



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DE  
PREPARADOS DE *Artemisia*  
*ludoviciana* NUTT.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIÓL. GERARDO DAVID ANAYA EUGENIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/523/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de septiembre de 2011 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) ANAYA EUGENIO GERARDO DAVID con número de cuenta 300194881 con la tesis titulada "Potencial Antidiabético de Preparados de *Artemisia ludoviciana* Nutt", realizada bajo la dirección del (la) DRA. RACHEL MATA ESSAYAG DE ESPINDOLA:

Presidente: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER  
Vocal: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Secretario: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
Suplente: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de septiembre de 2011

*María del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO

MCAA/MJFM/ASR/grf\*

## **Agradecimientos**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, que me brindó la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al CONACyT por el financiamiento brindado a través de los proyectos 150966 y 99395, indispensable para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo; guiarme con consejos y brindarme parte de sus enseñanzas para el desarrollo del presente trabajo.

A las Doctoras María Isabel Aguilar Laurents y Martha Lydia Macías Rubalcava, miembros de mi Comité tutorial, por las sugerencias y aportaciones a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado, que dedicaron tiempo para leer, revisar y mejorar la versión final de la tesis.

Dr. Robert Bye Boettler  
Dr. Ricardo Reyes Chilpa  
Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava  
Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
Dra. Irma Romero Álvarez

A la Q. Georgina Duarte Lisci de la Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, por todo su apoyo y asesoría durante la realización de los estudios de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas (CG-EM)

Al ser supremo que en ningún momento me ha abandonado y me supo iluminar y cuidar en situaciones adversas durante mis estudios de Maestría. Gracias Dios, por todo...

Agradezco a mi amada familia que nunca me ha dejado de apoyar en cada una de mis decisiones; y por que siempre han estado ahí cuando los necesite.

A Mis padres Lilia Eugenio Andraca y Marcos Nava García, porque sin su sacrificio no hubiese alcanzado la presente meta y por hacer de mi una persona de provecho

A mis hermanas Yanet Anaya Eugenio y Diana Laura Nava Eugenio y, a mi carnalito Marcos Oscar Nava Eugenio. Gracias por estar ahí y por soportarme.

A mis otros carnales: Uri Nimrod Ramírez Jarquín, Abraham Madariaga Mazón y Francisco Suarez Escamilla, por todos los consejos y experiencias vividas.

A cada uno de los miembros del laboratorio 124 del conjunto E, de la Facultad de Química: Isabel Rivero, Fernando Brindis, Araceli Pérez, Guadalupe Ángeles, por apoyarme y brindarme parte de sus conocimientos que apoyaron de manera importante la realización de este trabajo. Así también a Martín, Pepe, Chela, Frutsi, por todos esos buenos momentos. A Sonia, Sol, Martha, Harry, Viris, Bere, Erika, y a todos los demás.

A mis buenos amigos Abril Ortiz, Elizabeth Chávez, Rafa Jaimes, David Suarez, Ana Castañeda, Rafa Balderas, Lorena Hernández, Itzue Caviedes, Elsa García, Citlali Segura, Marisol Rodriguez y todos los que me faltan de la carrera.

A cada uno de los miembros del Real Chupirul AA y especialmente a tí Kike donde quiera que estes.

A los profesores del Posgrado en Ciencias Biológicas que me brindaron sus conocimientos y experiencias durante la Maestría.

**ÍNDICE**

ÍNDICE	I
Lista de Figuras	IV
Lista de Tablas	V
Lista de Abreviaturas	VI
I RESUMEN	i
Abstract	iii
II ANTECEDENTES	1
1 Generalidades Taxonómicas sobre <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	1
1. 1 Distribución	4
1. 2 Aspectos etnobotánicos	5
1. 3 Actividad biológica	11
1. 4 Composición química	13
2 Antecedentes Generales sobre la Diabetes Mellitus	33
2. 1 Definición y clasificación	33
2. 2 Impacto de la diabetes mellitus tipo 2 en el mundo y en México	35
2. 3 Tratamientos farmacológicos para la diabetes mellitus tipo 2	37
3 Diabetes y Plantas Medicinales en México	41
III HIPÓTESIS	42
IV OBJETIVOS	43
1 Objetivo General	43
2 Objetivos Particulares	43
V DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
1 Recolección del Material Vegetal	44
2 Preparación de los Extractos y Aceite Esencial	44
3 Ensayos Biológicos	45
3. 1 Evaluación de la toxicidad aguda	45
3. 2 Evaluación del efecto antidiabético	46
3. 2. 1 Efecto agudo hipoglucemiante	46

---

3. 2. 2 Efecto antihiper glucémico	47
4 Pruebas de Identidad	48
4. 1 Establecimiento de la composición del aceite esencial	48
4. 2 Determinación de los componentes volátiles	49
5 Análisis estadístico	49
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
1 Ensayos Biológicos	50
1. 1 Determinación de la toxicidad aguda	50
1. 2 Potencial antidiabético de <i>A. ludoviciana</i> Nutt.	52
1. 2. 1 Efecto agudo hipoglucemiante	53
1. 2. 1. 1 Efecto agudo hipoglucémico del extracto acuoso (EA)	53
1. 2. 1. 2 Efecto agudo hipoglucémico del extracto orgánico (EO)	55
1. 2. 2 Efecto antihiper glucémico	57
1. 2. 2. 1 Efecto del extracto acuoso (EA) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la glucosa	57
1. 2. 2. 2 Efecto del extracto orgánico (EO) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la glucosa	57
1. 2. 2. 3 Efecto del extracto acuoso (EA) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa	61
1. 2. 2. 4 Efecto del extracto orgánico (EO) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa	62
2 Pruebas de Identidad	64
2. 1 Establecimiento de los componentes volátiles de <i>A. ludoviciana</i> Nutt.	65

VII CONCLUSIONES	72
VIII PERSPECTIVAS	74
IX BIBLIOGRAFÍA	75
IX APÉNDICE	90
Tabla 1. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto acuoso (EA, 31.6, 100, 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en ratones normoglucémicos	90
Tabla 2. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto acuoso (EA, 31.6, 100, 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en ratones diabéticos	90
Tabla 3. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto orgánico (EO, 31.6, 100, 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en ratones normoglucémicos	90
Tabla 4. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto orgánico (EO, 31.6, 100, 300 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en ratones diabéticos	91
Tabla 5. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos	91
Tabla 6. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos	91
Tabla 7. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos	92
Tabla 8. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos	92
Tabla 9. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos	92
Tabla 10. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones	



diabéticos	93
Tabla 11. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos	93
Tabla 12. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos	93

## Lista de Figuras

Figura 1. Descripción general de <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	3
Figura 2. Distribución en México de <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	5
Figura 3. Algunos preparados de <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	8
Figura 4. Mortalidad por diabetes mellitus por sexo y entidad federativa en México en el año de 2009	36
Figura 5. Control de la regulación de los niveles de glucosa en el organismo	38
Figura 6. Órganos de blanco y mecanismos de algunos agentes antihiperoglucémicos orales administrados en pacientes con DMT2	39
Figura 7. Resumen de los ensayos dirigidos a evaluar el efecto antihiperoglucémico del extracto orgánico (EO) y del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en la prueba de tolerancia a la glucosa y/o a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos	48
Figura 8. Efecto hipoglucémico del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en ratones normoglucémicos	54
Figura 9. Efecto hipoglucémico del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en ratones diabéticos	54
Figura 10. Efecto hipoglucémico del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en ratones normoglucémicos	56
Figura 11. Efecto hipoglucémico del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en ratones diabéticos	56
Figura 12. Efecto del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos	58

Figura 13. Efecto del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos	58
Figura 14. Efecto del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos	60
Figura 15. Efecto del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos	60
Figura 16. Efecto del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos	61
Figura 17. Efecto del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos	62
Figura 18. Efecto del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos	63
Figura 19. Efecto del extracto orgánico (EO) de <i>A. ludoviciana</i> en los NGS en la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos	64
Figura 20. Cromatograma de gases del aceite esencial de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i>	67
Figura 21. Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (DVB/CAR/PDMS, fibra gris) de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i>	67
Figura 22. Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (PDMS, fibra roja) de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i>	70
Figura 23. Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (CAR/PDMS, fibra negra) de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i>	70

## Lista de Tablas

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Artemisia ludoviciana</i> y sinónimos	14
Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de <i>Artemisia ludoviciana</i>	30
Tabla 3. Toxicidad aguda de los preparados de <i>A. ludoviciana</i>	51
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de <i>A. ludoviciana</i>	68
Tabla 5. Compuestos volátiles de <i>A. ludoviciana</i> obtenidos de tres fibras con distinta polaridad	71

## Lista de Abreviaturas

ADA	American Diabetes Association
CAR	Carboxeno
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
DM	Diabetes Mellitus
DG	Diabetes Gestacional
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Media
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DDP-IV	Enzima Dipeptidil Peptidasa IV
DVB	Divinilbenceno
EA	Extracto Acuoso
EO	Extracto Orgánico
GLP-1	Péptido 1 Análogo del Glucagón
GIP	Péptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa
GLUT-4	Transportador para Glucosa Tipo 4
HS-SPME	Micro Extracción en Fase Gaseosa
h	Horas
IMN	Instituto Médico Nacional
NAD	Dinucleótido de la Adenin Nicotinamida
NGS	Niveles de Glucosa en Sangre
NIST	National Institute of Standars and Technology
PDMS	Polidimetilsiloxano
PGA	Prueba de Glucosa en Ayunas
POTG	Prueba Oral de Tolerancia a la Glucosa
POTS	Prueba Oral de Tolerancia a la Sacarosa
STZ	Estreptoizotocina

## I RESUMEN

Un importante problema de salud pública que aqueja a nuestra población es la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), enfermedad crónica degenerativa que principalmente afecta al sistema endocrino, causada por una falla en la secreción o acción de la insulina. A nivel nacional la DMT2 es una de las primeras causas de muerte. Los pacientes utilizan los más variados recursos terapéuticos, incluyendo las plantas medicinales, con la finalidad de tratar esta enfermedad. El estafiate (*Artemisia ludoviciana*), hierba aromática y ampliamente distribuida en el territorio mexicano, es una de las especies utilizada por la población mexicana para el tratamiento de la DMT2. En este contexto, el objetivo principal planteado al inicio del trabajo fue establecer, a nivel preclínico, el potencial antidiabético y toxicidad aguda de *A. ludoviciana*, con la finalidad de contribuir al uso racional de los productos herbolarios de México.

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó mediante el empleo de técnicas farmacológicas y fitoquímicas convencionales. Los resultados indican que los extractos orgánico (EO) y acuoso (EA) de la parte aérea de la planta, no son tóxicos en ratones de acuerdo al protocolo de Lorke. En todos los casos la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) fue mayor a 5 g/kg. En la segunda serie de experimentos se determinó el efecto hipoglucémico agudo del EO y del EA en ratones sanos y diabéticos (estreptozotocina, STZ 100 mg/kg). Estos preparados reducen significativamente los niveles de glucosa en sangre en el tiempo registrado. Los resultados fueron comparados con los controles blanco (salina NaCl 0.9%) y positivo (glibenclamida 10 mg/kg), la mejor actividad fue observada en los roedores diabéticos. Por otro lado en los ensayos para evaluar el efecto antihiperoglucémico se emplearon las pruebas de tolerancia a la glucosa y sacarosa. En la primera evaluación, el mejor efecto se observó para el EO en ratones diabéticos. Para la prueba de la tolerancia a la sacarosa los resultados indican que ambos extractos provocaron una inhibición significativa del pico postprandial a los 30 min después de la carga del disacárido. De nueva cuenta, el mejor efecto lo presentó el EO en roedores diabéticos; de esta manera se confirma que el estafiate presenta un efecto antihiperoglucémico notable. Esta serie de experimentos validan a nivel preclínico el uso popular de *A. ludoviciana* para el tratamiento de la DMT2.

Por último, se estableció la composición química de aceite esencial generado por hidrodestilación y de los componentes volátiles obtenidos por microextracción en fase sólida (HS-SPME por sus siglas en inglés), mediante el uso de la cromatografía de

gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM). En todos los casos la caracterización se realizó por comparación con muestras auténticas o mediante los cálculos del índice de retención (IR) y la comparación de los espectros de masas con los descritos en la literatura científica. Del aceite esencial se identificaron 48 componentes y los mayoritarios fueron eudesma-4,11- dien-2-ol (11.2 %), el cariofil-4(14),8(15)-dien-5-ol (11.2%), la  $\alpha$ -tujona (8%), el  $\beta$ -cariofileno (6.9%) y el acetato de 5-canfenilo (6.8%). La micro extracción en fase sólida se realizó utilizando tres tipo de fibras. La primera, fibra gris DVB/CAR/PDMS, permitió la posterior identificación de *cis*-pinocarveol (13%), sabinol (12.8%), (-) alcanfor (12.2%), 1,8-cineol (9.6%), acetato de 5-canfenilo (6%), mirtenol (5.9%), (+) alcanfor (5.7%) y  $\beta$ -tujona (5.6%). Mediante la segunda, fibra roja (PDMS), se detectaron como productos de mayor afinidad (-) alcanfor (21.2%), (-)borneol (12.3%), *cis*-pinocarveol (15%), *trans*-verbenol (8.2%) y 1, 8-cineol (7.2%). Por último, con la fibra negra (CAR/PDMS) se encontraron 1,8-cineol (21.6%), *p*-cimeno (12.3%), cimen-8-ol (9.5%), (+) alcanfor (8.6%), 3-careen-10-al (7.5 %), el *cis*-pinocarveol (6.7%) y el acetato de 5-canfenilo (6.6%). El perfil cromatográfico de los compuestos aromáticos establecido en este estudio será de utilidad como prueba de identidad de la planta en el proceso de control de calidad.

## Abstract

The use of herbal treatments for diabetes mellitus type 2 (DMT2) has become a popular practice in Mexico, where the disease is one of the principal causes of death. One of the most widely used species is “estafiate” (*Artemisia ludoviciana* Nutt.), a medicinal aromatic plant widely distributed along the country. In this scenario, the main goal of this work was to establish the antidiabetic potential and acute toxicity of *A. ludoviciana*, in order to contribute to the rational use of herbal products in Mexico.

The results showed that the organic (EO) and aqueous (EA) extracts (31.6, 100 and 316 mg/kg) of *A. ludoviciana* are not toxic to mice according to the Lorke’s procedure; in both cases the lethal medium dose was over 5 g/kg. The acute hypoglycemic effect of both preparations was also assessed in mice; the results revealed that in both normal and diabetic mice [nicotinamide adenine dinucleotide (NAD); 30mg/kg; streptozotocin (STZ) 100 mg/kg], they significantly reduced the glucose levels. The best activity was observed in diabetic mice. To assess the antihyperglycemic effect, sucrose (3 mg/kg) and glucose (1.5 mg/kg) tolerance tests were performed. For glucose test, the best activity was achieved with EO in diabetic mice; however, both extracts inhibited postprandial peak after sucrose load. The overall results tend to support the antidiabetic effect of *A. ludoviciana* in Mexican folk medicine.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry allowed to determine the chemical composition of the essential oil and volatile compounds obtained by hydrodistillation and headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), respectively. The characterization of constituents was performed by comparison with authentic samples and by comparison of the retention index (RI) and mass spectra with those described in the scientific literature. Forty eight compounds were identified in the essential oil, the most relevant eudesm-4,11-dien-2-ol (11.2 %), caryophyll-4(14),8(15)-dien-5-ol (11.2%) and  $\alpha$ -thujone (8%),  $\beta$ -caryophyllene (6.9%) and 5-camphenyl acetate (6.8%).

In the case of HS-SPME, the use of a DVB/CAR/PDMS fiber (gray) led to identification of *cis*-pinocarveol (13%), sabinol (12.8%), (-) camphor (12.2%), 1,8-cineol (9.6%), 5-camphenyl acetate (6%), myrtenol (5.9%), (+) camphor (5.7%) and  $\beta$ -thujone; while the red fiber allowed the detection of (-) camphor (21.2%), borneol (12.3%), *cis*-pinocarveol (15%), *trans*-verbenol (8.2%) and 1, 8-cineol (7.2%). Finally with a CAR/PDMS fiber (black) 1,8-cineol (21.6%), *p*-cimene (12.3%), cimene-8-ol

(9.5%), (+) camphor (8.6%), 3-carene-10-al (7.5 %) and 5-camphenyl acetate (6.6%) were identified. Altogether, these results will be valuable for the identity tests of the plant, which in turn will be useful for quality control purposes.

## II ANTECEDENTES

### 1 Generalidades Taxonómicas sobre *Artemisia ludoviciana* Nutt.

La familia Asteraceae es una de las más diversas y ampliamente distribuidas entre las angiospermas con una distribución cosmopolita. El número de géneros y especies que la constituyen varía según el autor, estimándose entre 950 a 1,400 géneros y de 20,000 a 30,000 especies. En América esta familia se encuentra ampliamente distribuida y en México se localiza su principal centro de diversificación (Rzedowski y Rzedowski, 1985, 2001; Sánchez, 1980). El desarrollo de estas plantas se ha visto favorecido por los efectos de perturbación en muchos ecosistemas; en consecuencia, son especies abundantes en vegetación secundarias donde crecen como ruderales, aunque también pueden crecer como arvenses (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

Uno de los géneros más importantes de esta familia es *Artemisia*, nombre que se refiere a Artemis, deidad griega de la fecundidad, quien se dice, describió las virtudes del ajeno (*Artemisia absinthium* L.).

Muchas especies de este género se han utilizado desde tiempos inmemoriales y por diferentes culturas con fines medicinales, culinarios, cosméticos y ceremoniales. Además muchas especies constituyen materias primas invaluables para la obtención de productos y preparados de interés terapéutico. Así por ejemplo, la especie *Artemisia annua* L. (Qing Hao) es la fuente natural de artemisinina, un potente antipalúdico que sirvió de prototipo para el diseño de una nueva generación de fármacos para combatir al protozooario *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina (Anon, 1982). La hierba Qing Hao se ha empleado por miles de años en la medicina tradicional china para la cura de varios padecimientos, en particular como agente antipirético, en el tratamiento de las fiebres asociadas al paludismo (Anon, 1979). Por otro lado, el ajeno nativo de regiones templadas de Europa, Asia y norte de África, fue ampliamente utilizado por los egipcios; sus atributos medicinales como agente antihelmíntico, antiséptico, antiespasmódico, carminativo y tónico fueron transmitidos posteriormente a los griegos (Simon *et al.*, 1984). Hoy en día, además de sus usos culinarios, se utiliza principalmente para tratar trastornos digestivos, como tónico y en la elaboración de bebidas alcohólicas incluyendo el licor de ajeno, vermouth, pernod y aguardiente de ajeno, por mencionar algunas (Lanier, 1995).

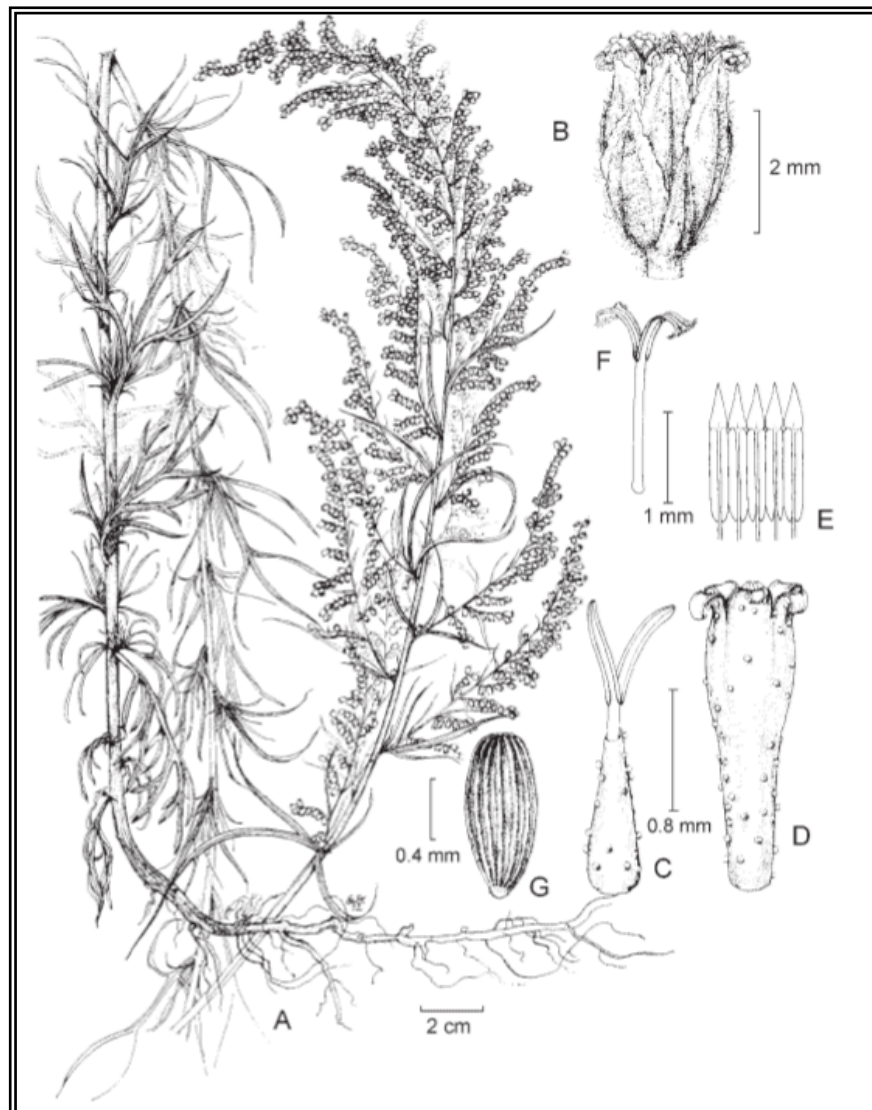


El género *Artemisia* Less (tribu Antheramidae) está constituido por alrededor de 500 especies, 21 de las cuales se encuentran en México (Bora y Sharma, 2010; Castelo *et al.*, 2003-2005). En 1829 Besser publicó el primer estudio racional acerca de la taxonomía del género; en ese trabajo agrupó las especies del género en cuatro secciones considerando la morfología de la estructura floral. Las secciones propuestas fueron las siguientes: *Abrotanum*, *Absinthium*, *Dracunculus* y *Seriphidium*; filogenéticamente las dos primeras secciones son las más antiguas. Posteriormente, otros taxónomos transformaron estas secciones en subgéneros y agruparon *Abrotanum* y *Absinthium* en un nuevo subgénero que denominaron *Artemisia*. Cada subgénero (*Artemisia*, *Dracunculus* y *Seriphidium*) consiste de varias secciones; investigaciones quimiotaxonómicas posteriores sustentaron esta división; en estos estudios se consideró a los flavonoides como marcadores taxonómicos (Belenovskaja, 1996). Recientemente, tras numerosas revisiones intragenéricas, los diferentes estudios fitoquímicos, cariológicos, fitogeográficos y de micromorfología del polen han permitido dividir al género *Artemisia* en cinco subgéneros: *Absinthium*, *Artemisia*, *Dracunculus*, *Seriphidium* y *Tridantatae* (Muhammad *et al.*, 2010).

Las plantas son frecuentemente aromáticas; con hojas alternas, indivisas a finamente divididas; sus cabezuelas por lo general son paniculadas o racimosas, a menudo péndulas; el involucreo es ovoide, campanulado o hemisférico, sus brácteas están dispuestas en varias series, las exteriores más cortas, y todas o algunas con los márgenes escariosos; el receptáculo es plano o cónico, siempre desnudo; las flores periféricas femeninas presentes o ausentes, fértiles o infértiles, sus corolas son cilíndricas o subcilíndricas, 2 a 4 dentadas, y a menudo oblicuas e inconspicuas; las flores del disco son hermafroditas, o bien funcionalmente masculinas, sus corolas son campanuladas, infundibuliformes o tubulosas; las anteras presentan bases obtusas; las ramas del estilo de las flores hermafroditas son linear-oblongas y truncadas en el ápice; los frutos son aquenios abovoides, elipsoides, cilíndricos o comprimidos, con vilano ausente o coroniforme (Sánchez, 1980; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

De las especies mexicanas, quizás la más importante por su amplio uso medicinal y cultural, mismo que se remonta a la época precolombina, es *Artemisia ludoviciana* Nutt; *A. ludoviciana* fue descrita por primera vez por Thomas Nuttall en la obra "The Genera of North American Plants" en 1818 (Colin, 2002).

*Artemisia ludoviciana* es una planta herbácea, que puede alcanzar hasta 1.5 m de alto; es perenne, aromática, con varios tallos estriados, flocoso-tomentosos que se hacen glabros con la edad; sus hojas miden hasta 15 cm de largo, indivisas y lineares a lanceoladas, elípticas u ovobadas, a profundamente divididas, blanco tomentosas en ambas caras, pero pubescentes en el haz; cabezuelas a menudo péndulas, agrupadas en panículas o racimos foliosos; involucreo campanulado, sus brácteas 6 a 16, las interiores de 2 a 4 mm de largo, más o menos tomentosas por fuera; receptáculo hemisférico; flores periféricas 5 a 12, sus corolas angostamente cilíndricas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 6 a 15, sus corolas tubulosas o con la garganta campanulada, de  $\pm$  1 mm de largo, glabros (Rzedowski y Rzedowski, 2001). En México, la planta florece entre los meses de agosto y noviembre (Figura 1, IMN, 1898; 1904; McVaugh, 1984).



**Figura 1.** Descripción general de *Artemisia ludoviciana* Nutt. A. *Artemisia ludoviciana*; B. cabezuela; C. corola y ramas del estilo de la flor periférica; D. corola de la flor central; E. anteras; F. ramas del estilo; G. aquenio (Tomado de Rzedowski y Rzedowski, 1997).

*A. ludoviciana* Nutt., presenta varias sinonimias; de acuerdo a Castelo y colaboradores (2003-2005) las más importantes son:

*Artemisia albula* Wooton.

*Artemisia ghiesbreghtii* Rydb.

*Artemisia ludoviciana* subsp. *albula* (Wooton) D.D. Keck.

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck.

*Artemisia ludoviciana* subsp. *redolens* (A. Gray) D.D. Keck.

*Artemisia ludoviciana* subsp. *sulcata* (Rydb.) D.D. Keck.

*Artemisia ludoviciana* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Fernald.

*Artemisia mexicana* Less.

*Artemisia mexicana* Willd. ex Spreng.

*Artemisia muelleri* Rydb.

*Artemisia redolens* A. Gray.

*Artemisia revoluta* Rydb.

*Artemisia sulcata* Rydb.

*Artemisia vulgaris* L.

*Artemisia vulgaris* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) H.M. Hall & Clem.

*Artemisia vulgaris* var. *ludoviciana* (Nutt.) Kuntze.

## 1. 1 Distribución

*Artemisia ludoviciana* se distribuye desde el sur de Canadá hasta Guatemala. En México se le encuentra principalmente en las regiones templadas del Valle de México (Balderas, 2006) aunque también habita en climas cálido, semicálido y semiseco. De acuerdo a los registros de los Herbarios Nacional (*MEXU*), de la Facultad de Ciencias (FCME, UNAM) y de Missouri Botanical Garden (MOBOT, 2011), la planta se distribuye en los estados de Aguascalientes, Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas; Villaseñor y Espinosa (1998) también mencionan los estados de Campeche, Guerrero, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa, no obstante, es probable que la planta se distribuya en los estados de Nayarit y Yucatán (Figura 2).

Su distribución altudinal puede variar; así, en el oeste de México se encuentra entre 1500 y 2300 m (McVaugh, 1984); y en el Valle de México se reporta hasta 2900 m de altura (Rzedowski y Rzedowski, 2001)

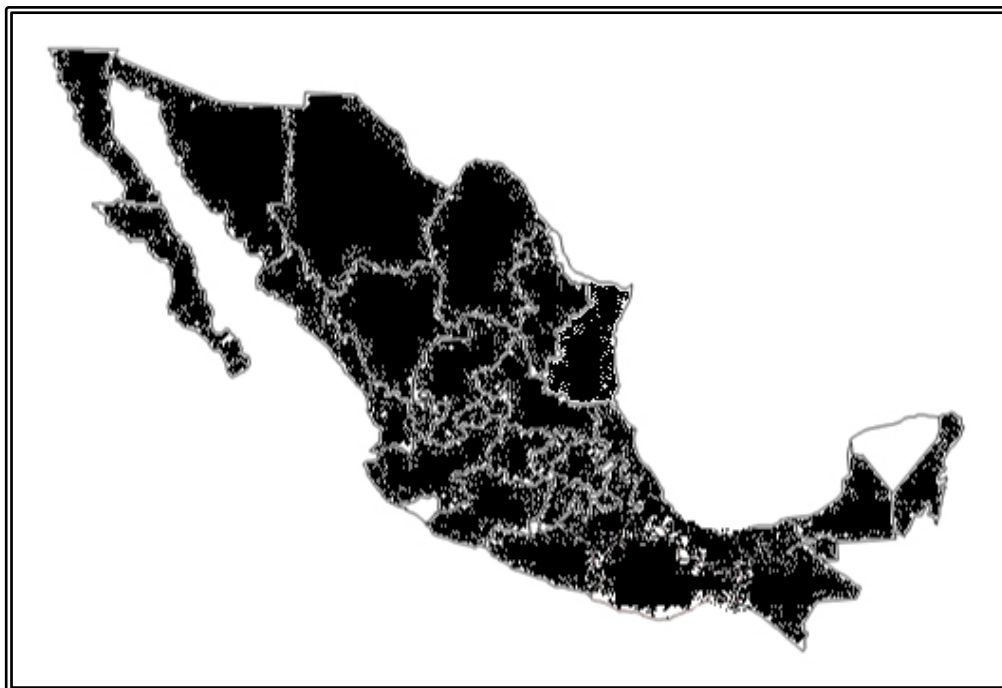


Figura 2. Distribución en México de *Artemisia ludoviciana* Nutt.

## 1. 2 Aspectos etnobotánicos

*Artemisia ludoviciana* se conoce con una gran variedad de nombres comunes incluyendo estafiate (nombre corrupto de iztauhyatl), ajenjo, azúmate de Puebla, ajenjo del país, altamiza, altaniza, artemisia, cola de zorrillo, ensencio de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maistra, incienso, incienso verde e istafiate (Martínez, 1992; Heike, 2009). Asimismo, de acuerdo a distintos registros etnobotánicos la planta se designa como istafiatl, iztauhyatl en náhuatl; quite-tes, guitee en lengua zapoteca; ambfe, mexmitzi en otomí (Martínez, 1979); guitee, iztauhyatl, haway, kaway si' isim ts'tsim, osomiate, xun, tsakam ten huitz, ten ts'ojol en dialecto tenek; ros'sabl'i en rarámuri; y kamaistra en popolca, (Argueta *et al.*, 1994).

La referencia más antigua sobre el uso de *A. ludoviciana* se encuentra en el trabajo “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” o mejor conocido como Códice De la Cruz-Badiano de Martín de la Cruz publicado en 1552, donde se consigna su eficacia para tratar la debilidad de las manos, mal del ano, pies lastimados, el cuerpo cansado o agobiado por demasiado calor, al tocado por el cielo o fulminado y, piojos en la cabeza

(De la Cruz, 1991). Generalmente, la planta era mezclada con otras yerbas como se describe a continuación: por ejemplo, para la debilidad de las manos la planta se mezclaba con semillas de xoxouhcapatl y ramas de quetzalxoxouhqui, todo esto era molido y después cocido en agua; para el “mal de asentaderas” o mal del ano, este se curaba si se molía y se colocaba en agua caliente las siguientes plantas, iztauhyatl, tonatiuh ixih, coyoxihuitl, iztac ocoxochitl y hojas de la hierba tepechian, con esta medicina se lavaba la parte enferma o era colocado en forma de plasta. Para “lastimaduras en los pies” se molían juntas las hierbas: tlalehecapatl, coyoxihuitl, iztauhyatl, tepechian, achilli, xiuhehecapatl, cuauhiyauhtli, quetzalxoxouhcapatl, tzotzotlani; flores de cacahuaxochitl y piltzintecouhxochitl; ramas de ehecapatl e itzcuinpahtli; también las piedras tlacalhuatzin, eztetl y tetlahuitl, tierra de color pálido. Contra el cansancio se utilizaba un preparado con la hierba ahuiyac xihuitl, o sino, tlatlancuaye, tlatlaolton, itzcuinpahtli, xiuhehecapatl, iztauhyatl, con flor de huitzitzilxochitl, y las piedras tetlahuitl, tlacalhuatzin y eztetl, todo esto era molido en agua y se lavaban los pies. Para curar el “calor excesivo” existían varios tratamientos pero uno en particular era el de la poción que se hace con la raíz de tzayanalquilitl, acacpac quiltil y tolpatlactli, de ramas de tetzmitl e iztauhyatl. Para tratar aquel que fuera tocado por el cielo o fulminado, se tenía que beber una poción hecha con ramas de ayauhcuahuitl, tepapaquilti cuahuitl, ciprés muy verde, iztauhyatl, hierba cuauhiyauhtli y teamoxtl, siempre caliente. Cuando la gente tenía piojos en la cabeza los aztecas utilizaban un medicamento realizado con la raíz del arbusto zohzoyatic, hierba de iztauhyatl, grasa o gordura de pato, una cabeza de ratón hecha cenizas y pajas tomadas de un nido de golondrina también molidas, toda esta mezcla era colocada en la cabeza (De la Cruz, 1991).

En el Códice Florentino publicado en 1557, se describen los usos medicinales del iztauhyatl; en esta obra se le indica para “la caspa, tos, las angustias del corazón, los granos de la cabeza, asperezas del rostro, para la toba de los dientes (sarro), el dolor de los pechos y de todo el cuerpo, así como para el adormecimiento de los pies, echar cólera y flema; para el ahíto, la fiebre y purificar la orina”.

Recientemente, Ortiz de Montellano (1994) recopiló abundante información acerca de los usos precoloniales y coloniales del iztauhyatl. De acuerdo al autor, el uso principal del iztauhyatl era para las limpias rituales; así el iztauhyatl, se asociaba con las enfermedades “causadas” por Tláloc y por otras deidades del complejo agricultura-fertilidad. Por tal motivo, durante los sacrificios a Tláloc los espectadores llevaban

flores de iztauhyatl; se creía que si se abanicaba a los niños pequeños con las flores, resistirían las infestaciones por gusanos. También se usaba para curar los padecimientos de origen mágico, por ejemplo muchas culturas incluidas la azteca, creían que ciertas enfermedades eran consecuencia de la introducción de pequeños objetos, como trocitos de hueso, pedernales debajo de la piel de la víctima; el remedio solía entrañar la eliminación del objeto por succión, luego, el curador mascaba iztauhyatl y lo salpicaba en la piel del paciente (Ortiz , 1994). De la información anterior, concluye el historiador la clara asociación del iztauhyatl con el rayo y la fiesta de huehuateotl (dios viejo), porque sólo a los viejos se les permitía hacer limpias. Finalmente señala, que el estafiate sigue conservando sus propiedades mágicas y rituales en la cura de enfermedades culturales tradicionales como el mal de ojo, la caída de mollera o los malos aires, por mencionar algunas.

Francisco Hernández en su obra “Historia Natural de Nueva España”, escrita entre 1571-1577, relata “aplicada esta planta a las almorranas o atada en el brazo las seca y arruga, quita dolores que provienen de frío o de flatulencia, es favorable al pecho y cura los cólicos y dolores de intestinos, agregándole quáuhyetl o picietl fortalece las partes internas; alivia, instilado en la boca, a los infantes que vomitan leche o sufren empacho; abre las obstrucciones; mezclado con ecapatli o laurel de indias, cura a los relajados y con su cocimiento se lavan con muy buen resultado las piernas débiles o hinchadas” (Hernández, 1959).

Fray Francisco Ximénez, fiel traductor de Francisco Hernández, en la Obra Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas y Animales en la Nueva España y publicada en México en 1615, señala que “el iztauhyatl es una hierba de forma y propiedades semejantes al absintio, que los españoles la designan con el nombre corrupto de estafiate, del cual se hallan dos géneros, uno de hojas angostas y el otro de más anchas. En cuanto a los usos, ambas quitan los dolores nacidos de causa fría y de ventosidades, son útiles para el pecho, curan los dolores cólicos, y de ijada, socorre a los niños que vomitan la leche (Ximénez, 1888).

En el Atlas de Medicina Tradicional publicado por el Instituto Nacional Indigenista (Argueta *et al.*, 1994) se indica textualmente que en el siglo XVI “las Relaciones Geográficas” proporcionan la siguiente información acerca de la planta: aprovechada para dolor de cabeza, molida y bebida es muy saludable para las pechugueras.

En el siglo XVIII, el misionero jesuita Juan de Esteyneffer en su obra “Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades” indica la efectividad de la planta para tratar problemas gastrointestinales, la perlesía, sordera, gusanos, vómitos, obstrucción del hígado, hidropesía, mal de loanda, pujos y lombrices (Esteyneffer., 1978). A finales de ese siglo, el botánico y farmacéutico Vicente Cervantes como parte de su discurso inaugural del Jardín Botánico en 1791, escribió su Ensayo a la Materia Medica Vegetal de México (1889) donde describe la utilización de 293 plantas, entre ellas el estafiate como estomática, balsámica, antihelmíntica, febrífuga, antivenérea y expelente. Esta obra se publicaría años después. Para el siglo XIX, se señalan usos similares en la obra Ensayo para la Materia Medica Mexicana arreglada por una comisión nombrada por la Académica Médico-Quirúrgica, coordinada por De la Cal y Bracho, y publicada en Puebla en 1832. Posteriormente, en la Farmacopea Mexicana publicada por la Academia Farmacéutica de México en 1846, mencionan al ajenjo del país como *Artemisia laciniata*, misma que es utilizada como parte del vino alhucema, recomendado como tónico y resolutivo. En la Nueva Farmacopea Mexicana publicada en 1876 por la sociedad farmacéutica mexicana, la refieren como tónico amargo y estimulante, emenagogo y antihelmíntico. En ambas farmacopeas se enlistan varias preparaciones incluyendo extractos, elixires, alcoholatos, vinos, pomadas, vinagres, aceites esenciales y mezclas de polvo para tisanas conteniendo tanto el ajenjo del país como el extranjero (*Artemisia absinthium*). En la Figura 3 se incluyen algunos ejemplos.

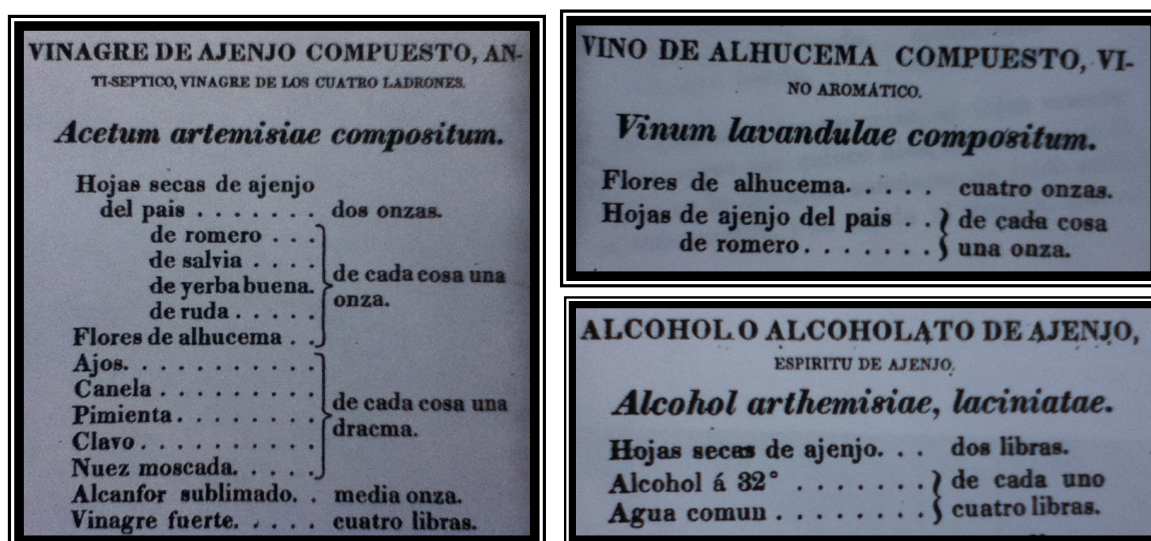


Figura 3. Algunos preparados de *Artemisia ludoviciana* (estafiate del país), reportados en la Farmacopea Mexicana publicada en 1846.

La Sociedad Mexicana de Historia Natural indica el uso del estafiate como antiparasitario, eupéptico, emenagogo y para heridos por rayo. Francisco de Asis en 1886 la reseña como útil para la neurosis, los vómitos de leche de los infantes, disentería y para reumatismos articulares mezclada con mecapatli y otras yerbas. Menciona que médicos nahoas trataban la pitiriasis, que es un tipo de escamación de la piel de la cabeza, con un preparado que contenía estafiate. También para los sudores abundantes de los pies y como antiespasmódica. Dato curioso que apunta es que: “esta yerba el que la trae consigo junto al corazón, da esfuerzo, ánimo y osadía, su polvo bebido con vino quita el cansancio del camino, ahuyenta las moscas, cociéndola con leche de cabra y untar con esto las paredes”. Agrega, es usada para las hemicranias, la falta de sueño debido a una indigestión y para corroborar los órganos genitales (Flores, 1982). A finales del mismo siglo, Eleuterio González menciona sus usos como tónico amargo, estomático, emenagogo y antihelmíntico; ha sido usado también como antiperiódico y contra las leucorreas y la caquexia palustre”. En Datos para la Materia Médica Mexicana, se retoma la información de Ximénez y de Cervantes al experimentar con diversos extractos de la planta. En los últimos años de este siglo, el Instituto Médico Nacional (IMN) la consigna como: antiparasitaria, eupéptica, antipalúdica, catártica, oxitócica, y que produce parálisis.

En 1904, Fernando Altamirano en su texto “Materia Medica Mexicana: A Manual of Mexican Medicinal Herbs” señala que el extracto alcohólico de la planta no es tóxico para animales, retarda la acción de los jugos gástricos en lugar de acelerarla; atribuye el retardo a la neutralización de la acidez estomacal. Describe también que el aceite esencial de la especie mexicana es menos tóxico que el del ajeno europeo. Alfonso Herrera (1921) señala que “esta planta puede emplearse como antihelmíntica y como modificador de la sensibilidad”; añade, “es falsa la creencia vulgar de que obra como estomático; en algunos casos parece haber obrado como ligero aperitivo”. Maximino Martínez por otra parte, la indica como aperitiva, antirreumática, analgésica, antiparasitaria, eupéptica, advierte que produce parálisis y sirve para la hipoclorhidria. Luis Cabrera (1958) consigna al estafiate para la bronquitis, como antiespasmódico y catártico, en cólicos hepáticos por cálculos, para las congestiones hepáticas, y en dispepsia.



En publicaciones recientes sus usos más documentados incluyen el tratamiento de varios padecimientos gastrointestinales como dolor de estómago, cólicos estomacales, indigestión, dolor e inflamación en la boca del estómago, estreñimiento, gastritis, diarrea, vomito, disentería, afecciones parasitarias, dolores de cabeza y oído, y cólicos menstruales (Ruiz-Salazar, 1989; Martínez, 1992; Argueta *et al.*, 1994; Mendoza *et al.*, 1997; Colin, 2002; Jiménez, 2011). Otros reportes señalan su efectividad para el tratamiento de la bronquitis (Amo, 1979), congestión del pecho, mareos, nervios (Bye, 1986), enfermedades del corazón (Morton, 1981), neumonía, tos (Molina-Salinas *et al.*, 2006), infecciones e inflamaciones, diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), así como problemas vesiculares y de fertilidad (Colin, 2002). Tradicionalmente la planta se consume bajo la forma de una infusión que se elabora a partir de las hojas, partes aéreas (hojas, tallos y flores) o las flores (Colin, 2002).

Las partes aéreas del estafiate se ingieren, generalmente como infusión, solas o mezcladas, dependiendo del uso. Así cuando hay dolor se puede acompañar con ruda (*Ruta chalepensis*), epazote de zorrillo (*Dysphania graveolens*), manzanilla (*Matricaria recutita*) y hierbabuena (*Mentha piperita*); para la diarrea se puede mezclar con hierbabuena, marrubio (*Marrubium vulgare*), manzanilla, aguacate (*Persea americana*) y guayaba (*Psidium guajava*), entre otras. Para el tratamiento de parásitos intestinales (lombrices), se puede acompañar con epazote (*Teloxys ambrosioides*), ajeno (*Artemisia absinthium*) o con hierbabuena, en ayunas (Argueta *et al.*, 1994). Otra forma de usar al estafiate es bajo la forma de tintura con albahaca (*Ocimum basilicum*), con esta mezcla se aplican fomentos o dan fricciones en caso de “aire” o “mal aire” como anginas, bronquitis, catarros, resfríos, tos, tosferina y otros. En caso de reumatismo en Michoacán se frota en la parte que es afectada con un preparado alcohólico hecho con estafiate, hojas de aguacate, alcanfor, aceite de oliva, cempasúchil, albahacar y jengibre.

Como se puede apreciar, desde tiempos precoloniales y hasta nuestros días, *A. ludoviciana* se ha utilizado con fines curativos para aliviar numerosos padecimientos. Al igual que en el caso de otras plantas sus usos han sufrido un continuo proceso de adecuación a las enfermedades emergentes o con una alta incidencia en la población (Aguilar y Xolalpa. 2002). En la actualidad algunos de los usos consignados por las culturas precolombinas aún se siguen conservando, pero otros como su efecto antidiabético son recientes (Hamdan y Afifi, 2003, Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Jarald *et al.*, 2008; Romero-Cerecero *et al.*, 2009). En los trabajos de Andrade-Cetto y

Heinrich en 2005 y Romero-Cerecero y colaboradores en 2009, se indica que para tratar la diabetes las partes aéreas del estafiate deben consumirse bajo la forma de infusión.

### 1.3 Actividad biológica

Numerosos estudios científicos realizados sobre *Artemisia ludoviciana* han permitido demostrar que algunos de sus preparados poseen varias propiedades farmacológicas, algunas de las cuales correlacionan con las bondades medicinales que se le atribuyen a la planta. En nuestro país los primeros trabajos científicos encaminados a comprobar sus usos medicinales atribuidos se realizaron a finales del siglo XIX y principios de siglo XX en el IMN. Así en el volumen III de los Anales del Instituto Médico Nacional (Armendáris, 1897) y en la Materia Medica Mexicana (1904) de Fernando Altamirano se asienta, que su uso como estomáquico no pudo comprobarse ya que en conejos tratados con el extracto de la planta se observó una disminución de la acción de los jugos gástricos. En otros experimentos se demostró que la esencia del estafiate paraliza la movilidad de ranas, dejando intacta su sensibilidad. Por otro lado, se realizaron experimentos para comprobar si el estafiate era capaz de inducir el aborto en conejas preñadas a la dosis de 0.8 a 3 g; los resultados fueron negativos. Más adelante en el volumen 9 (Villaseñor, 1907) de los Anales se menciona que el estafiate aumenta la secreción salivar y la secreción gástrica y que no es tóxico.

En pacientes del hospital San Andrés se realizaron estudios con diversos preparados del estafiate encontrándose que el extracto hidroalcohólico en algunos casos sirve como un aperitivo suave; la tintura de la misma planta produjo mejores resultados, comprobándose entonces su eficacia como aperitivo. En otro estudio, el extracto fluido de estafiate se utilizó como eupéptico en un paciente nefrítico, obteniéndose de nueva cuenta resultados satisfactorios (Castanedo, 1908). Pero, el mejor efecto observado de esta planta fue el antihelmíntico, ya que en varios enfermos con signos y síntomas de parásitos se les suministró la planta bajo la forma de cápsulas, aceite esencial o polvo de las flores obteniéndose una mejoría notable de los pacientes. Por tanto se comprobó que el estafiate presenta efectos antiparasitarios y eupépticos (Terres, 1897; Castanedo 1906).

Malagón y colaboradores (1997) demostraron que el extracto etanólico del estafiate presenta un efecto antiprotozoario contra *Plasmodium yoelii*. Asimismo, a varios extractos (acuoso, metanólico, hexánico y acetónico) del estafiate se les

comprobó una buena actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Fernández *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2006). Zavala-Sánchez y colaboradores (2002) demostraron que el nonanal del aceite esencial de *A. ludoviciana* es el responsable de la actividad antidiarreica de la planta. En otros trabajos se comprobó que el extracto metanólico del estafiate presenta un efecto antibacteriano ya que inhibió de manera significativa el crecimiento de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri-2* (Alanís *et al.*, 2005; Dubal *et al.*, 2009) así como las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Navarro *et al.*, 1996). García y colaboradores (2006) demostraron que el extracto etanólico presenta también un efecto inhibitorio del crecimiento y producción de enterotoxinas en cepas de *Vibrio cholerae*. Jiménez-Arellanes y colaboradores (2003) encontraron que los extractos hexánico y metanólico de estafiate inhibieron el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis. Más recientemente, Castillo-Juárez y colaboradores (2009) demostraron que el extracto acuoso de *A. ludoviciana* inhibe de manera importante el crecimiento de *Helicobacter pylori*, principal causante de la gastritis y úlceras pépticas. El estafiate también inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Navarro *et al.*, 1996), afecta el desarrollo del gorgojo del maíz (Juárez-Flores *et al.*, 2010) e inhibe el crecimiento de otras plantas (Rodríguez *et al.*, 1976); éste efecto alelopático se atribuye a la presencia de la lactona sesquiterpenica aquilina en la planta. En este mismo trabajo se encontró que la eudesmanolida ludovicina A es citotóxica. Bork y colaboradores (1996, 1997) demostraron que el extracto etanólico presenta un efecto antiinflamatorio ya que inhibe al factor de transcripción NF-k B.

También se han realizado varios trabajos la especie *A. vulgaris*. Así, varios investigadores demostraron que el extracto acuoso y el aceite esencial de la planta son potentes antioxidantes (Bhatt *et al.*, 2006; Temraz y El-Tantawy 2008). Otro estudio reciente demostró que el extracto metanólico de *A. vulgaris* muestra una actividad antihelmíntica contra *Trichinella spiralis* (Caner *et al.*, 2008). Además, el aceite esencial actúa como un repelente de insectos (Wang *et al.*, 2006). El extracto acuoso presenta propiedades anticonvulsivas (Vasanth *et al.*, 1991). Vahdati-Mashhadian y colaboradores (2009) mostraron que un extracto etanólico presenta actividad citotóxica en contra de células derivadas de carcinoma (HepG-2 y Hep-2). Las propiedades antiinflamatorias del aceite se analizaron y el efecto comprobado se atribuyó al azuleno que se encuentra en el aceite esencial (Beyrouthy *et al.*, 2008). En 1992 Sun y

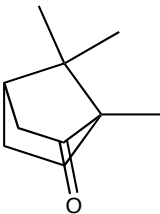
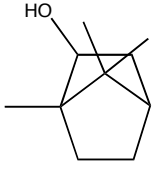
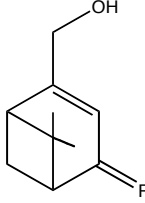
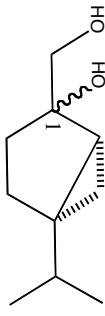
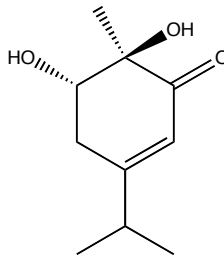
colaboradores reportaron actividad antitumoral debida al ácido artemísico y a la artemisina B presentes en la planta.

#### 1. 4 Composición química

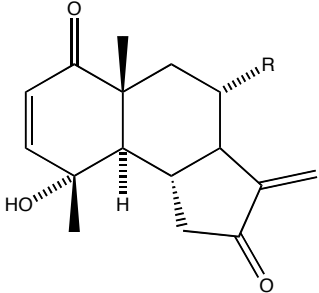
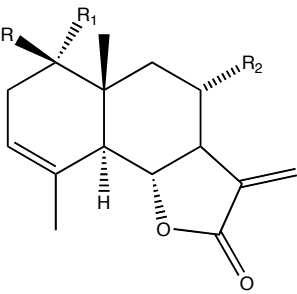
En las últimas cuatro décadas se han realizado un gran número de estudios químicos sobre la especie *A. ludoviciana*. Estos trabajos han permitido establecer que los metabolitos más abundantes de la planta pertenecen a la categoría de los monoterpenoides (1-7), lactonas sesquiterpénicas (8-60) y flavonoides (61-80). Las lactonas sesquiterpénicas pertenecen en su mayoría a la categoría de las eudesmanólidas (8- 30), aunque también se han reportado algunas guayanólidas (31-51) y germacranólidas (52-60). Los flavonoides pertenecen principalmente a los grupos de las flavonas (63-80), flavanonas (62), y flavonoles (61). En la Tabla 1 se resumen los compuestos aislados presentes en la especie.

También se ha constatado que la planta es rica en un aceite esencial constituido principalmente por monoterpenoides y sesquiterpenoides. Así por ejemplo, en un estudio reciente realizado por Lopes-Lutz y colaboradores (2008) se identificaron cuarenta y cinco compuestos en el aceite esencial de *A. ludoviciana*; la mayoría de los constituyentes reportados pertenecen a monoterpenoides (48.8–75.6%) y sesquiterpenoides oxigenados (17.8%). Los productos mayoritarios de la esencia se caracterizaron como 1,8 cineol (21.5–27.6%), el alcanfor (15.9–37.3%) y la davanona (11.5%), coincidiendo con el estudio realizado por Blust y Hopkins (1987), en el cual los componentes mayoritarios fueron; 1,8 cineol, alcanfor y borneol, así como la guayanólida aquilina. También con el nombre sinónimo *A. vulgaris* se han llevado a cabo trabajos para identificar los componentes de la esencia, por ejemplo; los resultados de Blagojevica y colaboradores (2006) muestran que en la esencia de las partes aéreas de la planta los componentes mayoritarios fueron; 1,8 cineol (28.9%), sabineno (13.7%),  $\beta$ -tujona (13.5%) y  $\beta$ -oxido de cariofileno (6.5%). Govindaraj y colaboradores (2008) identificaron al alcanfor (16.8%), a la  $\alpha$ -tujona (11.3%), al germacreno D (7.2%), al campfeno (6.5%), al 1,8-cineol (5.8%) y al  $\beta$ -cariofileno (5.4%). Los resultados de estos trabajos se resumen en la Tabla 2.

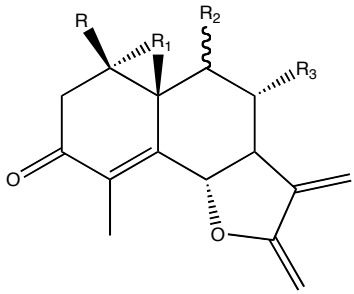
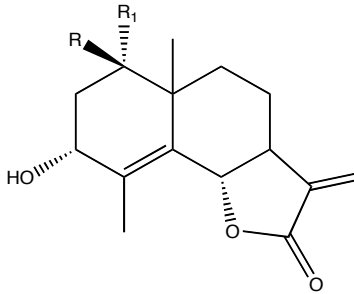
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos.

MONOTERPENOIDES	ESPECIE	REFERENCIA
<p>Alcanfor (1)</p> 		
<p>Borneol (2)</p> 		
	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991
<p>4-(hydroxymethyl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one (3) R=O</p> <p>Mirtenol (4) R=H, β-OH</p>		
<p>(1<i>R</i>,2<i>R</i>,5<i>S</i>)-2-α-(hydroxymethyl)-5-isopropylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol (5) 1α-OH</p> <p>(1<i>R</i>,2<i>R</i>,5<i>S</i>)-2-β-(hydroxymethyl)-5-isopropylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol (6) 1β-OH</p>		
<p>(5<i>S</i>,6<i>R</i>)-5,6-dihidroxi-3-isopropil-6-metilciclohex-2-en-1-one (7)</p>		

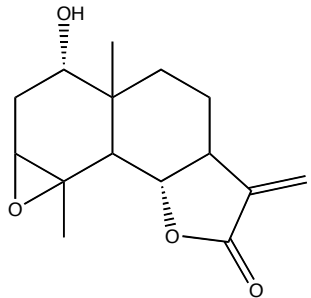
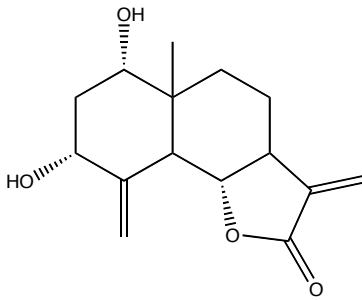
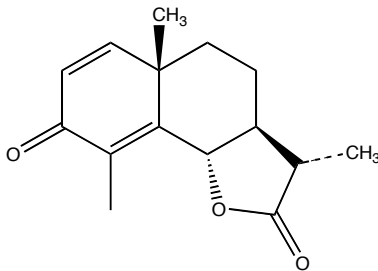
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Arglanina (<b>8</b>) R= H</p> <p>Artemexifolina (<b>9</b>) R=OAc</p>	<p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p>	<p>Romo <i>et al.</i>, 1970</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1984</p> <p>Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Balderas, 2006</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1984</p>
 <p>Douglanina (<b>10</b>) R=R<sub>2</sub>=H, R<sub>1</sub>=OH</p> <p>Ludalbina (<b>11</b>) R=H, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OAc</p> <p>Santamarina (<b>12</b>) R=OH, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H</p>	<p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>albula</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p>	<p>Sánchez-Viesca y Romo, 1963</p> <p>Romo <i>et al.</i>, 1970</p> <p>Lee y Geissman, 1970</p> <p>Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Geissman y Saitoh, 1971</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1984</p> <p>Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1984</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

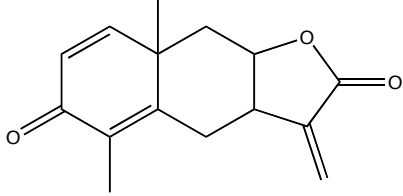
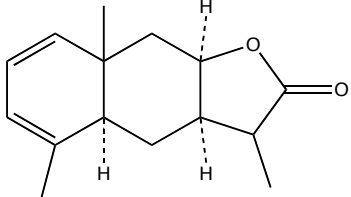
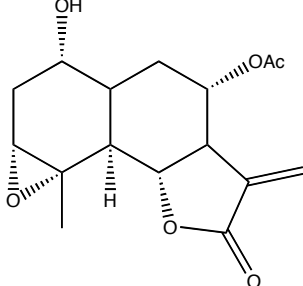
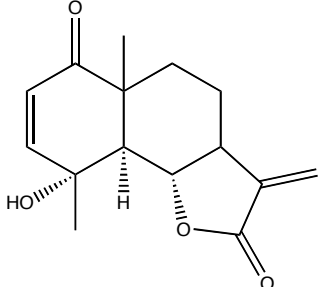
LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Armexifolina (<b>13</b>) R=OH, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H</p> <p>Ludovicina C (<b>14</b>) R<sub>1</sub>= OH R=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H</p> <p>8 α-Acetoxiarmexifolina (<b>15</b>) R=OH, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OAc</p> <p>(<b>16</b>) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH</p>	<p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> <i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1984 Balderas, 2006</p> <p>Lee y Geissman, 1970 Mata <i>et al.</i>, 1984</p>
 <p>Armexina (<b>17</b>) R=H, R<sub>1</sub>=OH</p> <p>Armefolina (<b>18</b>) R=OH, R<sub>1</sub>=H</p>	<p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p>	<p>Romo y Tello, 1972</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1984 Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993 Balderas, 2006</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

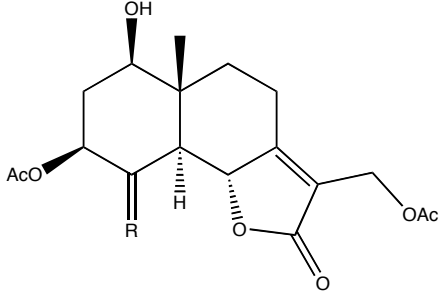
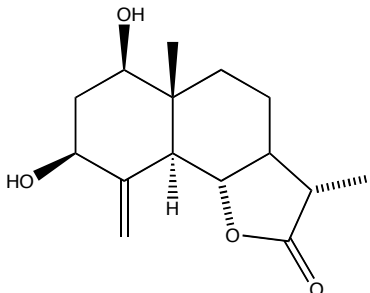
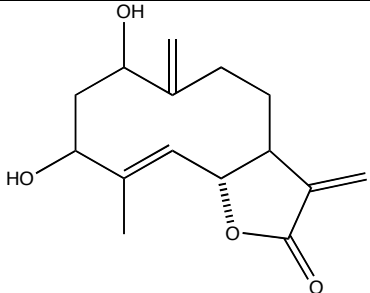
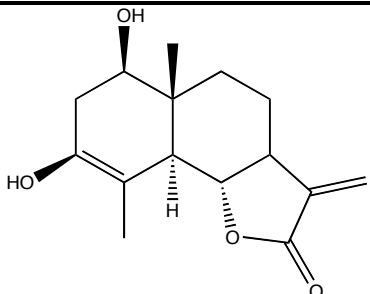
LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Ludovicina A (19)</p>	<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Lee y Geissman, 1970 Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993 Balderas, 2006
 <p>Ludovicina B (20)</p>	<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Lee y Geissman, 1970
 <p>Santonina (21)</p>	<i>A. mexicana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Viehoever y Capen, 1923 Rio de la Loza, 1897 Lee y Geissman, 1970



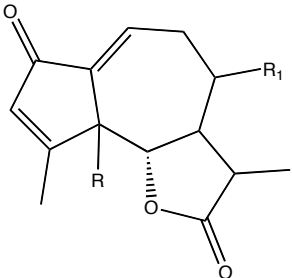
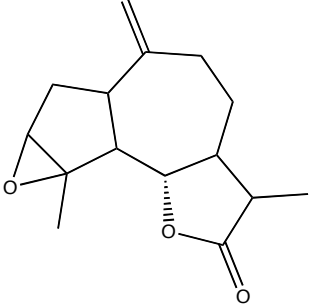
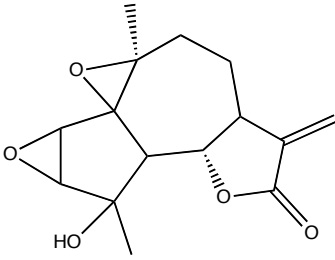
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p data-bbox="204 723 400 757"><b>Yomogina (22)</b></p>	<p data-bbox="624 633 1023 667"><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p>	<p data-bbox="1023 633 1378 667">Lee y Geissman, 1970</p>
 <p data-bbox="204 974 416 1008"><b>Antemidina (23)</b></p>	<p data-bbox="624 985 1023 1019"><i>A. ludoviciana</i></p>	<p data-bbox="1023 985 1378 1019">Epstein y Jenkins, 1979</p>
 <p data-bbox="204 1361 496 1395"><b>α-Epoxiludalbina (24)</b></p>	<p data-bbox="624 1357 1023 1391"><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p>	<p data-bbox="1023 1357 1378 1391">Mata <i>et al.</i>, 1984</p>
 <p data-bbox="204 1731 395 1765"><b>Vulgarina (25)</b></p>	<p data-bbox="624 1727 1023 1798"><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p>	<p data-bbox="1023 1727 1378 1760">Ohno <i>et al.</i>, 1980</p>

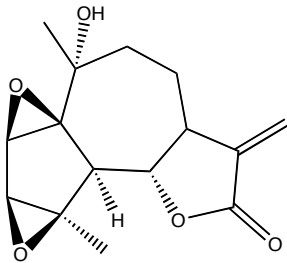
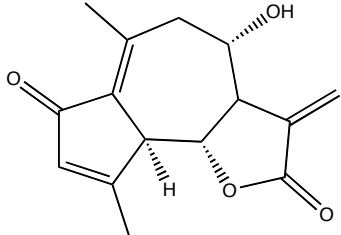
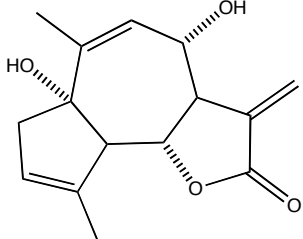
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>(26) R=CH<sub>2</sub> (27) R= Me, α-OH</p>	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991
 <p>(28)</p>	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991
 <p>(29) Ridentina</p>	<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993 Balderas, 2006
 <p>(30) Ridentina B</p>	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991

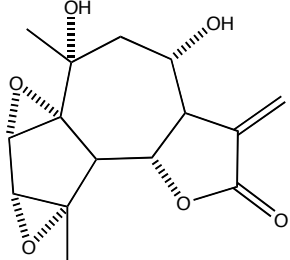
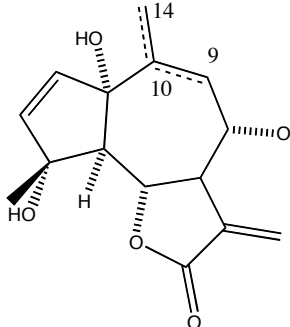
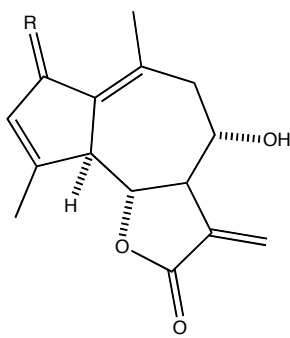
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 Aquilina (31) R=R <sub>1</sub> =H	<i>A. ludoviciana</i> <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Domínguez y Cárdenas, 1975 Ohno <i>et al.</i> , 1980  Balderas, 2006
Deacetilmatricarina (32) R=H, R <sub>1</sub> =OH	<i>A. ludoviciana</i>	Domínguez y Cárdenas, 1975
Parisina (33) R=OH, R <sub>1</sub> =H	<i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i>	Ohno <i>et al.</i> , 1980
 Estafiatina (34)	<i>A. mexicana</i>  <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Sánchez-Viesca y Romo, 1963 Romo <i>et al.</i> , 1970 Balderas, 2006
 Crisartemina-A (35)	<i>A. mexicana</i>	Sánchez-Viesca y Romo, 1963 Romo <i>et al.</i> , 1970

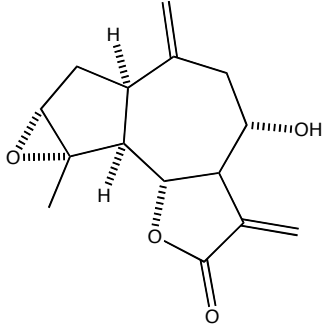
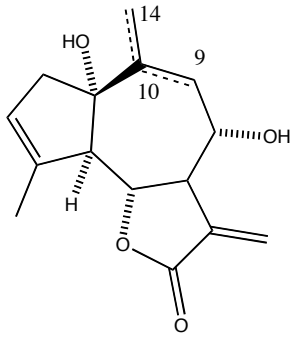
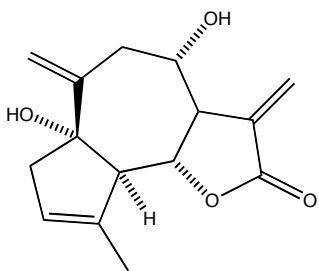
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 Crisartemina B (36)	<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>  <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i>	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993  Ohno <i>et al.</i> , 1980
 11,13-Deshydrodesacetilmatricarina (37)	<i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i>	Ohno <i>et al.</i> , 1980
 (38) Rupicolina A	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991

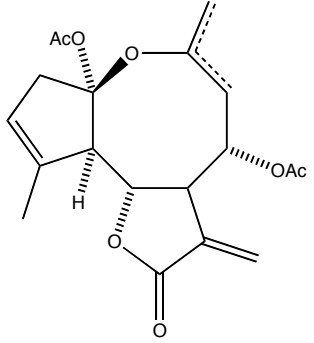
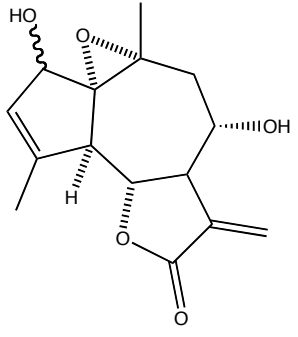
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA		
				
(39) Rupina A				
	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991		
(40) $\Delta^{10(14)}$				
(41) $\Delta^9$				
				
(42) R= CH <sub>2</sub>				
(43) R= O				

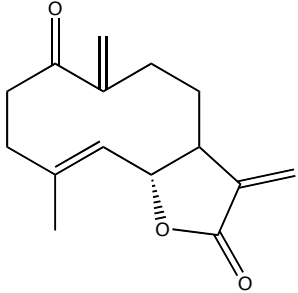
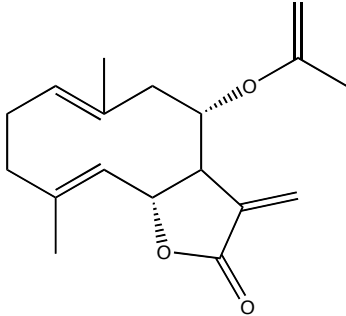
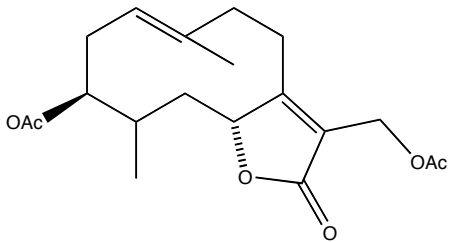
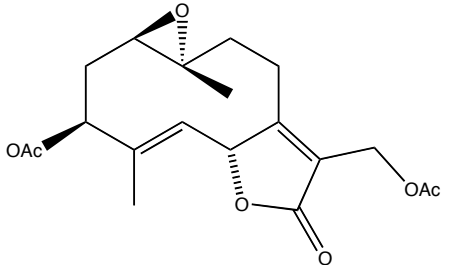
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>(44)</p>  <p>(45) <math>\Delta^{10(14)}</math></p> <p>(46) <math>\Delta^9</math></p>  <p>(47)</p>	<p><i>A. ludoviciana</i></p>	<p>Jakupovic <i>et al.</i>, 1991</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

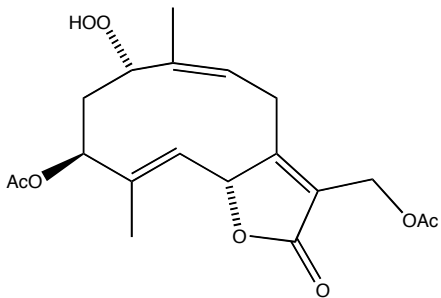
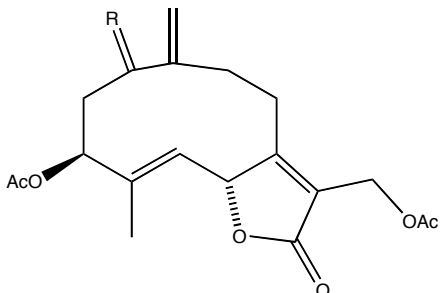
LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>(48) <math>\Delta^{10(14)}</math></p> <p>(49) <math>\Delta^9</math></p>  <p>(50) 2<math>\alpha</math>-OH</p> <p>(51) 2<math>\beta</math>-OH</p>	<p><i>A. ludoviciana</i></p>	<p>Jakupovic <i>et al.</i>, 1991</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

LACTONAS SESQUITERPENICAS (Germacranólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 Artemorina (52)	<i>A. ludoviciana</i> <i>ssp. mexicana</i>	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
 Tulipinolida (53)	<i>A. ludoviciana</i> <i>ssp.</i> <i>mexicana</i>	Mata <i>et al.</i> , 1984
 (54)	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991
 (55)		

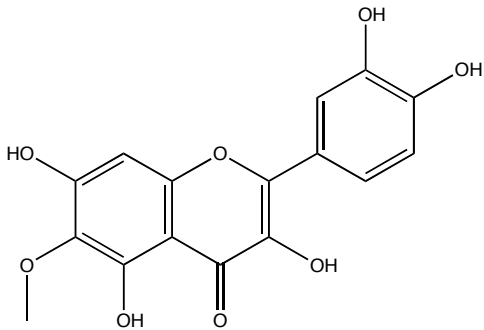
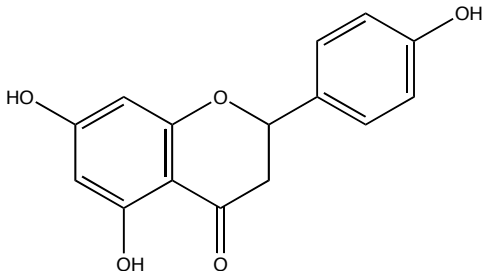


**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos. (Continuación)

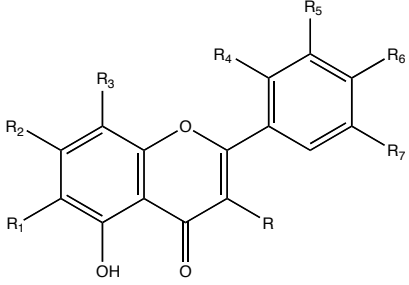
LACTONAS SESQUITERPENICAS (Germacranólidas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>(56)</p>	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991
 <p>(57) R=O (58) R=H, <math>\alpha</math>-OH (59) R=H, <math>\beta</math>-OH (60) R=H, <math>\beta</math>-OOH</p>		

Nota: En esta tabla solo se indican los nombres comunes de los compuestos.

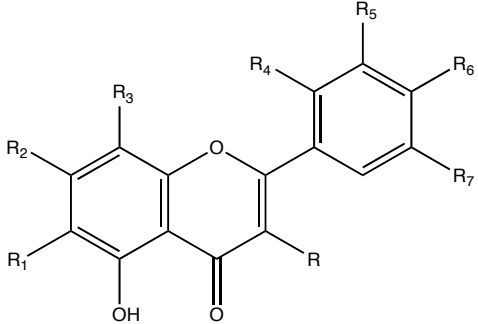
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

FLAVONOIDES (Flavonol)	ESPECIE	REFERENCIA
 Eupafolina (61)	<i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i>	Liu y Mabry, 1982
FLAVONOIDES (Flavanonas)	ESPECIE	REFERENCIA
 Naringenina (62)	<i>A. ludoviciana</i>	Jakupovic <i>et al.</i> , 1991

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

FLAVONOIDES (Flavonas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Eupatilina (<b>63</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=OH</p> <p>Jaceosidina (<b>64</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>7</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>5,7,2',4'-Tetrahidroxi-6,5'- dimetoxiflavona (<b>65</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>7</sub>=OMe</p> <p>5,7,4'-Trihidroxi-6,3',5'- trimetoxiflavona (<b>66</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>5,7,3'-Trihidroxi-6,4',5'- trimetoxiflavona (<b>67</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=OH</p> <p>5,7,3'4'-Tetrahidroxi-6,5'- dimetoxiflavona (<b>68</b>) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>7</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>5,7-Dihidroxi-3,6,8,4'- tetrametoxiflavona (<b>69</b>) R=R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=Me, R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H</p> <p>5,7,4'-Trihidroxi-3,6- dimetoxiflavona (<b>70</b>) R=R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H</p>	<p><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p>	<p>Liu y Mabry, 1982</p> <p>Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Balderas, 2006</p> <p>Ruiz-Cancino <i>et al.</i>, 1993</p> <p>Liu y Mabry, 1982</p>

**Tabla 1.** Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* y sinónimos (Continuación).

FLAVONOIDES (Flavonas)	ESPECIE	REFERENCIA
 <p>Axilarina (71) R=R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H</p> <p>Selagenina (72) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>7</sub>=OMe</p> <p>3',4'-Dimetil eter de la luteolina (73) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OMe</p> <p>Tricina (74) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=OMe</p> <p>Hispidulina (75) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>Crisoeriol (76) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH, R<sub>5</sub>=OMe</p> <p>Campferol 3-metil eter (77) R=OMe, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>Apigenina (78) R<sub>2</sub>=R<sub>6</sub>=OH R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H</p> <p>Luteolina (79) R=R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OH</p> <p>5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona (80) R=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>7</sub>=H, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=OMe</p>	<p><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p>	<p>Liu y Mabry, 1982</p> <p>Balderas, 2006</p>

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de *Artemisia ludoviciana*. (1- Lopes-Lutz *et al.*, 2008. 2- Blagojevica *et al.*, 2006. 3- Govindaraj *et al.*, 2008).

Compuesto	Identificación	% de Área		
		<i>A. ludoviciana</i> 1	<i>A. vulgaris</i> 2	3
81	Hexanal	0.1	-	-
82	(2E)-Hexenal	0.1	-	-
83	(E)-Salveno	-	-	t
84	Santolina trieno	0.2	4.0	-
85	2,5-Dietenil-2-metil-tetrahidrofurano	0.3	-	-
86	Triciclono	0.1	-	0.5
87	$\alpha$ -Tujeno	0.1	1.0	-
88	$\alpha$ -Pino	1.6	5.9	1.7
89	$\alpha$ -Fencheno	-	-	4.7
90	Campfeno	2.3	0.1	6.5
91	Tuja-2,4(10)-dieno	0.1	-	-
92	Benzaldehido	t	-	-
93	Sabineno	0.6	13.7	3.7
94	Artemiseol	0.8	-	-
95	$\beta$ -Pino	0.4	t	1.7
96	3-Octanona	-	-	t
97	Mirceno	-	-	t
98	1,8-Deshidrocineol	-	-	0.2
99	$\beta$ -Mirceno	-	1.3	-
100	3-Octanol	-	-	t
101	6-Metil-5-hepten-2-one	t	-	-
102	Mesitileno	0.1	-	-
103	$\alpha$ -Felandreno	-	-	t
104	$\alpha$ -Terpineno	0.4	-	0.1
105	<i>p</i> -Cimeno	0.8	t	1.1
106	Limoneno	0.2	-	0.4
107	1,8-Cineol	22	28.9	5.8
108	Lactona de lavanda	-	-	t
109	(E)- $\beta$ -Ocimeno	-	-	0.1
110	<i>cis</i> -Arbusculona	0.2	-	-
111	Artemisia cetona	-	-	0.3
112	$\gamma$ -Terpineno	0.8	0.3	0.2
113	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	-	-	0.8
114	Artemisia alcohol	-	-	t
115	Terpinoleno	-	-	t
116	<i>trans</i> - Hidrato de sabineno	-	-	0.3
117	Linalol	-	-	0.6

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de *Artemisia ludoviciana*. (1- Lopes-Lutz *et al.*, 2008. 2- Blagojevic *et al.*, 2006. 3- Gavindaraj *et al.*, 2008. Continuación).

Compuesto	Identificación	% de Área		
		<i>A. ludoviciana</i> 1	2	<i>A. vulgaris</i> 3
118	Isoforona	0.3	-	-
119	$\alpha$ -Tujona	-	1.2	11.3
120	Crisantemona	1.3	-	-
121	$\beta$ -Tujona	-	13.5	3.4
122	<i>cis</i> -p-Ment-2-en-1-ol	-	-	0.1
123	Crisantenona	-	-	1.0
124	Tujanol	-	-	0.4
125	<i>trans</i> -Pinocarveol	-	-	0.9
1	Alcanfor	15.9	1.4	16.8
126	Neoisatujanol	-	-	0.8
127	Sabinona	-	-	t
128	Isoborneol	-	-	0.8
2	Borneol	2.3	-	4.0
129	4-Terpineol	2.2	2.2	0.8
130	Acetato del hidrato de <i>trans</i> - sabineno	-	t	-
131	Tuj-3-en-10-al	-	-	0.1
132	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0.2	-	t
133	$\alpha$ -Terpineol	0.7	-	-
134	Mirtenol	1	-	0.9
135	Verbenona	-	-	0.3
136	<i>trans</i> -Piperitol	t	-	-
137	<i>trans</i> -Carveol	0.2	-	0.2
138	<i>cis</i> -Carveol	-	-	0.1
139	<i>nor</i> -Davanona	1	-	-
140	Cumin aldehído	-	-	0.1
141	Carvona	t	-	0.1
142	Piperitona	t	-	-
143	Peril aldehído	-	-	0.2
144	Acetato de bornilo	0.1	t	-
145	Acetato de lavandulilo	-	-	1.6
146	Silfiperfol-5-eno	-	-	t
147	$\alpha$ -Cubebeno	-	-	t
148	Silfiperfol-4,7(14)dieno	-	-	0.2
149	Ciclosativeno	-	-	t
150	$\alpha$ -Copaeno	-	0.6	0.8
151	$\beta$ -Bourboneno	-	t	0.1
152	$\beta$ -Elemeno	-	1.4	0.1
153	$\beta$ -Cubebeno	-	-	0.6
154	Cipreno	-	-	t

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de *Artemisia ludoviciana*. (1- Lopes-Lutz *et al.*, 2008. 2- Blagojevic *et al.*, 2006. 3- Gavindaraj *et al.*, 2008. Continuación).

Compuesto	Identificación	% de Área		
		<i>A. ludoviciana</i>	<i>A. vulgaris</i>	
		1	2	3
155	$\alpha$ -Gurjuneno	-	t	1.0
156	$\beta$ -Cariofileno	t	2.3	5.4
157	$\beta$ -Cedreno	-	-	t
158	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	-	-	t
159	$\alpha$ -Humuleno	-	0.5	1.4
160	Aromadendreno	-	0.9	0.1
161	<i>allo</i> -Aromadendreno	-	-	0.3
162	9- <i>epi</i> -(E)-Cariofileno	-	-	t
163	$\gamma$ -Curcumeno	-	-	0.2
164	$\gamma$ -Humuleno	-	1.1	-
165	Germacreno D	-	-	7.2
166	$\beta$ -Selineno	-	4.7	0.2
167	$\gamma$ -Gurjuneno	-	2.8	-
168	<i>trans</i> -Murolo-4(14),5-dieno	-	-	0.2
169	Biciclogermacreno	-	-	1.3
170	$\alpha$ -Muroleno	-	-	0.3
171	$\alpha$ -Cadieno	-	-	0.2
172	$\gamma$ -Cadieno	-	-	0.3
173	$\delta$ -Cadineno	-	1.3	1.6
174	Davana eter (isomero)	2.9	-	-
175	Davana eter (isomero)	1.0	-	-
176	Oxido de artedouglasia A	0.4	-	-
177	$\alpha$ -Caracoleno	-	-	t
178	Oxido de artedouglasia D	0.1	-	-
179	<i>trans</i> -Nerolidol	-	-	t
180	Davanona B	0.2	-	2.4
181	Ledol	-	-	t
182	Oxido de artedouglasia B	0.4	-	-
183	Oxido de cariofileno	-	6.5	0.8
184	Davanona	11.5	-	-
185	Longiborneol	-	-	0.2
186	Guaiol	-	-	t
187	Oxido de humuleno II	-	1.2	0.1
188	Carriofila-4(18),8-(15)-dieno-5-ol	-	-	0.1
189	<i>T</i> -Cadinol	-	-	0.2
190	<i>T</i> -Murolol	-	-	0.1
191	$\beta$ -Eudesmol	-	-	0.1
192	$\alpha$ -Eudesmol	-	-	0.4

## 2 Antecedentes Generales sobre la Diabetes Mellitus

### 2.1 Definición y clasificación

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa, relacionada con un desorden en el sistema endocrino, que se caracteriza por la presencia de concentraciones anormalmente elevadas de glucosa en la sangre, que como consecuencia generan una hiperglucemia en el organismo, resultado de la falla en la secreción o acción de la insulina, o ambas (Ross *et al.*, 2004; Muoio y Newgard, 2008), la cual provoca un desequilibrio en la producción y liberación excesiva de glucosa del hígado y una reducción de la síntesis de glucógeno, la cual genera profundas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Ross *et al.*, 2004; ADA, 20011).

Los síntomas clásicos de un individuo que presenta diabetes se ven reflejados por que existe una marcada deficiencia en el transporte de glucosa plasmática al interior celular, por esta razón el organismo reacciona como si se encontrara en estado de alimentación insuficiente, provocando: la estimulación de la glucogenólisis, lipólisis y, gluconeogénesis, sin embargo, estos procesos se realizan de manera incompleta lo dando como resultado la producción de cuerpos cetónicos; además, se activa la cascada de señalización de consumo de alimentos, pero superior a lo normal (polifagia). Pero durante las comidas la glucosa no es absorbida correctamente, por ello el organismo busca excretar el exceso de glucosa por medio de la orina (glucosuria), estas cantidades anormales de glucosa en la orina generan un cambio osmótico el cual provoca diuresis, lo cual favorece un incremento en la producción de orina (poliuria), este fenómeno también induce cambios en el organismo, ya que la pérdida de líquidos y la hiperglucemia incrementan la osmolaridad del plasma incitando a que el organismo ingiera mayor cantidad de agua (polidipsia), un último síntoma es la presencia de visión nublada (ADA, 2011).

Dentro de las complicaciones clínicas que genera el desorden metabólico inducido por la hiperglucemia, se incluyen a largo plazo; el daño a pequeños vasos sanguíneos de la retina (retinopatía) que induce una marcada pérdida de la visión. Estas alteraciones micro vasculares también provocan insuficiencia renal crónica (nefropatía), daño en la fibras nerviosas periféricas (neuropatía), que principalmente se observan en las



extremidades de los pies, donde comúnmente se exhiben ulceraciones que en muchas de las ocasiones son tan graves que es necesario amputar alguno o hasta a los dos pies del paciente (Ross *et al.*, 2004). Estas afecciones micro y macrovasculares disminuyen la calidad y esperanza de vida e incrementan el riesgo de alguna enfermedad cardiovascular.

Existen diferentes tipologías de DM entre las más comunes se encuentran; la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) o insulino dependiente, generalmente este tipo de diabetes inicia en edades tempranas o antes de los 30 años de edad, es caracterizada por la ausencia total de insulina en el organismo, causado por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas (células encargadas de las síntesis de insulina), que se relaciona con predisposición genética y que se desencadena por factores ambientales, no obstante la tasa de destrucción de las células es variable en cada individuo. Así las personas que presentan este tipo de diabetes tienen que administrarse diariamente una cierta cantidad de insulina para poder sobrevivir. No obstante, del total de las personas que tienen DM solo el 5% corresponde a este tipo de diabetes (ADA, 2011).

Un segundo tipo de diabetes es la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) también conocida como diabetes de la edad adulta por que se presenta en individuos mayores a los 30 años, la principal diferencia con la DMT1 es que en este tipo de diabetes si hay células  $\beta$  que producen insulina, pero a pesar de eso la células  $\beta$  sufren un trastorno leve precoz del patrón de secreción de la insulina, caracterizado por cambios de la secreción cíclica, disminución en la frecuencia de los pulsos y retraso en la respuesta ante la elevación de la cantidad de glucosa, las causas de este trastorno aun no se conocen. Finalmente, la insulina disminuye su capacidad de acción (insulinorresistencia), por que el receptor tirosina-cinasa no responde apropiadamente a ella ya sea de origen endógeno secretada por el páncreas o exógenamente administrada. Por tanto la DMT2 se debe principalmente a una utilización ineficaz de la insulina. La DMT2 representa a nivel mundial el 90- 95% de los casos de diabetes (ADA, 2011).

La mayor parte de los casos de DMT2 se producen en el contexto de lo que se conoce como síndrome metabólico, al cual se asocian la diabetes, la hipertensión arterial, el aumento de los niveles de colesterol, triglicéridos y/o ácido úrico, así como el sobrepeso, muy probablemente relacionados a la resistencia a la insulina. Se ha observado que la mayor tasa de incidencia se presenta en personas con antecedentes familiares. En años recientes se han descubierto varios genes que se relacionan con este padecimiento, pero este componente genético es complejo y aún no es definido.

Posiblemente es acompañado de factores ambientales, tales como una mala alimentación y hábitos como el sedentarismo (ADA, 2011).

Otro tipo de diabetes es la gestacional (DG), que se presenta en las mujeres embarazadas que presentan niveles de glucosa por arriba de lo normal, aunque nunca hayan tenido diabetes. La DG se desarrolla aproximadamente a las 28 semanas del embarazo y se presenta en el 4% del total de mujeres embarazadas. Aún no se sabe claramente que es lo que la provoca, pero probablemente las hormonas que ayudan al desarrollo de bebé durante todo el embarazo, son las causantes de que la insulina no ejerza su efecto en el cuerpo de la madre, mejor conocido como insulinoresistencia (ADA, 2011).

Existen otros tipos específicos de diabetes que abarcan; los relacionados con problemas genéticos en función de las células  $\beta$ , la acción de la insulina, así como problemas en el sistema inmunológico, inducida por enfermedades en el páncreas y endocrinas en general, además los medicamentos, sustancias químicas e infecciones son capaces de inducir diabetes (ADA, 2011).

Para saber si una persona presenta o es probable que padezca diabetes, los especialistas realizan una prueba de glucosa en ayunas (PGA) o una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). Con cualquiera de esas dos pruebas, puede diagnosticarse la diabetes. La American Diabetes Association americana de diabetes (ADA por sus siglas en inglés, 2011) recomienda realizarse la prueba de PGA porque es más económica, rápida y fácil de realizar. Por tanto, si una persona se realiza estas pruebas y la medición de glucosa en ayuno es mayor a los 110 mg/dL pero menor a 140 mg/dL, es considerado pre-diabético (Levy *et al.*, 2006). Si en un paciente en estado de prediabetes se toman medidas de control de glucosa sanguínea, principalmente el ejercicio y alimentación, se ha demostrado que es posible retrasar e incluso prevenir la aparición de DMT2 (ADA, 2011).

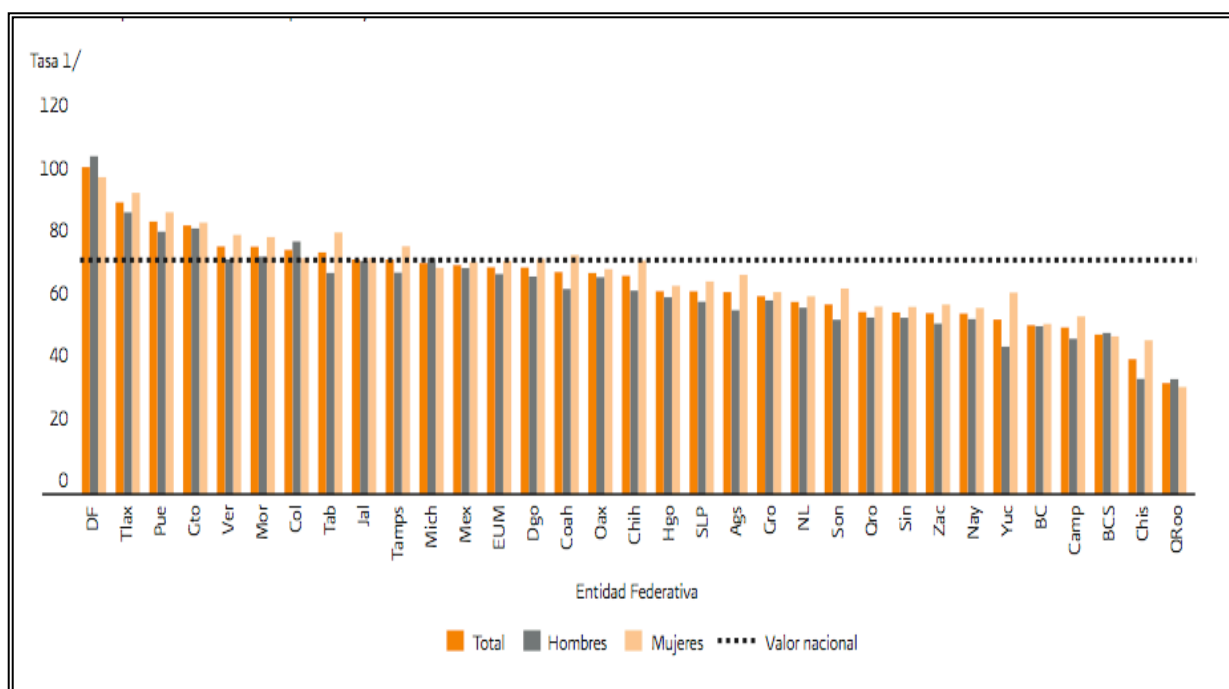
## 2. 2 Impacto de la diabetes mellitus tipo 2 en el mundo y en México

A nivel mundial la diabetes es un problema importante de salud pública y su debida atención resulta sumamente costosa para las autoridades de salud. En varios países, incluido el nuestro, esta enfermedad constituye la primera causa de muerte (Secretaria de Salud, 2010), así en 2004 fallecieron 3.4 millones de personas como consecuencia de la enfermedad, cerca del 80% de las muertes se registraron en países de

ingresos económicos bajos y medios; además casi la mitad de esas muertes corresponden a personas de menos de 70 años y un 55% a mujeres. Actualmente, se estima que 220 millones de personas padecen la enfermedad y se prevé que para el año 2030 este valor se duplique (OMS, 2011).

En los Estados Unidos de Norteamérica se estima que cerca de 20.8 millones de personas padecen diabetes, correspondiente al 7% de la población; de estos, desafortunadamente alrededor de 6.2 millones no saben que padecen la enfermedad (ADA, 2011). En ese país diariamente se diagnostican 4,100 casos nuevos de DM2, además diariamente se amputan 230 extremidades inferiores, ingresan a hemodiálisis permanente 120 casos, y por si fuera poco, se presentan cerca de 55 casos de ceguera.

Nuestro país no está libre de este problema, pues en la última década la DM ha sido la primera causa de muerte. Así en 2010, la DM provocó 72, 449 muertes (14.7% del total de las muertes del país). Este número representa un incremento del 80.8 % en relación a la década anterior 1999-2009. El Distrito Federal, en el 2009, fue la entidad federativa que registró la tasa más elevada de mortalidad causada por DM con 104.7 muertes por cada cien mil habitantes, seguido de Tlaxcala con 93.4 defunciones. Caso contrario, Quintana Roo fue la entidad con la menor tasa de muertes, 35.6 por cada cien mil habitantes (Figura 4, Secretaría de Salud, 2010).



**Figura 4.** Mortalidad por diabetes mellitus por sexo y entidad federativa en México en el año de 2009 (Secretaría de Salud, 2010).

Entre las instituciones de salud pública, el IMSS registró el mayor número de casos nuevos por año. Sin embargo, la tasa de mortalidad por DM más alta fue la registrada en los servicios médicos de PEMEX, con 99.9 muertes por cien mil usuarios, cifra 2.3 veces mayor que la registrada entre los afiliados al sector público de salud.

De acuerdo al Sistema Nacional de Salud, de enero del 2010 a la fecha se registraron 8.7 millones de pruebas de detección de diabetes, y en ese mismo año ingresaron a tratamiento más de 120 mil personas, 11.9% más que en 2009. Los datos anteriores reflejan el impacto económico de la DMT2 en nuestro país, pues genera un gasto anual de 317 millones de pesos solo para el cuidado de los pacientes.

Se estima que en nuestro país el 90% de los casos de diabetes DMT2 son atribuibles al sobrepeso u obesidad. De acuerdo a la Secretaría de Salud (2010), hoy en día México, ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad, después de Estados Unidos de América.

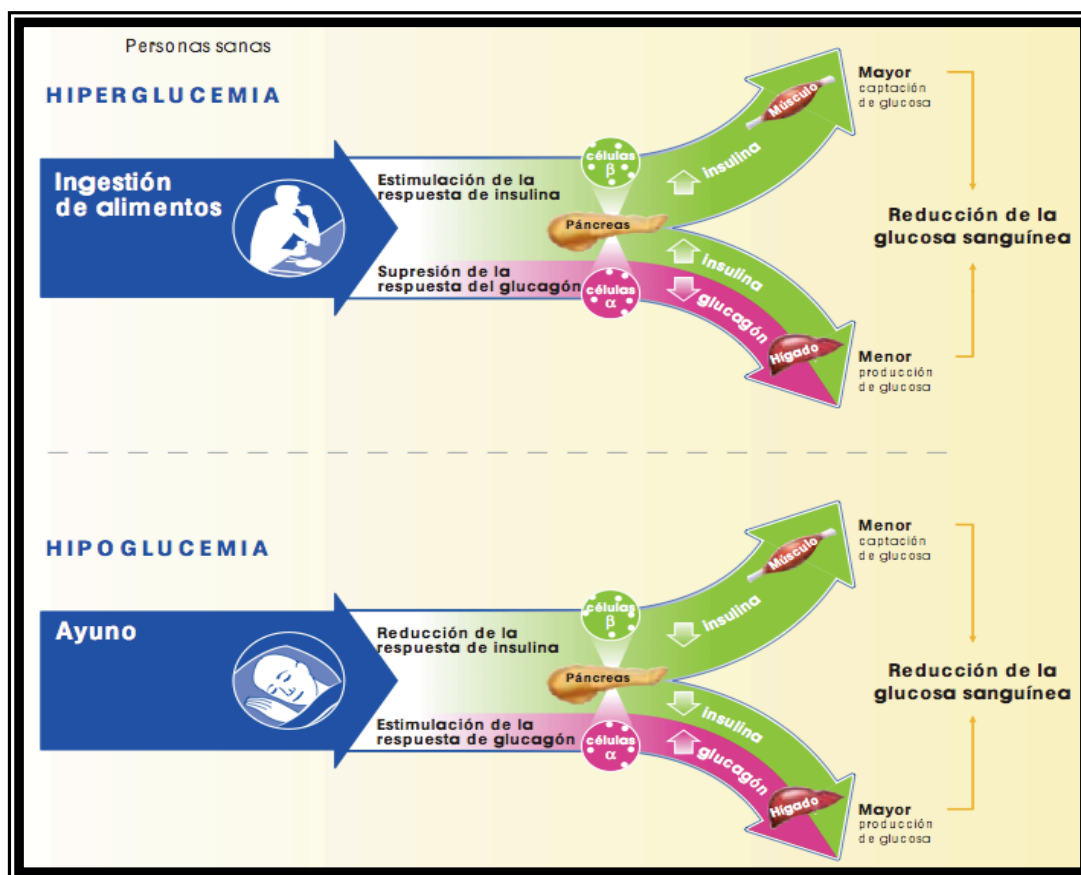
### **2.3 Tratamientos farmacológicos para la diabetes mellitus tipo 2**

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la DMT2 tienen como objetivo primordial regular los niveles de glucosa en sangre (NGS), para así disminuir las complicaciones micro y macrovasculares de la enfermedad. Estos fármacos se administran de forma oral y presentan diferentes mecanismos de acción, criterio que generalmente se utiliza para clasificarlos (Moller, 2001; Cheng y Fantus, 2005; Altagracia-Martínez *et al.*, 2007).

El grupo de fármacos más utilizado es el de las sulfonilureas, mismas que estimulan especialmente a las células  $\beta$  del páncreas para producir y liberar más insulina al sistema circulatorio; este proceso se lleva a cabo por el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K^+_{ATP}$ ). No obstante, una consecuencia de la enfermedad es la pérdida gradual de las células  $\beta$  pancreáticas, lo cual ocasiona una limitada actividad de este tipo de fármacos. Además, después de una terapia de diez años, las sulfonilureas reducen significativamente su eficiencia. Entre los medicamentos de primera generación se encuentran; la tolbutamida, acetohexamida, tolazamida y clorpropamida; entre los de segunda generación destacan la glibenclamida, glibepirida, glipicida, gliquidona y la gliclacida. Estos medicamentos pueden provocar hipoglucemia, eventos cardiovasculares, agranulocitosis, trombocitopenia, anemia hemolítica y aplásica, erupción cutánea, prurito, dolor de cabeza, náuseas, diarrea,

vómito y porfiria hepática, como principales efectos adversos. Otros estimulantes de la liberación de insulina son las meglitinidas como la repaglinida y la nateglinida.

Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas, inhiben o retrasan la acción de las enzimas encargadas de la fragmentación de los glúcidos en monosacáridos, evitando así la absorción en la que participan transportadores de glucosa dependientes de sodio, y por lo tanto la digestión de los mismos en el tubo digestivo. Entre los fármacos más importantes de este grupo se encuentran la acarbosa y el miglitol; sus efectos secundarios más comunes son flatulencia, dolor abdominal, diarrea y erupción cutánea.

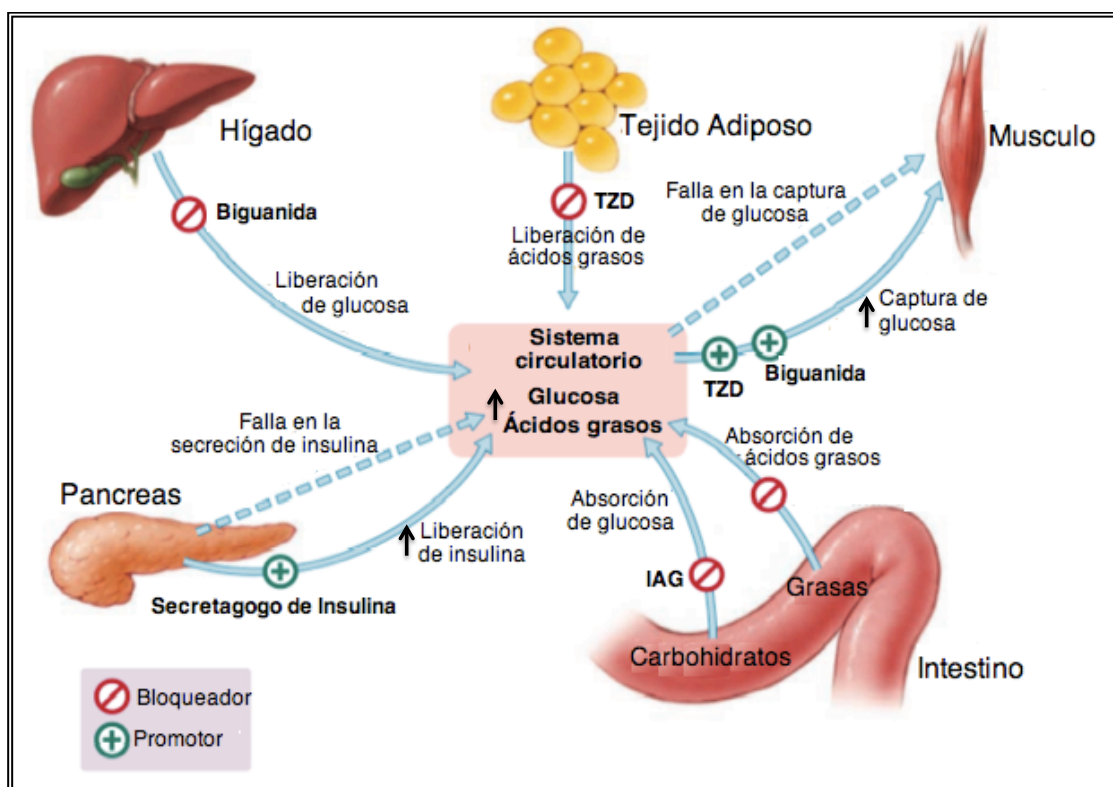


**Figura 5.** Control de la regulación de los niveles de glucosa en el organismo. Durante la ingesta de alimentos se estimula la liberación de insulina de las células  $\beta$  del páncreas y una inhibición de la liberación de glucagón. Sin embargo en un estado de ayuno se produce glucagón en las células  $\alpha$  del páncreas y una inhibición en la liberación de insulina (Tomado de, Un equilibrio delicado: Entendiendo las Incretinas, regulación de la glucosa y fisiopatología de la diabetes tipo 2., Merck® 2006).

Las biguanidas, reducen o inhiben la liberación de glucosa en el hígado, al inhibir la gluconeogénesis hepática, también reducen la absorción intestinal de la glucosa. Por lo tanto, estos tipos de fármacos benefician el control de los NGS. Los fármacos pertenecientes a esta familia son la metformina, fenformina y la buformina. La

diarrea, las náuseas, el vómito, las flatulencias, astenia, la indigestión, la incomodidad abdominal y dolor de cabeza son eventos secundarios al consumo de estos fármacos. Cabe mencionar que una consecuencia de la acción de la insulina es la inhibición de la liberación de glucosa hepática a través de su regulación del glucagón; este último controla la ruptura y liberación de glúcidos en el hígado (Figura 5).

Un grupo de fármacos de incorporación reciente para el tratamiento de la DMT2 es el de las tiazolidinedionas que incluyen a la troglitazona, rosiglitazona y la pioglitazona; estos productos se caracterizan por inducir un incremento de la sensibilidad a la insulina mediante el aumento en la transcripción de genes que participan en este proceso. Funcionan como agonistas del receptor proliferador-activador  $\gamma$  del peroxisoma (PPAR  $\gamma$ , Figura 6). Los efectos secundarios registrados para estos productos incluyen infecciones en el tracto respiratorio, dolor de cabeza, sinusitis, mialgia y trastornos dentales (Moller, 2001; Cheng y Fantus, 2005; Altagracia-Martínez *et al.*, 2007; Bösenberg y Vanzyl, 2008).



**Figura 6.** Órganos de blanco y mecanismos de algunos agentes antihiper glucémicos orales administrados en pacientes con DMT2. TZD= Tiazolidinedionas; IAG= Inhibidores de las  $\alpha$ - glucosidasas (modificado de Cheng y Fantus, 2005).

Entre la nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes se encuentra la enzima dipeptidil peptidasa IV (DDP-IV) encargada de la degradación de las principales incretinas en los seres humanos, el péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1 por sus siglas en inglés) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP por sus siglas en inglés, Kieffer *et al.*, 1995; Deacon *et al.*, 1995). Estos péptidos son secretados por las células intestinales L (íleon y colon) y K (duodeno y yeyuno) respectivamente. Entre los fármacos inhibidores de la DDP-IV se encuentran el LAF-237, MK-0431 y el P93/01 (Gautier *et al.*, 2005).

La actividad fisiológica de las incretinas se refleja en la estimulación de la liberación de insulina dependiente de glucosa en las células  $\beta$ , y en el caso del GLP-1 también suprime la producción de glucagón dependiente de glucosa de las células  $\alpha$  pancreáticas (Ahrén. 2003; Drucker 2003; Gautier *et al.*, 2005). Estudios *in vitro* muestran, que el GLP-1 estimula la transcripción del gen de la insulina (Drucker *et al.*, 1987), así como su biosíntesis, en animales aumenta la replicación de las células  $\beta$  del páncreas, fomenta la expansión de la masa de células  $\beta$  y por último inhibe la muerte programada de células  $\beta$  (Fehmann y Habener, 1992; Farilla *et al.*, 2002). El GIP aumenta la replicación y favorece la supervivencia de las células  $\beta$  (Trümper *et al.*, 2001). Por lo descrito anteriormente, se han buscado análogos de incretinas resistentes a la degradación de la DDP-IV como lo es exedin-4 que actúa como agonista de los receptores de GLP-1, por lo tanto, incrementa la secreción de insulina e inhibe la liberación de glucógeno dependiente de glucosa; otros fármacos que han sido estudiados son el liraglutido y la sitagliptina (Bösenberg y Vanzyl, 2008).

La administración exógena de insulina por vía subcutánea es la única terapia para los enfermos con DMT1. Sin embargo, también es necesaria para pacientes con DMT2 que no responden a los fármacos orales, normalmente esto puede ocurrir con el paso de los años y el desarrollo de la enfermedad o en casos extremos donde el paciente presenta los NGS muy elevados. Por otro lado, el tratamiento con insulina representa un riesgo latente de sufrir hipoglucemia. Actualmente, la insulina puede ser administrada de manera inhalada y absorbida por los pulmones, así al igual que la vía subcutánea se evita la degradación del péptido por enzimas gastrointestinales, otra ventaja es que para el paciente no resulta molesto (Garg *et al.*, 2006 ).

Una forma efectiva de tratar y de prevenir el desarrollo de DMT2 es el ejercicio, cuyos beneficios se ven reflejados en un incremento en la sensibilidad a la insulina, que

provocan una disminución importante en los NGS por el alto consumo y demanda de energía. A largo plazo el ejercicio genera la reducción de tejido adiposo visceral e incrementa la captación de glucosa dentro del músculo esquelético en un periodo postprandial, causada por un incremento en la translocación de transportadores para glucosa GLUT-4 en la membrana de las células. Estos mecanismos son considerados independientes de insulina y son de importancia farmacológica para la innovación en los tratamientos para DMT2 (Ross *et al.*, 2004).

### 3 Diabetes y Plantas Medicinales en México

México, con aproximadamente 3352 especies de plantas medicinales, se encuentra en segundo lugar a nivel mundial en cuanto a riqueza de plantas medicinales; y es solo superado por China que cuenta con alrededor de 5000 especies (Bye *et al.*, 1992). Esta riqueza es consecuencia de varios factores incluyendo la situación geográfica, variedad de climas, topografía, historia geológica y una gran diversidad cultural. Se calcula que alrededor del 10 % de la diversidad global de especies se concentra en el territorio mexicano (CONABIO, 2006).

Al igual que en muchos países del mundo, un importante sector de la población utiliza las plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. La mayoría de los enfermos de diabetes recurren en primera instancia a los centros de salud oficiales donde se les diagnostica la enfermedad y se les recomienda el tratamiento apropiado. Pero, los pacientes luego recurren a los médicos tradicionales en busca de terapias alternativas a base de plantas. Estos médicos han generado tratamientos a base de hierbas en las últimas décadas, de tal forma que a la fecha se han descrito alrededor de 306 especies de plantas dentro de 235 géneros y 93 familias para el tratamiento de la enfermedad; sin embargo, la mayoría de estas no ha sido objeto de investigación científica alguna. Una de esas especies citada en el estudio de Andrade-Cetto y Heinrich (2005) es la *Artemisia ludoviciana*, objeto del presente estudio. El lector interesado es remitido a esa revisión para una información detallada de las especies de mayor uso.



### III HIPÓTESIS

El uso popular de la especie *Artemisia ludoviciana* para el tratamiento de la diabetes sugiere que los preparados de la planta y algunos de sus constituyentes poseen propiedades hipoglucemiantes o antihiperoglucémicas. Por lo tanto, la administración de extractos vegetales de esta planta a animales de experimentación debe disminuir significativamente los NGS.

## IV OBJETIVOS

### 1 Objetivo General

Establecer el potencial antidiabético de *A. ludoviciana* Nutt., mediante estudios farmacológicos apropiados con la finalidad de establecer la eficacia preclínica y algunos parámetros de identidad de los preparados de la planta y así contribuir al uso racional de los productos herbolarios de mayor uso en las prácticas médicas populares de México.

### 2 Objetivos Particulares

1. Establecer de manera preliminar la inocuidad de los extractos derivados de la planta mediante la determinación de su toxicidad aguda en roedores utilizando la prueba de Lorke.
2. Determinar el potencial hipoglucemiante de los extractos de *A. ludoviciana* Nutt., mediante la evaluación de sus efectos en los niveles de glucemia en animales normoglucémicos y diabéticos, de acuerdo a las técnicas convencionales.
3. Determinar el potencial antihiper glucémico de los extractos de *A. ludoviciana* Nutt., mediante la evaluación de sus efectos en los niveles de glucemia en animales normales y diabéticos, utilizando para ello pruebas de tolerancia a la glucosa y sacarosa.
4. Establecer la composición química del aceite esencial obtenido por hidrodestilación y de los volátiles separados por micro extracción en fase sólida de la parte aérea de *A. ludoviciana* Nutt., mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas.

## V DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 1 Recolección del Material Vegetal

El material vegetal (parte aérea) de *Artemisia ludoviciana* Nutt., se recolectó en el poblado de San Nicolás “Tetelco” rumbo a la “yaqueme” en la delegación Tláhuac, Distrito Federal, el 5 de octubre de 2009. Las coordenadas geográficas del sitio de recolección son las siguientes: 19° 12' 25.16'' N, 98° 58' 40.41'' O, a una altura de 2265 msnm. Una muestra de referencia (registro 119871) se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM.

### 2 Preparación de los Extractos y Aceite Esencial

El material vegetal de *Artemisia ludoviciana*, se secó a temperatura ambiente, protegiéndolo de la exposición directa a la luz. El material seco se fragmentó en un molino Willey.

El extracto orgánico (EO) se preparó vía maceración y para ello se tomaron 270 g de estafiate molido y seco y se trataron con 1.5 L de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1). La mezcla se dejó en reposo durante una semana; al cabo de este tiempo se filtró y el extracto resultante se concentró *in vacuo* en un rotaevaporador (Heidolph, Laborota 4000). Este proceso generó 30 g de un extracto seco verde oscuro.

El extracto acuoso (EA) se preparó mediante el método de infusión. Cada 20 g de material vegetal seco se trataron con 500 ml de agua hirviendo; la mezcla resultante se dejó reposar durante 30 min y se filtró a través de un filtro de papel por gravedad. El extracto obtenido se concentró a sequedad en un rotaevaporador adaptado a una bomba de vacío. Para la realización de los diferentes ensayos fue necesario repetir el proceso tres veces.

El aceite esencial (AE) se elaboró a partir de 300 g del material seco a través de una hidrodestilación. El aceite se separó del producto de destilación mediante un proceso de reparto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío para generar 0.569 g de un aceite amarillo. El proceso se repitió tres veces.

### 3 Ensayos Biológicos

Para los ensayos biológicos se utilizaron ratones machos de la cepa ICR de un peso aproximado de 25-35 g, adquiridos comercialmente de Harlan México S. A. de C. V. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , alimento *ad libitum*, 70-80% de humedad relativa y un ciclo de 12 h luz/ oscuridad y de acuerdo a las normas establecidas en la NOM-062-ZOO-1999. En todos los ensayos los animales fueron privados de alimento doce horas antes de la evaluación pero con acceso libre al agua. Todas las muestras (EO, EA, AE y controles) objeto de ensayo se suspendieron en una solución salina (NaCl al 0.9 % y 0.1 % de Tween 80) y se administraron por vía oral. En general, en todas las pruebas biológicas se utilizaron dos tipos de controles, uno positivo y un vehículo.

#### 3.1 Evaluación de la toxicidad aguda

Para determinar la toxicidad aguda potencial se utilizó el método experimental descrito por Lorke (1983). Se evaluaron independientemente todos los preparados de *A. ludoviciana*.

Este ensayo se realizó en dos fases; en la primera se formaron cuatro grupos de tres ratones, a cada grupo se le administró por vía oral una dosis única de 10, 100 o 1000 mg/kg del preparado a evaluar; los animales se observaron en dos horas siguientes a la administración de los tratamientos y se monitorearon continuamente los siguientes catorce días, registrándose su peso, comportamiento y algún cambio físico visible. En caso de que algún ratón muera en el periodo de observación se registra el día y hora de la muerte. Todos los animales son sujetos a una necropsia al termino del experimento o *post-mortem* para observar posibles daños a los órganos internos.

En la segunda fase, se utilizaron grupos de animales iguales que fueron tratados con dosis mayores (1600, 2900 y 5000 mg/kg) de cada uno de los preparados, de manera independiente, de acuerdo a los criterios de Lorke (1983). El experimento duro 14 días, y de nueva cuenta, se realizaron las observaciones descritas para la primera fase.

Al cabo de los ensayos se calculó la  $DL_{50}$  mediante una media geométrica entre la dosis donde se presenta el deceso del primer animal y la última dosis donde no se presentó muerte alguna de roedores. En caso de no observar deceso alguno se considera que la  $DL_{50}$  es mayor a 5g/kg de peso.

### 3. 2 Evaluación del efecto antidiabético

Para la determinación de la actividad antidiabética de los extractos EO y EA de *Artemisia ludoviciana*, se diseñaron diferentes experimentos de tipo agudo *in vivo* con base en los protocolos experimentales ampliamente descritos en la literatura utilizando animales normoglucémicos y diabéticos (Bailey y Flatt, 1990; Williamson *et al.*, 1996; Verspohl, 2002; Soumyanath, 2006., Guerrero-Analco *et al.*, 2005, 2007; Cristians *et al.*, 2009).

La DMT2 se indujo en los ratones mediante la administración de una dosis única de estreptozotocina [STZ, 100 mg/kg i.p.] después de un tratamiento previo con el dinucleótido de la adenin nicotinamida [NAD por sus sigla en inglés, 30 mg/kg]. Los niveles de glucosa se determinaron 8 días después de la administración de la STZ y aquellos que presentaron NGS mayores a 200 mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los estudios.

En todos los experimentos, las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en el final de la cola. Los NGS se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

La glibenclamida, glucosa, sacarosa, acarbosa, STZ y el NAD utilizados en los diferentes ensayos conducentes a determinar el potencial antidiabético se compraron a Sigma-Aldrich (St. Lois, MO. USA).

#### 3. 2. 1 Efecto agudo hipoglucemiante

Después de ocho horas de ayuno, los ratones normoglucémicos o diabéticos, según el caso, se dividieron en cinco grupos. Al primer grupo se le administró el vehículo (solución salina, NaCl 0.9 %), al segundo el control positivo glibenclamida [10

mg/kg]; finalmente, los grupos III-V recibieron los tratamientos (EO o EA) a las dosis de 31.6, 100 o 300 mg/kg, respectivamente. A continuación, los NGS se midieron a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de las muestras. Una vez que se obtuvieron los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia, de acuerdo a la ecuación (Guerrero-Analco *et al.*, 2007):

$$\% \text{ de variación de glucemia} = [(G_t - G_i) / G_i] \times 100.$$

$G_i$  corresponde al valor de glucemia inicial

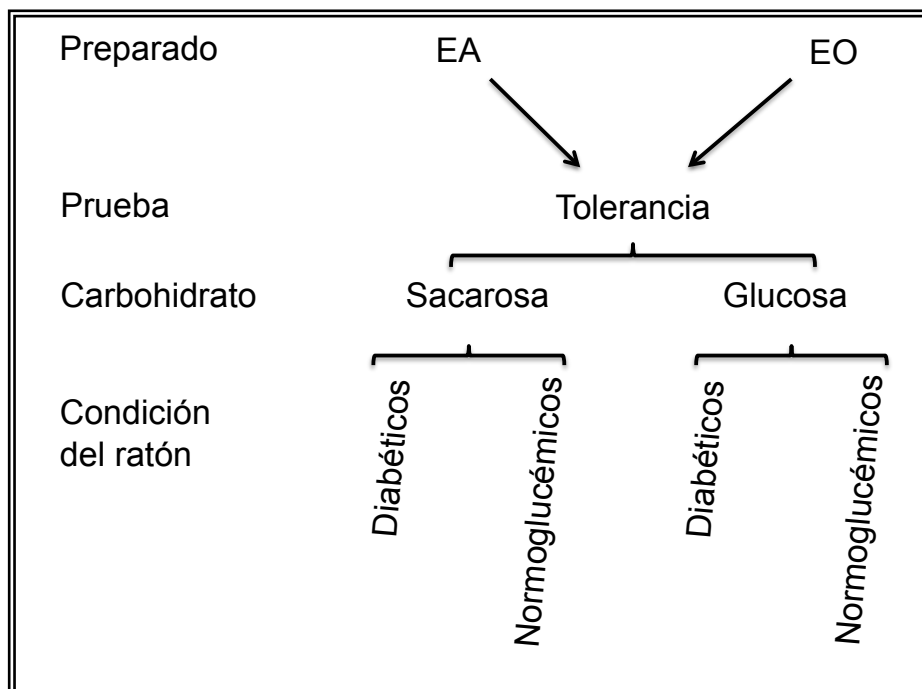
$G_t$  el valor de glucemia a los diferentes tiempos

### V. 3.2.2 Efecto antihiper glucémico

Con la finalidad de determinar el efecto antihiper glucémico del EO y del EA de *A. ludoviciana*, se realizaron de manera independiente la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) y a la sacarosa (POTS) en ratones normoglucémicos y diabéticos.

En estas pruebas después de un ayuno de 8 horas, los animales se dividieron en cinco grupos: al primero se le administró el vehículo (solución salina, NaCl 0.9%), al segundo el control positivo que en el caso de la POTG fue la glibenclamida [10 mg/kg] y para la POTS fue acarbosa [5 mg/kg]. Los grupos III-V fueron tratados con las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg del extracto a evaluar. Treinta min después de haber iniciado el tratamiento, todos los animales recibieron por vía oral una solución de glucosa anhidra (1.5 g/kg) o sacarosa (3 g/kg) según el caso. Posteriormente, los NGS se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120, y 240 min después de la administración de los carbohidratos. Los porcentajes de variación de glucemia se calcularon acuerdo a la ecuación indicada en el inciso anterior.

En la Figura 7 se ilustra de manera resumida la estrategia experimental utilizada para determinar el efecto hipoglucemiante de los distintos tratamientos.



**Figura 7.** Resumen de los ensayos dirigidos a evaluar el efecto antihiperoglucémico del extracto orgánico (EO) y del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en la prueba de tolerancia a la glucosa y/o a la sacarosa en ratones normoglucémicos y diabéticos.

## 4 Pruebas de Identidad

### 4.1 Establecimiento de la composición del aceite esencial

La determinación de la composición del aceite esencial de *A. ludoviciana* se realizó aplicando la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM), utilizando un cromatógrafo Agilent 6890N marca LECO pegasus 4D y una columna capilar DB-5 (10m x 0.18mm *d.i.*; 0.18 $\mu$ m) con un programa de temperatura desde 40 °C hasta 300 °C (4°C/min). El helio (1 mL/min) fue utilizado como gas acarreador. La introducción de la muestra (2 $\mu$ L) se realizó utilizando un modo split (1:20). Los componentes presentes en la esencia fueron identificados mediante el cálculo de sus índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts (Van Den Dool, 1963), utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) y por la comparación de sus espectros de masas con los reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo del National Institute of Standards and Technology (NIST). De manera adicional, algunos metabolitos fueron identificados mediante la inyección de

estándares utilizando las mismas condiciones cromatográficas. Finalmente, la cuantificación de cada constituyente se realizó a partir de la medición del área bajo la curva de cada pico en el cromatograma correspondiente.

#### 4.2 Determinación de los componentes volátiles

La identificación de los componentes volátiles presentes en *A. ludoviciana*, se realizó mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (HS-SPME por sus siglas en inglés) utilizando tres tipos de fases de diferente polaridad: a) divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano, (DVB/CAR/PDMS), b) polidimetilsiloxano (PDMS) y c) carboxeno/polidimetilsiloxano, (CAR/PDMS). En todos los casos la desadsorción y subsecuente análisis de cada muestra se realizó aplicando a la CG-MS (Perraudin *et al.*, 2006).

Rápidamente, 1 g de planta seca, 75 mg de NaCl y 5 mL de agua desionizada, fueron colocados en un vial con capacidad de 15 mL. Enseguida, se introdujo en el vial la fase sólida y se mantuvo en agitación constante durante 10 min, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de exposición de la muestra con la fase sólida, se realizó el análisis de cada fibra empleando a la cromatografía de gases utilizando las mismas condiciones analíticas descritas en el inciso V.4.1.

Cada uno de los componentes presentes en las muestras analizadas fueron identificados mediante la comparación de sus índices de retención y espectros de masas, con aquellos reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo NIST.

#### 5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo validando la diferencia entre los promedios normalizados del porcentaje de variación en los NGS  $\pm$  su error estándar, Utilizando la prueba *t* de Student (pareada y no pareada, según el caso) y la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney, considerando una significancia al valor de  $p \leq 0.05$ .



## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estafiate es una planta que ha estado presente durante mucho tiempo en la cultura mexicana y ha sido utilizada para el tratamiento de diversos padecimientos que afectan a la población. Una aplicación medicinal reciente de esta especie es para aliviar la diabetes y considerando el impacto de esta enfermedad a nivel mundial, se hace necesario el establecimiento de sus parámetros de calidad, eficacia e inocuidad a nivel preclínico y así contribuir al uso racional de los productos herbolarios de México para tratar esta enfermedad. De tal forma, que en el presente trabajo se consideró pertinente establecer el potencial antidiabético, la toxicidad aguda y el contenido de productos volátiles de algunos preparados de *A. ludoviciana*.

### 1 Ensayos Biológicos

#### 1.1 Determinación de la toxicidad aguda

Como norma básica, al evaluar la inocuidad se debe tener en cuenta la documentación sobre un largo periodo de utilización. Así pues, cuando no se cuente con estudios toxicológicos detallados, la evaluación del riesgo habrá de basarse en la experiencia documentada de utilización prolongada sin indicios de problemas en materia de inocuidad. No obstante, aun en los casos de productos herbolarios utilizados durante un largo periodo, pueden haber existido riesgos toxicológicos crónicos que hayan pasado inadvertidos (OMS, 2002). Al realizar la investigación bibliográfica sobre los antecedentes toxicológicos de esta planta no se encontró descripción alguna sobre sus efectos tóxicos. No obstante, fue posible documentar la utilización tradicional del estafiate por más de quinientos años. Entonces, esta planta ha sido utilizada por las culturas mexicanas por siglos sin que se haya reportado algún efecto tóxico.

Al no contar con registro de efectos tóxico de esta especie, en la primera parte de este trabajo se determinó la toxicidad aguda de los extractos orgánico (EO) y acuoso (EA) de *Artemisia ludoviciana* mediante la metodología establecida por Lorke (1983). Los resultados de esta prueba indican que ambos preparados de la planta no son tóxicos para ratones.

El ensayo de Lorke se realiza en ratones, permite el cálculo de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) utilizando un número mínimo de animales y se realiza en un tiempo relativamente corto.

En la primera fase del ensayo los animales recibieron los tratamientos a las dosis sugeridas por Lorke [10, 100, 1000 mg/kg (cada grupo n=3)]; al visualizar durante las primeras dos horas después de la administración, no se observó anomalía conductual ni daños visibles en los roedores; después de 15 días de monitoreo, el peso y el comportamiento de los roedores no se modificó en comparación con el vehículo (Tabla 3). En la segunda fase, los roedores se trataron con los extractos a las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. Durante las primeras dos horas, algunos animales presentaron una agitación poco usual, pero posteriormente este efecto cesó y no se observó conductualmente una actividad anómala visible en comparación con los roedores que recibieron el tratamiento con el vehículo (salina 0.9%). De igual forma en el monitoreo de los siguientes 15 días no se observó mortalidad ni cambios conductuales o de peso (Tabla 3).

Al término de cada fase se realizó una necropsia a los animales para observar si los tratamientos provocaron daño en los órganos vitales; en ningún caso se observó afectación de los órganos ya que las muestras presentaron el mismo color, tamaño, y aspecto que los controles. En conjunto los resultados indican que el valor de la  $DL_{50}$  de los extractos (EO y EA) de *A. ludoviciana* es  $> 5000$  mg/kg, y por lo tanto de acuerdo a los criterios de Lorke, no son tóxicos bajo este modelo.

Tabla 3. Toxicidad aguda de los preparados de *A. ludoviciana*. EA; extracto acuoso. EO; extracto orgánico.

EA				EO			
Fase 1		Fase 2		Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3	10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3	100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3	1000	0/3	5000	0/3
$DL_{50} > 5000$ mg/kg				$DL_{50} > 5000$ mg/kg			

## 1. 2 Potencial antidiabético de *A. ludoviciana* Nutt.

Al realizar la investigación bibliográfica del estafiate, se logró documentar la existencia de varios estudios farmacológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la planta (Armendáris, 1897; Terres, 1897, 1899; Villaseñor, 1907; Castanedo, 1908; Rodríguez *et al.*, 1976; Vasanth *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1996; Bork *et al.*, 1996, 1997; Malagón *et al.*, 1997; Zavala-Sánchez *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Alanís *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005; Bhatt *et al.*, 2006; Calzada *et al.*, 2006; García *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Temraz y El-Tantawy 2008; Park *et al.*, 2008; Caner *et al.*, 2008; Dubai *et al.*, 2009; Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Vahdati-Mashhadian *et al.*, 2009; Juárez-Flores *et al.*, 2010), y sólo uno relacionado con el potencial antidiabético. En ese estudio, realizado por Alarcón-Aguilar y colaboradores (1998) se determinó el efecto de una decocción de la planta (4 ml/kg, preparados a partir de 40 g de planta y 300 ml de agua) sobre los niveles de glucosa en una prueba de tolerancia al carbohidrato en conejos sanos. Con base en esa prueba los autores concluyen que el extracto es inactivo. Evidentemente, esos resultados no son suficientes para determinar que la especie no es activa. Esta consideración y la falta de antigüedad del uso tradicional para tratar la diabetes, hacen necesario establecer a nivel preclínico, con una batería de ensayos apropiados, el potencial antidiabético de la planta.

Para establecer el potencial antidiabético de varios preparados de la especie se siguió la siguiente estrategia general: En primer lugar, se determinó el efecto hipoglucemiante agudo en roedores sanos y diabéticos. En caso de obtener resultados satisfactorios, se procedió a evaluar el efecto antihiper glucémico de los mismos preparados utilizando las pruebas de tolerancia a los carbohidratos sacarosa y glucosa, también en animales normoglucémicos y diabéticos. En todos los casos los animales fueron diabetizados con estreptozotocina (STZ, 100 mg/kg) previo tratamiento con NAD 30 mg/kg a fin de obtener un modelo de diabetes tipo 2 (Guerrero-Analco *et al.*, 2007). Para las pruebas de hipoglucemia y POTG, el control positivo fue la glibenclamida (10 mg/kg), fármaco de segunda generación ampliamente utilizado por la sociedad mexicana para el tratamiento de la DMT2 (Lisson, 1999; Altagracia-Martínez *et al.*, 2007); para la POTS se usó acarbosa. Los valores de glucemia en sangre con respecto al tiempo fueron expresados como porcentaje de variación de glucemia. Este cálculo nos permite ponderar de manera individual los niveles de glucosa en los

distintos tiempos de medición respecto a un valor inicial de glucemia en este caso el tiempo 0 (Sharma *et al.*, 1997).

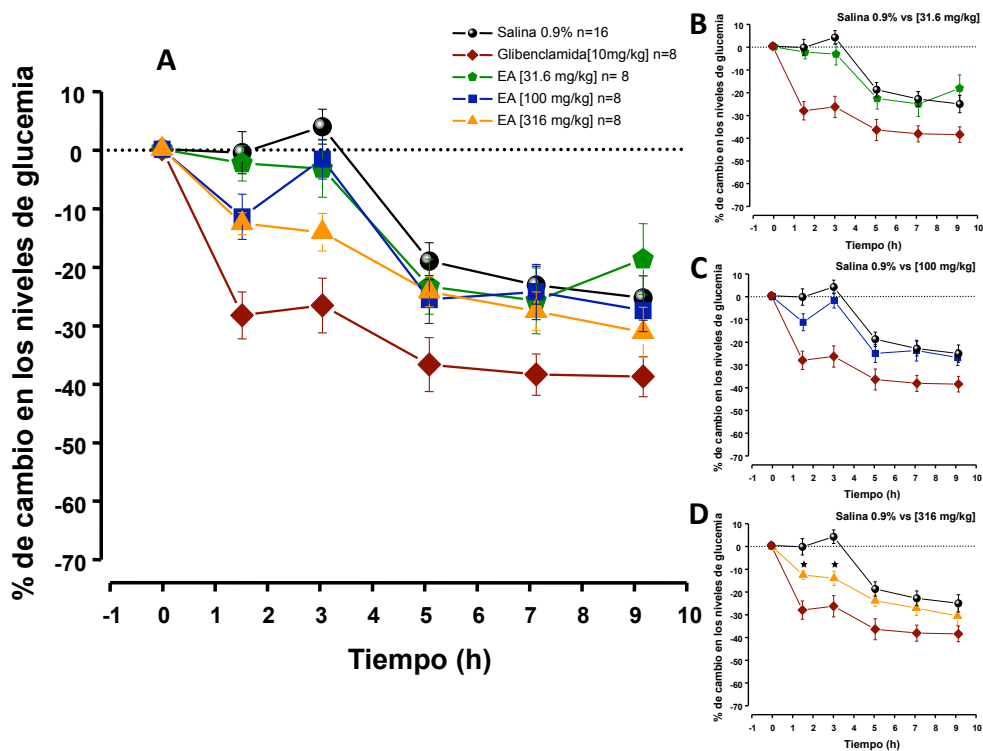
### 1. 2. 1 Efecto agudo hipoglucemiante

#### 1. 2. 1. 1 Efecto agudo hipoglucémico del extracto acuoso (EA)

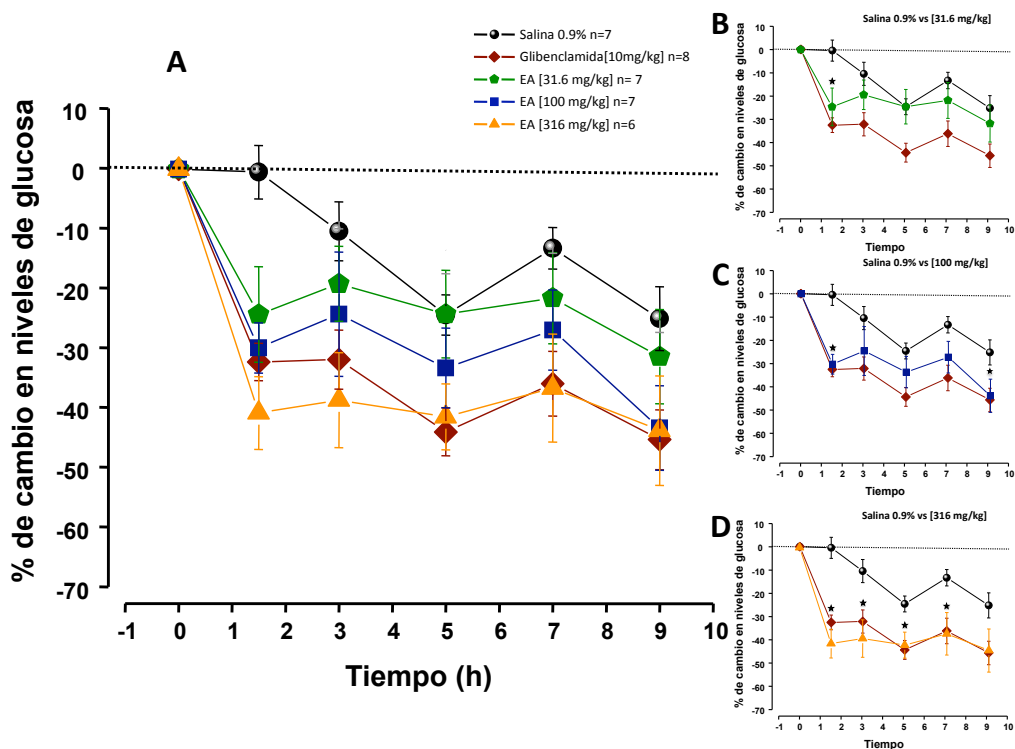
La evaluación del efecto agudo hipoglucemiante potencial del EA en ratones normoglucémicos indicó que a la dosis de 316 mg/kg disminuyen significativamente los niveles de glucosa en comparación con el vehículo (solución salina), a la hora y media (-12.1%  $p=0.04$ ) y a las tres horas de iniciado el tratamiento (-13.6%,  $p=0.001$ , Tabla 1 del apéndice y Figura 8D). Para las dosis de 31.6 y 100 mg/kg no se observó efecto biológico con respecto al vehículo (Tabla 1 del apéndice y Figura 8B y C).

En el caso de los ratones diabéticos, los resultados se muestran en la Tabla 2 del apéndice y Figura 9, donde se puede apreciar un efecto hipoglucemiante a la hora y media después del tratamiento (-24.3%,  $p=0.01$ ), a la dosis de 31.6 mg/kg. No obstante, este efecto no se mantuvo a lo largo del tratamiento. El tratamiento a la dosis de 100 mg/kg de igual manera redujo significativamente los NGS a la hora y media (-29.8%,  $p=0.0001$ ) y a las 9 horas (-43.2%,  $p=0.04$ ). Finalmente, a la dosis de 316 mg/kg los NGS disminuyeron significativamente a partir de primer registro (hora y media, -40.7%); este efecto se mantuvo durante todo el experimento, y fue muy parecido al inducido por la glibenclamida ( $p\leq 0.01$ , Tabla 2 del apéndice y Figura 9D).

Los resultados de esta prueba nos indican que el EA de *Artemisia ludoviciana* posee un efecto agudo hipoglucemiante significativo en comparación a la solución salina; la mejor actividad biológica fue observada en ratones diabéticos con la dosis de 316 mg/kg. La eupatilina, un componente aislado previamente de la planta (Liu y Mabry, 1982; Ruiz-Cancino *et al.*, 1993; Balderas, 2006), puede constituir uno de los principios responsable de este efecto ya que reduce los niveles de glucagón en ratones diabéticos, al mismo tiempo que provoca un incremento en los niveles de adiponectina, hormona implicada en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos; además, en el hígado reduce la actividad de la glucosa-6 fosfatasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa e incrementa la de la glucoquinasa; y en el páncreas incrementa las concentraciones de insulina en las células  $\beta$  (Young-Jin *et al.*, 2008).



**Figura 8.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratones **normoglicémicos**. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs EA (31.6 mg/kg), C) salina vs EA (100 mg/kg), D) salina vs EA (316 mg/kg). \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.



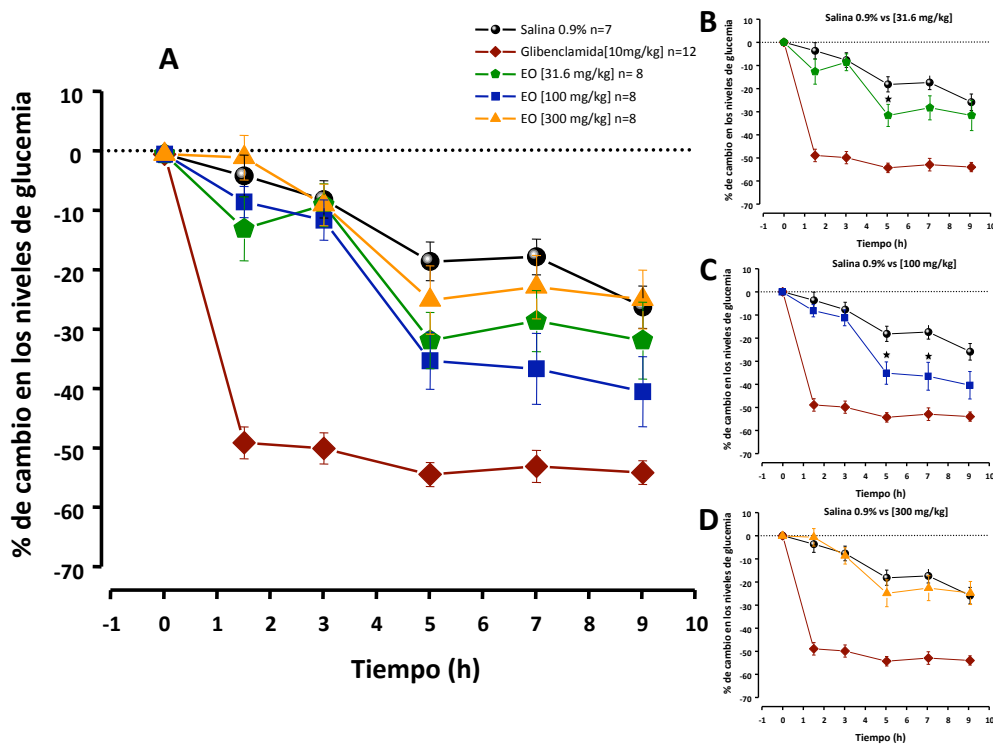
**Figura 9.** Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratones **diabéticos**. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs EA (31.6 mg/kg), C) salina vs EA (100 mg/kg), D) salina vs EA (316 mg/kg). \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.

### 1. 2. 1. 2 Efecto agudo hipoglucémico del extracto orgánico (EO)

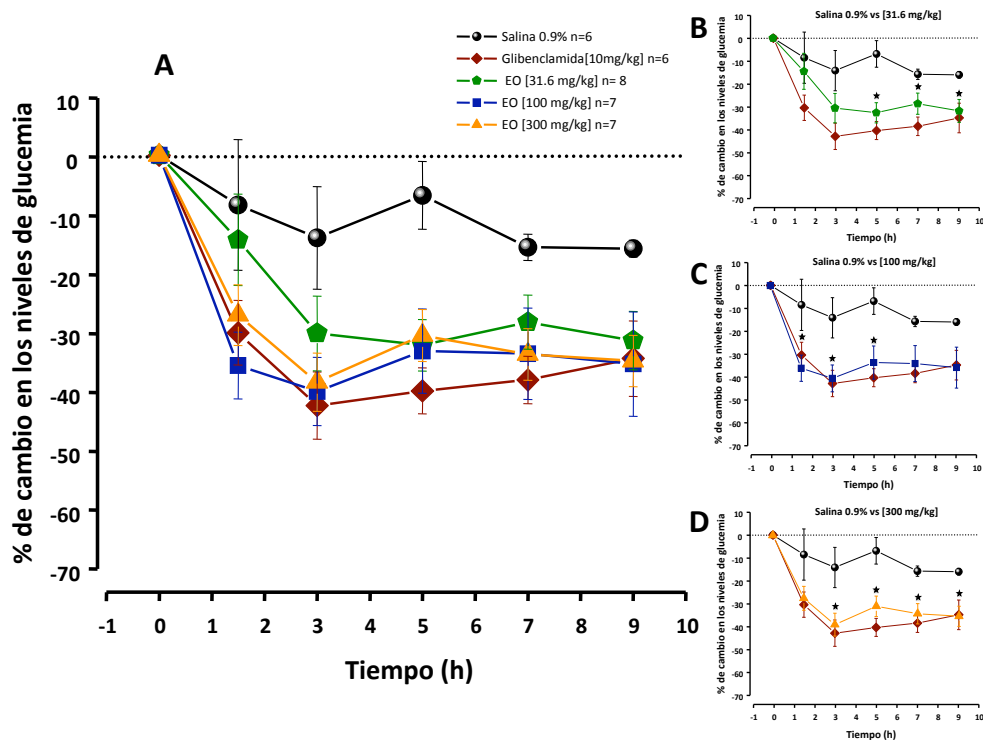
De manera similar se evaluó el efecto agudo hipoglucemiante del EO del estafiate; los resultados se muestran en las Tablas 3, 4 del Apéndice y en las Figuras 10 y 11. En los ratones sanos, la dosis de 31.6 mg/kg provocó una reducción significativa de los NGS a las cinco horas de iniciado el tratamiento con respecto al control (-31.3%,  $p=0.01$ , Tabla 3 del Apéndice, Figura 10B); a la dosis de 100 mg/kg también se observó una reducción significativa en los niveles de glucosa a las cinco (-34.7%,  $p=0.01$ ) y siete horas (-36%,  $p=0.01$ ) después del tratamiento; no obstante, a la dosis mas alta no se cuantificó una reducción en los NGS en los roedores (Tabla 3 del Apéndice y Figura 10D). El fenómeno de hormesis (Mattson, 2008), descrito previamente durante la evaluación de otros extractos vegetales, puede explicar este comportamiento.

En el caso de los ratones diabéticos se observó un mejor efecto hipoglucemiante dosis dependiente (Tabla 4 del Apéndice y Figura 11). A la dosis de 31.6 mg/kg se observó una reducción de los NGS a partir de las tres horas, pero estadísticamente hubo diferencia significativa a partir de las cinco horas del tratamiento (-32.2%,  $p=0.002$ ); el efecto se mantuvo durante todo el tiempo de registro (Tabla 4 del Apéndice y Figura 11B). A la dosis de 100 mg/kg los NGS se redujeron significativamente a partir del primer registro (hora y media, -35.7%,  $p=0.04$ ) conservándose a las tres (-40.1%,  $p=0.04$ ) y hasta las cinco horas (-33.2%,  $p=0.01$ ). Por último, a la dosis de 300 mg/kg, el extracto presentó una actividad muy parecida a la de la glibenclamida, reduciendo los NGS a partir de las tres horas (-38.5%,  $p=0.04$ ), y hasta las 9 horas (-34.9%,  $p=0.001$ ). De los resultados anteriores se desprende que el EO, al igual que el EA, tiene un efecto hipoglucemiante tanto en ratones sanos como diabéticos.

Los resultados del conjunto de evaluaciones conducentes a determinar el potencial hipoglucemiante son congruentes con el uso de la planta para el tratamiento de la diabetes.



**Figura 10.** Efecto hipoglucémico del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en ratones normoglucémicos. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs EA (31.6 mg/kg), C) salina vs EA (100 mg/kg), D) salina vs EA (316 mg/kg). \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.



**Figura 11.** Efecto hipoglucemiante del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en ratones diabéticos. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs EA (31.6 mg/kg), C) salina vs EA (100 mg/kg), D) salina vs EA (316 mg/kg). \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina

### 1. 2. 2 Efecto antihiperoglucémico

Una vez que se comprobó que los preparados del estafiate presentan propiedades hipoglucemiantes se evaluó su efecto antihiperoglucémico potencial, empleando la POTG y la POTS. En estas pruebas de tolerancia se evalúa el efecto de un tratamiento sobre los NGS postprandiales luego de una carga de glucosa o sacarosa administrada por vía oral, tanto en animales normoglucémicos como diabéticos.

#### 1. 2. 2. 1 Efecto del extracto acuoso (EA) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la glucosa

Los resultados del efecto del EA de *A. ludoviciana* en la POTG en ratones normoglucémicos se muestran en la Tabla 5 del Apéndice y en la Figura 12. El EA reduce significativamente el pico postprandial a las tres dosis administradas a los 30 min; este efecto resultó dependiente de la dosis. Estos resultados contrastan con los de Alarcón-Aguilara y colaboradores en 1998.

Los resultados de la evaluación del efecto antihiperoglucémico del EA (Tabla 6 del Apéndice y Figura 13) en ratones diabéticos arrojaron que sólo a la dosis de 316 mg/kg se inhibió el aumento de los NGS inducido por la carga del carbohidrato administrada (51.1%,  $p=0.05$ ).

#### 1. 2. 2. 2 Efecto del extracto orgánico (EO) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la glucosa

Los resultados del efecto del EO sobre los NGS utilizando la POTG sobre roedores normoglucémicos se muestran en la Tabla 7 del Apéndice y Figura 14; de los mismos se desprende que a los 30 min, únicamente el tratamiento a la dosis de 31.6 mg/kg (24.4%  $p= 0.001$ ) el EO reduce el pico postprandial inducido por la carga del carbohidrato. A la dosis de 100 mg/kg se observa una reducción a los 30 min; sin embargo, sólo a los 60 min esta diferencia fue significativa (57%,  $p=0.02$ ) con respecto a la salina. La última dosis ensayada, 316 mg/kg, no generó una inhibición del pico postprandial. Estos resultados parecen sustentar que el extracto orgánico afecta a los ratones normales, a dosis bajas.



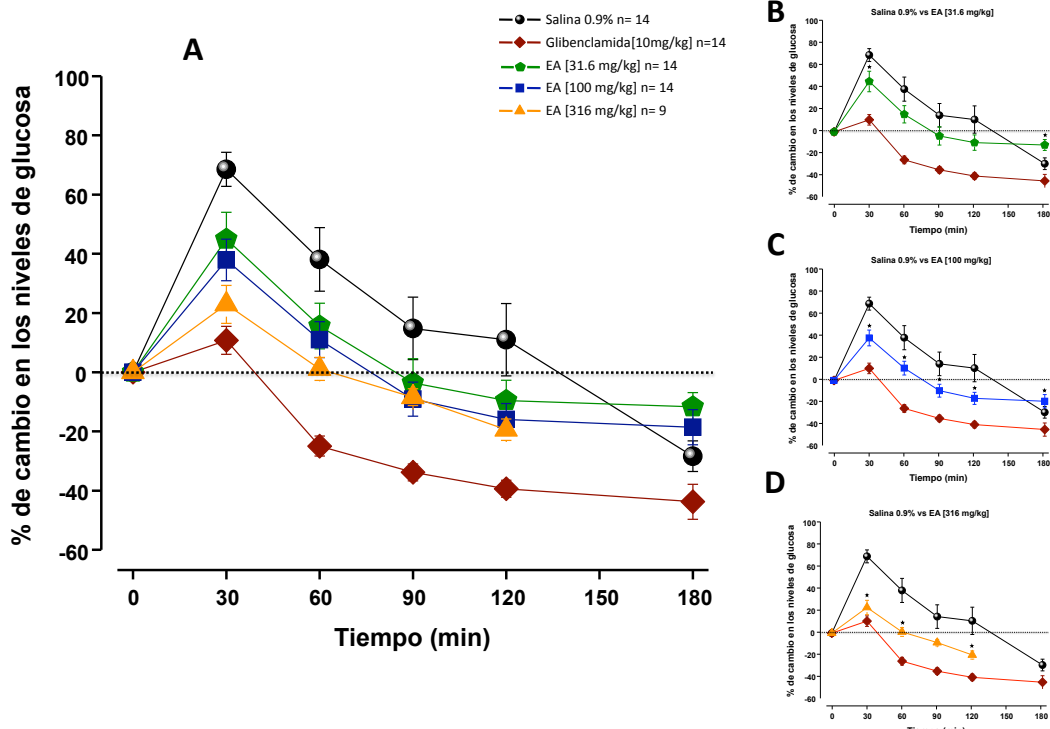


Figura 12. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones **normoglucémicos**. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.

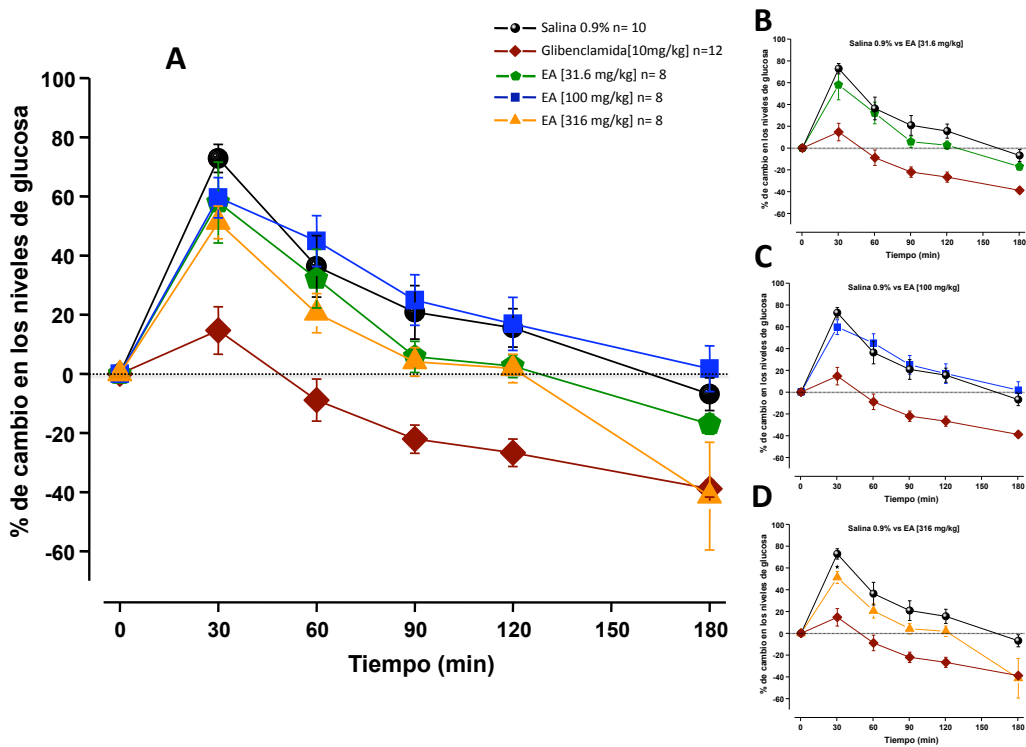


Figura 13. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones **diabéticos**. A) gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

La serie de experimentos en ratones diabéticos (Tabla 8 del Apéndice y Figura 15 A-D) revelaron que a las dosis de 100 y 316 mg/kg el extracto induce un efecto antihiper glucémico significativo, similar al que genera la glibenclamida.

Una posible explicación del efecto antihiper glucémico observado por los extractos de *A. ludoviciana* es la inhibición de los mecanismos encargados de la absorción de la glucosa en el intestino, es decir el bloqueo del cotransportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1, por sus siglas en inglés) y del principal transportador de glucosa el GLUT2. Este efecto podría correlacionarse con el alto contenido de flavonoides de la planta, ya que se ha reportado que varios de estos compuestos inhiben el transporte de la glucosa en el intestino (Kwon *et al.*, 2007), entre ellos la naringenina (Li *et al.*, 2006) que fue aislada de *A. ludoviciana* por Jakupovic y colaboradores (1991). Esta flavanona bloquea al cotransportador SGLT1 en el intestino de conejos e inhibe la reabsorción de la glucosa en riñón (Li *et al.*, 2006). Además, diferentes investigaciones han permitido corroborar que GLUT2 y SGLT1 incrementan en abundancia y actividad en el intestino de ratas diabéticas favoreciendo así el fenómeno de hiperglucemia después de una ingesta de alimentos (Burcelin *et al.*, 1992; Debnam *et al.*, 1995).

Por otro lado, es probable que los preparados de la planta, modifiquen de alguna manera la acción de las incretinas GLP1 y GIP; cabe recordar que estas hormonas son secretadas en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos y favorecen la síntesis, liberación y acción de la insulina (Gautier *et al.*, 2005). Alternativamente, o de manera adicional, los compuestos del estafiate pueden inhibir la actividad de la enzima DPP-IV encargada de la degradación de las incretinas, incrementando sus niveles, y así promover su efecto fisiológico.

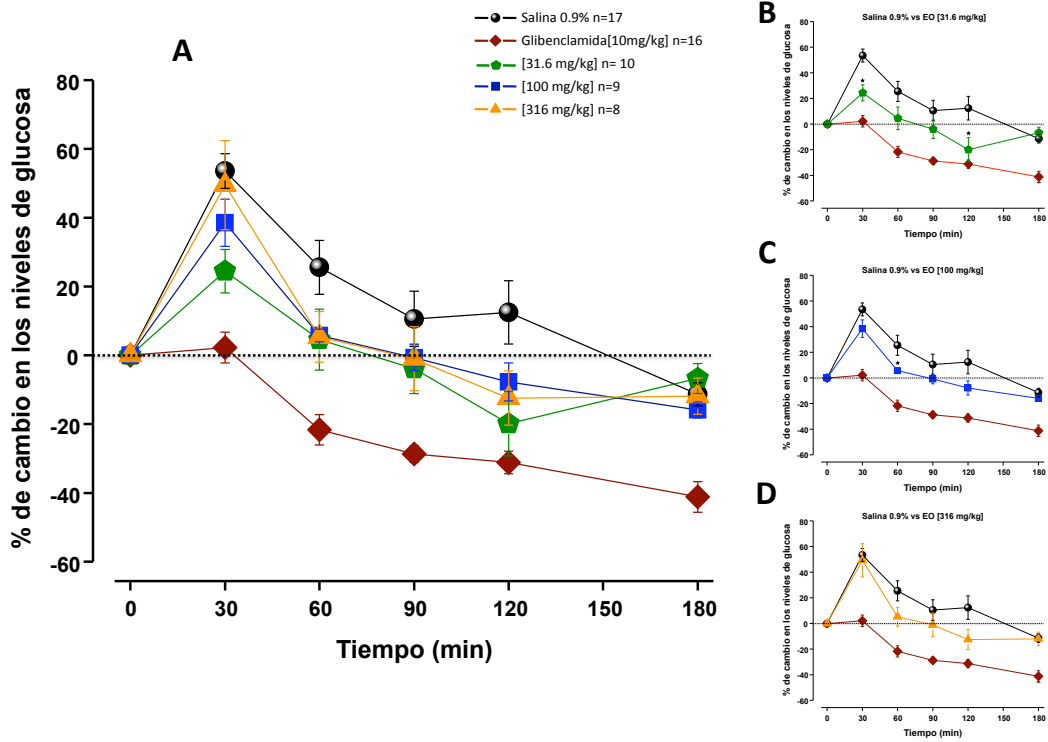


Figura 14. Efecto del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en los NGS en la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones **normoglucémicos**. A) gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

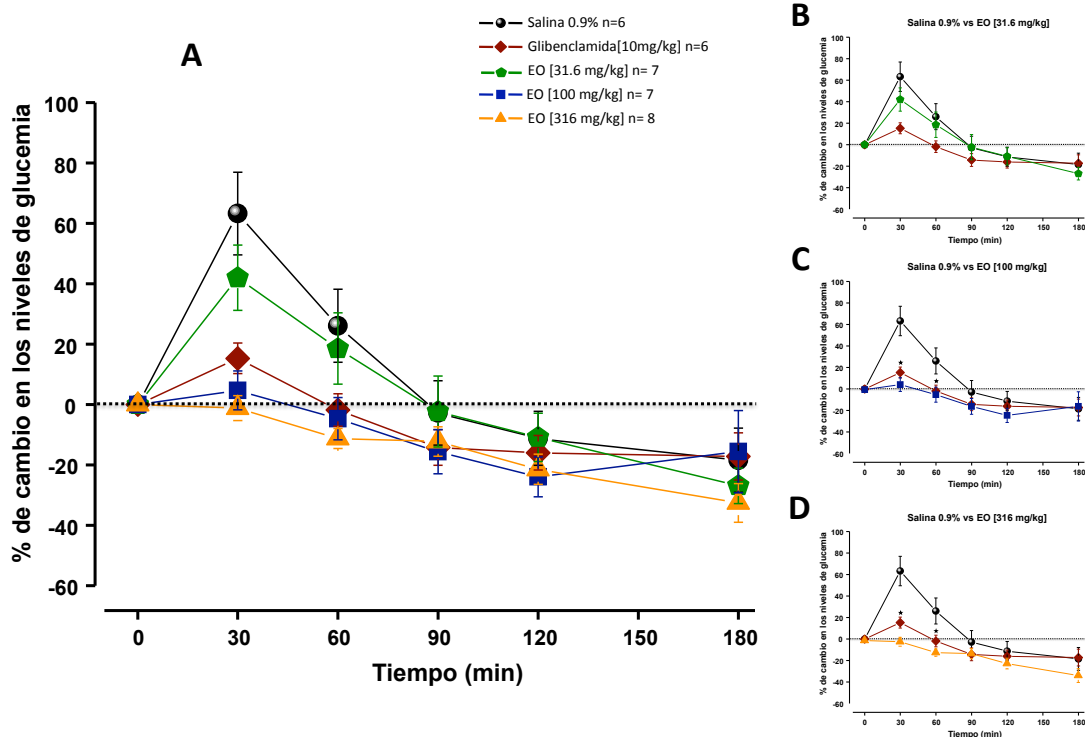


Figura 15. Efecto del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de la tolerancia a la glucosa en ratones **diabéticos**. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.

### 1. 2. 2. 3 Efecto del extracto acuoso (EA) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa

Los resultados del efecto del EA sobre los NGS utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa en roedores sanos y diabéticos se muestran en las Tablas 9, 10 del Apéndice y en las Figuras 16 y 17 respectivamente.

En los ratones sanos el EA de la planta presentó una actividad antihiperoglucémica importante a la dosis de 100 mg/kg (22.8%,  $p=0.05$ ) ya que inhibió significativamente la generación del pico postprandial inducido por la carga de sacarosa (22.8%,  $p=0.05$ , Tabla 9 del Apéndice, Figura 16C). A las dosis 31.6 y 316 mg/kg no hubo diferencia significativa con respecto a la salina (Tabla 9 del Apéndice y Figura 16). El menor efecto observado a la dosis de 316 mg/kg del EA puede deberse a diversas causas incluyendo un fenómeno hormésis.

Los resultados de la evaluación del efecto antihiperoglucémico del EA en la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos arrojan que sólo a la dosis de 31.6 mg/kg (51.6%,  $p=0.005$ ) se inhibe el pico postprandial inducido por la carga de sacarosa administrada (Tabla 10 del Apéndice, Figura 17B).

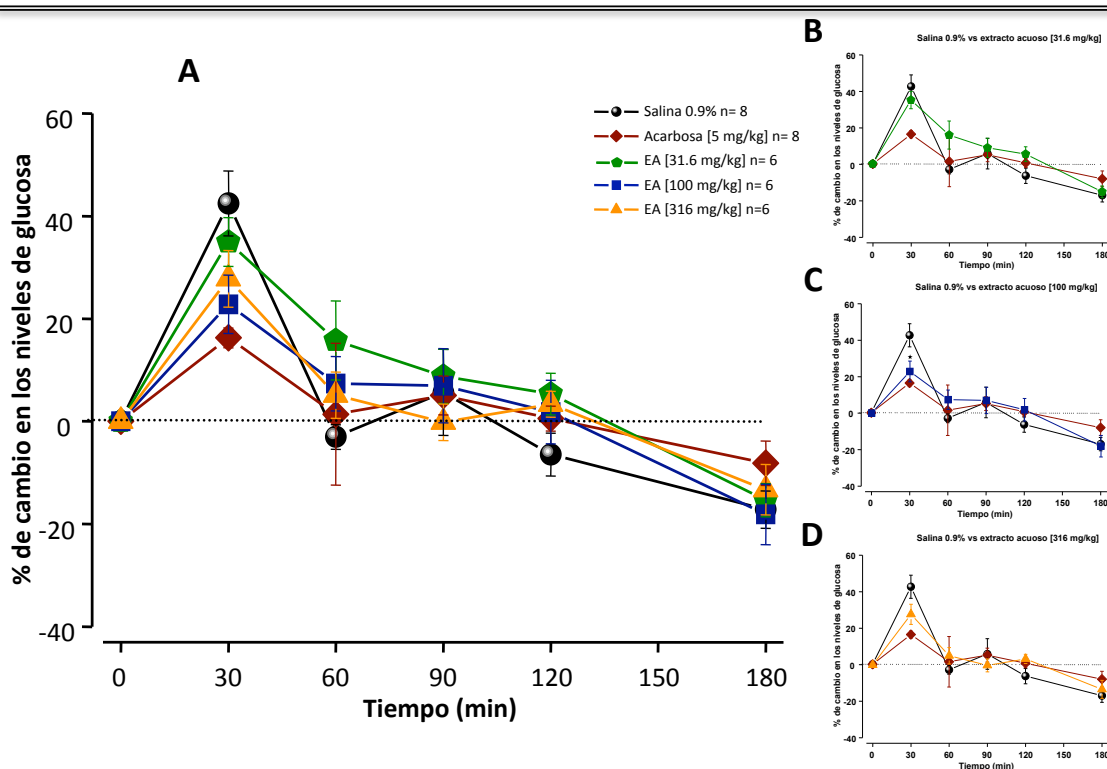
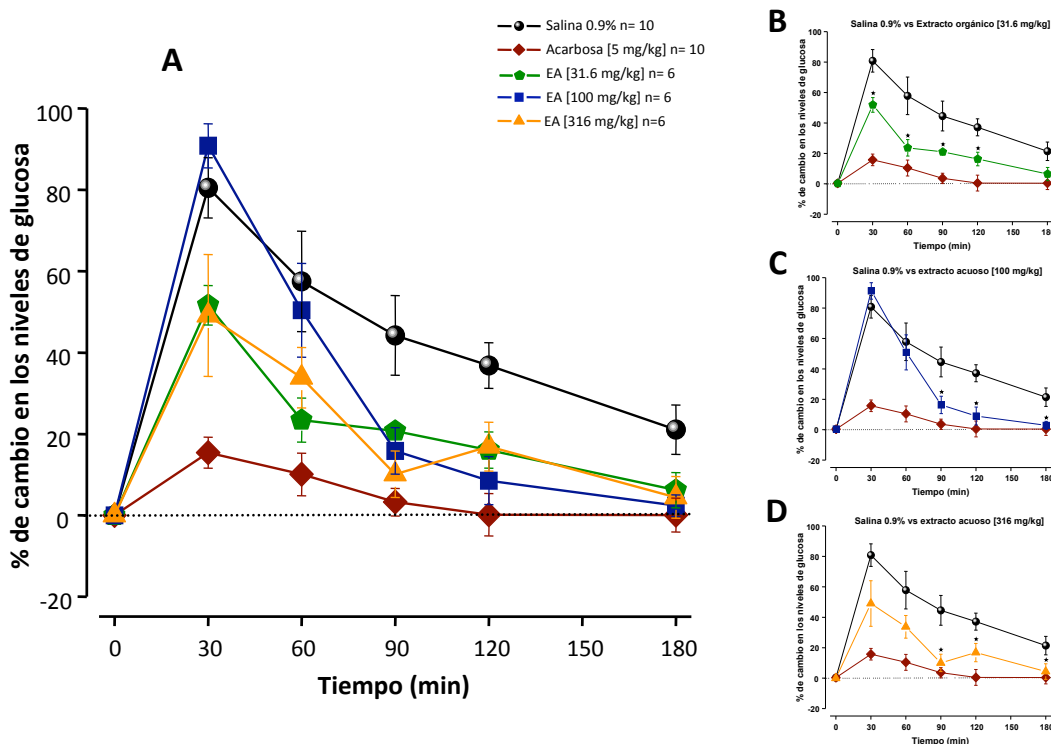


Figura 16. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos. A) gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.



**Figura 17.** Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

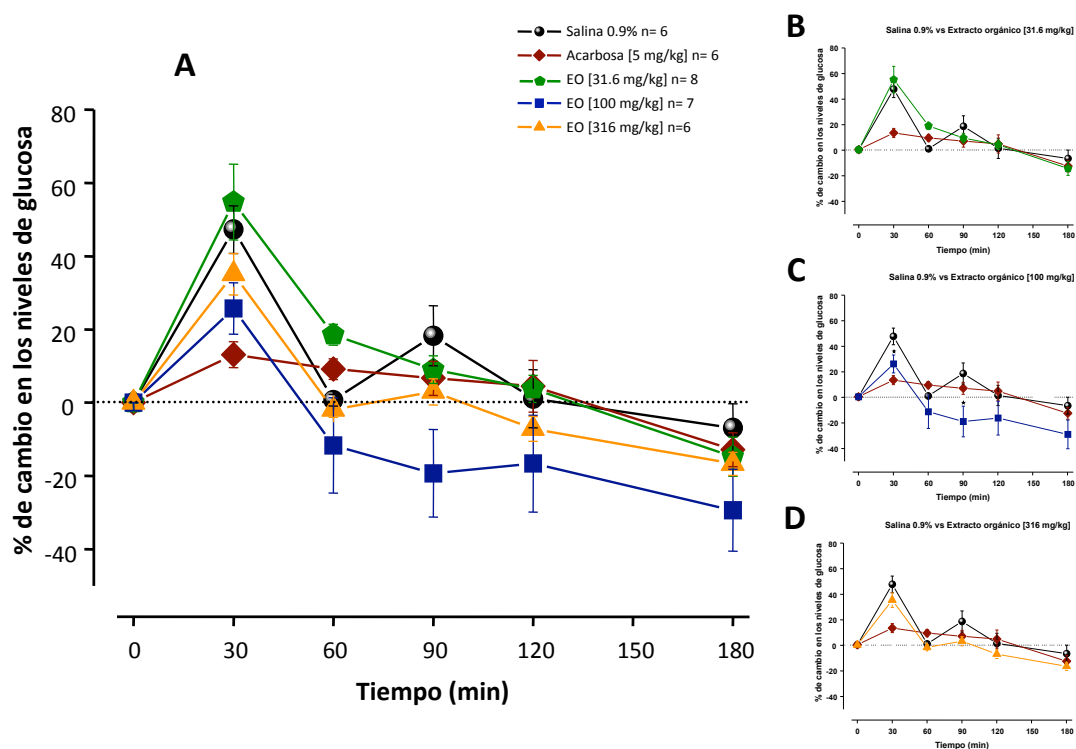
#### 1. 2. 2. 4 Efecto del extracto orgánico (EO) sobre los niveles de glucosa sanguínea utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa

El efecto del EO del estafiate en ratones normoglucémicos se muestran en la Tabla 11 del Apéndice y Figura 18. De los mismos se desprende que el EO presenta un efecto antihiperoglucémico importante, aunque no fue dependiente de la dosis. Así, el tratamiento a la dosis de 31.6 mg/kg no disminuyó los niveles de glucosa postprandial; no obstante, a la dosis de 100 mg/kg se observó un decremento significativo del pico postprandial a los 30 min (22%,  $p=0.02$ ), comportamiento que se mantuvo a lo largo del experimento (Tabla 11 del Apéndice y Figura 18C). Por último, a los 30 min, la dosis de 316 mg/kg provocó una pequeña reducción de los niveles del carbohidrato, pero no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

En ratones diabéticos el EO de *A. ludoviciana* presentó una actividad antihiperoglucémica significativa importante, ya que las tres dosis evaluadas inhibieron a los 30 min del tratamiento el pico postprandial inducido por la sacarosa, los resultados se aprecian en la Tabla 12 del Apéndice y en la Figura 19. Por otro lado, el efecto observado no fue dependiente de la dosis.

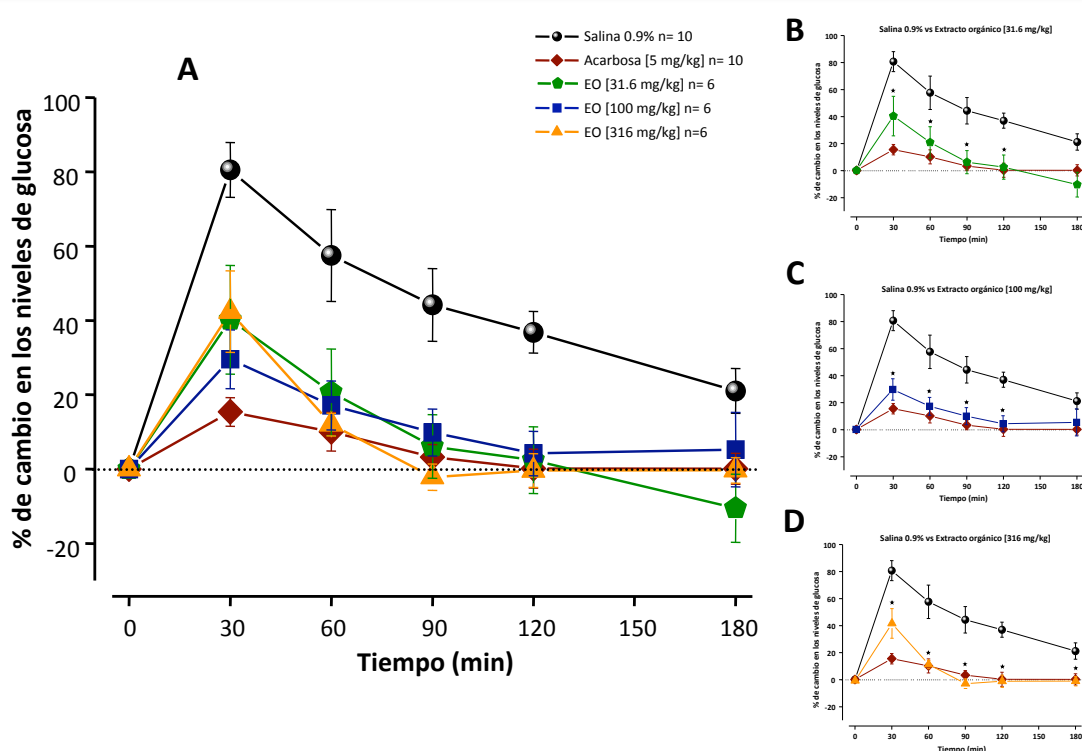
Una explicación viable al efecto biológico demostrado para los preparados del estafiate en esta última serie de experimentos es la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas, mismas que se encargan de la degradación de los polisacáridos a monosacáridos para favorecer la absorción de la glucosa en el intestino (Krasikov *et al.*, 2001). La búsqueda de nuevos inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas representa una importante estrategia para el tratamiento de los pacientes con DMT2.

En relación a estos resultados, cabe destacar que en un estudio de la especie *Artemisia capillaris*, se encontró que el extracto metanólico (100  $\mu$ g/ml) de las partes áreas de la planta inhibió fuertemente la actividad de las maltasas (57%) y de las  $\alpha$ -glucosidasas (Lee y Kim, 2007). Ambas plantas tienen en común la presencia de flavonoides, alguno de los cuales presentan propiedades inhibitorias de las  $\alpha$ -glucosidasas; por lo tanto, es factible que los flavonoides de *A. ludoviciana* sean antihiperoglucémicos. Esta última afirmación deberá comprobarse experimentalmente.



**Figura 18.** Efecto del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones normoglucémicos. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.02$  en comparación a la salina.

El mejor efecto observado en la inhibición del pico postprandial después de la carga de sacarosa se presentó con el EO sobre ratones diabéticos. Por lo tanto, es probable que algunos de los componentes del EO sean inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. El trabajo realizado por Jong-Sang y colaboradores en el 2000 demostró que el flavonoide luteolina, aislado de *A. ludoviciana* var. *ludoviciana* (Liu y Mabry, 1982), es un inhibidor de las  $\alpha$ -glucosidasas y  $\alpha$ -amilasas. Por lo anterior, es probable que el efecto antihiper glucémico observado en estos ensayos corresponda en parte a la luteolina.



**Figura 19.** Efecto del extracto orgánico (EO) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de la tolerancia a la sacarosa en ratones diabéticos. A) Gráfica general, B) salina 0.9% vs 31.6 mg/kg, C) salina vs 100 mg/kg, D) salina vs 316 mg/kg. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

## 2 Pruebas de Identidad

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. Ello resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales, en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis. El control de calidad de las drogas vegetales y derivados, pretende garantizar su identidad, pureza

(ausencia de contaminantes, falsificaciones o adulteraciones) y contenido en principios activo o marcadores (Cañigüeral y Vila, 2005). Las exigencias concernientes al control de la calidad de las drogas vegetales, así como los métodos a utilizar, se recogen principalmente en las farmacopeas y si estos métodos no existiesen es necesario establecerlos. Por ello, en el presente trabajo se inició con el desarrollo de las pruebas de identidad química mediante el establecimiento de los componentes volátiles de la *A. ludoviciana* y los perfiles cromatográficos de los mismos. En estudios posteriores se establecerán los marcadores presentes en los extractos orgánicos e infusión de la planta.

## 2. 1 Establecimiento de los componentes volátiles de *A. ludoviciana* Nutt.

La última parte de este trabajo fue enfocado a determinar los constituyentes volátiles de *Artemisia ludoviciana*, como parte de las actividades conducentes a determinar los parámetros de calidad de la droga cruda de la planta. Para ello se aplicó la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM). En primer lugar, se determinó la composición química del aceite esencial del estafiate obtenido por hidrodestilación, de manera adicional se realizó la identificación de los componentes volátiles de la planta, mediante la técnica de micro extracción en fase gaseosa (HS-SPME) utilizando tres tipos de fibras (fase sólida) de diferente polaridad, una de divinilbenceno/carboxeno/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, fibra gris); la segunda de polidimetilsiloxano (PDMS, fibra roja), y la última de carboxeno/polidimetilsiloxano, (CAR/PDMS, fibra negra). De esta forma se garantiza la detección de la mayor cantidad posible de los productos volátiles presentes en los productos naturales. En todos los casos el subsecuente análisis de cada muestra se realizó aplicando a la CG-EM.

En el aceite esencial de *A. ludoviciana* obtenido por destilación se lograron identificar 47 compuestos, correspondientes al 92 % de los componentes totales (Figura 20 y Tabla 4). Del total de compuestos sólo 21 coinciden con los reportes previos (Blust y Hopkins. 1987; Blagojevic *et al.*, 2006; Govindaraj *et al.*, 2008; Lopes-Lutz *et al.*, 2008) no obstante, se identificaron 18 nuevos metabolitos diferentes. Los productos mayoritarios del presente estudio, fueron una eudesmanólida identificada como eudesma-4,11-dien-2-ol (11.2 %), cariofil-4(14),8(15)-dien-5-ol (11.2%),  $\alpha$ -tujona (8%),  $\beta$ -cariofileno (6.9%), acetato de 5-canfenilo (6.8%) y alcanfor (4.7 %). En comparación con los estudios previamente reportados (Blust y Hopkins. 1987;

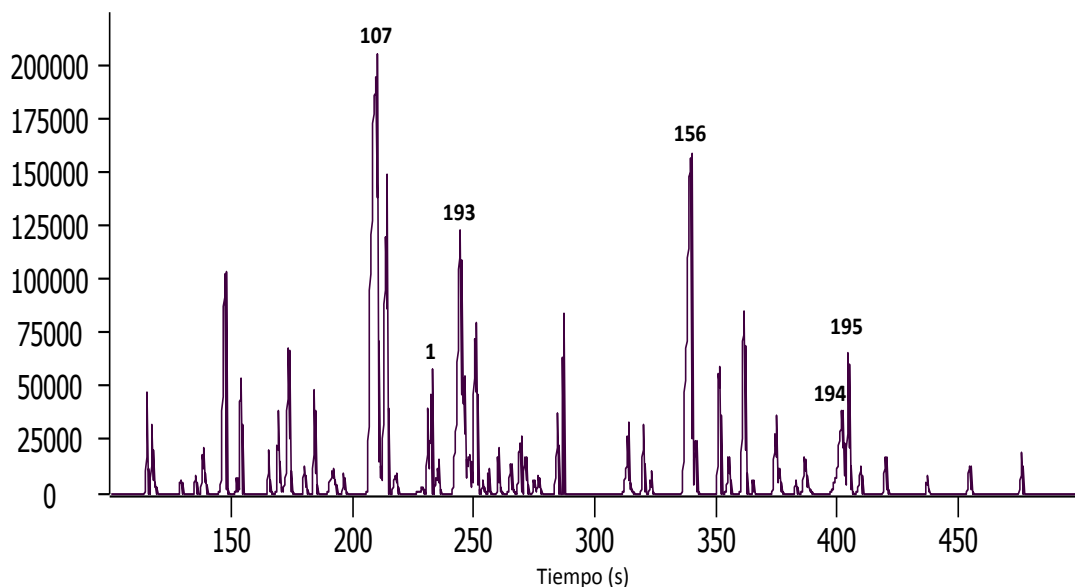


Blagojevica *et al.*, 2006; Govindaraj *et al.*, 2008; Lopes-Lutz *et al.*, 2008), sólo tres componentes mayoritarios son comunes: la  $\alpha$ -tujona, el  $\beta$ -cariofileno y el alcanfor. Como se indicó en la sección de antecedentes los monoterpenoides 1,8-cineol (5.8 a 28.9 %), el alcanfor (1.4 a 16.8 %), la  $\beta$ -tujona (3.4 a 13.5 %), el  $\alpha$ -pineno (1.6 a 5.9 %), el sabineno (0.6 a 13.7 %), el campfeno (0.1 a 6.5 %) y la  $\alpha$ -tujona (1.2 a 11.3), así como los sesquiterpenos, davanona (11.5 %),  $\beta$ -cariofileno (2.3 a 5.4) y óxido de cariofileno (0.8 a 6.5 %), son los compuestos principales de las esencia de especies recolectadas en Canadá, Croacia, y Serbia (Blust y Hopkins. 1987; Blagojevica *et al.*, 2006; Govindaraj *et al.*, 2008; Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Por lo tanto la especie que crece en México presenta una composición cualitativa similar a la de las especies que crecen en otras regiones, sin embargo el contenido cuantitativo sí muestra diferencia, misma que puede atribuirse a variaciones ontogénicas, climáticas y geográficas. A la fecha no se ha descrito ningún estudio conducente a establecer la variación del contenido de metabolitos de *A. ludoviciana* a lo largo de un ciclo vegetativo, lo cual queda como una perspectiva del presente trabajo.

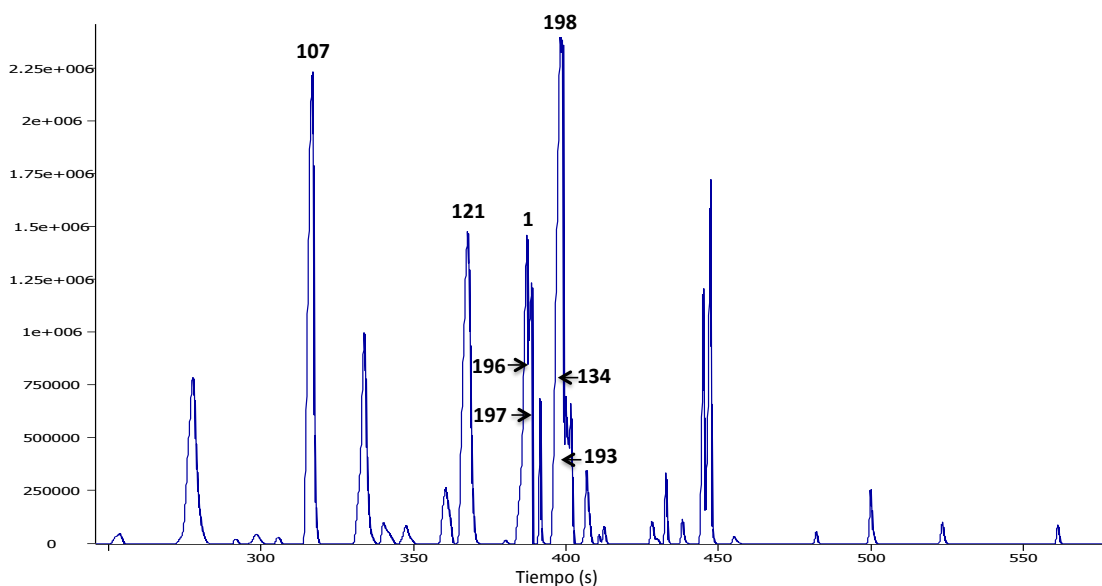
Cabe mencionar que a pesar del alto contenido de  $\alpha$ -tujona (8.0 %) encontrado en el aceite, no existen reportes de efectos tóxicos de la planta. La  $\alpha$ -tujona es un monoterpeno que se caracteriza por tener actividad en el sistema nervioso central, generando convulsiones en el organismo (Millet *et al.*, 1981; Emert *et al.*, 2004)

Al comparar los resultados generados sobre la composición del aceite esencial del estafiate, se observan similitudes con los encontrados para otras especies de *Artemisia*. Así, en *Artemisia icana* los principales metabolitos del aceite esencial son alcanfor (19.0%), borneol (18.9%), 1,8-cineol (14.5%), acetato de bornilo (7.8%), campfeno (4.9%), and  $\alpha$ -tujona (4.8%, Cetin *et al.*, 2009). En *A. cana* también predominan 1,8-cineol (20.8–11.0%) y el alcanfor (55.2–37.4%) (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Para *A. herba-alba* se encontró que la  $\beta$ -tujona (35.66%), el alcanfor (34.94%), 1,8-cineol (7.42%) y la  $\alpha$ -tujona (4.12%, Aghaei *et al.*, 2011) son predominantes. *A. sieberi* presenta un alto contenidos de linalol (42%), timol (25.1%) y  $\alpha$ -terpineol (10%, Khosravi *et al.*, 2011), mientras que *A. absinthium* contiene predominantemente  $\beta$ -pineno (23.8%) y  $\beta$ -tujona (18.6%, Rezaeinodehi y Khangholi, 2008). *A. biennis*, presenta alcanfor (24.6%), artemisia cetona (11.4%) y  $\alpha$ -pineno (10.2%, Nematollahi *et al.*, 2006) y *A. dracuncululus*,  $\alpha$ -pineno (0.7%), mirceno (1.2%), limoneno (3.5%) y z-( $\beta$ -ocimeno (12.7%, Verma *et al.*, 2010). Por último, *A. frigida* contiene  $\alpha$ -pineno (0.2-7.8%), campfeno (1.9-5.8%), 1,8-cineol (8.9-33.8%) y alcanfor (6.7-40.0%, Korolyuk y

Tkachev, 2010). Como se desprende de la información anterior el alcanfor, 1,8-cineol,  $\alpha$ -tujona y campfeno son constantes, y también se identificaron en el presente trabajo.



**Figura 20.** Cromatograma de gases del aceite esencial de las partes aéreas de *A. ludoviciana*. Asignación de picos: (107) 1,8-cineol, (1) alcanfor, (193) acetato de 5-canfenilo, (156)  $\beta$ -cariofileno, (194) cariofil-4(14),8(15)-dien-5-ol, (195) eudesma-4,11-dien-2-ol.



**Figura 21.** Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (DVB/CAR/PDMS, fibra gris) de las partes aéreas de *A. ludoviciana*. Asignación de picos: (107) 1,8-cineol, (121)  $\beta$ -tujona, (1) alcanfor, (196) sabinol, (197) *cis*-pinocarveol, (198) (+) alcanfor, (134) mirtenol, (193) acetato de 5-canfenilo.

Tabla 4. Composición química del aceite esencial de *A. ludoviciana*.

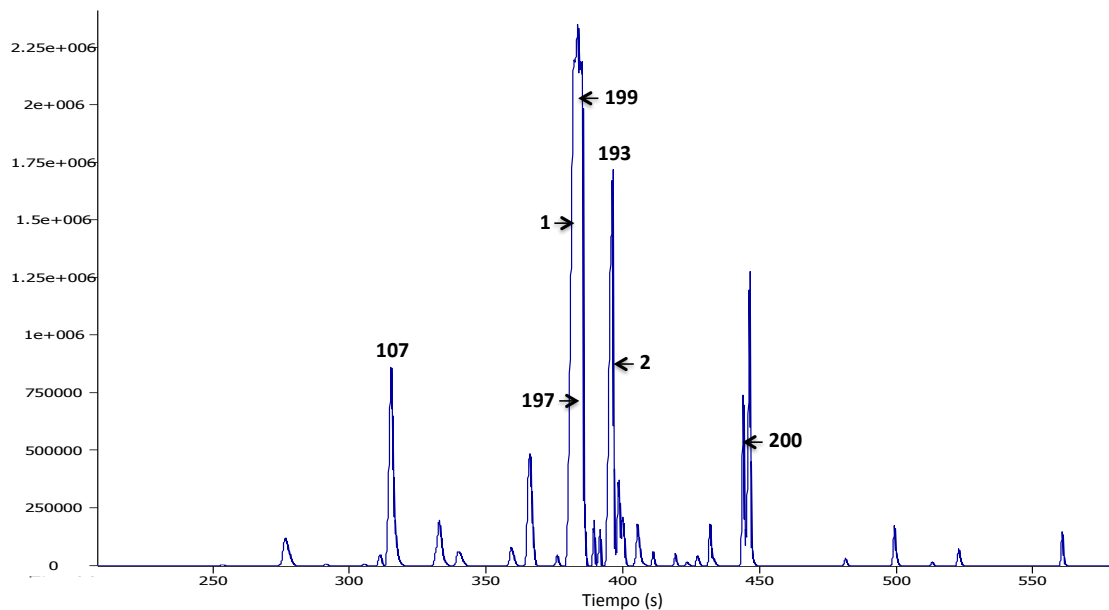
Compuesto	IR	Área (%)	Método de identificación
Santolin-trieno	904	0.5	IR, EM
1-(2-furanil)-Etanona	909	0.3	IR, EM
2-Ciclohexenona	936	0.1	IR, EM
Campfeno	949	0.2	IR, EM
5,5-Dimetil-2(5H)-furanona	957	0.3	IR, EM
Artemisiol	976	2.9	IR, EM
Metil heptanona	987	0.2	IR, EM
2,3-Deshidro-1,8-cineol	991	0.6	IR, EM
4-Careno	1017	0.3	IR, EM
<i>p</i> -Cimeno	1025	0.3	IR, EM
1,8-Cineol	1035	3.0	IR, EM
Bencen-acetaldehído	1050	0.4	IR, EM
$\gamma$ -Terpineno	1059	0.6	IR, EM
<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	1086	0.2	IR, EM
Nonanal	1114	2.9	IR, EM
<b><math>\alpha</math>-Tujona</b>	1117	<b>8.0</b>	IR, EM
$\beta$ -Tujona	1126	2.4	IR, EM
Deshidrosabinona	1135	0.2	IR, EM
<b>(-)-Alcanfor</b>	1159	<b>4.7</b>	IR, EM
Acetato de (-)-trans-pinocarvilo	1164	1.9	IR, EM
(+)-Alcanfor	1166	3.2	IR, EM
trans-Pinocarveol	1168	0.8	IR, EM
Sabinona	1172	t	IR, EM
Isopinocarvona	1175	0.2	IR, EM
<b>Acetato de 5-camfenilo</b>	1193	<b>6.8</b>	IR, EM
Lavandulol	1194	2.7	IR, EM
Borneol	1195	3.5	IR, EM
4-Terpineol	1197	0.4	IR, EM
(-)-Mirtenal	1198	1.6	IR, EM
Salicilato de metilo	1204	0.1	IR, EM
$\alpha$ -Terpineol	1209	0.8	IR, EM
<i>cis</i> -Verbenona	1222	0.2	IR, EM
Cuminal	1253	0.5	IR, EM
Carvona	1255	0.2	IR, EM
2-Metilhexa-1,3,5-trieno	1259	0.5	IR, EM
1,2-Dipropenil-ciclobutano	1268	t	IR, EM
Acetato de bornilo	1291	0.7	IR, EM
(-)-Acetato de mirtenilo	1297	0.8	IR, EM
Eugenol	1363	1.0	IR, EM
Copaeno	1378	0.7	IR, EM
<b><math>\beta</math>-Cariofileno</b>	1429	<b>6.9</b>	IR, EM
$\beta$ -Gurjuneno	1433	0.2	IR, EM
$\alpha$ -Cariofileno	1460	0.8	IR, EM
Germacreno D	1487	3.4	IR, EM
$\alpha$ -Muuroleno	1497	0.2	IR, EM
$\alpha$ -Copaeno	1523	1.2	IR, EM
$\alpha$ -Calacoreno	1545	0.2	IR, EM
Oxido de cariofileno	1555	1.0	IR, EM
<b>Cariofil-4(14),8(15)-dien-5-ol</b>	1596	<b>11.1</b>	IR, EM
<b>Eudesma-4,11-dien-2-ol</b>	1597	<b>11.2</b>	IR, EM
Cadina-1(10),4-dien-8 $\alpha$ -ol	1651	1.1	IR, EM
Total		92.0	
Aceite obtenido (% w/w-material seco)		0.2	

En negritas los componentes mayoritarios. IR: Índice de retención de Kováts, en una columna DB-5. EM: Identificación de los espectros de masas con los reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo (NIST). t: trazas (el área bajo la curva es menor a 0.1%).

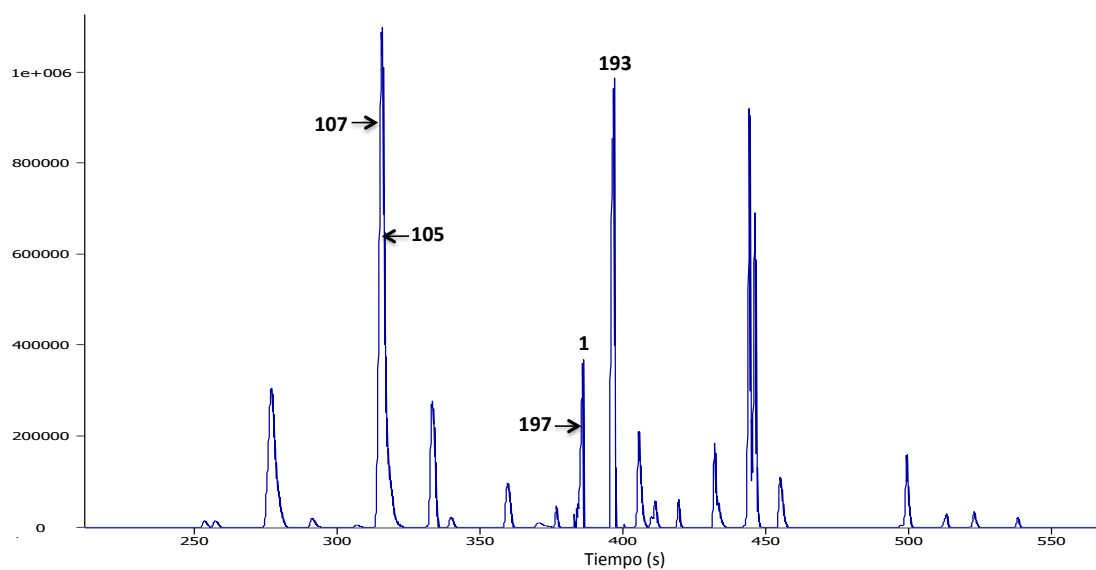
El estudio de los componentes separados mediante el proceso de microextracción utilizando las fibras gris, roja y negra como fases sólidas se identificaron 37, 30 y 31 compuestos diferentes, correspondientes al 99.7%, 95.9 % y 95.6 %, respectivamente (Figuras 21, 22, 23 y Tabla 5).

Entre los componentes volátiles identificados de *A. ludoviciana* más afines a la fibra gris (Tabla 5), se encuentran *cis*- pinocarveol (13%), sabinol (12.8%), (-) alcanfor (12.2%), 1,8-cineol (9.6%), acetato de 5-canfenilo (6%), mirtenol (5.9%), (+) alcanfor (5.7%) y  $\beta$ -tujona (5.6%). Con la fibra roja los analitos de mejor afinidad fueron (-) alcanfor (21.2%), (-) borneol (12.3%), *cis*-pinocarveol (15%), *trans*-verbenol (8.2%) y 1, 8-cineol (7.2%, Tabla 5). Por último, los compuestos identificados con la fibra negra fueron 1,8-cineol (21.6%), *p*-cimeno (12.3%), cimen-8-ol (9.5%), (+) alcanfor (8.6%), 3-carene-10-al (7.5 %), el *cis*-pinocarveol (6.7%) y el acetato de 5-canfenilo (6.6%, Tabla 5).

Como se desprende de los resultados de las Tablas 4 y 5, los resultados de los dos grupos de análisis resultaron complementarios, ya que aunque la mayoría de los constituyentes se registraron con las dos pruebas, fue posible detectar algunos metabolitos diferentes en cada una. Esto refrenda la necesidad de utilizar la extracción en fase sólida a la hora de establecer los componentes volátiles de las plantas.



**Figura 22.** Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (PDMS, fibra roja) de las partes aéreas de *A. ludoviciana*. Asignación de picos: (107) 1, 8-cineol, (1) alcanfor, (199) *trans*-verbenol, (193) acetato de 5-canfenilo, (2) borneol, (200) acetato de mirtenilo.



**Figura 23.** Cromatograma de gases mediante la microextracción en fase sólida (CAR/PDMS, fibra negra) de las partes aéreas de *A. ludoviciana*. Asignación de picos: (107) 1, 8-cineol, (105) *p*-cimeno, (1) alcanfor, (197) *cis*-pinocarveol, (193) acetato de 5-canfenilo.

**Tabla 5.** Compuestos volátiles de *A. ludoviciana* identificados por CG-EM tras su microextracción en fase sólida utilizando tres fibras de distinta polaridad.

Compuesto	IR	Área %			Método de identificación
		Gris (DVB/CAR/PDMS)	Negra (CAR/PDMS)	Roja (PDMS)	
Campfeno	955	0.3	0.2	t	IR, EM
Artemiseol	981	3.4	3.5	1.6	IR, EM
$\alpha$ -Fellandreno	1008	0.2	-	-	IR, EM
$\alpha$ -Terpineno	1021	0.2	1.0	t	IR, EM
<b><math>p</math>-Cimeno</b>	1032	-	<b>12.3</b>	0.5	IR, EM
Limoneno	1040	4.9	-	-	IR, EM
<b>1,8-Cineol</b>	1041	<b>9.6</b>	<b>21.6</b>	<b>7.2</b>	IR, EM
$\gamma$ -Terpineno	1069	0.3	0.1	0.2	IR, EM
Artemisia cetona	1073	2.9	2.2	1.8	IR, EM
$\alpha$ -Pinoeno	1084	-	0.2	-	IR, EM
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	1084	0.3	-	0.9	IR, EM
Terpinoleno	1098	0.3	-	-	IR, EM
$\alpha$ -Tujona	1122	1.2	0.8	1.0	IR, EM
<b><math>\beta</math>-Tujona</b>	1136	<b>5.6</b>	-	3.9	IR, EM
<b>Cimen-8-ol</b>	1166	-	<b>9.5</b>	-	IR, EM
<b>(-)-Alcanfor</b>	1169	<b>12.2</b>	-	<b>21.2</b>	IR, EM
<b>3-carene-10-al</b>	1170	-	<b>7.5</b>	-	IR, EM
<b>Sabinol</b>	1170	<b>12.8</b>	-	-	IR, EM
<b>cis- Pinocarveol</b>	1171	<b>13.0</b>	<b>6.7</b>	<b>15.0</b>	IR, EM
<i>trans</i> -Verbenol	1166	-	-	<b>8.2</b>	IR, EM
<b>(+)-Alcanfor</b>	1173	<b>5.7</b>	<b>8.6</b>	-	IR, EM
Sabina cetona	1173	-	0.2	-	IR, EM
Verbenona	1174	3.6	-	-	IR, EM
Isopinocarvona	1179	0.6	1.0	0.7	IR, EM
<b>Mirtenol</b>	1191	<b>5.9</b>	-	-	IR, EM
<b>Acetato de 5-camfenilo</b>	1191	<b>6.0</b>	<b>6.6</b>	<b>5.5</b>	IR, EM
<b>Borneol</b>	1193	1.9	4.1	<b>12.3</b>	IR, EM
4-Terpinenol	1196	0.4	-	1.4	IR, EM
$\alpha$ -Tujenal	1198	0.6	0.5	0.9	IR, EM
(-)-Mirtenal	1198	0.6	0.9	1.4	IR, EM
$\alpha$ -Terpineol	1206	-	0.9	1.0	IR, EM
Mirtenal	1209	0.7	0.9	-	IR, EM
Carveol	1219	0.1	0.1	-	IR, EM
<i>cis</i> -Verbenona	1223	0.2	0.2	0.3	IR, EM
Formato de bornilo	1238	-	0.2	0.3	IR, EM
Cuminal	1258	0.3	-	0.4	IR, EM
Acetato de verbenilo	1269	0.6	0.9	-	IR, EM
Piperitona	1270	0.6	-	-	IR, EM
Acetato de bornilo	1298	1.5	2.5	2.7	IR, EM
<b>(-)-Acetato de mirtenilo</b>	1303	2.5	2.2	<b>5.5</b>	IR, EM
Carvacrol	1321	0.2	0.8	-	IR, EM
Ylangeno	1383	0.1	-	0.2	IR, EM
Aromadendreno	1428	0.4	-	0.8	IR, EM
Cariofileno	1428	-	0.7	-	IR, EM
$\alpha$ -Carifileno	1464	-	0.3	t	IR, EM
Curcumeno	1491	0.2	0.2	0.4	IR, EM
Oxido de cariofileno	1593	0.2	-	0.6	IR, EM
Total		99.7	95.6	95.9	

En negritas los compuestos de mayor afinidad en las diferentes fibras. IR: Índice de retención de Kováts en una columna DB-5. EM: Identificación de los espectros de masas con los reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo (NIST), t: trazas (el área bajo la curva es menor a 0.1%).

## VII CONCLUSIONES

La revisión de numerosas fuentes bibliográficas permitió documentar que el uso de esta especie ha perdurado en la cultura mexicana por más de cuatro siglos, y su presencia en los mercados populares contemporáneos son el mejor testimonio de su eficacia. Muchos de sus usos se han mantenido a lo largo de este tiempo, principalmente aquellos para el alivio de padecimientos gastrointestinales. Otros, son de incorporación reciente; como el antidiabético que fue descrito por Alarcón-Aguilar en 1998. Este uso surge posiblemente por la necesidad de nuevas alternativas para el alivio de esta terrible enfermedad.

Los estudios de toxicidad aguda de varios preparados de *A. ludoviciana* (EA y EO) indicaron que la planta no es tóxica ya que  $DL_{50}$  fue mayor de 5000 mg/kg en todos los casos. Aunque los experimentos se realizaron en roedores, estos resultados y la utilización prolongada por más de cuatro siglos, antecedentes médicos, históricos y etnológicos de la planta son consistentes con la inocuidad de la planta. Estos hallazgos se encuentran en armonía con los lineamientos de la OMS que establecen que el empleo prolongado por varios decenios y sin contratiempos manifiestos de una planta son testimonios de su inocuidad.

Los extractos del estafiate presentaron una importante actividad antidiabética, tanto hipoglucémica como antihiperoglucémica, expresada de mejor manera sobre roedores diabéticos. Estos resultados constituyen un buen antecedente preclínico de la eficacia de la especie como agente antidiabético. El excelente efecto antihiperoglucémico del extracto orgánico de la planta en los modelos farmacológicos experimentales permite establecer la hipótesis que la planta contiene inhibidores de las alfa-glucosidasas y/o de los mecanismos encargados de la absorción de la glucosa en el intestino. Estos productos constituyen agentes potenciales novedosos de fármacos antidiabéticos. Por otro lado, el efecto hipoglucemiante de los preparados de la planta, puede deberse a la presencia de estimulantes de la liberación de insulina de las células  $\beta$  del páncreas, que como la glibenclamida al unirse a su receptor bloqueen los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, y disminuyan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , efecto que da lugar a la despolarización de la membrana plasmática, permitiendo la apertura de

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje. El aumento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenará la exocitosis de vesículas de insulina al torrente sanguíneo. Asimismo, la presencia de eupatilina en la planta puede provocar un efecto hipoglucemiante a través de una reducción de los niveles de glucagón en ratones diabéticos, al mismo tiempo que induce un incremento en los niveles de adiponectina, una hormona que regula el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos (Young-Jin *et al.*, 2008).

El análisis de los componentes volátiles de *A. ludoviciana* mediante dos métodos diferentes permitió la identificación de 76 compuestos diferentes de los cuales el eudesma-4,11- dien-2-ol (11.2 %), el cariofil-4(14), 8(15)-dien-5-ol (11.2%), la  $\alpha$ -tujona (8%), el  $\beta$ -cariofileno (6.9%) y el acetato de 5-canfenilo (6.8%), (-)alcanfor (12.2-21.2 %), 1,8-cineol (7.2-21.6), *cis*-pinocarveol (6.7-15%), pueden constituir compuestos marcadores de la especie que crece en México. El perfil de compuestos aromáticos establecido en este estudio será de utilidad como prueba de identidad de la planta en el proceso de control de calidad.



## VIII PERSPECTIVAS

1. Establecer los principios activos responsables de las propiedades antihiper glucémicas e hipoglucémicas de la planta.
2. Realizar estudios pertinentes enfocados a la determinación del mecanismo de acción de los compuestos aislados de la especie.
3. La presencia en un porcentaje alto de  $\alpha$ -tujona (8%) en el aceite esencial, sugiere realizar más pruebas de inocuidad, para así completar el perfil de seguridad preclínica de la especie.
4. Realizar estudios de variación fenológica de la planta con la finalidad de establecer la variación del contenido metabólico del aceite esencial, en particular del contenido de tujona para emitir las recomendaciones de seguridad pertinentes.
5. Desarrollar un método analítico para establecer las pruebas composición de la especie y contribuir así al desarrollo de las pruebas de calidad de la planta.

**IX BIBLIOGRAFÍA**

- Academia Farmacéutica, México. (1846). *Farmacopea mexicana formada y publicada por la academia farmacéutica de la capital de la república*. México. Imprenta a cargo de Manuel N. De la Vega, 229, 263, 266 pp.
- ADA (American Diabetes Association, 2011). *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Position statement. *Diabetes Care*. 34: S62-S69.
- Aghaei, M., Alizadeh, M., y Sharifian, I. (2011). Chemical composition of essential oil of Artemisia Herba-Alba from West Azerbaijan, Iran. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 10: 6, 2413-2416.
- Aguilar, C. A., y Xolalpa, M. S. (2002). La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia*. Julio- septiembre. 24-35.
- Ahrén, B. (2003). Gut peptides and type 2 diabetes mellitus treatment. *Current Diabetes Reports*. 3: 365-372.
- Alanís, A. D., Calzada, F., Cervantes, J. A., Torres, J., Ceballos, G. M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 153-157.
- Alarcón-Aguilara, F. J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C., y Flores-Saenz, J. L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 101-110.
- Altagracia-Martínez, M., Kravzov-Jinich, J., Moreno-Santamaría, M. Del R., Rubio-Poo, C., Skromne-Kadlubik, D., Rivas-Cornejo, M. S., Vázquez-Moreno, E. (2007). Diabetes mellitus tipo 2: venta de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 38: 1 23-33.
- Altamirano, F. (1904). *Materia medica mexicana: a manual of mexican medicinal herbs*. St. Louis, Missouri : Mexican national commission. 78 p.
- Amo, R. S., del (1979). *Plantas medicinales del estado de Veracruz*. Xalapa (Veracruz). Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos.

- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 122: 163-171.
- Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325–348.
- Anon. (1979). Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. Antimalarial studies on qinghaosu. *Chinese Medical Journal*. 92: 811-816.
- Anon. (1982). China Cooperative Group on Qinghaosu and its derivatives as Antimalarials. Chemical studies on qinghaosu (Artemisinin). *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2: 3-8.
- Argueta, V. A., Cano, A. L. M., y Rodarte, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. tomo II. México D. F. Instituto Nacional Indigenista. 628-630 pp.
- Armendáris, E. (1897). Informe de los trabajos realizados en el mes de enero de 1897. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. México.
- Bailey, C. J., y Flatt, P. R. (1990). Models for testing new hypoglycemic drugs. New antidiabetic drugs. Smith-Gordon. London. 65-82.
- Balderas, J. L. (2006). Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana* y evaluaciones biológicas preliminares. México, Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Químicas)-UNAM, Facultad de Química.
- Bejar, E., Reyes-Chilpa, R., y Jiménez-Estrada, M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in XVI century Mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*. 24: 799-844.
- Belenovskaja, L. (1996) *Artemisia*: the flavonoids and their systematic value. In D. J. N. Hind y H. J. Beentje (eds.), *Compositae: Systematics*. Proceedings of the International Compositae Conference. *Chemotaxonomy*. 1: 253-259.
- Besser, W.S. (1829). Synopsis Absinthiorum. *Bull. Soc. Imp. Natl. Mosc.* 1: 219.

- Beyrouthy, E. M., Arnold, N., Delelis-Dusollier, A., y Dupont, F. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 315–334.
- Bhatt, L. R., Lim, J. A., Chai, K. Y., Kang, J. I., Oh, H. K., y Baek, S. H. (2006). Antioxidative and antimicrobial activities of essential oil from *Artemisia vulgaris*. *Natural Product Sciences*. 4: 226-231.
- Blagojevic, P., Radulovic, N., Palica, R., y Stojanovic, G. (2006). Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J. Agric. Food Chem*, 54: 4780-4789.
- Blust, H. M., y Hopkins, T. L. (1987). Gustatory responses of a specialist and a generalist grasshopper to terpenoids of *Artemisia ludoviciana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 45: 1 37-46.
- Bora, S. K., y Sharma, A. (2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmaceutical Biology*. 1-9.
- Bork, P. M., Schmitz, M. L., Kuhnt, M., Escher, C., y Heinrich, M. (1997). Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B). *FEBS Lett*. 402: 85–90.
- Bork, P. M., Schmitz, M. L., Weimann, C., Kist, M., y Heinrich, M. (1996). Nahua Indian medicinal plants (México): inhibitory activity of NF- $\kappa$  B as an antiinflammatory model and antibacterial effects. *Phytomedicine*. 3(2): 263–69.
- Bösenberg, L. H., y Van Zyl, D. G. (2008). The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *JEMDSA*. 13: 3 80-88.
- Burcelin, R., Eddouks, M., Kande, J., Assan, R., y Girard, J. (1992). Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. *The Biochemical Journal*. 288: 675– 679.
- Bye, R. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tharahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*. 40: 103-124.
- Bye, R., Linares, E., y Flores, P. (1992). Selección de plantas medicinales de México. *Noriega Editores*. México. 125 p.

- Cabrera, L. G. (1958). Plantas curativas de México : Propiedades medicinales de las más conocidas plantas de México, su aplicación correcta y eficaz. Ed. cicerón, México. D. F.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., y Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 367–370.
- Caner, A., Doskaya, M., Degirmenci, A., Can, H., Baykan, Uner, A., Basdemir G., Zeybek, U., y Guruz, Y. (2008). Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Experimental Parasitology*. 119: 173-179.
- Cañigual, S., y Vila, R. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 6(1): 43-51.
- Castanedo, J. A. (1906). Informe de los trabajos realizados en el mes de junio de 1906. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VIII. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. México.
- Castanedo, J. A. (1908). Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1908. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo X. Tipografía la universal de taladrid, blanco y comp. México.
- Castelo, E., Ricalde, O., y Panero, J. (2003-2005). Catálogo de Autoridades de Asteráceas Mexicanas y Actualización de tribus Heliantheae y Eupatorieae. University of Texas. Base de datos SNIB-CONABIO proyectos V004, AE012 y CS011. México, D.F. 3 p.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., y Romero, I. (2009) Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122: 402-405.
- Cervantes, V. (1889) Ensayo a la materia médico-vegetal de México. Estudio. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.
- Cetin, B., Özer, H., Cakir, Ahmet., Mete, E., Öztürk, E., Polat, T., y Kandemir, A. (2009). Chemical Composition of Hydrodistilled Essential Oil of *Artemisia*

- incana (L.) Druce and Antimicrobial Activity against Foodborne Microorganisms. *Chemistry and Biodiversity*. 6, 2302-2310.
- Cheng, A.Y., y Fantus, G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 172: 213–226.
  - Colin, W. W. (2002). *Artemisia*. Editorial Taylor and Francis Inc. New York. USA. 107-118 p.
  - CONABIO (2006). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
  - Cristians, S., Guerrero-Analco, J. A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., y Mata, R. (2009). Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *J. Nat. Prod*, DOI: 10. 1021/np800642d.
  - De la Cal, A., y Bracho, A. (1832). *Ensayo para la Materia Médica Mexicana*. Oficina del Hospital de San Pedro, Academia Médico-Quirúrgica. Puebla, 101 p.
  - De la Cruz, M. (1991). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*: Manuscrito Azteca de 1552 Según Traducción Latina de Juan Badiano. Editorial Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 258 pp.
  - Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., y Holst, J. J. (1995). Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*. 44:1126–1131.
  - Debnam, E. S., Smith, M. W., Sharp, P. A., Srai, S. K., Turvey, A., y Keable, S. J. (1995). The effects of streptozotocin diabetes on sodium-glucose transporter (SGLT1) expression and function in rat jejunal and ileal villus-attached enterocytes. *Pflugers Archiv- European Journal of Physiology*. 430: 151–159.
  - Domínguez, X. A., y Cárdenas, E. (1975). Achillin y deacetylmaticarin from two *Artemisa* species. *Phytochemistry*. 14:2511-2512.
  - Drucker, D. J. (2003). Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 26: 2929–2940.

- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., y Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*. 84: 3434–3438.
- Dubal, Z.B., Avasthe, R.K., Haque, N., Toppo, S., Murugkar, H.V y Barbudde, S.B. (2009). Efficacy of medicinal plant extracts and antimicrobials on different serotypes of *Escherichia coli*. *Indian Journal of Animal Sciences*. 79: 1, 15-18.
- Emmert, J., Sartor, G., Sporer, F., y Gummersbach, J. (2004). Determination of  $\alpha$ - $\beta$ -Thujone and Related Terpenes in Absinthe using Solid Phase Extraction and Gas Chromatography. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 9, 352-356.
- Epstein, W. W., y Jenkins, E. E. U. (1979). Anthemidin, a new sesquiterpene lactone from *Artemisia ludoviciana*. *Journal of Natural Products*. 42 (3): 279-81.
- Esteyneffer, J. De. (1978). Florilegio medicinal/Juan de Esteyneffer ; ed., estudio preliminar, notas, glosario e índice analítico, Ma. del Carmen Anzures y Bolaños. México: Academia Nacional de Medicina. 520 pp.
- Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U., y Perfetti, R. (2002). Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*. 143: 4397–4408.
- Fehmann, H-C., y Habener, J. F. (1992). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7–37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma, TC-1 cells. *Endocrinology*. 130:159–166.
- Fernández, S. S., Ramos, G. C., Mata, C. D. B., Villarreal, V. J., Treviño, V. L. (2005). In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia*. 76, 5: 466-468.
- Flores, T. F. de A. (1982) Historia de la medicina en México desde la época de los indios hasta la presente. México: IMSS.
- García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C., y Heredia, N. (2006). Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 669–674.

- Garg, S., Rosenstock, J., Silverman, B. L., y Sun, B. (2006). Efficacy and safety of preprandial human insulin inhalation powder versus injectable insulin in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 49: 891–899.
- Gautier, J. F., Fetita, S., Sobngwi, E., y Salaün-Martin C. (2005). Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 31: 233-242.
- Geissman, T. A., y Saitoh, T. (1971). Ludalbin, a new lactone from *Artemisia ludoviciana*. *Phytochemistry*. 11, 3: 1157-1160.
- Govindaraj, S., Ranjitha, K. B. D., Cioni, P. L., y Flamini. G. (2008). Mass Propagation and Essential Oil Analysis of *Artemisia vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 105, 3: 176-183.
- Guerrero-Analco, J. A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., y Mata, R. (2005). Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica*. 71: 1099-1105.
- Guerrero-Analco, J. A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverria, J., Navarrete, A., y Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. 68: 2087-2095.
- Hamdan, I. I., y Afifi, F. U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 117–121.
- Heike, V. (2009). Malezas de México, 31 de marzo del 2011. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisialudoviciana/fichas/ficha.htm>
- Hernández, F. (1959). Historia natural de nueva España / traducción de José Rojo Navarro. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Libro 2. 291 pp.
- Herrera, A. L. (1921). Farmacopea latino-americana. Herrero Hermanos Sucs. México. 805 pp.
- Instituto Médico Nacional. (1898). Datos para la materia medica mexicana. México : Secretaria de Fomento. Vol II. 95-110 pp.



- Instituto Nacional de Salud Pública. (2009). Diabetes is the leading cause of death in México. <http://www.insp.mx/medios/noticias/index.php?art/id:75>
- Jakupovic, J., Tan, R. X., Bohmann, F., Boldt, P. E., y Jla, Z. J. (1991). Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*. *Phytochemistry*. 30, 5: 1573-1577.
- Jaral, E., Balakrishnan, S. J., y Dharam, C. J. (2008). Diabetes and Herbal Medicines. *IJPT*. 7: 97-10.
- Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*. 2003. 17, 8: 903-8.
- Jiménez, M. F. A. (2011). *Herbolaria mexicana*. Editorial Colegio de Posgraduados. México. 186 pp.
- Jong-Sang, K., Chong-Suk, K., y Kun, H. S. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavanoid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64, 11: 2458-2461.
- Juárez- Flores, B. I., Jasso-Pineda, Y., Aguirre-Rivera, J.R., y Jasso- Pineda, I. (2010). Efecto de polvos de asteráceas sobre el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Mostch). *Polibitanica*. 30: 123-135.
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M., y Parsa, S. (2011). Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Medicale*. 21, 2: 93-99.
- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H., Pederson, R. A. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 136: 3585–3596.
- Korolyuk, E. A., y Tkachev, A. V. (2010). Chemical composition of the essential oil from two wormwood species *Artemisia frigida* and *Artemisia argyrophylla*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 386, 7: 884-893.
- Krasikov, V. V., Karelov, D. V., y Firsov, L. M. (2001).  $\alpha$ -Glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*. 66: 267-281.

- Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C. P., Lee, J-H., Kruhlak, M., Levine, M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21: 366-377.
- Lanier, D. (1995) Absinthe, the cocaine of the nineteenth century. McFarland and company. 187 pp.
- Lee, K. H., y Geissman, T. A. (1970). Sesquiterpene lactone of Artemisia constituents of *A. ludoviciana* ssp. mexicana. *Phymchemistry.* 9: 403-408.
- Lee, S. J., y Kim, C. H. (2007). Inhibitory Effects of *Artemisia capillaris* Thumb. on  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 15, 2: 128-131.
- Levy, M. N., Koeppen, B. A., y Stanton, B. A. (2006). Berne y levy fisiología. Cuarta edición. Elseiver España, S. A. 836 pp.
- Li, J. M., Che, C. T., Lau, C. B. S., Leung, P. S., y Cheng, C. H. K. (2006). Inhibition of intestinal and renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter by naringenin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 38: 5-6.
- Lisson, A. R. (1999). Glibenclamida en diabetes mellitus. *Revista de Farmacología y Terapeutica.* 6: 1-2.
- Liu, Y-L., y Mabry, T. J. (1982). Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry.* 21, 1: 209-214.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., y Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* 69: 732-1738.
- Lopes-Lutz, D., Mckay, T., y Kolodziejczyk, P. P. (2008). Distribution of volatiles in *Artemisia cana*. *Pharmaceutical Biology.* 46, 373-376.
- Lorke, D. (1983). A new aproach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology.* 54: 275-287.
- Malagon, F., Vázquez, J., Delgado, G., Ruiz, A., (1997). Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in a rodent malaria model. *Parassitologia.* 39: 3-7.

- Martínez, M. (1979) Catálogo de nombres científicos y vulgares de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México, D. F. 1242 pp.
- Martínez, M. (1992). Las Plantas Medicinales de México. 6ta edición, Botas, México., 133-135 pp.
- Mata, R., Delgado, G., y Romo del Vivar, A. (1984). Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *Angustifolia*. *Phytochemistry*. 23, 8: 1665-1668.
- Mattson, M. P. (2008). Awareness of hormesis will enhance future research in basic and applied neuroscience. *Crit Rev Toxicol*. 38: 633–639.
- McVaugh, R., (1984). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western México. Vol. 12. Compositae. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. 467 pp.
- Mendoza, C. G., García, P. J., y Estrada, L. E. (1997) Catalogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el Mercado de Sonora. Materiales para la docencia, No 2. Chapingo, México. 135 p.
- Merk<sup>®</sup>. (2006). Un equilibrio delicado: Entendiendo las Incretinas, regulación de la glucosa y fisiopatología de la diabetes tipo 2. Whitehouse Station, N. J, E.U.A. 19 pp.
- Millet, Y., Jouglard, J., Steinmertz, M. D., Tognetti, P., y Arditti, J. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study.
- Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Becerril-Montes, P., y Said-Fernández, S. (2006). Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*. 37: 45–49.
- Moller, D. (2001). New drugs targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*. 414: 821-827. *Clinical Toxicology*. 18, 12:1485-98.
- Morton, J. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas of Yucatan. C. Thomas Springfield (IL).

- Muhammad, Q. H., Muhammad, A., Mir, A. K., Ghazalah, Y., Nighat, S., y Shazia, J. (2010). Palynological study of the Genus *Artemisia* (Asteraceae) and its Systematic Implications. *Pakistan Journal of Botany* 42, 2: 751-763.
- Muoio, D. M., y Newgard, C. B. (2008). Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Molecular Cell Biology*. 9, 193-205.
- Navarro, V., Villareal, M., Rojas, G., Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 53, 3: 143-147.
- Nematollahi, F., Rustaiyan, A., Larijani, K., Nadimi, M., y Masoudi, S. (2006). Essential oil composition of *artemisia biennis* willd. and *pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey., two compositae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 18, 3:339-341.
- Nuttall, T. (1818). The Genera of North American Plants. Tellow of the American philosophical society, and of the academy of natural sciences of Philadelphia. Vol. II.
- Ohno, N., gershenzon, J., Roane, Catherine. y Mabry, T. J. (1980). 11, 13-Dehydrodesacetylmatricarin and other sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana* and the identity of artecanin and chysartemin B. *Phytochemistry*. 19: 103-106.
- OMS (Organización Mundial de Salud, 2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. 75 p.
- Organización Mundial de Salud (OMS, 2011). Pagina Web <http://www.who.org> (accesado en julio del 2011).
- Ortiz, B. E. (1995). La Familia Asteraceae en el Estado de Nayarit. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F.
- Ortiz, de M. B. R. (1994). Medicina, Salud y Nutrición Azteca. 2da edición. Siglo XXI editores. S. A de C. V. 346 pp.
- Perraudin, F., Popovici, J., y Bertrand, C. (2006). Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl. by GC-MS. *Journal of Natural Substances*. 1: 1-5.

- Rezaeinodehi, A., y Khangholi, S. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11, 6: 946-949.
- Rio de la Loza, F. (1897). Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. México.
- Rodríguez, E., Towers, G., y Mitchell, J. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*. 15: 1573-1580.
- Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Huerta-Reyes, M., y Tortoriello-García, J. (2009). Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8, 5: 380 – 388.
- Romo, J. Romo de Vivar, A., Treviño R., Joseph-Nathan, P., y Díaz, E. (1970). Constituents of *Artemisia* and *chrysanthemum* species-the structures of chrysartemins A and B. *Phytochemistry*. 9, 7: 1615-1621.
- Romo, J. y Tello, H. (1972). Estudio de la *Artemisia mexicana*: Armexina un nuevo santanolido cuya lactona posee fusion cis. *Rev. Latinoam. Quim.* 3, 112-126.
- Ross, S. A., Gulve, E. A., y Wang, M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Review*. 104: 1255-1282.
- Ruiz- Cancino, A., E. A., y Delgado, G. (1993). Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. Mexicana. *Phytochemistry*. 33: 51113-1 115.
- Ruiz-Salazar, C. (1989). Contribución al estudio de las plantas medicinales de la delegación Xochimilco. México D. F. MEXU. Herbario Nacional (UNAM). Tesis.
- Rzedowski, C. de G., y Rzedowski, J. (1997). Compositae. Tribu Anthemideae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 60. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y

- comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Rzedowski, G. C. de., y J. Rzedowski (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 pp.
  - Rzedowski, J., y Rzedowski C. de G. (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol II. Dicotyledoneae. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología. México, D. F.
  - Sánchez-Viesca, F., y Romo, J. (1963). Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). *Tetrahedron*. 19, 8: 1285-1291.
  - Sánchez, O. (1980). La Flora del Valle de México. 6ta edición. Herrero, México. 432 pp.
  - Secretaria de Salud. (2010). Rendición de Cuentas en Salud 2009. Edición 2010. México D. F.
  - Sharma, S., Dwivedi, S., y Swarup, D. (1997). Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seed in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 58: 39-44.
  - Simon, J. E., Chadwick, A. F., y Craker, L. E. (1984). Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 7-9, 59-61, 91-92, 99-100 pp.
  - Sociedad Farmacéutica Mexicana. (1896). Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México. México. Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento. 587 pp.
  - Soumyanath, A. (2006). Traditional medicines for modern times. Vol. 6. Antidiabetic plants. Taylor and Francis Group Editors. 1ª Edición. Boca Raton, Florida. 1-314.
  - Sun, W. C. Han, J. X. Yang, W. Y. Deng, D. A., y Yue, X. F. (1992). Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and artemisinin B *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 13: 541-543.
  - Temraz, A., y El-Tantawy, W. H. (2008). Characterization of antioxidant

- activity of extract from *Artemisia vulgaris*. *Pakistan J Pharm Sci*. 21, 321–326.
- Terres, J. (1897) Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. México.
  - Trümper, A., Trümper, K., Trusheim, H., Arnold, R., Göke, B., y Hörsch, D. (2001). Glucose-dependent insulintropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Molecular Endocrinology*. 15: 1559–1570.
  - Vahdati-Mashhadian, N., Emami, S. A., Oghazian, M. B., y Vosough, R. (2009) The cytotoxicity evaluation of seven species of *Artemisia* on human tumor cell lines. *Pharmacologyonline*. 1: 229-242.
  - Van Del Dool, H., y Kratz Dec, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperatura programmed Gas-Liquid partition chromatography. *Chromatol.* 2: 463-471.
  - Vasanth S., Gopal R. y Kundu A. (1991). Biological activities of the genus *Artemisia* L. *Indian Drugs* 28: 170-177.
  - Verma, M. K., Anand, R., Chisti, A. M., Kitchulu, S., Suresh, C. A. S., y Shawl, R. K. K. (2010). Essential oil composition of *Artemisia dracunculoides* L. (Tarragon) growing in Kashmir – India. *Journal of essential Oil-Bearing Plants*. 13, 3: 331-335.
  - Verspohl, E. J. (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*. 68: 581-90.
  - Viehoveer, A., y Capen, R. G. (1923). New source of santonin. *Journal of American Chemical Society*. 45: 1941-1944.
  - Villaseñor, F. (1907) Informe de los trabajos realizados en el mes de agosto de 1907. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo IX. Tipografía la universal de Madrid, blanco y comp. México.
  - Villaseñor, R. J. L., y Espinosa, G. F. J. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 449 pp.
  - Wang, J., Zhu, F., Zhou, X., M., Iu, C., y Lei, C. L. (2006). Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium*

- castaneum* (Herbst) (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *J. Stored Prod. Res.* 42: 339-347.
- Williamson, E. M., Opako, D. T., y Evans, F. J. (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. Volume 1. Ed. Jonh Wiley & Sons. New York. 1-228.
  - Ximénez, F. (1888). Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas y Animales de uso medicinal en la Nueva España. Oficina tipografica de la Secretaría de fomento. México. Libro segundo, 291 p.
  - Young-Jin, K., Un, J. J., Mi-Kyung, L., Hye-Jin, K., Seon-Min, J., Yong, B. P., Hae-Gon, C., Nam-In, B., Kyung, T. L., Tae-Sook, J., y Myung-Sook, C. (2008). Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic b-cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 82: 25–3.
  - Zavala-Sánchez, M. A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez-Saldivar, D., y Arias-García, L. (2002). Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology.* 40: 4, 263-268.



## X APÉNDICE

Tabla 1. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto acuoso (EA, 31.6, 100, 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.04$  en comparación al vehículo.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 h = 0% (mg/dL)	1,5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
Vehículo (n=16)	NaCl 0.9%	150.5 $\pm$ 4.7	-4.4 $\pm$ 4.1	-3.6 $\pm$ 2.8	-18.3 $\pm$ 3	-22.3 $\pm$ 3	-24.3 $\pm$ 3.6
Glibenclamida (n=8)	10	157.1 $\pm$ 4.9	*-20.5 $\pm$ 5.4	*-25.6 $\pm$ 4.4	*-35.3 $\pm$ 4.4	*-33.4 $\pm$ 4.7	*-37.2 $\pm$ 3.2
EA (n=8)	31.6	163.7 $\pm$ 5.9	-2.3 $\pm$ 2.8	-3.1 $\pm$ 4.6	-22.5 $\pm$ 4.5	-24.8 $\pm$ 5.3	-18 $\pm$ 5.8
EA (n=8)	100	156.7 $\pm$ 5	-11 $\pm$ 3.7	-1.6 $\pm$ 3.2	-24.6 $\pm$ 3.9	-23.3 $\pm$ 4.5	-26.4 $\pm$ 3.4
EA (n=8)	316	165 $\pm$ 3.8	*-12.1 $\pm$ 1.7	*-13.6 $\pm$ 3	-23.3 $\pm$ 2.4	-26.5 $\pm$ 3.1	-30 $\pm$ 4

Tabla 2. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto acuoso (EA, 31.6, 100, 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.04$  en comparación al vehículo.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 h = 0% (mg/dL)	1,5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
Vehículo (n=7)	NaCl 0.9%	162 $\pm$ 7.1	-0.4 $\pm$ 4.4	-10.3 $\pm$ 4.9	-24.3 $\pm$ 3.3	-13.2 $\pm$ 3.4	-25 $\pm$ 5.3
Glibenclamida (n=8)	10	283.5 $\pm$ 51.1	*-32.2 $\pm$ 3.1	*-31.8 $\pm$ 4.9	*-43.9 $\pm$ 4	*-35.8 $\pm$ 5.4	*-45.2 $\pm$ 4.9
EA (n=7)	31.6	269.5 $\pm$ 67.3	*-24.3 $\pm$ 7.9	-19.1 $\pm$ 7.9	-24.2 $\pm$ 7.3	-21.5 $\pm$ 7.6	-31.3 $\pm$ 7.8
EA (n=7)	100	261.1 $\pm$ 53.6	*-29.8 $\pm$ 4.1	-24.2 $\pm$ 10.3	-33.2 $\pm$ 6.6	-26.9 $\pm$ 6.7	*-43.2 $\pm$ 7
EA (n=6)	316	313.1 $\pm$ 61.1	*-40.7 $\pm$ 6	*-38.6 $\pm$ 7.9	*-41.4 $\pm$ 5.4	*-36.5 $\pm$ 9	-43.7 $\pm$ 9.1

Tabla 3. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto orgánico (EO, 31.6, 100, 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.04$  en comparación al vehículo.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 h = 0% (mg/dL)	1,5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
Vehículo (n=7)	NaCl 0.9%	155.3 $\pm$ 6.2	-3.6 $\pm$ 3.4	-7.6 $\pm$ 3.1	-18 $\pm$ 3.2	-17.2 $\pm$ 2.9	-25.5 $\pm$ 3.5
Glibenclamida (n=12)	10	172.5 $\pm$ 6.5	*-48.1 $\pm$ 2.6	*-49.4 $\pm$ 2.6	*-53.7 $\pm$ 2	*-52.5 $\pm$ 2.6	*-53.2 $\pm$ 1.9
EO (n=8)	31.6	183.7 $\pm$ 7.2	-12.5 $\pm$ 5.3	-8.5 $\pm$ 3.6	*-31.3 $\pm$ 4.7	-28 $\pm$ 5.1	-31.3 $\pm$ 6.4
EO (n=8)	100	172.8 $\pm$ 5.8	-8 $\pm$ 2.6	-11 $\pm$ 3.3	*-34.7 $\pm$ 4.8	*-36 $\pm$ 5.9	-39.9 $\pm$ 5.9
EO (n=8)	300	166.7 $\pm$ 2.7	-0.5 $\pm$ 3.7	-8.5 $\pm$ 3.5	-24.5 $\pm$ 5.7	-22.3 $\pm$ 5.3	-24.4 $\pm$ 4.9

Tabla 4. Efecto agudo hipoglucemiante del extracto orgánico (EO, 31.6, 100, 300 mg/kg) de *A. ludoviciana* en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación al vehículo.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 h = 0% (mg/dL)	1,5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
Vehículo (n=6)	NaCl 0.9%	239 $\pm$ 49.1	-8.4 $\pm$ 11.1	-14 $\pm$ 8.7	-6.8 $\pm$ 5.7	-15.6 $\pm$ 2.2	-15.5 $\pm$ 3.5
Glibenclamida (n=6)	10	219.8 $\pm$ 10.2	-30.1 $\pm$ 5.4	*-42.4 $\pm$ 5.6	*-40 $\pm$ 3.9	*-38.1 $\pm$ 4	*-34.5 $\pm$ 6.4
EO (n=8)	31.6	210 $\pm$ 23.8	-14.3 $\pm$ 7.7	-30.2 $\pm$ 6.3	<b>*-32.2<math>\pm</math>4.3</b>	<b>*-28.3<math>\pm</math>4.5</b>	<b>*-31.4<math>\pm</math>4.9</b>
EO (n=7)	100	264.2 $\pm$ 42.7	<b>*-35.7<math>\pm</math>5.7</b>	<b>*-40.1<math>\pm</math>5.8</b>	<b>*-33.2<math>\pm</math>7.1</b>	-33.6 $\pm$ 7.7	-35.4 $\pm$ 8.8
EO (n=7)	300	227.5 $\pm$ 19.6	-27.1 $\pm$ 5.1	<b>*-38.5<math>\pm</math>4.9</b>	<b>*-30.5<math>\pm</math>4.3</b>	<b>*-33.8<math>\pm</math>4.3</b>	<b>*-34.9<math>\pm</math>4.3</b>

Tabla 5. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=14)	NaCl 0.9%	158 $\pm$ 4	68.5 $\pm$ 5.7	38 $\pm$ 10.7	14.7 $\pm$ 10.5	10.9 $\pm$ 12.1	-28.3 $\pm$ 5.1
Glibenclamida (n=14)	10	157.3 $\pm$ 5.6	*10.7 $\pm$ 4.7	*-24.9 $\pm$ 3.4	*-33.8 $\pm$ 2.8	*-39.4 $\pm$ 2.8	*-43.7 $\pm$ 5.8
EA (n=14)	31.6	156.1 $\pm$ 6.7	<b>*44.9<math>\pm</math>9.1</b>	15.6 $\pm$ 7.7	-3.6 $\pm$ 8.1	-9.5 $\pm$ 6.8	*-11.6 $\pm$ 4.8
EA (n=14)	100	141.3 $\pm$ 4.1	<b>*37.9<math>\pm</math>7</b>	*10.9 $\pm$ 6	*-9.1 $\pm$ 5.7	*-15.9 $\pm$ 5.3	*-18.5 $\pm$ 5.9
EA (n=9)	316	149.4 $\pm$ 9	<b>*22.8<math>\pm</math>6.3</b>	*1 $\pm$ 3.9	-8.4 $\pm$ 2.8	*-14.8 $\pm$ 3.8	

Tabla 6. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=10)	NaCl 0.9%	189.6 $\pm$ 19.4	72.8 $\pm$ 4.7	36.3 $\pm$ 10.3	20.8 $\pm$ 9	15.5 $\pm$ 6.4	-6.8 $\pm$ 5.5
Glibenclamida (n=12)	10	208.3 $\pm$ 22	*14.6 $\pm$ 8	*-8.8 $\pm$ 7.1	*-22.1 $\pm$ 4.7	*-26.7 $\pm$ 4.6	*-38.8 $\pm$ 3
EA (n=8)	31.6	243 $\pm$ 53.9	57.9 $\pm$ 13.6	32.1 $\pm$ 9.9	5.7 $\pm$ 5.2	2.5 $\pm$ 3.9	-17 $\pm$ 3.3
EA (n=8)	100	213.5 $\pm$ 34.4	59.5 $\pm$ 6.8	44.8 $\pm$ 8.6	24.9 $\pm$ 8.5	16.9 $\pm$ 8.9	1.7 $\pm$ 7.7
EA (n=8)	316	184.8 $\pm$ 14.7	<b>*51.1<math>\pm</math>5.5</b>	20.4 $\pm$ 6.6	4 $\pm$ 4.8	1.8 $\pm$ 4.8	-41.3 $\pm$ 18.1

Tabla 7. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=17)	NaCl 0.9%	165.7 $\pm$ 4	53.5 $\pm$ 5	25.5 $\pm$ 7.8	10.5 $\pm$ 8	12.4 $\pm$ 9.2	-11.3 $\pm$ 3.3
Glibenclamida (n=16)	10	162.8 $\pm$ 2.9	*2.2 $\pm$ 4.4	*-21.6 $\pm$ 4.4	*-28.6 $\pm$ 2.4	*-31.1 $\pm$ 3.2	*-41.1 $\pm$ 4.4
EO (n=10)	31.6	164.8 $\pm$ 7	<b>*24.4<math>\pm</math>6.3</b>	4.5 $\pm$ 8.8	-3.9 $\pm$ 7.1	*-19.8 $\pm$ 9.3	-6.7 $\pm$ 4.3
EO (n=9)	100	154.1 $\pm$ 4.1	38.5 $\pm$ 6.8	*5.7 $\pm$ 1.8	-0.7 $\pm$ 3.7	-7.7 $\pm$ 5.5	-15.8 $\pm$ 2.3
EO (n=8)	316	158.3 $\pm$ 8.5	49.4 $\pm$ 12.9	5.3 $\pm$ 7.3	-1 $\pm$ 9.3	-12.4 $\pm$ 7.8	-11.8 $\pm$ 5.2

Tabla 8. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.04$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=6)	NaCl 0.9%	218.8 $\pm$ 17.6	63.2 $\pm$ 13.6	26 $\pm$ 12.1	-2.7 $\pm$ 10.6	-11.2 $\pm$ 8.9	-18.4 $\pm$ 10.6
Glibenclamida (n=6)	10	396.5 $\pm$ 82.6	*15.2 $\pm$ 5	*-1.8 $\pm$ 5.3	-14.24 $\pm$ 5.9	-16 $\pm$ 5.7	-17.2 $\pm$ 7.8
EO (n=7)	31.6	297.8 $\pm$ 47.8	41.9 $\pm$ 10.8	18.48 $\pm$ 11.8	-2.3 $\pm$ 11.7	-10.9 $\pm$ 8	-26.9 $\pm$ 5.9
EO (n=7)	100	379.2 $\pm$ 63.6	<b>*4.6<math>\pm</math>6.4</b>	*-4.7 $\pm$ 3.3	15.6 $\pm$ 7.3	-23.9 $\pm$ 6.5	-15.6 $\pm$ 13.6
EO (n=8)	316	450.3 $\pm$ 32.9	<b>*-1.2<math>\pm</math>4.1</b>	*-11.2 $\pm$ 3.3	-12.2 $\pm$ 4.8	-21.4 $\pm$ 4.9	-32.5 $\pm$ 6.4

Tabla 9. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=8)	NaCl 0.9%	156.2 $\pm$ 6	42.4 $\pm$ 6.3	-3 $\pm$ 2.4	5.6 $\pm$ 8.3	-6.4 $\pm$ 4.1	-17.1 $\pm$ 3.6
Glibenclamida (n=8)	10	149.2 $\pm$ 8.3	*16.2 $\pm$ 1.9	1.4 $\pm$ 13.8	5 $\pm$ 3.7	0.5 $\pm$ 3.7	-8.1 $\pm$ 4.3
EA (n=6)	31.6	163.6 $\pm$ 6.2	34.9 $\pm$ 4.7	*15.7 $\pm$ 7.6	8.7 $\pm$ 5.2	5.3 $\pm$ 4	-15.3 $\pm$ 3.2
EA (n=6)	100	159 $\pm$ 8.7	<b>*22.8<math>\pm</math>5.6</b>	7.3 $\pm$ 5.3	6.9 $\pm$ 7.2	1.8 $\pm$ 6.1	-18.1 $\pm$ 5.8
EA (n=6)	316	145.6 $\pm$ 11.1	27.7 $\pm$ 5.5	5.1 $\pm$ 4.5	-0.1 $\pm$ 3.5	3.3 $\pm$ 2.5	-13.2 $\pm$ 4.9

Tabla 10. Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=10)	NaCl 0.9%	181.1 $\pm$ 6.1	80.5 $\pm$ 7.4	57.5 $\pm$ 12.3	44.2 $\pm$ 9.7	36.8 $\pm$ 5.5	21 $\pm$ 6
Glibenclamida (n=10)	10	218.4 $\pm$ 31.5	<b>*15.4<math>\pm</math>3.8</b>	*10 $\pm$ 5.2	*3.2 $\pm$ 3.3	*0.1 $\pm$ 5.2	*0.06 $\pm$ 4.1
EA (n=6)	31.6	179.8 $\pm$ 11.3	<b>*51.6<math>\pm</math>4.8</b>	*23.4 $\pm$ 5.4	*20.7 $\pm$ 1.4	*16 $\pm$ 4.4	6.1 $\pm$ 4.3
EA (n=6)	100	179.3 $\pm$ 5.4	90.8 $\pm$ 5.4	(50.4 $\pm$ 11.5)	*15.8 $\pm$ 5.6	*8.5 $\pm$ 5.8	*2.3 $\pm$ 2.6
EA (n=6)	316	220.6 $\pm$ 59	49.1 $\pm$ 15	33.8 $\pm$ 7.4	*10.1 $\pm$ 5.7	*16.9 $\pm$ 5.9	*4.4 $\pm$ 5.1

Tabla 11. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones **normoglucémicos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.02$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=6)	NaCl 0.9%	138.6 $\pm$ 5	47.2 $\pm$ 6.5	0.6 $\pm$ 1.6	18.2 $\pm$ 8.1	1.1 $\pm$ 7.9	-6.9 $\pm$ 6.6
Glibenclamida (n=6)	10	137 $\pm$ 6.5	<b>*13.1<math>\pm</math>7.3</b>	*9.1 $\pm$ 2.8	6.7 $\pm$ 4.6	4.4 $\pm$ 7	-12.8 $\pm$ 4.6
EA (n=8)	31.6	117.8 $\pm$ 6.2	54.7 $\pm$ 10.3	18.5 $\pm$ 2.8	9 $\pm$ 3.7	8 $\pm$ 3.7	-14.7 $\pm$ 5.3
EA (n=7)	100	137.4 $\pm$ 7.8	<b>*22<math>\pm</math>6.8</b>	-11.6 $\pm$ 12.9	*-19.2 $\pm$ 11.9	-16.6 $\pm$ 13.2	-29.3 $\pm$ 11.1
EA (n=6)	316	144.6 $\pm$ 6.9	35.1 $\pm$ 5.6	-1.9 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3.5	-7.1 $\pm$ 3.3	-16.6 $\pm$ 3.1

Tabla 12. Efecto del extracto orgánico (EO, 31.6, 100 y 316 mg/kg) de *A. ludoviciana* en los NGS durante la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones **diabéticos**. Cada valor es la media  $\pm$  error estándar. Los valores del tiempo 0 fueron estandarizados al 0%. \*  $p \leq 0.05$  en comparación a la salina.

Tratamiento	Dosis mg/kg	Concentración de glucosa en la sangre (%)					
		0 min = 0% (mg/dL)	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Vehículo (n=10)	NaCl 0.9%	181.1 $\pm$ 6.1	80.5 $\pm$ 7.4	57.5 $\pm$ 12.3	44.2 $\pm$ 9.7	36.8 $\pm$ 5.5	21 $\pm$ 6
Glibenclamida (n=10)	10	218.4 $\pm$ 31.5	<b>*15.4<math>\pm</math>3.8</b>	*10 $\pm$ 5.2	*3.2 $\pm$ 3.3	*0.1 $\pm$ 5.2	*0.06 $\pm$ 4.1
EA (n=6)	31.6	238.3 $\pm$ 38.2	<b>*40.2<math>\pm</math>14.6</b>	*20.6 $\pm$ 11.6	*6 $\pm$ 8.5	*2.4 $\pm$ 8.9	*-10.5 $\pm$ 9.1
EA (n=6)	100	310.3 $\pm$ 82	<b>*29.5<math>\pm</math>7.9</b>	*17.1 $\pm$ 6.6	*9.8 $\pm$ 6.3	*4.2 $\pm$ 5.9	5.2 $\pm$ 10
EA (n=6)	316	258 $\pm$ 57.8	<b>*42.3<math>\pm</math>10.9</b>	*11-9 $\pm$ 3	*-2.1 $\pm$ 3.5	*-0.3 $\pm$ 4.5	*-0.3 $\pm$ 3.4