



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*
y evaluaciones biológicas preliminares

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(Farmacia-Química Farmacéutica)

PRESENTA

QFB JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ



TUTOR: DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en:

El Instituto de Química, UNAM

y

Laboratorio L-314 de la Facultad de Estudios

Superiores Zaragoza, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Dr. Guillermo Delgado Lamas

M. en C. Alejandro Ruiz Cancino

M. en C. Arturo Cano Flores

Enrique Serrano Saldaña

Mara Nidia Elizalde Mastache

Al personal técnico-académico del Instituto de Química

Por el apoyo y facilidades brindadas
para la realización de este trabajo.

Blanca Rosa Jiménez Pérez

Por no desistir en su intento de ver
culminado este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres

Que a pesar de las carencias le han brindado
a mis hermanos y a mi la oportunidad de
lograr nuestros sueños.

A Cori Corazoncito

Quien en las buenas y en las malas
siempre ha permanecido a mi lado y
me ha demostrado que es la persona más
valiosa de mi vida.

*... un día el maestro le dijo al alumno:
"El mundo es de los audaces"...*

... espero que el alumno ya lo haya comprendido...

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	<i>i</i>
Abstract	1
Resumen	2
Introducción	3
Marco teórico	4
1. Generalidades en la investigación en productos naturales	4
2. Generalidades del género <i>Artemisia</i> L.	5
2.1 <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	6
3. Metabolitos secundarios del género <i>Artemisia</i> L.	8
3.1 Aceites esenciales	9
3.2 Lactonas sesquiterpénicas	10
3.2.1 Actividades biológicas de las lactonas sesquiterpénicas	11
3.3 Flavonoides	17
4. Actividades biológicas de plantas y metabolitos del genero <i>Artemisia</i> L.	19
Objetivo	22
Parte experimental	23
1. Análisis químico	23
a) <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (San Rafael)	23
b) <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (Milpa Alta)	26
c) Aceites esenciales	27
2. Evaluaciones biológicas	28
a) Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L.	28
b) Evaluación antimicrobiana por el método de Mitscher	29
Resultados y discusión	32
1. <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (San Rafael)	32
Extracto etanólico	32
Extracto diclorometánico	43
2. <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (Milpa Alta)	47
Extracto diclorometánico	47

3. Evaluaciones biológicas preliminares	56
Conclusiones	60
Sugerencias	62
Propiedades espectroscópicas y espectrométricas de las sustancias aisladas	63
Espectros de las sustancias	68
Referencias	105

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas ha resurgido el interés por las plantas medicinales en busca de fuentes de sustancias con actividad farmacológica o de nuevas moléculas para la elucidación de fenómenos fisiológicos y/o bioquímicos.¹⁻² El estudio químico de las plantas medicinales es una parte muy importante en esta nueva línea de investigación, cuyo objetivo es el aislamiento de los principios activos que puedan existir en la planta y que son responsables de las propiedades terapéuticas atribuidas a la misma.

El género *Artemisia* L. ha sido objeto de numerosos estudios químicos y bioensayos de actividad que han mostrado una gran cantidad de metabolitos secundarios de diferentes clases y de una amplia gama de actividades biológicas, sin embargo, muy pocas plantas de este género que crecen en nuestro país han sido estudiadas. Una de estas plantas, *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* ha sido estudiada por su abundancia en el Valle de México, y se le han atribuido una amplia gama de actividades terapéuticas, las cuales no han sido comprobadas. Asimismo, se le ha relacionado con *Artemisia annua*, sin embargo, los estudios hasta el momento indican que no posee la misma composición química ni la misma actividad antimalárica, por lo que es necesario explorar otro tipo de actividades biológicas.

En este trabajo, se estudió *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, la cual fue colectada en dos lugares diferentes con distintos medios ambientes en la misma época del año, para estudiar si su composición química es determinada por el ambiente en que crece y asimismo, explorar si posee algunas actividades biológicas. En este caso se estudiaron la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher y la toxicidad en *Artemia salina* dichas pruebas fueron escogidas por su facilidad y porque se pueden aplicar a extractos crudos.

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar sus diferencias fitoquímicas derivadas del lugar de colecta, así como sus propiedades antimicrobianas y su toxicidad frente a *Artemia salina* de sus extractos crudos, se realizó el análisis químico a *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en San Rafael, Tlalmanalco, Estado de México y San Pedro Atocpan, Milpa Alta, Distrito Federal.

Los ejemplares colectados fueron secados a la sombra a temperatura ambiente, se prepararon los extractos por medio de extracción sólido-líquido con *n*-hexano, diclorometano y etanol. Los dos últimos extractos se fraccionaron por cromatografía en columna para la obtención de los metabolitos secundarios. Los aceites esenciales se extrajeron por medio de destilación por arrastre de vapor con material vegetal fresco recién colectado. Las sustancias aisladas se caracterizaron por medio de sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

De los ejemplares colectados en San Rafael, del extracto etanólico de las partes aéreas, se aislaron e identificaron las lactonas Arglanina, Ludovicina A, Armefolina y Armexifolina. Del extracto diclorometánico de las partes aéreas de la misma, se aislaron las lactonas Arglanina, Ludovicina A, Armexifolina y Achillina, y la flavona Artemetina. Del vegetal colectado en San Pedro Atocpan, del extracto diclorometánico de las partes aéreas, se aislaron e identificaron, las lactonas Estafiatina, Achillina y Ridentina, y la flavona Eupatilina.

Con respecto a las pruebas biológicas preliminares, los aceites esenciales, así como los extractos hexánico y diclorometánico tienen actividad sobre *Artemia salina* L., mientras que el etanólico no tiene actividad. En cuanto a la actividad antimicrobiana, sólo los aceites esenciales de ambas plantas, así como el extracto hexánico del vegetal colectado en San Rafael presentan actividad.

Los resultados obtenidos sugieren que el ambiente ecológico determina la composición química y la actividad biológica que presenta el vegetal en estudio.

ABSTRACT

The phytochemical analysis and antimicrobial and toxicity test of *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* collected in two places; San Rafael, Tlalmanalco, Estado de México and San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F. were performed.

Extracts were obtained by solid-liquid extraction with *n*-hexane, dichloromethane and ethanol from the dried plant. Column chromatography techniques of the dichloromethane and ethanol extracts were performed in order to obtain the secondary metabolites. Essential oils were obtained by steam distillation from fresh plant recently collected. Secondary metabolites were identified by physical, spectrometric and spectroscopic methods.

Arglanin, Ludovicin A, Armefolin and Armexifolin were isolated from the ethanolic extract of aereal parts; and Arglanin, Ludovicin A, Armexifolin, Achillin and the flavone Artemetin were isolated from the dichloromethanic extract of aereal parts of *A. ludoviciana* from San Rafael, Tlalmanalco. Estafiatin, Achillin, Ridentin and the flavone Eupatillin were isolated from the dichloromethanic extract of aereal parts of *A. ludoviciana* from San Pedro Atocpan, Milpa Alta.

Essential oils, hexanic and dichloromethane extracts from both plants were toxic to *Artemia salina*, whereas ethanolic extract did not. Essential oils of both plants and hexanic extract from plant collected in San Rafael, Tlalmanalco, showed moderate antimicrobial activity.

The obtained results suggest that the chemical composition and the biological activity depend on ecological environment where the plants under study are collected.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades en la investigación en productos naturales.

La mayor parte de la población mundial usa plantas medicinales como su fuente primaria de agentes terapéuticos. No es sorprendente encontrar que en muchos países del mundo exista un sistema bien establecido de medicina tradicional. Muchos de estos remedios están bien documentados y están comercialmente disponibles, mientras que en otros remedios están celosamente guardados por el curandero o *shaman*³.

Aún cuando las plantas medicinales se han empleado desde hace siglos, no fue sino hasta principios del siglo XIX, cuando se tuvo la inquietud de estudiarlas con el objetivo primordial de aislar los principios activos responsables de sus propiedades terapéuticas⁴.

De esta manera, a nivel de investigación básica, la estimación de los efectos farmacológicos de los extractos vegetales y los procedimientos químicos a los que se someten las plantas con el objeto de aislar e identificar los principios activos, proporciona en gran medida las bases que permiten convalidar o refutar las propiedades terapéuticas atribuidas a las mismas⁵.

La corroboración científica de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas aportan beneficios al medio clínico y contribuye al mayor entendimiento de una expresión cultural de los pueblos que las utilizan. Además, las plantas medicinales constituyen una reserva natural que aún no ha sido suficientemente explotada como fuente potencial de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica⁵⁻⁶.

Las plantas medicinales es el recurso terapéutico principal para muchos mexicanos. La flora medicinal del país es extensa y en las prácticas médicas populares se utilizan como remedio una amplia gama de variedades y especies botánicas⁷⁻⁸.

De esta manera en la investigación en productos naturales los especialistas se orientaron por años a temas de estudio de aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de las plantas. Ahora, buscan en las plantas medicinales sustancias con actividad biológica⁵.

Esto hace necesario una investigación interdisciplinaria para realizar un estudio completo e integrado, donde la *etnobotánica* indique el uso medicinal de la especie en la comunidad de colecta, la *fitoquímica* permita asilar y caracterizar al o los principios activos, y por último, la *farmacología* determine su actividad farmacológica específica ⁴.

2. Generalidades del género *Artemisia* Less.

Artemisia L. es un género cosmopolita que se localiza predominantemente en las regiones septentrionales del mundo como Norteamérica, Europa, Asia y Norte de África, y se extiende hacia el sur hasta los trópicos donde la precipitación pluvial anual es de 0-50 cm³ ⁹⁻¹⁰. Perteneció a la familia *Compositae* (*Asteraceae*) que comprende cerca de 1,000 géneros y 20,000 especies divididas en 13 tribus. Dentro de dicha familia, *Artemisia* está incluida en la tribu *Anthemideae* y comprende por sí misma varias especies distribuidas en cuatro subgéneros (*Abrotanum*, *Absinthium*, *Drancunculus* y *Seriphidium*), el cual oscila entre 200 y 400, de acuerdo con diferentes autores ^{9,11}.

De acuerdo con el *Herbario Nacional MEXU*^a, en nuestro país existen 21 especies de plantas pertenecientes al género *Artemisia* L., localizadas desde el centro y hasta el norte del país, abarcando una gran variedad de condiciones climáticas y de vegetación. En el Cuadro 1, se enumeran dichas especies y el estado donde se localizan.

^a Investigación personal en las colecciones del herbario.

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

Cuadro I. Especies del género *Artemisia* que se encuentran distribuidas en México de acuerdo con Ruiz 1990¹² y el Herbario Nacional MEXU.

2.1 *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*

Artemisia ludoviciana ssp. *mexicana* es una planta nativa de México distribuida en las regiones templadas del Valle de México. Es conocida principalmente como *estafiate* y es una de las especies con mayor difusión, siendo sus usos igualmente compartidos y coincidentes en las regiones donde se localiza. Su empleo principal es para el tratamiento de padecimientos digestivos¹³⁻¹⁴. En el Cuadro II se mencionan algunas de sus características.

Artemisia ludoviciana ssp. mexicana**Nombre científico:**

Artemisia ludoviciana ssp. mexicana Nuttall (Willd) Keck
Artemisia mexicana Willd

Nombre común:

Estafiate, iztauhatl (sal amarga), ajenjo del país, istafiate, estayate, artemisa, altamiza, azumate.

Localización:

Principalmente en las regiones templadas del Valle de México.

Características:

Hierba muy aromática de hasta un metro de altura, con ramas blanquecinas y hojas divididas en tres, como listones alargados. Las flores son amarillentas y como cabezuelas abundantes. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Se da en forma silvestre y está asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, subperenifolia y perennifolia; matorral xerófilo y bosques mesófilo de montaña, de encino y pino.

**Usos en la Medicina Tradicional Mexicana:**

Su principal empleo es contra padecimientos digestivos como parásitos e infecciones intestinales, cólicos, disentería y vómito. El tratamiento consiste en utilizar las ramas y otras plantas en cocimiento y tomarse como agua de uso. También se ha recomendado contra la bilis, afecciones hepáticas, dolor de cuerpo, inapetencia, reumatismo, mala digestión, gastritis, anginas, bronquitis y malestares del riñón, diabetes, irritación de ojos, dolor de oídos, nervios, mareos y dolor de cabeza, esterilidad y problemas menstruales.

Cuadro II. Características principales de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* ^{8,14-17}.

3. Metabolitos secundarios del género *Artemisia* L.

El género *Artemisia* L. es fuente de una cantidad considerable de productos nuevos e interesantes desde el punto de vista químico y farmacológico. Muchos de estos metabolitos no han sido encontrados en otros géneros por lo que algunos de ellos han sido considerados como marcadores taxonómicos ⁹.

En el Cuadro III. Se resumen los principales metabolitos del género.

Principales metabolitos secundarios del género <i>Artemisia</i> L.				
➤ Acetilenos	}	<ul style="list-style-type: none"> • Trienos conjugados • Eteres enol espirocetales • Derivados del dehidrofalcarinona • Derivados del tiofeno • Aromáticos 		
➤ Coumarinas				
➤ Flavonoides	}	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonas • Flavonoles • Glicósidos de flavonas y flavonoles 		
➤ Terpenos				
	}	• Monoterpenos		
		• Sesquiterpenos	} <ul style="list-style-type: none"> • Lactonas • No lactonas 	} <ul style="list-style-type: none"> • Germacranólidas • Eudesmanólidas • Guayanólidas • Otros esqueletos
➤ Lignanos tipo sesamina				
➤ Otros compuestos	}	<ul style="list-style-type: none"> • Fenólicos • Derivados de la acetofenona • Derivados del ácido cinámico • Fenoxicromonas • Benzofuranos 		

Cuadro III. Principales metabolitos secundarios encontrados en el género *Artemisia* L. ⁹.

3.1 Aceites esenciales.

Las plantas del género *Artemisia* L. producen una gran cantidad de compuestos terpénicos o terpenoides en sus tricomas glandulares. Los componentes más frecuentes derivan biogenéticamente del ácido mevalónico y se les cataloga como monoterpenos (isoprenoides C₁₀) y sesquiterpenos (isoprenoides C₁₅) de bajos puntos de fusión. Otras clases de sustancias químicas pueden estar presentes junto con los terpenos como por ejemplo, los hidrocarburos alicíclicos y aromáticos con sus respectivos derivados oxigenados, compuestos con azufre y fenilpropanoides; por ello, las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales son muy diversas. Estas mezclas complejas son las principales responsables del olor característico de las plantas ¹⁸⁻²⁰.

Los aceites esenciales son comercialmente importantes como base de perfumes naturales y como saborizantes de alimentos. Entre las familias de plantas particularmente ricas en aceites esenciales se incluyen *Compositae*, *Labiatae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae* y *Umbelliferae* ¹⁹.

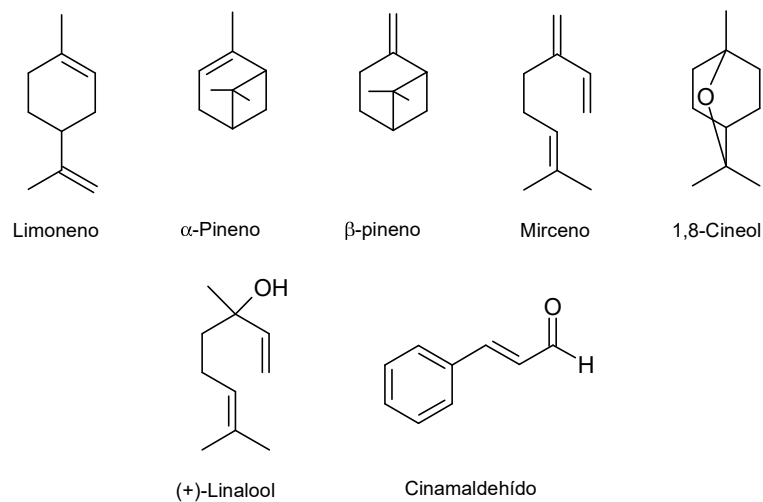


Figura 1. Ejemplos de sustancias presentes en los aceites esenciales en plantas del género *Artemisia* ^{18,21}.

3.2 Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas son productos naturales cuyo esqueleto base está formado por la unión de 3 unidades de *isopreno* (2-metil-1,3-butadieno) ^{20,22}. Sus constituyentes son biogénicamente derivados del *trans,trans*-farnesilpirofosfato (Figura 2). Su biosíntesis se encuentra bien detallada en la literatura ^{7,23}.

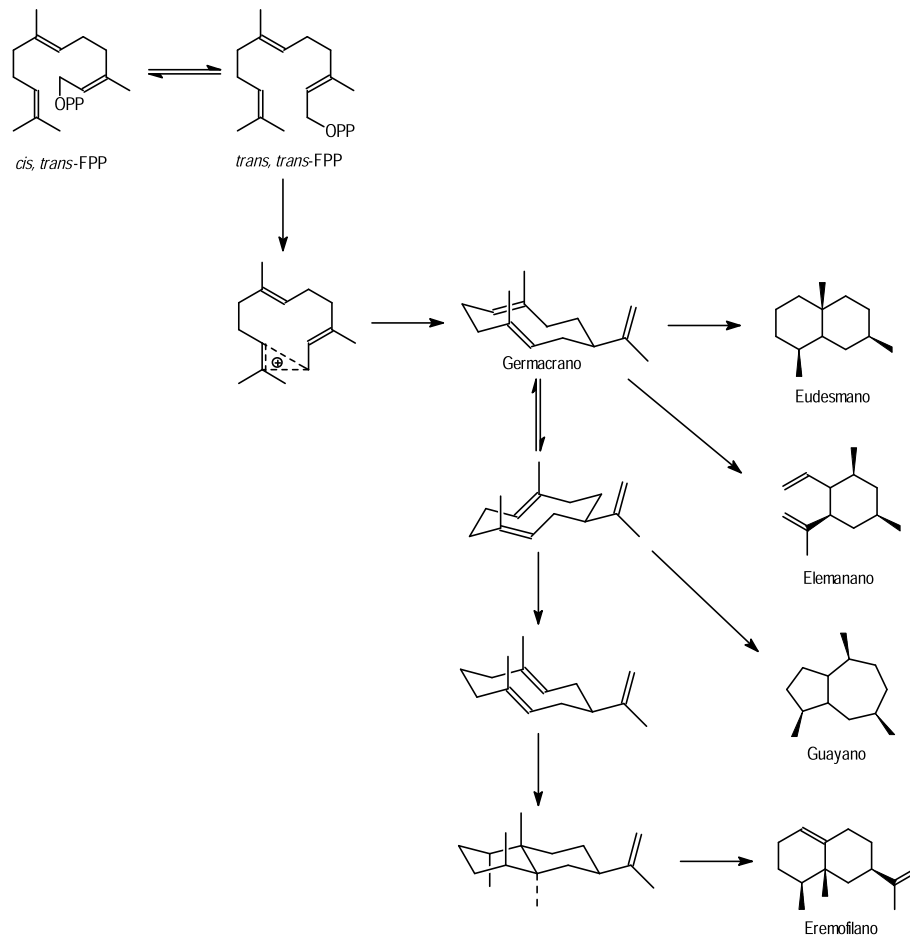


Figura 2. Ruta biosintética de los principales sesquiterpenos base de las lactonas ^{18,23}.

Las lactonas sesquiterpénicas son generalmente incoloras, de sabor amargo, y estables. Su distribución es bastante esporádica, localizándose principalmente en la familia *Compositae* (Compuestas). En dicha familia se encuentran en pelos secretores globulosos, en las hojas, en las bracteas de las inflorescencias, en los aquenios y son escasas en los tallos y raíces ¹⁸.

De acuerdo con su estructura se ha clasificado a las lactonas sesquiterpénicas en 30-35 grupos, sin embargo, la gran mayoría de las mismas se encuentran en 9 grupos principales (Figura 3) ^{7,9,24}.

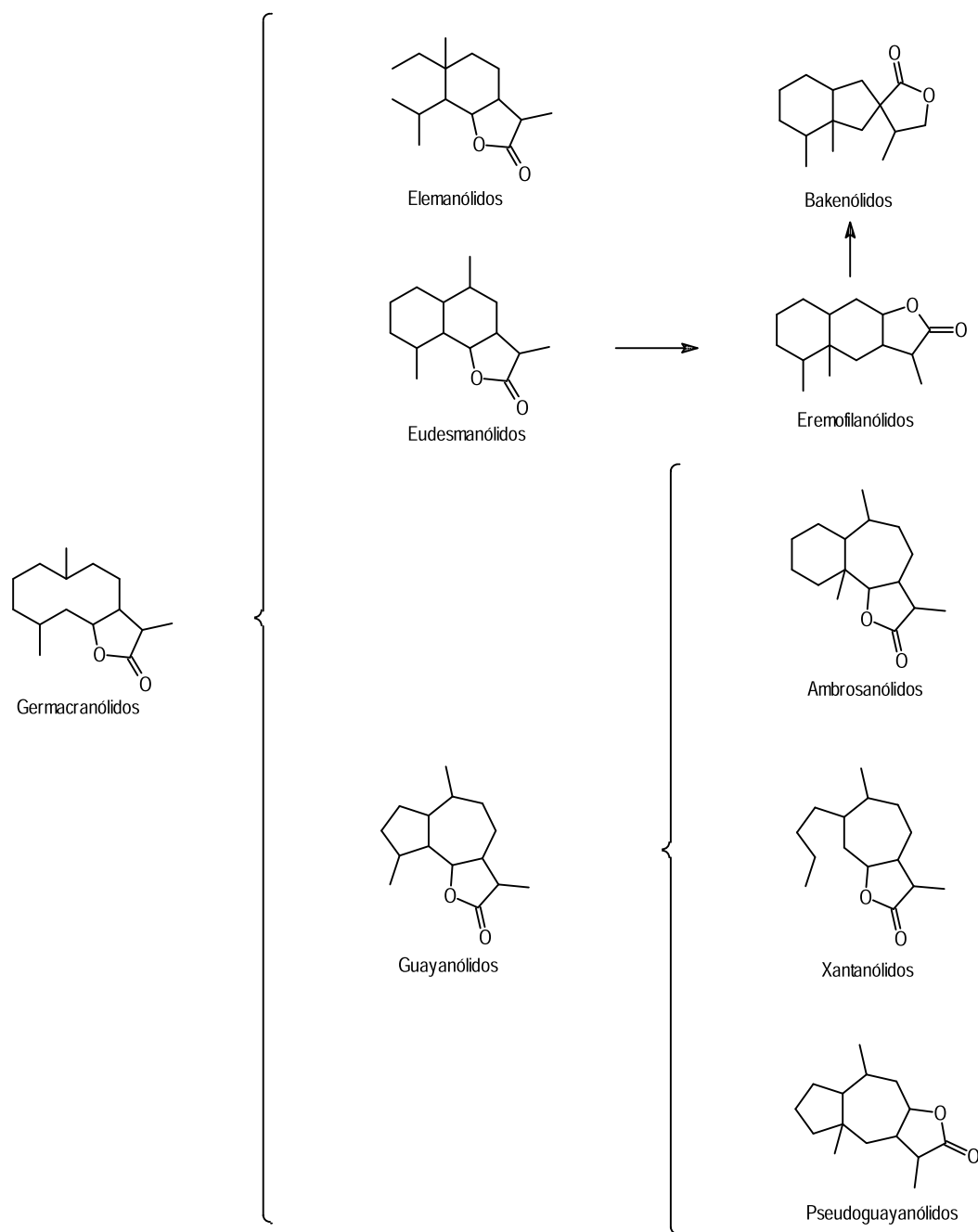


Figura 3. Principales esqueletos carbocíclicos de las lactonas sesquiterpénicas ¹⁸.

La característica principal e importante de las lactonas sesquiterpénicas es la presencia del anillo γ -lactona que puede estar cerrado hacia el carbono 6 ó hacia el carbono 8. Asimismo, presentan en muchos casos un grupo α -metileno y la incorporación de hidroxilos o hidroxilos esterificados. La forma glicosídica es rara y algunas lactonas incorporan átomos de halógenos o azufre ²⁴.

3.2.1 Actividades biológicas de las lactonas sesquiterpénicas.

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

Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas.				
Lactona sesquiterpénica	Fuente vegetal	Estructura	Actividad biológica*	Referencia
Bakkenólida A	<i>Petasis albus</i>	1	A	7 24
Helenalina	<i>Helenium autumnale</i>	2	A, B, H	7 24 25
Partenina	<i>Parthenium hysterophorus</i>	3	A, C, H, O	24 26
Xantatina	<i>Xanthium pennsylvacum</i>	4	B, C	24
Mikanólida	<i>Mikania monogasensis</i>	5	B, C	24
Cnicina	<i>Cnicus benedictus</i>	6	B	24
Pseudovalina	<i>Inula sp.</i>	7	C	24
Partenólida	<i>Tanacetum vulgare</i>	8	B	24
Saurina	<i>Saussurea sp.</i>	-	D	24
Sauripina	<i>Saussurea sp.</i>	-	D	24
Qinghaosu	<i>Artemisia annua</i>	9	E	27 24
Eremantina	<i>Eremanthus elaeagnus</i>	-	F	7
Constunólida	<i>Eremanthus elaeagnus</i>	10	F, O	7
Alantolactona	<i>Inula helenium</i>	11	C, G, H, J, K, O	24 26
Isoalantolactona	<i>Inula helenium</i>	12	C, H, J, K	26
α -Santonina	<i>Artemisia sp.</i>	13	G, H	7 24

Cuadro IV. Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas y su fuente natural.

Lactona sesquiterpénica	Fuente vegetal	Estructura	Actividad biológica*	Referencia
Canina	<i>Artemisia cana</i>	14	H	7 24 24
Coronopilina	<i>Iva xanthifolia</i>	15	C, H, N	25 26
Inulicina	<i>Inula japonica</i>	16	I	24
Amaralina	<i>Helenium amarum</i>	17	L	24
Enhidrina	<i>Enhydra fluctuans</i>	18	K	24
Damsina	<i>Pennisetum hysterophorus</i>	19	M	24
Ridentina	<i>Artemisia sp.</i>	20	A	7
Arteglasina A	<i>Artemisia douglasiana</i>	21	A, O	7
Vulgarina	<i>Artemisia vulgaris</i>	22	A	7
Arbusculina A	<i>Artemisia tridentata</i>	23	N	7
Achillina	<i>Artemisia ludoviciana</i>	24	N	7

*** Actividades biológicas:**

A. Citotóxica y antitumoral.	F. Antieschistosomida.	K. Antihipertensiva.
B. Antibacteriana.	G. Antihelmíntica.	L. Analgésica.
C. Antimicótica.	H. Insecticida.	M. Anticolinérgica.
D. Amebicida.	I. Estimulante del SNC.	N. Efecto tóxico en plantas.
E. Antimalárica.	J. Expectorante.	O. Dermatitis en humanos.

Cuadro IV (Continuación). Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas y su fuente natural.

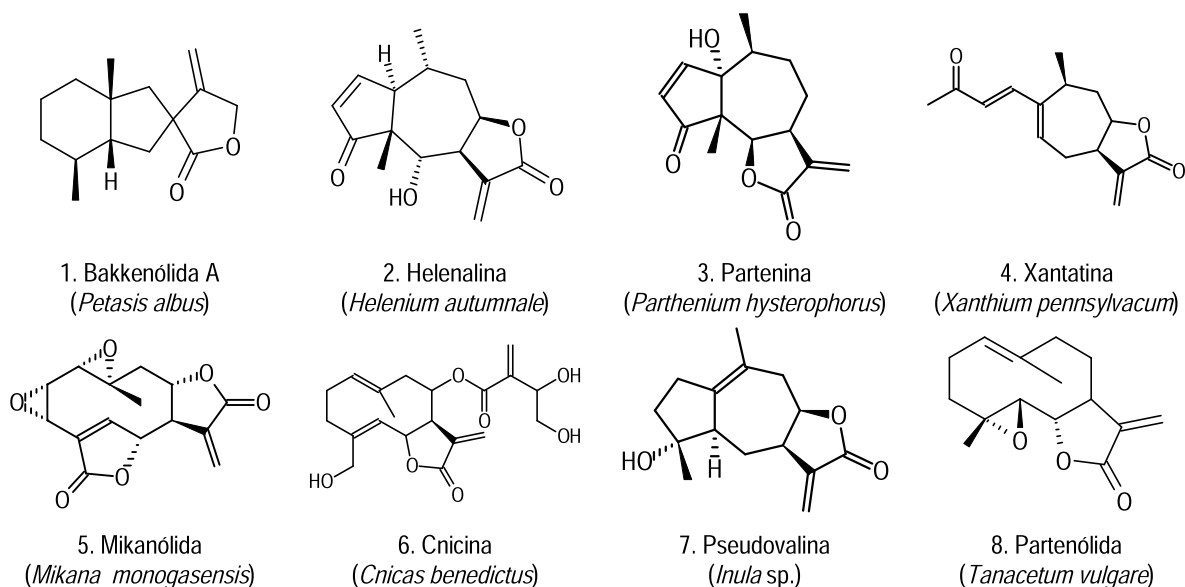


Figura 4. Estructuras de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica.

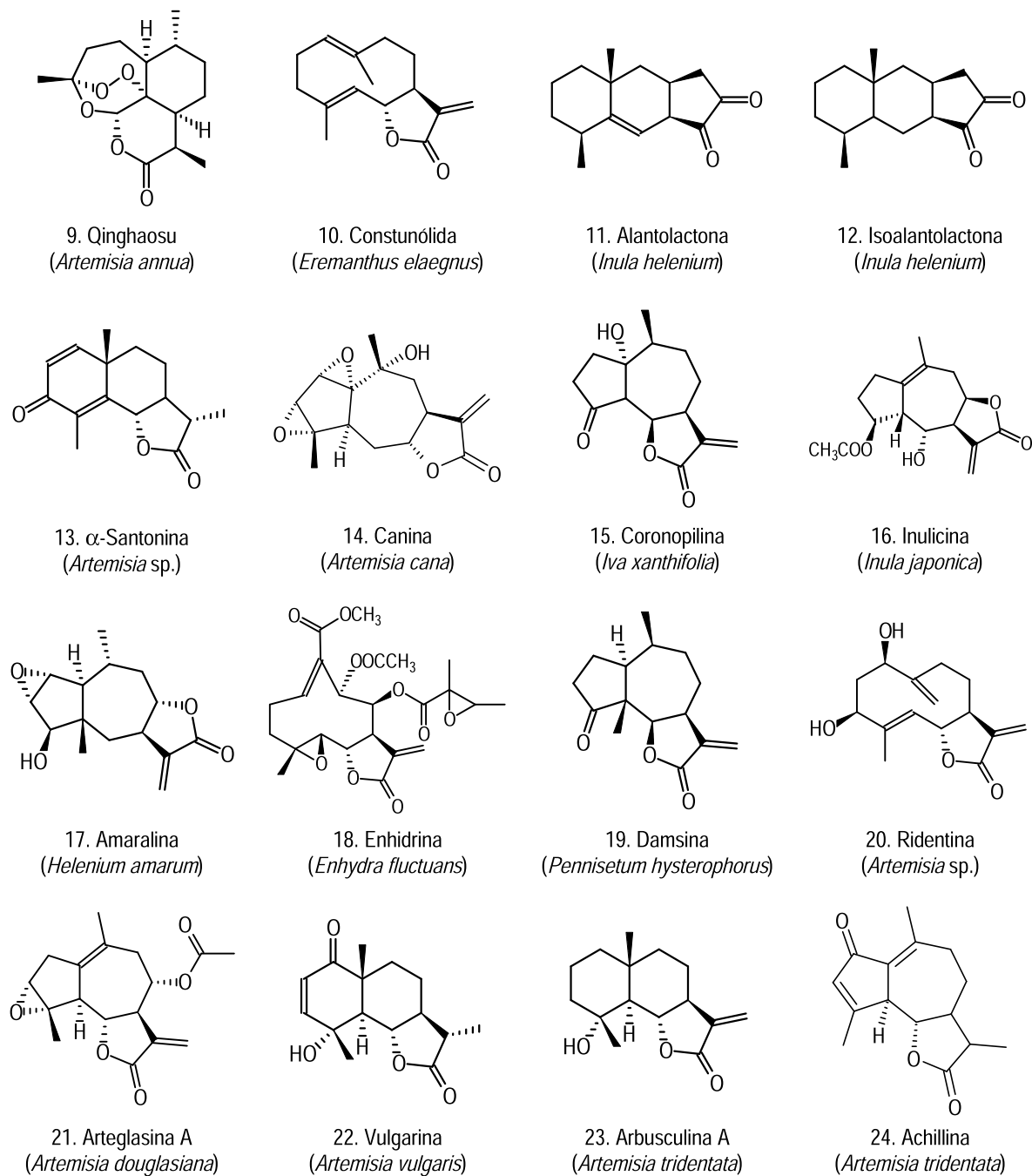


Figura 4 (Continuación). Estructuras de lactonas sesquiterpénicas con actividad biológica.

Estas actividades biológicas son generalmente el resultado de la reacción de las lactonas sesquiterpénicas con los grupos tioles de compuestos de vital importancia, tales como la cisteína y el glutatión (Figura 5). Cabe señalar que los estudios realizados hasta el momento sobre las estructuras químicas y la actividad biológica de dichos compuestos no han permitido llegar a una generalización sobre la relación estructura-actividad. Esto se debe a que existen otros grupos funcionales tales como epóxidos, hidroxilos, clorhidrinas, cetonas insaturadas u O-acilos en la molécula, además del grupo α -metileno- γ -lactona, del cual se sospecha que es responsable de muchas de las actividades de estas sustancias. Asimismo, deben de ser consideradas las diferencias fisiológicas y bioquímicas de los organismos que son utilizados en dichas investigaciones ^{7,27}.

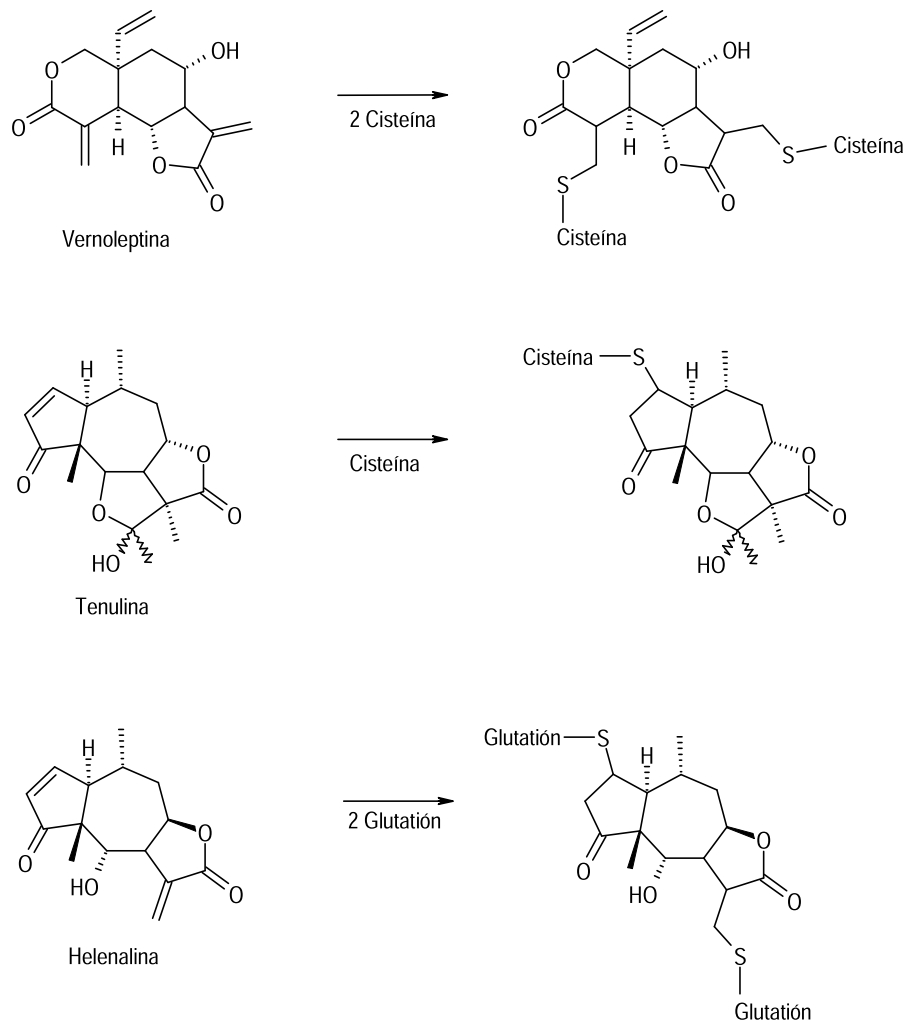


Figura 5. Reacción de algunas lactonas sesquiterpénicas con nucleófilos biológicos a través de una reacción de Michael ²⁷.

Recientemente se ha encontrado el mecanismo de acción de la actividad antiinflamatoria de algunas lactonas sesquiterpénicas. Se ha demostrado que la *helenalina*, *11 α ,13-dihidrohelenalina* y *chamissonólida*, inhiben selectivamente la activación del factor de transcripción NF- κ B^b en respuesta a cuatro estímulos diferentes en células T, células B y células epiteliales. Esta actividad está mediada químicamente por los carbonilos α,β -insaturados (α -metilen- γ -lactona, ciclopentanona α,β -insaturada) y por la conformación del esqueleto carbocíclico base (la conformación de *bote* es menos activa que la conformación de *silla*). Estas lactonas sesquiterpénicas son los primeros agentes antiinflamatorios que ejercen su efecto inhibiendo directamente la activación del factor de transcripción NF- κ B²⁸⁻²⁹.

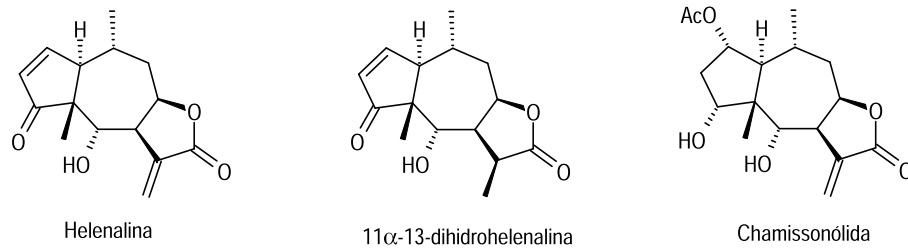


Figura 6. Estructuras de lactonas sesquiterpénicas antiinflamatorias que inhiben la activación del factor de transcripción NF- κ B²⁸⁻²⁹.

^b El factor de transcripción NF- κ B es un mediador central de la respuesta inmune humana. Regula la transcripción de varias citocinas inflamatorias, tales como las interleucinas 1, 2, 6 y 8 y TNF- α (factor necrótico tumoral), también como genes que codifican para ciclooxigenasa II, óxido nítrico sintasa, inmunorreceptores, moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento hematopoiético y receptores del factor de crecimiento. La inhibición farmacológica de NF- κ B atenúa sustancialmente procesos inflamatorios²⁸⁻²⁹.

3.3 Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos responsables de la coloración de numerosas hojas, flores y frutos que poseen 15 átomos de carbono, con un esqueleto C₆-C₃-C₆, es decir, dos anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 carbonos¹⁸. De esta manera se pueden distinguir tres estructuras básicas (Figura 7).

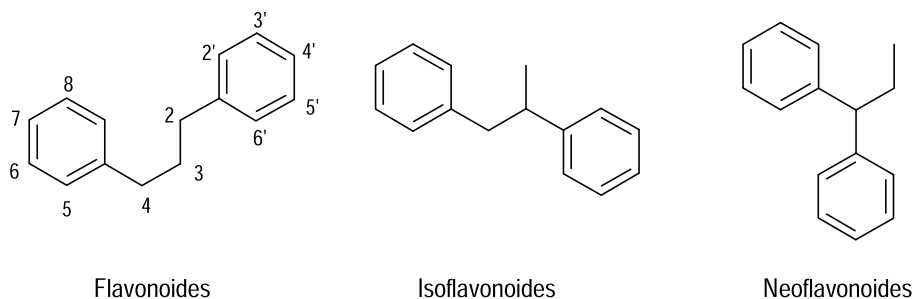


Figura 7. Estructuras básicas de los flavonoides.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas y se pueden encontrar tanto en forma libre como en glucósidos, estos últimos son los responsables de las coloraciones, mientras que las agliconas se encuentran en los tejidos leñosos^{19,30}.

El término flavonoide incluye a diferentes grupos muy diversos, las estructuras de dichos grupos se muestran en la Figura 8.

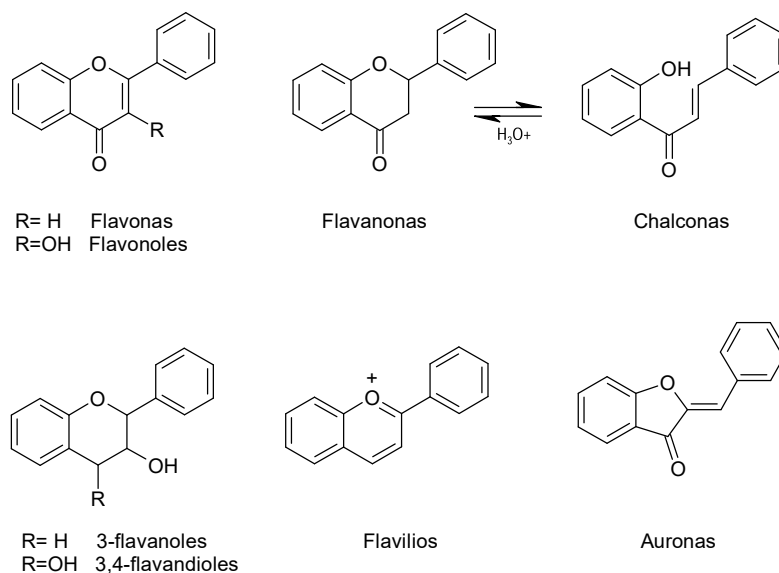


Figura 8. Diferentes grupos de flavonoides¹⁸.

Los flavonoides presentan una amplia variedad de actividades biológicas entre las que se pueden mencionar:

- Actividad antioxidante y protectora de radiaciones solares ³¹.
- Inhibidores enzimáticos ³².
- Disminución de la permeabilidad y fragilidad capilar ³³.
- Actividad antibacteriana ³⁴⁻³⁵.
- Actividad antifúngica ³⁶.
- Actividad citotóxica ³⁷⁻³⁸.
- Potenciación de la actividad antimalárica de la artemisinina ³⁹.

4. Actividades biológicas de plantas y metabolitos del género *Artemisia* L.

Las plantas del género *Artemisia* son aromáticas amargas ricas en metabolitos secundarios. Este género, a través de la historia ha sido fuente de medicamentos tradicionales, especias, condimentos y repelentes de insectos. Actualmente son fuentes de materias primas para la industria farmacéutica, alimenticia y de fragancias. En ésta última se estudian intensamente los terpenoides ²¹.

En el Cuadro V, se enlistan las actividades biológicas de diversas especies del género *Artemisia*, así como las sustancias o extractos responsables.

Actividades biológicas de plantas y metabolitos del género <i>Artemisia</i> L.			
Actividad biológica	Especie	Responsable de la actividad	Referencia
Antimalárica	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina y derivados Artemether Arteannuina	27 40
	<i>Artemisia abrotanum</i>	Extracto clorofórmico Isofraxidina Acetato de 1(S*)-hidroxi- α -bisabolóxido A	4
Antitumoral y citotóxica	<i>Artemisia cana</i>	Canina	7
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Vulgarina α -Santonina Ridentina	7
	<i>Artemisia douglasiana</i>	Arteglasina A	7
	<i>Artemisia ludoviciana</i>	Ludovicina A	7
	<i>Artemisia canariensis</i>	Vulgarina Tabarina	42
	<i>Artemisia absinthium</i>	Artemisetina	40
	<i>Artemisia xanthocroa</i>	Éter 7-metilico de Eridictiol	40
Incremento del flujo biliar	<i>Artemisia capillaris</i>	Extracto de flores Carpilartemisina A Carpilartemisina B	40
	<i>Artemisia scoparia</i>	p-Hidroxiacetofenona Escoparona	40

Cuadro V. Actividades biológicas de plantas y metabolitos del género *Artemisia* L.

Actividad biológica	Especie	Responsable de la actividad	Referencia
Insecticida	<i>Artemisia vulgaris</i>	Extractos de diferentes polaridades	40
	<i>Artemisia monosperma</i>	Aceites esenciales 3-Metil-3-fenil-1,4-pentadieno	43
	<i>Artemisia kurramensis</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia capillaris</i>	Cariofileno Epóxido de cariofileno	21
	<i>Artemisia borealis</i>	Poliacetilenos	44
	<i>Artemisia absinthium</i>	Extractos de diferentes polaridades	45
Anoréxica en insectos	<i>Artemisia vachanica</i>	Extracto etanol/agua	40
	<i>Artemisia couffifolia</i>	Extractos de diferentes polaridades	40
	<i>Artemisia capillaris</i>	Fenoléteres Metileugenol	46
Repelente de insectos	<i>Artemisia vulgaris</i>	α -Pino Terpenen-4-ol	21
Estimulación del apetito en insectos	<i>Artemisia princeps</i>	Fracciones hexánicas Fracciones alcohólicas	47
Alelopática	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina Acido arteannuico	40 21 48
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Metabolitos hidrofílicos	40
	<i>Artemisia sp.</i>	Achillina Aceites esenciales	21
	<i>Artemisia capillaris</i>	Capileno	49
	<i>Artemisia princeps var. orientalis</i>	Aceites esenciales Extracto acuoso	50 51
Antibacteriana	<i>Artemisia herbalba</i>	Aceites esenciales	52 53
	<i>Artemisia nilagirica</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia nilagirica</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia pallens</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia parviflora</i>	Aceites esenciales	40 54
	<i>Artemisia monosperma</i>	Flavonas y alcaloides	40
	<i>Artemisia haplophila</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia maritima</i>	Aceites esenciales	54
	<i>Artemisia moorcroftiana</i>	Aceites esenciales	54
	<i>Artemisia roxburghiana</i>	Aceites esenciales	54
<i>Artemisia princeps var. orientalis</i>	Aceites esenciales	50	
Antimicótica	<i>Artemisia sublessingiana</i>	Chysoeriol 5,7,4'-Trihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona	40
	<i>Artemisia nilagirica</i>	Aceites esenciales	40 55
	<i>Artemisia monosperma</i>	Flavonas y alcaloides	40
	<i>Artemisia vestita</i>	Aceites esenciales	40
	<i>Artemisia coerulescens</i>	Extracto hexánico	40
	<i>Artemisia drancunculus</i>	Aceites esenciales	54
	<i>Artemisia parviflora</i>	Aceites esenciales	54
	<i>Artemisia scoparia</i>	Aceites esenciales	54
<i>Artemisia princeps var. orientalis</i>	Aceites esenciales	50	

Cuadro V (Continuación). Actividades biológicas de plantas y metabolitos del género *Artemisia* L.

Actividad biológica	Especie	Responsable de la actividad	Referencia
Antiviral	<i>Artemisia parviflora</i>	Extractos de diferentes polaridades	40
Anticomplemento	<i>Artemisia princeps</i>	Fracciones de polisacáridos	56
	<i>Artemisia capillaris</i>	Fenilpoliacetilenos Cariofileno Metileugenol Acetato de boronilo	40
Antihepatotóxica	<i>Artemisia capillaris</i>	Extracto metanólico Eupatolitina Arcapillina	57
Anticonceptiva	<i>Artemisia absinthium</i>	Extracto etanólico	58
	<i>Artemisia scoparia</i>	Escoparona	40
Hipotensiva	<i>Artemisia scoparia</i>	Escoparona	40
Antihelmíntica	<i>Artemisia capillaris</i>	Extractos de hojas y tallo	40
	<i>Artemisia sieversiana</i>	Extracto de flores	40
	<i>Artemisia absinthium</i>	Tujona	40
Antidiabética	<i>Artemisia abyssinica</i>	Decocción acuosa	59
	<i>Artemisia herbalba</i>	Extracto acuoso	60
Antiadherente de células al vidrio	<i>Artemisia capillaris</i>	Extracto metanólico Ramnocitrina Capillarina	40
Anticoagulante	<i>Artemisia herbalba</i>	Acido galacturónico / Ramnosa	40
Anticonvulsiva	<i>Artemisia vulgaris</i>	Extracto acuoso	40
Antipirética	<i>Artemisia absinthium</i>	Extracto etanólico 24-etilcolesta-7,22-dien-3,β-ol	61
	<i>Artemisia coerulesens</i>	α-Santonina β-Santonina	62
Analgésica	<i>Artemisia capillaris</i>	Escoparona	40
Relajante del músculo liso	<i>Artemisia absinthium</i>	Absintina	40
Aumento en el nivel de corticosterona	<i>Artemisia sieversiana</i>	Extracto etanólico	40
Estimulación de la germinación	<i>Artemisia parviflora</i>	Extracto acuoso	40
Disminución de la permeabilidad capilar	<i>Artemisia paniculata</i>	Flavonoides	40
Antiinflamatoria	<i>Artemisia capillaris</i>	Escoparona	40
Inhibición de la peroxidación de lípidos	<i>Artemisia princeps</i>	Acido 3,5-di-O-cafeoilquinico Acido 4,5-di-O-cafeoilquinico	63
	<i>Artemisia montana</i>	Acido 3,5-di-O-cafeoilquinico Acido 4,5-di-O-cafeoilquinico	63
Inducción de la síntesis de inhibidores de proteinasas	<i>Artemisia tridentata</i>	Metiljasmonato	64

Cuadro V (Continuación). Actividades biológicas de plantas y metabolitos del género *Artemisia* L.

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue:

Realizar estudio químico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en dos lugares diferentes (San Rafael, Tlalmanalco, Estado de México y San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F.), con el objeto de determinar si la composición química de especie varía con respecto a las condiciones ambientales en la cual crece y asimismo, explorar si poseen sus extractos crudos actividad antimicrobiana o actividad tóxica en *Artemia salina* y si estas son diferentes entre las plantas.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Análisis químico.

a) *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* (San Rafael).

Artemisia ludoviciana ssp. *mexicana* fue colectada en el bosque de pino en los alrededores de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México el 7 de septiembre de 1996. Inmediatamente después, el material vegetal fue secado a la sombra y a temperatura ambiente. Una vez seco el material vegetal, se procedió a la obtención de los extractos crudos de acuerdo con el Diagrama 1. Una muestra del material fue enviada al Herbario Nacional MEXU en donde el vegetal colectado fue identificado por el Biol. Osvaldo Téllez.

Del **extracto etanólico de las partes aéreas**, se tomó una alícuota de 229 gramos en peso seco; la cual fue fraccionada por cromatografía en columna por elución a vacío con mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo de polaridad creciente y utilizando Sílica Gel 60G (450 g) como fase estacionaria. Se obtuvieron un total de 867 fracciones de 500 mL cada una, de donde se aislaron y caracterizaron las siguientes sustancias:

- Después de sucesivas cromatografías de las fracciones 109-169(231-267) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) y *n*-hexano-acetato de etilo (6:4) respectivamente, se aisló una sustancia cristalina, la cual fue purificada mediante recristalización por par de disolventes (acetona:*n*-hexano); obteniéndose 14.7 mg de cristales rómbicos transparentes con punto de fusión de 206-208 °C. La sustancia se identificó como la **Ludovicina A**, con base en los datos espectroscópicos de RMN¹H y COSY.
- De las fracciones 170-190 y 191-232 eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2), fue aislado un sólido blanco que cristalizó espontáneamente. Esta sustancia fue purificada mediante una recristalización por par de disolventes (acetato de etilo:*n*-hexano), obteniéndose 853.4 mg de un sólido cristalino de punto de fusión de 193-195 °C, por ello dicha sustancia fue caracterizada e identificada como la **Arglanina**, con base a sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas y por comparación con una muestra auténtica estándar.

- De las fracciones 109-169(466-510) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) en ambas cromatografías, fue identificada por medio de comparación en CCF con una muestra auténtica a la ***Armefolina***.
- De las fracciones 325-396(116) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (7:3) en ambas cromatografías, fue aislada después de sucesivas cromatografías, una sustancia en forma de agujas blancas. Esta fue purificada mediante recristalización por par de disolventes (acetato de etilo:*n*-hexano); de donde se obtuvieron 8.6 mg de un sólido cristalino amorfo, cuyo punto de fusión fue de 206-207 °C. Esta sustancia fue caracterizada por técnicas espectroscópicas y espectrométricas, como la ***Armexifolina***.

Del ***extracto diclorometánico de las partes aéreas***, se tomó una muestra de 142 g en peso seco, la cual fue fraccionada por cromatografía en columna por elución a vacío con mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo de polaridad creciente y utilizando Sílica Gel 60G (300 g) como fase estacionaria. De dicha fraccionación se obtuvieron 1405 fracciones de 400 mL cada una y, se aislaron y purificaron las siguientes sustancias:

- De las fracciones 304-351 y 416-438 eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) se aisló una sustancia cristalina blanca de punto de fusión de 197-200 °C y se recristalizó por medio de *n*-hexano:acetato de etilo obteniendo 167.7 mg, dicha sustancia fue identificada como ***Arglanina***.
- De las fracciones 288-303 y 352-382 eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) se aisló una mezcla de sustancias cuyo análisis indicó la composición de la mezcla como ***Arglanina*** y ***Ludovicina A***, de esta última se aislaron 21 mg al recristalizar con *n*-hexano:acetato de etilo un punto de fusión de 205-207 °C.
- De las fracciones 495-510 y 479-526(104-137) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (7:3) y eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) respectivamente, se aisló un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 207-208 °C que al cristalizarlo en *n*-hexano:acetato de etilo

se obtuvieron 4.1 mg. Esta sustancia fue identificada como la **Armexifolina** por comparación de sus propiedades espectroscópicas y físicas con la aislada en el extracto etanólico.

- De las fracciones 439-478 eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (7:3) se obtuvieron 8.2 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 203-205 °C que se identificó por comparación con una muestra auténtica obtenida del extracto diclorometánico de *A. ludoviciana* colectada en Milpa Alta, como la **Achillina**.
- De las fracciones 288-303(104) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (8:2) en ambas cromatografías, se aisló un sólido amarillo pálido. Esta sustancia se purificó por medio de recristalización por par de disolventes (*n*-hexano:acetato de etilo), obteniéndose 10.1 mg con un punto de fusión 261-263 °C. Esta sustancia se identificó como la **Artemetina** con base a sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas.

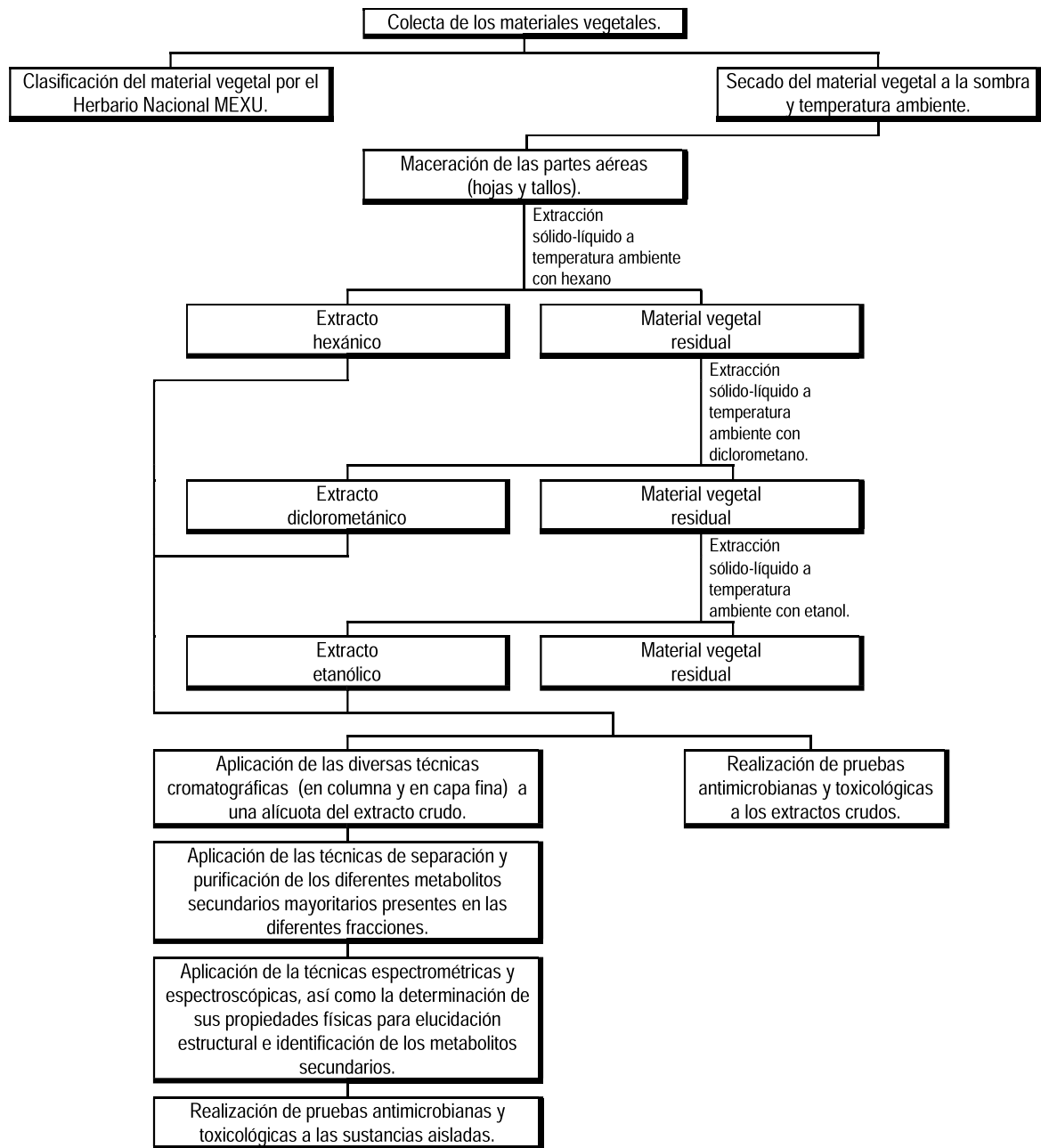


Diagrama 1. Diagrama de bloques que muestra el procedimiento seguido para la elaboración de los extractos a partir de cada uno de los vegetales colectados.

b) *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* (Milpa Alta).

Artemisia ludoviciana ssp. *mexicana* fue colectada a 50 m al norte de la carretera La Cruz-Loma Bonita en San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F., en septiembre de 1996. El material vegetal colectado fue secado a la sombra y temperatura ambiente para posteriormente obtener los diferentes extractos crudos de acuerdo con el Diagrama 1.

Del **extracto diclorometánico de las partes aéreas** se tomó una muestra de 274 g en peso seco. Esta muestra fue fraccionada por cromatografía en columna por elución a vacío con mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo de polaridad creciente y utilizando Sílica Gel 60G (560 g) como fase estacionaria, obteniendo 426 fracciones de 600 mL cada una. Las siguientes sustancias fueron aisladas y caracterizadas:

- De las fracciones 141-159 obtenidas al eluir la columna con *n*-hexano:acetato de etilo (93:7) y de la recromatografía de las fracciones 95-140 obtenidas con *n*-hexano:acetato de etilo (95:5), se aislaron 46.7 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 103-104 °C. Esta sustancia fue caracterizada por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas como la ***Estafiatina***.
- En las fracciones 188-217 obtenidas al eluir con *n*-hexano:acetato de etilo (85:15) se obtuvieron 19.1 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 203-205 °C. Dicha sustancia fue caracterizada como la ***Achillina*** de acuerdo a la información proporcionada por las técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- De las fracciones 279-309 eluidas con *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) se obtuvieron 27.2 mg de un sólido cristalino amarillo con punto de fusión de 237-238 °C, el cual fue caracterizado por técnicas espectroscópicas y espectrométricas como la ***Eupatilina***.
- Al tratar las fracciones 279-309 con diazometano en éter etílico, se obtuvieron 36.3 mg de un sólido cristalino amarillo-verdoso con un punto de fusión de 183-186 °C. De acuerdo a técnicas espectroscópicas se caracterizó dicha sustancia como ***5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona***.

- A partir de las fracciones 528-651, obtenidas a eluir con *n*-hexano:acetato de etilo (1:1) se obtuvieron 327.6 mg de un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 199 °C, caracterizada como la **Ridentina** por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

c) Aceites esenciales

Se realizó una destilación por arrastre con vapor al material fresco recién colectado de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, colectada tanto en San Rafael, Tlalmanalco como en San Pedro Atocpan, Milpa Alta en septiembre de 1998, para obtener sus respectivos aceites esenciales.

A los aceites esenciales obtenidos se les realizó el bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L. y pruebas antimicrobianas.

2. Evaluaciones biológicas.

a) Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*⁶⁵⁻⁶⁶.

Preparación de las muestras. Las muestras fueron preparadas disolviendo 20 mg del extracto o sustancia en 2 mL de disolvente^c. De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 μL a viales de 20 mL, utilizando 3 viales por dilución. Además, se agregaron 500 μL del disolvente utilizado a un vial que funcionó como blanco. Las muestras se dejaron evaporar 48 horas antes de iniciar el bioensayo. Las concentraciones finales de cada dilución fueron 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Preparación de las larvas de *Artemia salina* L. 50 mg de huevecillos de *Artemia salina* L. marca *Neptune* se colocaron en la parte oscura de la pecera para tal propósito (Figura 9), que contenía 600 mL de agua de mar artificial con aeración ligera continua. Después de 48 horas las larvas fototrópicas fueron colectadas y empleadas para el desarrollo del bioensayo.

Bioensayo. A los viales que contenían las muestras, se les agregó 200 μL de DMSO^d y 1.5 mL de agua de mar artificial. Posteriormente, se adicionaron 10 larvas a cada vial y se aforaron a un volumen de 5 mL. El blanco fue tratado de igual manera. Los viales fueron mantenidos bajo iluminación y las larvas sobrevivientes fueron contadas después de 24 horas. Se determinaron los porcentajes de larvas muertas para cada dosis y blanco^e y se calculó la concentración letal media (CL_{50}) mediante un programa de cómputo que utiliza el análisis probit⁶⁵⁻⁶⁶.

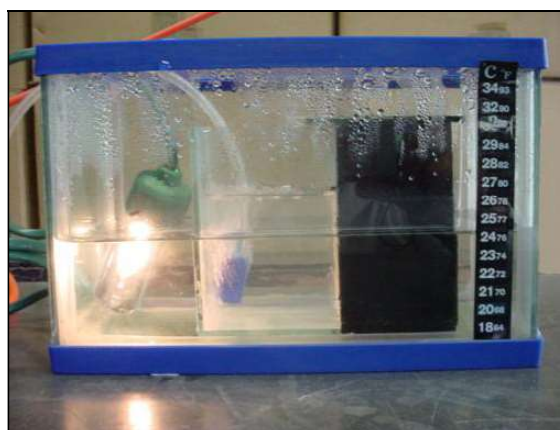


Figura 9. Pecera adaptada para el bioensayo en *Artemia salina* L.

^c En cada extracto se utilizó el disolvente con el que fue preparado.

^d El DMSO se utiliza para disolver completamente el extracto debido a que es el disolvente menos tóxico para la *A. salina* L.⁶⁷

^e En los casos donde hubo muertes en el control, los datos fueron corregidos utilizando la fórmula de Abbott: %muertes = [(prueba - control) / control] x 100⁶⁶.

b) Evaluación antimicrobiana por el método de Mitscher ⁶⁷.

Preparación de los microorganismos. Los microorganismos, mantenidos en agar de soya tripticaseína, se inocularon en caldo de soya tripticaseína. Después de una incubación de 24 horas, los cultivos fueron diluidos 1:100 con 9.9 mL de solución salina estéril al 0.9 % y 0.1 mL de los cultivos. Esta última dilución es la que se utilizó en el bioensayo. Los ocho microorganismos utilizados fueron: *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Micrococcus luteus* (ATCC 934) y *Streptococcus faecalis* (ATCC 10741).

Preparación de las muestras. Se pesaron 20 mg de extracto y se colocaron en un vial, posteriormente, se agregaron 0.2 mL de Tween 80 y 0.8 mL de solución salina estéril al 0.9 %. Finalmente la mezcla se agitó hasta disolver completamente la muestra.

Esta dilución se mezcló asepticamente, con 38 mL del medio AST a 50 °C y se vació en partes iguales a dos cajas Petri estériles. Una vez solidificado el medio se incubaron a 37 °C por 24 horas para realizar la prueba de esterilidad.

En el control positivo se utilizó el sulfato de estreptomicina como muestra y en el control negativo se utilizó solamente la mezcla de 0.2 mL de Tween 80 y 0.8 mL de solución salina estéril al 0.9 %.

Bioensayo. Los microorganismos fueron sembrados por medio de la técnica de estría en patrón radial (Figura 10), utilizando los ocho microorganismos por caja Petri ⁶⁷⁻⁶⁸.

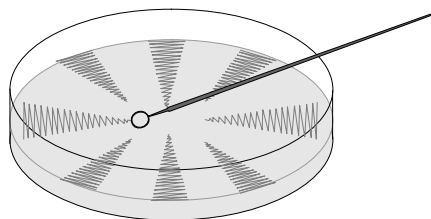


Figura 10. Esquema que muestra la forma en que se siembran los diferentes microorganismos en las cajas Petri, cada patrón radial es un microorganismo diferente.

Una vez inoculadas las cajas Petri se incubaron a 37 °C por 24 horas. Al término de la incubación, los resultados se leyeron de la siguiente manera:

- Aquellos microorganismos a los que hubo una inhibición total del crecimiento se consideran inhibidos y al extracto se considera activo contra dicho microorganismo a la concentración utilizada.
- Aquellos microorganismos a los que no hubo una inhibición del crecimiento se consideran no inhibidos y al extracto se considera inactivo contra dicho microorganismo a la concentración utilizada.
- Aquellos microorganismos a los que no hubo una inhibición del crecimiento pero su crecimiento fue menor al crecimiento obtenido en el blanco, se consideran no inhibidos y al extracto como poco activo contra dicho microorganismo a la concentración utilizada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en San Rafael Tlalmanalco, Estado de México

Extracto etanólico.

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

En su espectro de IR (espectro 1) se observa en 3459 cm^{-1} una banda fina que indica la presencia de un grupo hidroxilo; mientras que en 1748 y 1670 cm^{-1} se observan dos bandas correspondientes al grupo carbonilo de una α -metileno- γ -lactona y para una cetona α,β -insaturada⁶⁹⁻⁷⁰ respectivamente.

En su espectro de RMN¹H (espectro 2), se visualiza en δ 4.15 una señal triple (1H, $J = 11$ Hz) característica de H-6, el cual se acopla con una señal doble ubicada en δ 2.57 (1H, $J = 11$ Hz) que corresponde al hidrógeno de la posición cinco (H-5). El valor de la constante de acoplamiento ($J = 11$ Hz), sugiere que la fusión de los anillos A y B es *trans* (*trans*-decalina). Asimismo, se observa una señal múltiple en δ 2.51 (1 H, $J = 11$ Hz) que se acopla con H-6 y que se puede asignar a H-7, lo cual indica que se trata de una γ -lactona cerrada en la posición 6 con una fusión *trans* (H-6 β_{ax} - H-7 α_{ax})⁷¹ como se observa en la figura 11.

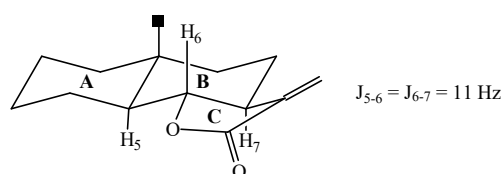


Figura 11. Disposición espacial de los hidrógenos H-5, H-6 y H-7.

Además se observan dos señales simples que aparecen en δ 1.23 (s, 3H) y δ 1.57 (s, 3H) para los metilos 14 y 15 respectivamente.

Las señales correspondientes a los hidrógenos geminales del doble enlace exocíclico de la γ -lactona, se observan en δ 6.17 (d, 1H, $J = 3$ Hz) para H-13b y δ 5.52 (d, 1H, $J = 3$ Hz) para H-13a. La diferencia en desplazamiento químico entre H-13b y H-13a es debido al efecto de anisotropía generado por el grupo carbonilo de la lactona sobre el H-13b ⁷²⁻⁷³ (figura 12).

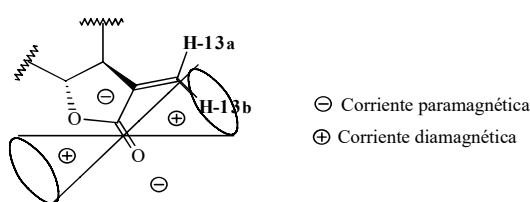


Figura 12. Posición de los hidrógenos H-13a y H-13b y efecto de anisotropía sobre H-13b.

Las señales dobles centradas en δ 6.63 (1H, $J = 10.5$ Hz) y δ 5.92 (1H, $J = 10.5$ Hz) ponen de manifiesto un sistema AB, que corresponde a la cetona α,β -insaturada que es confirmada en su espectro de IR. Dicho grupo funcional se ubica en el anillo A del esqueleto base, por lo que dichas señales se asignaron a H-3 y H-2 respectivamente. Además, el desplazamiento a campo bajo del CH₃-15, indica su posición geminal al grupo hidroxilo. De esta manera se establece la estructura parcial de la figura 13.

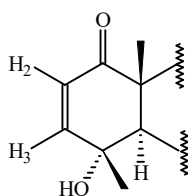


Figura 13. Estructura parcial de la sustancia obtenida de las fracciones 191-223.

Este análisis, más la comparación de los datos descritos con los informados en la literatura ^{12,74-76}, permitieron establecer la identidad de la sustancia como la *Arglanina*.

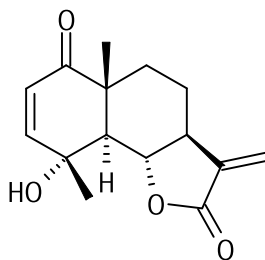


Figura 14. Arglanina.

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

En su espectro de IR, muestra en 3532.3 cm⁻¹ una banda que indica la presencia de un grupo hidroxilo y en 1797.9 cm⁻¹ la banda correspondiente a un grupo carbonilo de una γ -lactona.

En su espectro de RMN¹H (espectro 4), se observan las señales características de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de eudesmano: a δ 4.09 (*dd*, 1H, *J* = 11, 12 Hz) la señal de H-6, la cual, de acuerdo con el espectro COSY (espectro 5) interacciona -se acopla- con H-5 y H-7, los cuales aparecen en δ 2.33 (*d*, 1H, *J* = 12 Hz) y δ 2.43 (*m*, 1H) respectivamente. La constante de acoplamiento indica, nuevamente, la fusión *trans* de la lactona. Asimismo, las señales en δ 1.35 (*s*, 3H) y δ 0.81 (*s*, 3H) corresponden a CH₃-15 y CH₃-14, mientras que en δ 5.93 (*d*, 1H, *J* = 3 Hz) y δ 5.51 (*d*, 1H, *J* = 3 Hz) se observan las señales a H-13b y H-13a del doble enlace exocíclico, confirman la estructura base propuesta.

La señal que resuena en δ 4.41 corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo, esto se comprueba cuando se equilibra con D₂O (espectro 6), donde dicha señal desaparece.

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

Por otro lado, se observa en δ 2.82 una señal doble ($J = 5$ Hz) que integra para un hidrógeno que por su desplazamiento químico puede ser asignado a un hidrógeno base de un epóxido. Mientras que la señal múltiple en δ 2.14 fue asignada al hidrógeno H-2 α_{ec} , como se muestra en la figura 15.

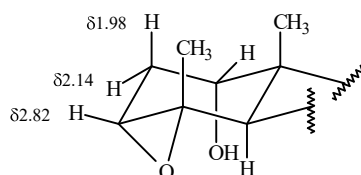


Figura15. Estructura parcial de la sustancia obtenida de las fracciones [109-169(231-267)].

El análisis anterior y la comparación de los datos experimentales con los informados en la literatura ^{12,77}, confirman la identidad de la sustancia como la *Ludovicina A*.

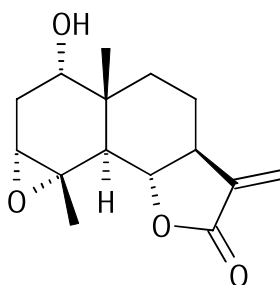


Figura 16. Ludovicina A.

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

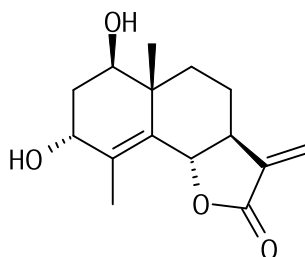


Figura 17. Arnefolina.

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

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

En su espectro de RMN¹³C (espectro 8) en desacoplamiento total, se observan 15 señales, que por su desplazamiento químico, confirma de que se trata de una lactona sesquiterpénica, que incorpora presumiblemente a una cetona α,β -insaturada en el anillo A. Asimismo la multiplicidad encontrada en su espectro de RMN¹³C aplicando la técnica DEPT (espectro 9), indica que la molécula presenta 2 metilos, 4 metilenos, 3 metinos y los restantes son carbonos cuaternarios⁷⁸.

Su espectro de RMN¹H (espectro 10), muestra una señal a δ 4.74 (*dd*, 1H, $J = 13.5, 2\text{ Hz}$) correspondiente a H-6, el cual, se acopla o interacciona con las señales observadas a δ 2.8 (*m*, 1H) y δ 2.05 (*d*, 3H, $J = 2\text{ Hz}$), de acuerdo con lo observado en su espectro COSY (espectro 11), donde la primer señal corresponde a H-7, mientras que la segunda corresponde al CH₃ unido al C-4, con el cual existe un acoplamiento de tipo alílico ($J = 2\text{ Hz}$). Esta observación confirma que se trata de una lactona con esqueleto de eudesmano, con fusión *trans*, debido a que su acoplamiento es de 13 Hz, es muy grande con respecto al valor informado en la literatura para una fusión *cis* (9 Hz), en la figura 18 se muestra un fragmento de la molécula, donde es posible situar a la cetona α,β -insaturada.

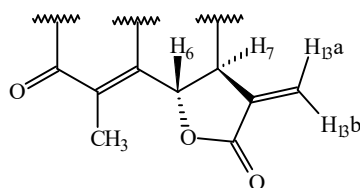


Figura 18. Posición de la cetona α,β -insaturada en el anillo A de la sustancia en discusión.

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

A δ 3.9 (*dt*, 1H, $J = 12.5, 4$ Hz) se observa la señal de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo (el cual se había puesto de manifiesto en el espectro de IR) que se acopla con las señales centradas en δ 2.7 (*dd*, 1H, $J = 16, 5$ Hz) y δ 2.61 (*dd*, 1H, $J = 13, 16$ Hz). Además, estas últimas señales se acoplan entre si. Dicho acoplamiento se determina con base en la semejanza de sus constantes de acoplamiento y de su espectro COSY (espectro 11). En este último no se observa un acoplamiento con H-7, lo que sugiere que las tres señales anteriores no corresponden a H-9 ni a H-8.

Debido al desplazamiento químico mostrado por el hidrógeno geminal al hidroxilo, no puede ser situado en la posición 2, ya que sería α a un carbonilo y por lo tanto, debería presentar un desplazamiento a campo bajo. Las señales anteriores son asignadas a H-1, H-2 α *pseudo-ecuatorial* y H-2 β *pseudo-axial* respectivamente, obteniéndose la estructura de la figura 19.

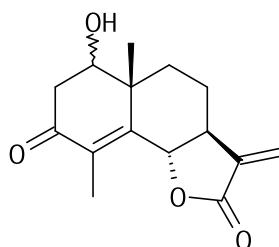


Figura 19. Posición definitiva del hidroxilo en el anillo A sin estereoquímica definida.

Si el hidroxilo se encuentra en posición α -axial, la sustancia será la lactona conocida como Ludovicina C; sin embargo, al comparar los datos obtenidos con los reportados para la Ludovicina C,⁷⁷ difieren ligeramente en los máximos de absorción en su espectro de IR, en el desplazamiento químico de algunos protones y en el punto de fusión (cuadro V).

Comparación de los datos de la Ludovicina C y de la sustancia en discusión.		
Datos	Ludovicina C	Sustancia en discusión
Máximos de absorción IR (cm ⁻¹)	3525	3619
	1760	1774
	1670	1674
	1630	1622
Punto de fusión (°C)	193-195	206-207
Desplazamiento químico de algunos protones	δ 4.61 (H-6)	δ 4.74 (H-6)
	δ 2.00 (H-15)	δ 2.05 (H-15)
	δ 3.75 (H-1, J= 3, 4 Hz)	δ 3.9 (H-1, J= 4, 12.5 Hz)
	δ 1.32 (H-14)	δ 1.29 (H-14)
	δ 6.18 (H13b)	δ 6.25 (H13b)
	δ 5.53 (H-13a)	δ 5.57 (H-13a)

Cuadro V. Comparación de los datos descritos para la Ludovicina C⁷⁷ y los determinados en la sustancia en discusión.

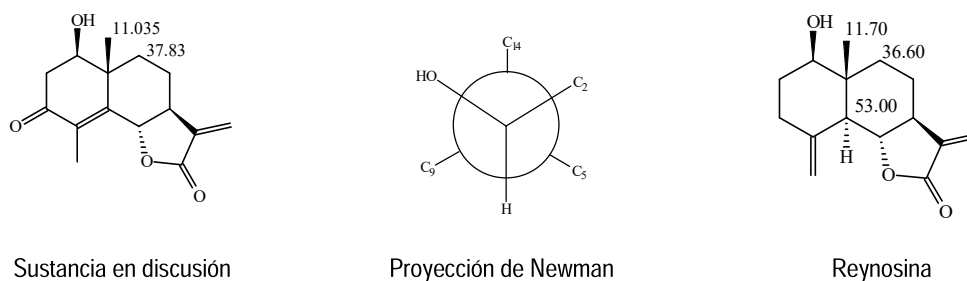
La diferencia más notable y determinante para afirmar que no se trata de la Ludovicina C, es el desplazamiento químico de H-1 ($\Delta\delta = -0.15$) y su constante de acoplamiento; este último dato presenta una diferencia muy grande ($\Delta J = 9.5$ Hz).

La orientación espacial del grupo hidroxilo, fue determinado en función de los desplazamientos químicos mostrados por los diferentes carbonos de dicha sustancia, efecto conocido como *Efecto γ -Gauche*⁷².

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

Cuadro VI. Desplazamientos químicos de los carbonos de la sustancia en discusión.

En la figura 20 se muestran las estructuras de la sustancia en discusión, suponiendo una configuración β -*ecuatorial* del hidroxilo, y de la Reynosina ⁷²; así como la proyección de *Newman* de las mismas. En dicha figura se observa que si el hidroxilo se encuentra en la orientación indicada, ejerce un efecto de protección γ -*Gauche* sobre C-9 y C-14, pero no sobre C-5 que se encuentra en orientación antiperiplanar.



Sustancia en discusión

Proyección de Newman

Reynosina

Figura 20. Efecto γ -*Gauche* en los carbonos C-9 y C-14 de la Reynosina y de la sustancia en discusión.

Comparando los desplazamientos químicos de estos carbonos en dichas sustancias, se observa una similitud en los mismos. Pero al comparar éstos con los reportados para la Arbusculina ⁷², sustancia en la cual no existe ningún hidroxilo en el C-1 (figura 21), se observa un desplazamiento a campo bajo para los C-9 y C-14 de la Arbusculina, lo cual confirma que la relación espacial del grupo hidroxilo situado en una posición β -*ecuatorial* ejerce un efecto γ -*Gauche* sobre los C-9 y C-14.



Figura 21. Ausencia del efecto γ -*Gauche* en los carbonos C-9 y C-5 de la Arbusculina⁵².

Asimismo, al hacer la comparación de los mismos desplazamientos con los descritos para la Ludovicina B, sustancia en la cual el grupo hidroxilo del C-1 se encuentra en posición α -*axial*, no se observa el efecto γ -*gauche* con el C-14 debido a su posición antiperiplanar con respecto al grupo hidroxilo del C-1. Sin embargo, se observa el efecto γ -*gauche* que ejerce el grupo hidroxilo sobre los carbonos C-9 y C-5, debido al desplazamiento químico de los mismos hacia campo alto (figura 22).

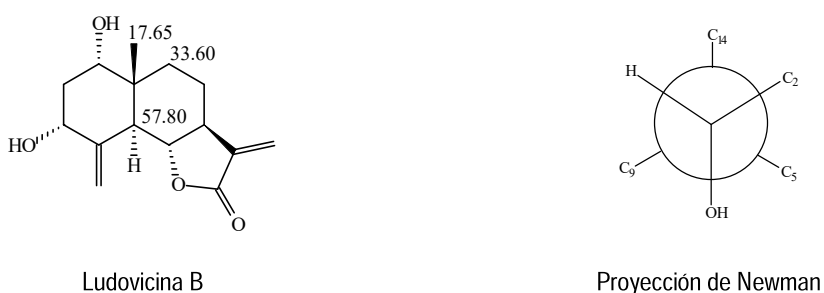


Figura 22. Efecto γ -*Gauche* en los carbonos C-9 y C-5, y ausencia del mismo en el C-14 de la Ludovicina B.

Con el análisis anterior, se concluye que la orientación del hidroxilo del C-1 se encuentra en una configuración β -*ecuatorial*. Cabe señalar que la sustancia en discusión fue descrita en 1984 como producto de la oxidación de la Armefolina ⁷⁹. Los datos obtenidos del producto derivado de la oxidación concuerdan con los encontrados en la sustancia aislada (figura 23).

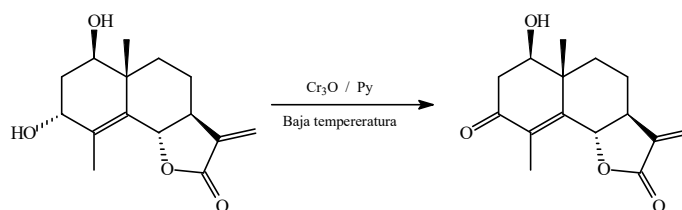


Figura 23. Reacción de oxidación de la Armefolina.

Además, los datos de la sustancia aislada de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* concuerdan con una sustancia aislada en 1977 de *Artemisia mexicana* var. *angustifolia* denominada *Armexifolina*, en la cual la posición del hidroxilo no estaba bien definida, situándolo preferentemente en el C-9⁸⁰.

De esta manera se concluye que la *Armexifolina* y la sustancia aislada de las fracciones 325-396(116), en discusión en el presente trabajo, son la misma.

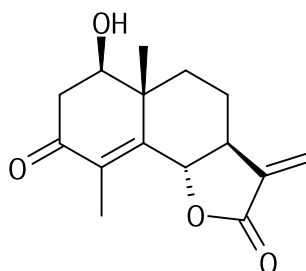


Figura 24. Armexifolina.

Cabe destacar que los datos de RMN¹H de la Armexifolina obtenida en 1984 se obtuvieron en un equipo de 100 MHz y los obtenidos en el presente estudio en un equipo de 500 MHz; por lo que estos últimos datos, corrigen a algunos de los informados anteriormente:

- La multiplicidad de la señal de H-1 es un doble de tripletes (*dt*) y no doble de doble (*dd*).
- La multiplicidad de la señal de H-2 informada como un multiplete (*m*), son dos señales diferentes, una a δ 2.7 para H-2 α *ec* y la otra a δ 2.61 para H-2 β *ax*, ambas con una multiplicidad doble de doble (*dd*).
- El desplazamiento químico de H-6 es δ 4.74 con una multiplicidad doble de doble (*dd*), y no un desplazamiento de δ 4.27 con una multiplicidad doble de cuarteto (*dq*).

- d) La multiplicidad de la señal de H-14 es doble de doble (*dd*), y no un singulete (*s*) como se había informado.

Por último, en los datos de RMN¹³C los desplazamientos para C-11 y C-12 informados en 1984 se encuentran invertidos, es decir, los desplazamientos correctos son: para C-11, δ 137.7, y para C-12, δ 169.1; y no δ 169.0 y δ 137.9, respectivamente, como se encontraban informados. Esto es debido a que el C-12, es el carbono del carbonilo de la lactona y el C-11 es carbono base del doble enlace exocíclico, por lo que el desplazamiento de este último debe ser menor.

Extracto diclorometánico.

De las fracciones 304-351 y 416-438 se aisló una sustancia cristalina blanca de punto de fusión de 197-200 °C y se recristalizó por medio de *n*-hexano:acetato de etilo obteniendo 167.7 mg, dicha sustancia fue identificada como **Arglanina** por comparación de sus propiedades espectroscópicas y físicas con la aislada en el extracto etanólico.

De las fracciones 288-303 y 352-382 se aisló una mezcla de sustancias cuyo análisis espectroscópico indicó la composición de la mezcla como **Arglanina** y **Ludovicina A**, de esta última se aislaron 21 mg al recristalizar con *n*-hexano:acetato de etilo un punto de fusión de 205-207 °C.

De las fracciones 495-510 y 479-526(104-137) se aisló un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 207-208 °C que al cristalizarlo en *n*-hexano:acetato de etilo se obtuvieron 4.1 mg. Esta sustancia fue identificada como la **Armexifolina** por comparación de sus propiedades espectroscópicas y físicas con la aislada en el extracto etanólico.

De las fracciones 439-478 se aislaron 5 mg de un sólido cristalino blanco cuyo punto de fusión fue de 203-205 °C. Esta sustancia se identificó por comparación con una muestra auténtica obtenida del extracto diclorometánico de *A. ludoviciana* de San Pedro Atocpan, como la **Achillina**.

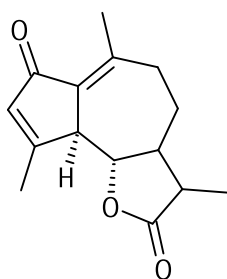


Figura 26. Achillina.

De las fracciones 288-303(104) se aisló un sólido amarillo pálido. Esta sustancia se purificó por medio de recristalización por par de disolventes (*n*-hexano:acetato de etilo), obteniéndose 10.1 mg con punto de

fusión 161-163 °C. Al realizarle cromatografía en capa fina y al revelarla con FeCl₃ al 1 % en etanol dio una coloración café característica de los flavonoides ⁸¹.

En su espectro de EM(IE) se observa un ión molecular a m/z 388 (100 %) el cual es adecuado para una fórmula molecular de composición elemental C₂₀H₂₀O₈ con 11 grados de insaturación ($\Omega = 11$), además se observa un pico a m/z 373 (71 %) que corresponde a [M-15]⁺ congruente con la pérdida de un grupo metilo que sugiere la presencia de uno o varios grupos metoxilo y muy probablemente en la posición 6;¹² esta misma fórmula además, sugiere que la molécula del flavonoide incorpora un grupo hidroxilo y 5 grupos metoxilo.

En su espectro de RMN¹H (espectro 13) las señales simples que integran para 3 hidrógenos que se observan en δ 3.975, δ 3.973, δ 3.967, δ 3.929 y δ 3.872 confirman la presencia de los 5 grupos metoxilos en la molécula.

En δ 12.6, se observa una señal simple, que de acuerdo a su desplazamiento es asignado al hidrógeno del hidroxilo quelatado en C-5, comprobación realizada cuando en su espectro de RMN¹H se equilibra con D₂O, con la cual la señal casi desaparece.

En δ 6.5 se observa una señal simple que integra para un hidrógeno, que puede asignarse a H-8 ó a H-3 de acuerdo al desplazamiento, de cualquier forma, el flavonoide en cuestión tiene una estructura base de *flavona*.

La señal doble de doble (*dd*) que aparece en δ 7.70 (1H, J = 8.5, 2.1 Hz) que integra para un hidrógeno interacciona con las señales dobles que aparecen en δ 7.74 (1H, J = 2.1 Hz) y δ 7.0 (1H, J = 8.4 Hz), estas señales se asignaron al anillo C de la flavona porque es el único anillo en el cual puede haber 3 hidrógenos y por lo tanto, en este anillo se encuentran 2 de los metoxilos de la molécula. Las constantes de acoplamiento J = 2.1 Hz y J = 8.4 Hz, indican que existe una interacción de tipo *meta* entre las señales que aparecen en δ 7.70 y δ 7.74, y una interacción de tipo *orto* entre las señales en δ 7.7 y δ 7.0, generando un sistema ABX (Figura 27).

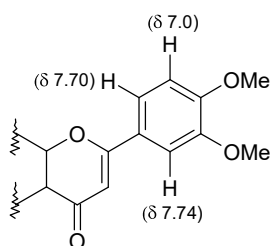


Figura 27. Patrón sustitución sugerido para el anillo C de la flavona.

De acuerdo con las estructuras resonantes del anillo C (figura 28), las posiciones C-2', C-4' y C-6' del anillo C están desprotegidas y por lo tanto los hidrógenos presentes en esas posiciones estarán desplazados a campo más bajo con respecto a las posiciones C-3' y C-5'. Asimismo, la posición C-6' tiene además, el efecto de la cetona α,β -insaturada, por lo que estaría aún más desplazado.

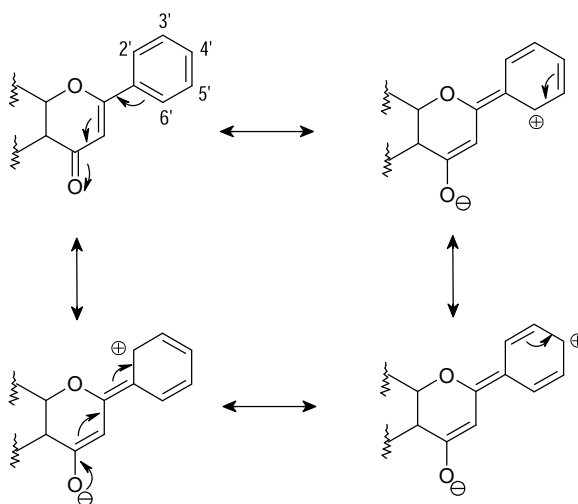


Figura 28. Estructuras resonantes del anillo C de la flavona.

La señal simple en δ 6.5 (1H) biogenéticamente puede estar en las posiciones C-8 del anillo A o en la posición C-3 del anillo B de la flavona. Su posición fue elucidada mediante el análisis del espectro COSY (espectro 14), en el cual se observa una interacción espacial con los hidrógenos H-2' y H-3'. Estas interacciones sugieren que la señal que aparece en δ 6.5 corresponde a la posición C-8 del anillo B y, por tanto, en la posición C-3 se encuentra el quinto metoxilo.

Estos datos y los informados en la literatura ⁸²⁻⁸⁴ permiten identificar a la flavona en discusión como la Artemetina, sustancias previamente aislada de *Artemisia arborescens*, *Artemisia absinthium* y de *Kuhnia eupatorioides* L. var. *pyramidalis* ⁸².

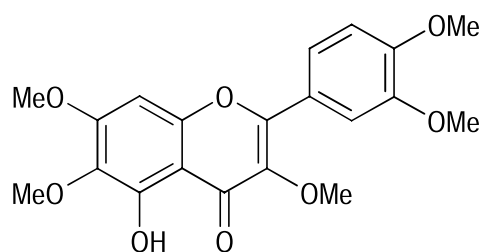


Figura 29. Artemetina.

1. *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F.

Extracto diclorometánico.

De las fracciones 141-159 obtenidas al eluir la columna con *n*-hexano:acetato de etilo (93:7) y de la recromatografía de las fracciones 95-140 obtenidas con *n*-hexano:acetato de etilo (95:5), se aislaron 46.7 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 103-104 °C, cuyo espectro de EM(IE) se observa un ión molecular a *m/z* 246 apropiado a una fórmula molecular C₁₅H₁₈O₃ con 7 grados de insaturación ($\Omega = 7$).

En su espectro de IR (espectro 16) se observan dos bandas a 1772 cm⁻¹ y a 1407 cm⁻¹ que indican la presencia de una cetona $\alpha\beta$ -insaturada característica de una α -metilen- δ -lactona, así como un doble enlace. En su espectro de RMN¹H (espectro 17) se observan dos sistemas AB que indican la presencia de dos dobles ligaduras exocíclicas confirmando las bandas observadas en IR. A δ 4.07 se observa una señal doble de doble con $J = 11.5$ y 9 Hz correspondientes a H-6 de la lactona, las constantes de acoplamiento indican un esqueleto de *guayano*^f.

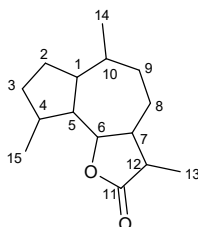


Figura 30. Esqueleto base del guayano.

En δ 6.21 ($J = 3$ Hz) y δ 5.48, ($J = 3$ Hz) se observan dos señales dobles de un sistema AB, correspondientes al metileno exocíclico en la posición α a la lactona debido al efecto de anisotropía antes discutido.

El otro sistema AB, observado en δ 4.95 ($J = 1.5$ Hz) y δ 4.86, ($J = 1.5$ Hz) corresponde a un doble enlace exocíclico ubicado en C-10. La interrelación de ambos sistemas se observa claramente en su espectro COSY (espectro 18).

^f En el esqueleto de *eudesmano* la segunda constante de acoplamiento es muy pequeña y en algunas sustancias $J_2 \approx 0$, observándose la señal como un triplete.

La banda que aparece en 2947 cm^{-1} en su espectro de IR y la señal a $\delta\ 3.37$ en su espectro de RMN¹H indican la presencia de un epóxido fusionado a ciclopentano que de acuerdo a la biogénesis está situado entre los carbonos C-3 y C-4 (figura 31).

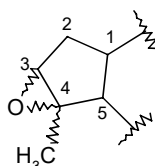


Figura 31. Ubicación propuesta para el epóxido de la lactona.

La señal simple localizada en $\delta\ 1.62$ que integra para tres hidrógenos corresponde a un metilo geminal a oxígeno o base de epóxido que se asignó al metilo del carbono C-4. Las asignaciones de las señales restantes de hidrógeno y carbono se realizaron mediante el experimento HMQC (espectro 20).

La orientación α del epóxido se estableció por comparación de los datos previamente informados ¹².

Con los datos anteriores, la sustancia en discusión se identificó como la **Estafiatina**.

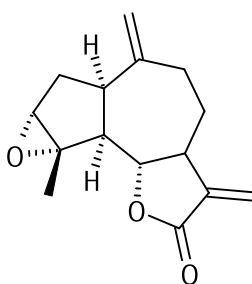


Figura 32. Estafiatina.

En las fracciones 188-217 obtenidas al eluir con *n*-hexano:acetato de etilo (85:15) se aislaron 19.1 mg de una sustancia sólida cristalina cuyo punto de fusión fue de 203-205 °C. En su espectro de IR (espectro 21)

se observan dos bandas en 1772 cm^{-1} y 1683 cm^{-1} correspondientes a una γ -lactona y a un carbonilo α,β -insaturado.

En su espectro de EM(IE) se observa el ión molecular a m/z 246 (100 %) que sugiere una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ con 7 grados de insaturación ($\Omega = 7$), que indica que se trata de una lactona sesquiterpénica.

En su espectro de RMN¹H (espectro 22) se observa una señal triple δ 3.59 ($J = 10.2$, $J = 9.9$ Hz) que se asigna a H-6 de la lactona. Cabe señalar que no se observa ningún sistema AB en campo bajo, por lo que la lactona no tiene un metileno exocíclico en C-11, y el carbonilo α,β -insaturado y el otro doble enlace se encuentran en los otros anillos.

En su espectro de RMN¹³C (espectro 23) se observan 15 señales que de acuerdo con el experimento APT (espectro 24) hay 3 metilos, 2 metilenos, 5 metinos y 5 carbonos no hidrogenados. De acuerdo con sus desplazamientos químicos un metino y los cinco carbonos no hidrogenados corresponden a carbonos con hibridación sp^2 .

Con los datos anteriores se sugiere que la lactona tiene un esqueleto de guayano con dos dobles ligaduras endocíclicas y un sistema carbonílico α,β -insaturado.

La señal en δ 3.38 ($J = 10$ Hz) corresponde a H-5, el cual se acopla con H-6 en forma *trans-diaxial*, esto se confirma con su espectro COSY (espectro 25).

El triple centrado en δ 6.13 ($J = 1.5$ Hz) corresponde a H-3, y el cuarteto centrado en δ 2.22 ($J = 12.3$, 7 Hz) corresponde a H-11.

En su espectro COSY se observan dos multipletes centrados en δ 2.34 y δ 1.32 acoplados entre sí y se asignaron a H-8 y H-9 respectivamente. Asimismo, H-8 se acopla con un multiplete centrado en δ 1.9, por lo que esta última señal fue asignada a H-7. Esta misma señal se acopla con H-11 con una constante de acoplamiento de $J = 12.3$ Hz, lo que indica que H-11 y H-7 se encuentran en orientación *cis*, asignado por lo tanto, orientación espacial β al metilo de C-13.

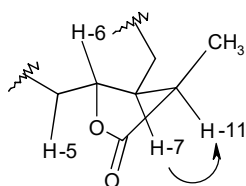


Figura 33. Posición del metilo C-13, de H-7 y H-11 en la lactona.

Con base a los datos anteriores y los informados en la literatura ¹² y por comparación con una muestra auténtica se concluyó que la sustancia en discusión es la **Achillina**.

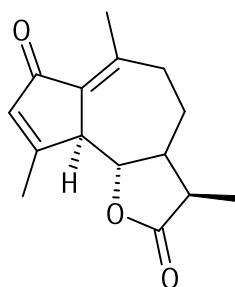


Figura 34. Achillina.

De las fracciones 279-309 eluidas con *n*-hexano:acetato de etilo (8:2) se obtuvieron 27.2 mg de un sólido cristalino amarillo con punto de fusión de 237-238 °C. Al realizarle cromatografía en capa fina a la sustancia y revelarla con FeCl₃ al 1 % en etanol, dio una coloración café característica de los flavonoides ⁸¹.

En su espectro EM(IE) se observa un ión molecular a *m/z* 344 que es apropiado para una fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇ con 11 grados de insaturación ($\Omega = 11$), que sugiere que el flavonoide incorpora en su molécula 2 grupos hidroxilo y 3 metoxilos. Asimismo, el ión a *m/z* 329 con asignación [M-15]⁺, (64.3 %) sugiere la pérdida de un metilo correspondiente a un metoxilo en la posición C-6.¹²

En su espectro de RMN¹H (espectro 27) las señales que se observan en δ 3.94, δ 3.91 y δ 3.83 confirman la presencia de los tres metoxilos. En δ 10.35 y δ 12.99 se observan las señales de los hidrógenos de los grupos hidroxilos, y la última señal corresponde al hidroxilo quelatado del C-5. Además, se observa a δ

6.57 una señal simple que de acuerdo con su desplazamiento se asigna a H-3, lo cual indica que el flavonoide tiene un esqueleto base de *flavona*.

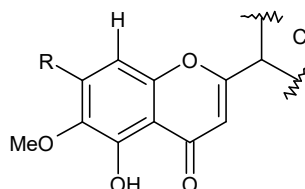


Figura 35. Estructura parcial de la flavona en discusión.

La señal simple que aparece a δ 6.76 corresponde a H-8. Su desplazamiento es característico del efecto protector del hidroxilo en posición α a H-8, por lo que el hidroxilo restante se asigna a C-7 y los dos metoxilos restantes se asignaron al anillo C de la flavona (figura 36).

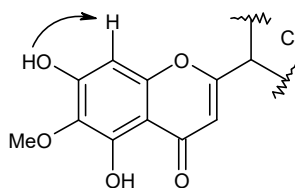


Figura 36. Sustitución del anillo A de la flavona en discusión.

Las dos señales dobles que aparecen en δ 7.47 ($J = 2.1$ Hz) y δ 7.06 ($J = 8.06$ Hz) y la señal doble de doble en δ 7.60 ($J = 8.4$ y 2.1 Hz) que integran cada una para un hidrógeno, se asignaron al anillo C de la flavona. Las constantes de acoplamiento indican que las señales en δ 7.47 y δ 7.60 tienen una interacción de tipo *meta* ($J = 2.1$ Hz), asimismo, las señales en δ 7.06 y δ 7.60 tienen una interacción de tipo orto ($J = 8.4$ Hz), formando un sistema ABX (Figura 37).

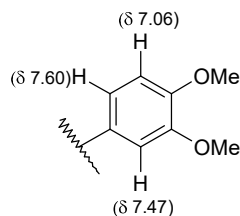


Figura 37. Patrón de sustitución sugerido del anillo C de la flavona.

Las estructuras resonantes del anillo C de la flavona (Figura 28) dan como resultado que las posiciones C-2', C-4' y C-6' estén desprotegidas y por lo tanto si hubiere hidrógenos en esas posiciones estarían desplazados a campo más bajo con respecto a las posiciones C-3' y C-5', sobre todo el hidrogeno en C-6' debido a su cercanía a la cetona α,β -insaturada. Debido a esto, esta posición es asignada a la señal en δ 7.60 ($J = 8.4$ y 2.1 Hz). Esta señal a su vez tiene un hidrógeno en posición orto y otro en posición meta, el cual este último está desplazado a campo más bajo con respecto al otro, por lo cual se asigna este último a la posición C-2' y el otro a la posición C-5'.

Estos datos y los informados en la literatura ¹² permitieron identificar a la flavona en discusión como la ***Eupatilina***.

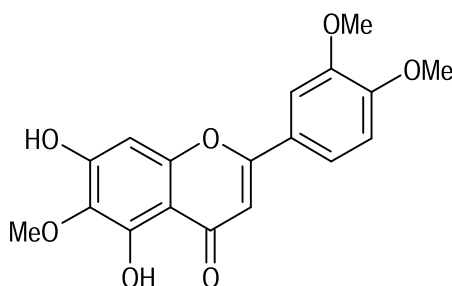


Figura 38. Eupatilina.

Al tratar las aguas madres de las fracciones 279-309, de las cuales se obtuvo la *Eupatilina*, con diazometano en éter etílico a baja temperatura, se obtuvieron 36.3 mg de un sólido cristalino amorfo amarillo-verdoso con un punto de fusión de 183-186 °C, cuyo espectro de IR (espectro 30) muestra dos bandas a 2940 cm^{-1} y 2840 cm^{-1} correspondientes a la vibración C-O y C-H, un grupo carbonilo a 1650 cm^{-1} y una vibración C-O-C a 1126 cm^{-1} que confirman la reacción de metilación, asimismo no se observan bandas en la región de $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ de la vibración O-H.

Comparando este producto con la Eupatilina se observan las siguientes diferencias:

- En el espectro de IR desaparece la banda en 3184 cm^{-1} que indica que los hidroxilos no quelatados fueron metilados.

- En su espectro EM(IE) su ion molecular se encuentra en m/z 358, es decir 14 unidades mayor que indican la adición de un metilo y el desprendimiento de un hidrógeno.
- En su espectro de RMN¹H (espectro 31) aparece una cuarta señal simple correspondiente al nuevo metoxilo.
- En su espectro de RMN¹³C (espectro 32) aparece una nueva señal en la región de los metoxilos.

Estos datos y los informados en la literatura ⁸⁵ confirman que la sustancia en discusión es el derivado metilado de la Eupatilina, la **5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona**.

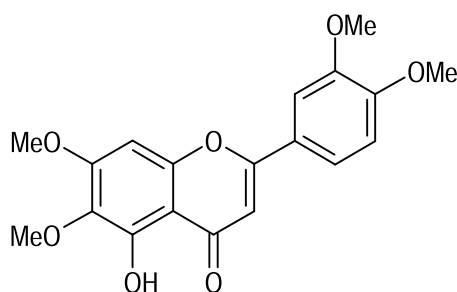


Figura 39. 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona.

De las fracciones 528-651, se aisló un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 198-199°C, cuyo espectro de EM(IE) se observa un ión molecular a m/z 264(85%) que sugiere una fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ con 6 grados de insaturación ($\Omega = 6$).

En su espectro de IR (espectro 33) se observan una banda a 1762 cm^{-1} característica de una α -metilen- γ -lactona. En su espectro de RMN¹H (espectro 34) se observa un sistema AB como un par de señales dobles a δ 6.08 ($J = 3.6$ Hz) y δ 5.49 ($J = 3.3$ Hz) características del metileno exocíclico de la α -metilen- γ -lactona.

Para aclarar o simplificar el espectro de RMN¹H se realizó el experimento de equilibrio con D_2O (espectro 37), con lo cual algunas señales importantes fueron simplificadas. En este último espectro una señal triple en δ 4.46 ($J = 9.9$ Hz) característica de H-6 de las lactonas sesquiterpénicas, que de acuerdo a su espectro COSY (espectro 35), interacciona con una señal doble en δ 5.28 ($J = 9.9$ Hz) correspondiente a un

hidrógeno vinílico, dicha señal se asignó a H-5, corroborando la presencia de un doble enlace entre C-4 y C-5, mientras que también interacciona con una señal simple en δ 2.8 que se asignó a H-7.

Asimismo las señales anchas que integran para un hidrógeno localizadas en δ 5.12 y δ 4.85 corresponden a un metileno exocíclico que biogenéticamente se ubica en C-15.

Las señales ubicadas en δ 4.15 y δ 3.85 que integran para un hidrógeno son características de H geminales a hidroxilo, lo cual corresponde a la fórmula molecular dada.

Con estos datos, la lactona sesquiterpénica en discusión tiene un esqueleto base de *germacrano* con dos dobles enlaces exocíclicos, un doble enlace endocíclico y dos hidroxilos (figura 40).

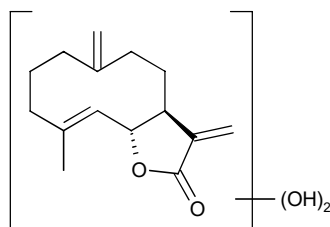


Figura 40. Estructura parcial de la lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano.

Para elucidar la ubicación de los hidroxilos se procedió al análisis de la señal que aparece en δ 4.15 en su espectro COSY (espectro 35). Esta señal interacciona con la ubicada en δ 4.85 previamente asignada a un hidrógeno del metileno exocíclico en C-15, y con una señal múltiple ubicada en δ 1.68 que integra para tres hidrógenos, dos de los cuales se pueden asignar a H-2, dando por resultado la posición de los hidroxilos en C-1 y C-3, y la señal en δ 4.15 a H-1 y la señal a δ 3.85 a H-3.

La orientación espacial de los hidroxilos se realizó comparando los resultados obtenidos con los informados en la literatura ^{12,86-87}, lo que permitió identificar a la lactona en discusión como la **Ridentina**.

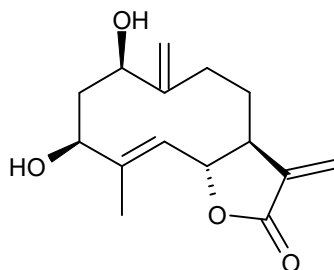


Figura 30. Ridentina.

3. Evaluaciones biológicas preliminares

Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L.

En el Cuadro VII se muestran los resultados de los bioensayos de toxicidad en *Artemia salina* L. realizados a los diferentes extractos de las plantas colectadas.

Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i> L de <i>Artemisia ludoviciana ssp. mexicana</i>				
Vegetal	Extracto	CL ₅₀	Límites de confianza	
			inferior	superior
<i>A. ludoviciana ssp. mexicana</i> (San Rafael, Tlalmanalco)	Hexánico	535 µg/mL	420 µg/mL	688 µg/mL
	Diclorometánico	264 µg/mL	200 µg/mL	352 µg/mL
	Etanólico	>>1000 µg/mL	-	-
	Aceites esenciales	<10 µg/mL	-	-
<i>A. ludoviciana ssp. mexicana</i> (San Pedro Atocpan, Milpa Alta)	Hexánico	225 µg/mL	178 µg/mL	287 µg/mL
	Diclorometánico	600 µg/mL	385 µg/mL	1083 µg/mL
	Etanólico	>>1000 µg/mL	-	-
	Aceites esenciales	<10 µg/mL	-	-

Cuadro VII. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* L. de los extractos crudos de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*.

De acuerdo con los resultados anteriores, se observó que tienen un comportamiento similar:

- Los extractos etanólicos de ambas plantas no presentaron actividad significativa sobre *Artemia*, es decir los compuestos polares presentes en dichos extractos no tienen actividad.
- Los aceites esenciales resultaron ser los más activos (CL₅₀ < 10 µg/mL), sin embargo, estos no fueron estudiados para comparar sus componentes químicos.

Con respecto a los demás extractos, en la *Artemisia* colectada en San Rafael, el extracto diclorometánico resultó ser más activo que el hexánico, mientras que en la *Artemisia* colectada en Milpa Alta tuvo un

comportamiento diferente, el extracto hexánico resultó ser más activo que el diclorometánico. Este comportamiento sugiere que dichos extractos tienen una composición química diferente, como se pudo comprobar al estudiar los extractos diclorometánicos. Sin embargo, esto mismo no quiere decir que las sustancias presentes en el extracto diclorometánico de la *Artemisia* de San Rafael sean más activas que las encontradas en la *Artemisia* de Milpa Alta, ya que la actividad biológica registrada es el resultado de las interacciones antagónicas y sinérgicas de todas las sustancias presentes.

Evaluación antimicrobiana por el método de Mitscher.

Al realizar la evaluación antimicrobiana por el método de dilución en placa de Mitscher se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro VIII.

Evaluación antimicrobiana de Artemia salina L de Artemisia ludoviciana ssp. mexicana										
Vegetal	Extracto	Concentración	Microorganismo							
			1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (San Rafael, Tlalmanalco)	Hexánico	1 mg/mL	x	x	✓	x	x	x	✓	x
		4 mg/mL	✓	x	✓	x	✓	✓	✓	x
	Diclorometánico	1 mg/mL	x	✓	±	x	✓	x	x	x
		4 mg/mL	x	x	x	x	x	x	✓	x
	Etanólico	1 mg/mL	x	x	x	x	x	x	x	x
		4 mg/mL	x	x	x	x	x	x	x	x
	Aceites esenciales	1 mg/mL	±	✓	✓	x	✓	x	✓	x
		4 mg/mL	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (San Pedro Atocpan, Milpa Alta)	Hexánico	1 mg/mL	x	x	x	x	x	x	✓	x
		4 mg/mL	x	x	x	x	x	x	✓	x
	Diclorometánico	1 mg/mL	x	x	x	x	✓	x	x	x
		4 mg/mL	x	±	x	x	x	x	x	x
	Etanólico	1 mg/mL	x	x	x	x	x	x	x	x
		4 mg/mL	x	x	x	x	x	x	x	x
	Aceites esenciales	1 mg/mL	x	✓	x	x	x	x	✓	x
		4 mg/mL	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
x = Inactivo (Sin inhibición del crecimiento)			± = Poco activo (crecimiento menor que en el blanco)			✓ = Activo (Inhibición total del crecimiento)				
1 = <i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539		2 = <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		3 = <i>Candida albicans</i> ATCC 10231		4 = <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619				
5 = <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p		6 = <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536		7 = <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 934		8 = <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10741				

Cuadro VIII. Evaluación antimicrobiana de los extractos crudos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*.

En general los aceites esenciales fueron los activos en todos los microorganismos de prueba a una concentración de 4 mg/mL, sin embargo esta concentración es muy alta para considerar que se pudiera encontrar una sustancia con propiedades antimicrobiana comparables con la actividad de los antibióticos que se utilizan en la terapéutica.

En *B. subtilis* la actividad se encontró a 1 mg/mL que a 4 mg/mL, es decir, la actividad se encontró a una concentración más baja, este comportamiento puede deberse a la saturación de los mecanismos de transporte hacia el interior del microorganismo y por lo tanto, el microorganismo evita su entrada.

Con respecto a la *Artemisia* de San Rafael, el extracto etanólico no resultó activo a ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que el extracto hexánico fue activo con los microorganismos, con excepción de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. faecalis*, a una concentración de 4 mg/mL, y activo a 1 mg/mL con *C. albicans* y *M. luteus*. El extracto diclorometánico sólo fue activo contra *S. aureus* a 1 mg/mL. La diferencia entre la actividad de los extractos puede deberse a la diferencia de permeabilidad entre los distintos microorganismos y las diferentes lipoficidades de las sustancias que componen los extractos. Aunque en general, entre menor lipoficidad de la sustancia mayor facilidad de ingresar a través de la pared y membrana celular de los microorganismos para poder actuar, si es que tienen actividad.

Con respecto a la *Artemisia* de Milpa Alta, los extractos tienen un espectro de acción muy limitado, sólo el extracto Hexánico fue activo contra *M. luteus* y el diclorometánico contra *S. aureus* y una ligera actividad contra *B. subtilis*. Este espectro de acción limitado puede ser indicativo de que existen sustancias específicas para dicho microorganismo en los extractos estudiados, lo que aumenta la importancia de las sustancias presentes en dichos extractos.

De acuerdo con lo anterior, se puede deducir que sólo los aceites esenciales tienen la probabilidad de encontrarse sustancias antimicrobianas contra los organismos de prueba.

CONCLUSIONES

Del estudio químico de los diferentes extractos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en San Rafael, Tlalmanalco se aislaron e identificaron las siguientes sustancias:

- Achillina
- Arglanina
- Armefolina
- Armexifolina
- Artemetina
- Ludovicina A

Mientras que de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* colectada en Milpa Alta se aislaron e identificaron las siguientes sustancias:

- Achillina
- Estafiatina
- Eupatilina
- Ridentina

Y se obtuvo por conversión química de la Estafiatina:

- 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona

Esta última sustancia, sin embargo, ya ha sido aislada como producto natural.

Con estos resultados se puede concluir que el medio ambiente así como la interrelación con las especies de ese mismo ambiente determina la composición química del vegetal aunque este sea de la misma especie y subespecie. Generalmente se debe a que este ambiente determina la ruta de los procesos biogénicos, dando prioridad a unos procesos sobre otros.

Con respecto a las pruebas biológicas preliminares, se puede concluir que los aceites esenciales, así como los extractos de baja y mediana polaridad (hexánico y diclorometánico) tienen actividad sobre *Artemia salina* L., mientras que los extractos polares (etanólico) no poseen dicha actividad. La diferencia entre los

valores de CE_{50} en los vegetales colectados en dos lugares son un indicativo de que poseen diferente composición química.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, existe una diferencia más notoria entre los dos vegetales ya que solo el extracto hexánico de la colectada en San Rafael presentó actividad y no con todos los organismos. Asimismo, en ambos vegetales, la actividad importante se obtuvo en los aceites esenciales con una ligera diferencia de actividad a favor de la Artemisia de San Rafael. Por lo que se puede concluir que sólo los aceites esenciales podrían estudiarse para encontrar sustancias antimicrobianas.

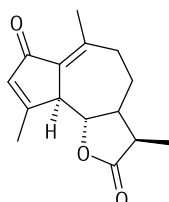
SUGERENCIAS

Del trabajo anterior se desprenden las siguientes sugerencias para continuar con el estudio de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*:

- Estudiar el extracto etanólico restante para comprobar que la composición química es diferente en cada uno de los extractos de las plantas estudiadas.
- Estudiar por cromatografía de gases a los aceites esenciales para conocer las composiciones de cada uno con respecto al lugar de colecta del vegetal.
- Realizar pruebas adicionales de actividad a los extractos de ambos vegetales, debido a que la medicina tradicional indica que este vegetal posee un amplio espectro de aplicaciones terapéuticas. Se podrían evaluar sus propiedades insecticidas o antiparasitarias, o inclusive hasta actividades como la antiinflamatoria o la analgésica.
- Estudiar otras especies de Artemisias que crecen en nuestro país, tanto químicamente como biológicamente, ya que muchas de ellas no se han estudiado, y de acuerdo con la literatura podrían ser potencialmente fuente de sustancias con alguna actividad biológica. Asimismo, estudiar la actividad antimalárica en cada una de estas especies, para encontrar una especie con actividad comparable a la de *Artemisia annua*.

PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS

*Achillina*¹²



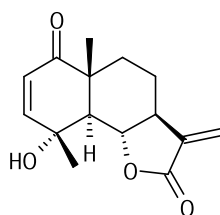
EM(IE) $m/z(\%)$: 246 M^+ (100), 231(9), 217(24), 203(4), 190(6), 173(25), 172(21), 145(11), 139(9), 133(6), 105(7), 91(15), 77(6), 55(6), 41(6), 28(21), 27(3), 4(3).

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{Nujol}}$ (cm^{-1} , espectro 21): 2929, 1772, 1683.

RMN¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 22): δ 6.13(*t*, $J=1.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, H-3), 3.59(*t*, $J=10.2$ Hz, $J=9.9$ Hz, H-6), 3.38(*d*, $J=9.9$ Hz, H-5), 2.41(*s*, H-14), 2.33(*m*, H-8), 2.27(*s*, H-15), 2.22(*c*, $J=12.3$ Hz, $J=7$ Hz, H-11), 1.95(*m*, H-7), 1.35(*m*, H-9), 1.24(*d*, $J=6$ Hz, H-13).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 23): δ 196.48(C-2), 178.11(C-12), 170.49(C-4), 152.67(C-10), 136.15(C-3), 132.50(C-1), 84.82(C-6), 57.01(C-7), 53.21(C-5), 41.74(C-11), 38.19(C-9), 26.62(C-8), 22.23(C-15), 20.40(C-14), 12.90(C-13).

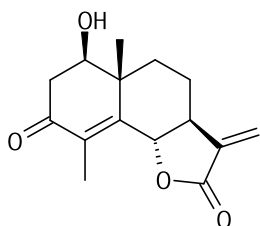
Arglanina^{12,74-76}



EM(IE) $m/z(\%)$: 262 M^+ (19), 43(21), 98(36), 119(17), 147(18), 165(12), 183(12), 201(18), 229(27), 247(100).

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm^{-1} , espectro 1): 3459, 2925, 2854, 1748, 1670.

RMN¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 2): δ 5.92(*d*, $J=10.5$ Hz, H-2), 6.63(*d*, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.57(*d*, $J=11$ Hz, H-5), 4.15(*t*, $J=11$ Hz, H-6), 2.59(*m*, H-7), 1.63(*m*, H-8), 2.13(*m*, H-9), 5.52(*d*, $J=3.3$ Hz, H-13a), 6.17(*d*, $J=3.3$ Hz, H-13b), 1.23(*s*, H-14), 1.57(*s*, H-15).

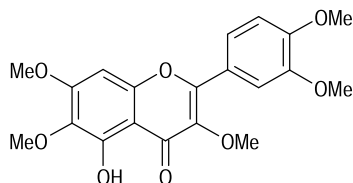
*Armexifolina*⁷⁹⁻⁸⁰

EM(IE) m/z (%): 262 M^+ (96), 41(46), 43(40), 55(36), 69(56), 81(43), 161(93), 162(79), 190(80), 191(100), 218(37), 233(43).

IR $\nu_{máx}^{CHCl_3}$ (cm^{-1} , espectro 7): 3619, 2943, 1774, 1674, 1622.

RMN¹H (500 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 10): δ 3.9(*dt*, $J=12.5$ Hz, $J=4$ Hz, H-1), 2.7(*dd*, $J=16$ Hz, $J=5$ Hz, H-2 α ec), 2.61(*dd*, $J=16$ Hz, $J=13$ Hz, H-2 β a), 4.74(*dd*, $J=13.5$ Hz, $J=2$ Hz, H-6), 2.8(*m*, H-7), 1.55(*m*, H-8 β ax), 1.75(*m*, H-8 α ec), 2.26(*m*, H-9), 5.57(*d*, $J=3$ Hz, H-13a), 6.25(*d*, $J=3$ Hz, H-13b), 1.29(*d*, $J=0.5$ Hz, H-14), 2.05(*d*, $J=2$ Hz, H-15).

RMN¹³C (500 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 8): δ 196.6(C-3), 169.07(C-12), 152.07(C-5), 137.71(C-11), 129.57(C-4), 119.83(C-13), 81.93(C-6), 74.34(C-1), 48.64(C-7), 43.78(C-10), 42.45(C-2), 37.83(C-9), 23.04(C-8), 17.47(C-15), 11.04(C-14).

*Artemetina*⁸²⁻⁸⁴

EM(IE) m/z (%): 388 M^+ (100), 387 [M^+-1]⁺ (33), 373(71), 369(16), 357(7), 355(13), 327(7), 194(6), 178(6), 165(13), 149(6).

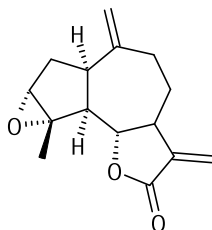
IR $\nu_{máx}^{CHCl_3}$ (cm^{-1} , espectro 12): 3597, 3531, 2966, 2935, 2856, 1768.

RMN¹H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 13): δ 12.6(*s*, OH C-6), 7.74(*d*, $J=2.1$ Hz, H-6'), 7.70(*dd*, $J=2.1$ Hz, $J=8.5$ Hz, H-2'), 7.0(*d*, $J=8.4$ Hz, H-3'), 6.5(*s*, H-8), 3.975(*s*, OCH₃), 3.973(*s*, OCH₃), 3.967(*s*, OCH₃), 3.929(*s*, OCH₃), 3.872(*s*, OCH₃).

RMN¹³C (75 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 15): 178.92(C-4), 158.78(C-2), 155.86(C-7), 152.81(C-5), 152.32(C-4'), 151.46(C-3), 148.85(C-9), 138.85(C-3'), 132.36(C-6), 122.98(C-1'), 122.15(C-6'),

111.36(C-5'), 110.92(C-2'), 106.65(C-10), 90.35(C-8), 60.89(OCH₃), 60.21(OCH₃), 56.32(OCH₃), 56.12(OCH₃), 56.03(OCH₃).

Estafiatina¹²



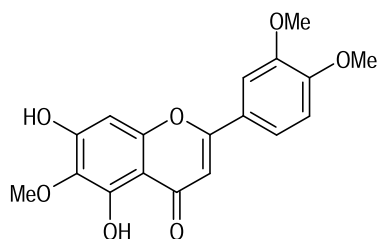
EM(IE) m/z(%): 246 M⁺ (13), 231(96), 203(16), 175(16), 162(26), 131(24), 117(22), 105(30), 97(100), 91(51), 79(30), 43(70), 41(38).

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm⁻¹, espectro 16): 2947, 1762, 1407.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 17): δ 6.20(*d*, J=3 Hz, H-13a), 5.48(*d*, J=3 Hz, H-13b), 4.95(*d*, J=1.5 Hz, H-14a), 4.86(*d*, J=1.5 Hz, H-14b), 4.07(*dd*, J=11.5 Hz, J=9 Hz, H-6), 3.37(*s*, H-3), 2.97(*ddd*, J=10 Hz, J=7 Hz, J=9 Hz, H-1), 2.86(*m*, H-7), 2.31(*dd*, J=8 Hz, H-5), 2.20(*m*, H-9), 2.06(*dd*, J=14 Hz, J=7.5, H-2), 1.81(*dddd*, J=14 Hz, J=11 Hz, J=1 Hz), 1.62(*s*, H-15), 1.53(*m*, H-8).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 19): δ 169.74(C-12), 146.15(C-10), 139.61(C-11), 120.14(C-13), 115.25(C-14), 80.53(C-6), 65.82(C-4), 63.17(C-3), 50.85(C-5), 44.86(C-1), 44.10(C-7), 32.97(C-2), 29.18(C-8), 28.64(C-9), 18.49(C-15).

Eupatilina¹²



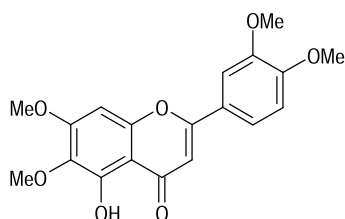
EM(IE) m/z(%): 344 M⁺ (100), 329(64), 301(40), 298(9), 243(3), 163(18), 139(8), 129(5), 120(3), 69(17).

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{Nujol}}$ (cm⁻¹, espectro 26): 3184, 1655.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS, espectro 27): δ 12.99(*s*, C₅-OH), 10.35(*s*, C₇-OH), 7.60(*dd*, J=2.1 Hz, J=8.4 Hz, H-6'), 7.47(*d*, J=2.1 Hz, H-2'), 7.06(*d*, J=8.7, H-5'), 6.76(*s*, H-8), 6.57(*s*, H-3), 3.94(*s*, OCH₃), 3.91(*s*, OCH₃), 3.83(*s*, OCH₃).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS, espectro 29): δ 181.94(C-4), 163.11(C-2), 163.11(C-7), 156.88(C-5), 152.59(C-4'), 152.32(C-9), 148.73(C-3'), 131.04(C-6), 123.05(C-1'), 119.62(C-6'), 111.08(C-5'), 108.94(C-2'), 104.14(C-3), 103.20(C-10), 93.93(C-8), 59.69(OCH₃), 55.62(OCH₃), 55.45(OCH₃).

5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona⁸⁵

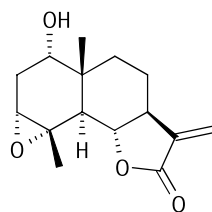


IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{Nujol}}$ (cm⁻¹, espectro 30): 2939, 2843, 1657, 1126.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 31): δ 12.76(*s*, C₅-OH), 7.53(*dd*, J=8.4 Hz, J=2.1 Hz, H-6'), 7.34(*d*, J=2.1 Hz, H-2'), 6.98(*d*, J=8.7 Hz, H-5'), 6.60(*s*, H-8), 6.56(*s*, H-3), 3.99(*s*, OCH₃), 3.98(*s*, OCH₃), 3.97(*s*, OCH₃), 3.93(*s*, OCH₃).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 32): δ 182.63(C-4), 164.01(C-2), 158.81(C-5), 158.81(C-7), 152.47(C-3'), 123.95(C-1'), 123.95(C-6'), 120.12(C-6), 111.36(C-5'), 109.10(C-2'), 106.25(C-10), 104.56(C-3), 90.64(C-8), 60.84(OCH₃), 56.34(OCH₃), 56.21(OCH₃), 56.16(OCH₃).

Ludovicina A^{12,77}

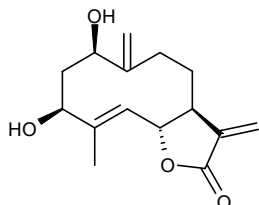


IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm⁻¹): 3536, 1768.

RMN¹H (300 MHz, DMSO-D₆ + CDCl₃, TMS, espectro 4): δ 3.15(*t*, J=5 Hz, H-1), 2.14(*m*, H-2 α e), 1.98(*m*, H-2 β ax), 2.82(*d*, J=3.6 Hz, H-3), 2.33(*d*, J=12 Hz, H-5), 4.09(*dd*, J=11 Hz, J=6 Hz, H-6),

2.43(*m*, H-7), 1.52(*m*, H-8 β *ax*), 1.86(*m*, H-8 α *ec*), 1.98(*m*, H-9 β *ec*), 1.16(*m*, H-9 α *ax*), 5.51(*d*, J=3 Hz, H-13a), 5.93(*d*, J=3 Hz, H-13b), 0.81(*s*, H-14), 1.35(*s*, H-15).

Ridentina^{12,86-87}



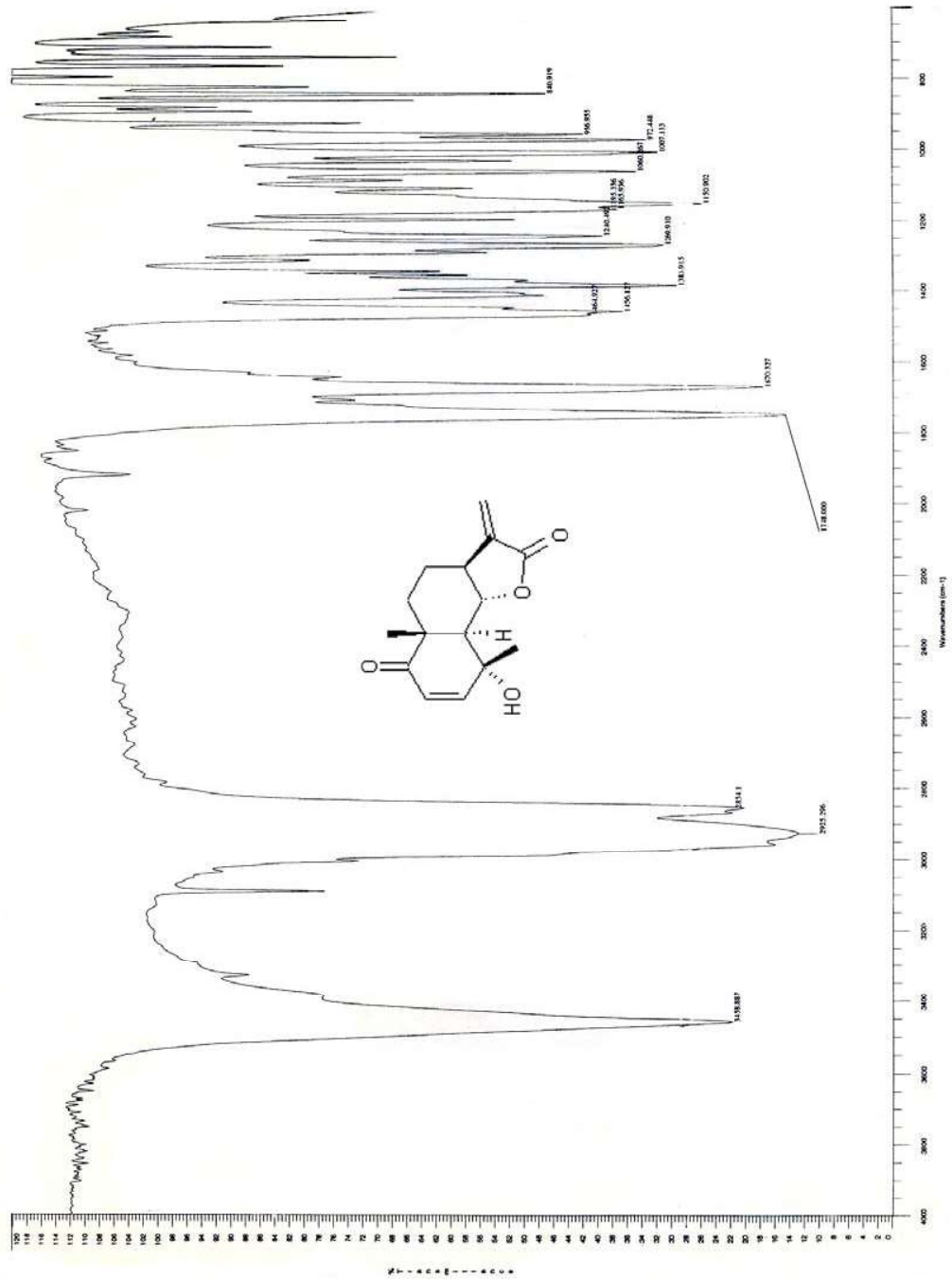
EM(IE) *m/z*(%): 264 $M^{+\bullet}$ (9), 246(26), 228(23), 219(55), 205(38), 178(47), 175(75), 149(100), 147(61), 119(63), 105(69), 91(92), 79(70), 77(56), 53(79), 41(62), 39(35), 27(20).

IR $\nu_{\text{máx}}^{\text{Nujol}}$ (cm^{-1} , espectro 33): 3333, 2855, 1763.

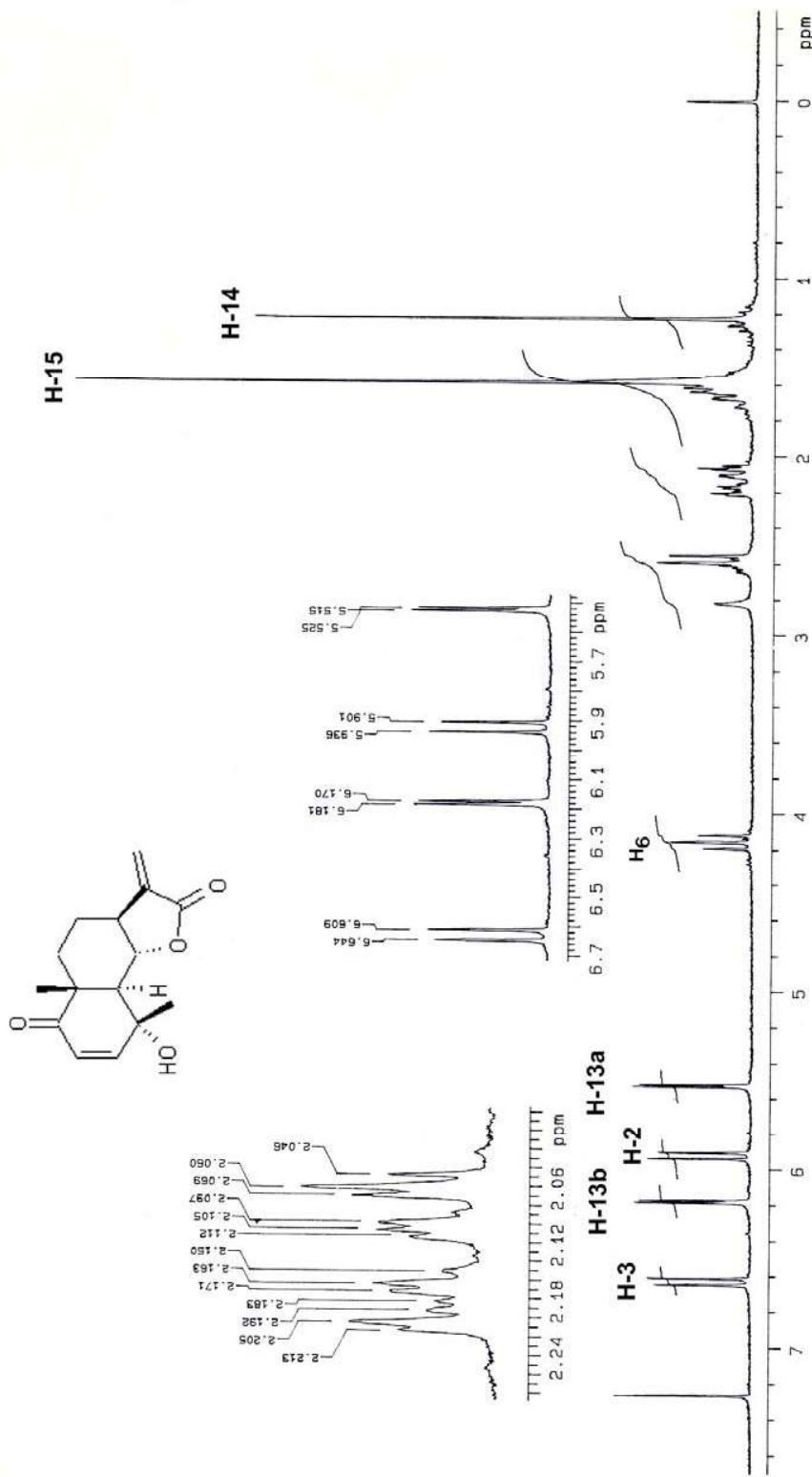
RMN¹H (300 MHz, CDCl_3 + DMSO, TMS, espectro 34): δ 6.08(*d*, J=3.6 Hz, H-13a), 5.50(*d*, J=3.3 Hz, H-13b), 5.28(*d*, J=9.9 Hz, H-5), 5.12(*sa*, $W_{1/2}$ =6 Hz, H-14a), 4.85(*sa*, $W_{1/2}$ =6 Hz, H-14b), 4.46(*t*, J=9.9 Hz, H-6), 4.15(*m*, H-1), 3.85(*m*, H-3), 2.28(*m*, H-9), 2.8(*m*, H-7), 1.96(*m*, H-2 y H-8 β), 1.68(*s*, $\text{C}_4\text{-CH}_3$), 1.60(*m*, H-8 α).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl_3 + DMSO, TMS, espectro 36): δ 169.21(C-12), 148.91(C-4), 148.91(C-10), 139.07(C-11), 119.91(C-5), 117.48(C-13), 109.76(C-14), 79.16(C-6), 74.05(C-3), 73.04(C-1), 40.22(C-2), 28.50(C-9), 25.21(C-8), 10.85(C-15).

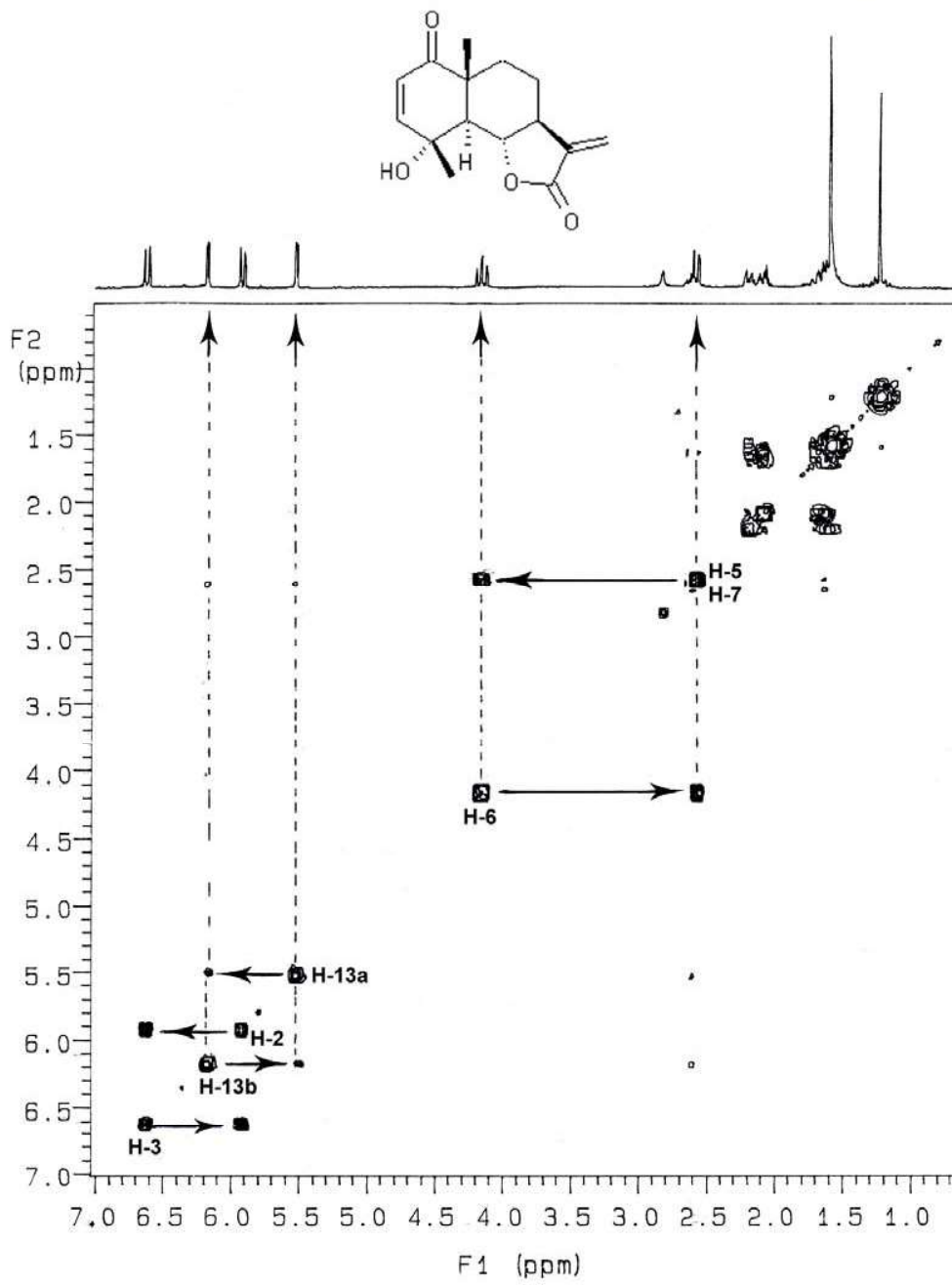
ESPECTROS



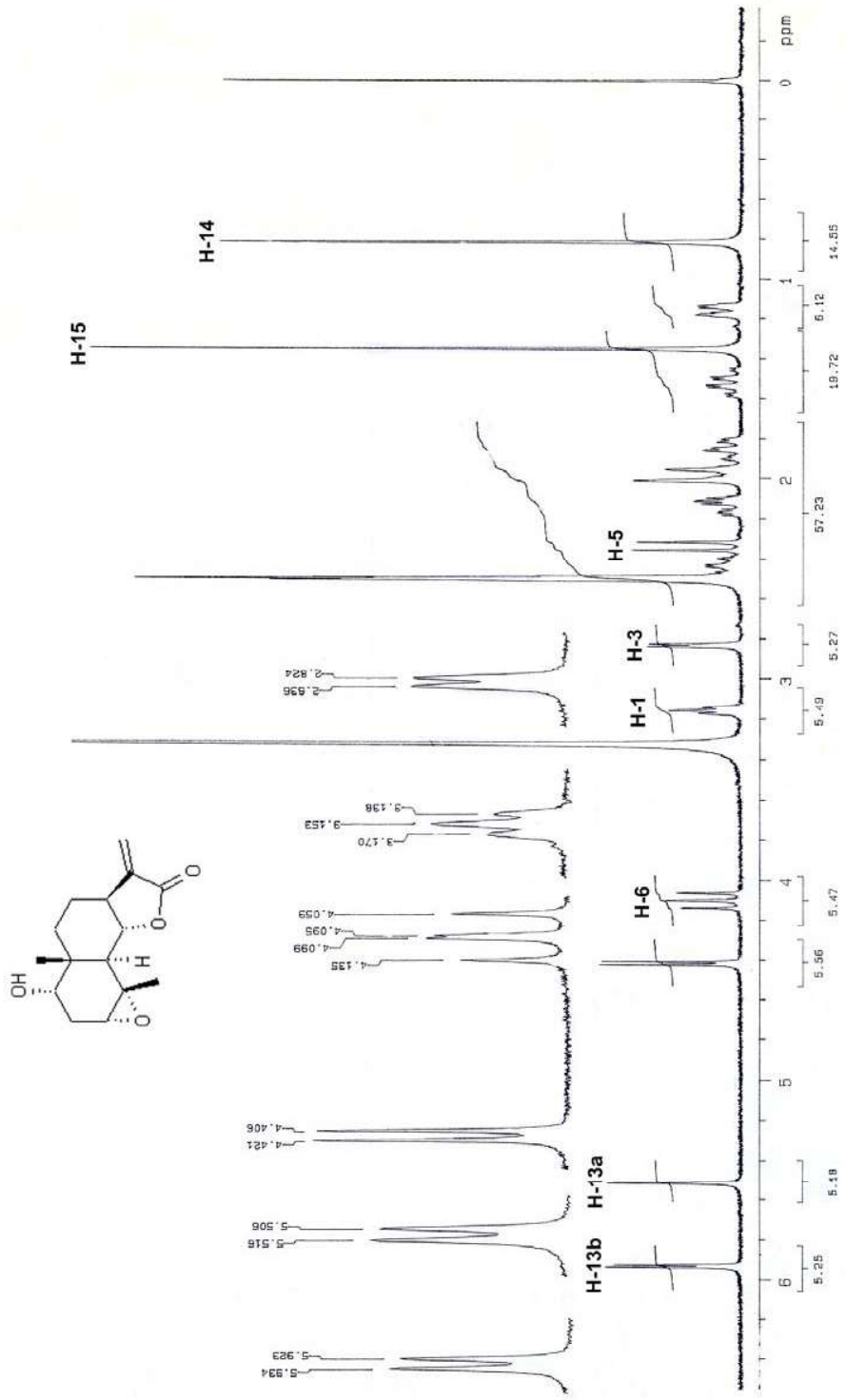
Espectro 1. Espectro de IR (CHCl₃) de la Arglanina.



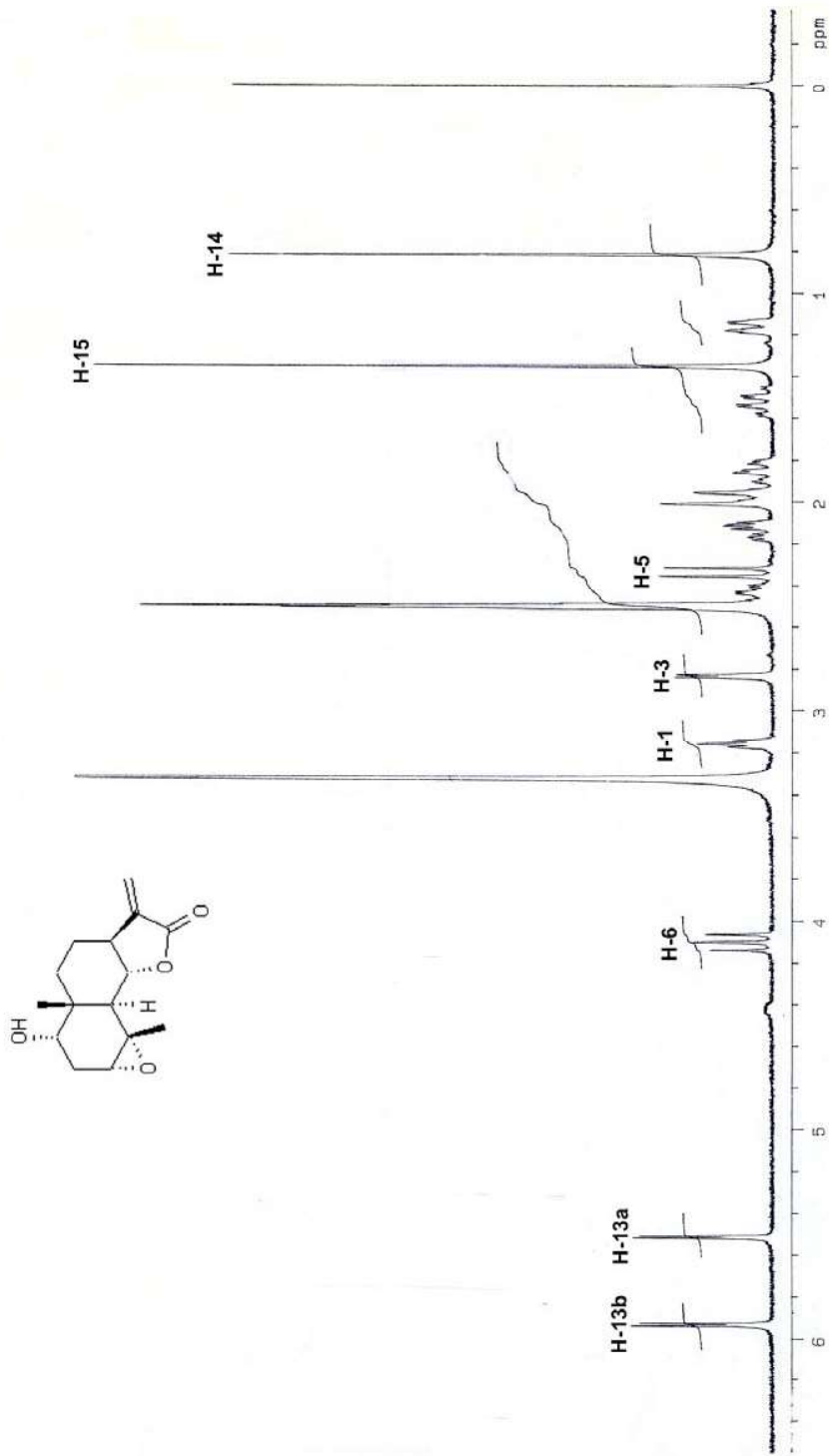
Espectro 2. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la Arginina.



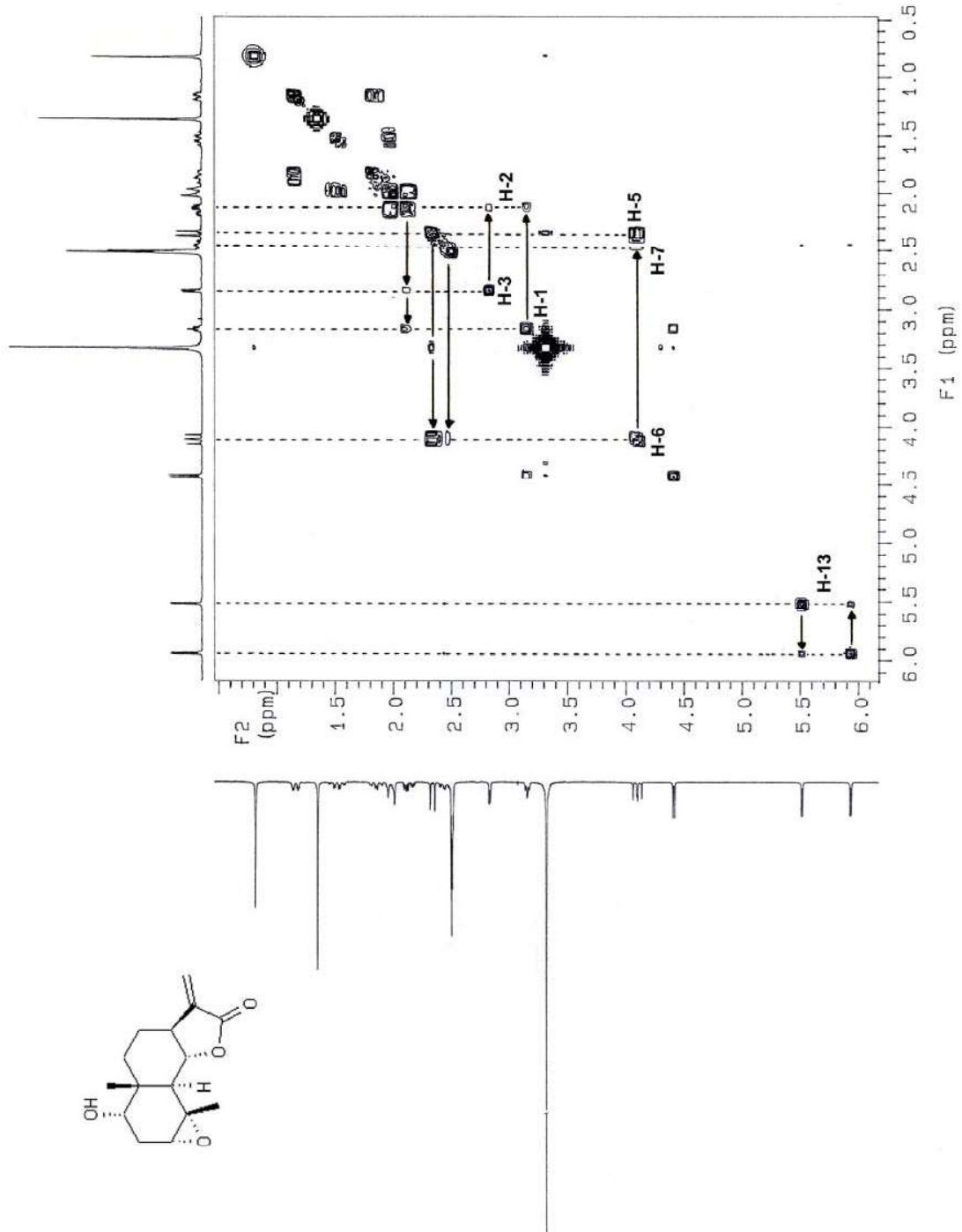
Espectro 3. Espectro COSY de la Arglanina.



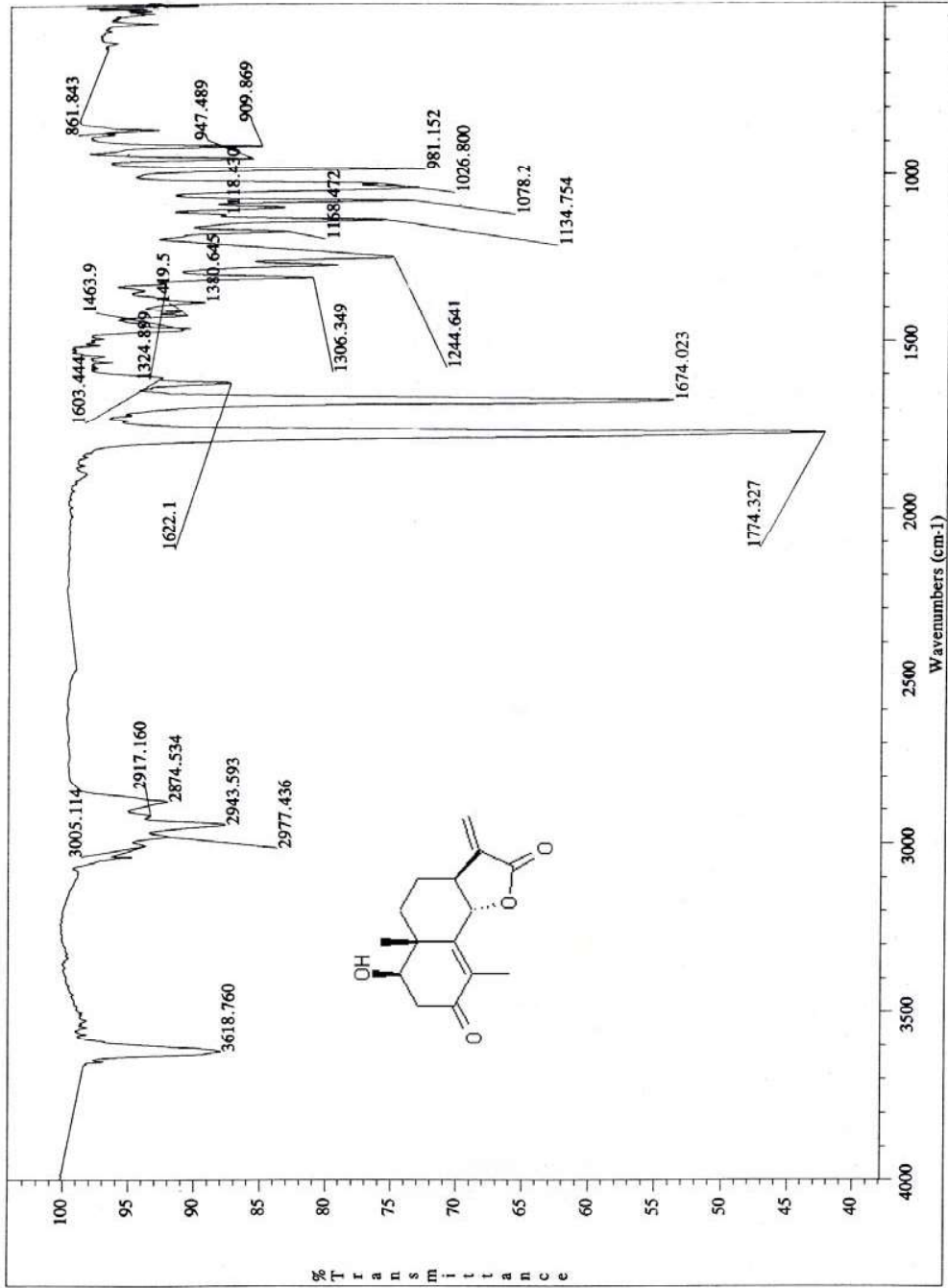
Espectro 4. Espectro de RMN¹H (300 MHz, DMSO-D₆ + CDC₃, TMS) de la Ludovicina A.



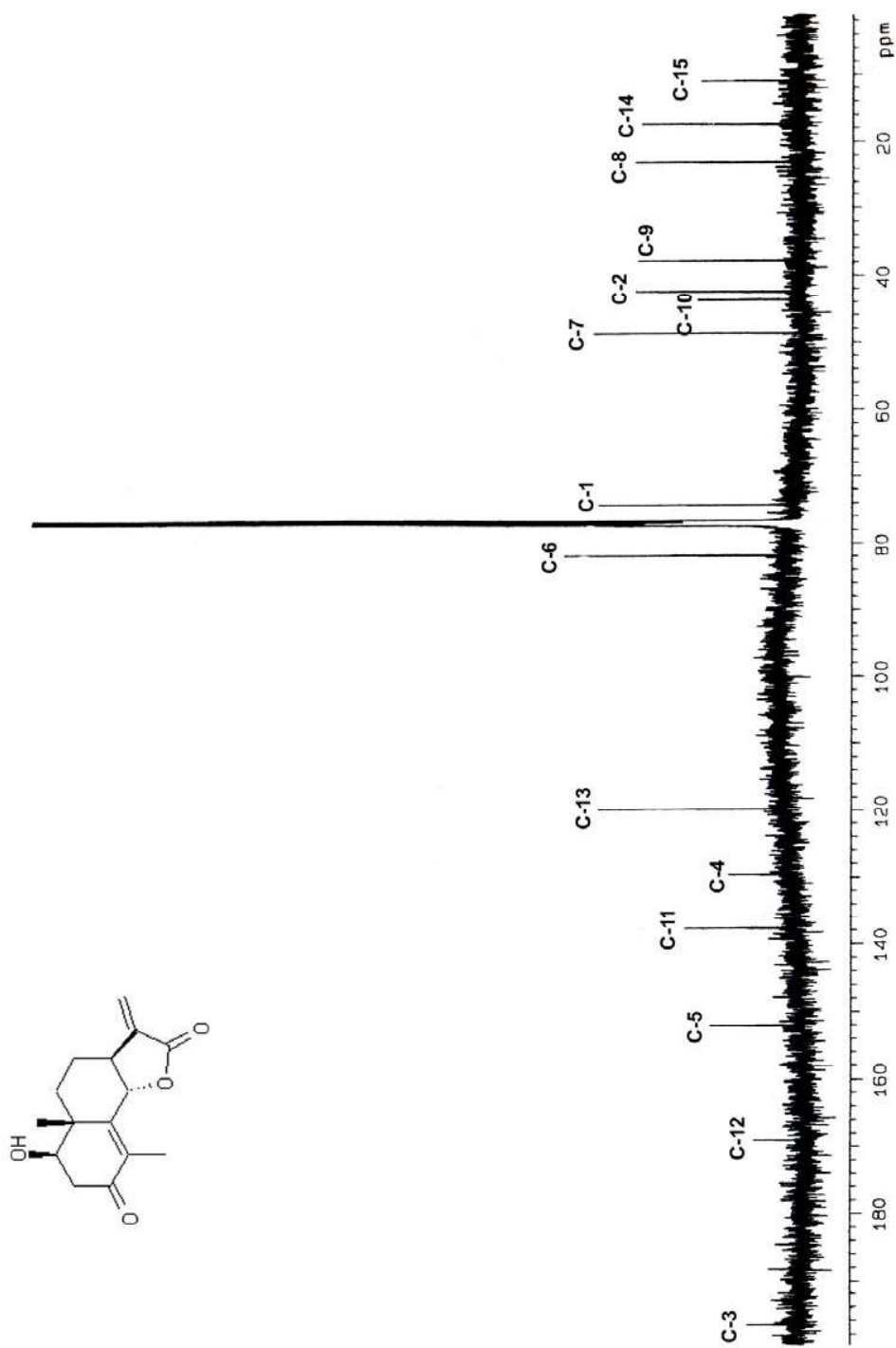
Espectro 5. Espectro de RMN^1H (300 MHz, $\text{DMSO-D}_6 + \text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, TMS) de la Ludovicina A.



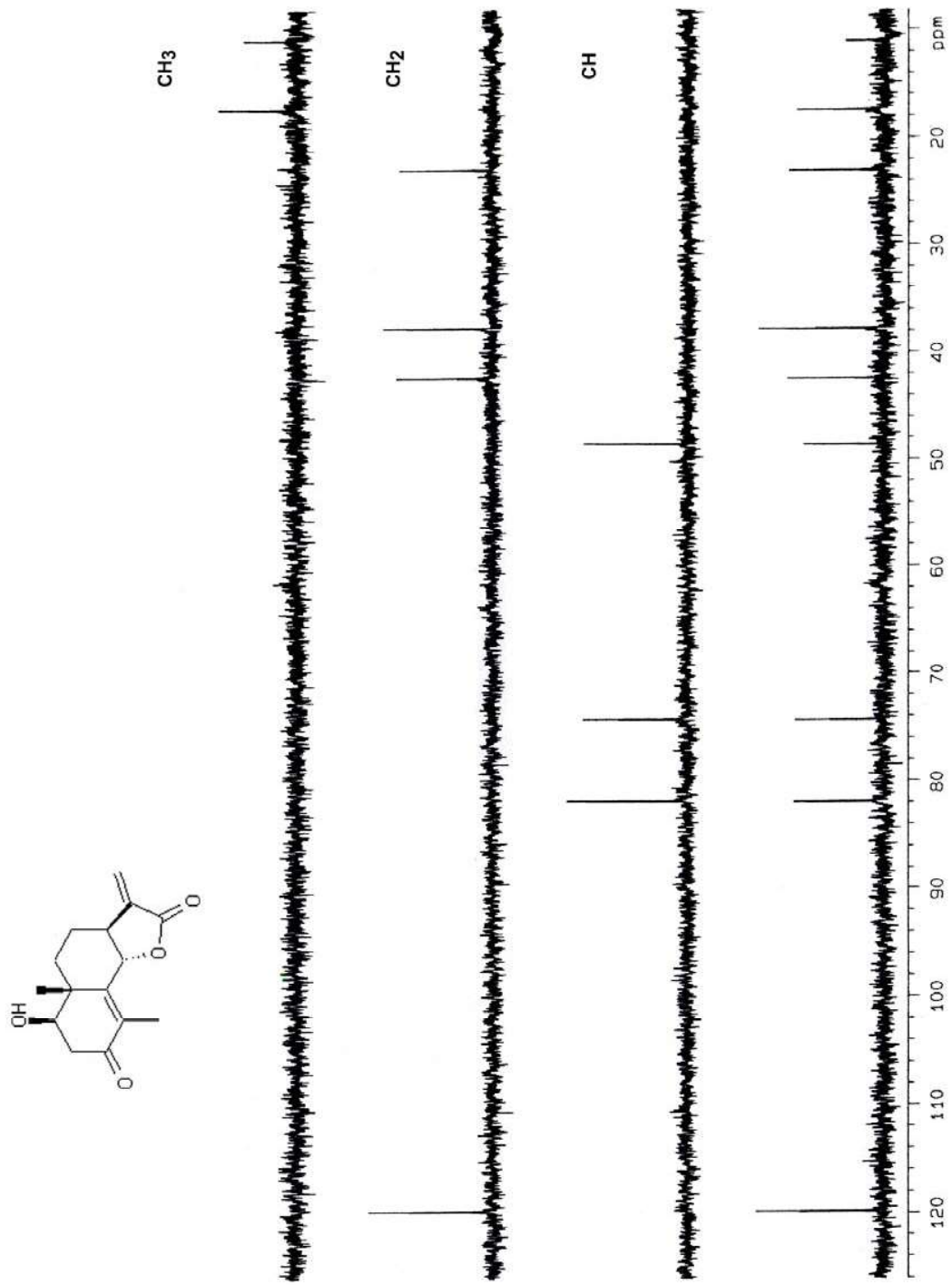
Espectro 6. Espectro COSY de la Ludovicina A.



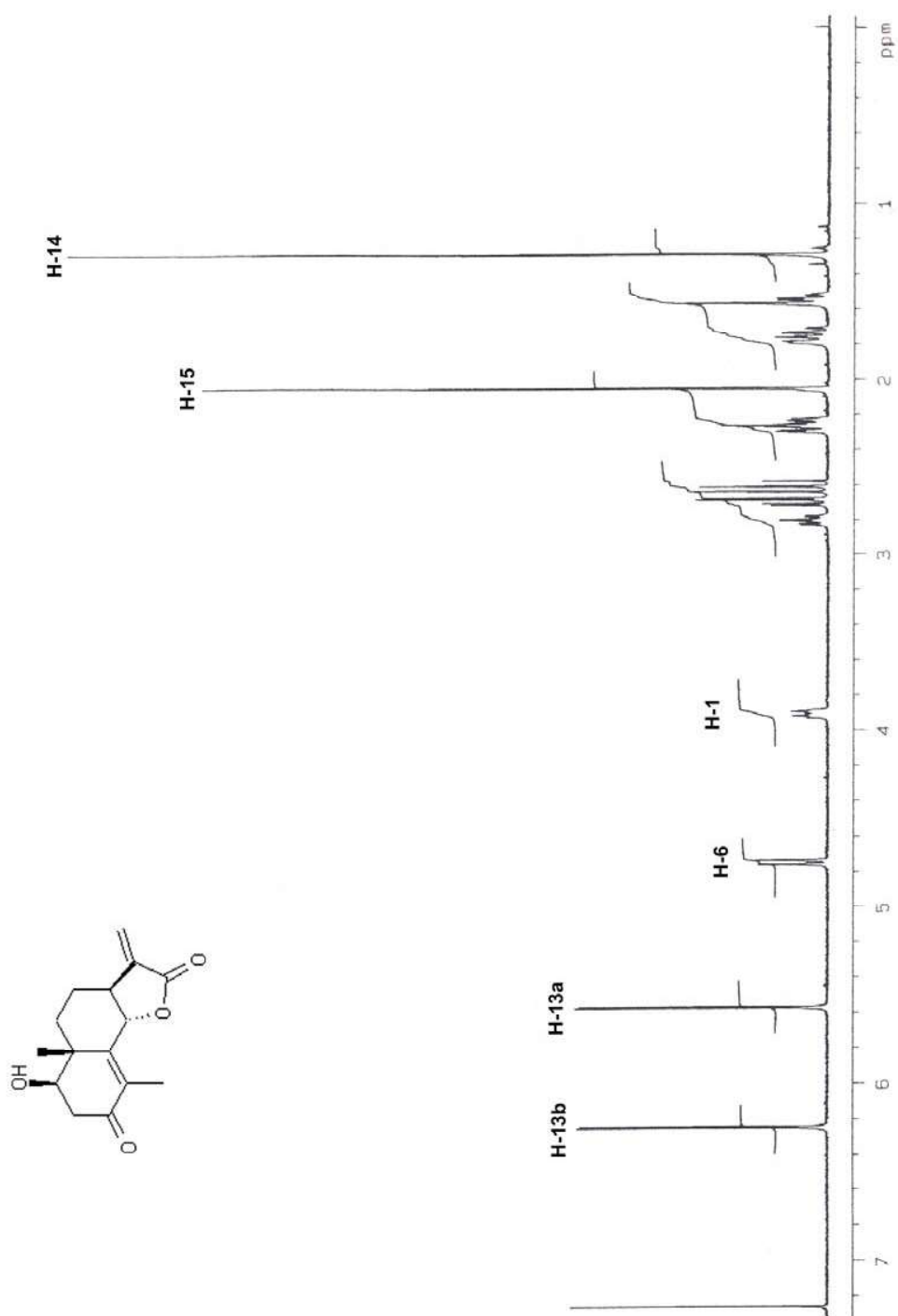
Espectro 7. Espectro IR (CHCl₃) de la Armexifolina.



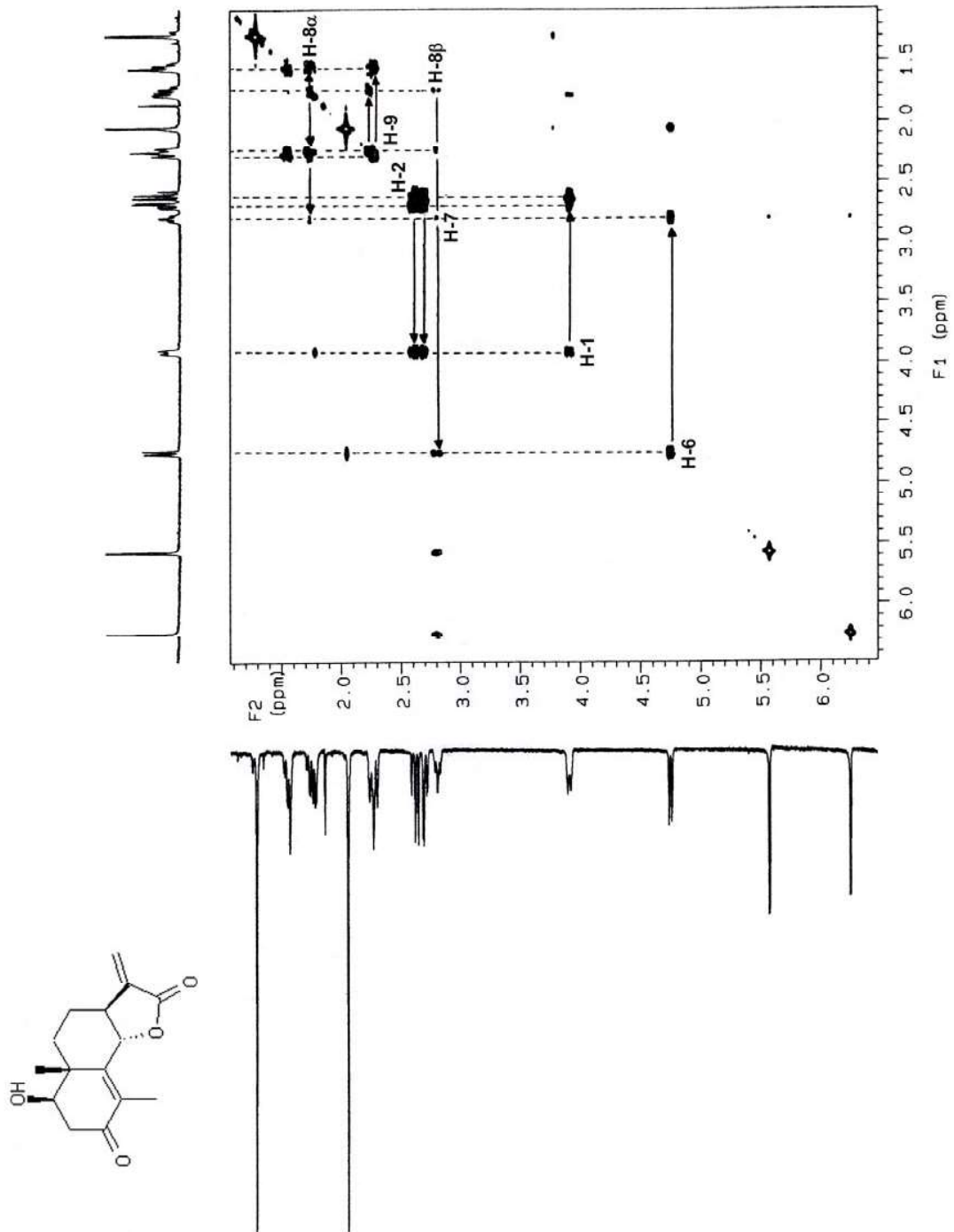
Espectro 8. Espectro de RMN¹³C (500 MHz, CDCl₃, TMS) de la Armexifolina.



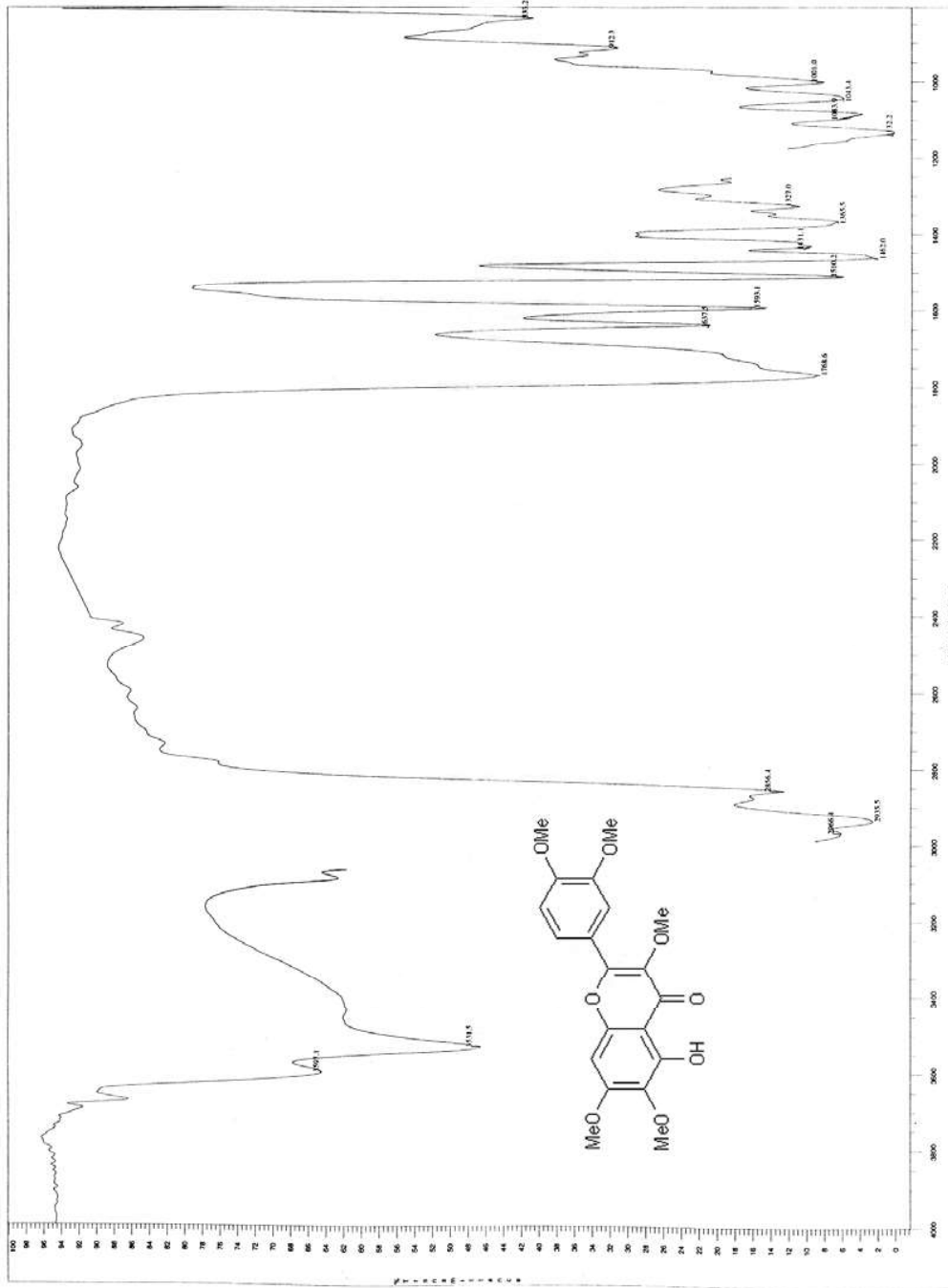
Espectro 9. Espectro DEPT de la Armexifolina.



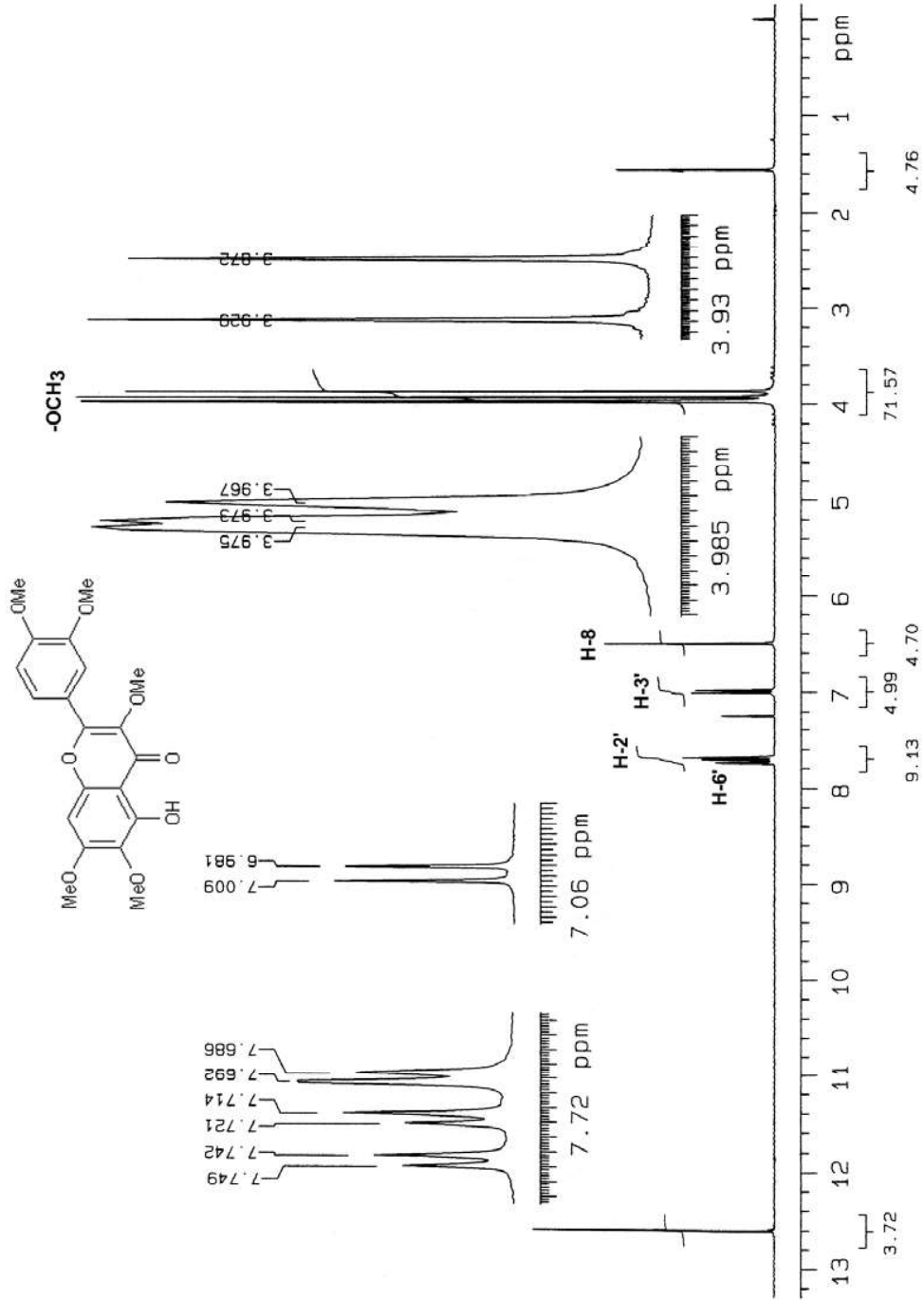
Espectro 10. Espectro de RMN^1H (500 MHz, CDCl_3 , TMS) de la Armexifolina.



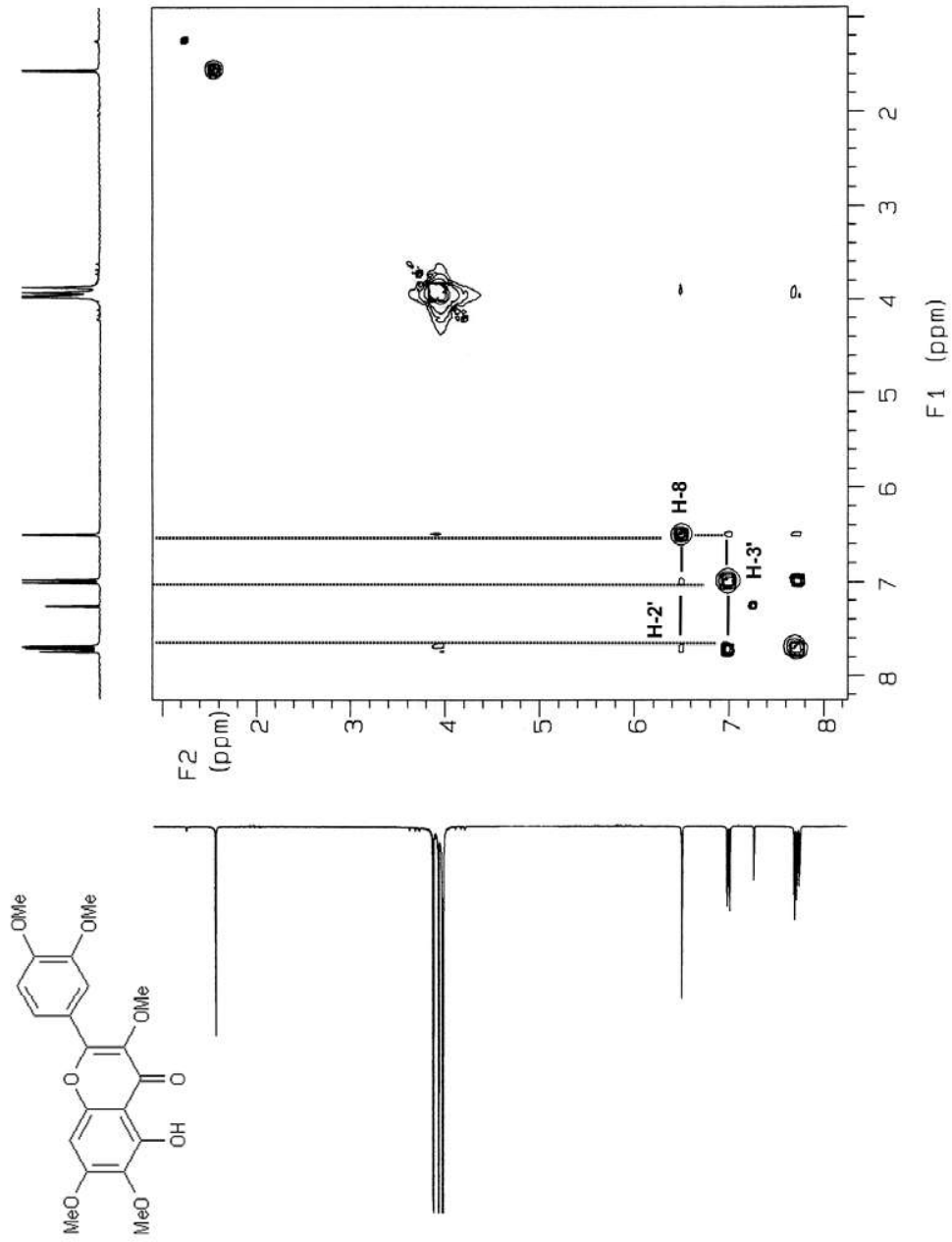
Espectro 11. Espectro COSY de la Armexifolina.



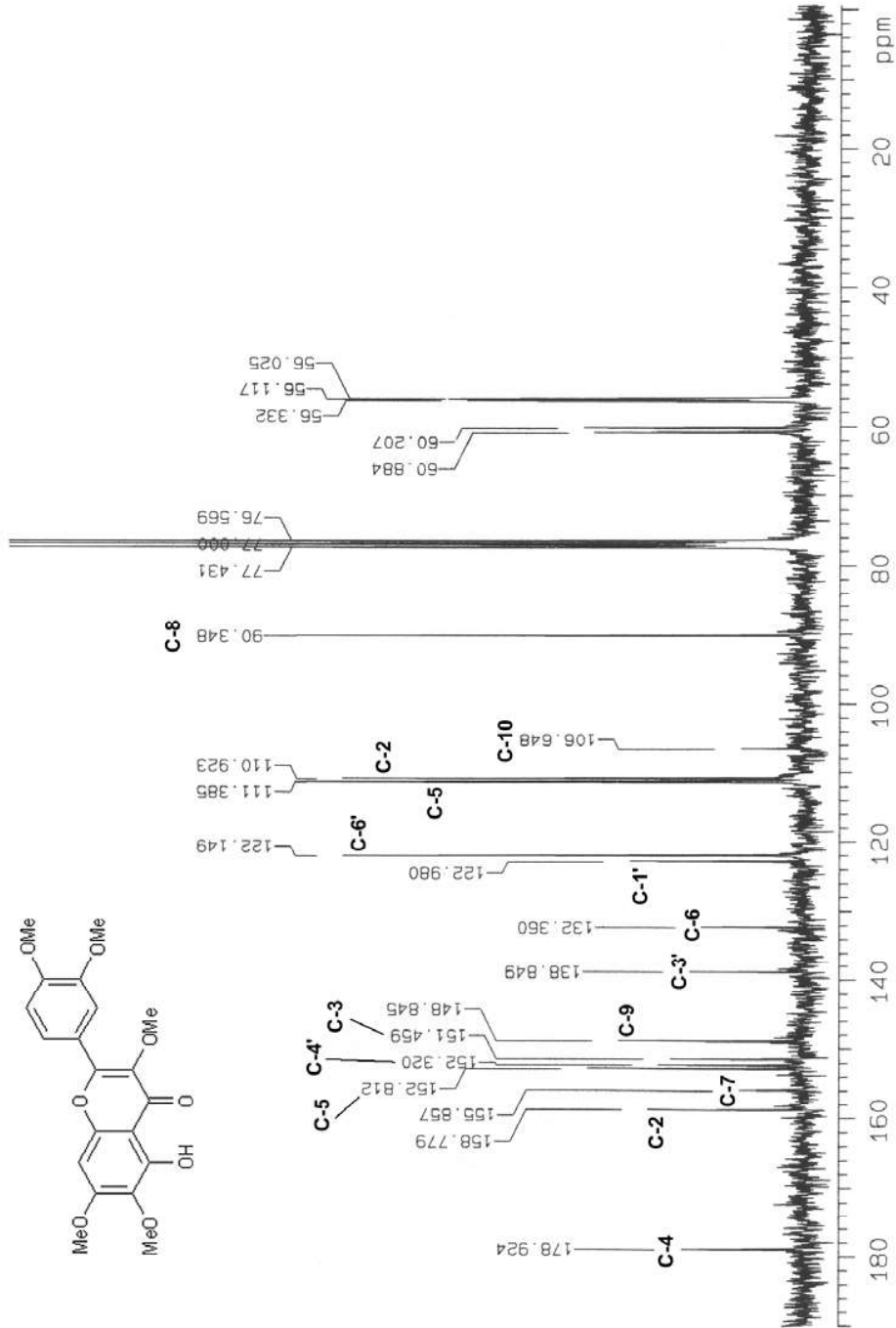
Espectro 12. Espectro de IR (CHCl_3) de la Artemetina.



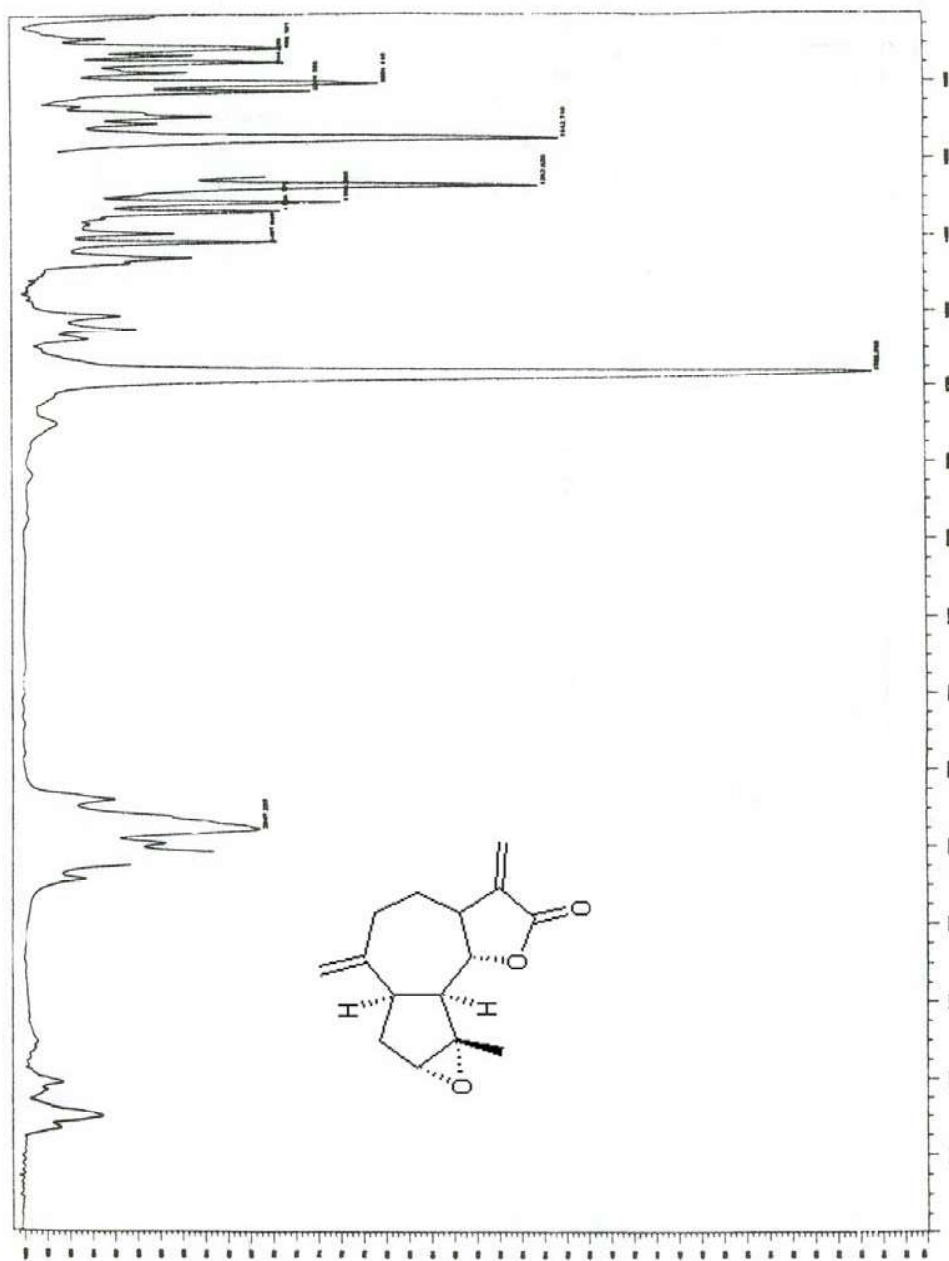
Espectro 13. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la Artemetina.



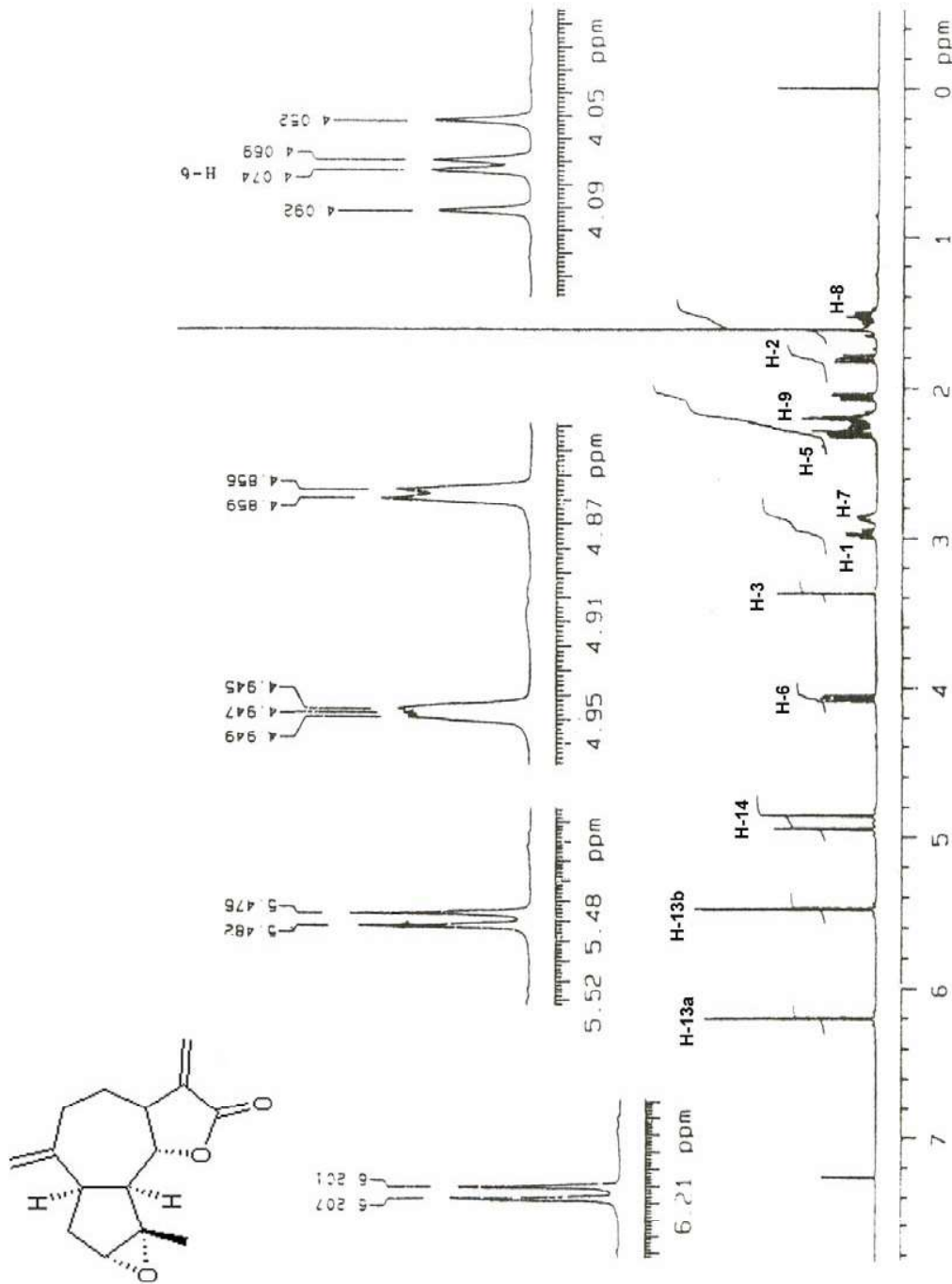
Espectro 14. Espectro COSY de la Artemetina.



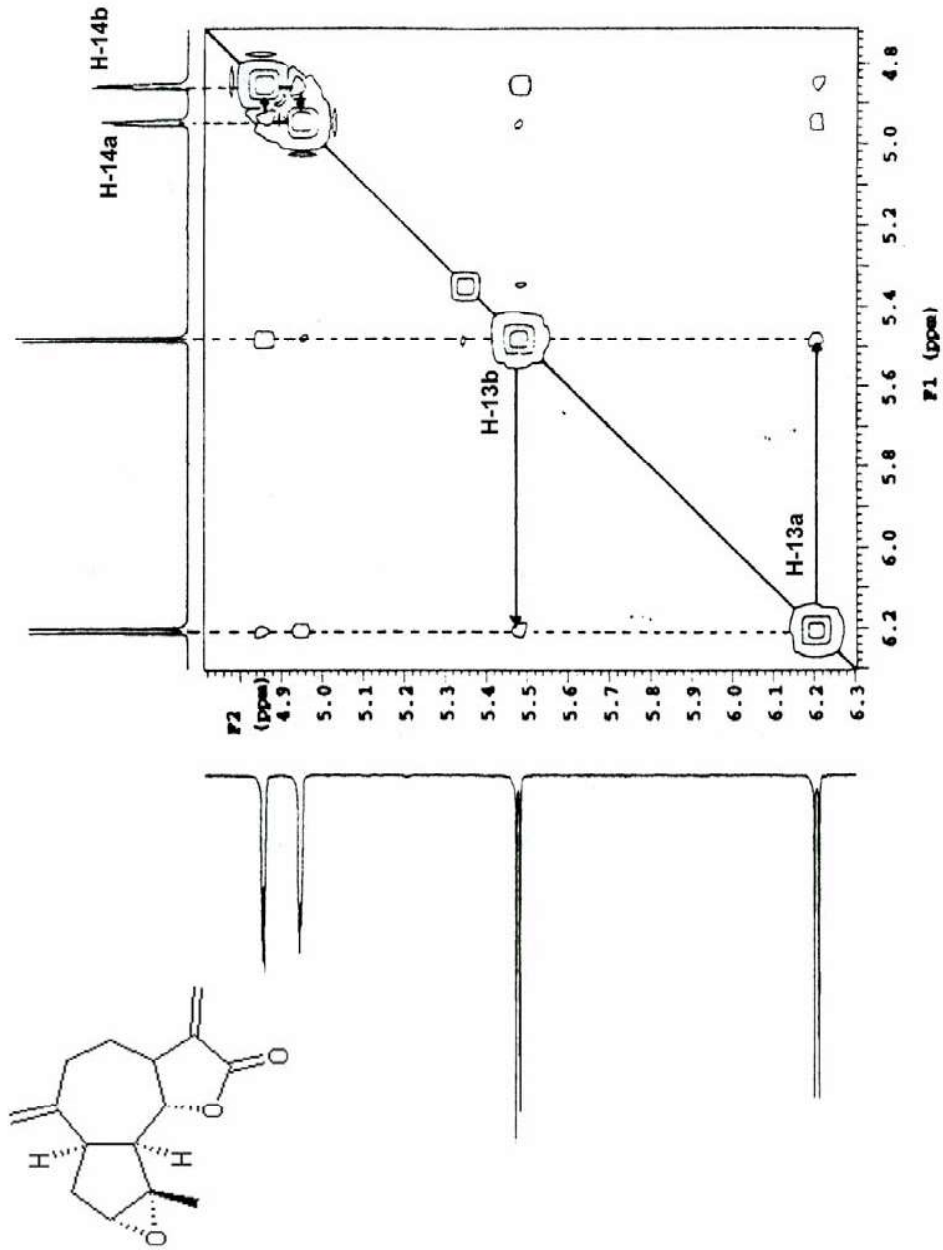
Espectro 15. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la Artemetina.



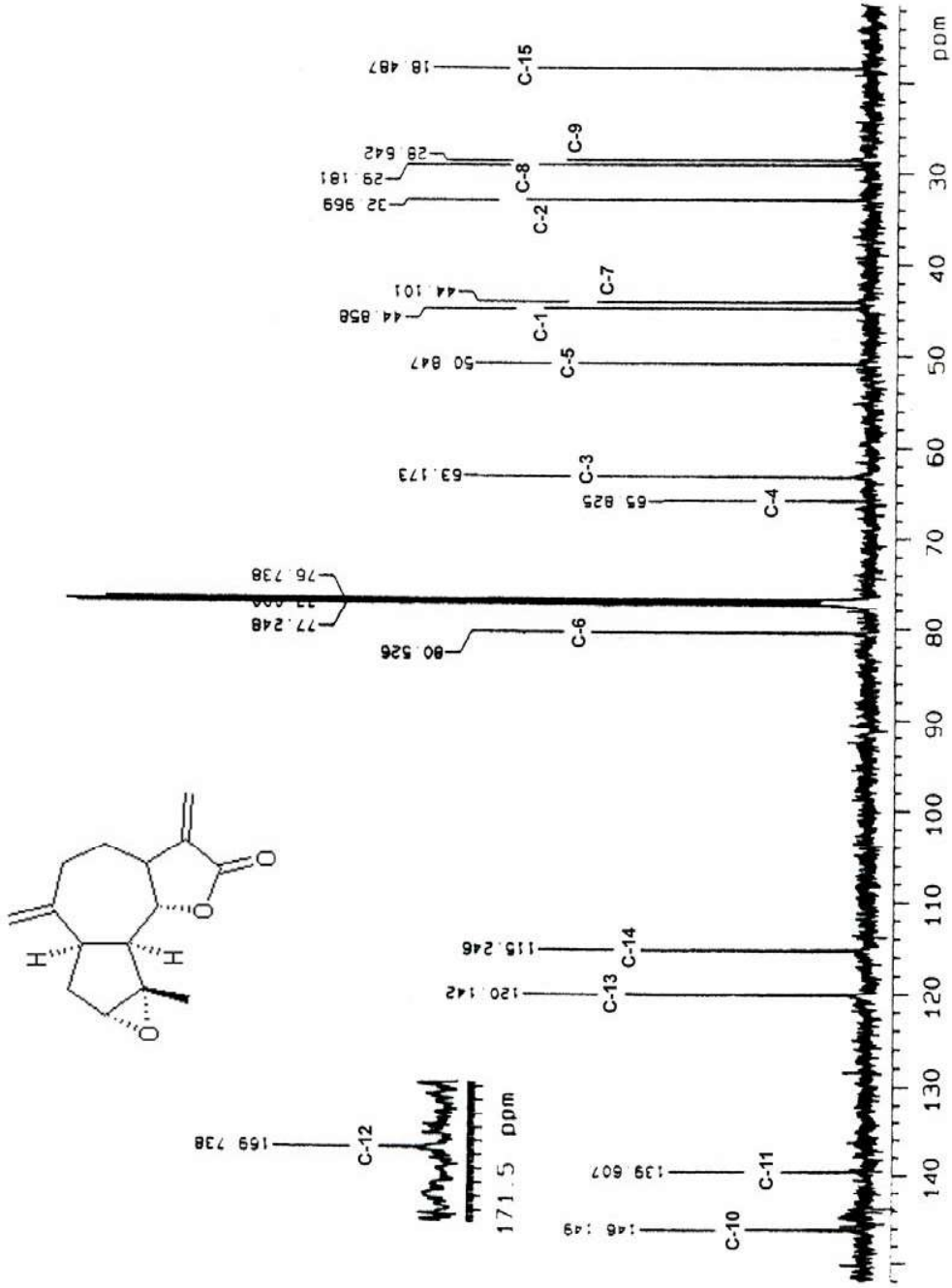
Espectro 16. Espectro de IR (CHCl₃) de la Estafiatina.



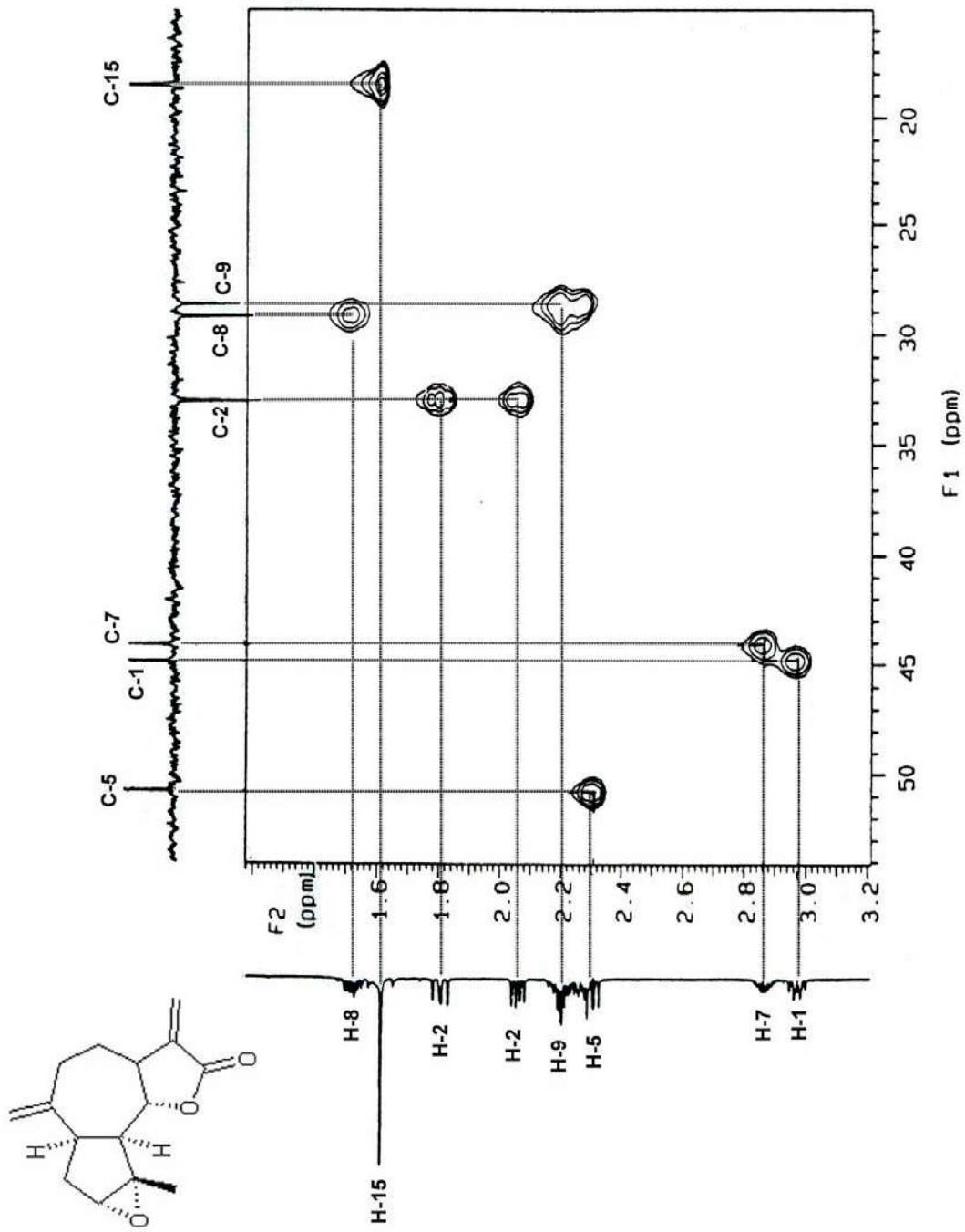
Espectro 17. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la Estafiatina.



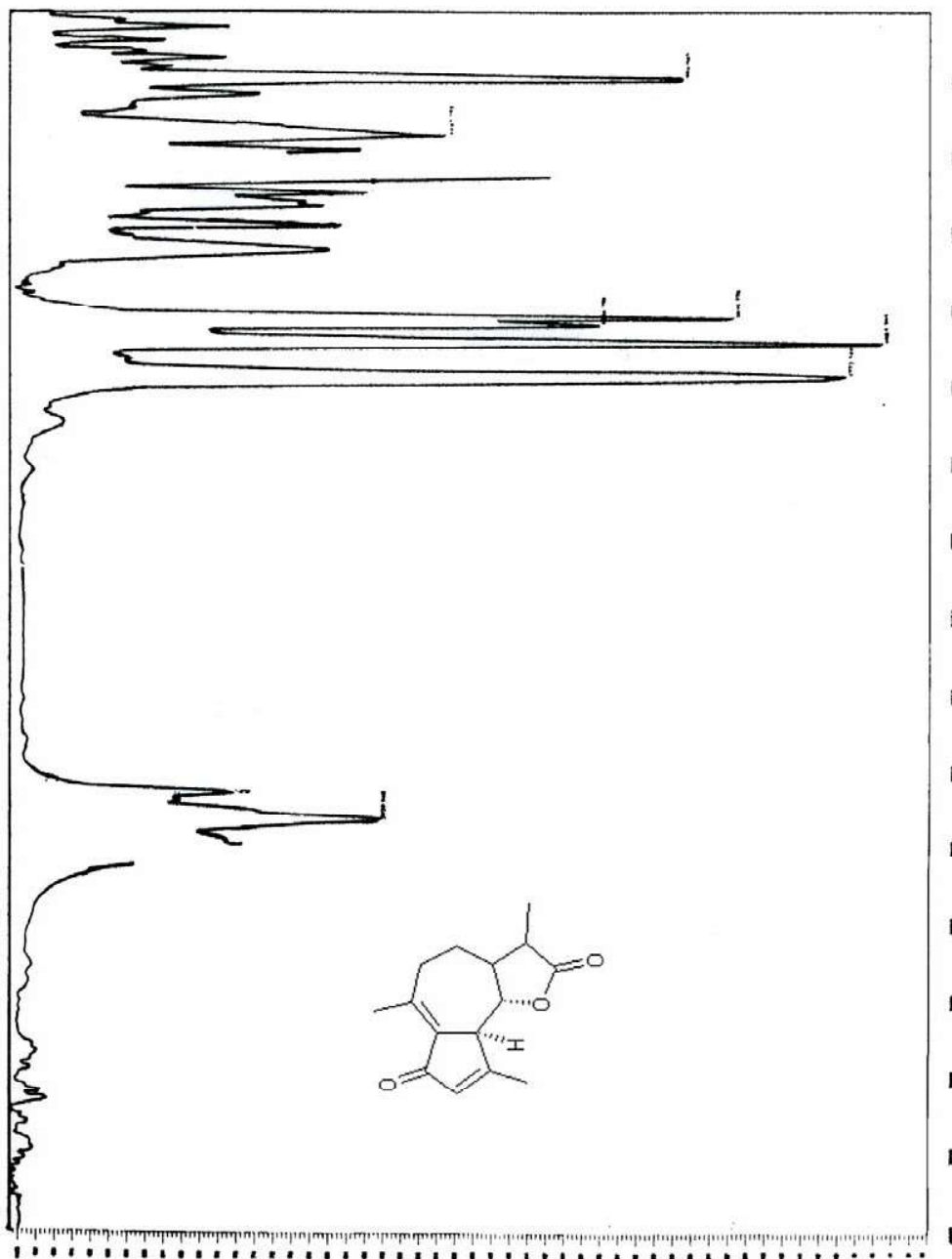
Espectro 18. Espectro COSY de la Estafiatina.



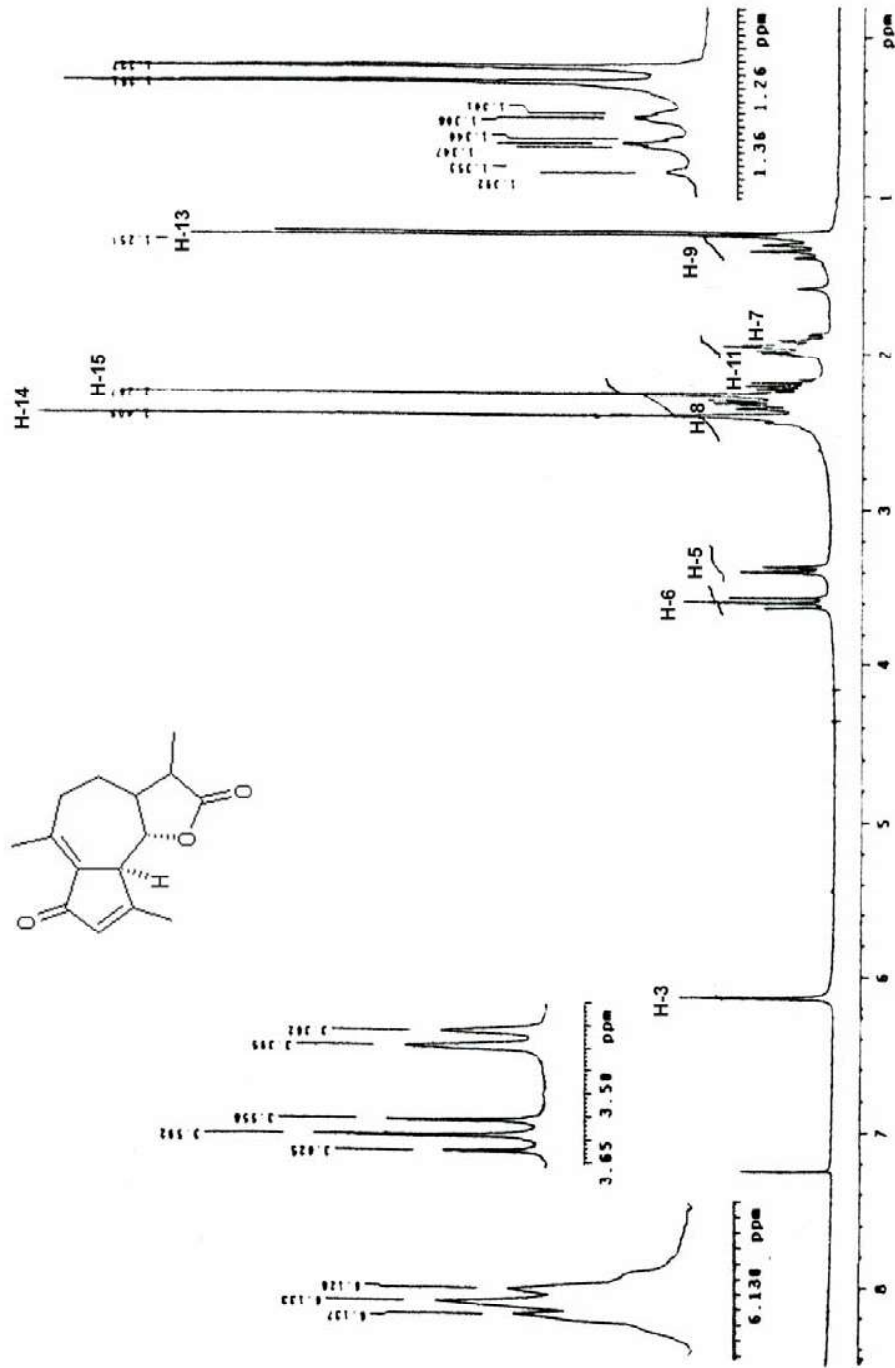
Espectro 19. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la Estafiatina.



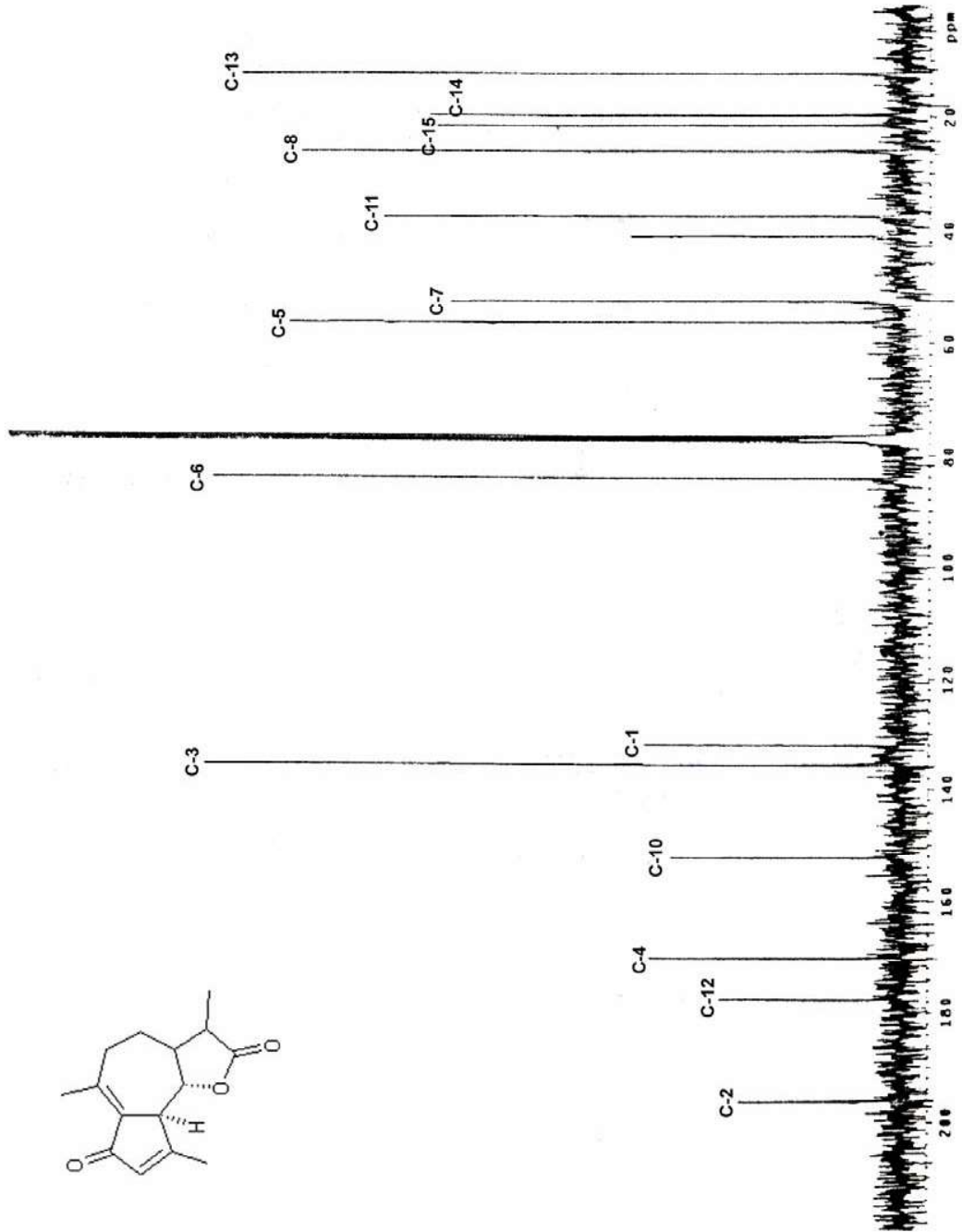
Espectro 20. Espectro HMBC de la Estafiatina.



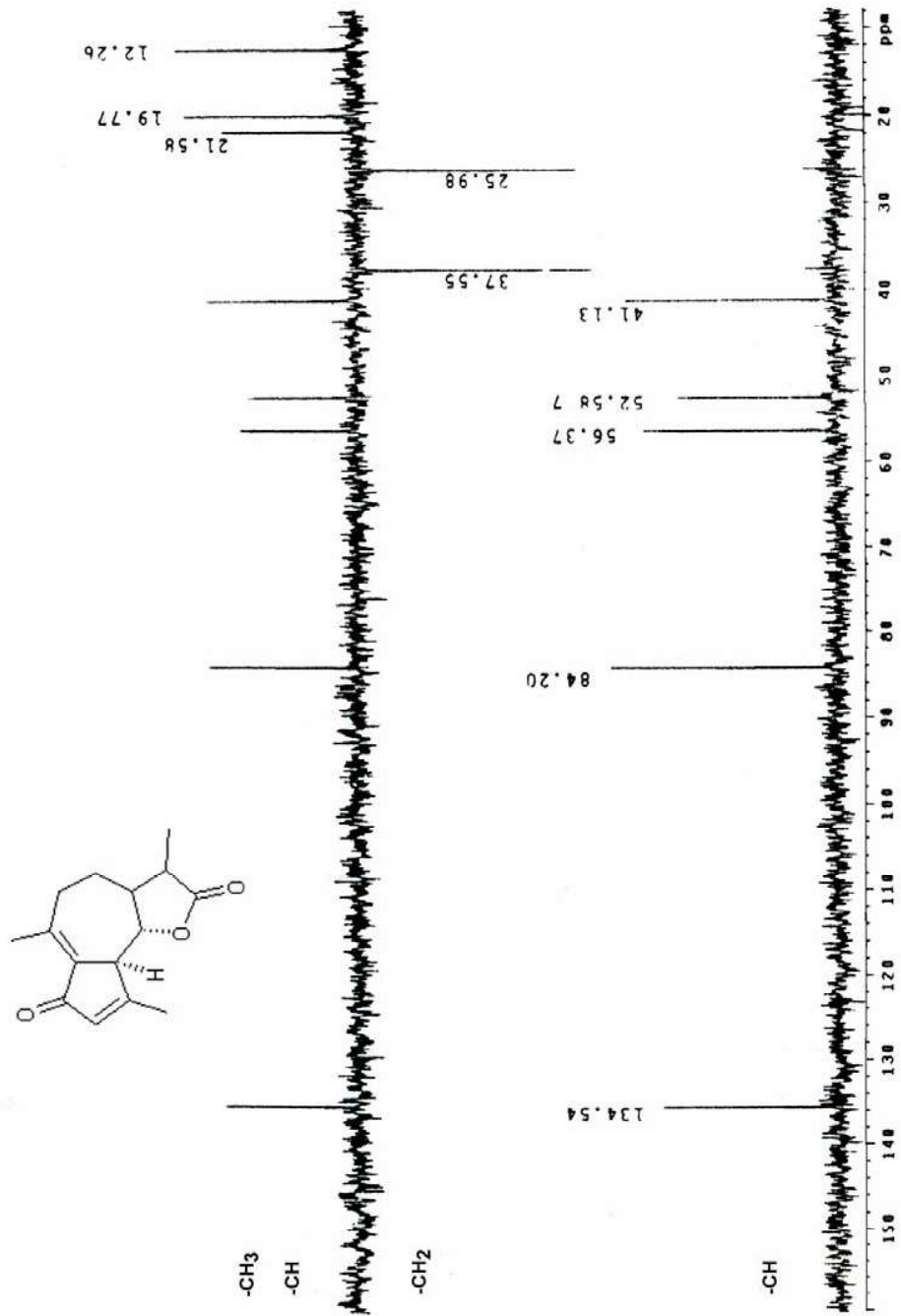
Espectro 21. Espectro de IR (Nujo) de la Achillina.



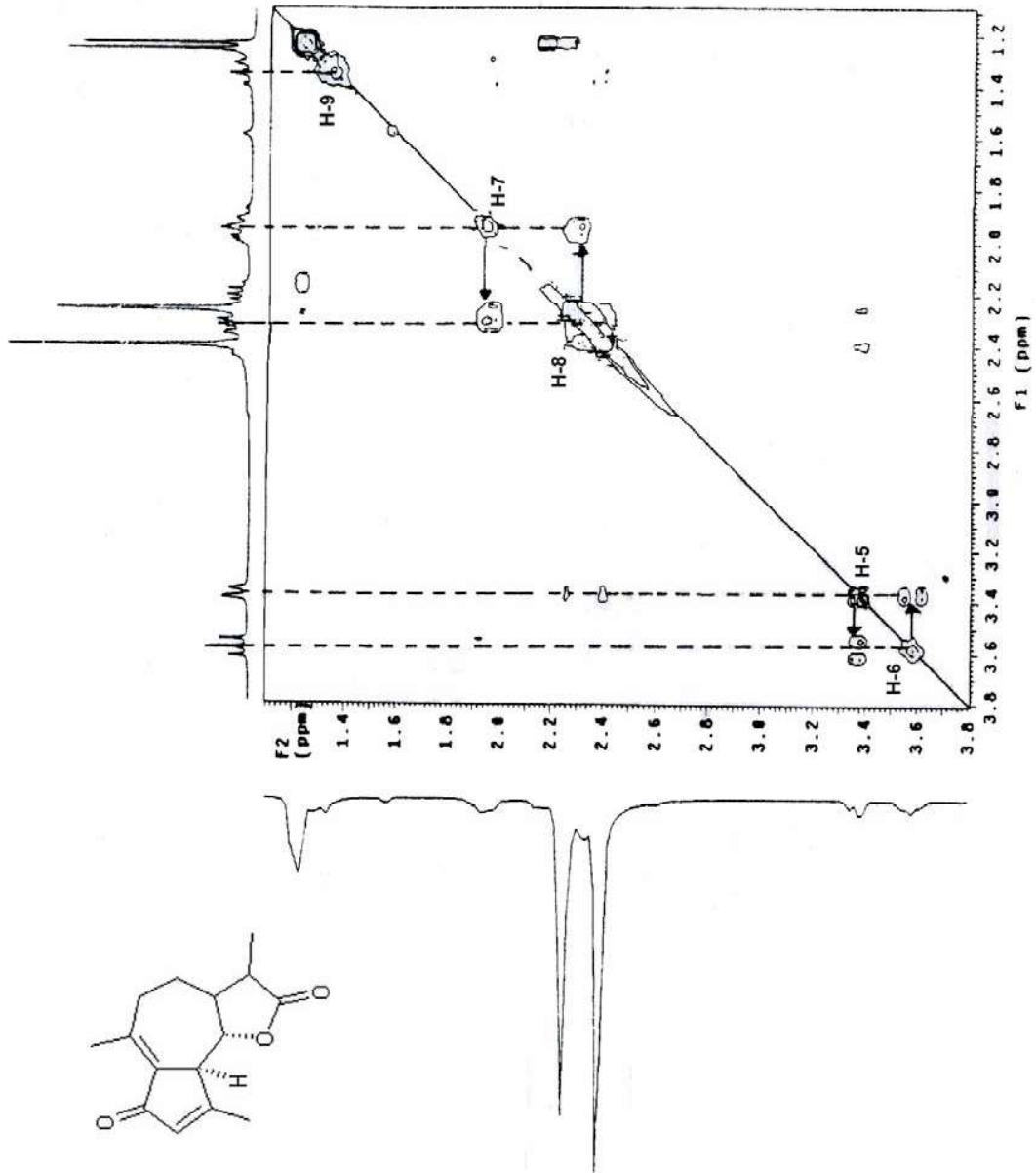
Espectro 22. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la Achillina.



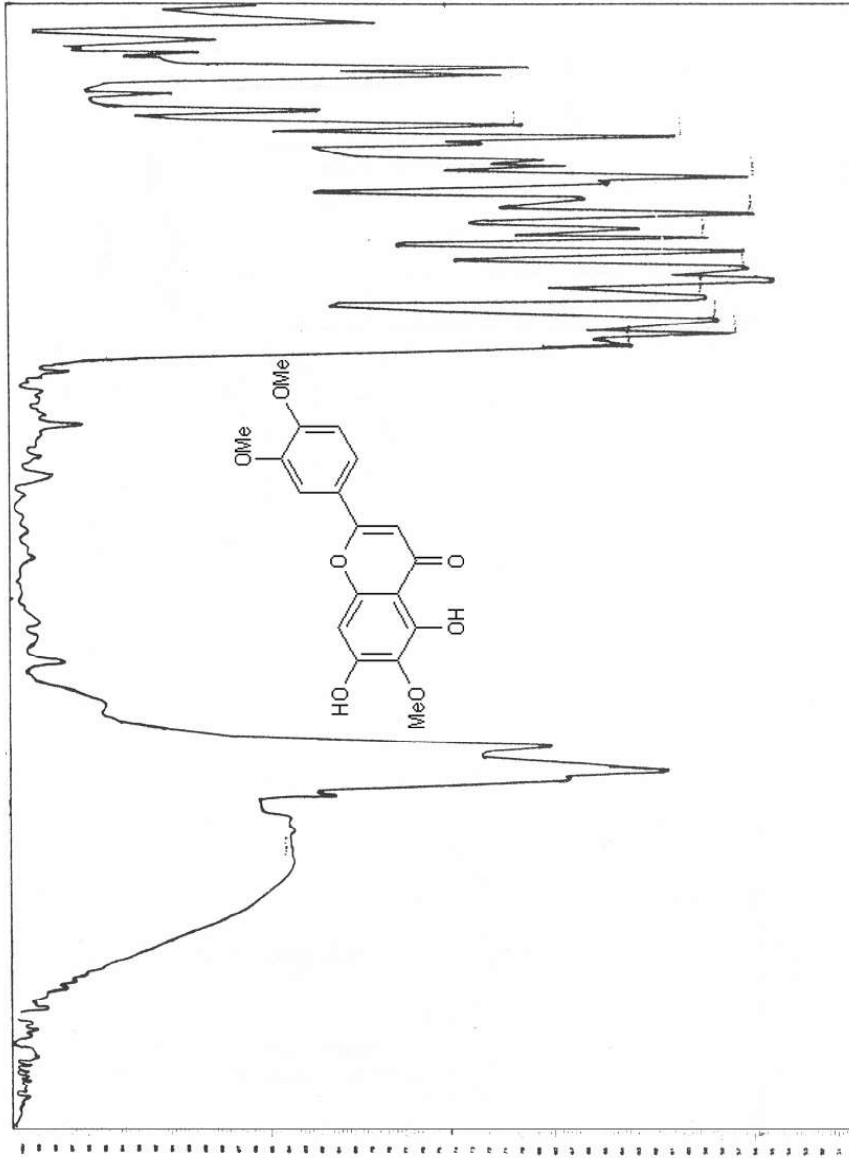
Espectro 23. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la Achillina.



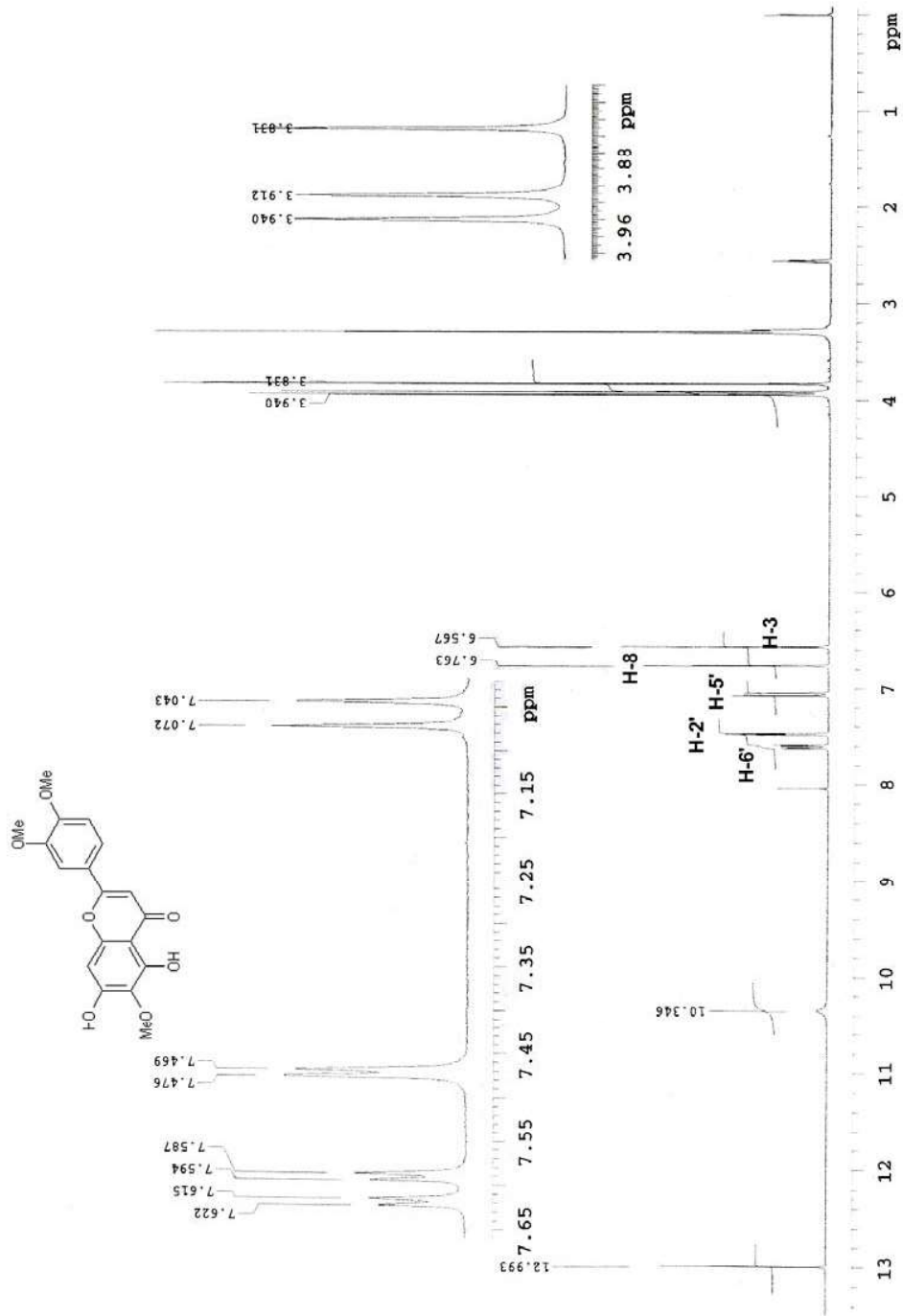
Espectro 24. Espectro APT de la Achillina.



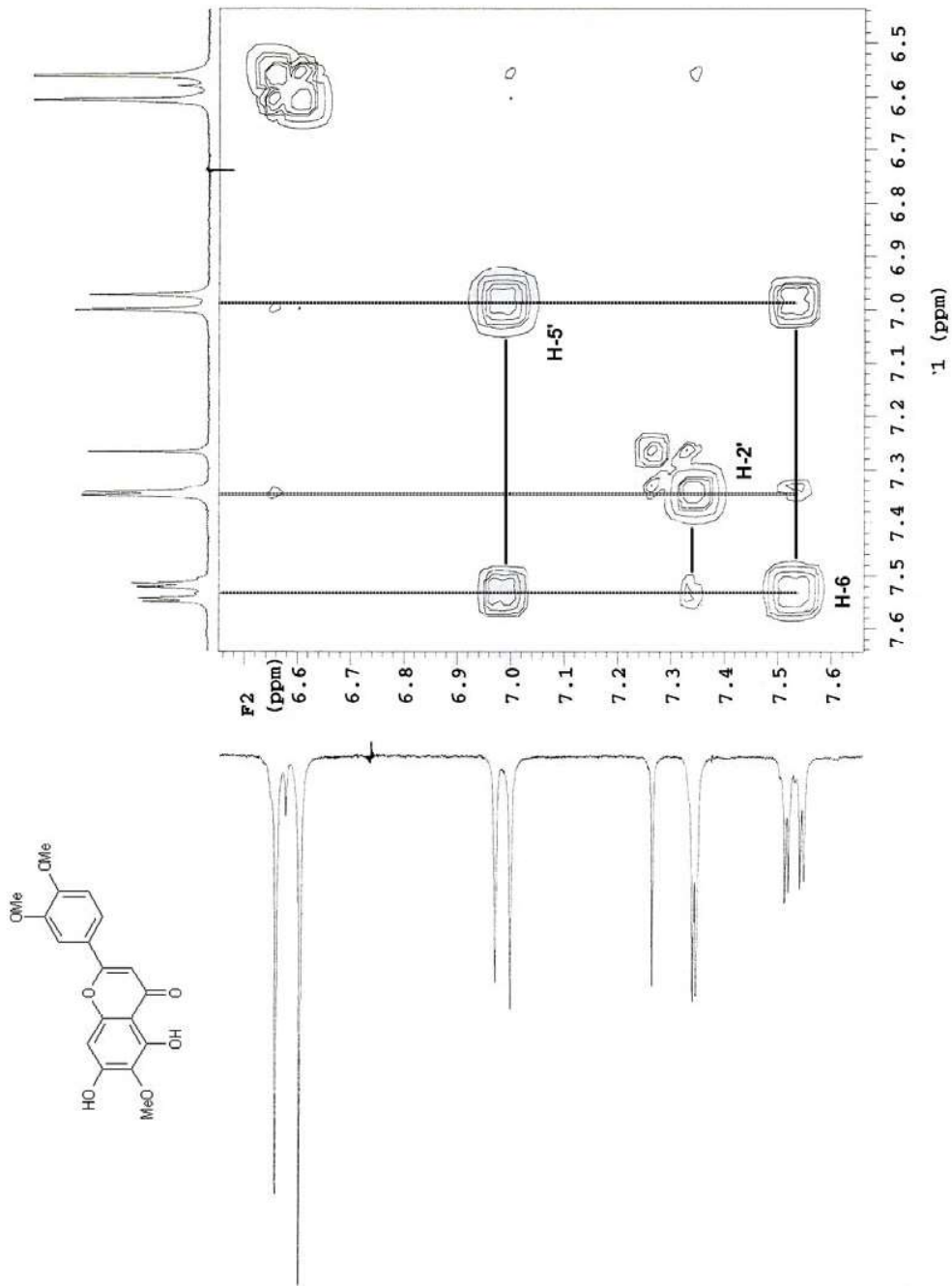
Espectro 25. Espectro COSY de la Achillina.



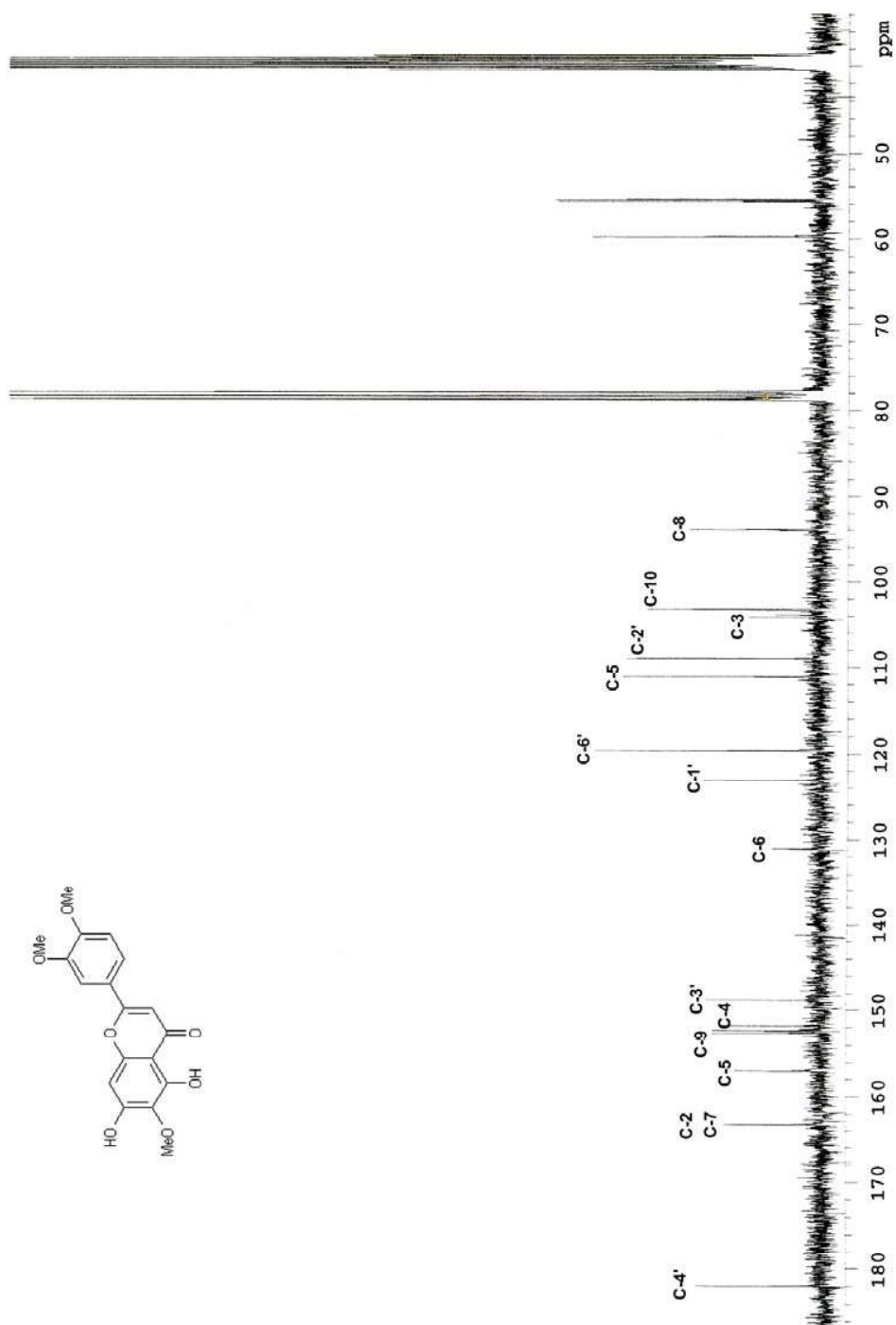
Espectro 26. Espectro de IR (Nujol) de la Eupatilina.



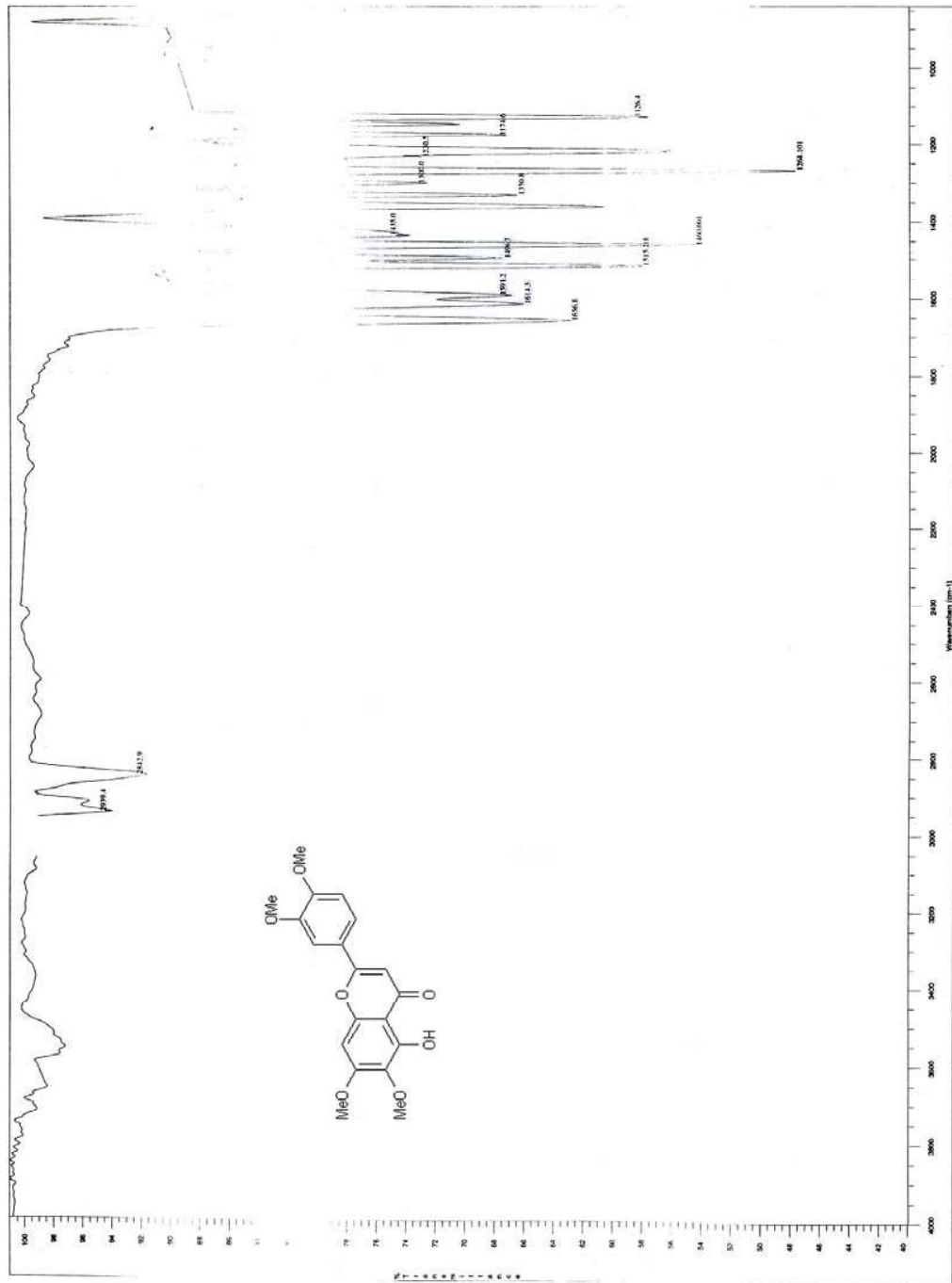
Espectro 27. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) de la Eupatilina.



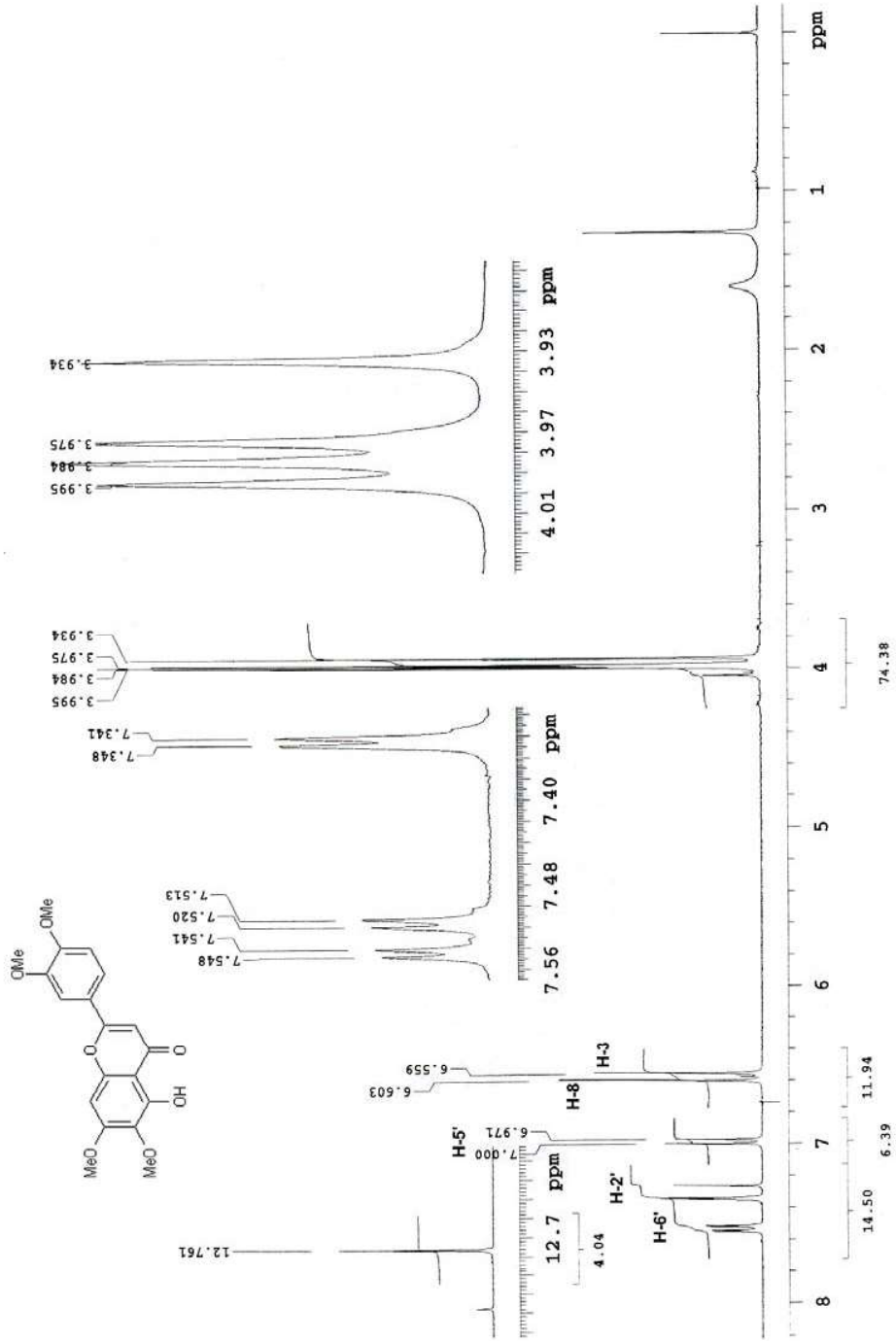
Espectro 28. Espectro COSY de la Eupatilina.



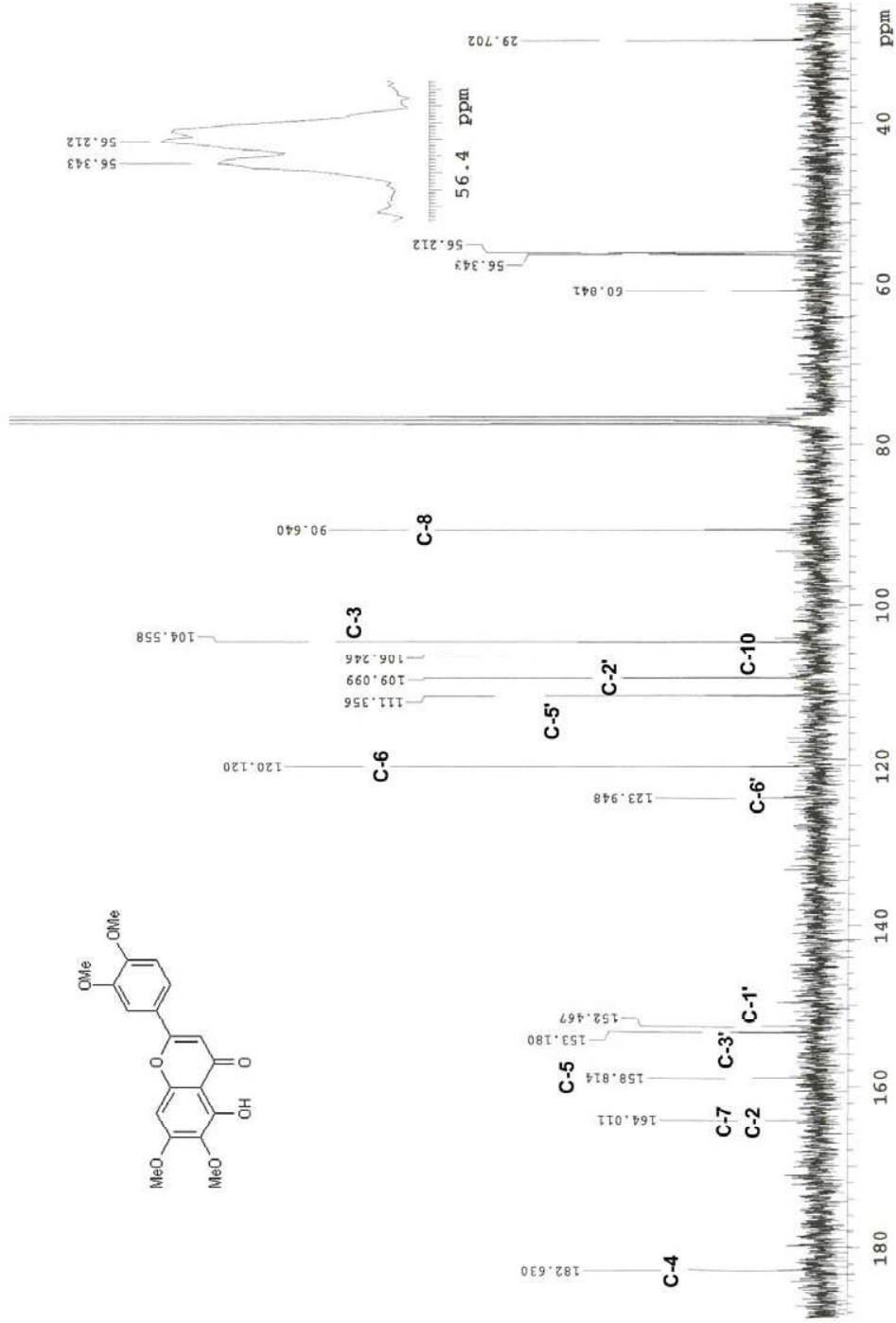
Espectro 29. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) de la Eupatiline.



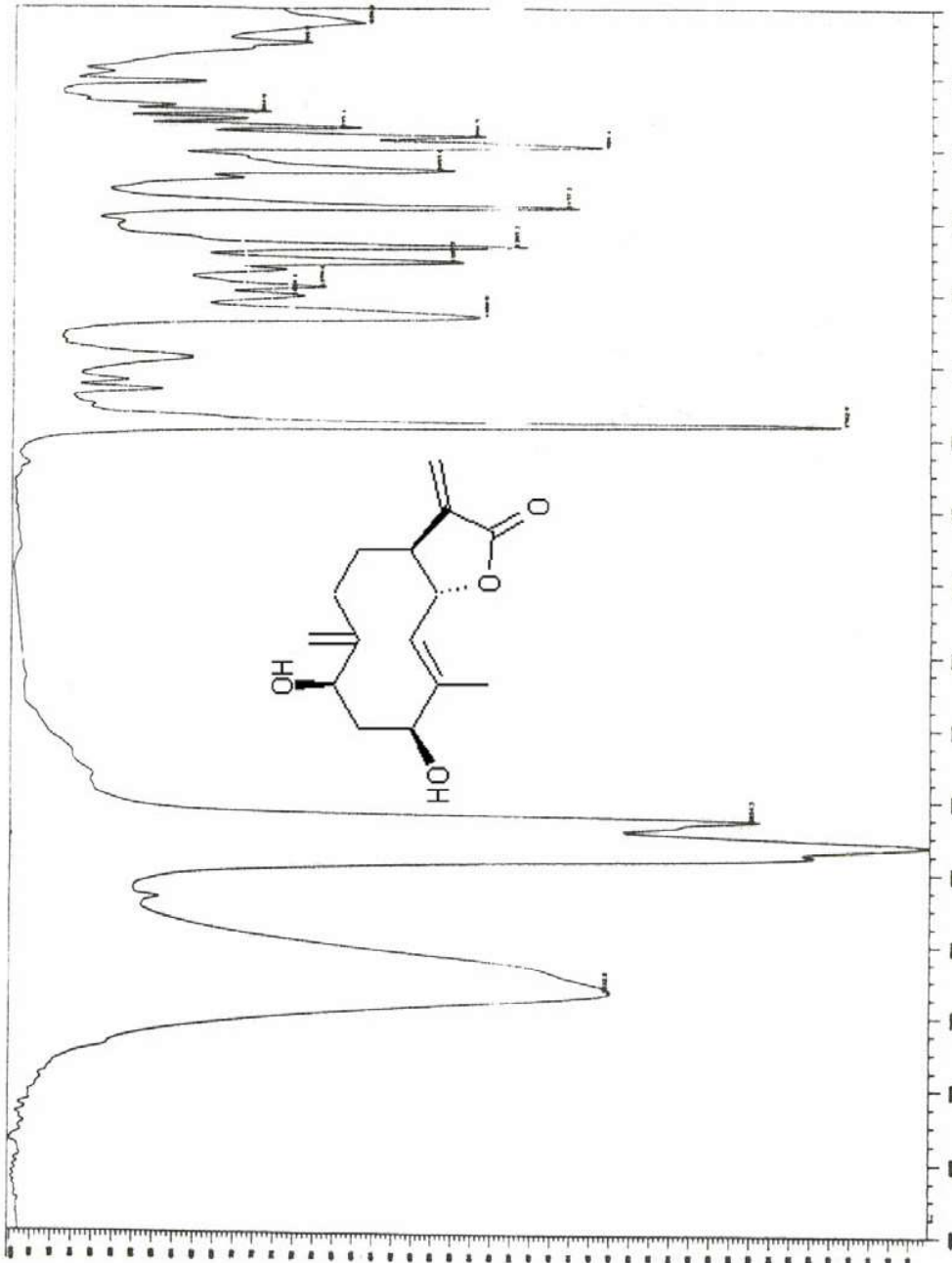
Espectro 30. Espectro de IR (Nujol) de la 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona.



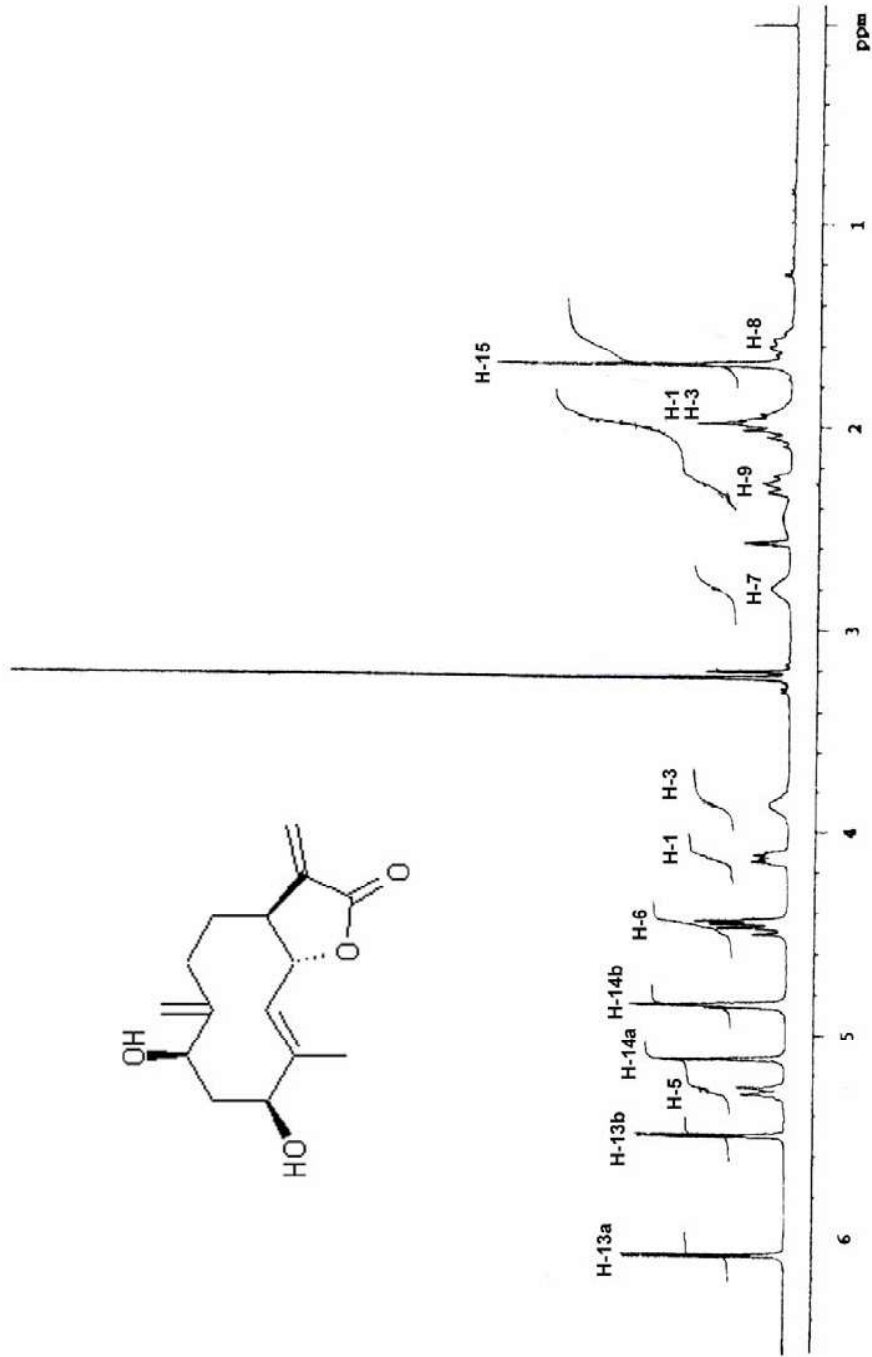
Espectro 31. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona.



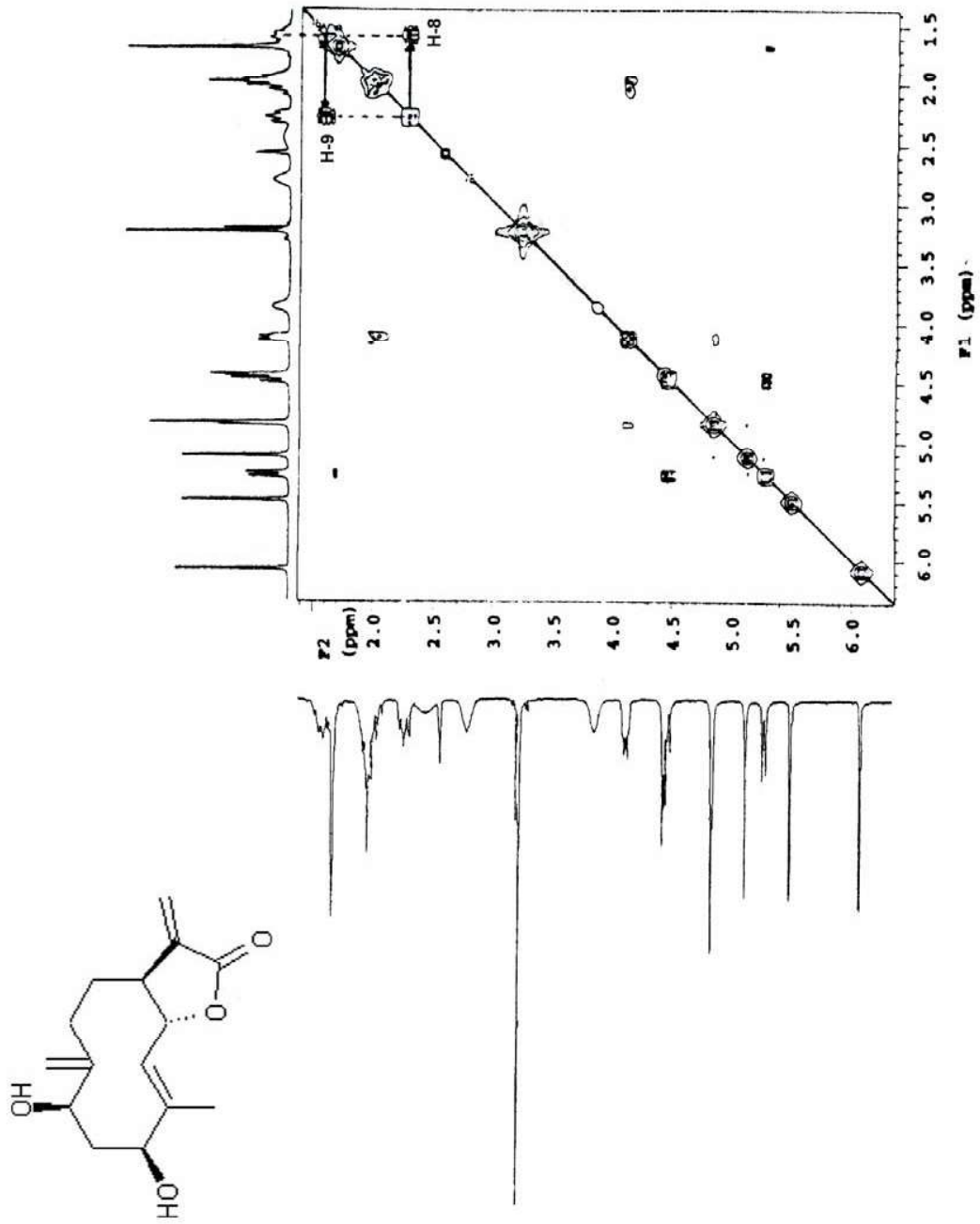
Espectro 32. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona.



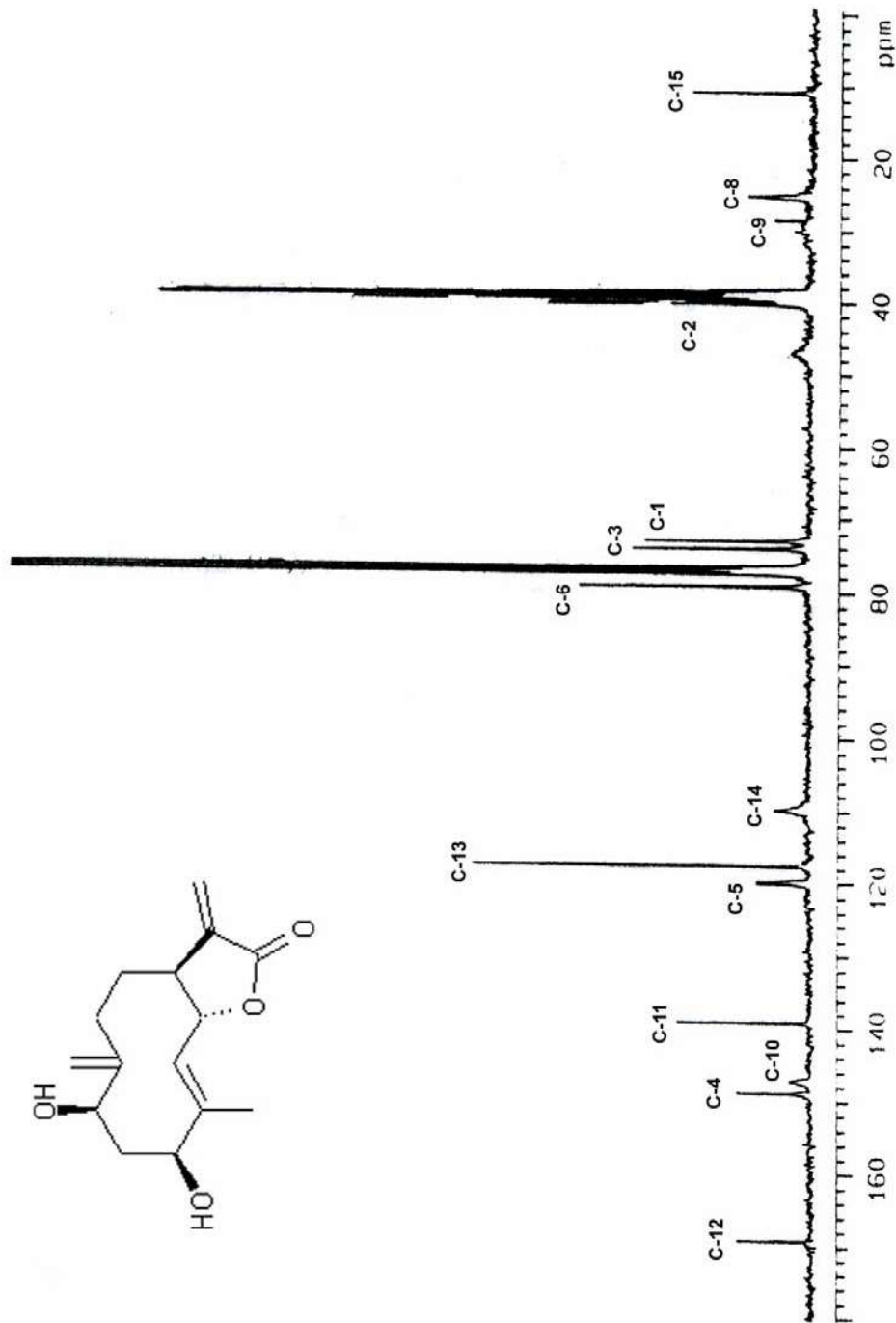
Espectro 33. Espectro de IR (Nujo) de la Ridentina.



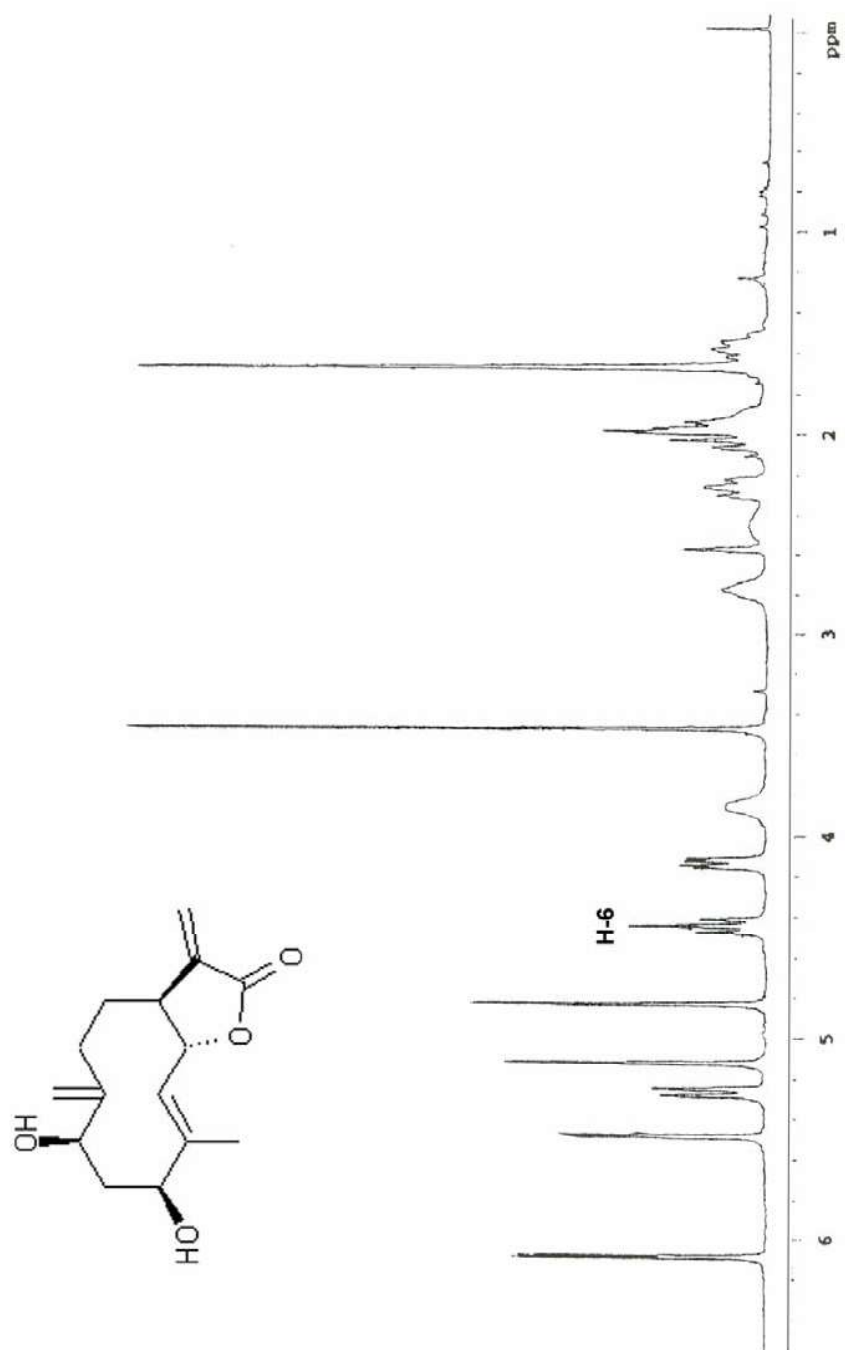
Espectro 34. Espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) de la Ridentina.



Espectro 35. Espectro COSY de la Ridentina.



Espectro 36. Espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) de la Ridentina.



Espectro 37. Espectro de RMN^1H (300 MHz, CDCl_3 + DMSO + D_2O , TMS) de la Ridentina.

REFERENCIAS

1. Williamson E, Okpako D. y Evans F. **1996**. Pharmacological methods in phytotherapy research. Volume I. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Jhon Wiley and Sons, GB: VII-IX, 1-8.
2. Harvey A. **1999**. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 20:196-198.
3. Cordell G. **1995**. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40:1585-1612.
4. Pérez M. **1994**. Plantas Medicinales, etnobotánica y fitoquímica: importancia de la investigación interdisciplinaria. *Folium (Instituto de Química)* 7:2-3.
5. La herbolaria y sus potencialidades. *Investigación y Desarrollo* 3:8, **1995**.
6. Capasso F., Balastrieri B. y Mascolo N. **1980**. Actualidad de las Plantas Medicinales. *Medicina Tradicional* 3:53-61.
7. Rodríguez E., Towers G. y Mitchell J. **1976**. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15:1573-1580.
8. Aranda F. (editor). **1996**. Plantas del mundo a México. *Guía México desconocido: Plantas que curan* 29:18-69.
9. Marco J. y Barbera O. **1990**. Natural Products from the genus *Artemisia* L. En: *Studies in Natural Products Chemistry* 7:201-264.
10. Kelsey R. y Shafizadeh F. **1979**. Sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia*. *Phytochemistry* 18:1591-1611.
11. Geissman T. e Irwin M. **1970**. Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*. *Pure and Applied Chemistry* 21:167-180.
12. Ruiz A. **1991**. *Análisis fitoquímico de Artemisia ludoviciana en busca de sustancias con propiedades antimaláricas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales, UAEM, México.
13. Lozoya X., Aguilar A. y Camacho J. **1987**. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Revista Médica del IMSS* 25:283-291.

14. Linares E., Flores B. y Bye R. **1988**. *Selección de Plantas Medicinales de México*, Edit. Limusa, México, 42-43.
15. Voldk J. y Stodolc J. **1983**. *El gran libro de las plantas medicinales*. Edit. Artra, España, 83.
16. Martínez M. **1992**. *Las Plantas Medicinales de México*. 6ª ed. Edit. Botas, México, 133-135.
17. Sánchez O. **1980**. *La flora del Valle de México*. 6ª ed. Edit. Herrero, México, 432.
18. Bruneton J. **1991**. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Edit. Acribia, España, 284-290.
19. Harborne B. **1984**. *Phytochemical methods*. 2nd edition. Chapman and Hall, EUA.
20. Domínguez X. **1979**. *Métodos de investigación fitoquímica*. Edit. Limusa, México, 93-110.
21. Duke S., Paul R. y Lee M. **1988**. Terpenoids from the genus *Artemisia* as potential pesticides. En: *Biologically Active Natural Products* 88:318-334.
22. Romo A. **1985**. *Productos Naturales de la flora mexicana*. Edit. Limusa, México, 69-137.
23. Manitto P. **1980**. *Biosynthesis of Natural Products*. Ellis Horwood Ltd., Pub., England, 237-254.
24. Picman A. **1986**. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 14:255-281.
25. Kupchan S., Eakin M. y Thomas A. **1971**. Tumor inhibitors. 69. Structure-citotoxicity relationships the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry* 14:1147-1152.
26. Picman A. **1993**. Inhibition of fungal by selected sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 21:307-314.
27. Klayman D. **1985**. Quinhaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 228:1049-1055.
27. Santos S. **1989**. Lactonas sesquiterpénicas - aplicações farmacológicas e quimiotaxonómicas. *Boletim SPQ* 36:41-43.
28. Lyss G., Schmidt T., Merfort I. y Pahl H. **1997**. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-κB. *Biological Chemistry* 378:951-961.
29. Lyß G., Knorre A., Schmidt T., Pahl H. y Merfort I. **1998**. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-κB by directy targeting p65. *The Journal of Biological Chemistry* 273:33508-33516.
30. Markham K. **1982**. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, EUA:1-54.

31. Liu Y., Newman P., Timmermann B. y Mabry T. **1990**. Techniques for flavonoid analysis: Phytochemistry Methods Fronteir. *Revista Latinoamericana de Química* 90:1-25.
32. Geahlen R., Koonchanok N. y McLaughlin J. **1989**. Inhibition of Protein-Tyrosine Kinase activity by flavanoids and related compounds. *Journal of Natural Products* 52:982-986.
33. Charnichart C. **1991**. Estudio químico de *Esenbeckia huertana*. Tesis de Licenciatura, UNAM: 12-15.
34. Biyiti L., Pesando D. y Puiseux-Dao S. **1988**. Antimicrobial activity of two flavanones isolated from the Cameroonian plant *Erythrina sigmoidea*. *Planta Medica* 126-128.
35. Miski M., Ulubelen A. y Johansson C. **1983**. Antibacterial activity of flavonoids form *Salvia palestina*. *Journal of Natural Products* 46:874-875.
36. Barron D., Desfougeres A., Mounquvé-Tachamo D. y Raguene H. **1995**. Claisen Rearrangements in the organic synthesis of prenil flavonoids. *Phytochemical Society of North America* 35:19.
37. Zheng C. **1994**. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica* 60(1):54-57.
38. Sánchez I., Calderon J., Ruiz B., Tellez J., Calzada L. y Taboada J. **2001**. *In vitro* cytotoxicity of flavonoids against MK2 and C6 tumour cells. *Phytotherapy Research* 15(4):290-292.
39. Elford B., Roberts M., Phillipson J. y Wilson R. **1987**. Potentiation of the antimalarial activity of quinghaosu by methoxylated flavones. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(3):434-436.
40. Vasanth S., Gopal R. y Kundu A. **1991**. Biological activities of the genus *Artemisia* L. *Indian Drugs* 28:170-177.
41. Cubukcu B., Bray D., Warhust D., Mericli A., Ozhatay N. y Sariyar G. **1990**. *In vitro* antimalarial activity of crude extracts and compounds from *Artemisia abrotanum* L. *Phytotherapy Research* 4:203-204.
42. González A., Darias V., Alonso G., Boada J. y Faria M. **1978**. Cytostatic activity of sesquiterpene lactones from Compositae of the Canary Islands. *Planta Medica* 33(4):356-359.
43. Saleh M. **1984**. An insecticidal diacetylene from artemisia monosperma. *Phytochemistry* 23(11):2497-2498.
44. Wang Y., Toyota M., Krause F., Hamburger M. y Hostettman K. **1990**. Polyacetylenes from *Artemisia borealis* and their biological activities. *Phytochemistry* 29:3101-3105.
45. Facknath S. y Kawol D. **1993**. Antifeedant and insecticidal effects of some plant extracts on the cabbage webworm, *Crociodolomia binotalis*. *Insect Science and Application* 14:571-574.

46. Yano K. y Kamimura H. **1993**. Antifeedant activity toward larvae of *Pieris rapae crucivora* of phenolethers related to methyleugenol isolated from *Artemisia capillaris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57:129-130.
47. Adati T. y Matsuda K. **1993**. Feeding stimulants for various leaf beetles (Coleoptera: *Chrysomelidae*) in the leaf surface wax of their host plants. *Applied Entomology and Zoology* 28:319-324.
48. Stiles L., Leather G. y Chen P. **1994**. Effects of two sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua* on physiology of *Lemna minor*. *Journal of Chemical Ecology* 20:969-977.
49. Yano K. e Ishizu, T. **1994**. Capillen, a seed germination inhibitor from *Artemisia capillaris* roots. *Phytochemistry* 37:689,690.
50. Yun K., Kil B. y Han D. **1993**. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile constituents of *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Journal of Chemical Ecology* 19:2757-2766.
51. Kil B., Yun K. y Lee S. **1992**. Influence of *Artemisia princeps* var. *orientalis* components on callus induction and growth. *Journal of Chemical Ecology* 18:1455-1462.
52. Yashphe J., Segal R., Breur A. y Erdreich N. **1979**. Antibacterial activity of *Artemisia herba-alba*. *Journal of Pharmacological Sciences* 68:924.
53. Benouda A., Hassar M. y Benjilali B. **1988**. *In vitro* antibacterial properties of essential oils, tested against hospital pathogenic bacteria. *Fitoterapia* 59:115-119.
54. Mehrotra S., Rawat A. y Shome U. **1993**. Antimicrobial activity of the essential oils of some Indian *Artemisia* species. *Fitoterapia* 54:65-68.
55. Kishore N., Mishra A. y Chansouria J. **1993**. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses* 36:211-215.
56. Yamada H., Ohtani K., Kiyohama H., Cyong J., Otsuka Y., Veno Y. y Omura S. **1985**. Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*. *Planta Medica* 121.
57. Kiso Y., Sasaki K., Oshima Y. y Hikino H. **1982**. Structure of Arcapillin, an antihepatotoxic principle of *Artemisia capillaris* herbs. *Heterocycles* 19:1615.
58. Rao V., Meneze A. y Godelha M. **1988**. *Fitoterapia* 59:17.
59. Mossa J. **1985**. *Fitoterapia* 56(5):311.

60. Twaig H. y Ai-Badr A. **1988**. Hypoglycemic activity of *Artemisia herba alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 24(2-3):123-126.
61. Shafi N., Mir I., Do M., Nguyen P. y LeQuesne. **1987**. 24-Ethylcholesta-7,22-Dien-3 β -ol: a possibly antipyretic constituent of *Artemisia absinthium*. *Planta Medica* 53(4):389.
62. Martin M., Moran A., Montero M., Roman L. y Carron R. **1988**. Antipyretic activity of α - and β -santonin. *Journal of Ethnopharmacology* 23(2-3):285.
63. Kimura Y., Okuda H, Hatano T., Agata J. y Archi S. **1984**. Studies on the Activities of Tannins and Related Compounds. V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Medica* 50(6):473
64. Farmer, E. y Ryan C. **1990**. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plants leaves. *Proceedings of the Natural Academy of Science, USA* 87:7713-7716.
65. McLaughlin J. **1991**. Crown gall tumours on potato disc and Brine Shrimp lethality: Two simple bioassay for higher plant screening and fractionation. En: *Methods in Plant Biochemistry. Volume 6. Assay for bioactivity*. Academic Press Limited, USA, 1-30.
66. Meyer B., Ferrigni N., Putman J., Jacobsen L., Nichols D. y McLaughlin J. **1982**. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
67. Barahona M., Cano M. y Sánchez-Fortún S. **1994**. Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*. *Revista de Toxicología* 11:92-95.
67. Mitscher L., Leu R., Bathala M., Wu W. y Beal J. **1972**. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia* 35:157-166.
68. Rios J., Recio M. y Villar A. **1988**. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23:127-149.
69. Silverstein R., Clayton G. y Morrill T. **1991**. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th edition. John Wiley and Sons, Singapore.
70. Ananthasubramanian L., Gopinath H. y Bhattacharyya S. **1986**. Infrared group frequencies of α -methylene- γ -lactone grouping in *cis*- and *trans*-eudesmanolides, germacranolides, elemic lactones and guianolides. *Indian Journal of Chemistry* 25B:380-383.

71. Samek Z. **1970**. The determination of the stereochemistry of five-membered α,β -unsaturated lactones with an exomethylene double bond based on the allylic long-range couplings of exomethylene protons. *Tetrahedron Letters* 671-676.
72. Noriega J. **1995**. *Estudio de RMN¹³C en lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de Eudesmano y sus derivados, aislados de Artemisia ludoviciana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México.
73. Ault A. y Dudek G. **1985**. *NMR an introduction to proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Holden-Day, Inc, USA, 63-65.
74. Ruiz-Cancino A., Cano A. y Delgado G. **1993**. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry* **33**:1113-1115.
75. Romo J., Romo A., Treviño R., Joseph-Nathan y Díaz E. **1970**. Constituents of *Artemisia* and *Chrysanthemum* species. The structures of Chrysartemins A and B. *Phytochemistry* **9**:1615-1621.
76. Matsueda S. y Geissman T. **1967**. Sesquiterpene lactones of *Artemisia* species. III. Arglanine from *Artemisia douglasiana* Bess. *Tetrahedron Letters* 2013-2015.
77. Lee K. y Geissman T. **1970**. Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. Constituents of *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry* **9**:403-408.
78. Kalinowski H. **1988**. *Carbon-13 NMR spectroscopy*. John Wiley and Sons, GB, 70-76, 109-110, 116-117.
79. Mata R., Delgado G. y Romo A. **1984**. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry* **23**:1665-1668.
80. Romo R., Vázquez F. y Zetina C. **1977**. Lactonas sesquiterpénicas de *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, **8**:127-130.
81. Mira L., Fernandez T., Santos M., Rocha R., Florencio H. y Jennings K. **2002**. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Taylor & Francis Health Sciences* **36**(11):1199-1208.
82. Herz W. **1961**. Isolation of 5-hydroxi-3,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone from *Kuhnia eupatorioides* L. var. *pyramidalis*. *Journal of Organic Chemistry* **26**:3014-3015.

83. Gottlieb H. y Wenkert E. **1977**. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochemistry* 16(11):1811-1816.
84. Timmermann B. y Mabry T. **1983**. 6-Methoxyflavonols from disjunct populations of *Brickellia cylindracea* (compositae). *Biochemical Systematics and Ecology* 11(1):37-39.
85. Martínez V., Barbera O., Sanchez-Parareda J. y Marco J. **1987**. Phenolic and acetylenic metabolites from *A. assoana*. *Phytochemistry* 26:2619-2624.
86. Irwin M., Lee K., Simpson R. y Geissman T. **1969**. Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. Ridentin. *Phytochemistry* 8:2009-2012.
87. Irwin M., Lee K., y Geissman T. **1973**. Ridentin B: A eudesmanolide from *Artemisia tripartita* ssp. *rupicola*. *Phytochemistry* 12:871.
88. Giesbrecht A., Davino S., Nassis C., Young M., Lopes J., Rodrigues D., Vichnewski W., Nasi A., Dias D. y Lopes J. **1990**. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Química Nova* 13:312-314.
89. Navarro V., Villarreal M., Rojas G. y Lozoya X. **1996**. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 53:143-147.
90. Vanden D. y Vlietinck A. **1991**. Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. En: *Methods in Plant Biochemistry. Volume 6. Assay for bioactivity*. Academic Press Limited, USA, 47-67 (1991).