

50524
69

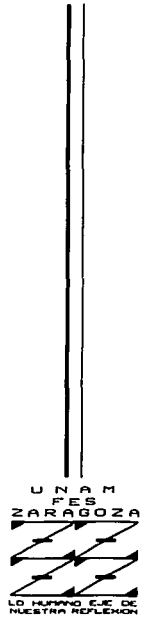


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO BIODIRIGIDO DE *Tanacetum parthenium* MEXICANA,
COMO INHIBIDOR DE CONTRACCIONES INDUCIDAS POR
SEROTONINA EN AORTA DE RATA WISTAR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
LIANA MEDINA CRUZ



MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2005

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

VOCAL: MTR. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

SECRETARIO: DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA

SUPLENTE: M. EN C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

SUPLENTE: Q.F.B. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ

SUSTENTANTE

LIANA MEDINA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio 126 del Conjunto E en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto IN 212300.

También se agradece el apoyo brindado por la Facultad de Química a través de la participación en el Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación".

Los resultados de esta investigación se presentaron en:

El 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy:

Liana Medina Cruz, Mirza Mezquita, Lino Reyes Trejo and Andrés Navarrete.

Essential oil of Feverfew grown in Mexico inhibits non-competitively 5-HT in rat aorta.

Oaxaca, México del 14 al 18 de Julio del 2001.

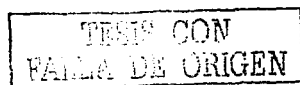
Y en la 7ª Expo Estudiantil de Iniciación Básica en la Investigación

Liana Medina Cruz y Andrés Navarrete.

Estudio biodirigido de *Tanacetum parthenium* mexicana, como inhibidor de contracciones inducidas por Serotonina en aorta de rata Wistar.

Facultad de Química, Departamento de Farmacia. UNAM. 30 Agosto del 2001.

C



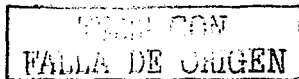
INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1 MIGRAÑA	3
2.1.1. Características	3
2.1.2. Patogenia	4
2.1.3. Tratamiento	5
2.1.3.1. Agudo	6
2.1.3.2. Profiláctico	8
2.1.3.3. Plantas medicinales	9
2.1.4. Respuesta vascular y migraña	10
2.1.4.1. Mediadores químicos	10
2.1.4.2. Serotonina (5-hidroxitriptamina)	12
2.1.4.3. Modelo en aorta torácica	13
2.2 <i>Tanacetum parthenium</i>	15
2.2.1. Generalidades	15
2.2.2. Composición química	17
2.2.3. Actividad biológica	24
2.2.3.1. Estudios clínicos	24
2.2.3.2. Actividad antiinflamatoria	26
2.2.3.3. Investigaciones realizadas con Serotonina	29
2.2.3.4. Inhibición de la contracción en anillos de aorta	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
6. MATERIAL Y MÉTODOS	35
6.1. MATERIAL VEGETAL	35
6.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO	35
6.3. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO CH_2Cl_2 DE LA PLANTA FRESCA	36
6.4. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	38
6.5. PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	38
6.6. ENSAYO BIOLÓGICO	39
6.6.1. Disección de la aorta torácica y sistema de registro	39
6.6.2. Actividad vasorelajante	40
6.6.3. Actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina	41
7. RESULTADOS	42
7.1. CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS DE CH_2Cl_2 DE LA PLANTA SECA, FRESCA Y PARTENÓLIDA	42

7.2. ACTIVIDAD VASORELAJANTE DE LOS EXTRACTOS DE CH ₂ Cl ₂ A NORADRENALINA	43
7.3. ACTIVIDAD INHIBITORIA A LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR SEROTONINA	45
7.3.1. Estabilidad de la preparación	45
7.3.2. Efecto antagonista de los extractos obtenidos de la planta fresca, seca y aceite esencial, sobre las contracciones inducidas por Serotonina	46
7.3.3. Efecto antagonista reversible del Aceite esencial	51
7.4. ACTIVIDAD INHIBITORIA A LA SEROTONINA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE CH ₂ Cl ₂ DE PLANTA FRESCA	52
7.4.1. Fraccionamiento biodirigido	52
7.4.2. Actividad antagonista a las contracciones inducidas por Serotonina y compuestos de las fracciones primarias y secundarias	52
7.5. CROMATOGRAMA DE GASES Y ESPECTRO DE MASAS DE LAS FRACCIONES ACTIVAS F-5.2 Y F-5.3	56
7.6. COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Tanacetum parthenium</i>	61
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	68
9. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS	74
10. BIBLIOGRAFÍA	76



INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Estructura de la Ergotamina	7
Fig. 2	Estructura del Sumatriptan	8
Fig. 3	Estructura de la Serotonina (5-Hidroxitriptamina)	12
Fig. 4	<i>Tanacetum parthenium</i> , especie mexicana (Santa María)	16
Fig. 5	Estructura química de la Partenólida	17
Fig. 6	Germacranólidos presentes en <i>Tanacetum parthenium</i>	18
Fig. 7	Eudesmanos presentes en <i>Tanacetum parthenium</i>	18
Fig. 8	Guayenólidas presentes en <i>Tanacetum parthenium</i>	19
Fig. 9	Compuestos encontrados de <i>T. parthenium</i> mexicana	20
Fig. 10	Principales compuestos de las partes aéreas de <i>T. parthenium</i>	21
Fig. 11	Éteres espirocetalicos de <i>T. parthenium</i>	22
Fig. 12	Compuestos del aceite esencial de <i>T. parthenium</i>	23
Fig. 13	Diagrama general para la obtención de los extractos de <i>T. parthenium</i>	36
Fig. 14	Diagrama general del fraccionamiento del extracto de CH_2Cl_2 de la planta fresca de <i>Tanacetum parthenium</i>	37
Fig. 15	Cromatograma de gases de la partenólida TR 24.65 minutos (1) y Espectro de masas (2).	42
Fig. 16	Cromatograma de gases de la partenólida (1), extracto CH_2Cl_2 de la planta fresca (2), extracto de la planta seca (3).	43
Fig. 17	Efecto vasorelajante de los extractos de CH_2Cl_2 a la contracción inducida por noradrenalina. Planta fresca, Planta seca, Aceite esencial y Control.	44

Fig.18 Curva Concentración-Respuesta para evaluar la estabilidad de la preparación	45
Fig.19 Curvas concentración-respuesta acumulativas de Serotonina, pruebas control	46
Fig.20 Curva Concentración-Respuesta del efecto inhibitorio del extracto de CH ₂ Cl ₂ de la planta fresca	47
Fig.21 Curva Concentración-Respuesta del efecto inhibitorio del extracto de CH ₂ Cl ₂ de la planta seca	48
Fig.22 Curva Concentración-Respuesta del efecto inhibitorio del aceite esencial	49
Fig.23 Curva Concentración-respuesta del efecto inhibitorio del Aceite esencial, Planta fresca y planta seca a la respuesta contráctil inducida por Serotonina (3x10 ⁻⁵ M)	50
Fig.24 Curva Concentración-Respuesta del Aceite esencial como inhibidor a las contracciones inducidas por Serotonina, efecto reversible	51
Fig.25 Inhibición a la respuesta contráctil inducida por Serotonina por las fracciones primarias del extracto de CH ₂ Cl ₂ de <i>T. parthenium</i> en anillos de aorta de rata	53
Fig.26 Inhibición a la respuesta contráctil inducida por Serotonina por las fracciones secundarias del extracto de diclorometano de <i>T. parthenium</i> en anillos de aorta de rata	54
Fig.27 Comparación del efecto inhibitorio de las contracciones inducidas por Serotonina del extracto de la planta fresca, de la fracción F-5, F-5.2 y F-5.3	56
Fig.28 Cromatograma de Gases de la fracción F-5.2 (1) y el Espectro de masas del pico correspondiente al compuestos mayoritario	57
Fig.29 Cromatograma de Gases de la fracción F-5.22 (1) y el Espectro de masas del pico correspondiente al compuestos mayoritario	58

Fig.30 Cromatograma de Gases de la fracción F-5.3 (1) y los Espectros de masas de los picos correspondientes a los compuestos mayoritarios	60
Fig.31 Cromatograma de Gases por IE del Aceite esencial de <i>T. parthenium</i>	61
Fig.32 Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> mexicana. p-Cimeno y α -Terpineno.	63
Fig.33 . Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> mexicana. Alcanfor y Terpeneol-4.	64
Fig.34 Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> mexicana. Ocimenona y Cariofileno.	65
Fig.35 Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> mexicana. β -Farneseno y Oxido de cariofileno.	66
Fig.36 Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> mexicana. Éteres espirocetalicos.	67

I

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efectos adversos de Santa María.	26
Tabla 2	Concentraciones Inhibitorias 50 (CI ₅₀) de las fracciones activas en el fraccionamiento biodirigido del extracto de CH ₂ Cl ₂ de planta fresca.	55

ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina
PG	Prostaglandina
LTC	Leucotrienos
PAF	Factor Activador de Plaquetas
VIP	Péptido Vasoactivo Intestinal
PHI	Péptido Histidina Isoleucina
PACAP	Péptido Activador Pituitario Adenilato Ciclasa
CGRP	Péptido Gen Relacionado Calcitonina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
GRP	Péptido Relacionado con la Gastrina
CCK	Colecistokinina
FRDE	Factor de Relajación Derivado del Endotelio
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
PMNs	Polimorfonucleares
COX	Ciclooxigenasa
LPS	Lipopolisacáridos
TX	Tromboxano
LT	Leucotrieno
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CG-EM	Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas
AA	Anillos de Aorta
EEM	Error Estándar de la Media
TR	Tiempo de Retención
m/z	Relación masa/carga
IE	Impacto electrónico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos

K

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN

La migraña es una enfermedad que padece del 10 al 20 % de la población mundial (Peroutka, 2001), afectando principalmente a personas jóvenes. El tratamiento terapéutico de esta enfermedad incluye una serie de fármacos, así como algunas plantas medicinales, entre las cuales se encuentra *Tanacetum parthenium* conocida comúnmente en México como Santa María. Esta planta también se ha utilizado además para aliviar los dolores menstruales, el asma, la artritis y como antipirético. Las hojas son ingeridas frescas, en una dosis diaria de 2 o 3 hojas (Foster, 1991).

La Serotonina, también llamada 5-Hidroxitriptamina (5-HT) es una de las sustancias químicas que está a la vanguardia en la investigación de la migraña (Peroutka, 2001 y Blau, 1992). El importante papel que juega la Serotonina en la fisiopatología de la migraña se hace evidente si se considera que se ha encontrado un aumento en metabolitos de Serotonina en orina durante el ataque de migraña, además de que diversos fármacos que se utilizan para aliviar la sintomatología de la migraña son activos sobre sistemas serotoninérgicos (Flórez, *et al.*, 1992).

Estudios realizados al extracto clorofórmico de hojas frescas de *T. parthenium* demostraron que inhibe las contracciones inducidas por la fenilefrina, Serotonina, tromboxano U4661 9, y angiotensina II en anillos de aorta de conejo. Esta inhibición es dependiente del tiempo y la concentración, y es de tipo no competitiva e irreversible en preparaciones con y sin endotelio. Los extractos también causan una pérdida progresiva del tono en anillos de aorta precontraídos. Estos resultados son similares a los obtenidos por

preparaciones de α -metilbutirolactona y partenólida, obtenidas de los extractos de *T. parthenium* (Barsby *et al.*, 1992).

El compuesto al que se le ha conferido la actividad biológica es la partenólida (Heptinstall *et al.*, 1992); sin embargo, el *Tanacetum parthenium* mexicana no contiene este compuesto (Romo *et al.*, 1965). Estudios realizados demuestran que el extracto de diclorometano de la planta fresca presenta actividad vasorelajante en anillos de aorta de rata (Mezquita, 2000).

En el presente trabajo se realizó el estudio biodirigido del extracto de *Tanacetum parthenium* mexicana para identificar el tipo de compuestos que le confieren la actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina en aorta de rata.

Los resultados demuestran que el extracto de diclorometano de *Tanacetum parthenium* mexicana presenta actividad como inhibidor a las contracciones inducidas por Serotonina, siendo de tipo no competitivo y dependiente de la concentración. Así mismo se demostró que su aceite esencial presenta una actividad similar a la del extracto de la planta fresca teniendo un efecto reversible.

Del fraccionamiento biodirigido se llegó a dos fracciones, una de las cuales presenta lactonas sesquiterpénicas diferentes a la partenólida, y la otra un compuesto aún no descrito en la literatura perteneciente a esta planta.

Con lo anterior se concluye que la actividad de *Tanacetum parthenium* mexicana puede ser debida a los aceites esenciales que contiene, a otras lactonas sesquiterpénicas no descritas, diferentes a la partenólida, o a ambos tipos de compuestos. Estos resultados son importantes considerando la importancia comercial que tienen las preparaciones fitofarmacéuticas de esta planta, ya que consideran como compuesto activo a la partenólida.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. MIGRAÑA

2.1.1. Características

El término migraña procede de la hemicrania que utilizaba Galeno para describir un trastorno periódico que comprendía un dolor hemicraneal paroxístico intenso, vómitos, fotofobia, recurrencia a intervalos regulares y alivio en un ambiente oscuro y sueño (Raskin, 1990).

La migraña es una enfermedad frecuente en personas entre 25 a 55 años principalmente. Su prevalencia es del 6% en hombres y 15-18 % en mujeres (Lobo, 1999).

La primera fase es la prodrómica, la cual ocurre en aproximadamente el 60 % de los pacientes con migraña y consiste de síntomas psicológicos, neurológicos o constitucionales ocurriendo horas o días antes de que se dé el dolor de cabeza.

La segunda fase es el aura, experimentado por aproximadamente el 20 % de los pacientes y consiste de síntomas visuales, sensoriales o motores antes o durante el dolor de cabeza. Estos síntomas generalmente duran menos de una hora. La migraña con aura es formalmente conocida como migraña "clásica". La tercera fase es el dolor de cabeza, el cual puede ir de típicamente moderado a severo y es frecuentemente unilateral y punzante. Puede estar acompañado por anorexia, náuseas, vómito, fotofobia, fonofobia, osmofobia y síntomas constitucionales. El dolor es usualmente exacerbado por la actividad física, los pacientes suelen buscar un lugar tranquilo y oscuro. La última fase, la posdrómica, ocurre después del dolor de cabeza y está caracterizada por molestias gastrointestinales y cambios de humor (Lobo, 1999).

Hay pocos factores causales que expliquen y se puedan identificar como desencadenantes de la migraña, sin embargo, en un estudio realizado a 30 individuos acerca de las circunstancias con que se produjo su primer ataque, una tercera parte reporta como detonador factores psicológicos, principalmente el estrés provocado por circunstancias personales o por factores ambientales. Otra tercera parte la atribuye a factores físicos que incluye ciertos alimentos (chocolate, queso, café, frutas cítricas), cambios hormonales, alergias, etc. Una última tercera parte la atribuye a ambos factores (Blau, 1992).

2.1.2. Patogenia

Existen teorías que intentan explicar los mecanismos que producen la migraña sin embargo no son convincentes, pues no explican exactamente los síntomas, su complejidad, y especialmente su lento desarrollo.

El cuadro clínico de los ataques de migraña sugiere una serie de procesos en diferentes sitios. La cuestión es ¿dónde comienza la migraña? Hay tres principales teorías que la pueden explicar: la vascular, la química y la neural (Blau, 1992).

La teoría vascular comienza con visiones diametralmente opuestas, algunos trabajos favorecen la vasoconstricción y otros la vasodilatación. Se postula que los ataques comienzan con la vasoconstricción, produciendo el aura, seguido por la vasodilatación para explicar las pulsaciones en el dolor de cabeza. Se ha demostrado que la administración de ergotamina reduce la amplitud de la pulsación de la arteria temporal en los pacientes con cefalea y que este efecto a menudo pero no constantemente se asociaba a una reducción del dolor. La medición del flujo de sangre en el cerebro podría explicar esto, sin embargo,

después de 25 años los resultados permanecen contradictorios, el incremento del flujo es soportado por un grupo y la hipoperfusión por otro usando la misma técnica (Blau, 1992).

La teoría neural plantea que la migraña es resultado de depresión difusa extensiva de la actividad eléctrica cortical ("depresión difusa de Leao"). Se trata de un fenómeno eléctrico observado en animales de experimentación, que se produce en la corteza cerebral por acción ante estímulos nocivos. Ocurre reducción focal de la actividad eléctrica e incremento del flujo sanguíneo, y a continuación extensión (difusión) de estos fenómenos a través del hemisferio, a un ritmo de 2 a 3 mm/min (Peroutka, 2001).

En la teoría química plantea que de acuerdo a estudios realizados en las dos últimas décadas acerca de la regulación del tono de los vasos sanguíneos cerebrales. se ha encontrado que son una serie de mediadores químicos los que relajan, contraen o modifican la permeabilidad y funciones de los vasos cerebrales. Estos mediadores son derivados del sistema simpático, parasimpático y de nervios sensoriales que inervan los vasos cerebrales y también factores humorales (Feuerstein. *et al.*, 1997).

2.1.3. Tratamiento

La migraña se puede tratar por medios farmacológicos mediante un programa de medicación intensivo, profiláctico o combinado. La selección del método terapéutico apropiado debe basarse en una valoración detallada de la frecuencia y gravedad de la migraña (Peroutka, 2001).

Cuando se trata de migraña leve, se puede tratar con analgésicos leves, tales como la aspirina, acetaminofén, ibuprofeno, naproxen, etc. La migraña moderada se trata con alcaloides del cornezuelo del centeno o con Sumatriptán. La forma más grave de migraña requiere el empleo de agentes profilácticos además de los fármacos para terapéutica aguda y antieméticos como la metoclopramida (Peroutka, 2001).

2.1.3.1. Agudo

Desde 1920 se reconoce la eficacia de los derivados alcaloides del cornezuelo de centeno para combatir la migraña. Su mecanismo de acción es complejo y continua en controversia. Estos alcaloides son fármacos no selectivos, puesto que interactúan con gran número de receptores, entre ellos están los 5-HT₁ y 5-HT₂, así como los receptores adrenérgicos y dopaminérgicos (Peroutka, 2001).

Los alcaloides del cornezuelo de centeno disponibles y útiles para el tratamiento abortivo de la migraña son: la ergotamina, el mesílate de dihidroergotamina, y la ergonovina.

Los preparados de ergotamina tienen sabor desagradable y sus efectos tóxicos incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea, contracciones uterinas dolorosas, vasoconstricción, frialdad, entumecimiento y hormigueo en los dedos de las manos y los pies. Las dosis altas provocan sed, confusión, alucinaciones e inconsciencia; con el uso crónico se ha informado la aparición de gangrena de las extremidades y valvulopatías cardíacas. Los alcaloides del cornezuelo de centeno tienen una historia interesante como agentes de intoxicaciones y alucinaciones en masa (Smith, 1993).

Cualquiera de los alcaloides del cornezuelo de centeno, incluida la Ergotamina (Fig. 1), esta contraindicado durante el embarazo y en los pacientes con hipertensión, enfermedad vascular oclusiva y enfermedad hepática o renal (Smith, 1993).

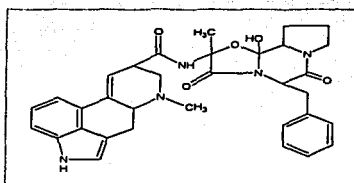


Figura 1. Estructura de la Ergotamina

Otro fármaco utilizado es el Sumatriptán (Fig. 2), el cual está relacionado estructuralmente con la 5-HT, presentando una clara actividad agonista sobre ciertos subtipos de receptores 5-HT₁. Es esencialmente inactivo en los demás subtipos de receptores 5-HT, así como en los α_1 y α_2 adrenérgicos, β -adrenérgicos, dopaminérgicos, muscarínicos colinérgicos y receptores de las benzodiazepinas (Peroutka, 2001; Flórez, *et al.*, 1992).

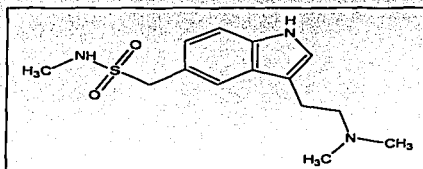


Figura 2. Estructura del Sumatriptán

Estudios recientes han demostrado una eficacia del Sumatriptán del 56-77 % en una hora. Los efectos adversos del Sumatriptán incluyen náusea, vómito, fatiga, mareo. Son raros los reportes de vasoespasmos coronarios, angina de pecho e infarto al miocardio (Lobo, 1999).

Algunos ensayos clínicos con Sumatriptán han descrito "síntomas del pecho", incluyendo la pesadez, estrechez o presión de pecho. (Nilsson, T., Longmore, J. *et al*, 1999)

El uso de opiáceos despierta controversia, ya que no son comúnmente prescritos para la migraña, aún cuando hay datos que demuestran claramente su eficacia. Reduce en aproximadamente un 54.5 % el dolor de cabeza una hora después de su administración.

Quizá lo más serio concerniente con el uso de opiáceos es el riesgo de abuso y dependencia, especialmente en pacientes con frecuentes dolores de cabeza (Lobo, 1999).

El uso de corticosteroides en pacientes con migraña es controversial, hay relativamente pocos datos que soporten su uso. La dexametasona, metilprednisolona, prednisona o hidrocortisona han sido recomendadas para ataques prolongados de migraña en pacientes que no responden a la terapia estándar. Sus efectos colaterales son poco comunes cuando la terapia esta limitada a menos de una semana (Lobo, 1999).

2.1.3.2. Profiláctico

Cuando la frecuencia de la migraña no excede de tres crisis al mes, pueden tratarse de manera profiláctica. Algunos de los fármacos utilizados son:

Antidepresivos tricíclicos, como la amitriptilina y la nortriptilina, los cuales son bloqueadores de los transportadores de la 5-HT y antagonistas de múltiples neurotransmisores. Sus efectos colaterales están relacionados con sus propiedades anticolinérgicas: mareos, visión borrosa, retención urinaria, arritmia cardíaca, etc.

Antagonistas serotoninérgicos como la metisergida y la ciproheptadina, los cuales son derivados ergóticos. Los efectos colaterales comunes al uso de estos son: náusea, vómito y diarrea.

Antagonistas β -adrenérgicos, tales como el propranolol, el timolol, el atenolol, nadolol; metoprolol; los cuales muestran una eficacia del 50-70 % utilizados como profilácticos. Sus efectos colaterales son letargo, malestares gastrointestinales, hipotensión.

Inhibidores de la monoamino-oxidasa: la fenelzina y el isocarboxácida. Los efectos colaterales comunes a su uso son hipotensión, insomnio y náuseas.

Bloqueadores de los canales de Ca^{2+} : la flunaracina, el diltiacem, la nifedipina y la nimopidina. Los efectos colaterales los desarrollan del 20 al 60 % de los pacientes, pero usualmente son leves y consisten de constipación e hipotensión (Peroutka, 2001).

2.1.3.3. Plantas medicinales

La mayoría de las grandes culturas como la China, India, Egiptia, Griega y muy particularmente la nuestra ha sabido aprovechar los portentosos beneficios que el reino vegetal aporta al bienestar humano, mediante el descubrimiento y uso de preparaciones naturales. Las plantas medicinales han sido objeto de profundos estudios, los cuales han

dado como resultado la acumulación de conocimientos herbolarios que nos permiten saber cómo, cuándo y qué plantas utilizar en cada caso (Aguirre, 1993).

Los tratamientos fitoterapéuticos han ofrecido fuentes alternativas de terapia para quienes padecen migraña, además de que han proporcionado información adicional acerca de la patogénesis de la migraña (Kelly, et al., 2000)

2.1.4. Respuesta vascular y migraña

2.1.4.1. Mediadores químicos

Entre estas sustancias están algunas aminas, tales como la noradrenalina, la adrenalina y la dopamina, la Serotonina, la histamina y la acetilcolina. También están presentes algunos mediadores lipídicos como los eicosanoides (prostaciclina, tromboxano Λ_2 , Prostaglandinas (PG_2 y PG_{2a} , etc.); los cistenil leucotrienos LTC_3 y LTD_4 ; el factor activador de plaquetas (PAF) (Feuerstein, *et al.*, 1997).

Algunos péptidos como el VIP (Péptido Vasoactivo Intestinal), el PHI (Péptido Histidina Isoleucina), la PACAP (Péptido Activador Pituitario-Adenilato Ciclasa), la CGRP (Péptido Gen Relacionado Calcitonina), la adrenomedulina, la substancia P, la bradiquinina, que son vasodilatadores; y algunos vasoconstrictores como el neuropéptido, la Angiotensina II, la endotelina I y la vasopresina (Feuerstein, *et al.*, 1997).

Se han informado de algunos nucleótidos como dilatadores de vasos cerebrales: la adenosina, el ADP, el ATP, el GRP, el CCK, la galanina, la neurotensina, la somatostatina y la dinorfina B. Además de algunos gases como el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Feuerstein, *et al.*, 1997).

Otras sustancias vasorelajantes que se han estudiado para explicar la patogenia de la migraña son los producidos por el endotelio: la prostaciclina (PGI_2) y el Factor de Relajación Derivado del Endotelio (FRDE), identificado actualmente como el óxido nítrico. La PGI_2 y el FRDE son química y biológicamente inestables. Ambos a través del AMPc y GMPc, respectivamente ejercen no solo vasodilatación sino también un acción antiplaquetaria. La migraña ha sido tratada con un gran número de inhibidores de la ciclooxigenasa, la cual suprime la biosíntesis vascular de PGI_2 y otras prostaglandinas (Gryglewski, *et al.*, 1990).

La vasodilatación de los vasos sanguíneos craneales y síntomas parecidos a los de la migraña son producidos por la PGI_2 y por nitratos orgánicos los cuales mimetizan los efectos del FRDE. En ciertos tipos de vasos sanguíneos, la Serotonina quien parece estar íntimamente ligada a la patogénesis de la migraña pues desencadena la producción endotelial de la PGI_2 y del FRDE (Gryglewski, *et al.*, 1990).

De todas las anteriores, la Serotonina es una de las sustancias químicas que está a la vanguardia en la investigación de la migraña (Peroutka, 2001 y Blau, 1992). El importante papel que juega la Serotonina en la fisiopatología de la migraña se hace evidente si se considera que se ha encontrado un aumento de sus metabolitos en orina durante el ataque de migraña, además de que diversos fármacos que se utilizan para aliviar la sintomatología de la migraña son activos sobre sistemas serotoninérgicos (Flórez, *et al.*, 1992).

2.1.4.2. Serotonina (5-Hidroxitriptamina)

La 5-Hidroxitriptamina (5-HT) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino (Fig. 3). Fue aislada e identificada en el plasma en 1948. Se localiza y sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del SNC, mientras que en las plaquetas se almacena por un mecanismo de transporte activo (Flórez, *et al.*, 1992).

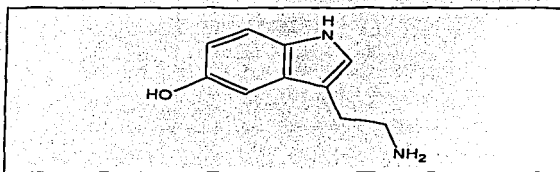


Figura 3. Estructura de la Serotonina (5-hidroxitriptamina)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las acciones de la Serotonina sobre los vasos son muy complejas debido a los múltiples sitios en donde puede actuar. En la mayoría de los territorios produce vasoconstricción, tanto arteriolar como venosa, no obstante también produce vasodilatación arteriolar en la circulación muscular y en la cutánea. El efecto neto de la Serotonina en un lecho vascular concreto esta determinado por el equilibrio entre sus acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras. Cuando se estudia su acción sobre tejido vascular aislado, predomina la respuesta contráctil (Flórez, *et al.*, 1992).

En gran medida, la acción vasoconstrictora esta relacionada con los receptores 5-HT₂, puesto que es específicamente bloqueada por los antagonistas de estos receptores, como la

ketanserina. Sin embargo, en ciertos vasos craneales, este efecto vasoconstrictor no está ligado a la activación de receptores 5-HT₂, sino que depende de la unión de la Serotonina a una población de sitios 5-HT₁ cuya naturaleza no está claramente determinada. Por otra parte, en ciertas condiciones es posible observar una acción vasodilatadora, que la Serotonina puede ejercer ya sea por activación de receptores 5-HT_{1A} que median la liberación de factores relajantes endoteliales o bien por inhibición de la liberación de noradrenalina, lo que genera una respuesta dilatadora (Flórez, *et al.*, 1992).

Además, la Serotonina tiene la capacidad de potenciar la acción vasoconstrictora tanto de noradrenalina como de otros agentes que contraen la fibra vascular, como la angiotensina II o la PGF_{2α}. Este mecanismo contribuye igualmente a facilitar la acción vasoconstrictora de la amina (Flórez, *et al.*, 1992).

2.1.4.3. Modelo en aorta torácica

La aorta es el vaso arterial de mayor calibre del cuerpo. En la aorta se distinguen una porción ascendente (aorta ascendente), el arco aórtico (*arcus aortae*) y la porción descendente (aorta descendente). La aorta descendente se divide, a su vez, en dos porciones: la aorta torácica y la aorta abdominal (Tatarinov, 1994).

La aorta torácica está situada en el mediastino posterior, por delante de la porción torácica de la columna vertebral. Da ramas viscerales hacia los órganos de la cavidad torácica (hacia el pericardio, la tráquea, los bronquios, el esófago) y ramas parietales, hacia las paredes de la cavidad torácica estas ramas van hacia el diafragma y arterias intercostales. A través del agujero aórtico, en la porción lumbar del diafragma, la aorta

torácica pasa a la cavidad abdominal, continuándose en la aorta abdominal (Tatarinov, 1994).

El interior del lumen de la pared del vaso sanguíneo ésta forrado con capas de células endoteliales y la parte de afuera del vaso esta cubierto con tejido conectivo. Las células del músculo liso están arregladas concéntricamente.

Los estudios farmacológicos en arterias (tejido aislado) son muy utilizados, ya que contienen un amplio rango de tipos de receptores que median la contracción (5-HT, α -adrenérgicos), relajación (β -adrenérgicos) y funciones endoteliales (acetilcolina) (Ferkany, 1998).

2.2. *Tanacetum parthenium*

2.2.1. Generalidades

Pertenece a la familia Compositae o Asteraceae. Sus nombres científicos son: *Tanacetum parthenium* (L.) Shultz-Bip, *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh., *Leucanthemum parthenium* (L.) Gren & Gordon, *Pyretrum parthenium* (L.) Sm., *Matricaria parthenium* (L.)

Los nombres comunes con que se le conoce son: Feverfew (del latín *febrifugo*), Altamiza, Hierba de Santa María, Hierba santa, manzanilla grande, manzanilla romana, mastranzo, matlali. En otomí *dhata manzanilla*, en náhuatl *caltemesha* (Foster, 1991; Argueta, 1994).

Tanacetum parthenium (Fig. 4) es una planta arbustiva, erecta, aromática, de 30 cm a 1 m de altura, escasamente velluda, puede tener el tallo simple o ramificado desde la base. Sus hojas son simples, de color verde, alternas, con graba en la cara superior, pubescente en la cara inferior, pinatífida, con lóbulos obovados y dentados. Las flores, que aparecen de julio a octubre, están dispuestas en corimbos de hasta 30 piezas, con algunas florecillas blancas alargadas y otras amarillas en forma de disco con brácteas involucras cubiertas de pelusa (Martínez, 1992; Argueta, 1994; Linares, 1996).

Se considera originaria de Irán, Irak y de Europa, adaptada a climas cálidos, semicálido, semiseco y templado. Se cultiva en huertos familiares, crece a orillas de caminos o en terrenos de cultivo.



Figura 4. *Tanacetum parthenium* mexicana (Santa María)

En estados como Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Morelos, México, Tlaxcala y Veracruz, se utiliza para diversos tipos de cefalca, como analgésico, para la artritis, para aliviar trastornos de la menstruación (como emenagogo, antiespasmódico, contra la dismenorrea y cólicos menstruales), y para provocar el aborto. Se toma el cocimiento de las ramas o de las flores (Lawrence, 1990; Argueta, 1994).

En la medicina tradicional del Reino Unido y Europa ha sido utilizada para aliviar el dolor de cabeza, los dolores menstruales, el asma, la artritis, y como antipirético. Las hojas son ingeridas frescas, en una dosis diaria de 2 o 3 hojas (Foster, 1991).

También ha tenido usos como planta de jardín, ya que aromatiza el aire debido a su fuerte olor. Funciona además como repelente de insectos (Foster, 1991).

2.2.2. Composición química

La principal lactona sesquiterpénica presente en *Tanacetum parthenium* es un germacranólido la partenólida (Fig. 5), la que se ha tomado como referencia para determinar la actividad biológica y para el control de calidad de preparaciones farmacéuticas y análisis de materia prima (USP 25, 2001 y Bohlman y Zdero, 1982).

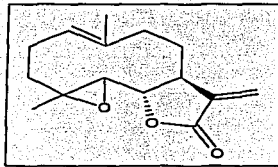


Figura 5. Estructura de la Partenólida

La partenólida se encuentra en un promedio de 1.52 % en peso seco de la planta. No hay ningún método específico para su cuantificación y aislamiento. Existen varios procedimientos de extracción, los cuales incluyen la cromatografía en columna abierta, espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Brown, *et al.*, 1996).

El resto de las lactonas sesquiterpénicas presentes en *T. parthenium* están presentes en pequeñas cantidades <10 mg/Kg. Otros germacranólidos representativos son una serie de metabolitos los cuales probablemente se obtienen por epoxidación y/o oxidación alílica, con o sin rearreglo alílico de la partenólida (Knight, 1995). Estos incluyen la custunólida, la

3 β -hidroxycustunólida, la 3 β -hidroxipartenólida, la artemorina, la 3 β -hidroxianhidroverlotorina, la epoxiartemorina y el peróxido correspondiente. (Fig. 6).

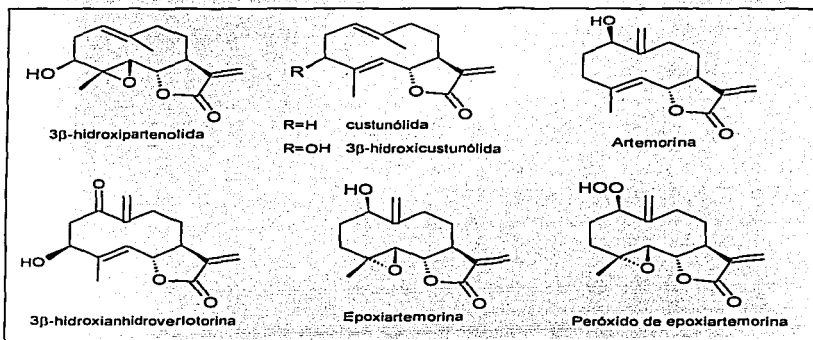


Figura 6. Germacranólidos presentes en *Tanacetum parthenium*.

Están presentes dos eudesmanos (Fig. 7) el metil éster del ácido cóstico y la reinosina, ambos se encuentran en pequeñas cantidades (Knight, 1995).

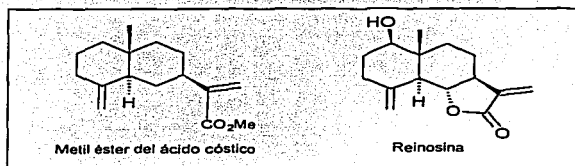


Figura 7. Eudesmanos presentes en *Tanacetum parthenium*

El resto de las lactonas sesquiterpénicas son del tipo guayenólida (Knight, 1995; Bohlman y Zdero, 1982). Se encuentran trazas de 8α -hidroxiestafiatina, acompañadas por los correspondientes ésteres isobutilato y angelato. Se encuentran también dos series de guayenólidas, la serie α , representadas por la tanapartina- α -peróxido, la canina y pequeñas trazas de 10-epi-canina y seco-tanapartolida A. La serie β corresponde a tanapartina- β -peróxido, la artecanina y finalmente la seco-tanapartolida B. (Knight, 1995). (Fig. 8).

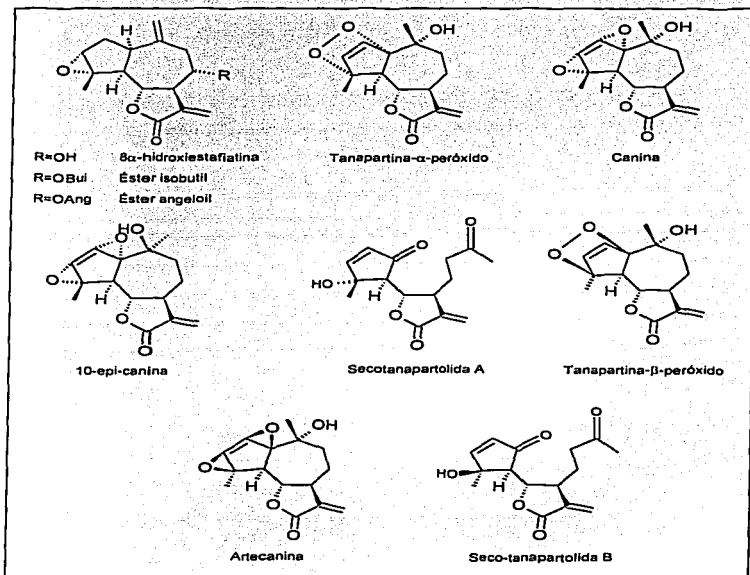


Figura 8. Guayenólidas presentes en *Tanacetum parthenium*.

En estudios realizados a *T. parthenium* mexicana se encontraron la Crisartemina A, la Crisartemina B y la Santamarina (Fig. 9), no así la partenólida. (Romo *et al.*, 1965; Romo *et al.*, 1970). Estudios posteriores confirmaron que ambas Crisarteminas corresponden a la Canina y Artecanaína respectivamente (Hewlett, *et al.*, 1996).

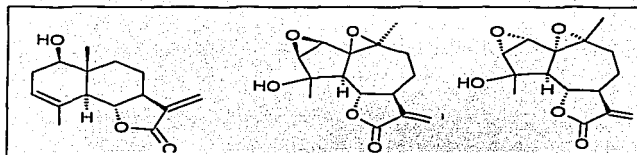


Figura 9. Compuestos encontrados en *T. parthenium* mexicana.

Las partes aéreas de la planta contienen una mezcla compleja de diferentes tipos de constituyentes. Se encuentran entre ellos el Germacreno D, el β -farneseno y el alcanfor, pequeñas cantidades (<10 mg/kg) de crisantenil acetato y el epímero *cis*-crisantenol junto con los ésteres acetato, angelato e isovalerato. También se encuentran presentes el *cis*-verbenol, la 4 β -acetoxicrisantenona, así como el bornil acetato y bornil angelato, (Fig. 10). (Bohlmann y Zdero, 1982).

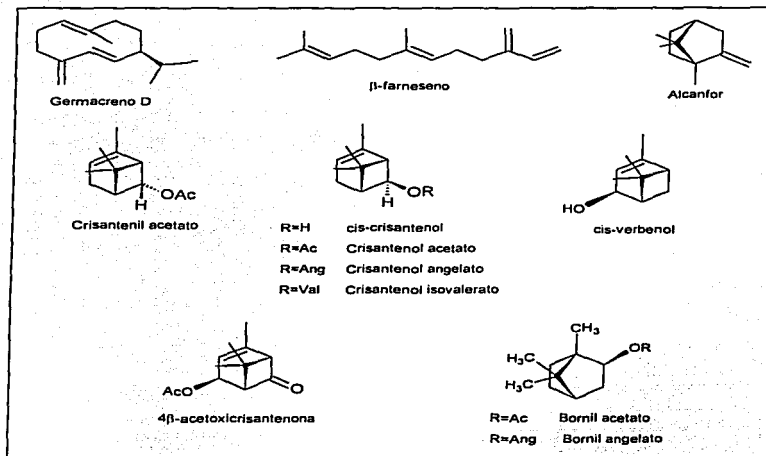


Figura 10. Principales compuestos de las partes aéreas de *T. parthenium*

También se encuentran una serie no terpenoide de éteres espirocetálicos (Fig.11), los cuales también se encuentran en pequeñas cantidades. Estos mismos han sido encontrados en las raíces de la planta en niveles relativamente altos, lo cual quizá indicaría el rol de defensa de este compuesto (Bohlmann y Zdero, 1982)

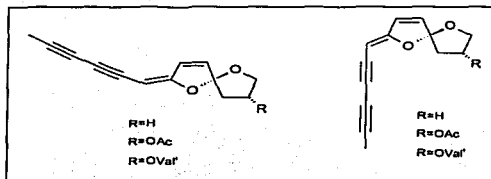


Figura 11. Éteres espirocetálicos de *T. parthenium*

Los principales compuestos que constituyen el aceite esencial de *T. parthenium* son el alcanfor y el crisantenil acetato (28-48 % y el 30-22% del aceite esencial respectivamente) de especies inglesas y holandesas. Otros terpenos que contiene son el α -pineno, el camfeno, el β -pineno, el α -terpineno, el p-cimeno, el γ -terpineno, el crisantenol, el bornil acetato, el β -cariofilleno, el β -farneseno, el D-germacreno, el epóxido del β -cariofileno, (Fig. 12). (Hendriks, *et al.*, 1996).

De las raíces de *T. parthenium* se aislaron la cumarina isofraxidina y la isofraxidina drimenil éter (Kisiel, *et al.*, 1997).

También se han identificado los siguientes flavonoides: el 3,6-dimetil éter y el 3,6,4'-trimetil éter del 6-hidroxikaempferol. El 3,6-dimetil éter, el 3,6,3' trimetil éter y el 3,6,4'-trimetil éter de la Quercetagenina. Las siguientes flavonas: la apigenina, la luteolina, el crisoceriol, la apigenina 7-glucurónido y la luteolina 7-glucurónido (Williams, *et al.*, 1999).

Se tienen reportados además los siguientes esteroides: estanol, campesterol y sitosterol, estigmasterol, fucosterol e isofucosterol (Wilkomirski, *et al.*, 1996)

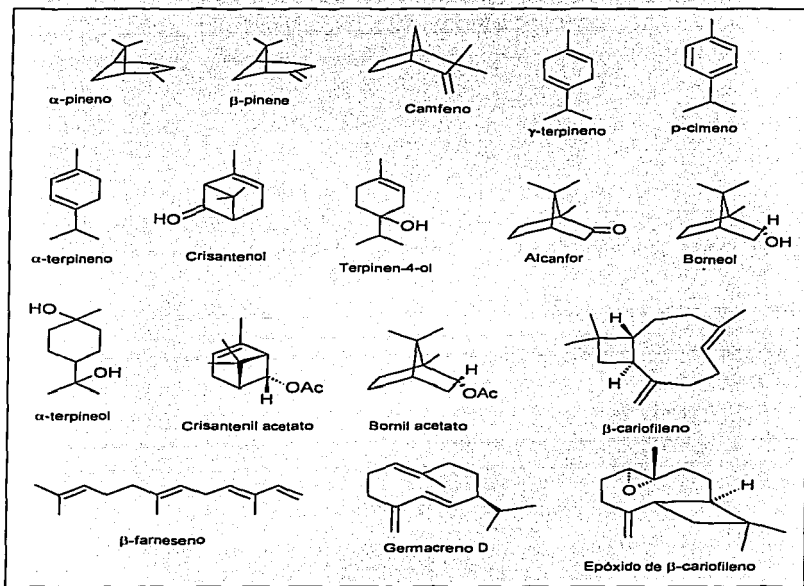


Figura 12. Compuestos del aceite esencial de *T. parthenium*

2.2.3. Actividad biológica

2.2.3.1. Estudios clínicos

Las hojas de *T. parthenium* se han sometido a estudios clínicos para evaluar su actividad en la migraña. En uno de ellos se realizó un estudio doble ciego con placebo en el que participaron 20 pacientes. Se evaluó la eficacia de las hojas de esta planta como profiláctico para la migraña. Los 10 pacientes que recibieron el placebo tuvieron un incremento significativo en frecuencia y severidad de dolor de cabeza, náusea y vómito con la aparición de efectos indeseables severos, en los primeros meses de estudio. Los otros 10 pacientes que recibieron las hojas secas de *T. parthenium* no presentaron cambios en frecuencias y severidad de los síntomas de la migraña. Esto proporciona bases de que la planta tomada como profiláctico previene los ataques de este padecimiento (Johnson *et al.*, 1985).

Los resultados anteriores fueron confirmados por otro estudio realizado siguiendo un diseño aleatorio cruzado en el cual participaron 72 pacientes. De este estudio se concluyó que el tratamiento con la planta reduce la severidad, (emplea a una concentración de 70 a 114 mg por cápsula, donde se contiene de 2-19 μmol de partenólida por cápsula), el número de ataques de migraña y la intensidad del vómito, sin embargo, el tiempo de duración de los ataques no se alteró. También se concluyó que la planta no produjo efectos colaterales de importancia (Murphy *et al.*, 1988).

Se realizó un estudio parecido a los mencionados anteriormente en donde participaron 57 pacientes (47 mujeres y 10 hombres), los cuales se dividieron en dos grupos al azar. El estudio fue un doble ciego placebo controlado. Los resultados demostraron que *T. parthenium* causa una reducción significativa en la intensidad del dolor, así como, una

disminución de los síntomas típicos usualmente relacionados con los ataques de migraña (vómito, náuseas sensibilidad a la luz y al ruido, etc.), en comparación con el tratamiento placebo (Palevitch *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos por Prrusindki y Niczypooruk (1999) de estudios clínicos en el Centro para el tratamiento de la migraña confirman el uso de *T. parthenium* como profiláctico para el tratamiento de la migraña.

También se han realizado estudios para demostrar su efectividad en el tratamiento de la artritis reumatoide. En un estudio con 41 pacientes del sexo femenino se administraron diariamente 70 a 86 mg de planta o placebo durante 6 semanas, siguiendo un diseño experimental doble ciego. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en más de 15 parámetros analizados. Lo que llevo a concluir que la planta no proporciona beneficios en el tratamiento de la artritis reumatoide (Patrick *et al.*, 1989).

Los efectos secundarios negativos registrados en un grupo de 270 pacientes que tomaron regularmente *T. parthenium* fueron mínimos y poco frecuentes. El síntoma adverso más común que se registró fue la ulceración de la boca (6.4 %), seguido de dolor abdominal e indigestión (3.9 %), sabor desagradable (3.0 %), sensación de cosquilleo (3.0 %), problemas urinarios (0.9 %), dolor de cabeza (0.9 %) y diarrea (0.4%) (Argueta, 1994). Los efectos adversos presentados en un estudio realizado con 16 pacientes, ocho tratados con hojas de *T. parthenium* y ocho con placebo fueron los siguientes (Johnson *et al.*, 1985).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Síntoma	Pacientes con planta	Pacientes con placebo
Ninguno	4	-
Nerviosismo, tensión, inquietud, sobresalto	-	5
Tensión o dolor de cabeza (no migraña)	-	3
Insomnio, sueño interrumpido	-	2
Dolor de articulaciones	2	3
Cansancio	-	2
Náusea	-	1
Deslumbramiento	-	1
Períodos de desatención profunda	1	1
Palpitaciones	1	-
Dolor abdominal por cólico	1	-
Frecuencia urinaria	-	1

Tabla 1. Efectos adversos de Santa María

En este estudio se administraron diariamente 50 mg de hojas de *T. parthenium* durante seis meses. Todos los pacientes presentaron al menos un efecto adverso, mientras que 4 de los 8 pacientes tratados con la planta no tuvieron efecto alguno. A estos mismos pacientes se les realizó un estudio bioquímico y hematológico antes y después del tratamiento, encontrándose que la planta no modifica dichos parámetros (Johnson *et al.*, 1985).

2.2.3.2. Actividad anti-inflamatoria

Recientemente se han estudiado los efectos antinociceptivos y anti-inflamatorios de los extractos de *T. parthenium* en ratas y ratones, administrados por vía oral cuando se induce el edema con ácido acético y carragenina. Estas respuestas son dosis-dependientes

(10, 20, 40 mg/kg. p.o.). La partenólida también muestra efectos a la dosis de 1 y 2 mg/kg i.p. (Naveen, *et al.*, 1999).

Williams *et al* (1999) han estudiado las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides de *T. parthenium*, mostrándose activos los 6-hidroxiflavonoides como inhibidores de la ciclooxigenasa y la 5-lipooxigenasa en leucocitos.

Del extracto clorofórmico de hojas, flores y semilla de *T. parthenium* se aisló un compuesto conocido como tanenina. Las pruebas farmacológicas indican que la tanenina podría contribuir a las propiedades antiinflamatorias atribuidas por la inhibición de la generación de eicosanoides pro-inflamatorios, a una concentración de 40 μ M, sin embargo, se considera que no es el único compuesto presente en la planta con esta actividad (Williams *et al.*, 1995).

Se han realizado estudios sobre el efecto inhibitor de los extractos de las hojas de *T. parthenium* en leucocitos humanos PMNs. De estos extractos fueron identificados como compuestos bioactivos mayoritarios al germacranólido (1.72 %), y la partenólida (2.62 %). Todos los extractos inhiben la quimioluminiscencia inducida por el acetato de forbol miristato en leucocitos PMNs humanos con un IC_{50} de 0.79 ± 0.19 a 2.46 ± 0.39 mg de hoja en peso seco/mL. Los resultados obtenidos sugieren que el compuesto responsable de la actividad podría resultar de la inhibición de la proteínasas C o eventos subsecuentes en la activación de leucocitos PMNs *in vitro* (Brown, *et al.*, 1997).

El extracto clorofórmico de la parte aérea de *T. parthenium* macerado con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a un pH de 7.4, inhibe la síntesis de prostaglandinas (50

$\mu\text{L/mL}$) de un 86 a un 88 %, pero no inhibe la ciclooxigenación del ácido araquidónico (Collier et al., 1980). Si el extracto se hierve durante 10 minutos se pierde dicha actividad. Lo anterior indica que la inhibición de la síntesis de PG por *T. parthenium* difiere del mecanismo de inhibición de los salicilatos.

En otro estudio utilizando la partenólida aislada del extracto clorofórmico de las hojas secas de *T. parthenium*, se demostró que inhibe la expresión de COX-2 y las citocinas proinflamatorias (TNF α y IL-1) en lipopolisacáridos (LPS) estimulados por macrófagos. La función estructural α -metilen- γ -lactona le confiere el efecto inhibitorio (Hwang et al., 1996)

El extracto clorofórmico de las hojas frescas y de los productos comerciales de la hoja seca de *T. parthenium*, producen la inhibición de la generación de tromboxano B₂ (TXB₂), leucotrieno B₄ (LTB₃) en leucocitos de peritoneo de rata y leucocitos PMNs de seres humanos. Los valores de IC₅₀ están en el rango de 5-50 $\mu\text{g/mL}$, la inhibición de TXB₂ y LT₄ ocurre en paralelo (Summer et al., 1992).

El extracto acuoso de *T. parthenium* a concentraciones de (50-200 mg/mL) inhibe los productos metabólicos de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa, ambos productos del metabolismo del ácido araquidónico (Capasso, 1986).

El extracto clorofórmico de las hojas de *T. parthenium* puede inhibir la compactación de las plaquetas por su efecto sobre los grupos sulfhidrilo. (Heptinstall et al., 1987).

2.2.3.3. Investigaciones realizadas con la Serotonina

El extracto cloroformo/metanol de las hojas secas de *T. parthenium* inhiben la actividad secretoria de Serotonina de las plaquetas y leucocitos polimorfonucleares (PMNs). La agregación de plaquetas se inhibe pero la síntesis de tromboxano no se lleva a cabo. Este mismo extracto también inhibe la liberación de vitamina B₁₂ unida a proteínas de PMNs, inducida por diferentes agentes (Heptinstall *et al.*, 1985). Otro estudio realizado demuestra que los extractos clorofórmicos de *T. parthenium* inhiben la liberación de la Serotonina en plaquetas, neutrófilos y leucocitos PMNs. Los compuestos identificados son la partenólida, la 3β-hidroxiipartenólida, la secopartenólida A, la canina y la artecanina (Groenewegwn *et al.*, 1986).

Se realizó un estudio en una preparación del fondo gástrico, para evaluar la actividad de la partenólida (almacenamiento, liberación y estimulación) frente a receptores 5-HT_{2B}. Las curvas dosis-respuesta a la Serotonina y la acción indirecta de la fenfluramina y la dextroamfetamina en el fondo gástrico son obtenidos en presencia y ausencia de la partenólida a una concentración de 10⁻⁶ – 10⁻⁵ M. La partenólida no muestra actividad agonista ni antagonista a la Serotonina en el fondo gástrico de rata, sin embargo inhibe la respuesta contráctil de la fenfluramina y dextroamfetamina. Lo anterior indica que la partenólida inhibe la liberación de Serotonina por una acción indirecta a agonistas en el fondo gástrico (Béjar, 1996).

Weber *et al.* (1997) demostró que la partenólida desplaza a la [³H] ketanserina de los receptores 5-HT_{2A} del cerebro de rata y conejo y en receptores 5-HT_{2A} clonados. Las constantes de afinidad están en el rango de 100-250 μM. Los resultados soportan en parte la hipótesis de que la partenólida es un antagonista de la Serotonina. La débil actividad de la

partenólida a receptores 5-HT_{2A} sugiere que otros receptores pueden ser igual o más importantes que los receptores 5-HT_{2A}. Se sabe que los receptores 5-HT_{1A} no son el blanco principal de la partenólida. La actividad de *T. parthenium* puede estar dada por otros compuestos además de la partenólida, los cuales pueden tener actividad por múltiples mecanismos. De estos compuestos, la partenólida puede jugar un rol mediando parcialmente mecanismos basados en receptores 5-HT_{2A}.

Se realizó la evaluación de extractos diclorometánicos de *T. parthenium* y del compuesto partenólida en la estimulación de receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2A}. Se midió la respuesta isométrica en fondo gástrico e ileon de rata, también se evaluó el extracto degradado térmicamente a 60 °C y 75 % de humedad. Los resultados obtenidos muestran que la partenólida antagoniza no competitivamente los efectos de la d-fenfluramina pero no así los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2A} en fondo gástrico e ileon de rata. Por el contrario el extracto diclorometánico sí presenta este efecto antagonista. Los extractos de *T. parthenium* degradados muestran una disminución en su actividad antiserotonérgica (Mitra, 2000).

2.2.3.4. Inhibición de la contracción en anillos de aorta

El extracto clorofoórmico de hojas frescas de *T. parthenium* inhibe las contracciones inducidas por la fenilefrina, Serotonina, tromboxano U4661 9, y angiotensina II en anillos de aorta de conejo. Esta inhibición es dependiente del tiempo y la concentración, y es de tipo no competitiva e irreversible en preparaciones con y sin endotelio. Los extractos también causan una pérdida progresiva del tono en anillos de aorta precontraídos y aparentemente también daña la capacidad de la acetilcolina para inducir las relajaciones dependientes del endotelio. Estos resultados son similares a los obtenidos por preparaciones

de α -metilbutirolactona y la partenólida, obtenidas de los extractos de *T. parthenium* (Barsby *et al.*, 1992).

Se compararon los extractos clorofórmicos de productos comerciales de las hojas secas de *T. parthenium* con extractos de plantas frescas. Los dos extractos difieren radicalmente en su contenido de α -metilbutirolactonas y en su perfil farmacológico cuando es evaluado *in vitro* en anillos de aorta de conejo y preparaciones de anococcigenus de rata. Los extractos de las hojas frescas causan una inhibición dependiente de la dosis y el tiempo a la respuesta contráctil por agonistas como la fenilefrina, la angiotensina II y la Serotonina. Los extractos clorofórmicos del polvo de planta seca no presenta este efecto, estos mismos no contienen partenólida ni butirolactonas (Barsby *et al.*, 1993).

El extracto clorofórmico de las hojas frescas de *T. parthenium* reduce la inactivación de la corriente de potasio dependiente del voltaje a concentraciones inhibitorias (IC_{50}) de 56 μ g/mL. Se tiene un bloqueo completo de la corriente si se incrementa la concentración a 1 mg/mL. En células de arteria de conejo también reduce la corriente de potasio dependiente del voltaje, pero no tiene efecto en la corriente dependiente del calcio. Estos resultados sugieren que el extracto clorofórmico de *T. parthenium* contiene un sustancia no conocida capaz de ser selectiva en el bloqueo de canales de potasio dependientes del voltaje (Barsby *et al.*, 1993).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La migraña es una enfermedad que padece del 10 al 20 % de la población mundial (Peroutka, 2001), afectando principalmente a personas jóvenes. El tratamiento terapéutico de esta enfermedad incluye una serie de fármacos, así como algunas plantas medicinales, entre las cuales se encuentra *Tanacetum parthenium* conocida comúnmente en México como Santa María.

La Serotonina, también llamada 5-Hidroxitriptamina (5-HT), es una de las sustancias químicas que está a la vanguardia en la investigación de la migraña (Peroutka, 2001 y Blau, 1992). Los extractos de diclorometano de la planta fresca de origen europeo se han evaluados *in vitro* en anillos de aorta de conejo, presentando actividad inhibitoria a la contracción inducida por Serotonina (Barsby *et al.*, 1993). La partenólida es a quien se atribuye principalmente la actividad terapéutica de esta planta (Heptinstall *et al.*, 1992). Estudios realizados en *T. parthenium* mexicana (Romo *et al.*, 1970; Mezquita, 2000) demuestran que no contiene este compuesto, sin embargo, presenta actividad como vasorelajante en anillos de aorta de rata.

Por lo anterior, es que en el presente trabajo se realizó el estudio biodirigido del extracto de *Tanacetum parthenium* mexicana, para identificar el tipo de compuestos que confieren la actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina en aorta de rata.

4. HIPÓTESIS

Debido a que *Tanacetum parthenium* mexicana no presenta partenólida, principal compuesto al que se le adjudica la actividad terapéutica contra la migraña, deben existir en esta especie otro(s) compuestos(s) que le confieran dicha actividad farmacológica.

5. OBJETIVOS

GENERAL

Realizar el estudio biodirigido de *Tanacetum parthenium* mexicana para identificar el o los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de las contracciones inducidas por Serotonina en aorta de rata.

ESPECÍFICOS

Comprobar que *Tanacetum parthenium* mexicana presenta actividad biológica aún cuando no contiene partenóvida.

Evaluar la actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina en aorta de rata, de los extractos de diclorometano de la planta fresca, seca y aceite esencial.

Realizar el fraccionamiento biodirigido de las fracciones más activas del extracto de la planta fresca.

Identificar el tipo de compuestos responsables de la actividad biológica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL VEGETAL

Tanacetum parthenium mexicana fue adquirida en el Mercado Sonora (México D.F.) en febrero del 2001 con un colector del Estado de Puebla. La identificación taxonómica la realizó la maestra Abigail Aguilar del Herbario Medicinal del IMSS, depositando una muestra de referencia que se registro con el número 13622.

La planta fresca se utilizó recién adquirida para preparar el extracto con CH_2Cl_2 y obtener el aceite esencial. Para el extracto de CH_2Cl_2 de la planta seca, se dejó secar la planta a la sombra a temperatura ambiente durante 1 mes. Las partes aéreas de la planta seca y fresca fueron fraccionadas manualmente antes de preparar los extractos.

6.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO

La planta fresca (341 g) y seca (253 g) fueron maceradas con CH_2Cl_2 durante 72 horas. Los extractos se filtraron y se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente. Para la planta fresca antes de concentrar el filtrado este se secó con Na_2SO_4 anhidro. Una vez eliminado el disolvente se obtuvieron 5.5 y 5.2 g de extractos de planta fresca y seca respectivamente.

En la Fig. 13 se muestra el diagrama general de la obtención de los extractos de diclorometano de la planta fresca, de la planta seca y del aceite esencial.

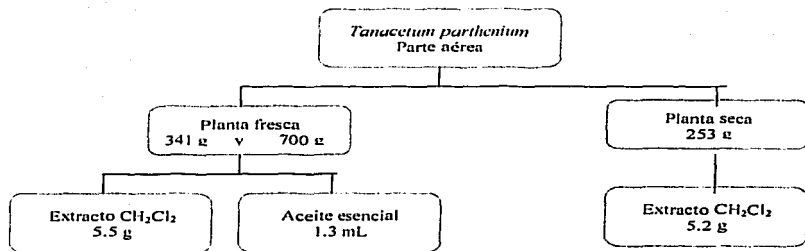


Figura 13. Diagrama general para la obtención de los extractos de *Tanacetum parthenium*.

6.3. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO DE CH_2Cl_2 DE LA PLANTA FRESCA

El fraccionamiento se realizó siguiendo la actividad de las fracciones, para lo cual se seleccionó en cada etapa, aquellas fracciones que presentaron mayor actividad como inhibidores a las contracciones inducidas por Serotonina.

El fraccionamiento se realizó utilizando cromatografía en columna abierta con Silicagel 60 (Merck), para lo cual se preadsorbieron los extractos en sílica gel en proporción 1:1. El fraccionamiento se siguió por cromatografía en capa fina, utilizando como revelador sulfato cérico amoniacal y calor. Previo a la revelación se observaron las placas con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm. El fraccionamiento completo se muestra en la Fig. 14.

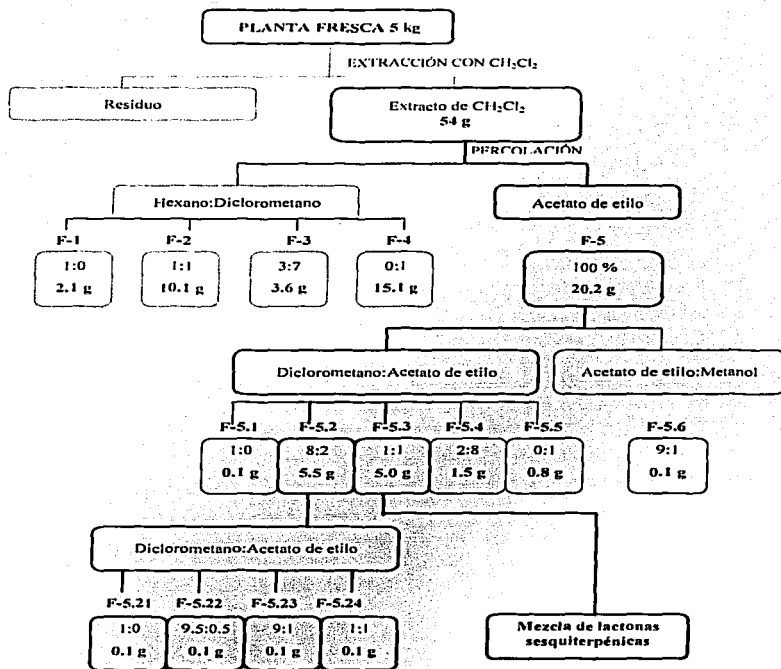


Figura 14. Diagrama general del fraccionamiento del extracto de CH_2Cl_2 de la planta fresca de *Tanacetum parthenium*. Las líneas de color más intenso indican las fracciones que presentaron mayor actividad antagonista a las contracciones inducidas por Serotonina.

6.4. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial se obtuvo de las partes aéreas de la planta fresca (700 g), a través de una destilación por arrastre con vapor de agua. El tiempo de destilación fue de 30 minutos. Una vez obtenido el aceite esencial (1.3 mL) se guardó en un vial de color ámbar, manteniéndolo en refrigeración (FHEUM, 2001).

6.5. PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Se realizó la comparación de los espectros de masas de los componentes del aceite esencial y de las fracciones activas con los reportados de compuestos previamente identificados en *T. parthenium* de distinto origen. Dicho análisis se llevó a cabo a través de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas CG-EM, para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie II acoplado a un espectrómetro de masas modelo JEOL JMS-SX102A de doble sector, geometría inversa.

Se inyectaron 0.1 μL de la muestra en una columna capilar HP-5MS (5% metil fenil silicona), de 30 metros de longitud, 0.31 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0.25 μm . Se utilizó como gas acarreador Helio, a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm^2 y con un flujo de 2 mL/min . La temperatura del inyector se mantuvo a 300 $^{\circ}\text{C}$ y el de la columna inicial fue de 50 $^{\circ}\text{C}$. El calentamiento se realizó gradualmente (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta alcanzar 300 $^{\circ}\text{C}$. La técnica utilizada fue de baja resolución por impacto electrónico y detección de iones positivos.

6.6. ENSAYO BIOLÓGICO

6.6.1. Disección de la aorta torácica y sistema de registro.

El estudio se realizó en ratas Wistar macho de 250-300 g de peso. Los animales se sacrificaron por sobredosis de anestesia con éter etílico, posteriormente se realizó la disección de la aorta torácica, limpiándola de grasa y tejido conectivo. Se cortaron 8 anillos de 2 mm de largo aproximadamente, los cuales se incubaron en cámaras verticales para tejidos aislados conteniendo solución Krebs con composición mM de NaCl 117; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 24.8; KH₂PO₄ 1.2 y glucosa 11.1. Los anillos de aorta (AA) se mantuvieron durante toda la evaluación a una temperatura de 37 ± 1 °C con burbujeo continuo de 95% O₂ y 5% CO₂ (gas carbógeno).

Bajo estas condiciones, los AA se sujetaron con ganchos de alambre Nicromel Núm 25, al fondo de la cámara y el otro extremo al transductor de desplazamiento de fuerza FT03, el cual está acoplado a un Polígrafo Biopack System.

La adquisición de los datos se realizó automáticamente por medio del programa Acknowledge (Biopack, Co., USA). La tensión inicial para los AA fue de 3 g dejándolos estabilizar por un periodo de 30 minutos.

Antes de realizar la evaluación de los extractos, los AA se estimularon con noradrenalina (Bitartrato de (-)-Arterenol, Sigma Co.) a una concentración de 1×10^{-6} M, tres veces a intervalos de 30 minutos. Después de cada estimulación se lavaron tres veces con solución de Krebs.

Como criterio de inclusión se evaluó la integridad del endotelio sólo para los experimentos de la actividad vasorelajante a noradrenalina. Después de estimular con noradrenalina 1×10^{-6} M y alcanzar la meseta de contracción, se adicionó Carbacol (Sigma Co.) a una concentración de 1×10^{-6} M. Si el endotelio estaba íntegro se producía una vasorelajación.

6.6.2. Actividad vasorelajante

Para probar el efecto vasorelajante de los extractos y el aceite esencial los AA fueron contraídos con noradrenalina $0.1 \mu\text{M}$. Una vez que se alcanzó la meseta de contracción (aproximadamente en 10 min.), se adicionó de forma acumulativa concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de extractos de prueba.

Los extractos evaluados se prepararon suspendiéndolos con una gota de Tween 80 (vehículo) en la cantidad necesaria de agua destilada para obtener las concentraciones indicadas.

De los ocho AA que se tuvieron en cada experimento, uno o dos de ellos se tuvieron como control. La solución control se preparó adicionando la misma cantidad de Tween 80 para alcanzar la misma concentración que se adicionó en la sustancia de prueba.

6.6.3. Actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina

Se determinó realizando curvas concentración-respuesta acumulativas de Serotonina a concentraciones de 1×10^{-7} , 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} y 3×10^{-5} M adicionadas en este orden. Primero se realizó una curva acumulativa de Serotonina sin que los AA hayan sido incubados con extracto, para tomarla como referencia y así calcular el porcentaje de inhibición a las contracciones. Después de lavar el tejido por tres veces con solución Krebs, el tejido se dejó reposar durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron los anillos de aorta durante 10 minutos con los extractos de prueba, después de este periodo se volvieron a contraer los AA con Serotonina a las concentraciones evaluadas inicialmente.

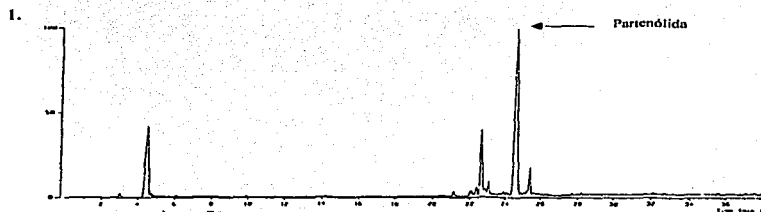
Las concentraciones evaluadas de los extractos fueron de 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$, preparadas de manera similar a las descritas anteriormente.

Para evaluar la reversibilidad de la actividad del aceite esencial como inhibidor a las contracciones se volvió a adicionar Serotonina a los AA a las concentraciones probadas inicialmente. Para esto se lavaron los AA tres veces con solución Krebs después de haber evaluado el aceite esencial, y se dejaron reposar durante 30 minutos. Al igual que en el experimento de vasorelajación, también se corrieron preparaciones de AA controles en cada experimento, los cuales se trataron con el vehículo.

7. RESULTADOS

7.1. CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS DE CH_2Cl_2 DE LA PLANTA SECA, FRESCA Y PARTENÓLIDA

La partenólida (m/z 248) no se encontró en los extractos obtenidos de la planta fresca ni en la obtenida de la planta seca como se muestra en los cromatogramas de gases. Fig. 15 y 16.



2.

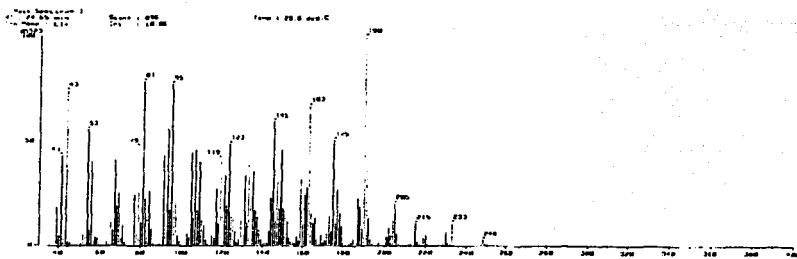


Figura 15. Cromatograma de gases de la partenólida, TR 24.65 min. (1), Espectro de masas (2).

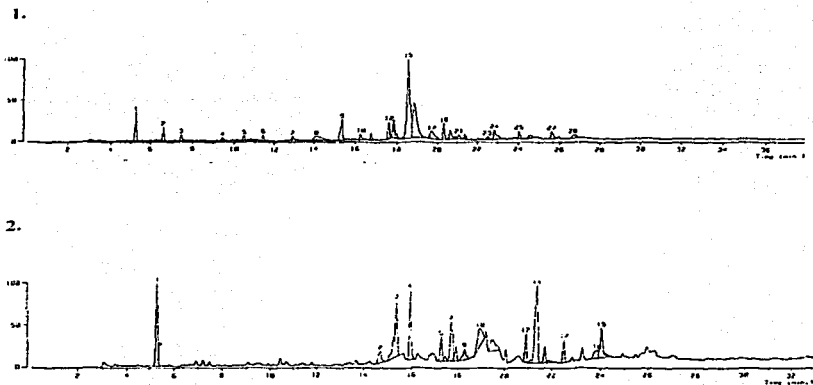


Figura 16. Cromatograma de gases del extracto CH_2Cl_2 de la planta fresca (1), extracto de la planta seca (2), bajo las mismas condiciones experimentales.

7.2. ACTIVIDAD VASORELAJANTE DE LOS EXTRACTOS DE CH_2Cl_2 A NORADRENALINA

Los extractos obtenidos de la planta fresca produjeron una vasorelajación en los anillos de aorta contraídos con noradrenalina del 84 %, mayor a la del extracto obtenido de la planta seca (42 %). El vehículo que se utilizó en el control (Tween 80, trazas) no presenta efecto alguno a las concentraciones utilizadas para suspender el extracto. El aceite esencial no produjo vasorelajación. (Fig. 17)

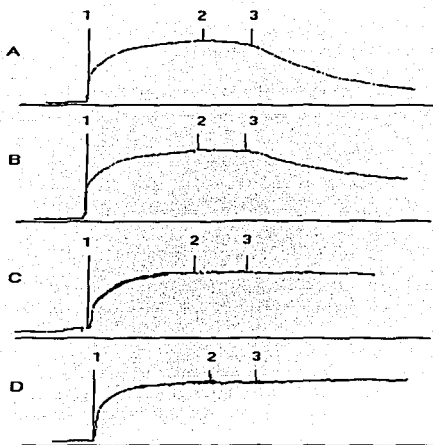


Figura 17. Efecto vasorelajante de los extractos de CH_2Cl_2 a la contracción inducida por noradrenalina Planta fresca 84 % (A), Planta seca 42 % (B), Aceite esencial 0 % (C) y Control 0 % (D). A concentraciones de 50 (1), 100 (2) y 200 (3) $\mu\text{g/ml}$. de extractos de prueba.

7.3. ACTIVIDAD INHIBITORIA A LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR SEROTONINA

7.3.1. Estabilidad de la preparación

Para determinar la estabilidad la preparación se realizaron dos curvas concentración-respuesta de Serotonina, espaciados cada uno por 30 minutos, tiempo utilizado para realizar la evaluación de los extractos. La preparación fue estable y las curvas fueron totalmente reproducibles en la misma preparación, bajo las condiciones experimentales en las que se trabajó. (Fig. 18).

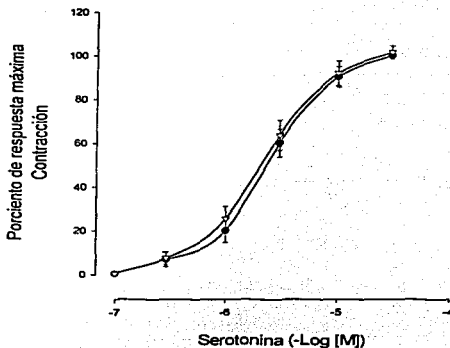


Figura 18. Curva Concentración-Respuesta para evaluar la estabilidad de la preparación. Actividad vasoconstrictora de la Serotonina a tiempo 0 (●), a los 30 minutos (▽) después de haber realizado la primera curva. Los resultados son el promedio \pm EEM de 18 repeticiones.

7.3.2. Efecto antagonista de los extractos obtenidos de la planta fresca, la planta seca y aceite esencial, sobre las contracciones inducidas por Serotonina

En cada experimento se consideró una o dos pruebas control, demostrándose que este no influía en la respuesta del tejido. (Fig. 19).



Figura 19. Curvas concentración-respuesta acumulativas de Serotonina, pruebas control, a concentraciones de (1) 1×10^{-7} , (2) 3×10^{-7} , (3) 1×10^{-6} , (4) 3×10^{-6} , (5) 1×10^{-5} y (6) 3×10^{-5} ; (7) lavado. A. Tiempo 0, B. A los 30 minutos.

El aceite esencial y la planta fresca de *Tanacetum parthenium* presentaron una inhibición no competitiva dependiente de la concentración, a las contracciones inducidas por Serotonina. La planta seca no presentó este efecto. (Fig. 20, 21 y 22).

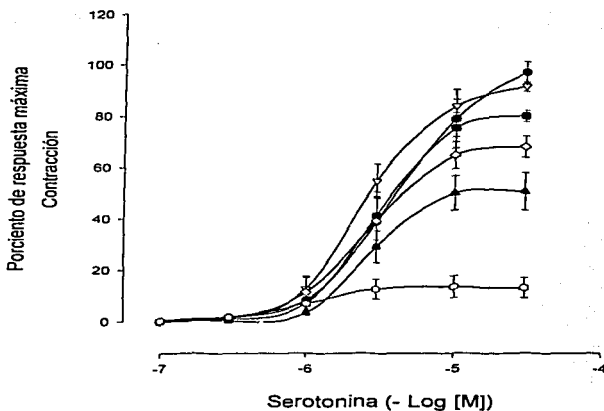


Figura 20. Curva Concentración-Respuesta contráctil provocada por Serotonina (1×10^{-6} M). En ausencia (●) y en presencia del extracto de CH_2Cl_2 de la planta fresca a concentraciones de 50 (∇), 75 (■), 100 (◇), 150 (▲) y 200 (○) $\mu g/mL$. Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

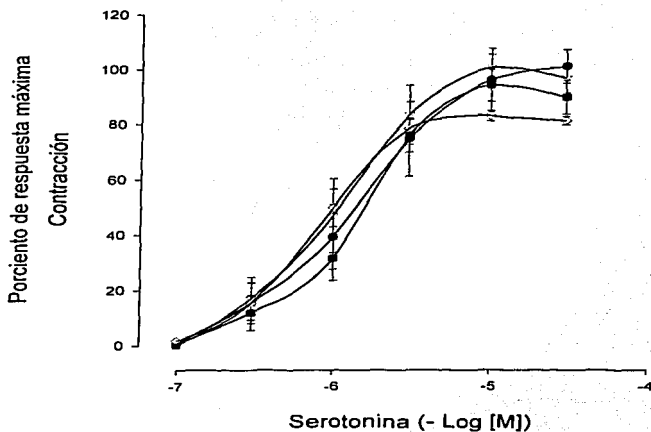


Figura 21. Curva Concentración-Respuesta contráctil provocada por Serotonina (1×10^6 M). En ausencia (●) y en presencia del extracto de CH_2Cl_2 de la planta seca a concentraciones de 50 (∇), 100 (◐) y 200 (○) $\mu\text{g/mL}$. Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

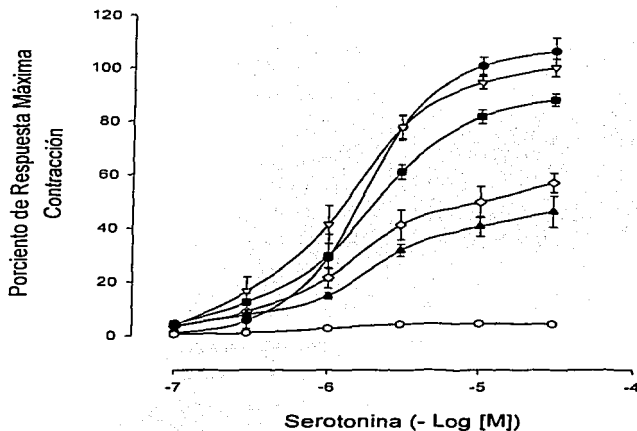


Figura 22. Curva Concentración-Respuesta contráctil provocada por Serotonina (1×10^{-6} M). En ausencia (●) y en presencia del Aceite Esencial a concentraciones de 50 (▽), 75 (■), 100 (◊), 150 (▲) y 200 (○) $\mu\text{g/mL}$. Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

El aceite esencial y la planta fresca son más potentes que la planta seca para inhibir las contracciones inducidas por Serotonina. Esto sugiere que parte de la actividad de la Santa María esta en los compuestos que constituyen el aceite esencial. (Figura 23)

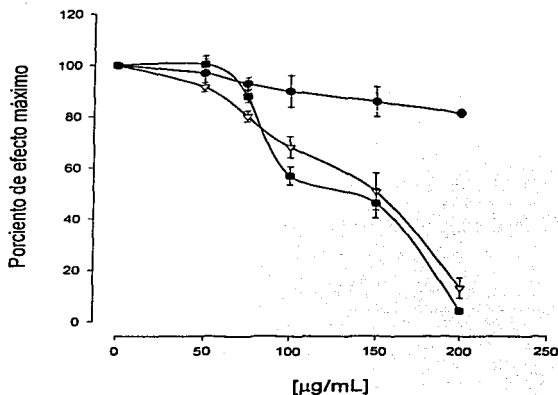


Figura 23. Curva Concentración-respuesta del efecto inhibitorio del Aceite esencial ■ (CI₅₀=125 µg/mL), Planta fresca ▽ (CI₅₀=130 µg/mL), y Planta seca (●) a la respuesta contráctil inducida por Serotonina (3×10^{-5} M). Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

7.3.3. Efecto antagonista reversible del Aceite esencial

El aceite esencial presentó un efecto antagonista reversible (Fig. 24), es decir cuando el tejido fue lavado y nuevamente contraído con Serotonina después de haber inhibido las contracciones, éste vuelve a contraer en la misma magnitud, lo cual indica que el aceite esencial no daña el tejido. Lo anterior no sucede con el extracto de diclorometano de la planta fresca ya que este provoca una pérdida progresiva del tono en anillos de aorta precontraídos, marcando una diferencia entre el Aceite esencial y el extracto de CH_2Cl_2 de planta fresca. El efecto irreversible del extracto de *Tanacetum parthenium* lo había señalado previamente Barsby y col. (1992).

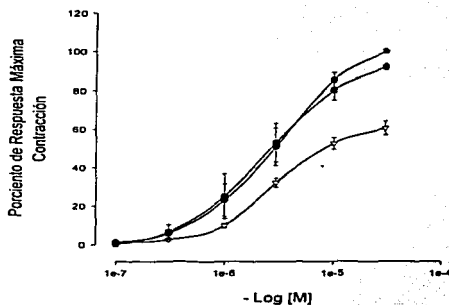


Figura 24. Curva Concentración-Respuesta de las contracciones inducidas por Serotonina. Antes de aplicar el Aceite esencial (●), en presencia del Aceite esencial a una concentración de 130 $\mu\text{g/mL}$ (▽) y 30. min. después de haber aplicado el Aceite esencial (■). Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

7.4. ACTIVIDAD INHIBITORIA A LA SEROTONINA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE CH_2Cl_2 DE PLANTA FRESCA

7.4.1. Fraccionamiento biodirigido

En la figura 14 se presenta al extracto de diclorometano las líneas de color más intenso indican las fracciones que tuvieron mayor actividad inhibitoria de las contracciones inducidas por Serotonina (3×10^{-5} M).

7.4.2. Actividad antagonista a las contracciones inducidas por Serotonina y compuestos de las fracciones primarias y secundarias

Se evaluó el efecto inhibitorio de las fracciones primarias y secundarias del extracto de la planta fresca a una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 25 y 26). Como se puede observar en las fracciones primarias la fracción más activa fue la F-5, la cual se procedió a fraccionar posteriormente.

A cada fracción se le realizaron estudios de CG-EM. En la Fracción F-2 y F-3 se encontraron compuestos que también se encuentran en el aceite esencial, tales como el alcanfor, el p-cimeno, el α -terpineno, el terpineol-4, el β -farneseno, la ocimena, el óxido de cariofileno, el cariofileno y los ésteres espirocetálicos, además de contener otros compuestos que no se identificaron.

En la fracción F-4 se encontraron principalmente compuestos con iones moleculares a m/z 248. Los espectros de masas de estos compuestos son diferentes a los de los compuestos ya reportados con iones moleculares m/z 248, incluyendo la partenólida.

En la fracción F-5 se encontraron una mezcla de compuestos con ion molecular de 278 m/z y un compuesto mayoritario con ion molecular de 238 m/z .

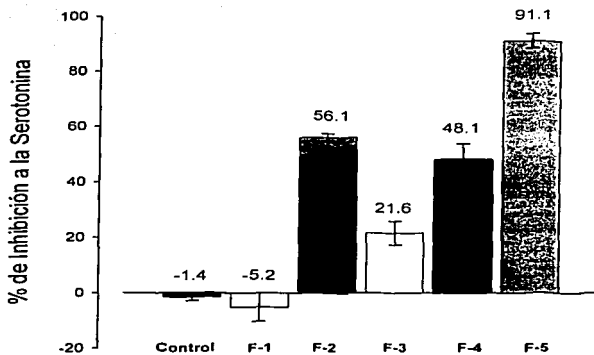


Figura 25. Inhibición a la respuesta contráctil inducida por Serotonina (3×10^{-5} M) por las fracciones primarias del extracto de CH_2Cl_2 de *T. parthenium* en anillos de aorta de rata. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 6 repeticiones, a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La Fracción más activa F-5 se fraccionó obteniéndose las fracciones secundarias F-5.1 a F-5.6 (Fig. 26). Las fracciones que presentaron mayor actividad inhibitoria a las contracciones inducidas por Serotonina (3×10^{-5} M) fueron la F-5.2 y F-5.3. Los compuestos mayoritarios de estas dos fracciones presentaron iones moleculares de m/z 238 y m/z 278 respectivamente

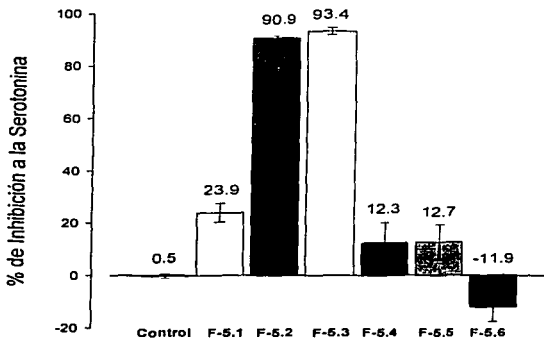


Figura 26. Inhibición a la respuesta contráctil inducida por Serotonina (3×10^{-5} M) por las fracciones secundarias del extracto de diclorometano de *T. parthenium* en anillos de aorta de rata. Los resultados representan el promedio \pm EEM de 6 repeticiones, a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

15

La actividad inhibitoria de las contracciones inducidas por Serotonina por el extracto de diclorometano de *T. parthenium* se debe a un sinergismo entre los diferentes compuestos que tiene, ya que la CI_{50} del In F-5 (Tabla 2) disminuye únicamente la mitad en comparación con la del extracto de la planta fresca, y la actividad de las fracciones secundarias no aumenta respecto a la fracción de donde se obtuvieron, incluso se aprecia que son ligeramente menos polares (Fig. 27).

Extracto / Fracción	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Potencia relativa
Extracto de Planta fresca	150	1
F-5	75	0.5
F-5.2	86.4	0.576
F-5.3	95.5	0.636

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) de las fracciones activas en el fraccionamiento biodirigido del extracto de CH_2Cl_2 de planta fresca. Potencia relativa respecto al extracto de la planta fresca.

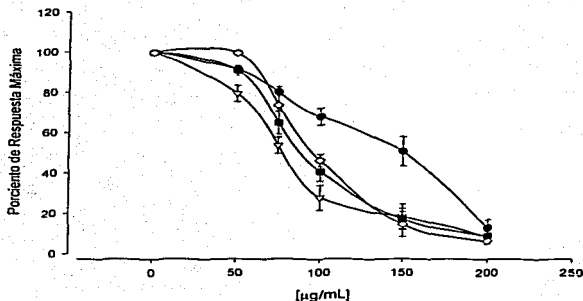


Figura 27. Comparación del efecto inhibitorio de las contracciones inducidas por Serotonina (3×10^{-5} M) del extracto de la planta fresca ● ($CI_{50}=150$ $\mu\text{g/mL}$), de la fracción F-5 ∇ ($CI_{50}=75$ $\mu\text{g/mL}$), de la fracción F-5.2 ■ ($CI_{50}=86.4$ $\mu\text{g/mL}$), y de la fracción F-5.3 ○ ($CI_{50}=95.5$ $\mu\text{g/mL}$). Los resultados son el promedio \pm EEM de 6 repeticiones.

7.5. CROMATOGRAMA DE GASES Y ESPECTRO DE MASAS DE LAS FRACCIONES ACTIVAS F-5.2 Y F-5.3

En el Cromatograma de Gases de la fracción F 5.2 (Fig. 28) se observa un compuesto mayoritario y el espectro de masas del compuesto mayoritario. De esta fracción se realizó un nuevo fraccionamiento, obteniéndose la fracción F-5.22.

El patrón del espectro de masas de la fracción F-5.22 no corresponde a los reportados para compuestos identificados en *T. parthenium* de distinto origen, incluyendo la partenólida

a quien se le ha atribuido la actividad de *Tanacetum parthenium* (Heptinstall *et al.*, 1992)
(Fig. 29)

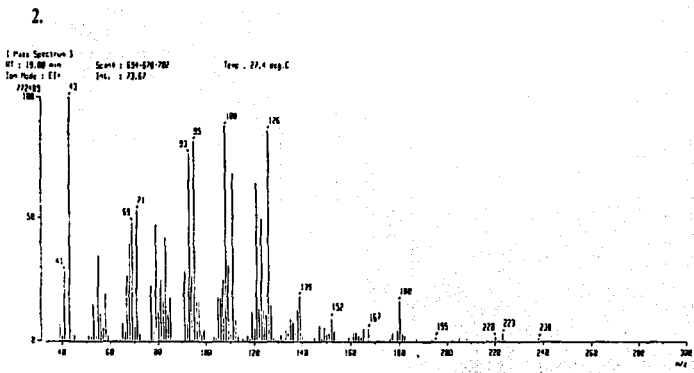
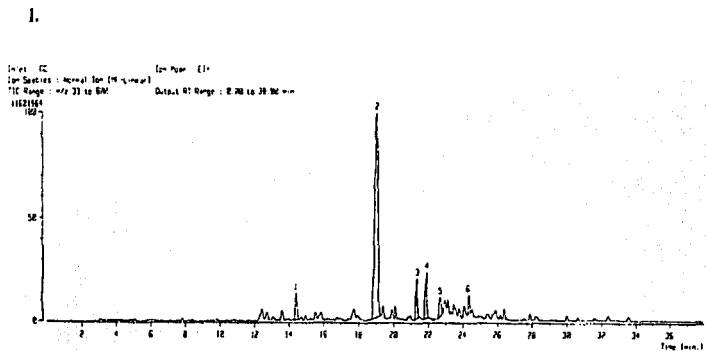
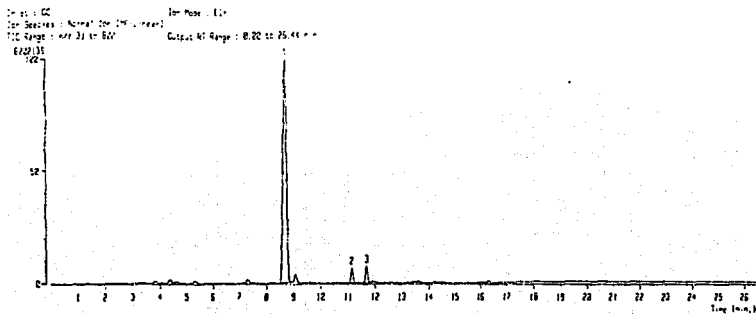


Figura 28. Cromatograma de Gases de la fracción F-5.2 (1) y el Espectro de masas del pico correspondiente al compuesto mayoritario, a un TR de 19.08 min. (2).

1.



2.

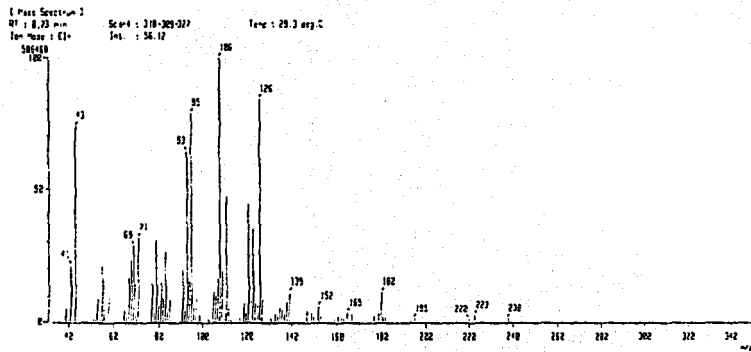
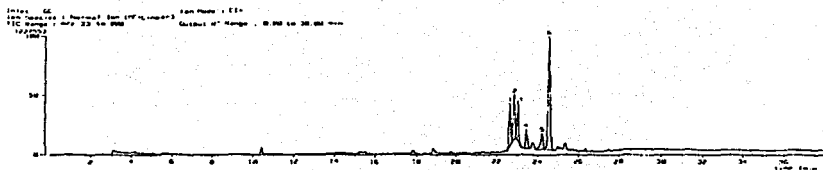


Figura 29. Cromatograma de Gases de la fracción F-5.22 (1) y el Espectro de masas del pico correspondiente a los compuestos mayoritario, a un TR de 8.73 min. (2).

Por CG-EM se analizó la fracción F-5.3 (Fig. 30), encontrando una mezcla de compuestos con ion molecular de m/z 278 y uno a m/z 280. Considerando los compuestos que se han identificado en esta especie de otro origen, los iones moleculares se ajustan a las fórmulas moleculares $C_{15}H_{18}O_5$ y $C_{15}H_{20}O_5$ correspondientes a lactonas sesquiterpénicas.

1.



2.

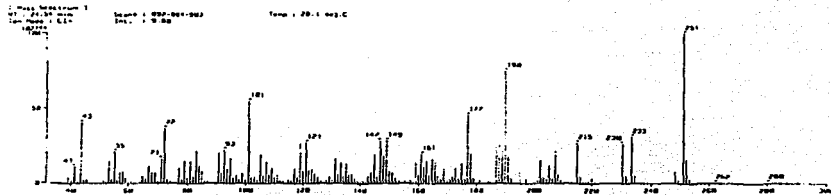
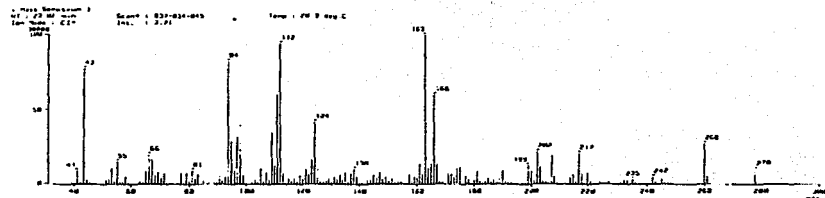


Figura 30. Cromatograma de Gases de la fracción F-5.3 (1) y los Espectros de masas de los picos correspondientes a los compuestos mayoritarios, a un TR 22.86 y 24.54 min. respectivamente(2).

7.6. COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum parthenium*

Por CG-EM se identificaron en el Aceite esencial (Fig. 31) compuestos tales como el alcanfor, el p-cimeno, el α -terpineno, el terpineol-4, el β -farneseno, la ocimeno, el óxido de cariofileno, el cariofileno y los ésteres espirocetalicos. Estos compuestos ya han sido identificados en *T. parthenium* de otro origen y los espectros obtenidos corresponden a los descrito en la literatura. Fig. (32-36).

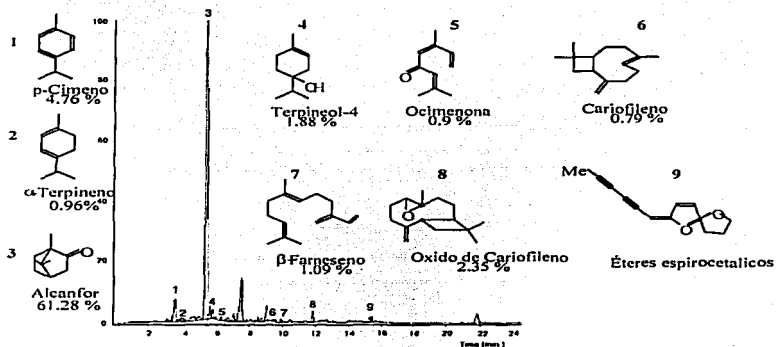
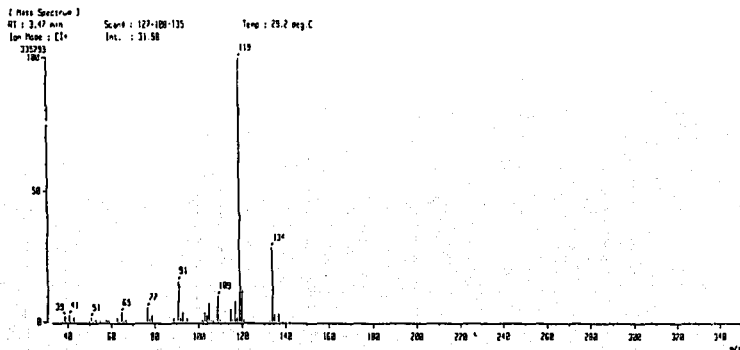


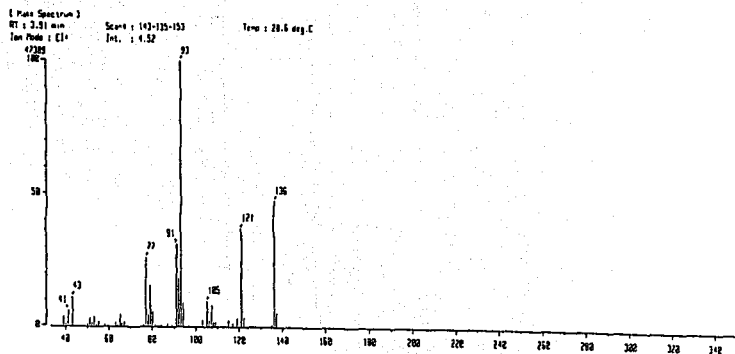
Figura 31. Cromatograma de Gases por IE del Aceite esencial de *T. parthenium*

El principal compuesto del aceite esencial de *T. parthenium* es el alcanfor (61.28 %) y el α -terpineno se evaluaron como inhibidores a las contracciones inducidas por Serotonina, sin embargo, no mostraron actividad a 200 $\mu\text{g/mL}$. Lo anterior sugiere que son otros los compuestos que tienen la actividad.

1.



2.

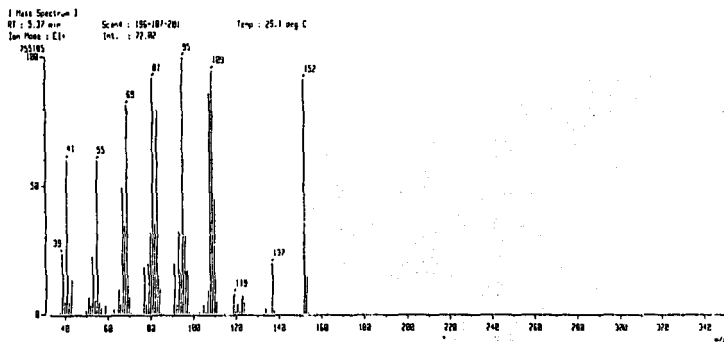


63

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

Figura 32. Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana. p-Cimeno (1) y α -Terpineno (2).

3.



4.

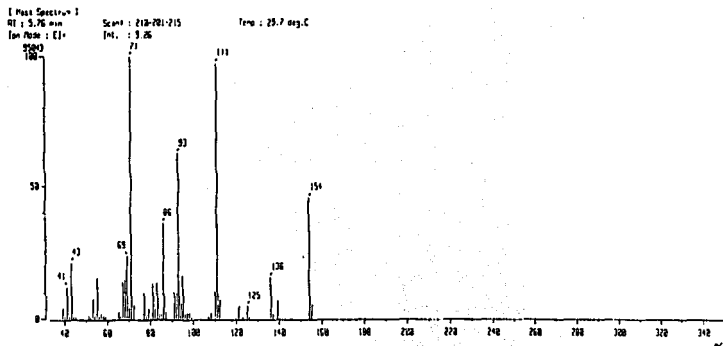
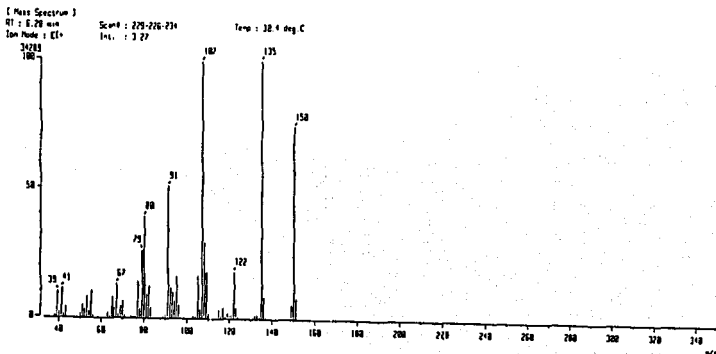


Figura 33. Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana. Alcanfor (3) y Terpineol-4 (4).

5.



6.

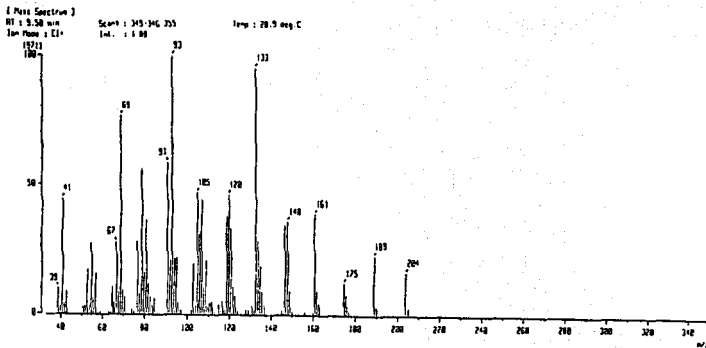
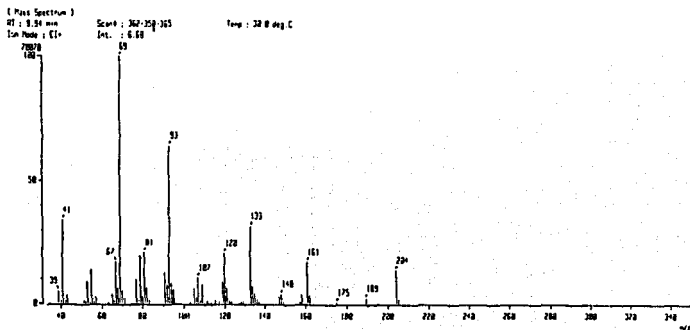


Figura 34. Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana. Ocimena (5) y Cariofileno (6).

7.



66

8.

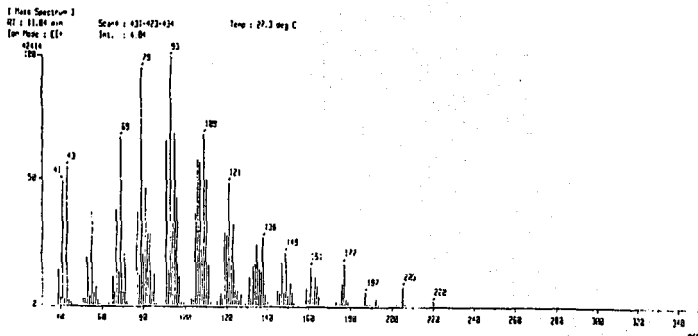
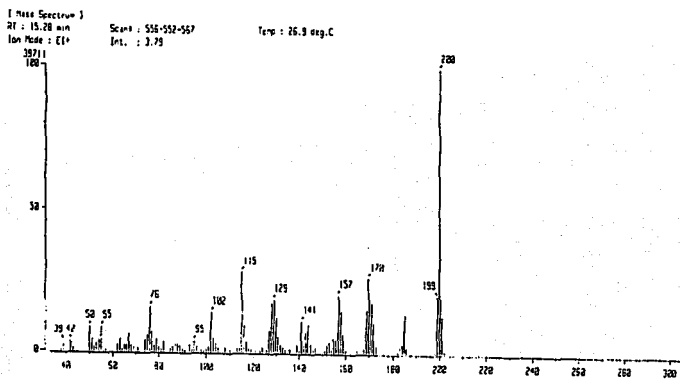


Figura 35. Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana. β -Farneseno (7) y Oxido de cariofileno (8).

TESIS CON
 FALLA DE CUBIEN

9.



67

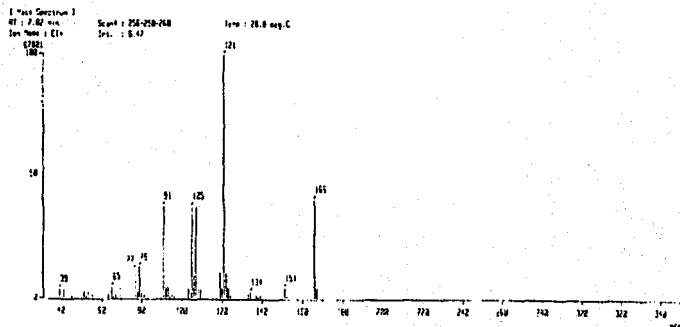


Figura 36. Espectros de masas de los compuestos identificados en el Aceite Esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana. Éteres espirocetalicos (9).

TESIS CON
 FALLA DE CUBIEN

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La partenólida no se encontró en los extractos de diclorometano de la planta fresca y seca (Fig. 15 y 16). El pico base del Cromatograma (señal mayor que toma el valor del 100 %) de la partenólida, se encuentra a un tiempo de retención de 24.65 min. con un ion molecular (último fragmento del espectro de masas) de m/z 248. El Cromatograma del extracto de diclorometano de planta fresca no presenta ningún pico a este tiempo de retención. Presenta dos compuestos con ion molecular de m/z 248 (TR 18.51 y 18.84 min.) sin embargo, el patrón de fragmentación es diferente al de la partenólida, ya que el pico base corresponde a m/z 248 y 230 respectivamente.

En el extracto de la planta seca tampoco esta presente la partenólida, el único compuesto con ion molecular de m/z 248 corresponde a un compuesto con un patrón de fragmentación distinto de la partenólida.

La ausencia de partenólida confirma los resultados obtenidos por Romo *et al.*, 1965 y 1970. Lo anterior hace suponer que hay otros compuestos activos en *T. parthenium* mexicana.

Antes de iniciar la evaluación de los extractos, fracciones y del aceite esencial se comprobó que el tejido fuera estable a las condiciones experimentales en que se llevaron a cabo las evaluaciones. Los resultados obtenidos demuestran que el tejido es estable a las condiciones experimentales en que se llevaron a cabo las evaluaciones (Fig. 17). Lo anterior indica que la disminución en la fuerza de contracción al contraer el tejido con Serotonina en presencia de los extractos no era debida a la pérdida de tono por agotamiento

del tejido. Durante cada experimento se tomaron uno o dos tejidos como control al cual se les adicionaba el vehículo sin extracto, obteniéndose los mismos resultados (Fig. 18).

La planta fresca presentó una inhibición no competitiva dependiente de la concentración a las contracciones inducidas por Serotonina (Fig. 20). La planta seca no presento este efecto (Fig. 21). Estos resultados hacían suponer que la pérdida de ciertos compuestos durante el secado de la planta fresca ocasionaban la pérdida de la actividad inhibitoria a la Serotonina, ya sea que los compuestos se degradaran o que fueran volátiles.

Para corroborar esta hipótesis se evaluó el aceite esencial como inhibidor de contracciones inducidas por Serotonina, presentando una actividad similar a la de la planta fresca. Esto indicaba que la pérdida de ciertos compuestos presentes en el aceite esencial podrían contribuir a la pérdida de actividad inhibitoria de la planta seca.

A diferencia del extracto de diclorometano de la planta fresca, el aceite esencial presenta un efecto antagonista reversible a la Serotonina (Fig. 22). Esto sugiere que el aceite esencial no contiene compuestos que dañan el tejido, a diferencia de lo descrito por Barsby, R., *et al* (1992), ya que ellos informaron que el extracto de diclorometano de la planta fresca presenta una actividad no reversible causando la pérdida progresiva del tono en anillos de aorta precontraídos con la fenilefrina, 5-hidroxitriptamina, tromboxano U46619, y angiotensina II.

La CI_{50} del aceite esencial fue de 125 $\mu\text{g/mL}$ y la de la planta fresca de 130 $\mu\text{g/mL}$, indicando que prácticamente tienen la misma potencia. La planta seca sólo presentó una disminución del 18.56 % de la fuerza de contracción a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Del fraccionamiento biodirigido del extracto de diclorometano de la planta fresca se obtuvieron inicialmente cinco fracciones (F-1 a F-5). Las fracciones F-2 y F-3 presentaron una inhibición del 56.1 y 21.6 % respectivamente a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 25). Ambas fracciones presentaron el olor característico del aceite esencial.

Por CG-EM se identificaron en estas dos fracciones, terpenos y otros que también se encontraron en el aceite esencial, entre los que se encuentran el alcanfor, el p-cimeno, el α -terpineno, el terpineol-4, el β -farneseno, la ocimenona, el óxido de cariofileno, el cariofileno y los ésteres espirocetalicos. Esto sugiere que efectivamente estos compuestos volátiles presentan actividad antagonista a las contracciones inducidas por Serotonina.

La fracción F-4 presentó un 48.1 % de inhibición a la Serotonina (Fig. 25). Los compuestos mayoritarios de esta fracción no fueron identificados, sin embargo, en los espectros de masas se observa un ion molecular de m/z 248, con un patrón de fragmentación diferente al de la partenólida.

La fracción F-5 fue la más activa (Fig. 25) con un 91.1 % de inhibición a las contracciones inducidas por Serotonina. Esto sugiere que además de los compuestos volátiles presentes en el Aceite esencial existen otro tipo de compuestos con una actividad inhibitoria mucho mayor. Del fraccionamiento de esta se obtuvieron seis fracciones secundarias, presentando mayor actividad antagonista las fracciones F-5.2 y F-5.3 con un porcentaje de inhibición a las contracciones inducidas por Serotonina del 90.9 y 93.4 % respectivamente a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Al evaluar el efecto inhibitorio del extracto de diclorometano de la planta fresca, de la fracción F-5, F-5.2 y de la F-5.3, se observa claramente que la actividad antagonista de la planta fresca se debe a un sinergismo entre diferentes compuestos y no a un solo compuesto, ya que la CI_{50} no disminuye significativamente (Fig. 27).

Después de fraccionar la fracción F-5.2 se obtuvo la fracción F-5.22, con apariencia aceitosa de color verde oscuro. En el cromatograma se vuelve a observar una mezcla de compuestos, de los cuales el compuesto mayoritario está presente en más de un 95 %. El espectro de masas de este compuesto muestra un ion molecular de m/z 238. El patrón de fragmentación que presenta este compuesto no ha sido descrito para los compuestos ya identificados de *T. parthenium* de otro origen (Knight, 1995; Bohlman y Zdero, 1982). Lo anterior sugiere que este compuesto es novedoso, sin embargo aún con los espectros de RMN de hidrógeno no fue posible hasta ahora identificarlo, debido entre otras cosas a la pequeña cantidad en la que se encuentra y a que no se logró purificar dado que se trata de una mezcla de compuestos.

La fracción F-5.3 presenta una mezcla de compuestos como se observa en su Cromatograma (Fig. 30). En los espectros de masas de estos compuestos y considerando los compuestos que se han identificado en *T. parthenium* de otro origen (Knight, 1995; Bohlman y Zdero, 1982), estos compuestos se ajustan a las fórmulas moleculares $C_{15}H_{18}O_5$ y $C_{15}H_{20}O_5$ correspondientes a lactonas sesquiterpénicas m/z 278.

Por CG-EM se identificaron en el aceite esencial de *T. parthenium* nueve compuestos, los cuales ya habían sido previamente reportados (Knight, 1995; Bohlman y Zdero, 1982; Hendriks, H. 1996).

El principal compuesto del aceite esencial fue el alcanfor (61.28 %), este compuesto se evaluó como inhibidor de las contracciones inducidas por Serotonina, sin embargo, no presentó dicha actividad. También se evaluó el α -terpineno y tampoco presentó actividad. Por lo anterior se puede pensar que son otros los componentes del aceite esencial los que presentan la actividad biológica.

Los demás compuestos presentes en el aceite esencial fueron: el p-cimeno (4.76 %), el α -terpineno (0.96 %), el terpineol-4 (1.88 %), el β -farneseno (1.09 %), la ocimenona (0.9%), el óxido de cariofileno (2.35 %), el cariofileno (0.79 %) y los ésteres espirocetálicos (1.14 %).

Es importante señalar que hasta antes de realizar el presente trabajo no se había considerado al aceite esencial como el compuesto activo de *Tanacetum parthenium*, lo que representa una de las aportaciones más importantes del presente trabajo, ya que presentó un efecto inhibitorio a las contracciones inducidas por Serotonina de tipo no competitivo y reversible. El efecto reversible es importante de considerar, ya que se tiene reportado que los extractos de diclorometano dañan el tejido por lo que no es reversible.

Por otro lado, el hecho de demostrar que el *T. parthenium* mexicana no tiene partenólida pero presenta el mismo efecto de otros *T. parthenium* que crecen en otras latitudes y que tienen partenólida, es importante, ya que desde el punto de vista comercial estos resultados indican que el *T. parthenium* mexicana se puede utilizar como materia

prima para elaborar fitomedicamentos cuyo principio activo puede elaborarse con el extracto obtenido de la planta fresca sin que necesariamente corresponda y cumpla con la monografía para el *T. parthenium* que aparece en la USP XXV, y en su lugar debe considerarse la monografía del *T. parthenium* que aparece en la FHEUM (1ra ed.) para el *T. parthenium* mexicano (Santa María).

Queda abierta la investigación para identificar los sesquiterpenos que se encuentran en las fracciones activas y de esta manera identificar al o a los compuestos responsables de la actividad terapéutica de *T. parthenium* mexicana.

9. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se demostró que el extracto de diclorometano de la planta fresca y el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana, inhibe las contracciones inducidas por Serotonina siendo de tipo no competitivo y dependiente de la concentración.
- Con el fraccionamiento biodirigido del extracto de diclorometano de la planta fresca se obtuvieron dos fracciones activas, una de ellas rica en lactonas sesquiterpénicas que no contienen partenólida. La otra fracción llevó a un compuesto que aunque no fue identificado completamente su ion no corresponde a los compuestos descritos en *T. parthenium* de otro origen.
- El aceite esencial de *T. parthenium* mexicana inhibe las contracciones inducidas por Serotonina de forma no competitiva, dependiente de la concentración y reversible.
- Se identificaron nueve compuestos del aceite esencial, los cuales ya habían sido reportados en *T. parthenium* de otro origen. El componente mayoritario fue el alcanfor presente en un (61.28 %).
- La pérdida de la actividad de la planta seca puede ser debida a la pérdida de aceites esenciales durante su secado.
- La actividad de *Tanacetum parthenium* mexicana puede ser debida a los aceites esenciales que contiene, a otras lactonas sesquiterpénicas no reportadas diferentes a la partenólida, o a ambos tipos de compuestos.

Propuestas:

- Identificar los compuestos mayoritarios de la fracción F-5 y evaluar su actividad.
- Evaluar la actividad biológica de los compuestos que constituyen el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* mexicana.
- Identificar los compuestos presentes en las fracciones F-2 y F-4, ya que también contienen compuestos que poseen actividad.
- Evaluar el extracto de diclorometano de la planta fresca, seca, aceite esencial y sus compuestos activos identificados con otros agonistas, tales como la noradrenalina, la angiotensina II, etc., para investigar el mecanismo de acción de estos compuestos activos.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, H. (1993). La herbolaria y la medicina tradicional mexicana en torno a la formación de recursos humanos para la salud. La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Publicación de la Secretaría de Salud. México. 233-246.
- Argueta, A. (1994). Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. III. Instituto Nacional Indigenista, México. 1273-1275.
- Barsby, R. W. J., Salan, U., Knigh, D. W. and Hoult, J. R. S. (1992). Feverfew extracts and parthenolide irreversibly inhibit vascular responses of the rabbit aorta. *J. Pharm. Pharmacol.* 44: 737-740.
- Barsby, R.W.J., Knight, D.W. and MacFadzean I. (1993). A chloroform extract of the herb feverfew blocks voltage-dependent potassium currents recorded from single smooth muscle cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:641-645.
- Barsby, R.W.J., Salan, U., Knigh, D.W. and Hoult, J.R.S.(1993). Feverfew and vascular smooth muscle: extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles, depend upon sesquiterpene lactone content. *J. Pharm. Pharmacol.* 59:20-25.

- Béjar, E. (1996). Parthenolide inhibits the contractile responses of rat stomach fundus to fenfluramine and dextroamphetamine but not serotonin. *J. Ethnopharm.* 50: 1-12.
- Bohlmann, F. and Zdero, C. (1982). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Tanacetum parthenium*. *Phytochem.* 21: 2543-2549.
- Blau, J. N. (1992). Migraine: theories of pathogenesis. *The Lancet* 339:1202-1209.
- Brown, A. M. G. *et al.* (1997). Effects of extracts of *Tanacetum* species on human polymorphonuclear leucocyte activity *in vitro*. *Phytother. Res.* 11:479-484.
- Brown, A. M. G., Lowe, K. C., *et al.* (1996). Comparison of extraction procedures for parthenolide in *Tanacetum parthenium*. *Phytochem. Anal.* 7:86-91.
- Capasso, F. (1986). The effect of an aqueous extract of *T. parthenium* L. On araquidonic acid metabolism by rat peritoneal leucocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 38:71-72.
- Collier, H. O. J., But, M., McDonald-Gibson, W. J. and Saed, S. A. (1980). Extract of feverfew inhibits prostaglandins biosynthesis. *The lancet* 922-923.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 1ra ed. México, 2001. 19-20

- Feuerstein, G. y Miller, A. (1997). Vasoactive mediators of cerebral vessels. En Welch, K. M. A., Caplan, L. R., *et al.* (Editores). Cerebrovascular diseases. Academic Press. USA. 8-13.
- Ferkany, J.W. and Kenakin, T. (1998). Isolated blood vessel assays. En Currents protocols in pharmacology. John Wiley and Sons Inc. USA, 4.4.1
- Flórez, J. y Pazos, A. (1992). Mediadores celulares I. Histamina y 5-Hidroxitriptamina. En Flórez, J., Armijo, J. A. Y Mediavilla, A. (Editores). Fisiología humana. Ediciones científicas y Técnicas SA. España, 280-296.
- Foster, S. (1991). Feverfew, *Tanacetum parthenium*. Col. Herbal Gram, American Botanical Council. Núm. 310: 3-7.
- Groenewegwn, W.A., Knigth, D.W. and Heptinstall, S. (1986). Compounds extracted from feverfew that have anti-secretory activity contain an alpha-methylene butyrolactone unit. *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 709-712.
- Gryglewski, R. J. and Vane, J. R. (1990). A possible role of endothelial vasorelaxants in the pathogenesis of migraine. En Sandler, M. y Collins, G. (Editores). Migraine: A spectrum of ideas. Oxford Medical Publications. UK: 51-57.

- Hayes, N. A. and Foreman J. C. (1987). The activity of compounds extracted from feverfew on histamine release from rat mast cells. *J. Pharm., Pharmacol.* 39: 466-470.
- Hendriks, H., Bos, R. and Woerdenbag, H. J. (1996). The essential oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. *Flavour Fragrance J.* 11:367-371.
- Heptinstall, S., Groenewegen, W. A., Spangenberg, P. and Loesche, W. (1987). Extract of feverfew may inhibit platelet behaviour via neutralization of sulphhydryl groups. *J. Pharm. Pharmacol.* 9: 459-465.
- Heptinstall, S., White, A., Williamson, L. and Mitchell, J. R. A. (1985) Extracts of feverfew inhibit granule secretion in blood platelets and polymorphonuclear leucocytes. *The Lancet.* 1071-1073.
- Hewlett, J.M., Begley, J.M., *et al.* (1996). Sesquiterpene lactones from feverfew, *Tanacetum parthenium*: isolation, structural revision, activity against human blood platelet function and implications for migraine therapy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* 1970-1986.
- Hwang, D., Fischer, N.H., *et al.* (1996). Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res.Com.* 226: 810-818.

- Johnson, E. S., Kadam N. P., *et al.* (1985). Efficacy of Feverfew as prophylactic treatment of migraine. *Br. Med. J.* 191:569-573.
- Kelly, L., Rogers, I., *et al.* (2000). Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. *Eur. J. Pharmacol. Sc.* 9:355-363.
- Kisiel, W. and Stojakowska A. (1997). A sesquiterpene coumarin ether transformed roots of *Tanacetum parthenium*. *Phytochem.* 46:515-516.
- Lawrence. (1994). The lawrence review of natural products.
- Linares, M. (1996). Selección de plantas medicinales de México. Noriega editores, México. 84-85.
- Lobo, B.L., *et al.* (1999). Symptomatic pharmacotherapy of migraine. *Clin. Therap.* 21:1118-1130.
- Martínez, M. (1992). Las plantas medicinales de México. 6ta ed. Ediciones botas, México. 286-287.

- Mezquita, A. M. (2000). Control de calidad y formulación de tabletas de *T. parthenium* por compresión directa. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM.
- Murphy, J. J., Heptinstall, S. and Mitchell, J. R. A. (1988). Randomized double blind placebo-controlled trial of feverfew in migraine prevention. *The Lancet*. 2:189-192.
- Naveen, K. J. and Shrinivas K. K. (1999). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. Extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 68:251-259.
- Nilsson, T., Longmore, J., *et al.* (1999). Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques.
- Palevitch, D., Earon, G. and Carasso, R. (1997). Feverfew (*Tanacetum parthenium*) as a prophylactic treatment for migraine: a double-blind placebo-controlled study. *Phytother. Res.* 11:508-511.
- Patrick M., Heptinstall, S. and Doherty, M. (1989). Feverfew in rheumatoid arthritis: a double blind, placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 48:547-549.
- Peroutka, S. J. (2001). Fármacos eficaces para el tratamiento de la migraña. En Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W. y Gilman A. G. (Editores). *Las Bases farmacológicas de la terapéutica*. 9a ed. Mc Graw-Hill, USA. 521-538.

- Raskin N. H. (1990). Pharmacology of migraine. *Prog. Drug. Res.* 34:209.
- Romó, J., Romo de Vivar, R., *et al.* (1965). Structure of Santamarine, a new sesquiterpene lactone. *Tetrahedron*. 21:1741-1745.
- Romo, J., Romo de Vivar, R., *et al.* (1970). Constituents of *Artemisia* and *Chrysanthemum* species- the structures of chrysartemins A y B. *Phytochem.* 9:1615-1621.
- Smith, C. M. (1993). Tratamiento de la cefalea; alcaloides del cornezuelo de centeno. En Smith, C. M. y Reynard, A. M. (Editores). *Farmacología*. Editorial Medica Panamericana, Argentina, 424-431.
- Summer, H., Salan, V., Knihth, D. W. and Houtl, R.S. (1992). Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in leukocytes by Feverfew. *Biochem. Pharm.* 1: 2313-2320.
- Tatarinov, V.G. (1994). Sangre sistema cardiovascular. En *Anatomía y fisiología humana*. 3ra ed., Noriega editores. México, 257-261.
- Vickers, H. R. (1985). Feverfew and migraine. *Br. Med. J.* 48: 547.
- Weber, J. T., O'Connor, MF., *et al.* (1997). Activity of parthenolide at 5HT_{2A} receptors. *J. Nat. Prod.* 60:651-653.

- Wilkomirski, B. and Dubielecka, B. (1996). Sterol content as a similarity marker of different organs of two variety of *Chrysanthemum parthenium*. *Phytochem.* 42:1603-1604.
- Williams, C. A., Harbone, J. B. *et al.* (1999). The flavonoides of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochem.* 51:417-423.
- Williams, C. A., Hout, J. R. S., *et al.* (1995). A biologically active lipophilic flavonol from *T. parthenium*. *Phytochem.* 38:267-270.