	B	40
Pseudovalina	<i>Inula</i> sp.	68	C	40
Partenólida	<i>Tanacetum vulgare</i>	69	B	40
Saurina	<i>Saussurea</i> sp.	-	D	40
Sauripina	<i>Saussurea</i> sp.	-	D	40
Qinghaosu	<i>Artemisia annua</i>	70	E	22, 40

Cuadro VI. Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas y su respectiva fuente vegetal.

Lactona sesquiterpénica	Fuente vegetal	Estructura	Actividad biológica*	Ref.
Eremantina	<i>Eremanthus elaeagnus</i>	-	F	37
Constunólida	<i>Eremanthus elaeagnus</i>	71	F, K	37
Alantolactona	<i>Inula helenium</i>	72	C, G, H, Ib, Ic, K	40, 42
Isoalantolactona	<i>Inula helenium</i>	73	C, H, Ib, Ic	40, 42
$\alpha$ -Santonina	<i>Artemisia</i> sp.	74	G, H	37, 40
Canina	<i>Artemisia cana</i>	75	H	37, 40
Coronopilina	<i>Iva xanthifolia</i>	76	C, H, J	40, 41, 42
Inulicina	<i>Inula japonica</i>	77	Ia	40
Amaralina	<i>Helenium amarum</i>	78	Id	40
Enhidrina	<i>Enhydra fluctuans</i>	79	Ic	40
Damaina	<i>Pennisetum hysterophorus</i>	80	Ie	40
Ridentina	<i>Artemisia</i> sp.	57	A, E	19, 37
Arteglasina A	<i>Artemisia douglasiana</i>	81	A, K	37
Vulgarina	<i>Artemisia vulgaris</i>	82	A	37
Ludovicina A	<i>Artemisia ludoviciana</i>	3	A, E	19, 37
Arbusculina A	<i>Artemisia tridentata</i>	83	J	37
Achillina	<i>Artemisia tridentata</i> <i>Artemisia ludoviciana</i>	9	J, E	19, 37
Deacetilmatricarina	<i>Artemisia tridentata</i>	8	J	37
Arglanina	<i>Artemisia ludoviciana</i>	54	E	19
Santamarina	<i>Artemisia ludoviciana</i>	53	E	19
Arnefolina	<i>Artemisia ludoviciana</i>	56	E	19
Estafiatina	<i>Artemisia ludoviciana</i>	1	E	19
Crisartemina B	<i>Artemisia ludoviciana</i>	55	E	19

## \* Actividades biológicas:

- |  |                              |
|--|------------------------------|
| A. Actividad citotóxica y antitumoral. | I. Actividad farmacológica:  |
| B. Actividad antibacterial.            | a. Estimulante del SNC.      |
| C. Actividad antimicótica.             | b. Expectorante.             |
| D. Actividad amebicida.                | c. Hipotensiva.              |
| E. Actividad antimalárica.             | d. Analgésica.               |
| F. Actividad antieschistosomíca.       | e. Anticolinérgica.          |
| G. Actividad antihelmíntica.           | J. Efecto tóxico en plantas. |
| H. Actividad insecticida.              | K. Dermatitis en humanos.    |

Cuadro VI. (Continuación).

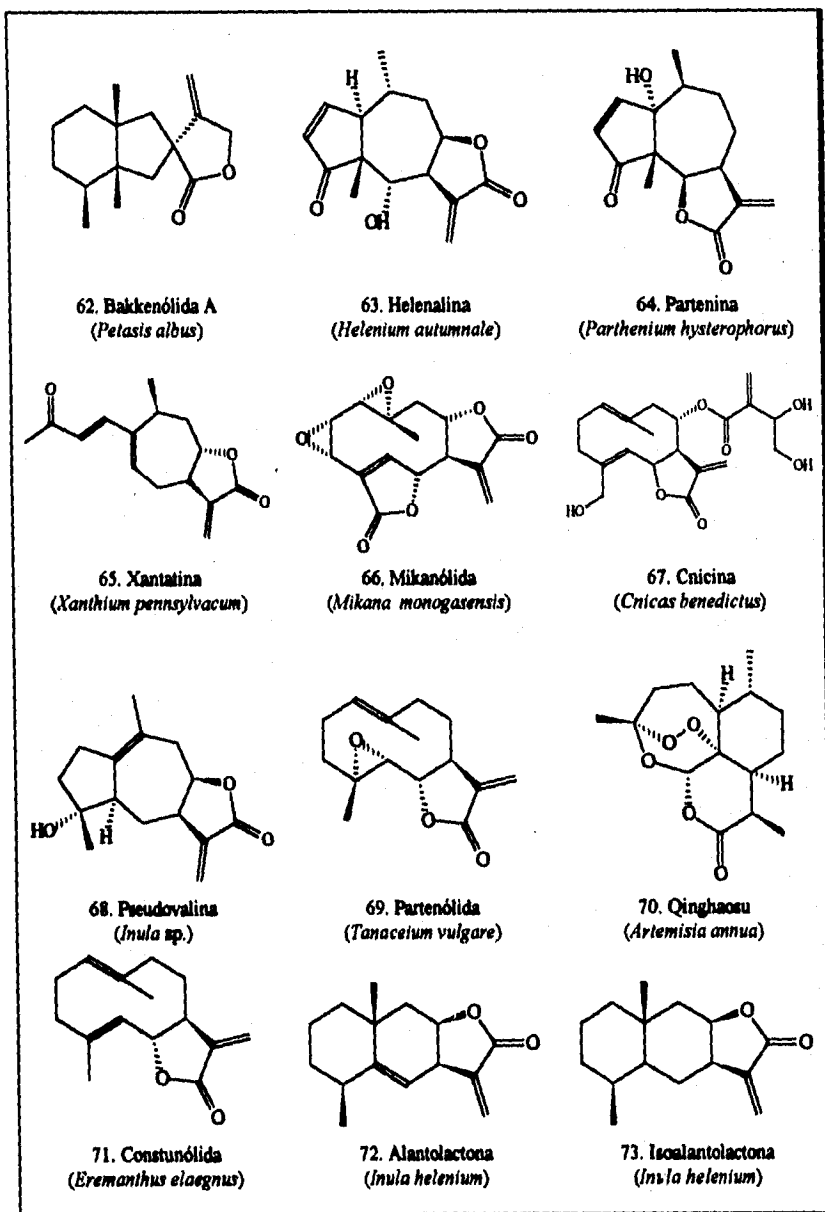


Figura V. Estructuras de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica.

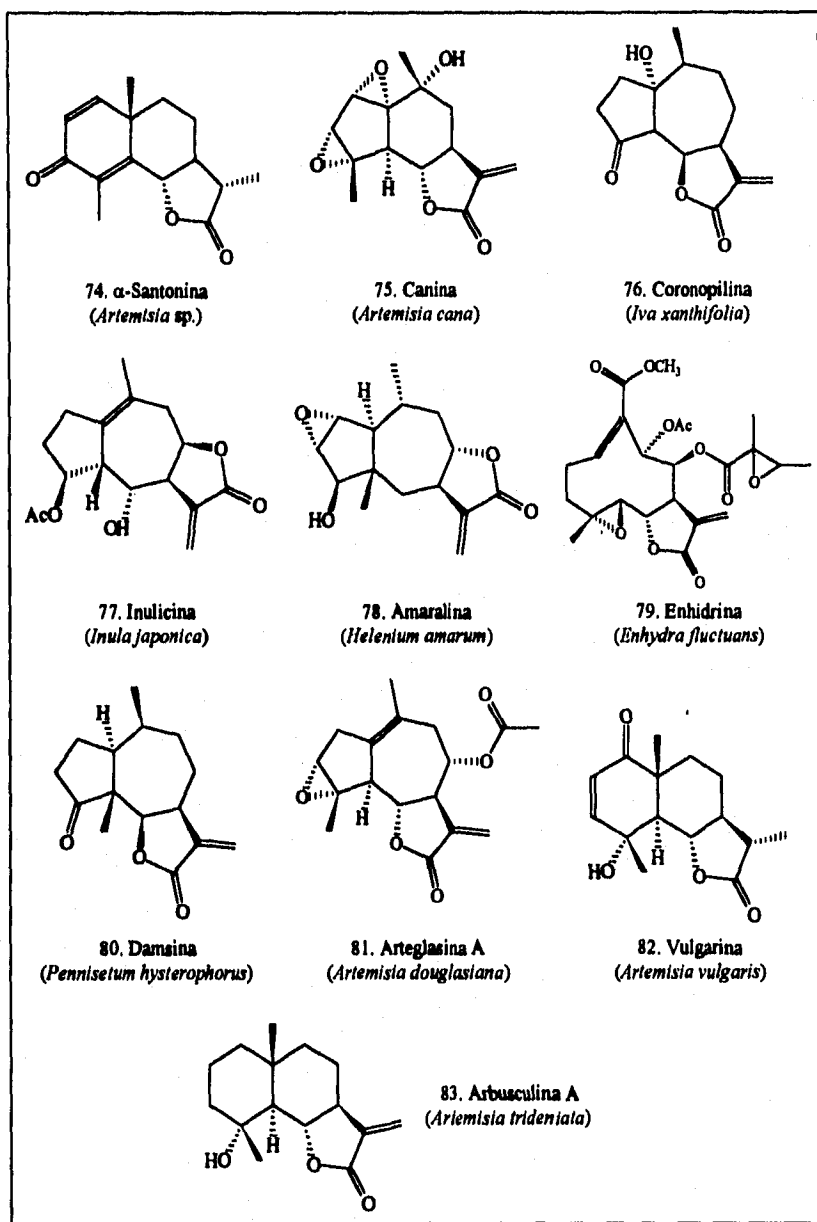


Figura V. (Continuación).

Estas actividades biológicas son generalmente el resultado de la reacción de las lactonas sesquiterpénicas con los grupos tioles de compuestos de vital importancia, tales como las enzimas. Cabe señalar que los estudios realizados hasta el momento sobre las estructuras químicas y la actividad biológica de dichos compuestos no han permitido llegar a una generalización sobre la relación estructura-actividad. Esto se debe a que existen otros grupos funcionales en la molécula, además del grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona del cual se sospecha que es responsable de muchas de las actividades de la lactona<sup>[10]</sup>. Asimismo, deben de ser consideradas las diferencias fisiológicas y bioquímicas de los organismos que son utilizados en dichas investigaciones<sup>37</sup>.

---

[10] Grupos funcionales tales como epóxidos, hidroxilos, clorhídrinas, cetonas insaturadas u O-acilos adyacentes a la  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona<sup>37</sup>.



#### D. GENERALIDADES SOBRE LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Muchos productos naturales novedosos son aislados, caracterizados, y publicados sin haberseles realizado alguna prueba biológica. De esta manera, las actividades biológicas de los productos naturales pueden permanecer desconocidas por muchos años. Sin el informe de su evaluación biológica, el descubrimiento de nuevos constituyentes de plantas medicinales es nada más que pura fitoquímica. Por lo que hay una necesidad real de realizar bioensayos generales, que puedan detectar un amplio espectro de actividades farmacológicas<sup>43</sup>.

Un ensayo biológico o *bioensayo* es un experimento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material o sustancia, que involucra un *estimulo* (por ejemplo, una vitamina, una hormona, un fungicida) aplicado a un *sujeto* (por ejemplo, un animal, un tejido animal, una planta, un cultivo bacteriano). La respuesta al estímulo puede ser variada, generalmente de acuerdo con un plan hecho por el investigador. Esta medida o *dosis* dada al sujeto puede ser evaluada como función del peso, volumen, o concentración. La respuesta del sujeto es una medida del valor final de alguna característica del sujeto (peso corporal, peso del riñón) o del cambio de una característica particular (incremento en el peso corporal, disminución de la presión sanguínea), puede ser un simple registro de la ocurrencia o no de un fenómeno (recuperación de la salud, muerte, contracción muscular). La magnitud o la frecuencia de la respuesta depende siempre de la dosis dada<sup>44</sup>.

A continuación se tratarán brevemente dos bioensayos que por su utilidad y sencillez, tienen una aplicación importante en el estudio de las plantas medicinales.

### D.1 BIOENSAYO DE LETALIDAD EN *Artemia salina* L.

La mayoría de los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos a dosis altas. Entonces, la letalidad *in vivo* en un simple organismo zoológico puede ser usada como un simple y rápido monitoreo durante la separación cromatográfica de extractos bioactivos de plantas. Una vez que se han aislado las sustancias bioactivas, una serie de bioensayos más específicos y sofisticados pueden ser empleados<sup>43</sup>.

Dentro de los bioensayos de toxicidad, los organismos invertebrados en especial los artrópodos acuáticos, han adquirido gran interés como organismos utilizados en pruebas de toxicidad. En los últimos años, la *Artemia salina* L. ha sido ampliamente utilizada en las pruebas de toxicidad a corto plazo<sup>43</sup>.

Con *Artemia salina* L., se ha desarrollado un método simple, donde los extractos de plantas, fracciones o compuestos puros pueden probarse para determinar su toxicidad<sup>43,45</sup>.

Como ejemplos de la utilidad de este bioensayo, se menciona el estudio de *Artemisia borealis*; donde su extracto diclorometánico mostró una fuerte toxicidad en *Artemia salina* ( $CL_{50} = 49 \mu\text{g/ml}$ ) y posteriormente se le determinaron al mismo propiedades fungicidas (frente a *Cladosporium cocumerinum*) y larvicidas (frente a *Aedes aegypti*<sup>(11)</sup>)<sup>46</sup>. Asimismo, un número de compuestos bioactivos conocidos fueron probados con este método y los resultados demostraron la gran utilidad general del bioensayo con compuestos de diversa estructura y mecanismo de acción<sup>43</sup> (Cuadro VII).

---

<sup>(11)</sup> Vector principal de la fiebre amarilla.

<b>Bioensayo en <i>Artemia salina</i> L. de compuestos bioactivos conocidos.</b>	
<b>Compuesto natural</b>	<b>LC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Podofilotoxina	2.4
Cloruro de berberina	22.5
Sulfato de estricnina	77.2
Digitalina	215
Sulfato de quinidina	215
Sulfato de efedrina	215
Estrofantina	215
Arbutina	275
Cafeína	306
Sulfato de atropina	686
α-Santonina	> 1000
Timol	514

Cuadro VII. Bioensayo en *Artemia salina* L. de compuestos bioactivos conocidos<sup>43</sup>.

La información anterior apoya fuertemente el uso de dicho bioensayo para detectar un amplio espectro de actividades biológicas en sustancias o en extractos de plantas.

## D.2. ENSAYO ANTIMICROBIANO DE MITSCHER PARA EXTRACTOS DE PLANTAS Y PRODUCTOS NATURALES.

La actividad antimicrobiana de plantas puede ser detectada por observación de la inhibición del crecimiento de varios microorganismos, como respuesta al contacto con los tejidos vegetales o extractos de las mismas. Muchos métodos para detectar tal actividad se han desarrollado, pero no son igualmente sensibles o no se basan en el mismo principio, por lo tanto, los resultados obtenidos son también influenciados por el método seleccionado y por los microorganismos utilizados en el bioensayo<sup>48</sup>.

De varios ensayos antimicrobianos, el más conveniente para un laboratorio pequeño es el de estría y difusión en agar. En este método, una pequeña cantidad del extracto de planta o producto natural es mezclado con agar nutritivo y vaciado a una caja de Petri. Es muy difícil preparar extractos estériles de plantas sin el empleo del autoclave o de otras condiciones extremas. En el método de difusión en agar, la esterilidad del extracto no es necesaria. La mayor parte del extracto se encuentra bajo la superficie de agar, donde los organismos aeróbicos contaminantes no pueden desarrollarse bien. La contaminación ocasional del cultivo que se desarrolla en la superficie del agar no es un problema serio y es fácilmente reconocible<sup>49</sup>.

La concentración utilizada generalmente en la evaluación de extractos crudos de plantas es de 1000 µg/ml y el criterio utilizado para indicar actividad antimicrobiana en la prueba, es la inhibición del crecimiento de uno o más de los microorganismos<sup>49</sup>.

Este bioensayo ha sido utilizado para probar algunos compuestos con propiedades antibióticas conocidas y sustancias previamente aisladas de plantas, dando como resultado la comprobación de la actividad de las primeras y el descubrimiento de propiedades antimicrobianas en algunos productos naturales en los cuales, se ignoraba dicha propiedad. (Cuadro VIII).

Algunos productos naturales probados con el método de Mitscher	
Sustancia	Microorganismo Inhibido
Afinisina	1, 3, 4, 5, 6
Cloruro de berberina	1, 2, 4, 5, 6
Constunólida	5, 6
Doriafranina	1, 2, 3, 4, 5, 6
Solanidina	1, 4, 5, 6
Cimicina	-
Tabernatina	5

1. *Staphylococcus aureus*

2. *Escherichia coli*

3. *Salmonella gallinarum*

4. *Klebsiella pneumoniae*

5. *Mycobacterium smegmatis*

6. *Candida albicans*

Cuadro VIII. Algunos productos naturales probados con el método de Mitscher<sup>49</sup>.

Además, se probaron también extractos etanólicos de diversas especies vegetales (Cuadro IX).

Algunas especies vegetales probadas con el método de Mitscher.		
Vegetal	Parte	Microorganismo inhibido
<i>Amorpha fruticosa</i>	partes aéreas	1, 5
<i>Braselia Thunbergii</i>	vegetal íntegro	1, 3, 5
<i>Chrysanthemum anethifolium</i>	partes aéreas	1, 2, 3, 4, 5, 6,
<i>Croton capitatus</i>	partes aéreas	-
<i>Eupatorium maculatum</i>	partes aéreas	5
<i>Hunneimannia fumariifolia</i>	partes aéreas	1, 4, 5, 6
<i>Mirabilis nyctaginea</i>	raíz	6
<i>Mirabilis nyctaginea</i>	partes aéreas	1, 3, 4, 5, 6
<i>Phytolacca americana</i> L.	partes aéreas	5
<i>Ptelea trifoliata</i> L.	partes aéreas	1, 4, 5, 6
<i>Trifolium repens</i> L.	partes aéreas	1, 5, 6

1. *Staphylococcus aureus*    3. *Salmonella gallinarum*    5. *Mycobacterium smegmatis*  
 2. *Escherichia coli*        4. *Klebsiella pneumoniae*    6. *Candida albicans*

Cuadro IX. Extractos etanólicos de algunas especies vegetales probadas con el método de Mitscher<sup>49</sup>.

La información anterior confirma la gran utilidad del bioensayo para detectar actividades antimicrobianas, en sustancias puras y extractos de plantas independientemente del tipo estructural que presentes los principios activos.

**Planteamiento del problema.**

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

---

El género *Artemisia* ha sido objeto de numerosos estudios debido a que son fuente de una gran cantidad de sustancias -productos naturales-<sup>12</sup>.

Dichos estudios se han centrado especialmente al aislamiento y elucidación estructural de sus metabolitos secundarios, sin atender a las propiedades biológicas que poseen las sustancias o bien, la planta en general<sup>3</sup>.

*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, es un vegetal muy usado en la medicina tradicional mexicana para diversos padecimientos; además de que existen estudios muy recientes que muestran su posible potencialidad como agente antimalárico<sup>19</sup>.

Por lo tanto, el presente estudio va encaminado al aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, con la finalidad de evaluar su toxicidad en *Artemia salina* L. (CL<sub>50</sub>) y su potencialidad como agente antimicrobiano, tanto de las sustancias puras aisladas como de la especie vegetal en general.



**Objetivos.**

## OBJETIVOS.

---

### A. GENERALES.

- Realizar el estudio químico y biológico del extracto etanólico de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, con la finalidad de aislar, purificar e identificar sus metabolitos secundarios mayoritarios; a los cuales, se les evaluará su toxicidad en *Artemia salina* L. y sus propiedades antimicrobianas frente a diferentes microorganismos de prueba.

### B. ESPECÍFICOS.

- Colectar el material vegetal, *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, en los alrededores del poblado de San Rafael, Tlalmanalco en el Estado de México.
- Preparar los diferentes extractos crudos, por medio de extracciones sólido-líquido, empleando disolventes de diferente polaridad.
- Separar y purificar los constituyentes mayoritarios presentes en el extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, aplicando para ello las diferentes técnicas de separación y purificación convencional con base a una estrategia de separación diseñada de acuerdo a las propiedades de cada extracto que permita obtener una cantidad de sustancias mayor.
- Aplicar las técnicas espectrométricas y espectroscópicas, así como la determinación de sus propiedades físicas, para la caracterización e identificación estructural de los metabolitos secundarios.
- Evaluar la toxicidad (CL<sub>50</sub>), utilizando como organismo de prueba a *Artemia salina* L., a cada uno de los extractos crudos y a las sustancias puras obtenidas.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas a cada uno de los extractos crudos y sustancias puras aisladas frente a diferentes microorganismos de prueba.

**Hipótesis de trabajo.**

**Hipótesis de trabajo.**

---

### HIPÓTESIS DE TRABAJO.

---

*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* es un vegetal muy apreciado en la medicina tradicional mexicana por sus diversas propiedades curativas, muchas de las cuales, aún no han sido plenamente comprobadas. Por lo tanto, es muy posible que en dicha planta existan sustancias con propiedades biológicas interesantes, principalmente las relacionadas con su actividad antimicrobiana y antimalárica.

Entonces, empleando las técnicas convencionales de laboratorio de química orgánica, se podrán aislar los diferentes metabolitos secundarios mayoritarios que constituyen el extracto etanólico de las partes aéreas de este vegetal. Asimismo, se podrán evaluar las sustancias puras aisladas así como los diferentes extractos crudos frente a *Artemia salina* L. y frente a diferentes microorganismos, para detectar sus posibles propiedades toxicológicas y antimicrobianas respectivamente.

## Metodología.

## METODOLOGÍA.

---

### A. MATERIALES.

#### a) Material vegetal.

- *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*.

#### b) Material para la extracción, aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios.

- **Cristalería.**

- Matraces Erlenmeyer de 50 y 125 ml,
- matraces bola de 100, 250, 500 y 1000 ml,
- frascos viales de 5 y 10 ml,
- probetas graduadas de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml,
- embudos de tallo corto,
- cámaras de elución para cromatofolios de diferentes tamaños,
- embudo Hirsh de porcelana,
- placa de toque de porcelana,
- columnas cromatográficas de diferentes tamaños
- equipo para la preparación de diazometano (Aldrich), y
- equipo para destilación fraccionada.

- **Sustancias.**

- Silica gel 60 G para CCF (Merck),
- sulfato de sodio anhidro (Aldrich),
- celite 545 (Merck),
- carbón activado vegetal (Lab. Laitz),
- sulfato cérico amónico (Baker),
- sal azul B (Merck),

- ácido sulfúrico (Baker),
  - ácido acético glacial (Baker),
  - diazald (Aldrich), e
  - hidróxido de potasio (Baker).
- Disolventes<sup>[12]</sup>.
- Hexano, grado técnico (Merck),
  - acetato de etilo, grado técnico (Merck),
  - etanol, grado técnico (Merck),
  - metanol, grado técnico (Merck),
  - cloroformo, grado analítico (Monterrey),
  - diclorometano, grado técnico (Merck),
  - acetona, grado técnico (Merck),
  - éter etílico, grado analítico (Monterrey), y
  - éter isopropílico, grado analítico (Baker).
- Material especial.
- Cromatofolios Al TLC de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck),
  - cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), y
  - cromatofolios de sílica gel de 60Å.
- Equipo.
- Rotavapor Yamato RE47,
  - rotavapor Büchi R-124,
  - balanza semianalítica OHAUS E 400,
  - balanza analítica Ainsworth 100 A,
  - baño de agua Yamato BM-42,
  - lámpara UV 254/366 nm mineralight,
  - balanza granataria OHAUS 700-800,

<sup>[12]</sup> Todos los disolventes grado técnico fueron purificados por destilación fraccionada.



- aparato Fisher Johns,
- espectrofotómetro de IR Perkin-Elmer, modelo 283 y 681,
- espectrofotómetro Nicolet FT-IR 5 SX,
- espectrómetro de masas Hewlett Packard 5985 GC/MS System 70 eV,
- espectrómetro de RMN Varian FT-80A, y
- espectrómetro de RMN Varian VXR-300 S.

**c) Material para los ensayos biológicos.**

• **Cristalería.**

- Pecera de 12x12x20 cm,
- pecera especial para la selección de larvas de *Artemia salina* L.<sup>[13]</sup>,
- frascos viales de fondo plano de 20 ml,
- microjeringas de 25, 50 y 500 µl,
- pipetas Pasteur,
- pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 ml,
- cajas Petri de 11 cm de diámetro,
- matraces Erlenmeyer de 500 ml,
- tubos de ensayo de 13 x 150, y
- tubos de ensayo de 13 x 150 con tapa de bakelita.

• **Material biológico.**

- Huevecillos deshidratados de *Artemia salina* L. (Sera),
- cepas de 

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853,
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922,
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538,
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 0579,
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	DM-93-10,
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 10741,

<sup>[13]</sup> Construida y equipada de acuerdo con las especificaciones descritas en la literatura<sup>43,45</sup>.

<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231,
<i>Listeria monocytogenes</i>	patógena,
<i>Salmonella typhi</i>	patógena.

• Sustancias.

- Sal marina,
- cloruro de sodio (Merck),
- removedor de cloro y buffer de pH (Care),
- agar de soya tripticaseína (Bioxon),
- caldo de soya tripticaseína (Bioxon), y
- sulfato de estreptomicina (Merck).

• Equipo.

- Balanza semianalítica OHAUS E 400,
- balanza analítica Ainsworth 100 A,
- olla de presión con manómetro, y
- estufa de incubación.

## B. PROCEDIMIENTOS.

### B.1. ESTUDIO QUÍMICO.

*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, fue colectada en las cercanías del poblado de San Rafael, Tlalmanalco en el Estado de México, en septiembre de 1993. Inmediatamente después de la colecta, se procedió a secar el material vegetal a la sombra y a temperatura ambiente. Una vez seca, se separaron sus partes aéreas (en hojas y tallo), para proceder a la obtención de los diferentes extractos de acuerdo con el diagrama de flujo mostrado en la página 52<sup>36,50</sup>.

Del extracto etanólico de hojas y tallo, se tomó una alícuota de 229 gramos en peso seco; la cual fue fraccionada por cromatografía en columna por elución a vacío, obteniéndose 867 fracciones de 500 ml cada una, de donde se aislaron y caracterizaron las siguientes sustancias:

- Después de sucesivas cromatografías de las fracciones [109-169(231-267)], se aisló una sustancia cristalina, la cual fue purificada mediante recristalización por par de disolventes (acetona:hexano); obteniéndose 14.7 mg de cristales rómbicos transparentes con punto de fusión de 206-208°C<sup>[14]</sup>. La sustancia se identificó como la *Ludovicina A* (I), con base a los datos espectroscópicos de RMN<sup>1</sup>H y COSY.
- De las fracciones [170-190] y [191-232] fue aislado un sólido blanco que cristalizó espontáneamente. Esta sustancia fue purificada mediante una recristalización por par de

---

<sup>[14]</sup> Los puntos de fusión no fueron corregidos.

disolventes (acetato de etilo:hexano), obteniéndose 853.4 mg de un sólido cristalino de punto de fusión de 193-195°C, por ello dicha sustancia fue caracterizada e identificada como la *Arglanina* (II), en base a sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas y por comparación con una muestra auténtica estándar<sup>[15]</sup>.

- De las fracciones [109-169(466-510)], fue identificada por medio de comparación en CCF con una muestra auténtica<sup>[14]</sup> a la *Arnefolina* (III).
- De las fracciones [325-396(116)], fue aislada después de sucesivas cromatografías, una sustancia en forma de agujas blancas. Esta fue purificada mediante recristalización por par de disolventes (acetato de etilo:hexano); de donde se obtuvieron 8.6 mg de un sólido cristalino amorfo, cuyo punto de fusión fue de 206-207°C. Esta sustancia fue caracterizada por técnicas espectroscópicas (IR, RMN<sup>1</sup>H, COSY, RMN<sup>13</sup>C y DEPT) y espectrométricas (EM(IE)), como la *Armexifolina* (IV).
- De las fracciones [109-169(511-526)] y [109-169(527-541)] y después de realizar una CCP fueron aislados 4.4 mg de una sustancia cristalina amorfa de punto de fusión 187-191°C (descompone). Las técnicas espectroscópicas de IR y RMN<sup>1</sup>H, así como la técnica espectrométrica de EM(IE), revelan que se trata de una lactona con grupos funcionales muy polares. Esta sustancia aún se encuentra en proceso de elucidación estructural.

---

<sup>[15]</sup> La muestra fue proporcionada por el M. en C. Alejandro Ruiz Cancino, la cual ya había sido obtenida en un estudio previo de esta planta.

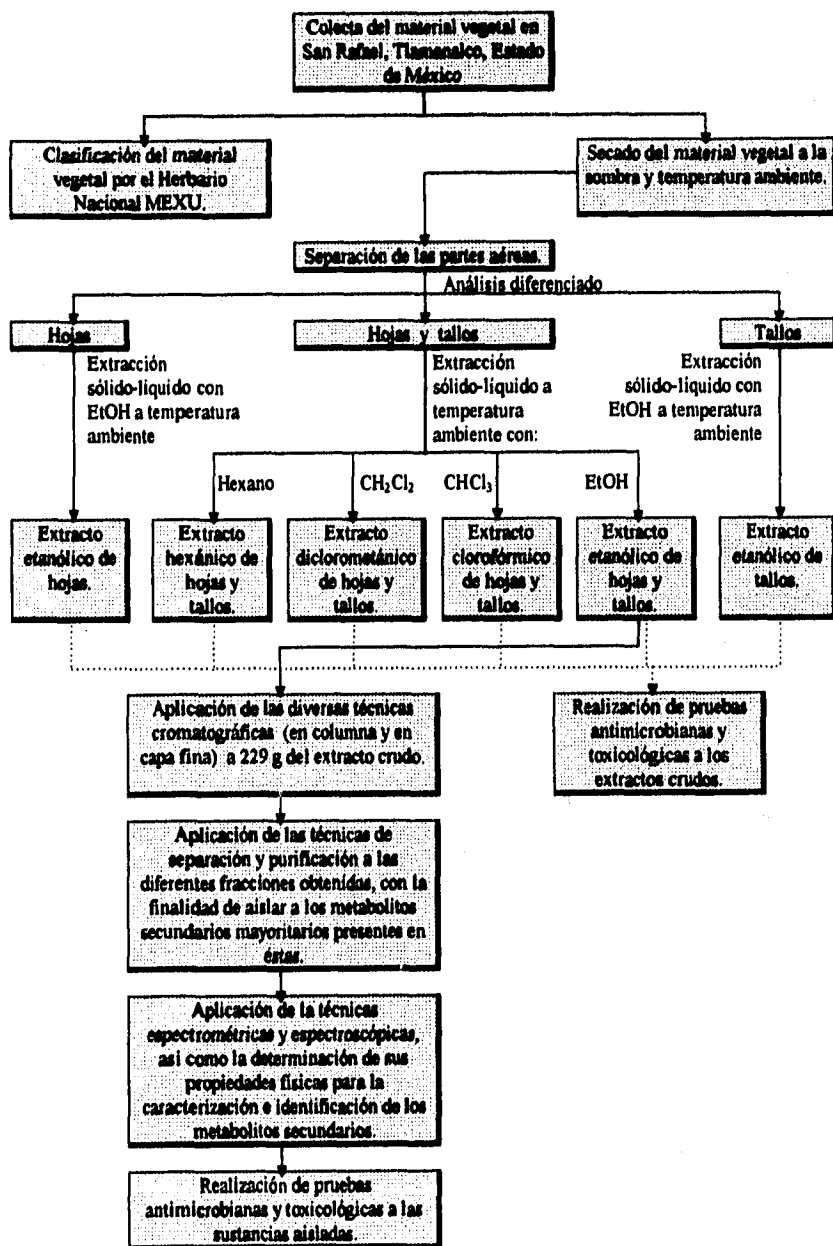


Figura VI. Diagrama de flujo seguido en el estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

- **Obtención de la  $\beta$ -pirazolina de la Arglanina.** 100 mg de la Arglanina (II) fueron disueltos en etanol absoluto y posteriormente se trataron con diazometano disuelto en éter etílico ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ )<sup>[16]</sup> a baja temperatura, produciendo la  $\beta$ -pirazolina de la Arglanina (V). Esta sustancia fue caracterizada mediante la comparación con una muestra auténtica<sup>[17]</sup> (Figura VI).

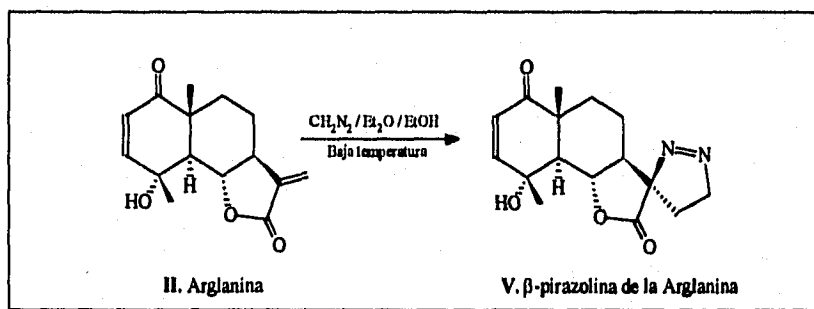


Figura VII. Obtención de la  $\beta$ -pirazolina de la Arglanina.

<sup>[16]</sup> El diazometano se preparó en un equipo especial para el caso. Se pesaron 11 g de diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida) y se disolvieron en 100 ml de éter etílico absoluto; esta solución se agregó lentamente, por medio de un embudo de adición, al matraz balón del equipo que contenía una mezcla de 5 g de hidróxido de potasio y 100 ml de éter etílico-agua-etanol (10:10:30) con calentamiento ligero. Se colectó el diazometano generado en un matraz balón que contenía 100 de éter etílico sumergido en hielo<sup>31</sup>.

<sup>[17]</sup> La muestra fue proporcionada por el M. en C. Alejandro Ruiz Cancino y el Q.F.B. José Noriega Galicia.

## B.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

### a) Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L.<sup>43,45</sup>.

**Preparación de las muestras.** Las muestras fueron preparadas disolviendo 20 mg del extracto o sustancia en 2 ml de disolvente<sup>[18]</sup>. De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 µl a viales de 20 ml, utilizando 3 viales por dilución. Además se agregaron 500 µl del disolvente utilizado a un vial que funcionó como blanco. Las muestras se dejaron evaporar 48 horas antes de iniciar el bioensayo. Las concentraciones finales de cada dilución fueron 10, 100 y 1000 µg/ml.

**Preparación de las larvas de *Artemia salina* L.** 50 mg de huevecillos de *Artemia salina* L. se colocaron en la parte oscura de la pecera, construida para tal propósito, que contenía 600 ml de agua de mar artificial con aeración ligera continua. Después de 48 horas las larvas fototrópicas fueron colectadas y empleadas para el desarrollo del bioensayo.

**Bioensayo.** A los viales que contenían las muestras, se les agregó 200 µl de DMSO<sup>[18]</sup> y 1.5 ml de agua de mar artificial. Posteriormente, se adicionaron 10 larvas a cada vial y se aforaron a un volumen de 5 ml. El blanco fue tratado de igual manera. Los viales fueron mantenidos bajo iluminación y las larvas sobrevivientes fueron contadas después de 24 horas. Se determinaron los porcentajes de larvas muertas para cada dosis y blanco<sup>[20]</sup> y se calculó la CL<sub>50</sub> mediante un programa de computo que utiliza el análisis de probitas de Finney<sup>[21]</sup>.

[18] En cada extracto se utilizó el disolvente con el que fue preparado. En las sustancias puras se utilizó metanol.

[19] El DMSO se utiliza para disolver completamente el extracto debido a que un reporte reciente indica que es el disolvente menos tóxico para la *Artemia salina*<sup>47</sup>.

[20] En los casos donde hubo muertes en el control, los datos fueron corregidos utilizando la formula de Abbott: %muertes = [ ( prueba - control ) / control ] x 100<sup>43</sup>.

[21] El programa de computo fue proporcionado por el Instituto de Química de la UNAM.

**b) Pruebas antimicrobianas<sup>49</sup>.**

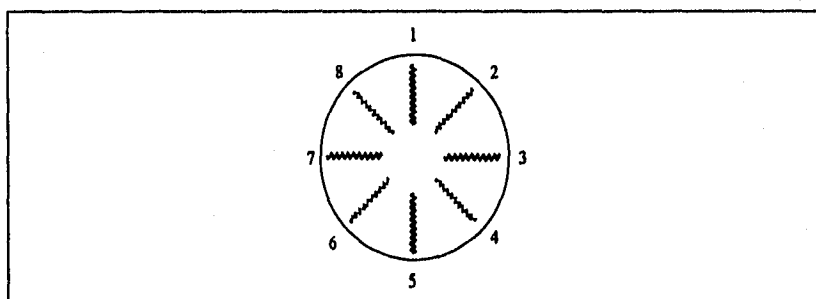
**Preparación de los microorganismos.** Los microorganismos, mantenidos en el medio AST, se inocularon al medio CST. Después de una incubación de 24 horas, los cultivos fueron diluidos 1:100 con 9.9 ml de solución salina estéril al 0.9% y 0.1 ml de los mismos. Esta última dilución es la que se utilizó en el bioensayo.

**Preparación de las muestras.** Se pesaron 40 mg de extracto ó 12 mg de sustancia pura y se colocaron en un vial, posteriormente, se agregaron 0.2 ml de tween 80 y 0.8 ml de solución salina estéril al 0.9%. Finalmente la mezcla se agitó hasta disolver completamente la muestra.

Esta dilución se mezcló, asépticamente, con 35 ml del medio AST a 50°C y se vació en partes iguales a dos cajas Petri estériles. Una vez solidificado el medio se incubaron a 37°C por 24 horas para realizar la prueba de esterilidad.

En el control positivo se utilizó el sulfato de estreptomicina como muestra y en el control negativo se utilizó solamente la mezcla de tween 80 y solución salina.

**Bioensayo.** Los microorganismos fueron sembrados por medio de la técnica de estria en un patrón radial (Figura VII), utilizando 8 microorganismos diferentes por caja de Petri.



**Figura VIII.** Esquema que muestra la forma de sembrado de los microorganismos en cada caja Petri. Cada número representa a un microorganismo diferente<sup>49</sup>.



Una vez inoculadas las cajas Petri se incubaron a 37°C por 24 horas. Al término de la incubación, los microorganismos inhibidos son considerados como sensibles y por lo tanto, la muestra -extracto o sustancia aislada- es considerada como activa contra dicho microorganismo.

## Resultados.

## RESULTADOS.

## A. ESTUDIO QUÍMICO.

En el estudio químico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, se lograron aislar las sustancias que a continuación se enlistan en la Tabla I.

Sustancias aisladas de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> .						
Sustancia	Estructura	Fórmula molecular	Peso molecular	Fracción de elución de polaridad creciente	Masa obtenida (mg)	Punto de fusión (°C)
Ludovicina A	I	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264	109-169(231-241) 109-169(242-267)	14.7	206-208
Argjanina	II	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	262	170-190 191-223	853.4	193-195
Arnefolina *	III	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264	109-169(466-510)	-	-
Armexifolina	IV	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	262	325-396(116)	8.6	206-207
**	-	-	-	109-169(511-526)	4.4	187-191
β-pirazolina de la Argjanina ***	V	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>1</sub>	304	-	-	105-197

\* Identificada por medio de comparación con una muestra auténtica.

\*\* Sustancia en proceso de elucidación estructural.

\*\*\* Producto de reacción de la Argjanina con diazometano.

Tabla I. Sustancias aisladas del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* en este estudio.

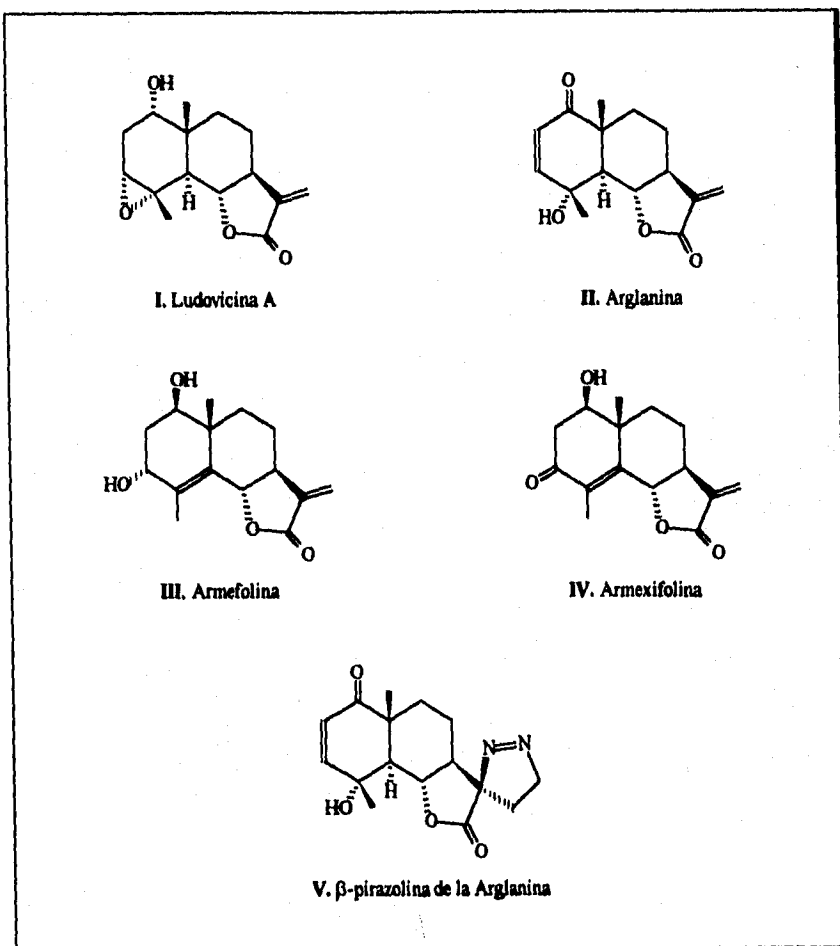


Figura IX. Estructuras de las sustancias aisladas del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* en el presente estudio.

**Propiedades espectroscópicas de las sustancias aisladas del extracto etanólico.**• **Ludovicina A**IR  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{CHCl}_3$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3536, 1768.RMN<sup>1</sup>H: (Tabla II).• **Arglanina**EM(IE) m/z(%): 262( $M^+$ , 19), 43(20.7), 98(35.5), 119(16.5), 147(18.2), 165(11.6),  
183(11.6), 201(18.2), 229(27.3), 247(100).IR  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{CHCl}_3$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3459, 2925, 2854, 1748, 1670.RMN<sup>1</sup>H: (Tabla II).• **Armexifolina**EM(IE) m/z(%): 262( $M^+$ , 95.5), 41(46.2), 43(39.5), 55(36.1), 69(56.3), 81(42.9),  
161(93.3), 162(79), 190(79.8), 191(100), 218(37), 233(42.9).IR  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{CHCl}_3$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3619, 2943, 1774, 1674, 1622.RMN<sup>1</sup>H: (Tabla II).RMN<sup>13</sup>C (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): C-1(74.34), C-2(42.45), C-3(196.6),  
C-4(129.57), C-5(152.07), C-6(81.93), C-7(48.64), C-8(23.04), C-9(37.83),  
C-10(43.78), C-11(137.71), C-12(169.07), C-13(119.83), C-14(11.04),  
C-15(17.47).• **Sustancia de la fracción 109-169(511-526)**IR  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{CHCl}_3$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3537, 2978, 2930, 2874, 1749, 1682, 1387, 1325, 1074,  
1016, 920.EM(IE) m/z(%): 280(29.6), 256(14.8), 247(15.7), 236(21.3), 216(25.0), 206(27.8),  
205(73.1), 191(33.3), 163(38.9), 159(25.0), 129(26.9), 117(33.3), 109(39.8),  
97(45.8), 83(50.0), 69(78.7), 57(76.9), 43(100), 40(83.3).RMN<sup>1</sup>H: (Tabla II).•  **$\beta$ -pirazolina de la Arglanina<sup>[22]</sup>**IR  $\nu_{\text{máx}}$   $\text{CHCl}_3$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3595, 1778, 1382, 1130, 1085, 1038, 978, 882.

<sup>[22]</sup> Datos proporcionados por el M. en C. Alejandro Ruíz Cancino y el Q.F.B. José Noriega Galicia quienes anteriormente caracterizaron a esta sustancia<sup>22</sup>.

Datos de RMN <sup>1</sup> H de algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas. (multiplicidad, J <sup>a</sup> )			
Hidrógeno	Arglanina (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS)	Ludovicina A (300 MHz, DMSO-D <sub>6</sub> + CDCl <sub>3</sub> , TMS)	Armexifolina (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS)
H-1	-	3.15( <i>t</i> , 5)	3.9( <i>dt</i> , 12.5, 4)
H-2	5.92( <i>d</i> , 10.5)	-	-
H-2 $\alpha$ <sub>acc</sub>	-	2.14( <i>m</i> )	2.7( <i>dd</i> , 16, 5)
H-2 $\beta$ <sub>ax</sub>	-	1.98( <i>m</i> )	2.61( <i>dd</i> , 16, 13)
H-3	6.63( <i>d</i> , 10.5)	2.82( <i>d</i> , 3.6)	-
H-5	2.57( <i>d</i> , 11)	2.33( <i>d</i> , 12)	-
H-6	4.15( <i>t</i> , 11)	4.09( <i>dd</i> , 11, 6)	4.74( <i>dd</i> , 13.5, 2)
H-7	2.59( <i>m</i> )	2.43( <i>m</i> )	2.8( <i>m</i> )
H-8	1.63( <i>m</i> )	-	-
H-8 $\beta$ <sub>ax</sub>	-	1.52( <i>m</i> )	1.55( <i>m</i> )
H-8 $\alpha$ <sub>acc</sub>	-	1.86( <i>m</i> )	1.75( <i>m</i> )
H-9	2.13( <i>m</i> )	-	2.26( <i>m</i> )
H-9 $\beta$ <sub>acc</sub>	-	1.98( <i>m</i> )	-
H-9 $\alpha$ <sub>ax</sub>	-	1.16( <i>m</i> )	-
H-13a	5.52( <i>d</i> , 3.3)	5.51( <i>d</i> , 3)	5.57( <i>d</i> , 3)
H-13b	6.17(3.3)	5.93( <i>d</i> , 3)	6.25( <i>d</i> , 3)
H-14	1.23( <i>s</i> )	0.81( <i>s</i> )	1.29( <i>d</i> , 0.5)
H-15	1.57( <i>s</i> )	1.35( <i>s</i> )	2.05( <i>d</i> , 2)

\* Los valores de las constantes de acoplamiento se dan en Hz.

Tabla II. Datos de RMN<sup>1</sup>H de algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas en este estudio.

**B. ESTUDIO BIOLÓGICO.****B.1. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L.**

En la Tabla III, se muestran los resultados de la evaluación toxicológica de los diferentes extractos, así como de algunas sustancias puras aisladas del extracto etanólico.

Bioensayo de toxicidad de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> .						
Extracto o sustancia	Porcentaje de muertes			CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Limite inferior	Limite superior
	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml			
Hexánico	3.33	5.55	17.78	94328.49	8297.87	2.34 x 10 <sup>9</sup>
Clorofórmico	6.67	25.55	50	929.84	496.78	2476.80
Diclorometánico	2.22	51.11	71.11	200.82	139.02	302.71
Etanólico (hojas y tallo)	1.11	42.22	66.67	288.08	198.50	444.04
Etanólico (hojas)	5.55	13.33	70.00	458.33	316.38	717.15
Etanólico (tallo)	2.22	6.67	46.67	1341.02	822.22	2855.85
Arglanina	3.33	5.55	87.77	324.21	249.73	427.10
β-pirazolina de la Arglanina*	0.00	1.11	10.0	-	-	-

\* Los resultados de la β-pirazolina de la Arglanina no pudieron ser calculados.

Tabla III. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L. de los diferentes extractos y sustancias aisladas del extracto etanólico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

**B.2. Pruebas antimicrobianas.**

El estudio en este rubro se dividió en tres fases: evaluación de los extractos crudos, evaluación de algunas fracciones del extracto etanólico de hojas y tallo y, evaluación de las sustancias aisladas.

A continuación en las Tablas IV, V y VI se muestran dichos resultados. Los microorganismos utilizados fueron:

- |                                    |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. <i>Listeria monocytogenes</i>   | 2. <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 4. <i>Escherichia coli</i>      |
| 5. <i>Streptococcus faecalis</i>   | 6. <i>Candida albicans</i>      |
| 7. <i>Mycobacterium smegmatis</i>  | 8. <i>Salmonella typhi</i>      |
| 9. <i>Streptococcus agalactiae</i> |                                 |

Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos.								
Extracto	Microorganismos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Hexánico	-	±	-	-	+	-	-	-
Clorofórmico	-	±	-	-	-	-	-	-
Diclorometánico	-	±	-	-	-	-	-	-
Etanólico (tallo)	-	±	-	-	-	-	-	-
Etanólico (hojas)	±	±	±	-	-	-	-	-
Etanólico (hojas y tallo)	-	±	±	-	-	-	-	-

(+) = actividad

(-) = sin actividad

(±) = poca actividad

**Tabla IV.** Resultados de la evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.



Evaluación antimicrobiana de algunas fracciones del extracto etanólico de hojas y tallo.								
Fracción	Microorganismos							
	1	2	3	4	5	6	7	9
1-7	-	+	-	+	-	-	-	-
95-108	-	-	-	-	-	-	-	-
109-169	+	+	-	+	-	-	-	-
191-223	+	+	-	-	-	-	-	-
282-324	+	+	-	+	-	-	-	-
397-501	+	+	-	+	-	-	-	-
574-590	+	+	-	+	-	-	-	-
591-625	-	+	-	+	-	-	-	+
698-735	+	+	-	+	-	+	-	+
736-867	+	+	-	+	-	-	-	+

(+) = actividad                      (-) = sin actividad                      (±) = poca actividad

Tabla V. Resultados de la evaluación antimicrobiana de algunas fracciones del extracto etanólico de hojas y tallo.

Evaluación antimicrobiana de las lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto estándar.								
Lactona	Microorganismos							
	1	2	3	4	5	6	7	9
Arglanina *	-	±	-	-	-	-	-	-
Ludovicina A	-	±	-	-	-	-	-	-
Arglanina	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -pirazolina de la Arglanina	-	±	-	-	-	-	-	-

(+) = actividad

(-) = sin actividad

(±) = poca actividad

\* En esta sustancia se utilizó la misma cantidad que en los extractos, mientras que en las demás, la cantidad estipulada en la metodología.

**Tabla VI.** Resultados de la evaluación antimicrobiana de algunas lactonas sesquiterpénicas aisladas del extracto etanólico de hojas y tallo.

**Discusión de resultados.**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### A. ESTUDIO QUÍMICO.

De las fracciones [191-223] eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2), se aisló un sólido en forma de agujas blancas de punto de fusión 193-195°C. En su espectro de EM(IE), presenta un ión molecular a  $m/z$  262 (19%) para una fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_4$  ( $\Omega = 7$ ), y que se corroboró con el análisis espectroscópico que a continuación se describe.

En su espectro de IR (espectro 1) se observa en  $3459\text{ cm}^{-1}$  una banda fina que indica la presencia de un grupo hidroxilo; mientras que en  $1748$  y  $1670\text{ cm}^{-1}$  se observan dos bandas correspondientes al grupo carbonilo de una  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona y para una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada<sup>53-54</sup> respectivamente.

En su espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 2), se visualiza en  $\delta 4.15$  una señal triple (1H,  $J = 11$  Hz) característica de H-6, el cual se acopla con una señal doble ubicada en  $\delta 2.57$  (1H,  $J = 11$  Hz) que corresponde al hidrógeno de la posición cinco (H-5) (espectro 3). El valor de la constante de acoplamiento (11 Hz), sugiere que la fusión de los anillos A y B es *trans* (*trans*-decalina). Asimismo, se observa una señal múltiple en  $\delta 2.51$  (1 H) con  $J = 11$  Hz que se acopla con H-6 y que se puede asignar a H-7, lo cual indica que se trata de una  $\gamma$ -lactona cerrada en la posición 6 con una fusión *trans* (H-6 $\beta_{ax}$  - H-7 $\alpha_{ax}$ ) (Figura X)<sup>55</sup>.

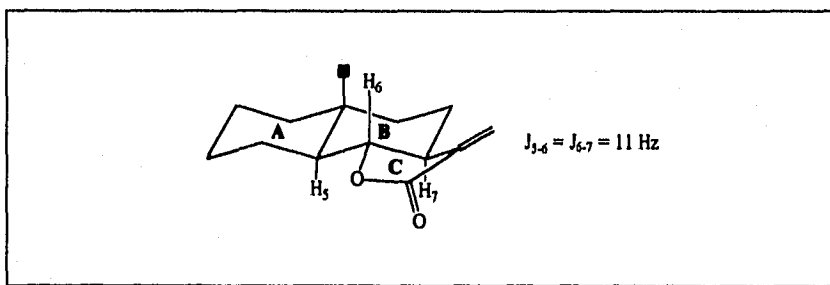


Figura X. Disposición espacial de los hidrógenos H-5, H-6 y H-7.

Además se observan dos singuletes que aparecen en  $\delta 1.23$  (s, 3H) y  $\delta 1.57$  (s, 3H) para los metilos 14 y 15 respectivamente (Figura XI).

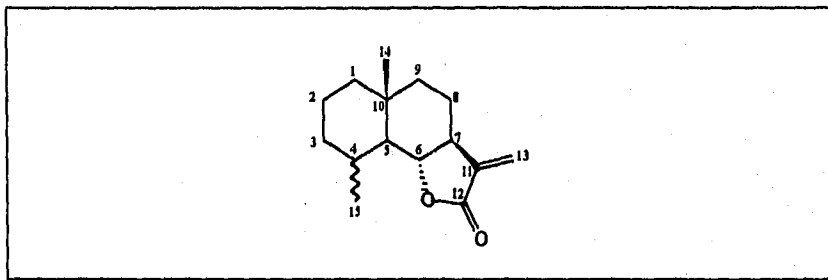


Figura XI. Lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano.

Las señales correspondientes a los hidrógenos geminales del doble enlace exocíclico de la  $\gamma$ -lactona, se observan en  $\delta 6.17$  (d, 1H,  $J = 3$  Hz) para H-13b y  $\delta 5.52$  (d, 1H,  $J = 3$  Hz) para H-13a. La diferencia en desplazamiento químico entre H-13b y H-13a es debido al efecto de anisotropía generado por el grupo carbonilo de la lactona sobre el H-13b<sup>52,56</sup> (Figura XII).

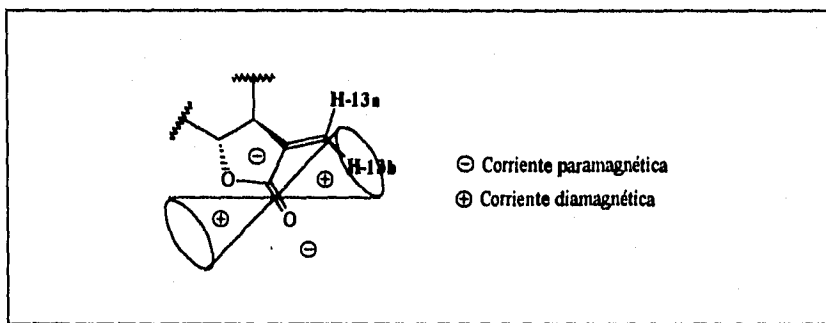


Figura XII. Posición de los hidrógenos H-13a y H-13b y efecto de anisotropía sobre H-13b.

Las señales dobles centradas en  $\delta 6.63$  (1H,  $J = 10.5$  Hz) y  $\delta 5.92$  (1H,  $J = 10.5$  Hz) ponen de manifiesto un sistema AB, que corresponde a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada que es confirmada en su espectro de IR. Dicho grupo funcional se ubica en el anillo A del esqueleto base, por lo que dichas señales se asignaron a H-3 y H-2 respectivamente. Además el desplazamiento a campo bajo del  $\text{CH}_3$ -15, indica su posición geminal al grupo hidroxilo. De esta manera se establece la estructura parcial de la Figura XIII.

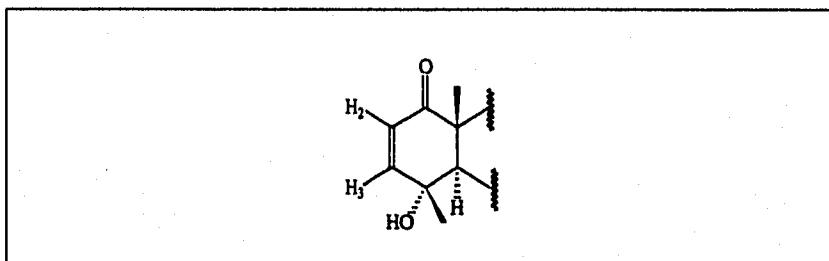


Figura XIII. Estructura parcial de la sustancia obtenida de las fracciones [191-223].

Este análisis, más la comparación de los datos descritos con los informados en la literatura<sup>19,33,34,37</sup>, permitieron establecer la identidad de la sustancia como la *Arglanina* (II).

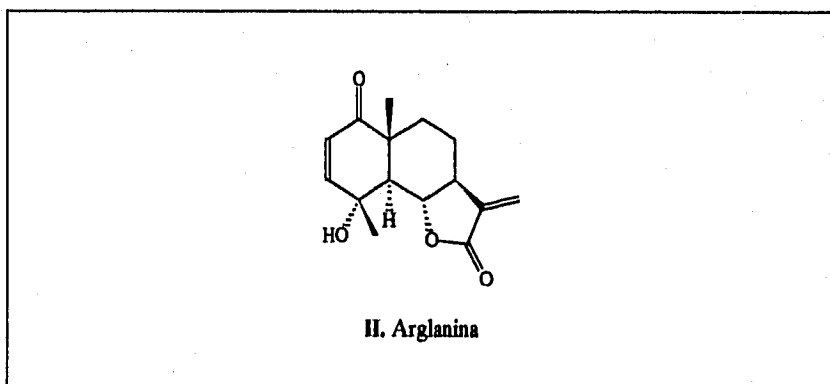


Figura XIV. Arglanina (II).

De las fracciones [109-169] eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2). Se tomó una alícuota de 13.71 gramos, la cual fue recromatografiada por CCV; obteniéndose en las fracciones [231-267], eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (6:4), una sustancia cristalina transparente de punto de fusión 206-208°C.

En su espectro de IR, muestra en 3532.3  $\text{cm}^{-1}$  una banda que indica la presencia de un grupo hidroxilo y en 1797.9  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente a un grupo carbonilo de una  $\gamma$ -lactona<sup>53-54</sup>.

En su espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 4), se observan las señales características de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano: a  $\delta$ 4.09 (*dd*, 1H,  $J = 11, 12$  Hz) la señal de H-6, la cual, de acuerdo con el espectro COSY (espectro 5) interacciona -se acopla- con H-5 y H-7, los cuales aparecen en  $\delta$ 2.33 (*d*, 1H,  $J = 12$  Hz) y  $\delta$ 2.43 (*m*, 1H) respectivamente. La constante de acoplamiento indica, nuevamente, la fusión *trans* de la lactona<sup>53</sup>. Asimismo, las señales en  $\delta$ 1.35 (*s*, 3H) y  $\delta$ 0.81 (*s*, 3H) corresponden a CH<sub>3</sub>-15 y CH<sub>3</sub>-14, mientras que en  $\delta$ 5.93 (*d*, 1H,  $J = 3$  Hz) y  $\delta$ 5.51 (*d*, 1H,  $J = 3$  Hz) se observan las señales a H-13b y H-13a del doble enlace exocíclico, confirman la estructura base propuesta.

La señal que resuena en  $\delta$ 4.41 corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo, esto se comprueba cuando se equilibra con D<sub>2</sub>O, donde dicha señal desaparece (espectro 6).

La señal en  $\delta$ 3.15 (*t*, 1H,  $J = 5$  Hz) corresponde, por su desplazamiento químico, a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, lo cual queda de manifiesto al observar el espectro COSY (espectro 5), en la Figura XV donde se observa claramente la interacción del hidrógeno del grupo hidroxilo ( $\delta$ 4.41) con el hidrógeno del C-1.

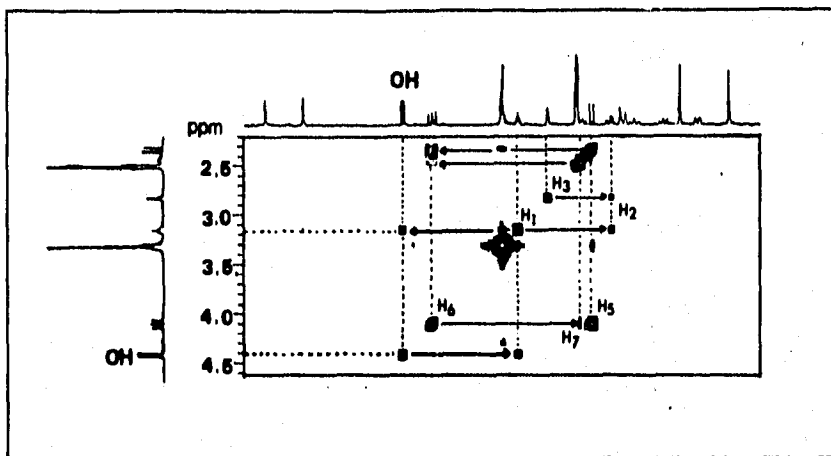


Figura XV. Espectro COSY donde se muestra la interacción de H-1 y del hidrógeno del hidróxilo (espectro 5).

Por otro lado, se observa en  $\delta 2.82$  una señal doble ( $J = 5$  Hz) que integra para un hidrógeno que por su desplazamiento químico puede ser asignado a un hidrógeno base de un epóxido. Mientras que la señal múltiple en  $\delta 2.14$  fue asignada al hidrógeno H-2 $\alpha$ c, como se muestra en la Figura XVI.

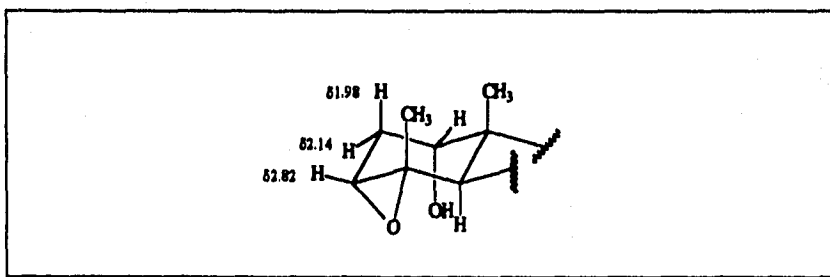


Figura XVI. Estructura parcial de la sustancia obtenida de las fracciones [109-169(231-267)].

El análisis anterior y la comparación de los datos experimentales con los informados en la literatura<sup>19,29</sup>, confirman la identidad de la sustancia como la *Ludovicina A* (I).



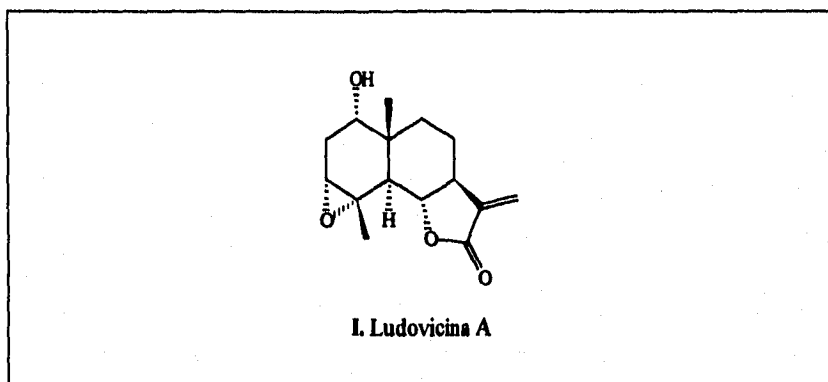


Figura XVII. Ludovicina A (I).

De las fracciones [466-501] obtenidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1), de la recromatografía de las fracciones [109-169], se identificó una sustancia que debido a la cantidad obtenida no se pudo analizar espectroscópicamente, razón por la cual se identificó mediante comparación directa en CCF con una muestra estándar de *Arnefolina* (III), la cual resulto tener el mismo  $R_f$ .

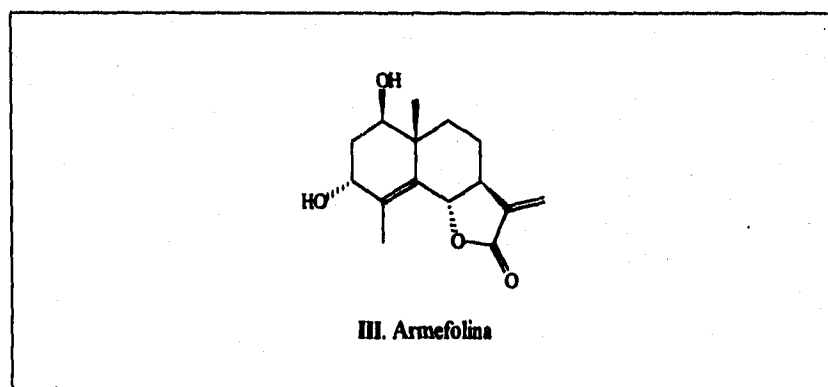


Figura XVIII. Arnefolina (III).

De las fracciones [325-396] eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (7:3), se tomó una alícuota de 4.04 gramos, la cual fue recromatografiada por CCV. En la fracción [116] eluida con idéntica polaridad, se obtuvo un sólido en forma de agujas blancas cristalinas, cuyo punto de fusión fue de 206-207°C.

En su espectro de EM(IE), presenta un ión molecular a  $m/z$  262 (95.8%) que corresponde a una fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_4$  ( $\Omega=7$ ). En su espectro de IR (espectro 7), se observa una banda en  $3618.7\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de un grupo hidroxilo. Mientras que las bandas observadas en  $1774.3$  y  $1674.0\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de un grupo carbonilo que forma parte de una  $\gamma$ -lactona y de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada<sup>53-54</sup>.

En su espectro de RMN<sup>13</sup>C en desacoplamiento total (espectro 10), se observan 15 señales, que por su desplazamiento químico, confirma de que se trata de una lactona sesquiterpénica, que incorpora presumiblemente a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en el anillo A. Asimismo la multiplicidad encontrada en su espectro de RMN<sup>13</sup>C aplicando la técnica DEPT (espectro 11), indica que la molécula presenta 2 metilos, 4 metilenos, 3 metinos y los restantes son carbonos cuaternarios<sup>58</sup>.

Su espectro de RMN<sup>1</sup>H (espectro 8), muestra una señal a  $\delta 4.74$  (*dd*, 1H,  $J = 13.5$ , 2 Hz) correspondiente a H-6, el cual, se acopla o interacciona con las señales observadas a  $\delta 2.8$  (*m*, 1H) y  $\delta 2.05$  (*d*, 3H,  $J = 2$  Hz), de acuerdo con lo observado en su espectro COSY (espectro 9), donde la primera señal corresponde a H-7, mientras que la segunda corresponde al CH<sub>3</sub>-unido al C-4, con el cual existe un acoplamiento de tipo alílico ( $J = 2$  Hz). Esta observación confirma que se trata de una lactona con esqueleto de eudesmano, con fusión *trans*, debido a que su acoplamiento es de 13 Hz, es muy grande con respecto al valor informado en la literatura para una fusión *cis* (9 Hz)<sup>55</sup>, en la Figura XIX se muestra un fragmento de la molécula, donde es posible situar a la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

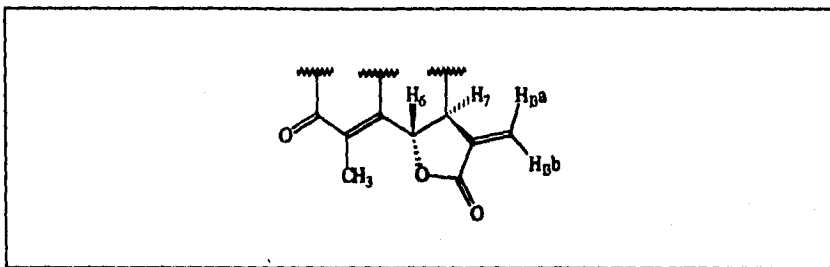


Figura XIX. Posición de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en el anillo A de la sustancia en discusión.

Además las señales de H-13b y H-13a se observan a  $\delta 6.25$  (*d*, 1H,  $J = 3$  Hz) y  $\delta 5.57$  (*d*, 1H,  $J = 3$  Hz) respectivamente, mientras que en el espectro de COSY puede observarse su interacción con H-7 y de este último con una señal en  $\delta 1.75$  (*m*, 1H), la cual necesariamente, debe corresponder a H-8 $\beta$ c.

A  $\delta 3.9$  (*dt*, 1H,  $J = 12.5, 4$  Hz) se observa la señal de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo, el cual se había puesto de manifiesto en el espectro de IR, que se acopla con las señales centradas en  $\delta 2.7$  (*dd*, 1H,  $J = 16, 5$  Hz) y  $\delta 2.61$  (*dd*, 1H,  $J = 13, 16$  Hz). Además, estas últimas señales se acoplan entre sí. Dicho acoplamiento se determina con base en la semejanza de sus constantes de acoplamiento y de su espectro de COSY. En este último puede observarse que las señales mencionadas no se acoplan con H-7, lo que indica que las tres señales anteriores no corresponden a H-9 ni a H-8.

Debido al desplazamiento químico mostrado por el hidrógeno geminal al hidroxilo, no puede ser situado en la posición 2, ya que sería  $\alpha$  a un carbonilo y por lo tanto, debería presentar un desplazamiento a campo bajo. Las señales anteriores son asignadas a H-1, H-2 $\alpha$  pseudo-ecuatorial y H-2 $\beta$  pseudo-axial respectivamente, obteniéndose la estructura de la Figura XX.

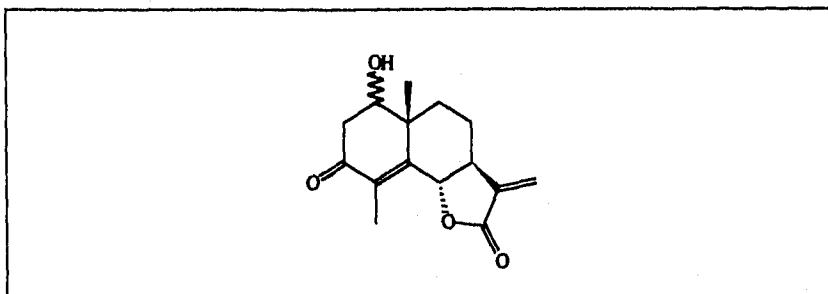


Figura XX. Posición definitiva del hidroxilo en el anillo A sin estereoquímica definida.

Si el hidroxilo se encuentra en posición  $\alpha$ -axial, la sustancia será la lactona conocida como Ludovicina C; sin embargo, al comparar los datos obtenidos con los reportados para la Ludovicina C<sup>29</sup>, difieren ligeramente en los máximos de absorción en su espectro de IR, en el desplazamiento químico de algunos protones y en el punto de fusión (Tabla VII).

Comparación de los datos de la Ludovicina C y de la sustancia en discusión.		
Datos	Ludovicina C	Sustancia en discusión
Máximos de absorción IR (cm <sup>-1</sup> )	3525 1760 1670 1630	3619 1774 1674 1622
Punto de fusión (°C)	193-195	206-207
Desplazamiento químico de algunos protones	84.61 (H-6) 82.00 (H-15) 83.75 (H-1, J= 3, 4 Hz) 81.32 (H-14) 86.18 (H13b) 85.53 (H-13a)	84.74 (H-6) 82.05 (H-15) 83.9 (H-1, J= 4, 12.5 Hz) 81.29 (H-14) 86.25 (H13b) 85.57 (H-13a)

Tabla VII. Comparación de los datos descritos para la Ludovicina C<sup>29</sup> y los determinados en la sustancia en discusión.

La diferencia más notable y determinante para afirmar que no se trata de la Ludovicina C, es el desplazamiento químico de H-1 ( $\Delta\delta = -0.15$ ) y su constante de acoplamiento; este último dato presenta una diferencia muy grande ( $\Delta J = 9.5$  Hz).

La orientación espacial del grupo hidroxilo, fue determinado en función de los desplazamientos químicos mostrados por los diferentes carbonos de dicha sustancia (efecto  $\gamma$ -gauche)<sup>52,58</sup>.

Desplazamientos químicos de los carbonos de la sustancia aislada de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	
Carbono	Desplazamiento químico
C-1	74.339
C-2	42.449
C-3	196.622
C-4	129.574
C-5	152.069
C-6	81.934
C-7	48.639
C-8	23.040
C-9	37.830
C-10	43.778
C-11	137.707
C-12	169.069
C-13	119.833
C-14	11.035
C-15	17.468

Tabla VIII. Desplazamientos químicos de los carbonos de la sustancia en discusión.

En la figura XXI se muestran las estructuras de la sustancia en discusión, suponiendo una configuración  $\beta$ -ecuatorial del hidroxilo, y de la Reynosina<sup>52</sup>; así como la proyección de Newman de las mismas. En dicha figura se observa que si el hidroxilo se encuentra en la

posición indicada, ejerce un efecto de protección  $\gamma$ -gauche sobre C-9 y C-14, pero no sobre C-5 que se encuentra en posición antiperiplanar.

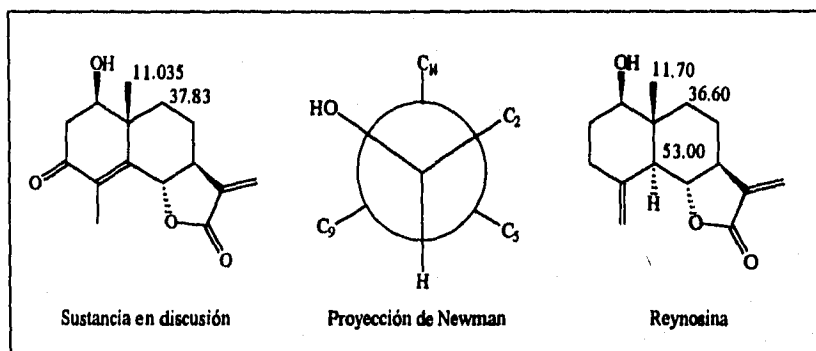


Figura XXI. Efecto  $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-14 de la Reynoldsina y de la sustancia en discusión<sup>52</sup>.

Comparando los desplazamientos químicos de estos carbonos en dichas sustancias, se observa una similitud en los mismos. Pero al comparar éstos con los reportados para la Arbusculina<sup>52</sup>, sustancia en la cual no existe ningún hidroxilo en el C-1 (Figura XXII), se observa un desplazamiento a campo bajo para los C-9 y C-14 de la Arbusculina, lo cual confirma que la relación espacial del grupo hidroxilo situado en una posición  $\beta$ -*ecuatorial* ejerce un efecto  $\gamma$ -gauche sobre los C-9 y C-14.

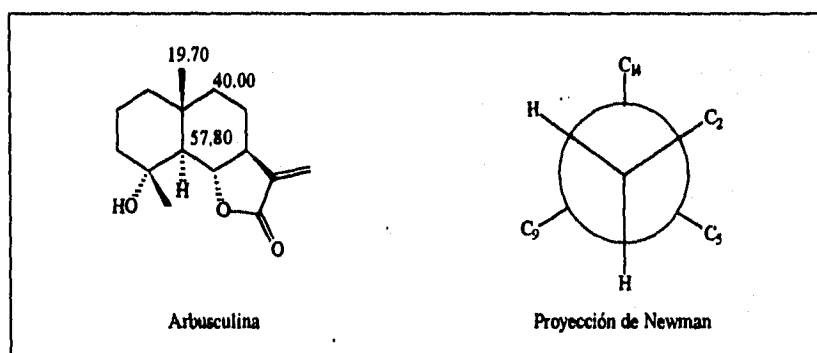


Figura XXII. Ausencia del efecto  $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-5 de la Arbusculina<sup>52</sup>.

Asimismo, al hacer la comparación de los mismos desplazamientos con los descritos para la Ludovicina B<sup>52</sup>, sustancia en la cual el grupo hidroxilo del C-1 se encuentra en posición  $\alpha$ -axial, no se observa el efecto  $\gamma$ -gauche con el C-14 debido a su posición antiperiplanar con respecto al grupo hidroxilo del C-1. Sin embargo, se observa el efecto  $\gamma$ -gauche que ejerce el grupo hidroxilo sobre los carbonos C-9 y C-5, debido al desplazamiento químico de los mismos hacia campo alto (Figura XXIII).

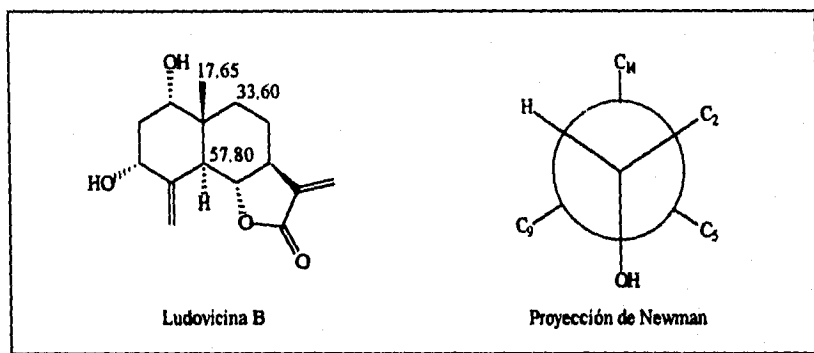


Figura XXIII. Efecto  $\gamma$ -gauche en los carbonos C-9 y C-5, y ausencia del mismo en el C-14 de la Ludovicina B.

Con el análisis anterior, se concluye que la posición del hidroxilo del C-1 se encuentra en una configuración  $\beta$ -ecuatorial. Cabe señalar que la sustancia en discusión fue descrita en 1984 como producto de la oxidación de la Arnefolina (III)<sup>59</sup>. Los datos obtenidos del producto derivado de la oxidación concuerdan con los encontrados en la sustancia aislada (Figura XXIV).

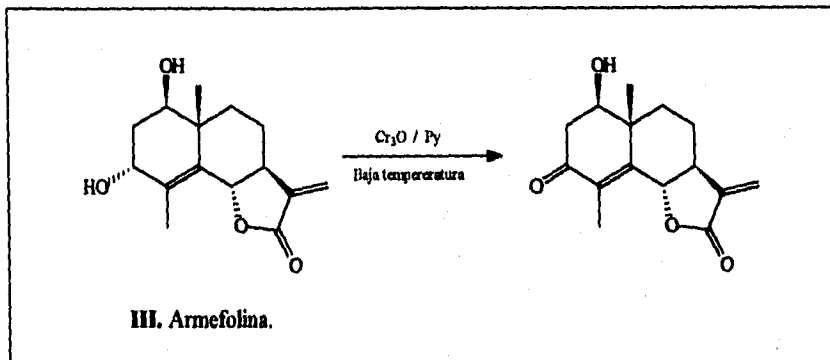


Figura XXIV. Reacción de oxidación de la Arnefolina (III)<sup>59</sup>.

Además, los datos de la sustancia aislada de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* concuerdan con una sustancia aislada en 1977 de *Artemisia mexicana* var. *angustifolia* denominada *Armexifolina*, en la cual la posición del hidroxilo no estaba bien definida, situándolo preferentemente en el C-9<sup>60</sup>.

De esta manera se concluye que la *Armexifolina* (IV) y la sustancia aislada de las fracciones [325-396(116)], en discusión en el presente trabajo, son la misma; siendo esta la primera vez que se informa dicha sustancia en *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

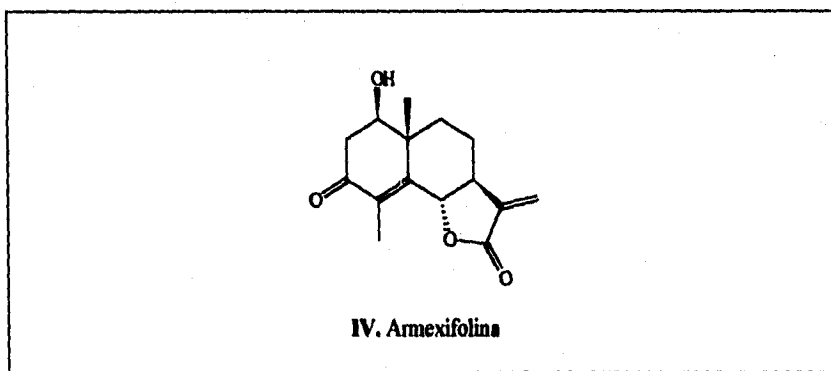


Figura XXV. Armexifolina (IV).



Cabe destacar que los datos de RMN<sup>1</sup>H de la Armexifolina obtenida en 1984 se obtuvieron en un equipo de 100 MHz y los obtenidos en el presente estudio en un equipo de 500 MHz; por lo que estos últimos datos, corrigen a algunos de los reportados anteriormente:

- a) La multiplicidad de la señal de H-1 es un doble de tripletes (*dt*) y no doble de doble (*dd*).
- b) La multiplicidad de la señal de H-2 reportada como un multiplete (*m*), son dos señales diferentes, una a  $\delta 2.7$  para H-2 $\alpha_{ec}$  y la otra a  $\delta 2.61$  para H-2 $\beta_{ax}$ , ambas con una multiplicidad doble de doble (*dd*).
- c) El desplazamiento químico de H-6 es  $\delta 4.74$  con una multiplicidad doble de doble (*dd*), y no un desplazamiento de  $\delta 4.27$  con una multiplicidad doble de cuarteto (*dq*).
- d) La multiplicidad de la señal de H-14 es doble de doble (*dd*), y no un singulete (*s*) como se había informado.

Por último, en los datos de RMN<sup>13</sup>C los desplazamientos para C-11 y C-12 informados en 1984<sup>39</sup> se encuentran invertidos, es decir, los desplazamientos correctos son: para C-11,  $\delta 137.7$ , y para C-12,  $\delta 169.1$ ; y no  $\delta 169.0$  y  $\delta 137.9$ , respectivamente, como se encontraban reportados. Esto es debido a que el C-12, es el carbono del carbonilo de la lactona y el C-11 es carbono base del doble enlace exocíclico, por lo que el desplazamiento de este último debe ser menor.

Del residuo de las fracciones [109-169(511-526)] y [109-169(527-541)] aplicado en CCP, se aislaron 4.4 mg de una sustancia cristalina amorfa con punto de fusión de 187-191°C. En su espectro de EM(IE), se observa su ión molecular a  $m/z$  280 (29.6%). En su espectro de IR (espectro 12), aparece  $3537\text{ cm}^{-1}$  una banda que corresponde a un grupo hidroxilo y en  $1749$  y  $1682\text{ cm}^{-1}$ , se observan dos bandas que nos indican la presencia de una  $\gamma$ -lactona y posiblemente de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

De las fracciones más polares de este mismo extracto, se aislaron una serie de sustancias; que por la cantidad aislada, no se pudieron analizar totalmente por métodos espectroscópicos. Sin embargo, se obtuvieron sus espectros de IR que revelan información muy interesante:

- De los eluatos más polares de la recromatografía de las fracciones [109-169], se aislaron dos sustancias que en sus espectros de IR (espectros 14 y 15), muestran las señales características de una  $\gamma$ -lactona y de grupos hidroxilos (Tabla IX).

Datos principales de IR de las sustancias aisladas de las fracciones más polares del extracto etanólico.							
Fracción	Espectro	Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )					
109-169	14		3457	1766		1661	
109-169	15		3459	1767		1678	
233-281	16		3435	1770	1716	1682	
502-520	17	3605	3435	1768	1717	1678	1601
557-573	18	3609	3438	1766	1731	1682	
608-615	19	3604	3436	1767	1712	1686	
636-697	20		3418	1762	1715	1683	
397-501	21	3599	3438	1768	1712		

Tabla IX. Bandas principales de absorción IR de las sustancias aisladas en las fracciones más polares del extracto etanólico.

- Señales semejantes (Tabla IX), se observan en los espectros de IR de las sustancias aisladas de las fracciones [233-281] (espectro 16), [502-520] (espectro 17), [557-573] (espectro 18), [608-615] (espectro 19) y [636-697] (espectro 20).
- Asimismo el sólido aislado de la fracción [397-501], revela en su espectro de IR (espectro 21), la presencia de varios grupos hidroxilos y de grupos carbonilos que podrían formar parte de una sustancia muy polar (Tabla IX).

## B. ESTUDIO BIOLÓGICO.

### B.1. Bioensayo en *Artemia salina* L.

Como puede observarse en la Tabla III, los extractos diclorometánico ( $CL_{50} = 201 \mu\text{g/ml}$ ) y etanólico de hojas y tallo ( $288 \mu\text{g/ml}$ ) resultaron ser los más tóxicos para *Artemia salina*. Los extractos restantes, a excepción del hexánico y etanólico de tallo, también pueden considerarse activos ya que el valor de  $CL_{50}$  es menor a  $1000 \mu\text{g/ml}$ <sup>43</sup>.

El análisis químico del extracto etanólico, mostró que sus constituyentes son principalmente compuestos polihidroxilados y lactonas sesquiterpénicas altamente oxigenadas, lo cual dificulta su separación y purificación; además, la cantidad que se aisló dificulta su análisis espectroscópico. Para poder determinar con mayor precisión la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas en *Artemia salina* es necesario aislar y purificar mayor cantidad de estas sustancias. Como ya se indicó anteriormente, el extracto diclorometánico, mostró estar constituido por varias lactonas sesquiterpénicas<sup>19</sup>, por lo que sería importante proceder a su análisis y evaluación biológica.

- Señales semejantes (Tabla IX), se observan en los espectros de IR de las sustancias aisladas de las fracciones [233-281] (espectro 16), [502-520] (espectro 17), [557-573] (espectro 18), [608-615] (espectro 19) y [636-697] (espectro 20).
- Asimismo el sólido aislado de la fracción [397-501], revela en su espectro de IR (espectro 21), la presencia de varios grupos hidroxilos y de grupos carbonilos que podrían formar parte de una sustancia muy polar (Tabla IX).

## B. ESTUDIO BIOLÓGICO.

### B.1. Bioensayo en *Artemia salina* L.

Como puede observarse en la Tabla III, los extractos diclorometánico ( $CL_{50} = 201 \mu\text{g/ml}$ ) y etanólico de hojas y tallo ( $288 \mu\text{g/ml}$ ) resultaron ser los más tóxicos para *Artemia salina*. Los extractos restantes, a excepción del hexánico y etanólico de tallo, también pueden considerarse activos ya que el valor de  $CL_{50}$  es menor a  $1000 \mu\text{g/ml}$ <sup>43</sup>.

El análisis químico del extracto etanólico, mostró que sus constituyentes son principalmente compuestos polihidroxilados y lactonas sesquiterpénicas altamente oxigenadas, lo cual dificulta su separación y purificación; además, la cantidad que se aisló dificulta su análisis espectroscópico. Para poder determinar con mayor precisión la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas en *Artemia salina* es necesario aislar y purificar mayor cantidad de estas sustancias. Como ya se indicó anteriormente, el extracto diclorometánico, mostró estar constituido por varias lactonas sesquiterpénicas<sup>19</sup>, por lo que sería importante proceder a su análisis y evaluación biológica.

Por otra parte, se puede decir que el extracto hexánico no contiene sustancias tóxicamente activas frente a *Artemia salina*; o si las contiene, se encuentran en menor concentración. Estudios químicos y biológicos, previamente informados en la literatura especializada indican que los principales constituyentes químicos presentes en este extracto son los monoterpenos, los cuales han presentado una importante actividad insecticida, larvicida y antimicrobiana<sup>7,18,46</sup>; sólo que estas sustancias se obtienen más fácilmente por destilación por arrastre de vapor.

Con respecto a la Arglanina (II) y su  $\beta$ -pirazolina (V), se encontró que la primera es un poco menos activa que el extracto etanólico de hojas y tallo ( $CL_{50} = 324 \mu\text{g/ml}$ ). Su producto de reacción con diazometano en éter etílico, la  $\beta$ -pirazolina, no presenta toxicidad frente a *Artemia salina* ( $CL_{50}$  no calculable); esto indica que el doble enlace exocíclico de la  $\gamma$ -lactona puede jugar un papel muy importante en su toxicidad frente a *Artemia salina*, al grado de reducirse totalmente si desaparece dicho enlace. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en otras investigaciones, donde sugieren que el grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona es el responsable de las actividades biológicas de las lactonas sesquiterpénicas<sup>37,40</sup>.

## B.2. Pruebas antimicrobianas.

Todos los extractos evaluados presentaron una ligera actividad a una concentración de  $1.11 \mu\text{g/ml}$  contra *Staphylococcus aureus*, mientras que el extracto etanólico de hojas y tallo presentó además, actividad contra *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto hexánico resultó activo contra *Streptococcus faecalis* (la actividad en este último fue mayor que en los demás). Esto quiere decir que en todos los extractos se deben encontrar sustancias con actividad antimicrobiana.

No necesariamente los mismos productos naturales que producen actividad en un extracto, la producen en los demás, porque no se tiene la seguridad de que las sustancias estén presentes en todos ellos. Por ejemplo, el extracto hexánico tiene sustancias poco polares tales como los aceites esenciales, monoterpenos o sustancias con grupos funcionales poco polares, cuya actividad antimicrobiana radica en la facilidad que tienen para atravesar la membrana celular de los microorganismos. Es por ello que tal vez sea el único extracto con actividad contra *Streptococcus faecalis*. Mientras que en los extractos etanólicos, como se había mencionado anteriormente, contienen sustancias polihidroxiladas y sustancias con grupos funcionales muy polares, cuyo mecanismo de acción antimicrobiana principal es la de desnaturalizar a las proteínas e inactivar enzimas (mecanismo semejante al de los fenoles y polioles utilizados como antisépticos). Como estos últimos mecanismos son muy rápidos y potentes, es por ello que los extractos etanólicos presentan un espectro más amplio en comparación con los demás extractos<sup>61-62</sup>.

Cabe mencionar que el extracto diclorometánico, presentó el menor valor de CL<sub>50</sub>, y presentó una baja actividad antimicrobiana. Este resultado sugiere que no existe una relación entre la toxicidad en *Artemia salina* y la actividad antimicrobiana.

Al evaluar algunas fracciones de la separación cromatográfica del extracto etanólico de hojas y tallo, se observa nuevamente la tendencia a inhibir a *Staphylococcus aureus* y a *Listeria monocytogenes* pero no a *Pseudomonas aeruginosa*. Este último resultado, puede deberse a que *Pseudomonas aeruginosa* es inhibida por un efecto de sinergismo de todas las sustancias presentes -y en poca cantidad- en el extracto íntegro, y al fraccionar éste, las sustancias presentes en cada fracción no pueden inhibir el crecimiento del mencionado microorganismo por sí solas. En cambio las sustancias de cada fracción sí pueden inhibir a *Staphylococcus aureus* y a *Listeria monocytogenes*. Cabe mencionar que la actividad de las fracciones es mayor comparada con la del extracto, debido a que las sustancias se encuentran en mayor concentración.

Las fracciones más polares del mismo extracto presentan además, actividad contra *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*. Mientras que las fracciones [698-735] contra *Candida albicans*. Sin embargo, de éstas últimas fracciones no se pudo aislar alguna sustancia en una cantidad que permitiera su análisis espectroscópico completo, sólo se tienen sus espectros de IR que revelan que se tratan de lactonas hidroxiladas muy polares (espectros 12-á 21), ni su evaluación biológica.

Con respecto a las sustancias puras, al evaluarlas a una concentración de 333 µg/ml, la Ludovicina A y la β-pirazolina de la Arglanina presentaron una ligera actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Este resultado sugiere que la actividad antimicrobiana de las lactonas sesquiterpénicas no tiene una clara dependencia de la presencia del grupo α-metilen-γ-lactona, tal y como lo sugiere Giesbrecht<sup>63</sup>; sino que se tienen que considerar la presencia de otros grupos tales como la cetona α,β-insaturada de la Arglanina o el grupo epóxido de la Ludovicina A, así como los grupos hidroxilo presentes. Estudios ya informados sobre la actividad antimicrobiana de las lactonas sesquiterpénicas, sugieren que la posición y configuración de los grupos funcionales adicionales a la α-metilen-γ-lactona, pueden aumentar o reducir su actividad<sup>63</sup>. En el presente estudio no fue posible determinar la relación estructura-actividad debido a que sólo se probaron tres lactonas sesquiterpénicas.

Al aumentar la concentración de la Arglanina a 1.11 mg/ml, mostró una ligera actividad contra *Staphylococcus aureus*. Algunos autores han sugerido que a dicha concentración, la utilidad de la sustancia como antimicrobiano es pobre, ya que no presenta una potencia alta (el sulfato de estreptomycin presenta inhibición total con este método a una concentración de 10 µg/ml)<sup>49</sup>, pero proporciona un esqueleto base que por medio de transformaciones químicas puedan modificar grupos funcionales que aumenten su potencia y por lo tanto, su utilidad práctica.

Cabe mencionar que la CL<sub>50</sub> de la Arglanina fue de 324 µg/ml, mientras que la pirazolina no presenta CL<sub>50</sub>; sin embargo, esta última presentó una actividad antimicrobiana un poco mayor a la primera. Esto quiere decir, que no existe una relación directa, en el caso particular de las lactonas sesquiterpénicas aisladas, entre la CL<sub>50</sub> y la actividad antimicrobiana presentada; es decir, que la manifestación de un valor de CL<sub>50</sub> alto no indica necesariamente que las lactonas presente actividad antimicrobiana, sino que, pueden tener otro tipo de bioactividad, hasta ahora desconocida para las sustancias aisladas.



## Conclusiones.

---

### CONCLUSIONES.

---

En el estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, se lograron aislar e identificar cuatro lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de eudesmano: Ludovicina A (I), Arglanina (II), Armefolina (III) y Armexifolina (IV). Cabe señalar que es la primera vez que se informa como constituyente de esta especie vegetal a la Armexifolina. Además, con el estudio espectroscópico realizado a esta sustancia, se pudieron realizar algunas correcciones a sus datos de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C previamente ya informados.

Del estudio biológico se puede concluir que *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* presenta ligera actividad contra *Staphylococcus aureus* independientemente del extracto del que se trate. Asimismo, el espectro de la actividad antimicrobiana se incrementa ligeramente con el aumento de la polaridad del extracto. Las sustancias aisladas presentaron ligera actividad antimicrobiana que es de poca utilidad práctica; pueden representar una fuente potencial de estructuras para la obtención de nuevas y mejores sustancias antimicrobianas.

Con respecto a los bioensayos en *Artemia salina*, estos resultados no siguen un comportamiento semejante al descrito anteriormente; ya que una sustancia o extracto muy activo en *Artemia salina* no muestra una actividad antimicrobiana similar. Por lo que se sugiere, que la actividad en *Artemia salina* indica que los extractos y las sustancias presentan otro tipo de actividad diferente a la antimicrobiana.

**Supercias.**

---

### SUGERENCIAS.

---

- Se sugiere analizar más a fondo los diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, en especial el extracto  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ , el cual es de una polaridad mayor a la del EtOH, debido a que al aumentar la polaridad del extracto hay más posibilidades de encontrar alguna actividad biológica importante.
- Se sugiere realizar un estudio biológico de las diferentes lactonas sesquiterpénicas aisladas de ésta y de otras especies vegetales de la Medicina Tradicional Mexicana, para determinar si alguna o algunas de ellas presentan actividades biológicas y para tratar de determinar su relación estructura-actividad. Recientemente en Canadá se ha comenzado a comercializar un medicamento contra la migraña denominado *Tanacet 125*, cuyo principio activo es la *Partenólida*, una lactona sesquiterpénica aislada de *Tanacetum parthenium* (Figura XXVI).
- Asimismo, se recomienda poner especial atención a los compuestos polihidroxilados que se obtengan en las fracciones más polares de los extractos, porque posiblemente en ellos se encuentran actividades biológicas interesantes.

## TANACET 125\* EFFECTIVE MIGRAINE PREVENTION

The name TANACET 125 is derived from the European botanical name for Feverfew, *Tanacetum parthenium*. The number "125" signifies that 125 mg of specially selected STANDARDIZED CERTIFIED FEVERFEW leaf powder is contained in each tablet.

### 1. The purpose of TANACET 125.

TANACET 125 has been specifically formulated for migraine sufferers. A continuous daily dosage of TANACET 125 (feverfew) has been clinically proven effective for the prevention of migraine attacks. TANACET 125 is the first over-the-counter medication to be approved for the prevention of migraine in Canada by the Health Protection Branch of Health and Welfare Canada.

### 2. How does TANACET 125 prevent migraine headaches?

The active ingredient in TANACET 125 is "Parthenolide". Parthenolide is a compound which inhibits the release of the nerve impulse transmitter serotonin. Migraine pain is caused when serotonin is released from small blood vessels in the brain. TANACET 125 inhibits the release of serotonin which regulates the dilation of these blood vessels, thereby relieving symptoms of migraine headaches.

### 3. Scientific Surveys of TANACET 125.

A survey of feverfew products commercially available in North America and the United Kingdom was completed by the Bureau of Drug Research of Health and Welfare Canada. This study showed by scientific analysis that TANACET 125 has the highest parthenolide content of all products examined, more than twice the minimum level stipulated by the Health Protection Branch for feverfew leaf products, allowed to make the claim for effectiveness in migraine prevention.

### 4. Hospital and University Research Studies.

Two clinical trials conducted in the United Kingdom have established the effectiveness of feverfew leaf preparations in reducing the incidence and duration of migraine attacks, as well as the degree of nausea. Over 70% of patients suffered from migraine expences relief ranging from the reduction to total elimination of symptoms while consuming feverfew daily.

Studies performed at the Queen's Medical Center of the University of Nottingham in the

United Kingdom had established that the level of feverfew's potency in migraine prevention was closely related to parthenolide content. In bioactivity studies conducted at the University of Ottawa, parthenolide was shown to be the active constituent of feverfew compounds in inhibiting the release of the body chemical serotonin from small cells in the blood (platelets).

### 5. The safety of TANACET 125.

The plant feverfew has been used for centuries as a headache treatment and is free of adverse side effects; only mild allergic reactions and occasional mouth ulcers have been reported. TANACET 125 has been formulated in less than 7% of consumers, and promptly with the reduction or discontinuation of TANACET 125.

The feverfew used in TANACET 125 is specially selected and grown in a controlled environment without the use of pesticides or herbicides to ensure the finest grade of medicinal herb.

TANACET 125 is free of yeast, cfm, soy, wheat, sugar, milk, sodium and animal by-products.

### 6. Dosage and how to take TANACET 125.

It is recommended that 1 or 2 tablets of TANACET 125 be taken daily 1 hour after breakfast or lunch and maintain the same therapeutic level of parthenolide in the blood. If the initial response to treatment is inadequate, dosage may be reduced. It is advised that the use of TANACET 125 beyond four months be maintained only on the advice and consultation of a physician.

### 7. Important Notice to Consumers.

Caution: Do not take TANACET 125 during pregnancy or when breast feeding. Keep out of reach of children.

For more information, please ask your Pharmacist, Physician or Natural Health Care Practitioner. Or call the toll free number: 1-800-567-5060.



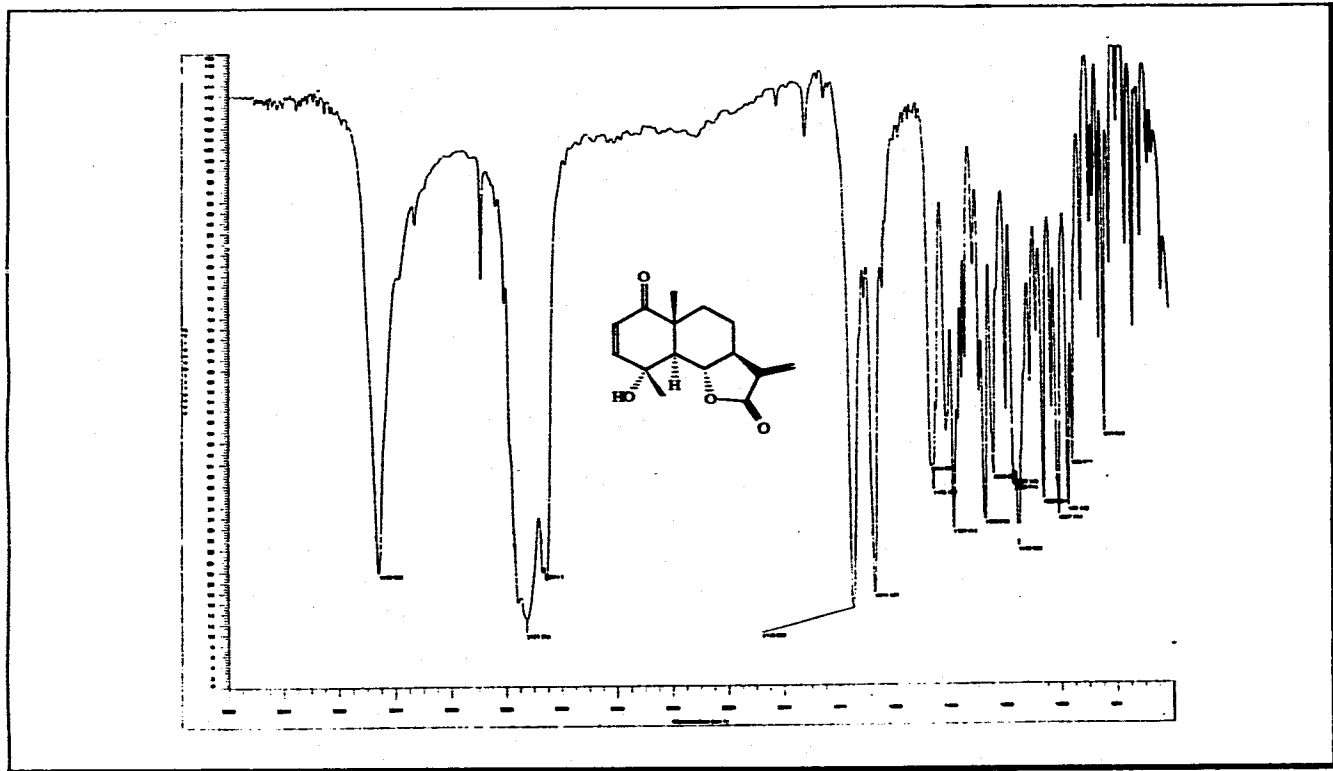
Abbey Pharmaceuticals Inc.  
Amphibious Building  
4706 Highway 50 West  
Toronto, Ontario, M3J 1P3

Distributed in Canada exclusively by Nutricorp International, a Division of C.E. Jamieson & Company Limited.

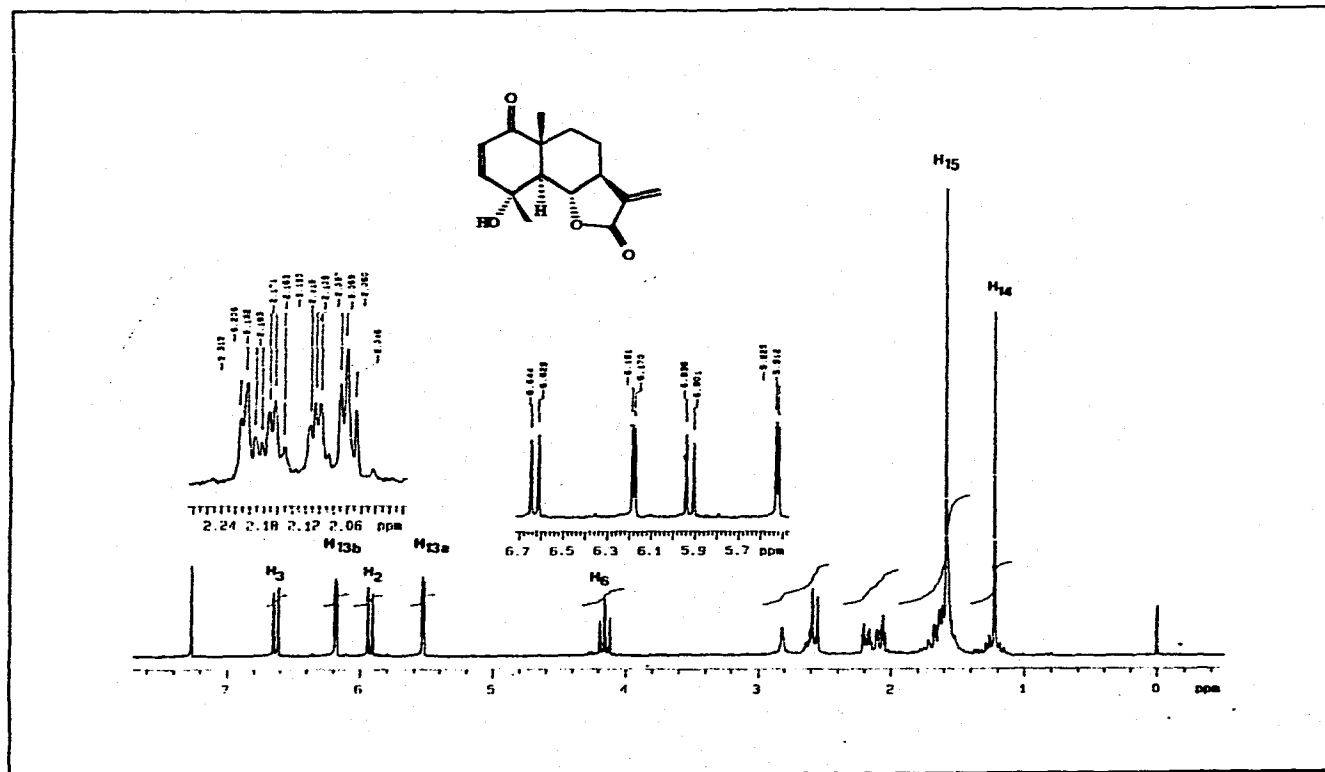
\*Registered Trademark

Figura XXVI. Propaganda distribuida por Nutricorp International (C.E. Jamieson & Company Limited) del Canadá, sobre el medicamento contra la migraña, Tanacet 125.

**Espectros de las sustancias.**

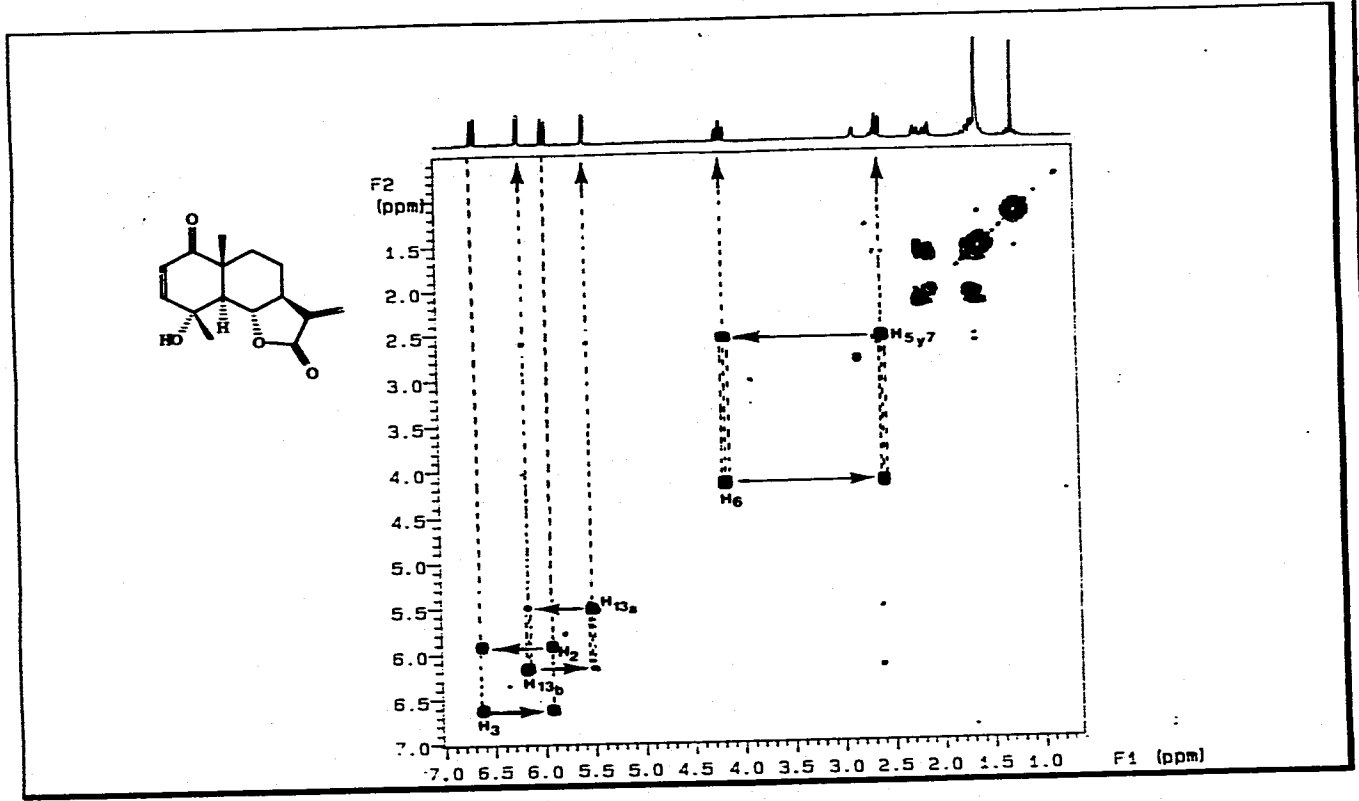


**Espectro 1.** Espectro de IR ( $\text{CHCl}_3$ ) de la Arglanina (II).

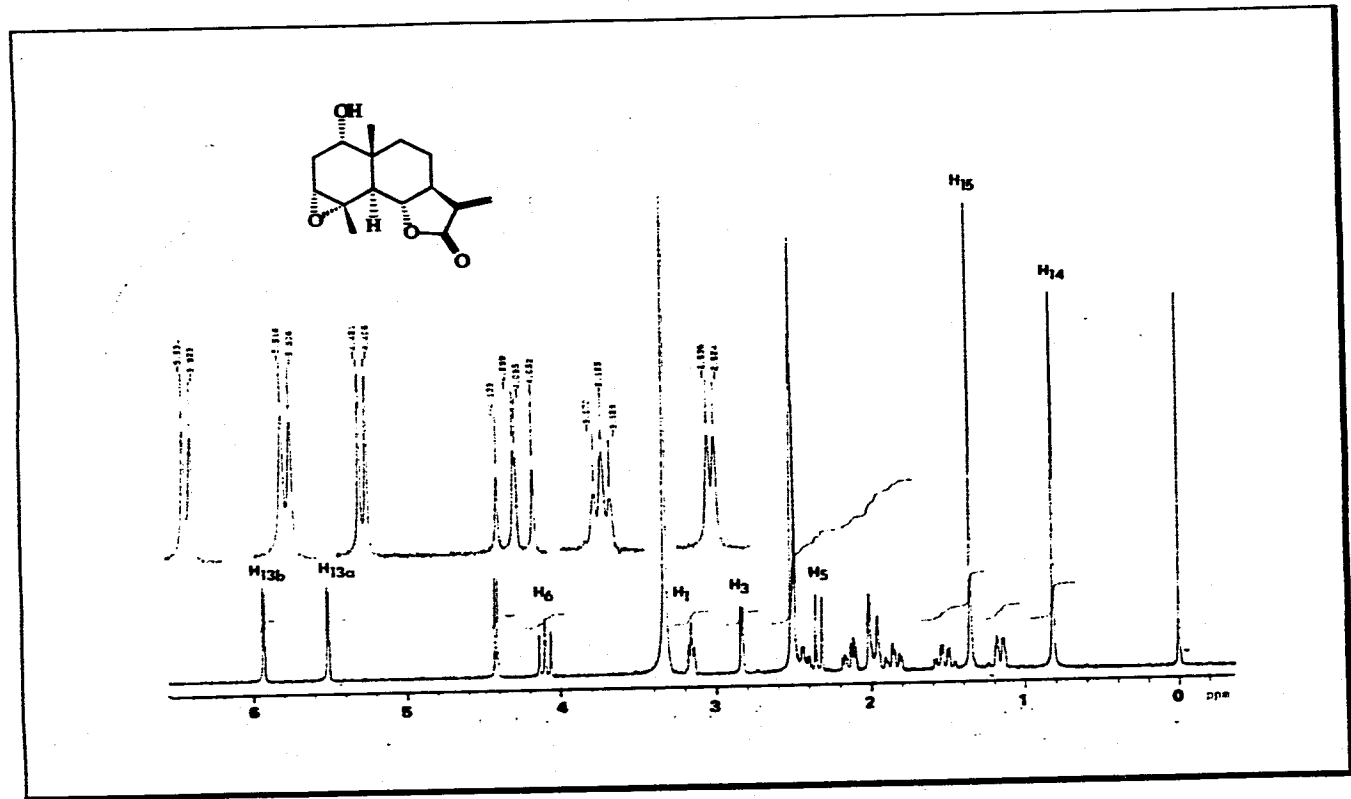


Espectro 2. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Argianina (II).

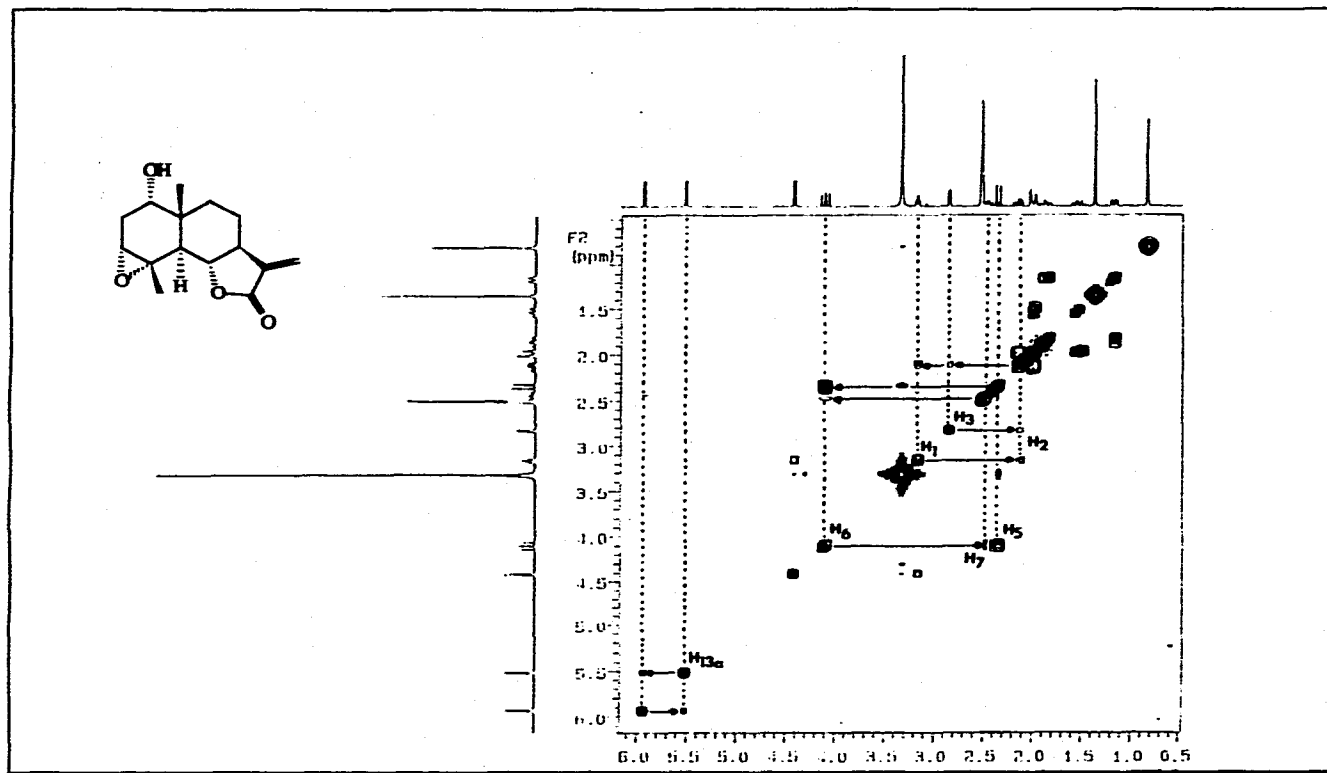




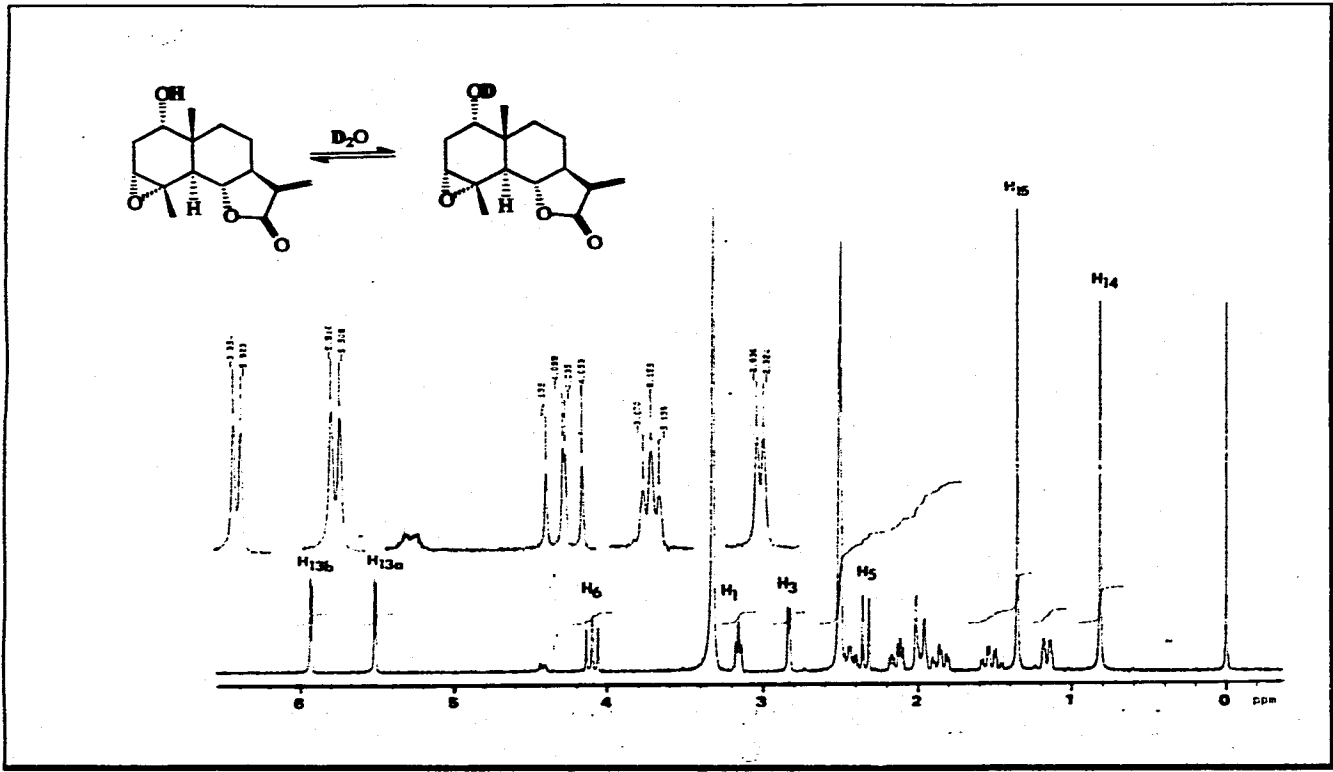
Espectro 3. Espectro COSY (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Arglanina (II).



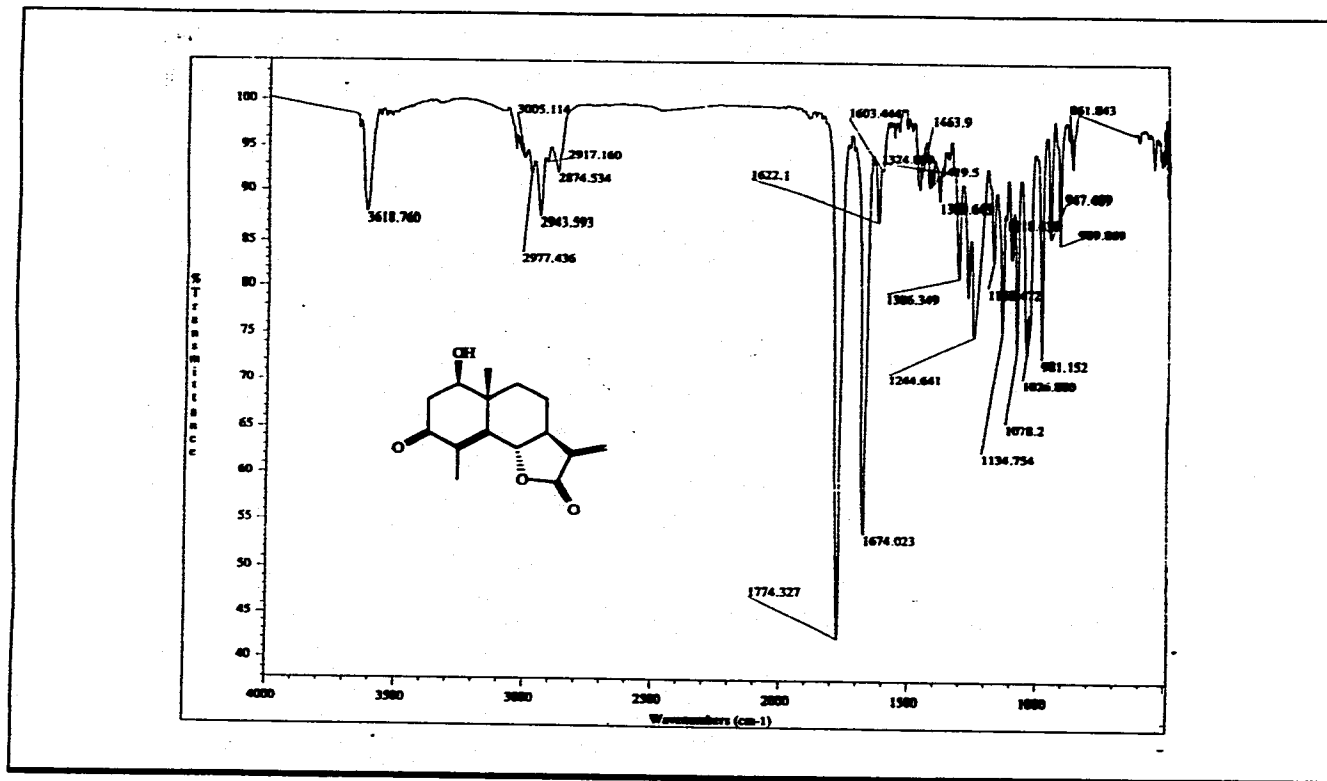
Espectro 4. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Ludovicina A (I).



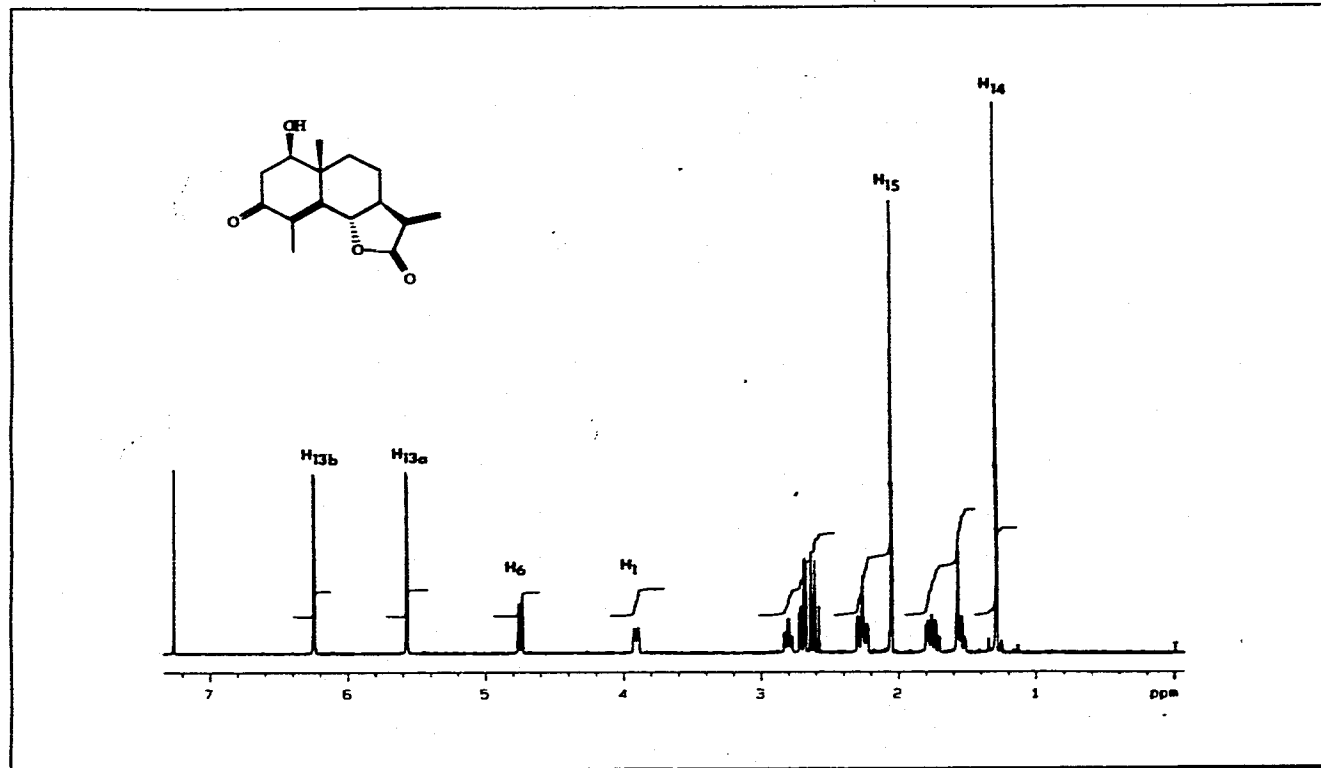
Espectro 5. Espectro COSY (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Ludovicina A (I).



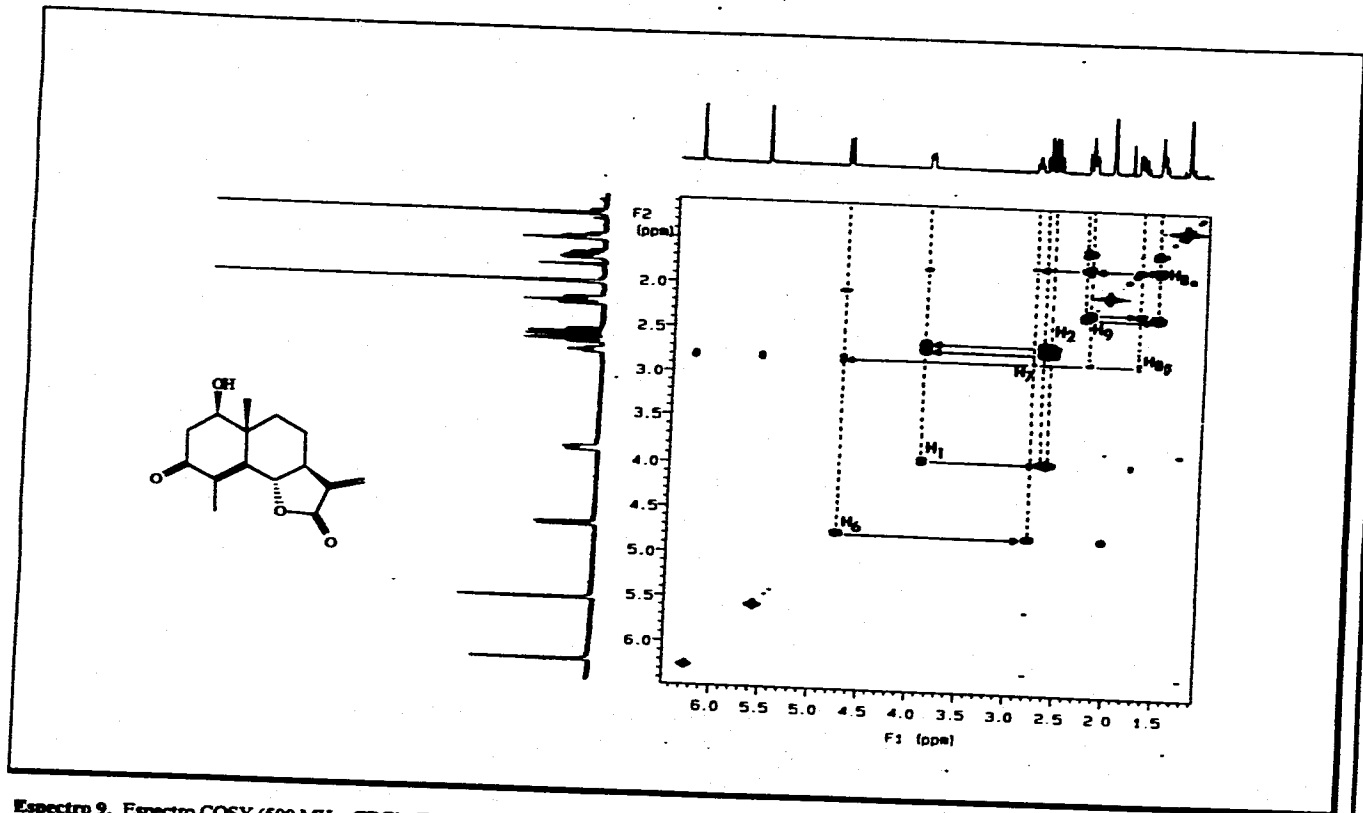
Espectro 6. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O, TMS) de la Ludovicina A (I).



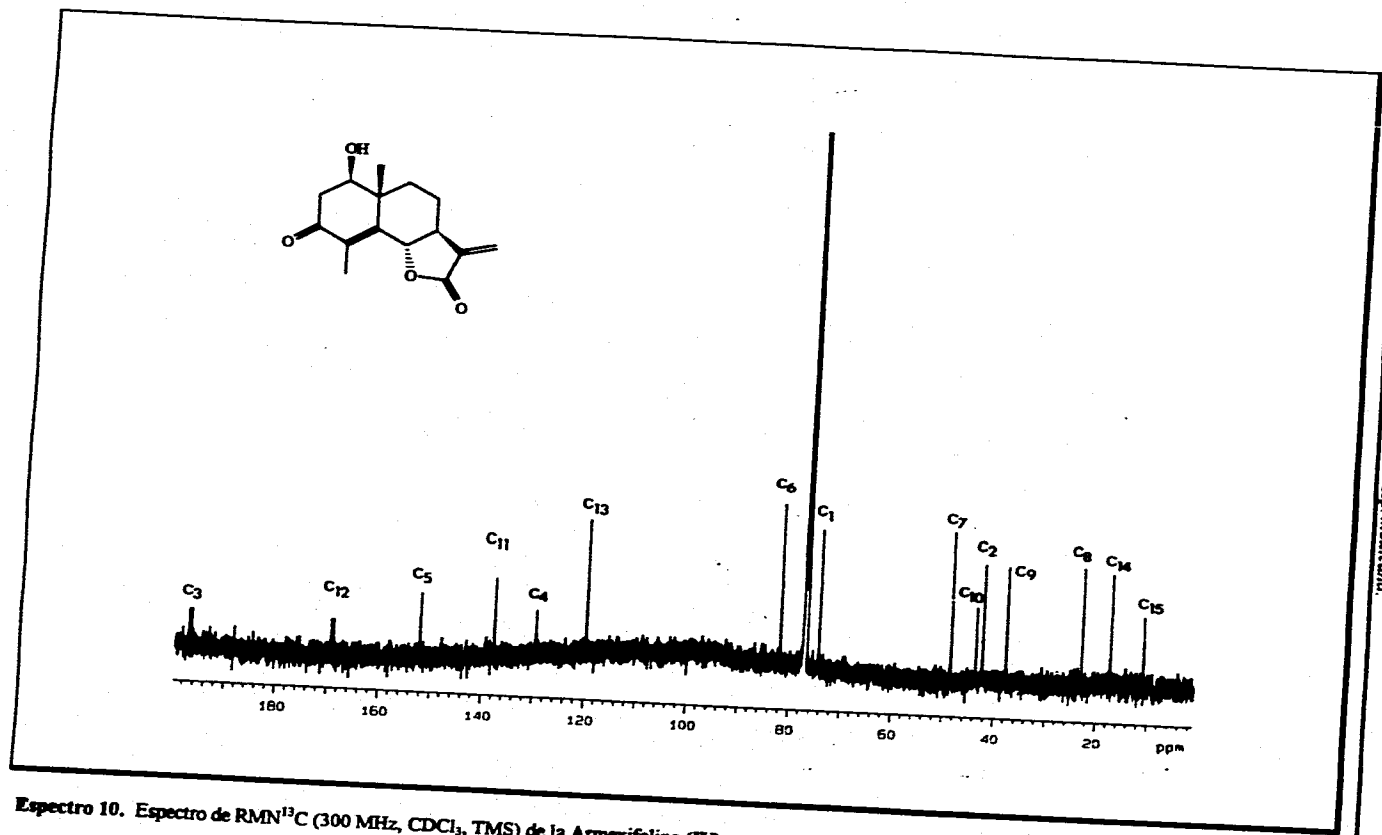
Espectro 7. Espectro de IR ( $\text{CHCl}_3$ ) de la Armetifolina (IV).



Espectro 8. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).

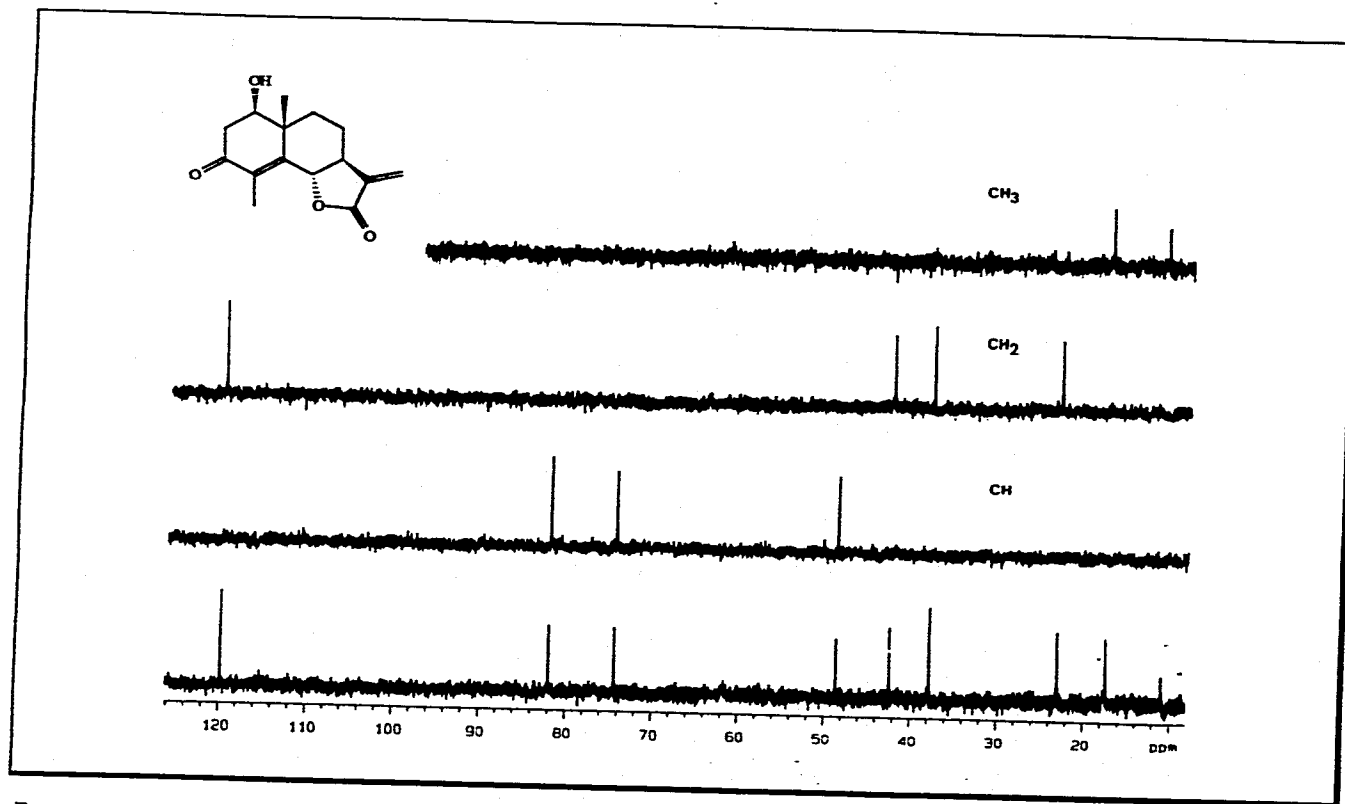


Espectro 9. Espectro COSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Artemisifolina (IV).

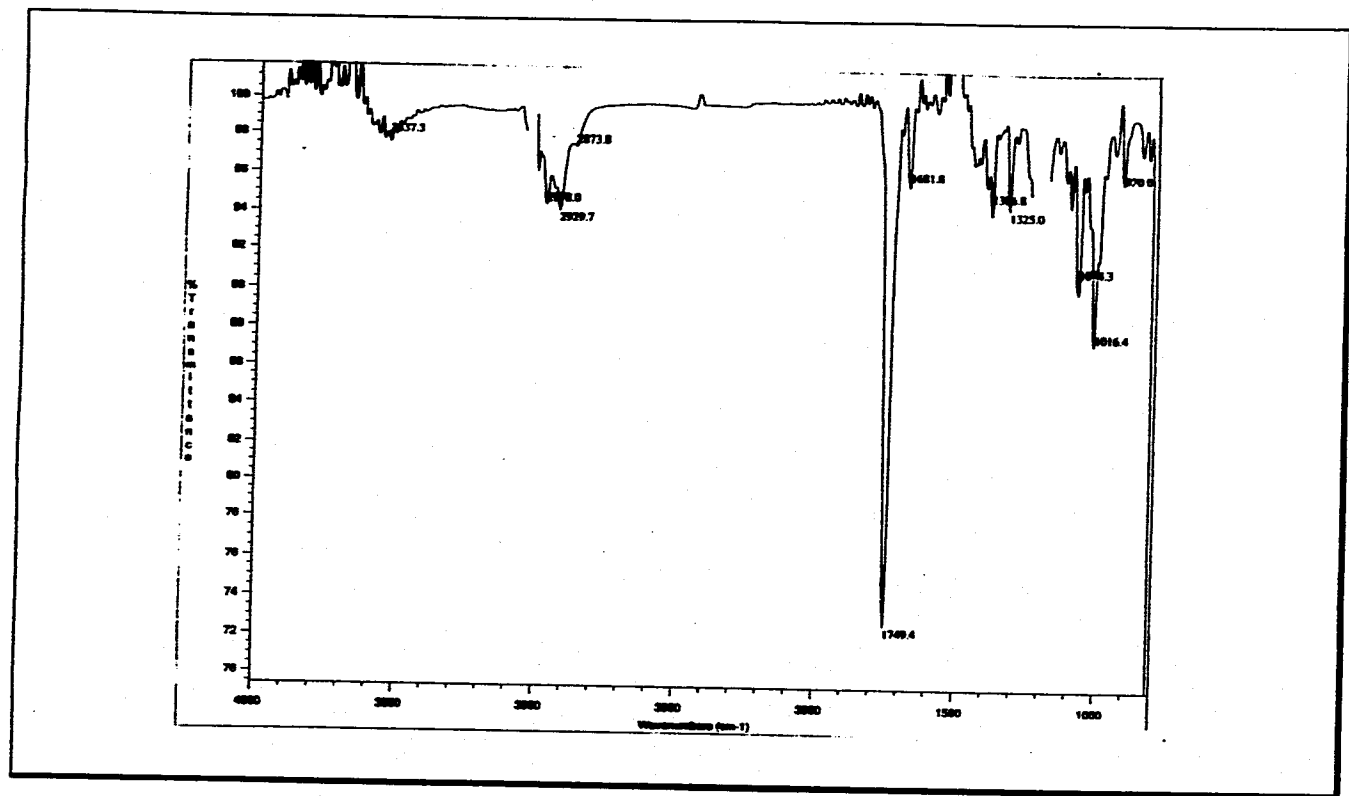


Espectro 10. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Armexifolina (IV).

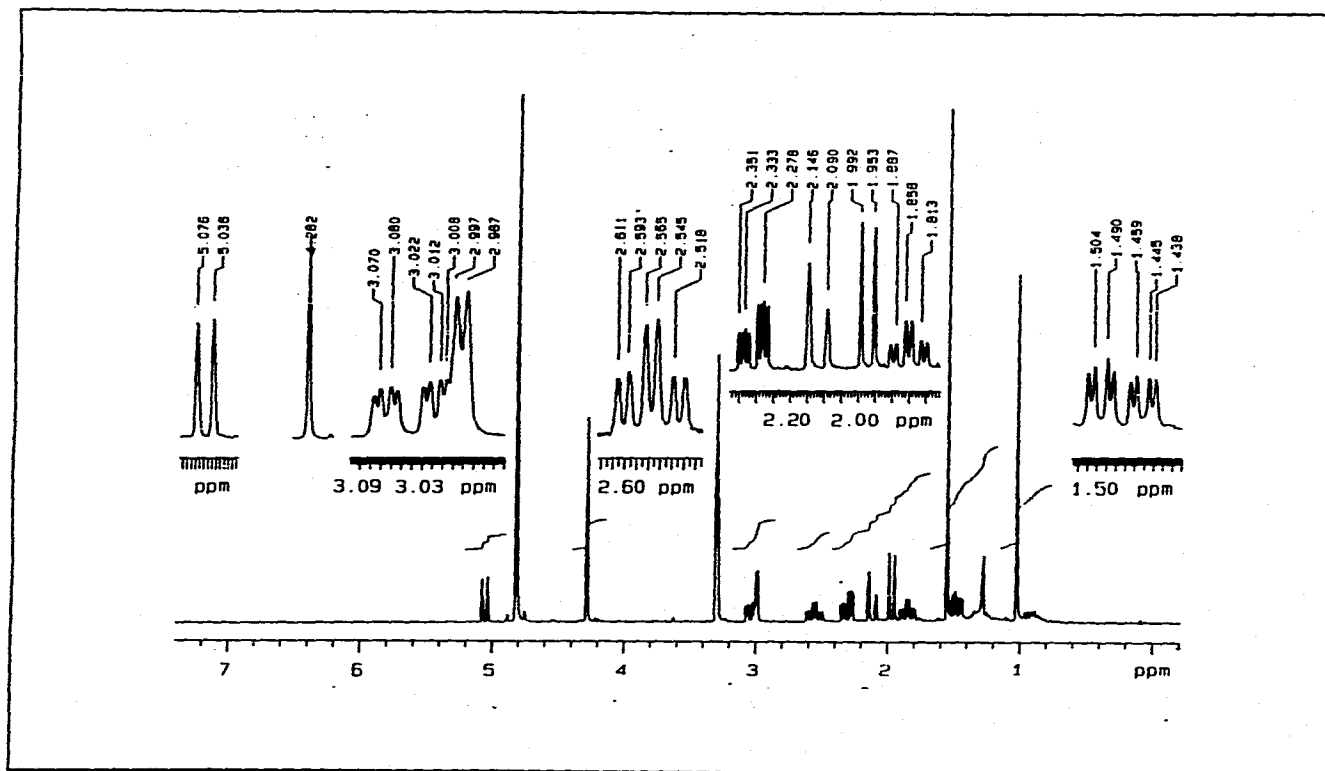




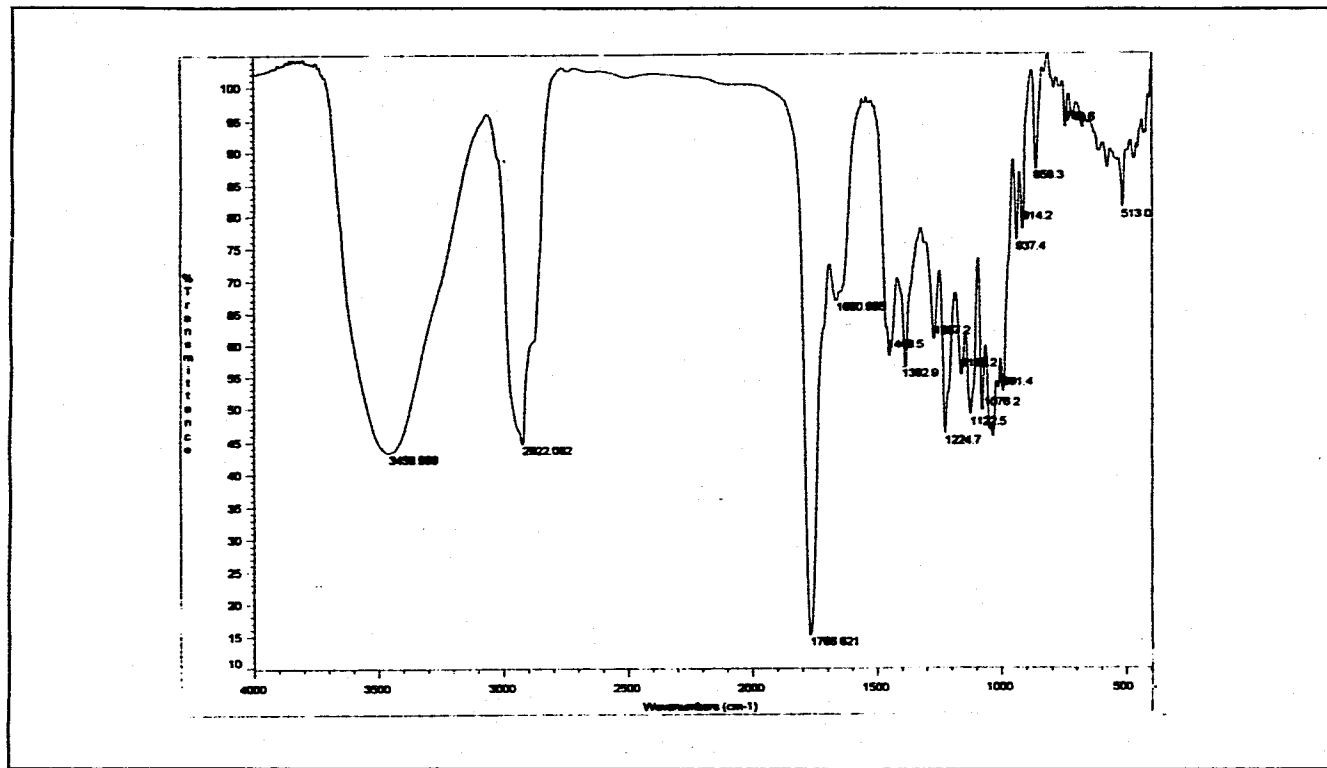
Espectro 11. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) de la Artemesifolina (IV).



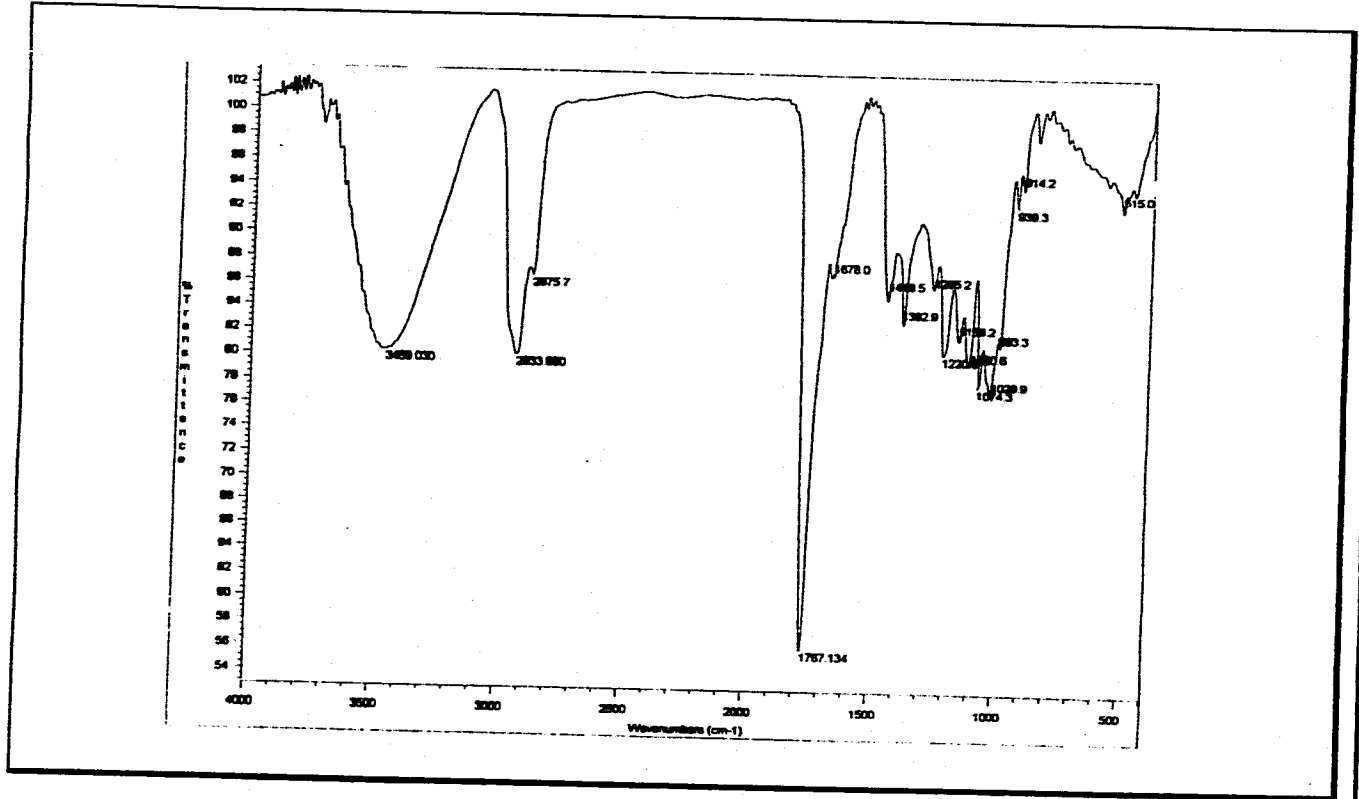
Espectro 12. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [109-169(511-526)].



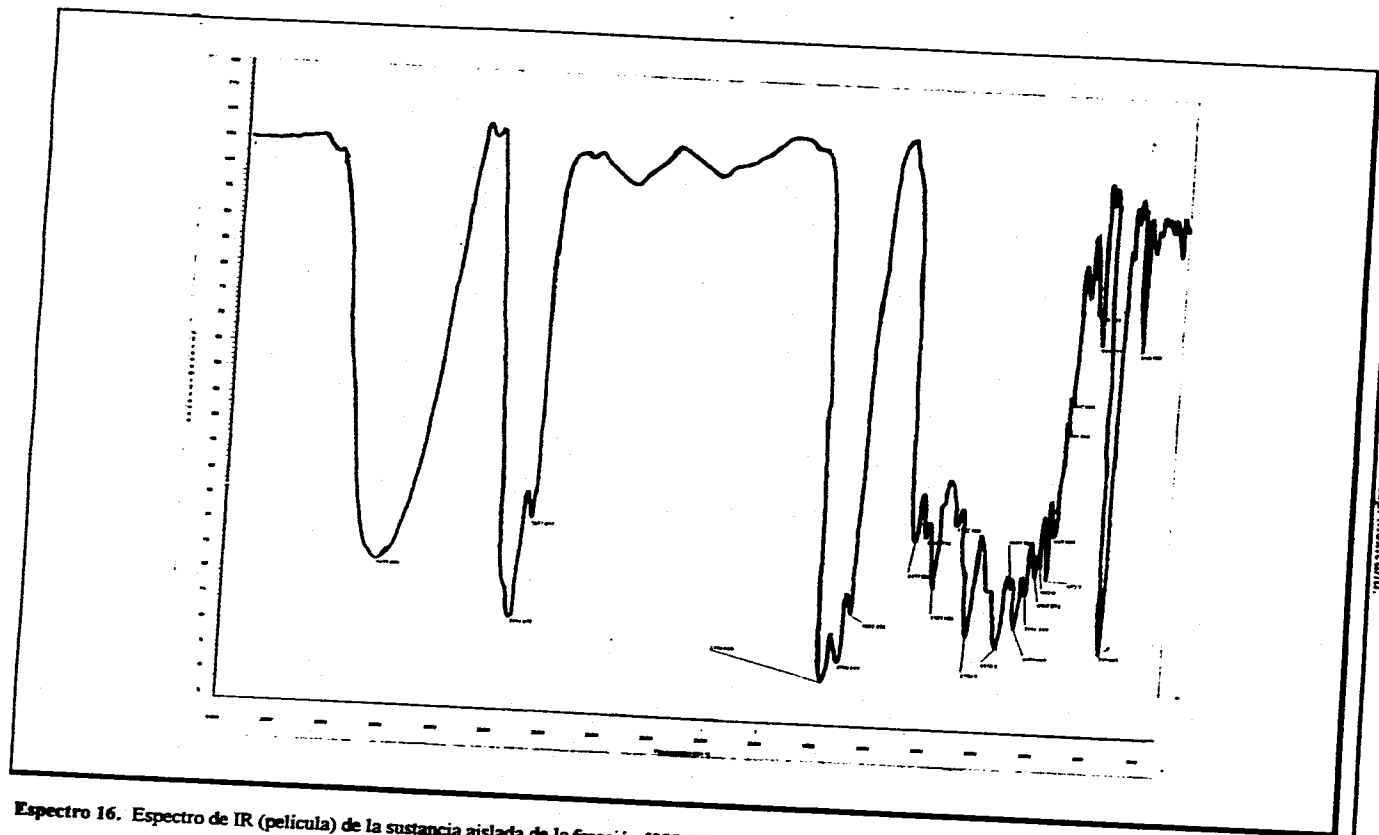
Espectro 13. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS) de la sustancia aislada de la fracción [109-169(511-526)].



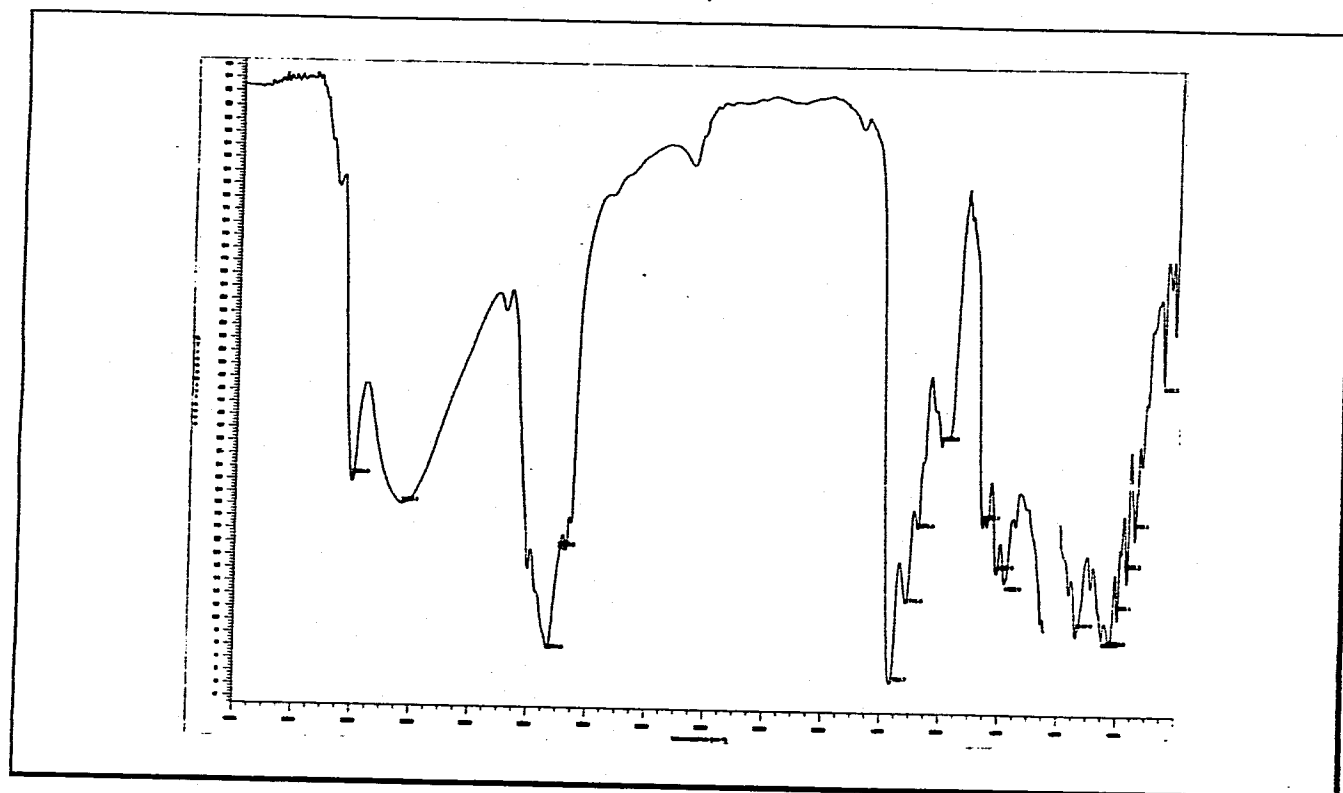
Espectro 14. Espectro de IR (KBr) del sólido 1 obtenido de la fracción [109-169(527-541)].



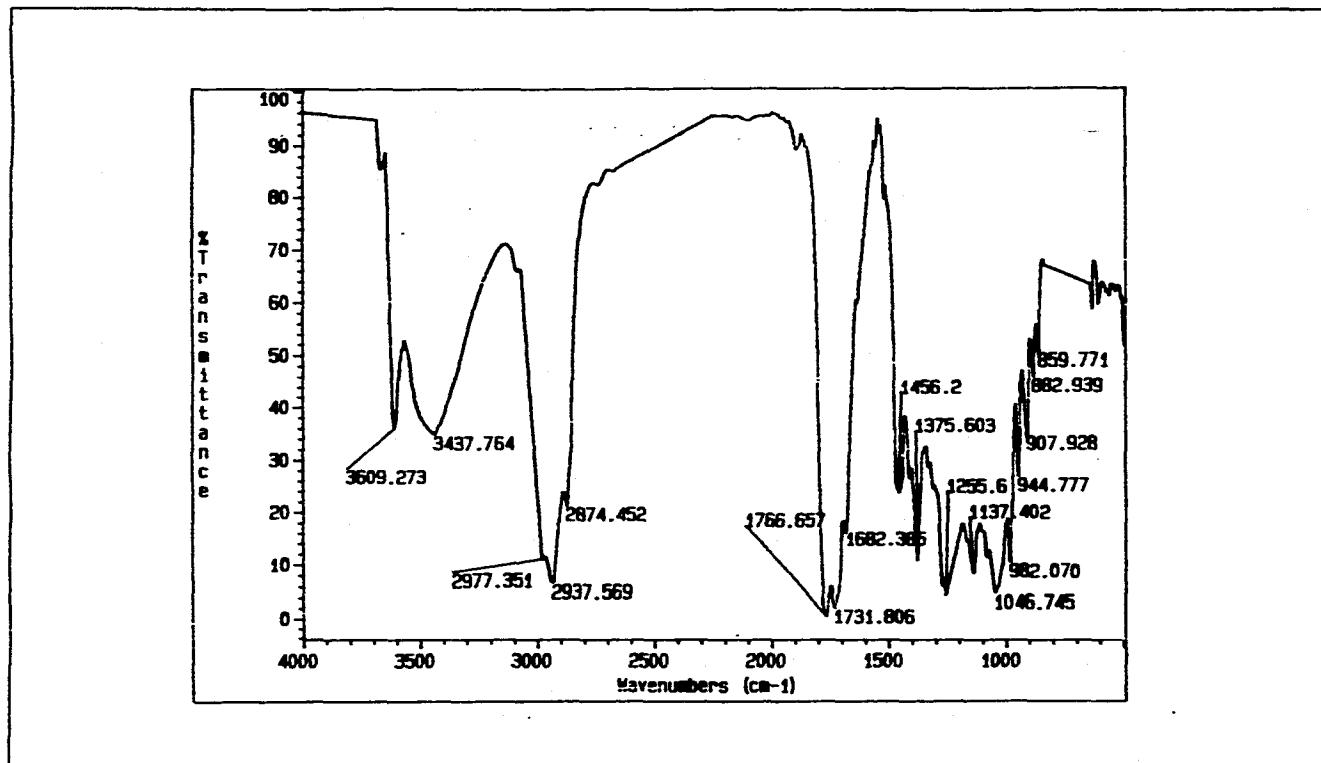
Espectro 15. Espectro de IR (KBr) del sólido 2 obtenido de la fracción [109-169(527-541)].



Espectro 16. Espectro de IR (película) de la sustancia aislada de la fracción [233-281].

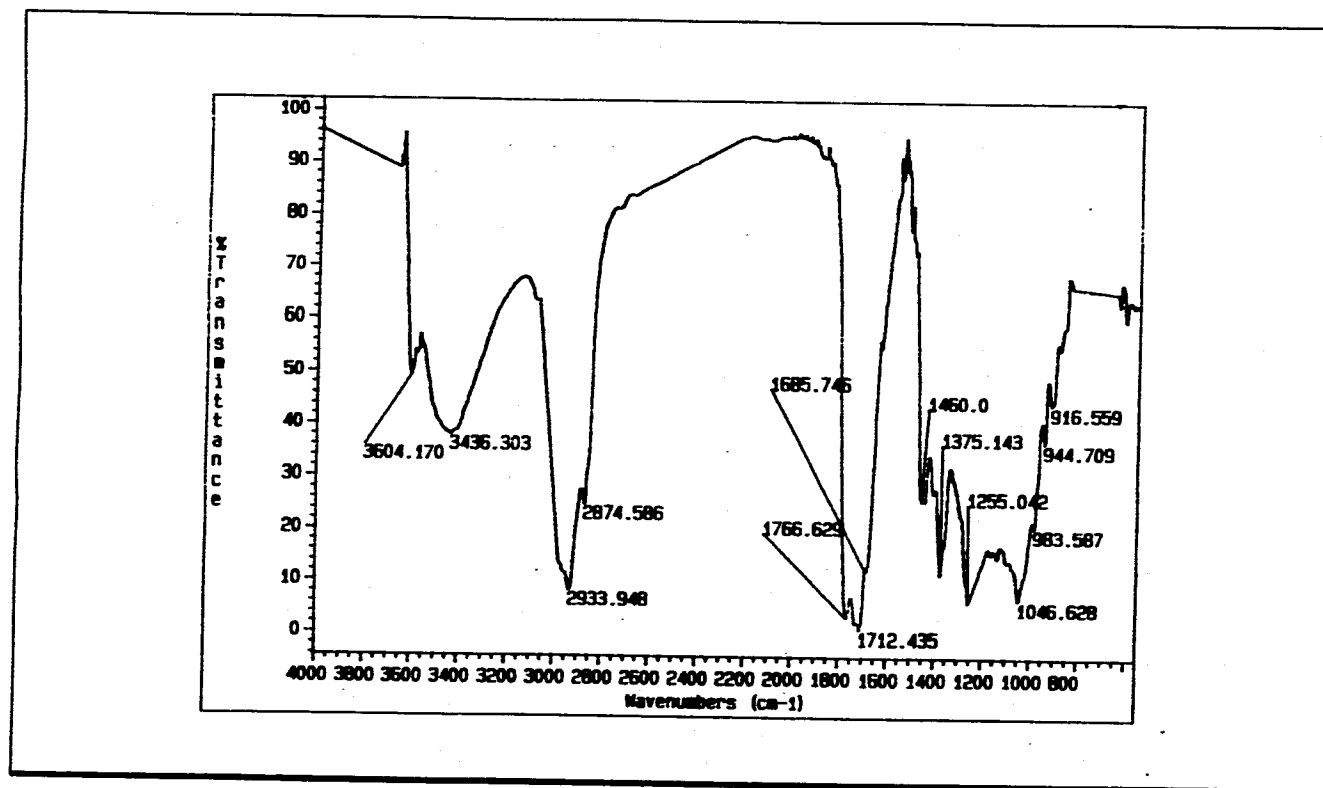


Espectro 17. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [502-520].

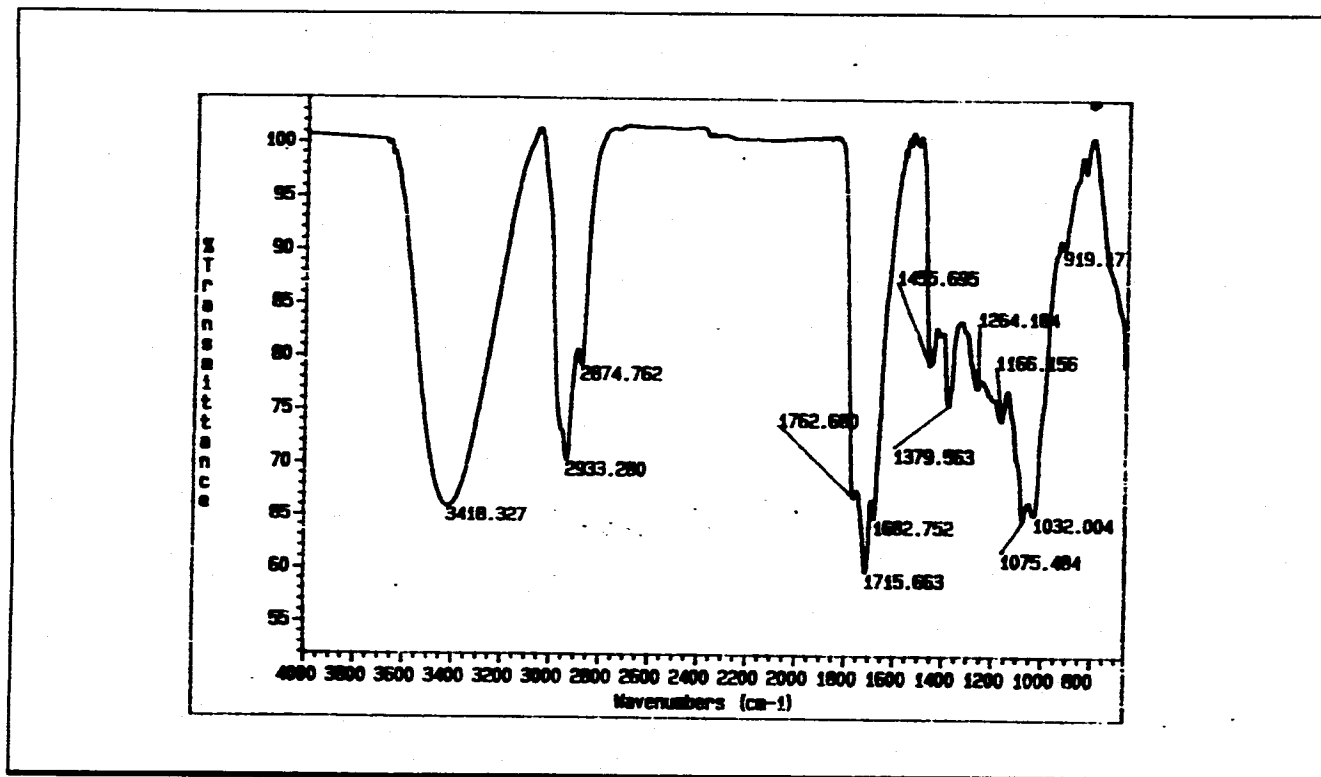


Espectro 18. Espectro de IR ( $\text{CHCl}_3$ ) de la sustancia aislada de la fracción [557-573].

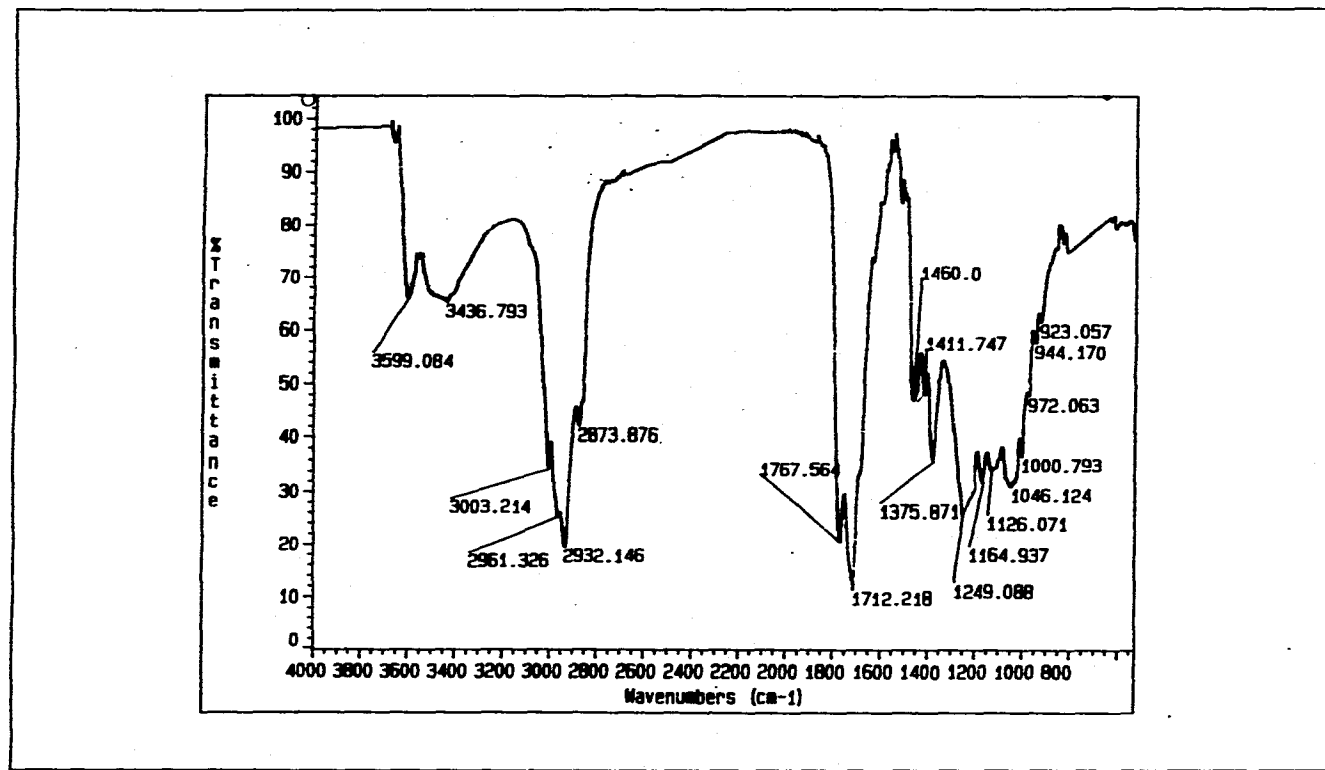




Espectro 19. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [608-615].



Espectro 20. Espectro de IR (suspensión en nujol) de la sustancia aislada de la fracción [636-697].



Espectro 21. Espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>) de la sustancia aislada de la fracción [397-501].

**Bibliografía.**

**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Bye, R., Linares, E. and Estrada, E.; Biological diversity of Medicinal Plants in Mexico. *Phytochemistry of Medicinal Plants. 1994 Phytochemical Society of North America. Annual Meeting. Simposium. Mexico* (1994).
2. Capasso, F., Balastrieri, B. y Mascolo, N.; Actualidad de las Plantas Medicinales. *Medicina Tradicional*, 3, 53-61 (1980).
3. La herbolaria y sus potencialidades. *Investigación y Desarrollo*, 3, 8 (1995).
4. Lozoya, X., Aguilar, A. y Camacho, J.; Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Revista Médica del IMSS*, 25, 283-291 (1987).
5. Pérez, M.; Plantas Medicinales, etnobotánica y fitoquímica: importancia de la investigación interdisciplinaria. *Folium (Instituto de Química)*, 2, 2-3 (1994).
6. Santos, S.; Lactonas sesquiterpénicas - aplicações farmacológicas e quimiotaxonómicas. *Boletim SPQ*, 36, 41-43 (1989).
7. Duke, S., Paul, R. and Lee, M.; Terpenoids from the genus *Artemisia* as potential pesticides. *Biologically Active Natural Products*, 88, 318-334 (1988).
8. Linares, E., Flores, B. y Bye, R.; *Selección de Plantas Medicinales de México*, Edit. Limusa, México, 42-43 (1988).
9. Hernández, F.; *Historia Natural de la Nueva España. Obras Completas*. Edit. UNAM, México, 42-43 (1988).

10. Baytelman, B.; *De enfermos y curanderos. Medicina Tradicional de Morelos*. Edit. INAH, México, (1959).
11. Martínez, M.; *Las Plantas Medicinales de México*. 6a. ed. Edit. Botas, México, 133-135 (1992).
12. Marco, J. and Barbera, O.; Natural Products from the genus *Artemisia* L.. *Studies in Natural Products Chemistry*, **7**, 201-264 (1990).
13. Kelsey, R. and Shafizadeh, F.; Sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia*. *Phytochemistry*, **18**, 1591-1611 (1979).
14. Geissman, T. and Irwin, M.; Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*. *Pure and Applied Chemistry*, **21**, 167-180 (1970).
15. Geissman, T.; Sesquiterpenoid lactones of *Artemisia* species. I. *Artemisia princeps* pamp. *Journal of Organic Chemistry*, **31**, 2523-2526 (1966).
16. Vasanth, S., Gopal, R. and Kundu, A.; Biological activities of the genus *Artemisia* L. *Indian Drugs*, **28**, 170-177 (1991).
17. Cubukcu, B., Bray, D., Warhust, D., Mericli, A., Ozhatay, N. and Sariyar G.; *In vitro* antimalarial activity of crude extracts and compounds from *Artemisia abrotanum* L. *Phytotherapy Research*, **4**, 203-204 (1990).
18. Mehrotra, S., Rawat, A. and Shome, U.; Antimicrobial activity of the essential oils of some Indian *Artemisia* species. *Fitoterapia*, **54**, 65-68 (1993).

19. Ruiz, A.; *Análisis fitoquímico de Artemisia ludoviciana en busca de sustancias con propiedades antimaláricas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales, U.A.E.M., México, (1991).
20. Sánchez, O.; *La flora del Valle de México*. 6a ed. Edit Herrero, S.A., México, 432 (1980).
21. Ortiz, B.; Aztec sources of some Mexican Folk Medicine. *Folk Medicine. The Art and the Science*. (Steiner, R.) American Chemical Society, U.S.A., 1-21 (1986).
22. Klayman, D.; Quinhaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science*, **228**, 1049-1055 (1985).
23. Roth, R and Acton, N.; The isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Journal of Chemical Education*, **66**, 349-350 (1989).
24. Jing-Bo, Guo-Qiao Li, Xing-Bo Guo, Yun Cheung Kong and Keith, A.; Antimalarial activity of Mefloquine and Qinghaosu. *The Lancet*, 285-288, August 7 (1982).
25. Phillipson, J. and O'Neil, J.; *Antimalarial and amoebicidal Natural Products*. University of London, G. B., 49-64 (1990).
26. Malagón, F., Vázquez, J., Delgado, G. y Ruiz, A.; Ensayo biológico del extracto diclorometánico de *Artemisia ludoviciana* para buscar principios antimaláricos. *VIII Congreso Nacional de Parasitología*. Hidalgo, México, (1988).
27. Malagón, F., Vázquez, J., Delgado, G. y Ruiz, A.; Ethanollic extract of *Artemisia ludoviciana*: Effect on *Plasmodium berghei* infection in CDI mice. *IV Congreso Internacional sobre Malária e Babesioses*. Río de Janeiro, Brasil (1991).

28. Sánchez-Viesca, F. and Romo, J.; Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). *Tetrahedron*, **19**, 1285-1291 (1963).
29. Lee, K. and Geissman, T.; Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. Constituents of *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*, **9**, 403-408 (1970).
30. Romo, J. y Tello, H.; Estudio de la *Artemisia mexicana*. Armexina, un nuevo santanólido cuya lactona posee fusión *cis*. *Revista Latinoamericana de Química*, **3**, 122-126 (1972).
31. Domínguez, X. and Cárdenas, E.; Achillin and deacetilmatricarin from two *Artemisia* species. *Phytochemistry*, **14**, 2511-2512 (1975).
32. Jakupovic, J., Tan, R., Bohlmann, F., Boldt, P and Jia, Z.; Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*. *Phytochemistry*, **30**, 1573-1577 (1991).
33. Ruiz-Cancino, A., Cano, A. and Delgado, G.; Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*, **33**, 1113-1115 (1993).
34. Romo, J., Romo, A., Treviño, R., Joseph-Nathan and Díaz, E.; Constituents of *Artemisia* and *Chrysanthemum* species. The structures of Chrysartemins A and B. *Phytochemistry*, **9**, 1615-1621 (1970).
35. Romo, A.; *Productos Naturales de la flora mexicana*. Edit. Limusa, México, 69-137 (1985).
36. Domínguez, X.; *Métodos de investigación fitoquímica*. Edit. Limusa, México, 93-110 (1979).



37. Rodríguez, E., Towers, G. and Mitchell, J.; Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573-1580 (1976).
38. Manitto, P.; *Biosynthesis of Natural Products*. Ellis Horwood Ltd., Pub., England, 237-254 (1980).
39. Bruneton, J.; *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Edit. Acribia, España, 284-290 (1991).
40. Picman, A.; Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14, 255-281 (1986).
41. Kupchan, S., Eakin, M. and Thomas, A.; Tumor inhibitors. 69. Structure-citotoxicity relationships the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14, 1147-1152 (1971).
42. Picman, A. and Schneider.; Inhibition of fungal by selected sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21, 307-314 (1993).
43. Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D. and McLaughlin, J.; Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34 (1982).
44. Finney, D.; *Statistical method in biological assay*. Third edition. McMillan Pub. Co., USA, 349-403 (1978).
45. McLaughlin, J.; Crown gall tumours on potato disc and Brine Shrimp lethaly: Two simple bioassay for higher plant screening and fractionation. *Methods in Plant Biochemistry. Volume 6. Assay for bioactivity*. Academic Press Limited, U.S.A., 1-30 (1991).

46. Wang, Y., Toyota, M., Krause, F., Hamburger, M. and Hostettman, K.; Polyacetylenes from *Artemisia borealis* and their biological activities. *Phytochemistry*, **29**, 3101-3105 (1990).
47. Barahona, M., Cano, M. and Sánchez-Fortún, S.; Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*. *Revista de Toxicología*, **11**, 92-95 (1994).
48. Vanden, D. and Vlietinck, A.; Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry. Volume 6. Assay for bioactivity*. Academic Press Limited, U.S.A., 47-67 (1991).
49. Mitscher, L., Leu, R., Bathala, M., Wu, W. and Beal, J.; Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia*, **35**, 157-166 (1972).
50. Pomilio A. y Vitale, A., *Métodos experimentales de laboratorio en química orgánica*. Secretaría General de la O.E.A., U.S.A., (1988).
51. *Organic Syntheses Collective Volume 2* (Edited by A. Blatt). John Wiley and Sons, U.S.A., 165-167 (1943).
52. Noriega, J.; *Estudio de RMN<sup>13</sup>C en lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de Eudesmano y sus derivados, aislados de Artemisia ludoviciana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M., México (1995).
53. Silverstein, R., Clayton, G. and Morrill, T.; *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th edition. John Wiley and Sons, Singapore (1991).
54. Ananthasubramanian, L., Gopinath, H. and Bhattacharyya, S.; Infrared group frequencies of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone grouping in *cis*- and *trans*-eudesmanolides,

- germacranolides, elemic lactones and guaianolides. *Indian Journal of Chemistry*, **25B**, 380-383 (1986).
55. Samek, Z.; The determination of the stereochemistry of five-membered  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactones with an exomethylene double bond based on the allylic long-range couplings of exomethylene protons. *Tetrahedron Letters*, 671-676 (1970).
56. Ault, A. and Dudek, G.; *NMR an introduction to proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Holden-Day, Inc, U.S.A., 63-65 (1985).
57. Matsueda, S. and Geissman, T.; Sesquiterpene lactones of *Artemisia* species. III. Arglanine from *Artemisia douglasiana* Bess. *Tetrahedron Letters*, 2013-2015 (1967).
58. Kalinowski, H.; *Carbon-13 NMR spectroscopy*. John Wiley and Sons, Great Britain, 70-76, 109-110, 116-117 (1988).
59. Mata, R., Delgado, G. and Romo, A.; Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry*, **23**, 1665-1668 (1984).
60. Romo, R., Vázquez, F. and Zetina, C.; Lactonas sesquiterpénicas de *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, **8**, 127-130 (1977).
61. Tortora, G., Funke, B. and Case, C.; *Microbiology. An introduction*. 4th edition. the Benjamin/Cummings Pub. Co., U.S.A., 176-185 (1992).
62. Boyd, R.; *General microbiology*. Times Mirror/Mosby College Pub., U.S.A, 612-615 (1984).
63. Giesbrecht, A. Davino, S., Nassis, C., Young, M., Lopes, J., Rodrigues, D., Vichnewski, W., Nasi, A., Dias, D. and Lopes J.; Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Química Nova*, **13**, 312-314 (1990).