

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO QUIMICO Y EVALUACION BIOLOGICA DE ARTEMISIA LUDOVICIANA SSP. MEXICANA (ESTAFIATE)

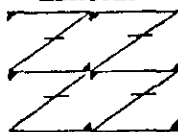
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

MARA NIDIA ELIZALDE MASTACHE

DIRECTOR: M. EN C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1999

274860



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco a Dios por darme la vida y
por hacer tangible su infinito amor a través
de mi familia.

Espero que el camino que emprenda
de ahora en adelante, sepa corresponder la
dicha y la felicidad que me ha dado.

Con todo cariño y respeto a mis padres:

Papá:

Gracias por ser mi amigo incondicional.

El amor y la confianza que sembraste
en mí, están dando sus frutos. No existirá
el tiempo ni la forma de poder pagarte lo
que me has dado.

Mamá:

Gracias por ser mi amiga y consejera.

Gracias por tu fuerte y dulce apoyo en todo
momento.

Esto es para tí, es un pequeño tributo
a tu amor y esfuerzo permanente.

A mis hermanos:

Ari y Marcos

No existe en el mundo un cariño
comparable al que nos une.
Gracias por ser mis guías y consejeros,
por apoyarme en todo momento, por
comprenderme y por soportarme.
Son el tesoro más valioso que poseo
y que siempre llevaré en mi corazón.

Con respeto y admiración al
M. en C. Arturo E. Cano Flores.
Gracias por su paciencia y su
dedicación. Por demostrarme
como se lucha por un ideal y
por enseñarme el camino al éxito.

Con todo cariño a David,
que me ha enseñado que no
existen barreras que impidan
alcanzar nuestros anhelos.
Por su apoyo incondicional
y por estar siempre a mi lado.

Gracias

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Familia Compositae	8
2.2 La química de las Compuestas	9
2.2.1 Aceites esenciales	10
2.2.2 Lactonas sesquiterpénicas	11
2.2.3 Diterpenos, Triterpenos	14
2.2.4 Sustancias diversas	15
2.3 El género <i>Artemisia</i> L.	16
2.3.1 Acetilenos	17
2.3.2 Cumarinas	19
2.3.3 Flavonoides	21
2.3.4 Terpenos	23
2.3.4.1 Monoterpenos	24
2.3.4.2 Lactonas sesquiterpénicas	25
2.3.4.3 Otros compuestos	29
2.4 <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	30
2.4.1 <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> y la medicina tradicional	32
2.4.2 Metabolitos secundarios de <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	33

2.5 Actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas	39
2.5.1 Ensayos biológicos	41
2.5.1.1 Ensayo de toxicidad frente <i>Artemia salina</i> L.	41
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
IV. OBJETIVOS	45
V. HIPOTESIS	47
VI. MATERIAL Y EQUIPO	49
VII. PARTE EXPERIMENTAL	55
7.1 Estudio químico del extracto diclorometánico	56
7.2 Estudio biológico de <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> y <i>Artemisia absinthium</i>	63
VIII. RESULTADOS	66
8.1 Estudio químico	67
8.2 Estudio biológico	72
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	75
9.1 Elucidación estructural de las sustancias aisladas	76
9.2 Estudio biológico de la especie	113
X. CONCLUSIONES	114
XI. ESPECTROS DE LAS SUSTANCIAS	116
XII. BIBLIOGRAFÍA	132

México ocupa un lugar privilegiado en el panorama mundial de la diversidad biológica. Con una superficie de apenas 1.5 % del área total de la masa continental, en su territorio se encuentran casi todos los biomas que existen en el planeta, y en él vive cerca del 10 % de las especies de plantas y animales terrestres que se conocen actualmente.

Su ubicación geográfica en un área de intersección de la región boreal y la región tropical, sus extensos litorales y su accidentada topografía, han dado lugar a una gran diversidad de climas, suelos y vegetación, que conforman un mosaico de bosques de coníferas, de encinos, de niebla, selvas altas siempre verdes, selvas que pierden sus hojas parte del año, matorrales, manglares, dunas costeras, y una gran cantidad de asociaciones de gran interés biológico.

A esta gran riqueza biológica, que hace que México sea considerado entre los países llamados de megadiversidad, se añade otra de igual valor, que es producto de la interacción de las sociedades humanas que poblaron este territorio con su ambiente: las plantas cultivadas. El área mesoamericana es una de las pocas en el mundo en que coinciden una gran diversidad biológica, el desarrollo de varias civilizaciones antiguas y ricas y un centro de origen de plantas cultivadas.

El conocimiento íntimo de los recursos vegetales del país ha sido conservado a través de generaciones por los grupos indígenas, de ahí que la herbolaria medicinal de México sea una de las dos o tres más ricas del mundo.

Si, como lo señala Edward O. Wilson: "... la riqueza de un país depende de su riqueza biológica, cultural y material, entonces México puede ser una de las naciones más ricas del orbe. La riqueza material dependerá del buen uso que hagamos de las dos primeras..."

El reino vegetal representa una importante fuente de moléculas nuevas. Cabe destacar que solamente una pequeña parte de las 400,000 a 500,000 especies identificadas en el mundo, ha estado sujeta a una investigación fitoquímica y de esta parte, es aún menor la que ha sido sometida a estudios biológicos o farmacológicos. Sin embargo, la rápida desaparición de los bosques tropicales y otras áreas biológicamente importantes, ha mermado una búsqueda exhaustiva, por lo que se ha hecho necesario obtener nuevos métodos que permitan un aislamiento rápido e identificación de productos naturales bioactivos [1].

La Fitoquímica se ha ido desarrollando a través del tiempo como una disciplina, cuyos objetivos principales son el estudio de la química orgánica de los productos naturales y de la bioquímica de plantas. Dando especial enfoque en la enorme variedad de sustancias orgánicas que se producen y acumulan en las plantas, su estructura química, su biosíntesis, su metabolismo, distribución en la naturaleza y su función biológica, entre otras.

A pesar de la gran diversidad de aplicaciones, las principales contribuciones de los estudios fitoquímicos se enfocan a la determinación de la estructura química, origen biosintético y modo de acción de los productos naturales en el campo de la fisiología vegetal; caracterización química de fitotoxinas¹ o fitoalexinas² en patología vegetal; inspección química de grupos determinados de plantas, principalmente constituyentes secundarios o macromoléculas, y la posterior aplicación de estos datos para obtener la clasificación de las plantas en quimiotaxonomía [2].

¹ Fitotoxinas: Productos de síntesis microbiana producidos en plantas superiores, cuando son invadidas por bacterias u hongos [2].

² Fitoalexinas: Productos del metabolismo de plantas superiores, formados en respuesta a un ataque microbiano [2].

El proceso de estudio de una planta es una actividad multidisciplinaria en farmacognosia, farmacología, química, biología y toxicología [1], y entre los pasos a seguir se encuentran:

- ♦ Selección, colección, identificación botánica y preparación del material a estudiar.
- ♦ Extracción con disolventes de diferente polaridad y análisis preliminar.
- ♦ Determinación de la actividad biológica y farmacológica de los extractos.
- ♦ Separación cromatográfica de los compuestos y purificación.
- ♦ Determinación de la estructura por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos como el UV, IR, RMN y EM.
- ♦ Análisis y perfil farmacológico de los compuestos puros y pruebas toxicológicas.
- ♦ Síntesis y preparación de derivados para la determinación de la relación estructura-actividad.

En un estudio fitoquímico, es crucial la realización de ensayos biológicos. Las pruebas deben ser simples, rápidas, reproducibles y baratas. Si los principios activos están presentes en bajas concentraciones en los extractos crudos, los bioensayos deben ser lo suficientemente sensibles para su detección. Para decidir que tipo de bioensayo utilizar es necesario primeramente, elegir el organismo de prueba, que bien pueden ser entre otros: organismos inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos o moluscos); enzimas, receptores, organelos celulares; o células cultivadas de origen animal o vegetal.

Además de la importancia que revisten los estudios biológicos, es igualmente importante y necesario el contar con sistemas eficientes para la

separación y caracterización de los metabolitos de las plantas. En la actualidad, una gran cantidad de laboratorios emplean técnicas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para el aislamiento y el control de la pureza final de los productos aislados, acoplados además a un sinnúmero de detectores como el Ultravioleta (UV) con arreglo de diodos para la determinación del tipo de constituyentes.

En lo que se refiere a la caracterización de los metabolitos aislados, uno de los métodos más sensibles para el análisis de las sustancias es la espectrometría de masas (EM), que tiene la capacidad de proporcionar información para la determinación del peso molecular y estructura de los analitos. Además, con el avance en el análisis espectrométrico, se añaden nuevas técnicas como el termospray (TSP)³, el flujo continuo FAB (CF-FAB) y el electrospray (ES)⁴, que cubren la ionización de productos no polares relativamente pequeños a moléculas altamente polares.

Otra técnica alternativa para la determinación de las características moleculares de las sustancias es la Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-¹H), que al principio no era ampliamente aceptada debido a su escasa sensibilidad, sin embargo sus posibilidades se incrementaron notablemente en la década de los 70's con la introducción de los instrumentos para la determinación del espectro de RMN de los átomos de carbono de las moléculas orgánicas [3]. Durante este periodo, surge la espectroscopía de RMN de dos dimensiones, cuyo arquetipo fue propuesto por Jeener en 1971 [4]. El experimento original es mejor conocido como cosy (Correlated Spectroscopy) que precedió a otras técnicas como la de NOESY (Nuclear Overhauser Effect

³ El TSP permite la ionización de constituyentes moderadamente polares como polifenoles o terpenoides en un rango de 200-800 unidades de masa (uma).

⁴ El CF-FAB o el ES son empleados generalmente para grandes moléculas polares (con peso mayor a 800 uma).

Spectroscopy), donde se determina la proximidad de los protones en el espacio, la técnica de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), y la técnica de HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy), estas dos últimas, de las más actuales [5-6].

La búsqueda química de los extractos crudos de las plantas ha permitido al paso del tiempo, la localización de miles de sustancias con diversas propiedades biológicas; sin embargo, se ha tomado especial interés por el estudio de ciertas familias que han demostrado poseer esta peculiar e importante característica, tal es el caso de la familia Compositae.

2.1 Familia Compositae

Compositae constituye la mayor familia de plantas fanerógamas; abarcan unos 1000 géneros y alrededor de 20,000 especies [7], se dividen en dos subfamilias y trece tribus distribuida como se muestra en la tabla I.

TRIBUS Y SUBFAMILIAS QUE CONSTITUYEN LA FAMILIA		
Compositae		
SUBFAMILIA	TRIBU	DISTRIBUCIÓN
I. Tubuliflorae	Vernoniae	América tropical
	Eupatorieae	América
	Astereae	América extratropical
	Inuleae	Cosmopolita
	Heliantheae	América
	Helenieae	México y región meridional
	Anthemideae	Región mediterránea (cerca del ecuador) y Sudáfrica
	Senecioneae	Cosmopolita
	Calenduleae	Sudáfrica
	Arctotideae	Sudáfrica
	Cynarcae	Región central (Ecuador)
	Mutisieae	Sudamérica
II. Liguliflorae	Cichorieae	Hemisferio norte

Tabla I. Distribución de tribus y subfamilias pertenecientes a la familia Compositae [8].

2.2 La Química de las Compositae

Durante cierta época disminuyó de manera considerable, el empleo de plantas medicinales, provocado por la producción de sustancias sintéticas con propiedades semejantes o de mayor eficacia curativa, pero el resurgir de enfermedades aparentemente erradicadas, el aumento en la morbilidad de otras, así como la aparición de otras de gran mortalidad como el SIDA, han hecho necesario retomar la búsqueda de nuevas sustancias a partir de plantas de las que se ha comprobado que poseen propiedades curativas. Entre ellas

destacan las pertenecientes a la familia Compositae, de la cual se han aislado sustancias tan numerosas como el número de especies pertenecientes a ella, y entre las que se encuentran: aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos y sustancias diversas.

2.2.1 Aceites esenciales

Generalmente son mezclas complejas constituidas principalmente por terpenos⁵ (monoterpenos y sesquiterpenos), y menos frecuentemente compuestos arénicos derivados del fenilpropano, los cuales son los responsables del olor característico de los vegetales; además de tener funciones biológicas bien definidas como la polinización, medio de defensa, entre otras funciones [9]. Algunos ejemplos se muestran en la figura 1.

Monoterpenos

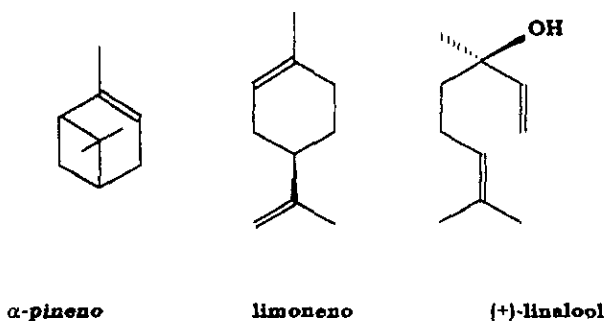
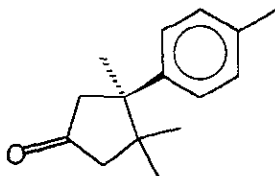


Figura 1. Algunas sustancias constituyentes de los aceites esenciales

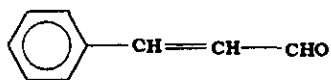
⁵ Terpeno: Estructura formada por la unión de dos o más unidades de isopreno (2-metil butadieno) [10].

Sesquiterpenos



β -cuparenona

Derivados del fenilpropano



Cinnamaldehido

Figura 1. (continuación)

2.2.2 Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son derivadas del pirofosfato de farnesilo, cuya estructura se muestra en la figura 2, y se han encontrado en diversas tribus que se ejemplifican brevemente.

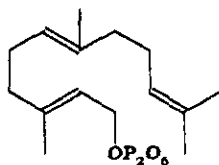
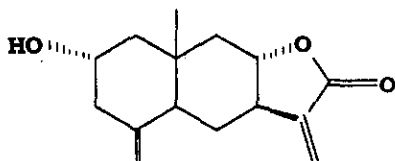
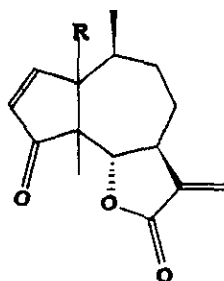


Figura 2. Estructura química del pirofosfato de farnesilo

• **Heliantheae**

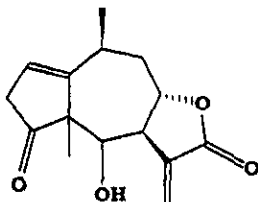


Ivalina
(*Iva microcephala* Nutt.)
(*I. imbricata* Walt.)

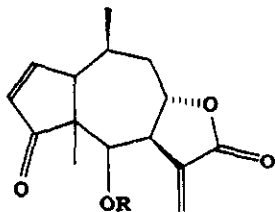


R= H: Ambrosina
(*Ambrosia maritima*)
R= OH: Partenina
(*Parthenium hysterophorus*)

• **Heleniae**

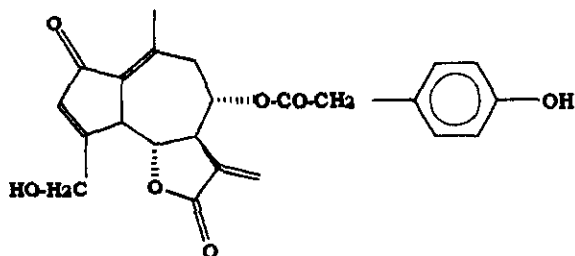


Mexicanina A
(*Helentium mexicanum* H.B.K.)



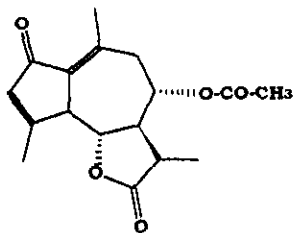
R= H: Helenalina
(*H. autumnale*)
R= CO-CH₃: Bigelovina
(*H. bigelovii* Gray.)

♦ *Cichorieae*

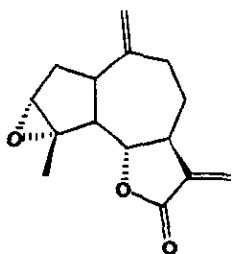


Lactucopikrina
(*Taraxacum officinale*)

♦ *Anthemideae*

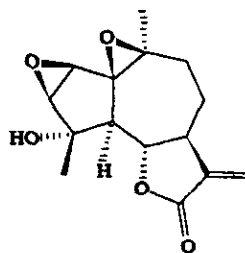


Matricarina
(*Achillea*)

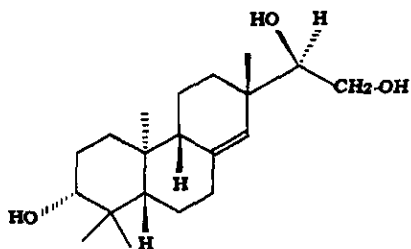


Estafiatina
(*Artemisia*) (11)

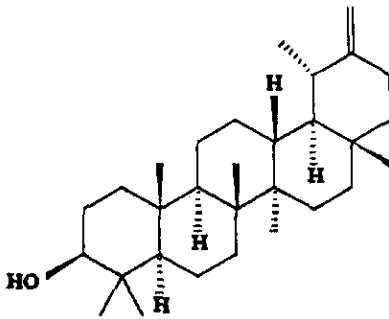
Crisartemina A
(*Chrysanthemum*)



2.2.3 Diterpenos, Triterpenos

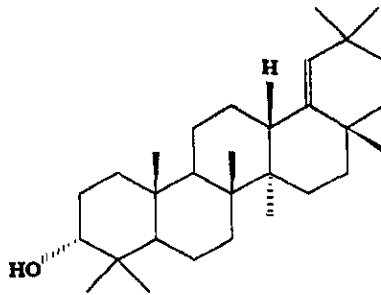


Darutigenol
(*Siegesbeckia orientalis*)



Taraxasterol
(*Taraxacum officinale*)

Germanicol
(*Taraxacum officinale*)



2.2.4 Sustancias diversas

Además de las sustancias ya mencionadas, se han aislado aunque en menor proporción [12]:

- ♦ Saponinas.
- ♦ Carotenoides: β -caroteno, licopeno, luteína, violaxantina, taraxaxantina, crisantemaxantina, flavoxantina, entre otras.
- ♦ Polienos y Fitomelanos.

- ♦ Sustancias con propiedades insecticidas.
- ♦ Alcaloides: Betaína, Trigonelina y Betonicina.
- ♦ Cianógenos: Linamarina.
- ♦ Compuestos fenólicos: Cumarinas, lignanos, flavonoides (flavanonas, flavonas, flavonoles).
- ♦ Carbohidratos.

2.3 El género *Artemisia* L.

Artemisia L. es un género ampliamente distribuido en todo el mundo, pertenece a la familia Compositae (Asteraceae), y está incluida en la subfamilia Tubuliflorae, tribu Anthemideae, la cual comprende un número variable de especies que oscila entre 200 y 400 [7, 13, 14, 15]. Este género se encuentra predominantemente en la parte norte del hemisferio (Norteamérica, Europa, Asia y norte de Africa), en la zona de 0 a 50 cm de precipitación, con extensiones al sur hacia los trópicos [16].

Artemisia L. es un género bien definido desde el punto de vista morfológico, e incluye especies herbáceas y matorrales exclusivamente. De acuerdo al sistema clásico de Candolle, se ha dividido en las siguientes secciones: Abrotanum, Absinthium, Seriphidium y Dracunculus. Recientemente se han considerado sólo dos secciones: Dracunculus y *Artemisia*, la cual incluye Abrotanum, Absinthium y Seriphidium [16].

Como miembro de la familia Compositae, es de esperarse que los metabolitos⁶ principales a encontrar sean: terpenos, fenoles (flavonoides y cumarinas) y acetilenos, los cuales se describen más adelante; sin embargo, ha sido fuente de nuevos productos de interés, muchos de los cuales no se han encontrado en otros géneros. Tal es el caso de las lactonas sesquiterpénicas que de hecho, son consideradas como marcadores químicos del género [7].

2.3.1 Acetilenos

Algunas estructuras características de los acetilenos encontrados en este género (las cuales se muestran en la tabla II), están representadas por compuestos insaturados conjugados (éster de la dehidromatricaria), la cetona de artemisia, dehidrofalcarinona y sus derivados, sustancias carbocíclicas aromáticas semejantes al capileno, isocumarinas como la capilarina, entre otras.

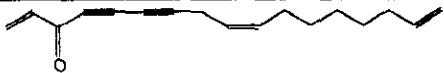
ACETILENOS ENCONTRADOS EN EL GENERO <i>Artemisia</i>	
Dehidrofalcarinona	

Tabla II. Estructura química de acetilenos encontrados en el género *Artemisia* L.

⁶ Los metabolitos son productos secundarios de las plantas, los cuales no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial de la célula [ref. 15, pág. 288].

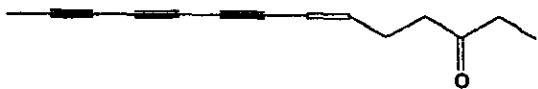

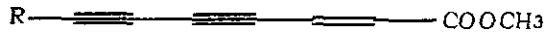
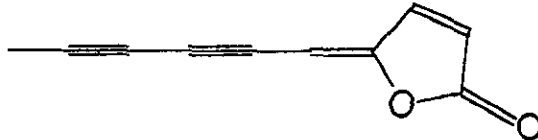
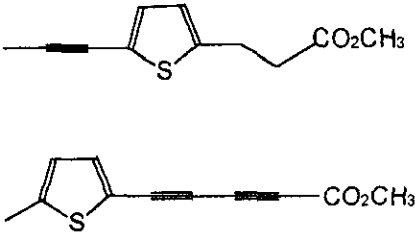
Cetona de artemisia	
Capileno	
Matricaria (éster) (R= <i>trans</i> -CH=CH-CH ₃) Lachnophilum (éster) (R= -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃)	
Eteres espirocetal enol	
Derivados del tiofeno	

Tabla II. (continuación)

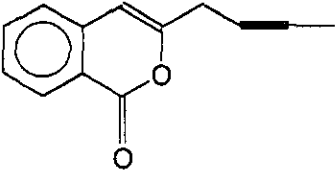
NOMBRE	ESTRUCTURA
Capilarina	 <p>The structure shows a coumarin core (a benzene ring fused to a 2-pyrone ring). At the 3-position of the pyrone ring, there is a propyl chain (three carbon atoms) attached to the double bond.</p>

Tabla II. (continuación)

2.3.2 Cumarinas

El género *Artemisia* es el principal productor de cumarinas dentro de la tribu Anthemideae (el esqueleto de la cumarina se muestra en la figura 3). Aparte de los derivados hidroxí/metoxi como la herniarina o escopoletina, y los glicósidos como la escopolina; las cumarinas más interesantes y características son aquellas que muestran un éter unido a un terpeno, como la artanina y lacinartina, en las cuales la parte terpénica es un residuo isoprénico. En la tabla III, se ejemplifican algunas cumarinas encontradas en el género *Artemisia*.

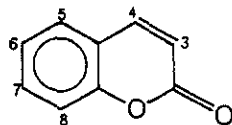


Figura 3. Esqueleto de Cumarina

CUMARINAS AISLADAS DE ESPECIES DEL GENERO <i>Artemisia</i>	
NOMBRE	ESTRUCTURA
Deoxilacarol	
Artelina	
Artanina	
Lacinartina	
Escopoletina	

Tabla III. Estructura química de algunas cumarinas aisladas de *Artemisia* L.

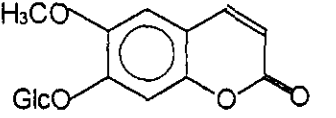
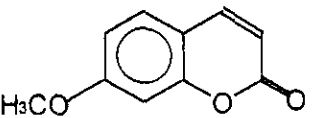
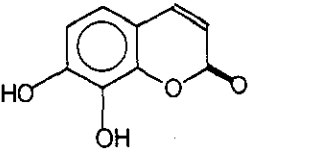
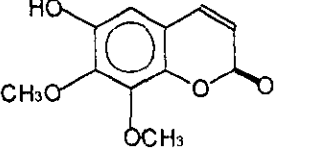
NOMBRE	ESTRUCTURA
Escopolina	
Herniarina	
Dafnetina	
Ascortina	

Tabla III. (continuación)

2.3.3 Flavonoides

Una característica estructural de los flavonoides (cuyo esqueleto se muestra en la figura 4) de esta tribu, es la presencia de derivados oxigenados y metilados en las posiciones 6 u 8. Las flavonas y flavonoles son comunes en forma de glicósidos a partir de mono o disacáridos, como se enlistan en la tabla IV [7].

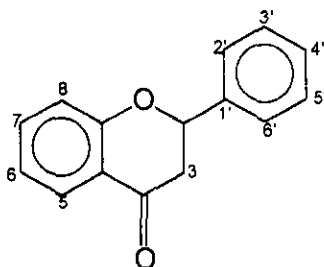


Figura 4. Esqueleto de los flavonoides

FLAVONOIDES AISLADOS DE ESPECIES DE <i>Artemisia</i>	
NOMBRE	POSICIÓN DE LOS SUSTITUYENTES
Acacetina	5,7-diOH; 4'-OMe
Apigenina	5,7,4'-triOH
Artemetina	5-OH; 3,6,7,3',4'-pentaOMe
Crisoeriol	5,7,4'-triOH; 3'-OMe
Eupatina	3,5,3'-triOH; 6,7,4'-triOMe
Eupatilina	5,7,-diOH; 6,3',4'-triOMe
Gardenina D	5,3'-diOH; 6,7,8,4'-tetraOMe
Isorhamnetina	3,5,7,4'-tetraOH; 3'-OMe
Jaceosidina	5,7,4',-triOH; 6,3'-diOMe
Kaempferol	3,5,7,4'-tetraOH
Luteolina	5,7,3',4'-tetraOH
Quercetina	3,5,7,3',4'-pentaOH
Santina	5,7-diOH; 3,6,4'-triOMe
Espinacetina	3,5,7,4'-tetraOH; 6,3'-diOMe

Tabla IV. Ejemplos de flavonoides aislados del género *Artemisia* L.

2.3.4 Terpenos

Los terpenos constituyen los principales metabolitos del género *Artemisia*, y se describen en términos generales por el número de unidades isoprenicas (figura 5) que las conforman, como se indica en la tabla V [10]:

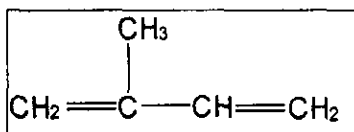


Figura 5. 2-metil-1,3-butadieno (isopreno)

TERPENOS	
TIPO	FÓRMULA
Hemiterpenos	C_5H_8
Monoterpenos	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
Sesquiterpenos	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$
Diterpenos	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$
Sesterpenos (Ofiobolanos)	$\text{C}_{25}\text{H}_{40}$
Triterpenos	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}$
Tetraterpenos	$\text{C}_{40}\text{H}_{64}$
Politerpenos	$(\text{C}_5\text{H}_8)_n$

Tabla V. Clasificación de terpenos según el número de átomos de carbono.

2.3.4.1 Monoterpenos:

Un considerable número de especies de éste género se caracterizan por su olor agradable como consecuencia del alto contenido de aceites esenciales, los cuales contienen un alto porcentaje de monoterpenos, algunos de los cuales se presentan en la figura 6.

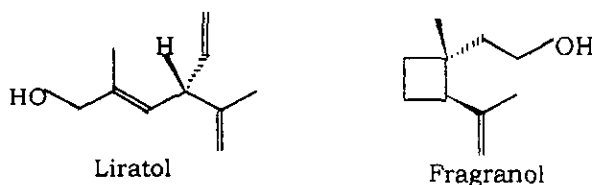


Figura 6. Monoterpenos presentes en los aceites esenciales de varias especies de *Artemisia*.

2.3.4.2 Lactonas sesquiterpénicas:

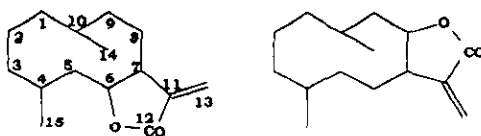
Como se mencionó anteriormente, las lactonas sesquiterpénicas son derivadas del *trans, trans* pirofosfato de farnesilo. Son incoloras, amargas y relativamente estables [17].

Las germacranólidas representan la clase biosintética más simple, de forma que pueden ser transformadas posteriormente a clases más avanzadas por ciclizaciones, transposiciones u oxidaciones [16].

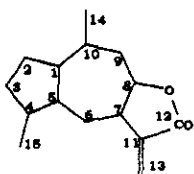
La clasificación de las lactonas sesquiterpénicas de acuerdo a su esqueleto carbocíclico puede establecerse en base a cuatro grupos principales: germacranólidas (con un anillo de 10 miembros), eudesmanólidas (compuestos 6/6 bicíclicos), guayanólidas y pseudoguayanólidas (compuestos 5/7 bicíclicos), los cuales se muestran en el esquema 1.

Cabe destacar que los cuatro grupos se pueden ciclicizar para generar las lactonas cerradas hacia la posición del carbono 6 o del carbono 8. La distribución de los diversos tipos de lactonas sesquiterpénicas, varía en los diferentes grupos en que se divide la familia de las Compuestas.

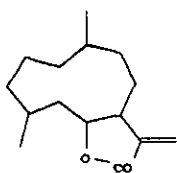
Una característica importante y común en todas las lactonas sesquiterpénicas es la presencia de un anillo γ -lactona, el cual en muchos casos presenta un grupo α -metileno conjugado con el grupo carbonilo [18].



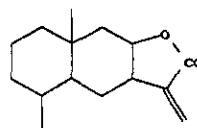
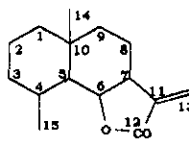
GERMACRANÓLIDAS



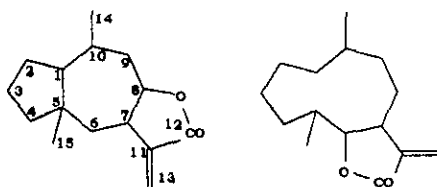
GUAYANÓLIDAS



EUDESMANÓLIDAS



Esquema 1. Clasificación de las lactonas sesquiterpénicas de acuerdo a su esqueleto carbocíclico



PSEUDOQUAYANÓLIDAS

Esquema I. (continuación)

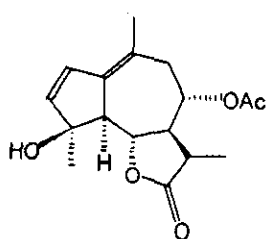
Se han encontrado un sinnúmero de lactonas sesquiterpénicas dentro del género *Artemisia*, las mostradas en la tabla VI, son solamente algunas de las más importantes, ver figura 7.

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS AISLADAS DE <i>Artemisia</i>			
ESPECIE	SUBSTANCIA	ESTRUCTURA	REF.
<i>A. carruthii</i>	Matricina	1	11, 14, 16
<i>A. douglasiana</i> Bess.	Arglanina	2	14, 16
	Douglanina	3	
	Ludovicina B	4	
<i>A. annua</i>	Artemisinina	5	18-20
	Arteannuina B		16, 21-22
<i>A. klotzchiana</i> Bess.	Matricarina	6	16, 23-24
	Deacetilmatricarina	7	11, 16, 23-24
	Achillina	8	16
	Crisartemina A	9	16, 23-24

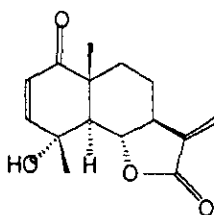
Tabla VI. Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género *Artemisia*

ESPECIE	SUBSTANCIA	ESTRUCTURA	REF.
<i>A. verlotorum</i> Lamotte.	Artemorina	10	16, 25-26
	Verlotorina	11	16, 25
	Tauremisina	12	16
	Anhidroverlotorina	13	16
<i>A. abstinthium</i> L.	Anabsintina	14	11, 16, 27
<i>A. balchanorum</i> Krasch	Costunólida	15	14, 16
	Balcanólida	16	

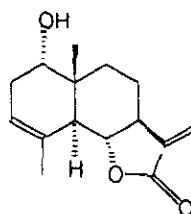
Tabla VI. (continuación)



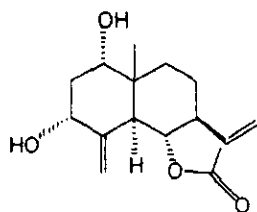
1. Matricina



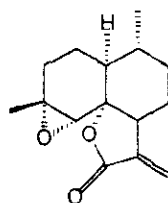
2. Argianina



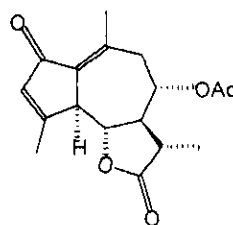
3. Douglanina



4. Ludovicina B

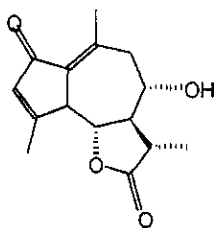


5. Arteannuina B

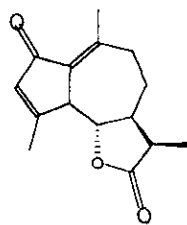


6. Matricarina

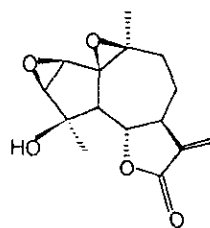
Figura 7. Lactonas sesquiterpénicas del género *Artemisia*.



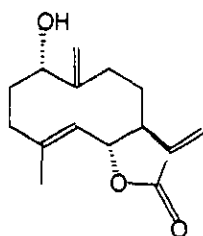
7. Deacetilmatricarina



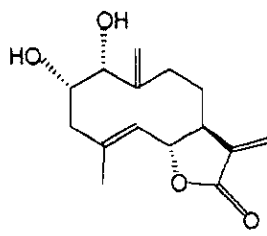
8. Achillina



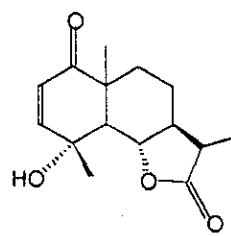
9. Crisartemina A



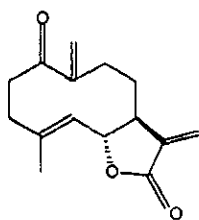
10. Artemorina



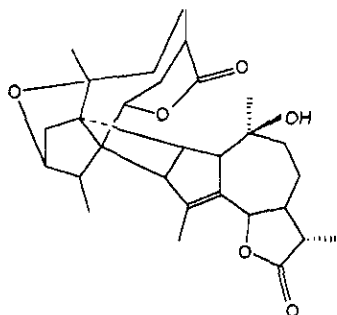
11. Verlotorina



12. Tauremisina

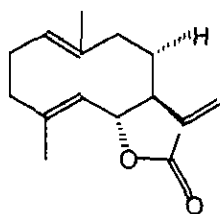


13. Anhidroverlotorina

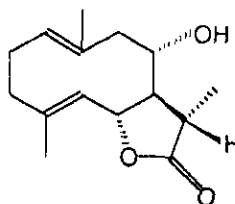


14. Anabsintina

Figura 7. (continuación)



15. Costunólida

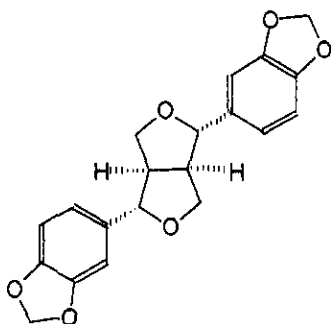


16. Balcanólida

Figura 7. (continuación)

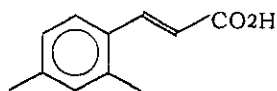
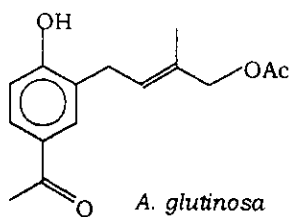
2.3.4.3 Otros compuestos:

Además de los compuestos ya mencionados, existen aquellos que se han encontrado en menores cantidades, los cuales se ejemplifican en la figura 8 [7].

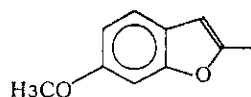
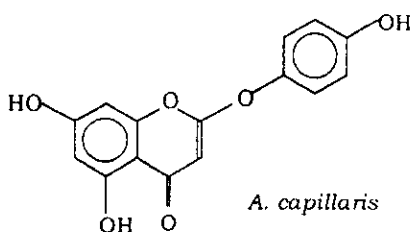


Lignanos tipo sesamina

Figura 8. Metabolitos encontrados en diferentes especies del género *Artemisia* L.



Derivados de la acetofenona y del ácido cinámico



Fenoxicromonas

Benzofuranos

Figura 8. (continuación)

2.4 *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*

Dentro de la República Mexicana existen 16 especies de *Artemisia* distribuidas en la región norte principalmente [28] (Tabla VII), de las cuales posee especial importancia *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, conocida comúnmente como "estafiate", "estayate", "istafiate" [29], "ajenjo del país" o "iztauhyatl". Es una planta nativa del país y se localiza en las regiones templadas, principalmente en el Valle de México a una altitud de 2350 a 2900 metros sobre el nivel del mar [30].

ESPECIES DE <i>Artemisia</i> EXISTENTES EN MÉXICO	
ESPECIE	REGIÓN
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Michoacán
<i>Artemisia albula</i> Wooten	Coahuila
<i>Artemisia dracunculoides</i> Pursh	Chihuahua, Baja California
<i>Artemisia filifolia</i> Torr	Chihuahua
<i>Artemisia frigida</i> Willd	Nuevo León
<i>Artemisia franservides</i> Greene	Chihuahua, Sonora
<i>Artemisia graphaloides</i>	Chihuahua
<i>Artemisia heterophylla</i> Nutt	Baja California
<i>Artemisia klotzschiana</i> Bess	Hidalgo
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>albula</i>	Baja California
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>	Distrito Federal
<i>Artemisia mexicana</i> var. <i>angustifolia</i>	Hidalgo
<i>Artemisia palmeri</i> (A. Gray)	Baja California
<i>Artemisia redolens</i> Gray	Chihuahua
<i>Artemisia tridentata</i> Nutt	Baja California Norte
<i>Artemisia tridentata angustifolia</i> Gray	Baja California Norte

Tabla VII. Especies de *Artemisia* que se desarrollan en México

2.4.1 *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* y la medicina tradicional

El empleo de plantas en nuestra dieta diaria, produce un balance de nutrimentos que es de gran utilidad para mantener el buen estado de nuestro organismo. Entre la gama de plantas empleadas con estos fines, existen algunas que además de considerarse como alimento, son también empleadas como medicinales.

Artemisia ludoviciana ssp. mexicana ha sido empleada en el tratamiento de diversos padecimientos, principalmente para los cólicos intestinales y como antihelmíntico. Sin embargo, desde nuestros antepasados se ha informado de una gran variedad de usos, algunos de los cuales se enlistan en la tabla VIII [31].

USOS DE <i>A. ludoviciana ssp. mexicana</i>	
USO	EPOCA
Fiebre y exceso de flemas	Precolombina
Gota	Precolombina
Diurético	Precolombina
Dolores originados por frío	Precolombina Colonial
Tos	Precolombina Moderna

Tabla VIII. Usos de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* en México

USO	EPOCA
Problemas digestivos	Precolombina Colonial Moderna
Epilepsia	Precolombina Colonial
Antihelmíntico	Colonial
Provocar la menstruación	Colonial
Reumatismo	Moderna
Parálisis	Moderna
Diarrea	Moderna

Tabla VIII. (continuación)

2.4.2. Metabolitos Secundarios de *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*

Se han realizado diversos estudios para conocer los constituyentes químicos de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, de donde se han aislado principalmente lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de eudesmano o guayano, acetilenos y monoterpenos [32].

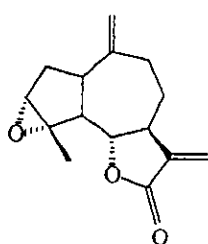
En la tabla IX se enlistan las sustancias aisladas de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*, cuyas estructuras se muestran en la figura 9. Cabe destacar que esta es sólo una parte de los muchos metabolitos encontrados, pues existen otros tantos a los que no se les ha asignado un nombre común en particular.

METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE		
<i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i>		
	SUBSTANCIA	REF.
LACTONAS SESQUITER- PENICAS	♦ Estafiatina ...17	24, 28, 33
	♦ Ludovicina A ...18	33-35
	♦ Ludovicina C ...19	34
	♦ Armexina ...20	28, 33
	♦ Ridentina B ...21	32
	♦ Rupicolina A ...22	32
	♦ Rupicolina B ...23	32
	♦ Rupina A ...24	32
	♦ 1 α ,3 α -dihidroarbusculina ...25	28, 35
	♦ Santamarina ...26	28, 35
	♦ Crisartemina B ...27	28, 35
	♦ Armefolina ...28	28, 35
	♦ Ridentina ...29	28, 35
	♦ 3 α -hidroxireynosina ...30	28, 35
	♦ Douglanina ...31	28, 34-35
	♦ Ludovicina B ...32	34
	♦ Artemorina ...33	35
	♦ Diacetilmatricarina ...34	33
♦ Achillina (Ver esquema 2)	28, 33	
♦ Arglanina ...35	28, 35	
♦ Crisartemina A ...36	24	

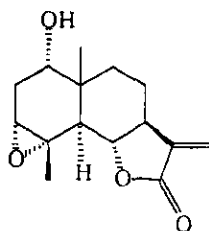
Tabla IX. Substancias obtenidas de *A. ludoviciana* ssp. *mexicana*

	SUBSTANCIA	REF.
MONOTERPENOS	♦ Alcanfor	...37 33
	♦ Borneol	...38 33
	♦ Felandreno	...39 33
	♦ α -pineno	...40 33
FLAVONOIDES	♦ Naringenina	...41 32
	♦ Eupatilina	...42 28, 35
	♦ Jaceosidina	...43 28, 35
ESTEROLES	♦ β -sitosterol	...44 28
	♦ Estigmasterol	...45 28

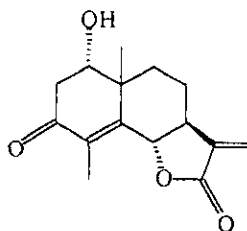
Tabla IX. (continuación)



17. Estafiatina

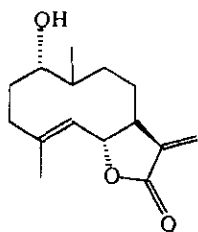


18. Ludovicina A

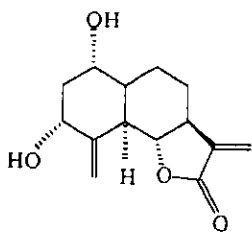


19. Ludovicina C

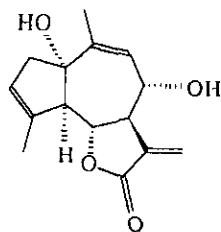
Figura 9. Sustancias aisladas de *A. ludoviciana* ssp. mexicana



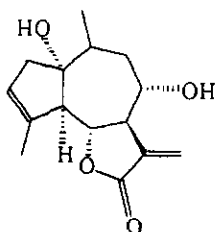
20. Armexina



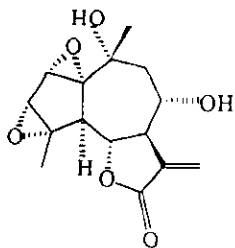
21. Ridentina B



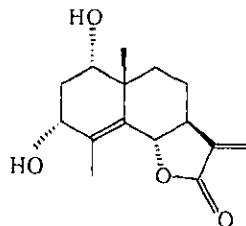
22. Rupicolina A



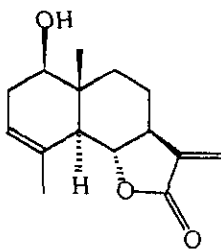
23. Rupicolina B



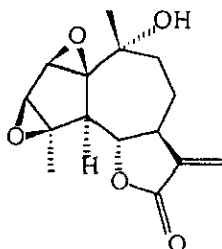
24. Rupina A



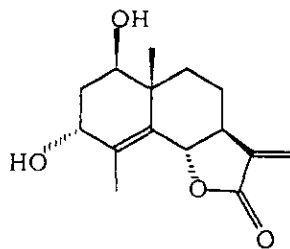
25. 1 α ,3 α -dihidroarbusculina



26. Santamarina

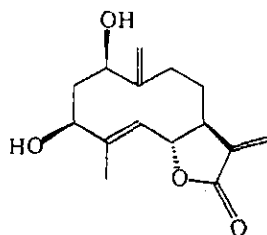


27. Crisartemina B

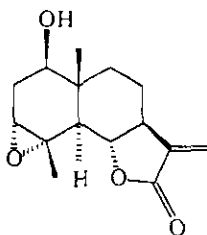


28. Armefolina

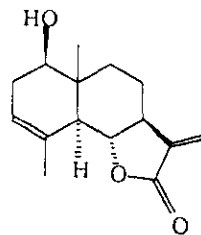
Figura 9. (continuación)



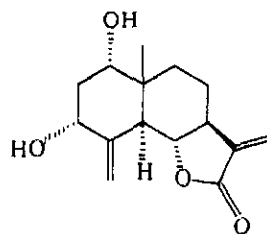
29. Ridentina



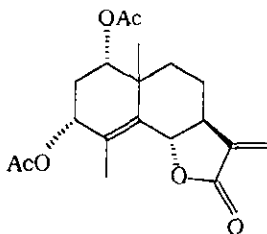
30. 3 α -hidroxiireynosina



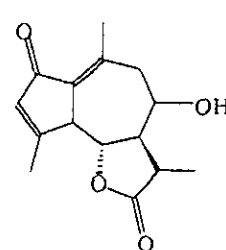
31. Douglanina



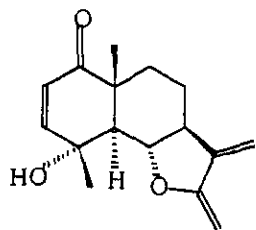
32. Ludovicina B



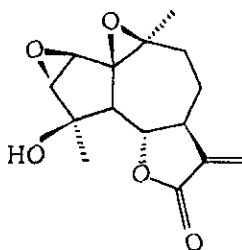
33. Artemorina



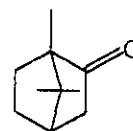
34. Diacetilmatricarina



35. Arglanina



36. Crisartemina A

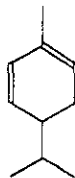


37. Alcanfor

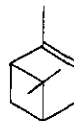
Figura 9. (continuación)



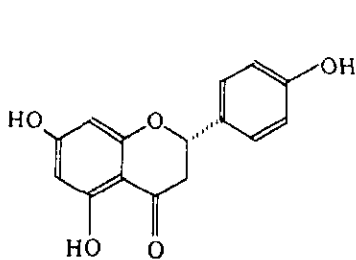
38. Borneol



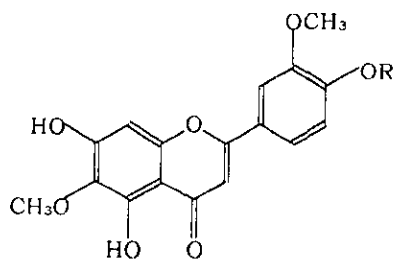
39. Felandreno



40. α -pineno

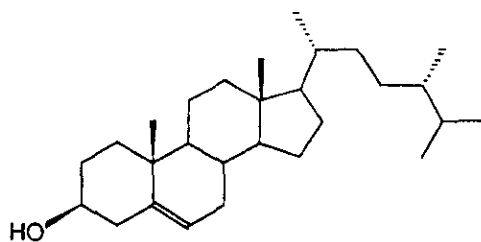


41. Naringenina



42. Eupatilina (R= CH₃)

43. Jaceosidina (R= H)



44. β - sitosterol

45. Estigmasterol (Δ^{22-23})

Figura 9. (continuación)

Como se ha observado, hay una gran variedad de lactonas sesquiterpénicas, y uno de los aspectos que le da mayor importancia a estas sustancias es que muchas de ellas poseen actividad biológica.

2.5 Actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas

La terapéutica actual no emplea los fármacos con lactonas sesquiterpénicas, sin embargo han despertado un gran interés debido a sus propiedades biológicas, entre las que destacan su actividad antitumoral, citotóxica, genotóxica, mutagénica; antibacteriana y antifúngica [36], además de su actividad antiprotozoaria, antihelmíntica, y como medio de defensa contra insectos herbívoros, entre otras [17- 18]:

a) Actividad antitumoral, citotóxica, genotóxica y mutagénica: Esta propiedad está directamente relacionada con el grupo α -metileno- γ -lactona presente en todas las lactonas que poseen esta actividad. Se estableció que el grupo *exo*-metileno es un requisito esencial para la citotoxicidad [19, 37- 38], de manera que cualquier cambio, como la insaturación o adición al grupo metileno, resulta en la pérdida de esta propiedad. Un grupo adicional como ésteres conjugados, ciclopentenona, un epóxido o una segunda lactona α,β -insaturada, aumentan la actividad biológica de la molécula.

Diversos estudios químicos demostraron que las lactonas sesquiterpénicas reaccionan con los grupos tioles de la cisteína, lo que lleva a una pérdida de la actividad de las enzimas sulfhidrilo, fosfofructoquinasa y glicógeno sintasa. Estos estudios refuerzan la teoría de que las lactonas

inhiben el crecimiento de los tumores por alquilación selectiva de las macromoléculas reguladoras del crecimiento [17-18].

b) Actividad antibacterial: Los estudios previos han tratado de definir la relación estructura - actividad, no concluyen algo en definitivo; sin embargo, se piensa en una posible relación con la presencia del grupo α -metilen- γ -lactona, o bien con el anillo de la ciclopentenona β -insaturado [39]. El mecanismo de acción es probablemente la reacción con el grupo tiol de la cisteína, de la misma forma en que actúan las sustancias que poseen actividad antitumoral.

c) Actividad antimicótica: Los estudios realizados sugieren que un grupo α -metilen- γ -lactona, o dos (en las pseudoguayanólidas), son necesarios para mostrar dicha actividad [17-18].

d) Actividad antiprotozoaria: Algunas lactonas sesquiterpénicas han mostrado poseer actividad contra protozoarios patógenos como *Entamoeba histolytica* y *Trichomona vaginalis*. Además, se encontró que la sustancia denominada Artemisinina (Qinghaosu, fig. 10), obtenida de *Artemisia annua* o Qinghao (lactona sesquiterpénica que comprende un ciclo endoperóxido), posee actividad contra las formas eritrocíticas de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*, agentes causantes de la malaria [19].

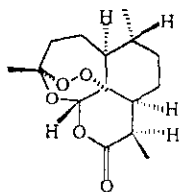


Figura 10. Estructura química de la Artemisinina (Qinghaosu)

2.5.1 Ensayos Biológicos

Muchos de los productos naturales aislados desde tiempo atrás hasta nuestros días han permanecido sin ser sometidos a ensayos biológicos. En la actualidad es necesario disponer de pruebas variadas para la determinación de un amplio espectro de actividades farmacológicas de una sustancia; sin embargo, es importante tomar en cuenta que muchas de las especies vegetales que pueden poseer alguna actividad son tóxicas a elevadas dosis, por lo que también es necesario el disponer de otros ensayos que permitan conocer la toxicidad de un extracto o de un metabolito en particular.

2.5.1.1 Ensayo de toxicidad frente *Artemia salina* L.

Un bioensayo simple para la investigación de productos naturales es aquel que emplea *Artemia salina* LEACH. Este estudio determina los valores de la concentración letal media (CL_{50}) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de compuestos activos y extractos en medio salino, estableciendo que para considerar una sustancia como tóxica, debe poseer una CL_{50} menor de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) [40].

Como demostración de la utilidad del estudio, en la tabla X se presentan algunos de los resultados de estudios de toxicidad realizados sobre algunos productos naturales, apoyando de esta forma el empleo de este método como uno de tantos que integran la gama de ensayos biológicos existentes, ofreciendo además la ventaja de que es un método rápido confiable y barato.

Ensayo de toxicidad frente A. salina L. de productos naturales conocidos	
SUSTANCIA	CL ₅₀ (mg/mL)
Arbutina	275
Sulfato de atropina	686
Digitalina	151
Sulfato de efedrina	215
Cafeína	306
Sulfato de quinidina	215

Tabla X. Ensayo de toxicidad realizado a productos naturales conocidos

III. Planteamiento del Problema

El empleo de plantas medicinales con fines terapéuticos posee especial importancia, ya que se ha retomado como forma alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades. En nuestro país, ha tenido mayor auge a raíz de la crisis económica en la que hemos estado inmersos, y que ha provocado el estudio de los recursos vegetales con que contamos, con la finalidad de afrontar las carencias y principalmente el costo de los medicamentos, que cada vez son más difíciles de adquirir y que además, la mayoría de las veces resultan ser tóxicos.

Artemisia ludoviciana ssp. mexicana es una planta nativa de México y es una de las especies con mayor difusión, siendo su uso igualmente compartido y coincidente en todas las regiones donde se localiza, empleándose principalmente para el tratamiento de padecimientos digestivos. Además, se le han atribuido a través del tiempo, una serie de propiedades curativas, muchas de las cuales no han sido comprobadas, debido a que los estudios realizados hasta ahora se han encaminado principalmente al conocimiento de la estructura de sus metabolitos secundarios.

Con base en lo anterior, el presente trabajo consiste en realizar el estudio químico de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*, con la finalidad de aislar y caracterizar aquellas sustancias químicas que presenten un efecto de citotoxicidad frente *Artemia salina*. Contribuyendo de esta manera al conocimiento de especies vegetales de la familia Compositae, empleadas por algunos grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país.

OBJETIVO GENERAL:

- Realizar el estudio químico y evaluación biológica frente *Artemia salina* de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*; con la finalidad de aislar y caracterizar sustancias químicas con actividad biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar la investigación bibliográfica de 1980-1998, sobre los estudios químicos y farmacológicos de la familia *Compositae* y del género *Artemisia*.
- Participar en la colecta del material vegetal.
- Preparar los extractos (hexánico, diclorometánico y etanólico) de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*.
- Determinar de manera cualitativa mediante ccf, la presencia de flavonoides en los extractos obtenidos.
- Determinar la CL_{50} de los diferentes extractos obtenidos frente *Artemia salina*.
- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios que constituyen el extracto diclorometánico de dicha especie vegetal.
- Determinar la CL_{50} de las sustancias puras aisladas del extracto diclorometánico.

Desde la época prehispánica, nuestro país se ha caracterizado por poseer un tesoro invaluable en lo que se refiere a su cultura y tradiciones; de las cuales, algunas prevalecen hasta nuestros días. Una de ellas es la medicina tradicional, cuyo uso se extiende a todas las regiones del país y a todos los estratos sociales.

Existen en la actualidad una gran cantidad de plantas con propiedades terapéuticas. Sin embargo, su empleo se limita a un uso en específico. Tal es el caso de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*, que se emplea comúnmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sin saber que es una fuente potencial de sustancias con actividad antibacteriana, antifúngica, antimalárica, entre otras; como se ha demostrado en estudios previos de ésta y otras especies pertenecientes al mismo género.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se realizará el estudio químico del extracto diclorometánico de las partes aéreas de *A. ludoviciana ssp. mexicana*. Además de la determinación de la CL_{50} de los extractos crudos de *Artemisia absinthium* y *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (San Rafael, Tlamanalco, Edo. de México), frente *Artemia salina*.

MATERIAL

Material vegetal

- ♦ *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (San Pedro Atocpan, Milpa Alta, Distrito Federal).
- ♦ *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (San Rafael, Tlalmanalco, Edo. de México).
- ♦ *Artemisia absinthium* (San Rafael Texmelucan, Edo. de Puebla).

Material para el estudio químico (extracción, aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios)

Material de vidrio:

- ♦ Camaras de elución de diferentes tamaños
- ♦ Campanas de vacío
- ♦ Capilares
- ♦ Columnas cromatográficas de diferentes dimensiones
- ♦ Embudo Hirsch de porcelana
- ♦ Embudos de vidrio de diferentes tamaños
- ♦ Equipo para destilación simple y fraccionada
- ♦ Frascos viales (5 mL)
- ♦ Matraz bola (250 y 1000 mL.)
- ♦ Matraz erlenmeyer (25, 50, 125 y 250 mL.)
- ♦ Matraz kitasato (25, 250 y 1000 mL.)

- Placa de toque de porcelana
- Probetas graduadas (10, 250, 500 y 1000 mL)
- Cubreobjetos
- Soportes universales

Sustancias:

- Carbón activado (J.T. Baker)
- Celite 545 (Merck)
- Cloruro férrico
- Sílica gel 60 GF para ccf (Merck)
- Sulfato cérico amoniacal (Aldrich)
- Sulfato de sodio anhidro (Aldrich)
- Diazald (Aldrich)

Disolventes:

- Acetato de etilo, grado técnico¹ (Disolventes y Mezclas)
- Acetona, grado técnico¹ (Merck)
- Cloroformo, grado analítico (Monterrey)
- Diclorometano, grado analítico (Mallinckrodt)
- Etanol, grado técnico¹ (Merck)
- Eter etílico, grado analítico (Mallinckrodt)
- Metanol, grado técnico¹ (Merck)
- n-Hexano, grado técnico¹ (Disolventes y Mezclas)

¹ El disolvente fue purificado mediante destilación fraccionada.

Otros:

- Cromatofolios de Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Espátula de acero inoxidable

Equipo:

- Aparato Fisher-Johns
- Balanza analítica (Ainsworth 100 A)
- Balanza granataria (OHAUS 700- 800)
- Balanza semianalítica (OHAUS E 400)
- Lámpara de UV 254/ 366 nm (Mineralight)
- Reostato (Staco Energy)
- Rotavapor (Büchi R- 124)
- Equipo para Diazald
- Espectrofotómetro de IR (Perkin Elmer, modelo 283 y 681)
- Espectrómetro de Masas (Hewlett Packard 5985 GC/Ms system 70 e V)
- Espectrofotómetro de RMN (Varian FT 8a y VxR-3005)

Material para el ensayo biológico

Material de vidrio:

- Embudo de tallo largo
- Frascos viales (7 mL)
- Matraz erlenmeyer (50 y 1000 mL)
- Microjeringas (25, 50 y 500 μ L)

- ♦ Pecera de 12 x 12 x 20 cm.
- ♦ Pecera especial para la incubación de *Artemia salina*
- ♦ Pipetas Pasteur
- ♦ Probetas graduadas (500 y 1000 mL)
- ♦ Termómetro (-10 a 100 °C)
- ♦ Vasos de precipitado (50, 100, 150, 500 y 1000 mL)

Sustancias:

- ♦ Sal marina (Aquarium Systems)
- ♦ Solución anticloro y amortiguador de pH (Care)

Disolventes:

- ♦ Acetato de etilo, grado técnico² (Disolventes y Mezclas)
- ♦ Cloroformo, grado analítico (Monterrey)
- ♦ Etanol, grado técnico² (Merck)
- ♦ Dimetilsulfóxido (Baker)

Otros:

- ♦ Aereador para pecera
- ♦ Calentador para pecera (70 w.)
- ♦ Espátula de acero inoxidable
- ♦ Lámpara de luz blanca
- ♦ Reóstato

²

El disolvente fue purificado mediante destilación fraccionada.

Equipo:

- Balanza analítica (Ainsworth 100 A)
- Balanza semianalítica (OHAUS E 400)

Material biológico:

- Huevecillos de *Artemia salina* (San Francisco Bay Brand)

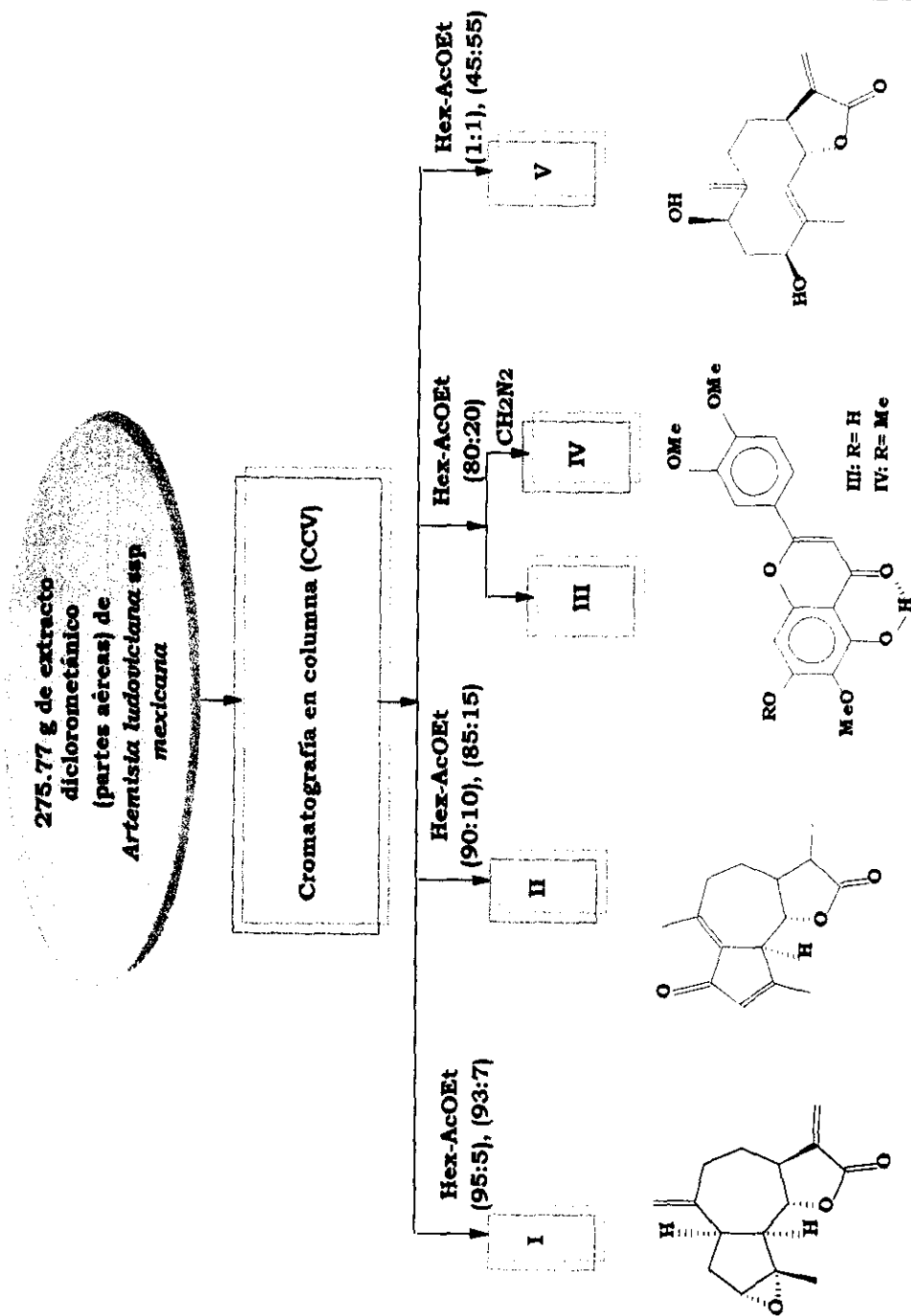
Artemisia ludoviciana ssp. *mexicana* fue colectada el 7 de septiembre de 1996 a 50 m. al norte de la carretera La Cruz-Loma Bonita, San Pedro Atocpan, Milpa Alta, D.F., por el Q.F.B. José Luis Balderas y el M. en C. Arturo E. Cano, mientras la identificación corrió a cargo del Biólogo Oswaldo Téllez del Instituto de Biología de la UNAM.

Las partes aéreas (tallo y hojas, 3935.4 g) de *A. ludoviciana*, previamente secas, se sometieron a procesos de lixiviación, obteniéndose 105.07 g de extracto hexánico, 275.77 g de extracto diclorometánico y 200.01 g de extracto etanólico.

7.1 Estudio químico del extracto diclorometánico:

Los 275.77 g del extracto diclorometánico se adsorbieron en 325.9 g de celita, para posteriormente colocarlos en una columna cromatográfica de 16.5 cm de diámetro, preparada con 1139.7 g de sílica gel, dando una altura de 12 cm. El estudio químico del extracto diclorometánico, se llevó a cabo de acuerdo con el diagrama mostrado en el esquema 2.

La columna se eluyó a vacío [41-43], con polaridad creciente, empleando primeramente n-hexano y aumentando gradualmente la polaridad con acetato de etilo. La diferenciación cromatográfica fue seguida por CCF, donde se obtuvieron un total de 426 fracciones de 600 mL cada una, las cuales se concentraron a presión reducida (rotavapor), obteniéndose las siguientes sustancias:



Esquema 2. Diagrama de flujo del estudio químico del extracto diclorometánico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*

Estafiatina (I)

Mediante un proceso de purificación por ccf preparativa¹, que se realizó al sólido obtenido de las fracciones 141-159 (n-hexano-AcOEt, 93:7), y mediante recromatografía de las fracciones 95-140, obtenidas al eluir la columna con mezcla de n-hexano-AcOEt (95:5), se aislaron respectivamente 27.5 mg y 19.2 mg (0.017 %)² de un sólido cristalino blanco, soluble en éter etílico, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol, e insoluble en n-hexano, con pf. 103-104°C.

Los datos obtenidos a partir de los estudios espectroscópicos y espectrométricos, permitieron caracterizar a esta sustancia como la Estafiatina.

IR ν_{max} (CHCl₃, espectro 1): 2947, 1762, 1407 cm⁻¹.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, espectro 2): δ 6.20 (*d*, J=3, 1H, Ha-13), 5.48 (*d*, J=3, 1H, Hb-13), 4.95 (*d*, J=1.5, 1H, Ha-14), 4.86 (*d*, J=1.5, 1H, Hb-14), 4.07 (*dd*, J=11.5 y 9, 1H, H-6), 3.37 (*s*, 1H, H-3), 2.97 (*ddd*, J= 10, 7 y 9, 1H, H-1), 2.90- 2.83 (*m*, 1H, H-7), 2.31 (*dd*, J_a = 9.5, 1H, H-5), 2.21- 2.19 (*m*, 1H, H-9), 2.06 (*dd*, J= 14 y 7.5, 1H, H-2), 1.81 (*dddd*, J= 14, 11 y 1, 1H, H-2), 1.62 (*s*, 3H, H-15), 1.55- 1.50 (*m*, 1H, H-8).

¹ Se empleó una placa preparativa de 20*20 cm, y 2 mm de espesor, utilizando como sistema de elución una mezcla n-hexano-AcOEt 80:20.

² El porcentaje indicado entre paréntesis para todas las sustancias, corresponde al rendimiento de ésta con base a 275.77 g de extracto diclorometánico sujeto a cromatografía.

RMN-¹³C (125MHz, CDCl₃, espectro 3): 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) y 18.49 (C-15).

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) y 41 (38).

Achillina (II)

A partir de las fracciones 188-217, obtenidas al eluir la columna con n-hexano- AcOEt (85:15), y tras un proceso de cristalización por par de disolventes (CHCl₃- propanol), se aislaron 19.1 mg (0.007%) de un sólido cristalino blanco, soluble en AcOEt, CHCl₃, acetona, MeOH y EtOH, insoluble en hexano; con un pf. 203-205 °C, la cual se identificó como la Achillina, con base en sus constantes espectroscópicas y espectrométricas:

IR ν_{\max} (Nujol, espectro 4): 2929, 1772, 1683 cm⁻¹.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 5): δ 6.13 (t, J=1.5 y 1.2, 1H, H-3), 3.59 (t, J=10.2 y 9.9, 1H, H-6), 3.38 (d, J=9.9, 1H, H-5), 2.41 (s, 3H, H-14), 2.36- 2.31 (m, 1H, H-8), 2.27 (s, 3H, H-15), 2.22 (c, J=12.3 y 7.0, 1H, H-11), 2.00- 1.90 (m, 1H, H-7), 1.39- 1.30 (m, 1H, H-9), 1.24 (d, J= 6, 3H, H-13).

RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃, espectro 6): 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).

EM (IE): m/z (%) 246 [M⁺, 100], 231 (9), 217 (24), 203 (4), 190 (6), 173 (25), 172 (21), 145 (11), 135 (9), 133 (6), 105 (7), 91 (15), 77 (6), 55 (6), 41 (6), 28 (21), 27 (3), 4 (3).

Eupatilina (III)

A partir de la fracción 279-309, obtenida con n-hexano-AcOEt (80:20), se aislaron y purificaron por cristalización por par de disolventes (CHCl₃-MeOH), 27.2 mg (0.01%) de un sólido cristalino amarillo, soluble en una mezcla caliente de CHCl₃-MeOH, y pf. 237-238°C, el cual se identificó como la Eupatilina, con base en sus constantes espectroscópicas y espectrométricas:

IR ν_{\max} (Nujol, espectro 7): 3184, 1655 cm⁻¹.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, espectro 8): δ 12.99 (s, 1H, C₅-OH), 10.35 (s, 1H, C₇-OH), 7.60 (dd, J=2.1 y 8.4, 1H, H-6'), 7.47 (d, J=2.1, 1H, H-2'), 7.06 (d, J=8.7, 1H, H-5'), 6.76 (s, 1H, H-8), 6.57 (s, 1H, H-3), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃) y 3.83 (s, 3H, OCH₃).

RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃ + DMSO, espectro 9): δ 181.90 (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) y 55.45 (OCH₃).

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

3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (IV)

Al realizar la reacción de metilación de las aguas madres de las fracciones 279-309 (de donde se obtuvo la Eupatilina), efectuada con diazometano en éter etílico a 0°C, se obtuvieron 36.3 mg (0.013%) de un sólido amorfo cristalino amarillo verdoso, el cual fue purificado por cristalización por par de disolventes (CHCl₃-n-hexano) y cuyas propiedades físicas y espectroscópicas son las que a continuación se describen: pf. 183-186°C, soluble en AcOEt, CHCl₃, MeOH y EtOH, insoluble en n-hexano.

IR ν_{\max} (Nujol): 2939, 2843, 1657, 1435, 1126 cm⁻¹.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 10): δ 12.76 (s, 1H, C₅-9OH), 7.53 (dd, J= 8.4 y 2.1, 1H, H-6'), 7.34 (d, J= 2.1, 1H, H-2'), 6.98 (d, J= 8.7, 1H, H-5'), 6.60 (s, 1H, H-8), 6.56 (s, 1H, H-3), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃).

RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃, espectro 11): δ 182.63 (C-4), 164.01 (C-2), 158.81 (C-5), 158.81 (C-7), 153.18 (C-4'), 152.47 (C-9), 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).

Ridentina (V)

A partir de la fracción 528-651, obtenida al eluir la columna con n-hexano-AcOEt 55:45, 50:50 y 45:55, se aislaron y purificaron por

cristalización por par de disolventes (CHCl_3 -MeOH), 327.6 mg (0.119 %) de un sólido blanco, cristalino, insoluble en n-hexano y AcOEt, soluble en mezcla: CHCl_3 -MeOH, CHCl_3 -EtOH, y Acetona-MeOH; con pf. 199°C, y que con base en sus constantes espectroscópicas y espectrométricas fue identificado como la Ridentina:

IR ν_{max} (Nujol, espectro 12): 3333, 2855, 1763 cm^{-1} .

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 + DMSO, espectro 13): δ 6.08 (d, J= 3.6, 1H, Ha-13), 5.50 (d, J= 3.3, 1H, Hb-13), 5.28 (d, J= 9.9, 1H, H-5), 5.12 (s.a., $W_{1/2}$ = 6 Hz, Ha-14), 4.85 (s.a., $W_{1/2}$ = 6 Hz, Hb-14), 4.46 (t, J= 9.9, 1H, H-6), 2.31-2.24 (m, 2H, H-9), 2.05- 1.92 (m, H-1 y H-3), 1.68 (s, 3H, C_4 - CH_3), 1.64- 1.56 (m, 1H, H-8).

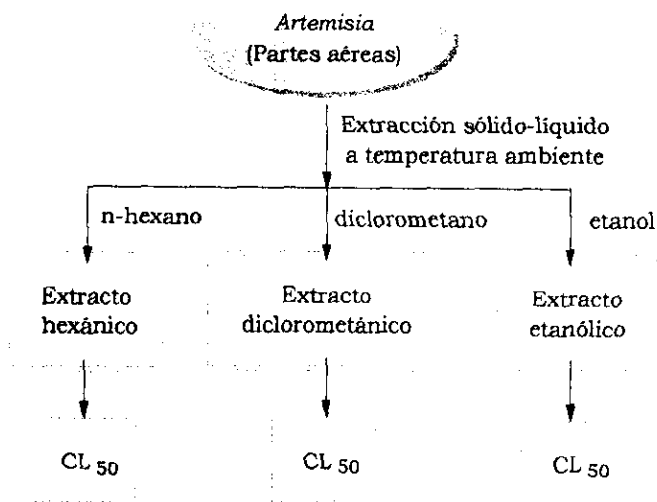
RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + DMSO, espectro 14): δ 169.21 (C-12), 148.91 (C-4), 148.91 (C-10), 139.07 (C-11), 119.91 (C-5), 117.48 (C-13), 109.76 (C-14), 79.16 (C-6), 74.05 (C-3), 73.04 (C-1), 40.22 (C-2), 28.50 (C-9), 25.21 (C-8), 10.85 (C-15).

EM (IE): m/z (%) 264 [M^+ , 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).

7.2 Estudio biológico de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y *Artemisia absinthium*.

Bioensayo de toxicidad frente *Artemia salina*

Se realizó el ensayo de toxicidad frente *Artemia salina* de los extractos hexánico, diclorometánico y etanólico de: *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* (colectada en San Rafael, Tlalmanalco, Edo. de México, y San Pedro Atocpan, Milpa Alta, Distrito Federal, el 7 de septiembre de 1996), y de *Artemisia absinthium* (Mercado de Sonora, 29 de septiembre de 1996), como se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Diagrama general de la determinación de la CL_{50} de los extractos de *Artemisia*

- ♦ Incubación de la *Artemia salina*.

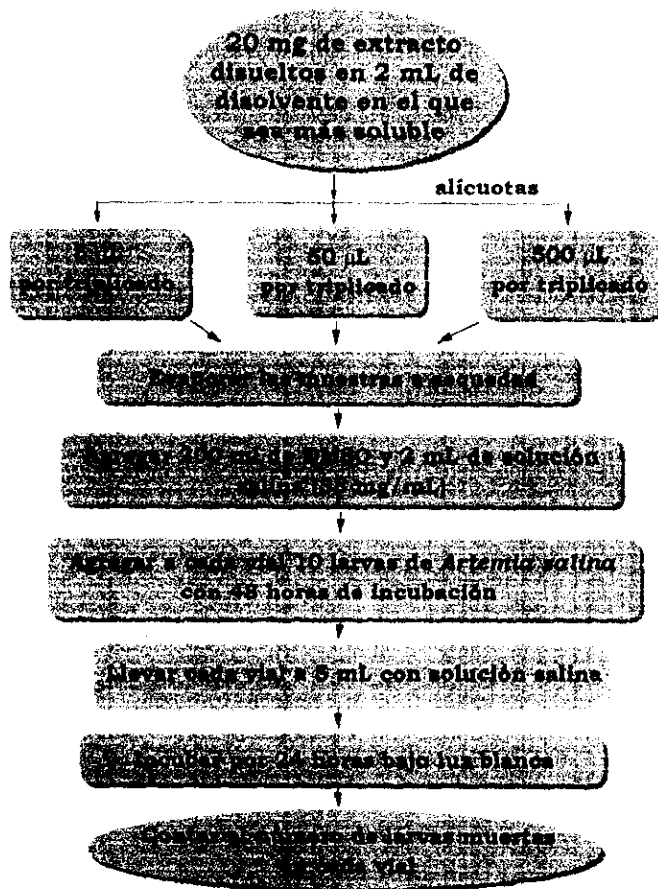
Se construyó una pecera conformada de un área oscura y otra iluminada, la cual contenía 700 mL de agua de mar artificial. Se depositaron 50 mg de huevecillos en la zona oscura y se mantuvo con aereación ligera y continua a 28°C de temperatura durante 48 horas.

- ♦ Preparación de la muestra.

Se pesaron 20 mg del extracto y se agregaron 2 mL del disolvente en el cual este fuera más soluble. Posteriormente se transfirieron a viales limpios alicuotas de 5, 50 y 500 μ L, cada una por triplicado, además de un blanco con 500 μ L del disolvente empleado. Se dejó evaporar el disolvente hasta sequedad a temperatura ambiente.

- ♦ Ensayo.

A cada vial con muestra se agregaron 200 μ L de DMSO [44] hasta disolver. Posteriormente se adicionaron 2 mL de solución salina y 10 larvas de *Artemia salina* (fototrópicas) con 48 horas de incubación previa. Se llevó a un volumen total de 5 mL con solución salina y se incubaron bajo luz blanca durante 24 horas. Terminado el periodo de tiempo se contó el número de larvas muertas, determinando la CL_{50} por el método de probitas empleando un programa de cómputo. El procedimiento se resume en el esquema 4.



Esquema 4. Diagrama de flujo para el bioensayo de toxicidad frente *Artemia salina*.

8.1 Estudio químico

DATOS DE IR, RMN Y EM DE LA ESTAFIATINA	
ESPECTRO	SEÑALES
IR ν_{\max} CHCl ₃ , (cm ⁻¹) (Espectro 1)	2947, 1762, 1407.
EM (I.E.)	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) y 41 (38).
RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) (ppm) (Espectro 2)	δ 6.20 (<i>d</i> , J=3, 1H, Ha-13), 5.48 (<i>d</i> , J=3, 1H, Hb-13), 4.95 (<i>d</i> , J=1.5, 1H, Ha-14), 4.86 (<i>d</i> , J=1.5, 1H, Hb-14), 4.07 (<i>dd</i> , J=11.5 y 9, 1H, H-6), 3.37 (<i>s</i> , 1H, H-3), 2.97 (<i>ddd</i> , J= 10, 7 y 9, 1H, H-1), 2.90- 2.83 (<i>m</i> , 1H, H-7), 2.31 (<i>dd</i> , J _a = 9.5, 1H, H-5), 2.21- 2.19 (<i>m</i> , 1H, H-9), 2.06 (<i>dd</i> , J= 14 y 7.5, 1H, H-2), 1.81 (<i>dddd</i> , J= 14, 11 y 1, 1H, H-2), 1.62 (<i>s</i> , 3H, H-15), 1.55- 1.50 (<i>m</i> , 1H, H-8).
RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) (ppm) (Espectro 3)	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).

Tabla XI. Datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la Estafiatina.

DATOS DE IR, RMN Y EM DE LA ACHILLINA	
ESPECTRO	SEÑALES
IR ν_{max} CHCl ₃ , (cm ⁻¹) (Espectro 4)	2929, 1772, 1683.
EM (I.E.)	246 [M ⁺ , 100], 231 (9), 217 (24), 203 (4), 190 (6), 173 (25), 172 (21), 145 (11), 135 (9), 133 (6), 105 (7), 91 (15), 77 (6), 55 (6), 41 (6), 28 (21), 27 (3), 4 (3).
RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) (ppm) (Espectro 5)	δ 6.13 (t, J=1.5 y 1.2, 1H, H-3), 3.59 (t, J=10.2 y 9.9, 1H, H-6), 3.38 (d, J=9.9, 1H, H-5), 2.41 (s, 3H, H-14), 2.36- 2.31 (m, 1H, H-8), 2.27 (s, 3H, H-15), 2.22 (c, J=12.3 y 7.0, 1H, H-11), 2.00- 1.90 (m, 1H, H-7), 1.39- 1.30 (m, 1H, H-9) 1.24 (d, J=6, H-13).
RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) (ppm) (Espectro 6)	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), .62 (C-8), 22.23 (C-15), 20.40 (C-14), 12.90 (C-13).

Tabla XII. Datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la Achillina.

DATOS DE IR, RMN Y EM DE LA EUPATILINA	
ESPECTRO	SEÑALES
IR ν_{\max} Nujol (cm ⁻¹) (Espectro 7)	3184, 1655
EM (I.E.)	344 [M ⁺ , 100], 329 (64), 301 (41), 298 (9), 243 (3), 163 (18), 139 (8), 129 (5), 120 (3), 69 (17)
RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ + DMSO + TMS) (ppm) (Espectro 8)	δ 12.99 (s, 1H, C ₅ -OH), 10.35 (s, 1H, C ₇ -OH), 7.60 (dd, J=2.1 y 8.4, 1H, H-6'), 7.47 (d, J=2.1, 1H, H-2'), 7.06 (d, J=8.7, 1H, H-5'), 6.76 (s, 1H, H-8), 6.57 (s, 1H, H-3), 3.94 (s, 3H, OCH ₃), 3.91 (s, 3H, OCH ₃), 3.83 (s, 3H, OCH ₃).
RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ + DMSO + TMS) (ppm) (Espectro 9)	δ 181.90 (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'), 19.62 (C-6'), 111.08 (C-5'), 108.94 (C-2'), 104.14 (C-3), 103.20 (C-10), 93.93 (C-8), 59.69 (OCH ₃), 55.62 (OCH ₃), 55.45 (OCH ₃).

Tabla XIII. Datos espectroscópicos y espectrométricos de la Eupatilina.

DATOS DE IR Y RMN DE LA 3', 4', 6, 7-TETRAMETOXI-5-HIDROXI-FLAVONA	
ESPECTRO	SEÑALES
IR ν_{MAX} Nujol (cm ⁻¹)	2939, 2843, 1657, 1435, 1126
RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) (ppm) (Espectro 10)	δ 12.76 (s, 1H, C ₅ -OH), 7.53 (dd, J= 8.4 y 2.1, 1H, H-6'), 7.34 (d, J= 2.1, 1H, H-2'), 6.98 (d, J= 8.7, 1H, H-5'), 6.60 (s, 1H, H-8), 6.56 (s, 1H, H-3), 3.99 (s, 3H, OCH ₃), 3.98 (s, 3H, OCH ₃), 3.97 (s, 3H, OCH ₃), 3.93 (s, 3H, OCH ₃).
RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ + DMSO + TMS) (ppm) (Espectro 11)	δ 182.63 (C-4), 164.01 (C-2), 158.81 (C-5), 158.81 (C-7), 153.18 (C-4'), 152.47 (C-9), 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 (OCH ₃), 56.34 (OCH ₃), 56.21 (OCH ₃), 56.16 (OCH ₃)

Tabla XIV. Datos espectroscópicos y espectrométricos de la 3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona.

DATOS DE IR, RMN Y EM DE LA RIDENTINA	
ESPECTRO	SEÑALES
IR ν_{max} CHCl ₃ , (cm ⁻¹) (Espectro 12)	3334, 1763.
EM (I.E.)	264 [M*, 8.45], 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).
RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , + DMSO) (ppm) (Espectro 13)	δ 6.08 (d, 1H, Ha-13), 5.50 (d, 1H, Hb-13), 5.28 (d, J= 9.9, 1H, H-5), 5.12 (s, 1H, Ha-14), 4.85 (d, J= 4.8, 1H, Hb-14), 4.46 (t, J= 9.9, 1H, H-6), 2.31- 2.29 (m, 2H, H-9), 2.05-1.92 (m, 2H, H-1 y H-3), 1.68 (s, 3H, H-15), 1.64- 1.56 (m, 2H, H-8).
RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , + DMSO) (ppm) (Espectro 14)	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), 10.84 (C-15).

Tabla XV. Datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la Ridentina.

8.2 Estudio biológico

Resultados del bioensayo de toxicidad frente *Artemia salina*

BIOENSAYO DE TOXICIDAD			
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> (Milpa Alta)			
EXTRACTO	CL₅₀ (µg/mL)	LSC	LIC
HEXANO	201.1489	309.8293	129.6176
	276.3167	412.6127	185.3572
	216.3775	348.1510	133.9845
Total	225.7676	287.8426	178.0156
DICLOROMETANO	492.8457	1250.0440	264.2835
	614.4701	2642.0240	275.6636
	752.6398	3525.7100	332.9934
Total	599.6868	1083.0560	384.7044
ETANOL	---	---	---
	---	---	---
	---	---	---
Total	1.7014E³⁸	0.0847	118068.6

Tabla XVI. Resultados del bioensayo realizado a los extractos crudos de *A. ludoviciana* ssp. *mexicana* (Milpa Alta).

CL 50: Concentración letal media

LSC: Límite superior confiable

LIC: Límite inferior confiable

BIOENSAYO DE TOXICIDAD			
<i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. mexicana (San Rafael)			
EXTRACTO	CL₅₀ (µg/mL)	LSC	LIC
HEXANO	487.6276	752.5791	323.4112
	517.8402	814.1282	330.4074
	610.4853	1002.88	385.5320
Total	535.0207	687.8946	420.1634
DICLOROMETANO	307.7328	514.5440	188.2002
	291.3679	513.2009	171.8116
	205.2070	338.5336	127.0161
Total	264.3724	351.9849	199.5535
ETANOL	---	---	---
	---	---	---
	---	---	---
Total	537144.3	984974E²⁰	15934.32

Tabla XVII. Resultados del bioensayo realizado a los extractos crudos de *A. ludoviciana* ssp. mexicana (San Rafael).

CL 50: Concentración letal media

LSC: Límite superior confiable

LIC: Límite inferior confiable

BIOENSAYO DE TOXICIDAD			
<i>Artemisia absinthium</i>			
EXTRACTO	CL₅₀ (µg/mL)	LSC	LIC
HEXANO	193.6467	318.5688	118.6513
	225.2066	339.7431	152.3544
	182.5441	290.6590	112.9642
Total	201.7608	258.5445	156.1544
DICLOROMETANO	85.2085	134.6631	53.8481
	87.4167	134.3811	56.2681
	57.5029	89.8182	36.6572
Total	76.4734	98.2644	59.2715
ETANOL	---	---	---
	---	---	---
	2549.5970	82205.66	929.5162
Total	6411.7420	62495.53	2392.6

Tabla XVIII. Resultados del bioensayo realizado a los extractos crudos de *Artemisia absinthium*.

CL 50: Concentración letal media

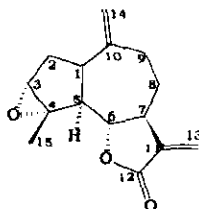
LSC: Limite superior confiable

LIC: Limite inferior confiable

IX. Discusión de Resultados

9.1 Elucidación estructural de las sustancias aisladas

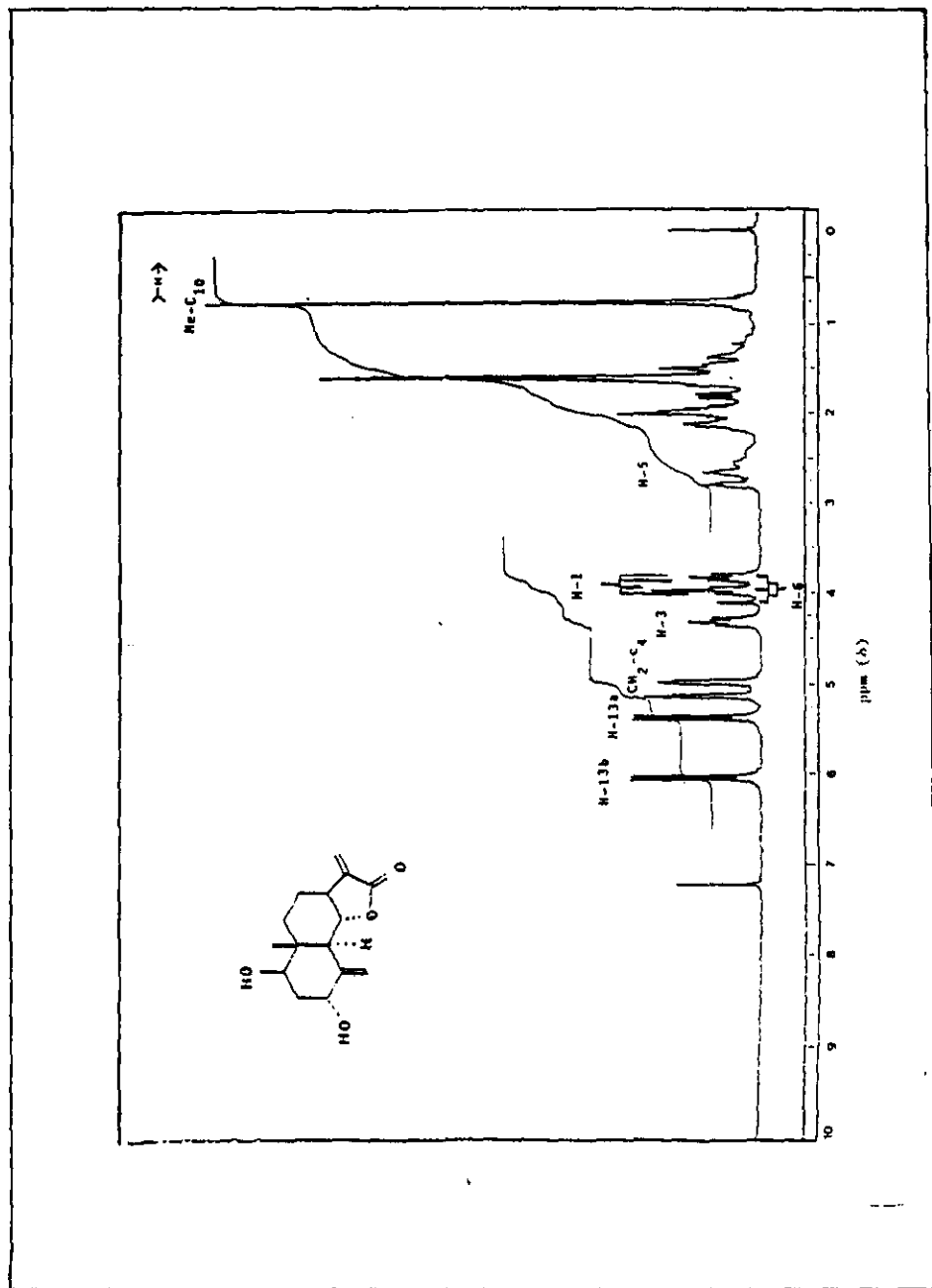
Estafiatina (II)



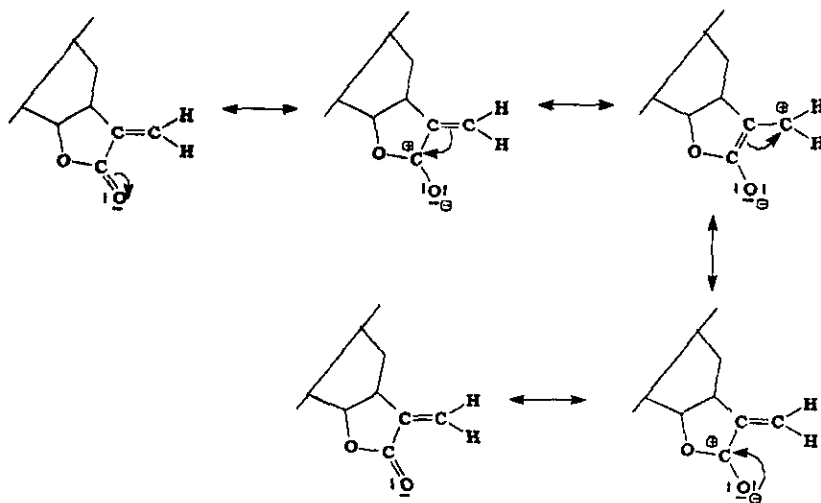
De las fracciones 141-159 obtenidas con mezcla Hexano-AcOEt (93:7), se aisló un sólido cristalino blanco que mostró señales intensas en el espectro de IR (espectro 1) en 2947 y 1762 cm^{-1} , correspondientes a las ν (C-H) y ν (C=O) respectivamente. En su espectro de masas por impacto electrónico, se observa un ion molecular de m/z 246 que corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ ($\Omega=7$).

El espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (espectro 2) muestra una señal doble de doble (dd) a δ 4.07 ($J=11.5$ Hz y 9 Hz) que se asigna al H-6 de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de guayano; ya que a diferencia de éste, en el esqueleto de eudesmano el H-6 aparece como un triplete, ver esquema 5 -espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de la 3 α -hidroxireynosina-, debido a la conformación de los anillos y al ángulo dihedral que se forma entre los H-5 y H-7.

La funcionalidad presente en la lactona se determinó de la siguiente forma: En δ 6.21 y δ 5.48 aparecen dos señales dobles ($J=3.6$ y 3.3) que corresponden al metileno exocíclico del anillo de la lactona. La presencia del grupo carbonilo conjugado a esta doble ligadura, provoca desprotección por el efecto electroatractor del átomo de oxígeno, como se muestra en el esquema 6, y al efecto de anisotropía generado por el grupo carbonilo [45].

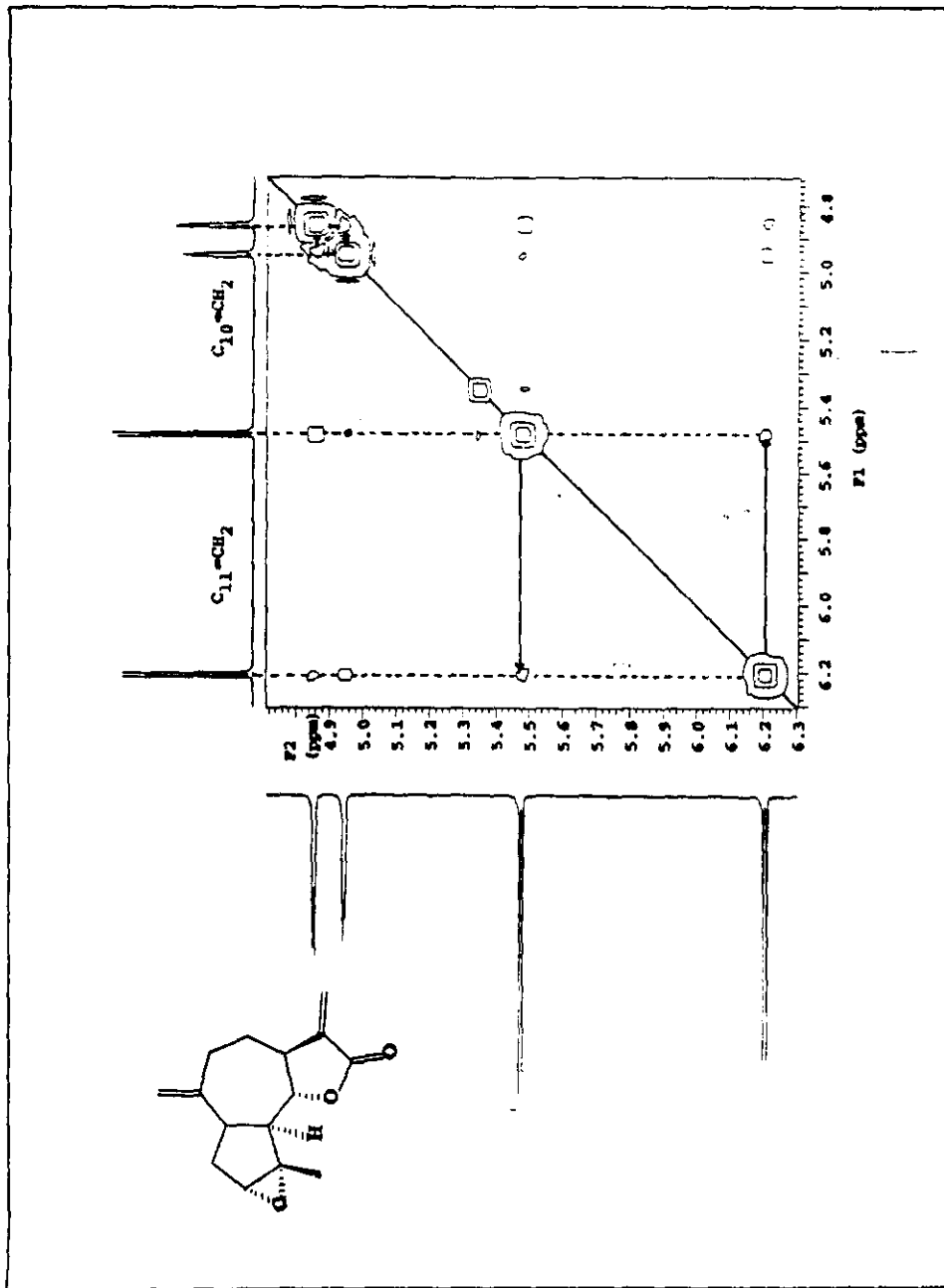


Esquema 5. Espectro de RMN-¹H de la 3α-hidroxiirenosina, que muestra la multiplicidad del H-6.



Esquema 6. Formas resonantes asociadas al grupo carbonilo α,β -insaturado.

En δ 4.95 y δ 4.86 se observan dos señales con multiplicidad doble de doble ($J= 3.6$ y 3.3), que se asignan a una doble ligadura exocíclica en el C-10, ya que el valor de sus constantes de acoplamiento corresponden a hidrógenos geminales [46]. El acoplamiento para los hidrógenos de las dobles ligaduras exocíclicas en C-10 y C-11 se observa claramente en su espectro cosy (esquema 7).



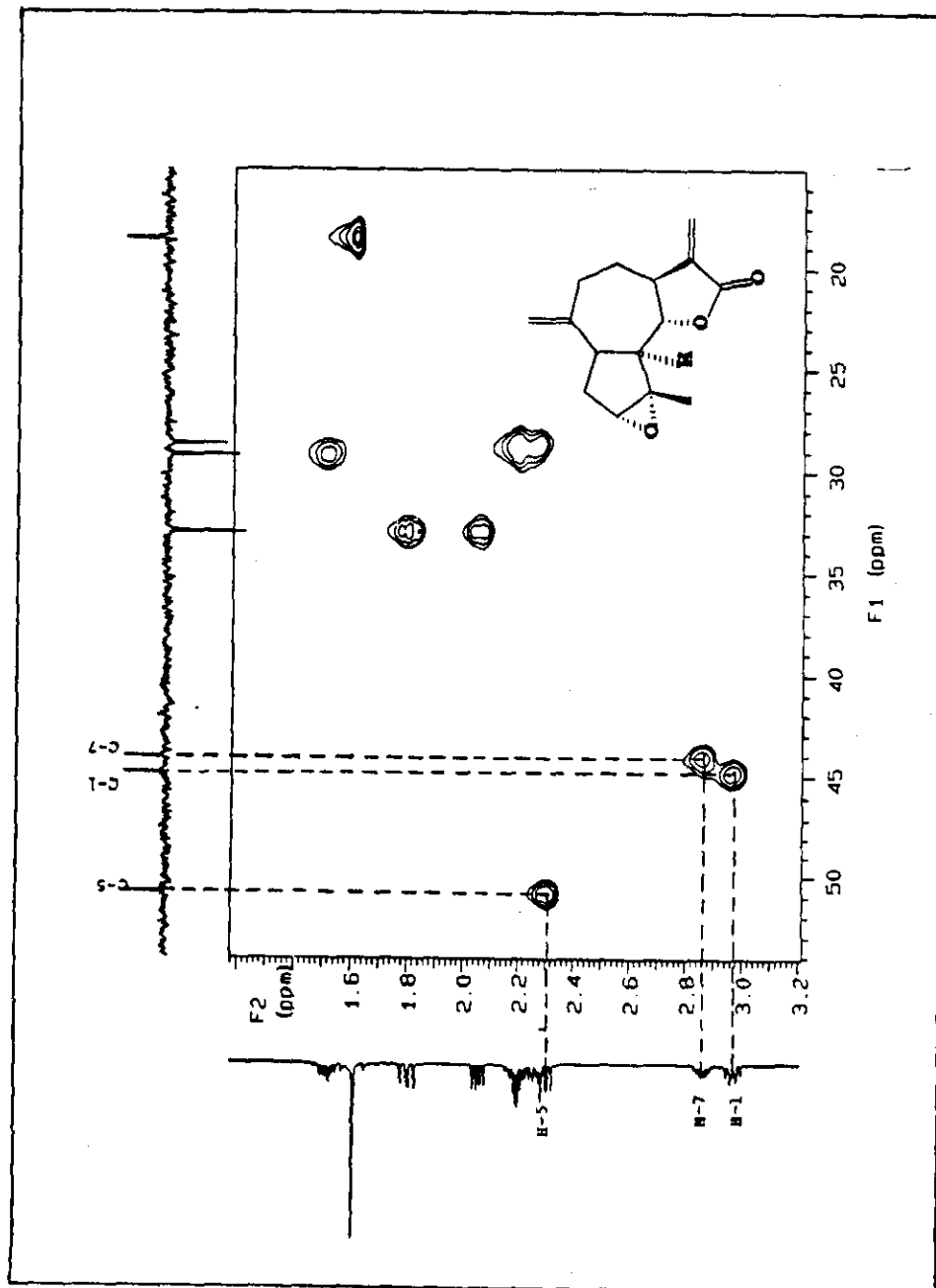
Esquema 7. Espectro COSY de la Estafiatina, mostrando el acoplamiento entre los hidrógenos pertenecientes a las dobles ligaduras exocíclicas.

En δ 1.62 se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos, la presencia del grupo metilo se comprueba por el ion generado a partir de la pérdida de 15 uma, que corresponde al pico de 231 ($M^+ - CH_3$, 95.74%) en su EM (i.e.). La ubicación de este grupo en el C-4 se precisó por aspectos de la biogénesis de este tipo de sustancias [11, 47].

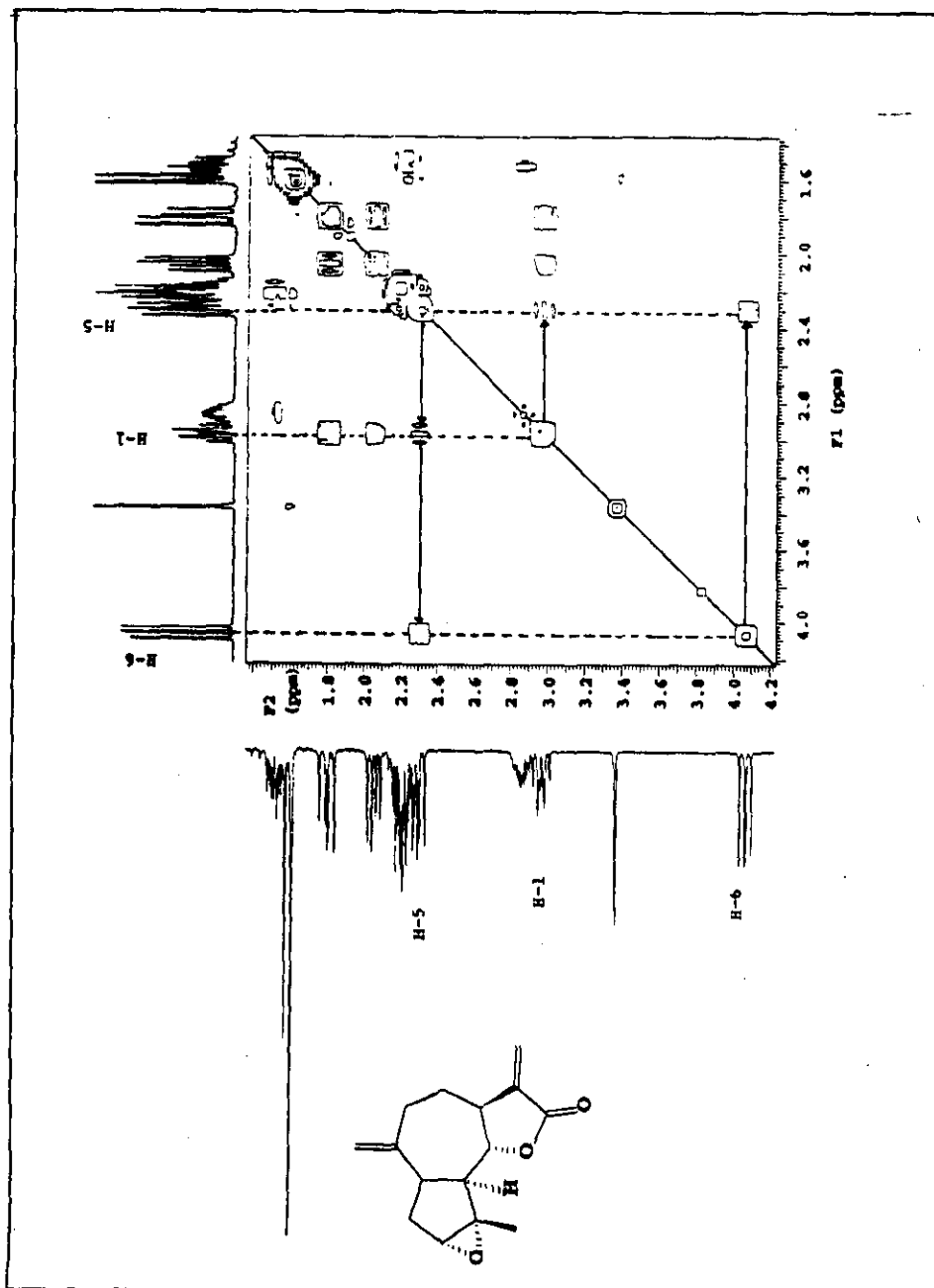
El H-3 se observa como una señal simple a δ 3.37, desplazamiento químico característico de un hidrógeno base de oxirano situado en el C-3.

Para la asignación total de las señales de hidrógeno y carbono presentes en los respectivos espectros de la sustancia en discusión, se procedió al análisis de su espectro HMQC, donde se observa que la señal del C-1 (δ 44.86) se asocia al multiplete en δ 2.97, por consiguiente corresponde al hidrógeno de la posición 1 como se muestra en el esquema 8.

Para el H-7 corresponde la señal múltiple δ 2.90-2.83 (C-7, δ 44.10), mientras que el H-5 aparece como un doble de doble en δ 2.31 ($J=10.5$ y 8.5), cuya señal para ^{13}C aparece en δ 50.85. El espectro cosy (esquema 9) muestra el acoplamiento existente entre los hidrógenos de las posiciones 6 y 5 y entre estos dos hidrógenos con H-1.



Esquema 8. Espectro HMQC de la Estafiatina.



Esquema 9. Espectro COSY de los átomos de las posiciones 1, 6 y 5 de la Estafiatina.

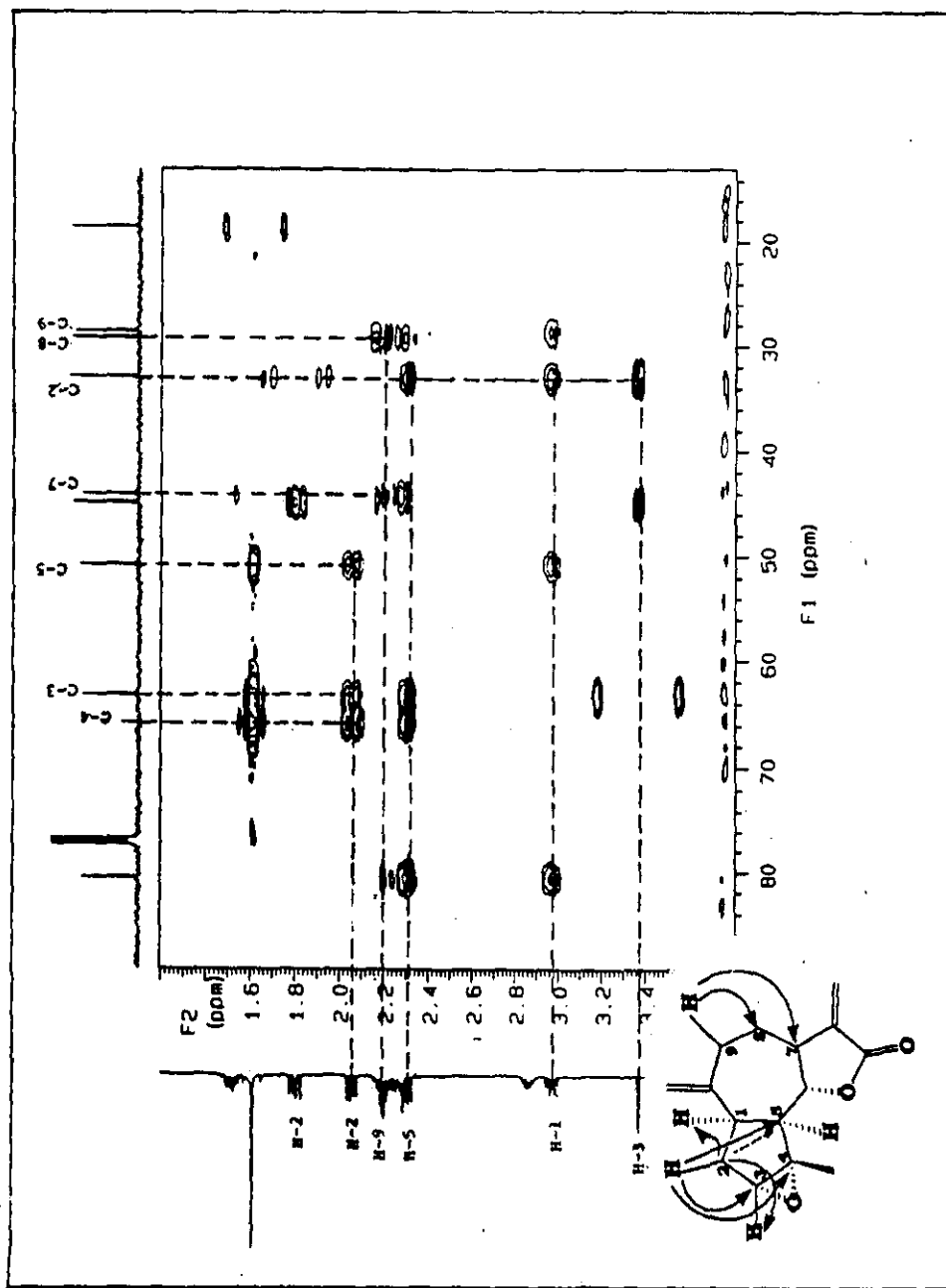
A partir del espectro $^1\text{H NMR}$, se definieron las señales correspondientes a los hidrógenos H-2, H-8 y H-9.

Al H-9 se le asignaron las señales múltiples que aparecen alrededor de δ 2.21- 2.19, ya que muestra acoplamiento a tres enlaces de distancia con el C-7 y a dos enlaces con C-8 (ver esquema 10), por lo tanto, al C-9 corresponde la señal observada en δ 28.64, debido a la interacción con los hidrógenos vinílicos del grupo metileno exocíclico localizado en el C-10, eliminando la posibilidad de que esta señal correspondiera al C-8, como se puede comprobar en el esquema 11.

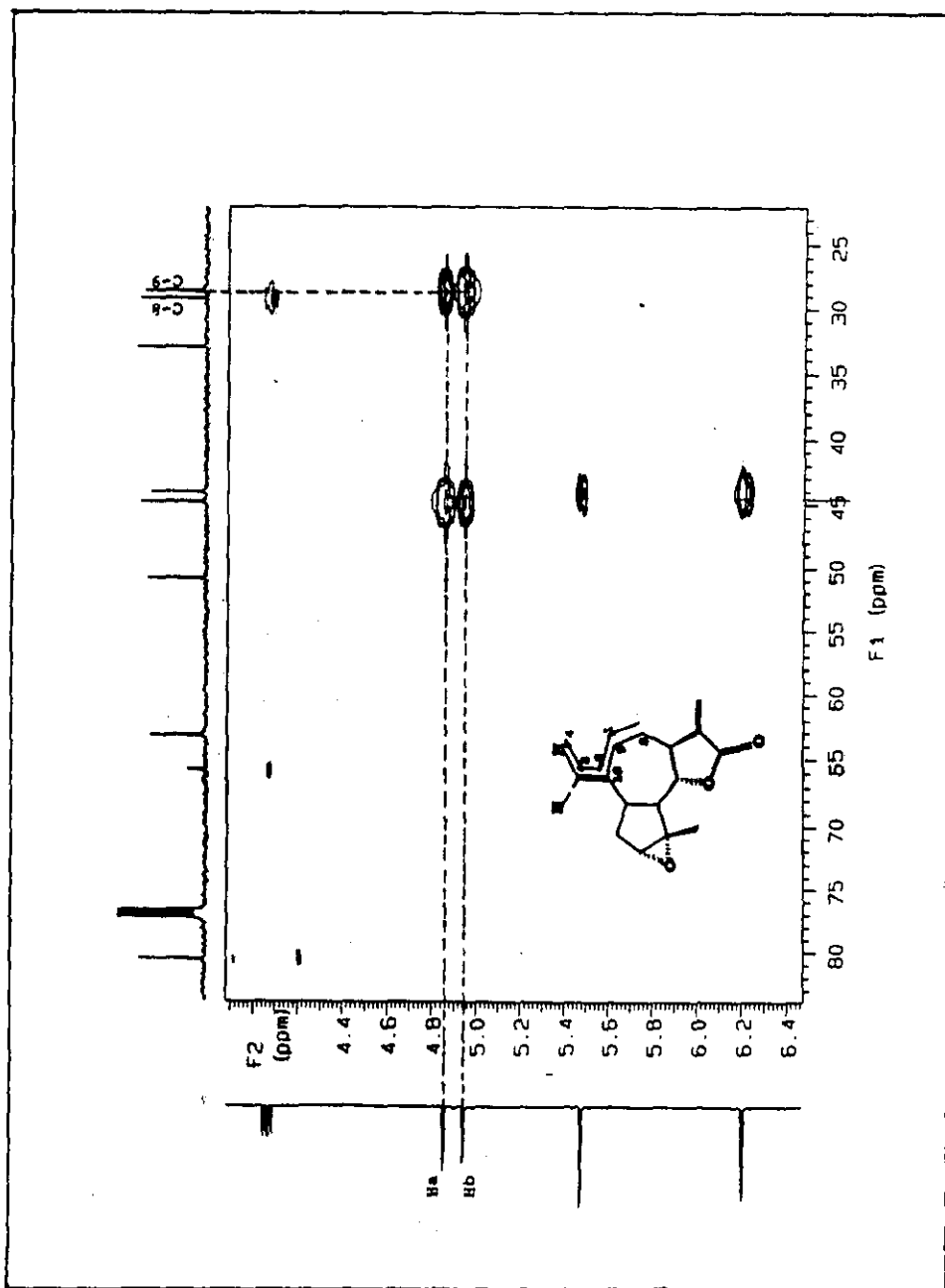
Al H-2 corresponden las señales doble de doble en δ 2.06 ($J=14$ y 7.5) y δ 1.81 ($dddd$, $J=14$, 11 y 1.5) pues de acuerdo al esquema 10, se observa una interacción a dos enlaces de distancia con el C-3, y a tres enlaces con C-4 y C-5; de ahí que al C-2 se le asignó la señal en δ 32.97, pues muestra interacción con H-1 a dos enlaces, y con los hidrógenos H-3 y H-5 a dos y a tres enlaces respectivamente.

Consecuentemente, al C-8 se asignó la señal en δ 29.18, y a sus hidrógenos las señales múltiples entre δ 1.55 y δ 1.50, ya que en el esquema 10 muestra interacción a dos enlaces con H-9 y a tres enlaces con H-6.

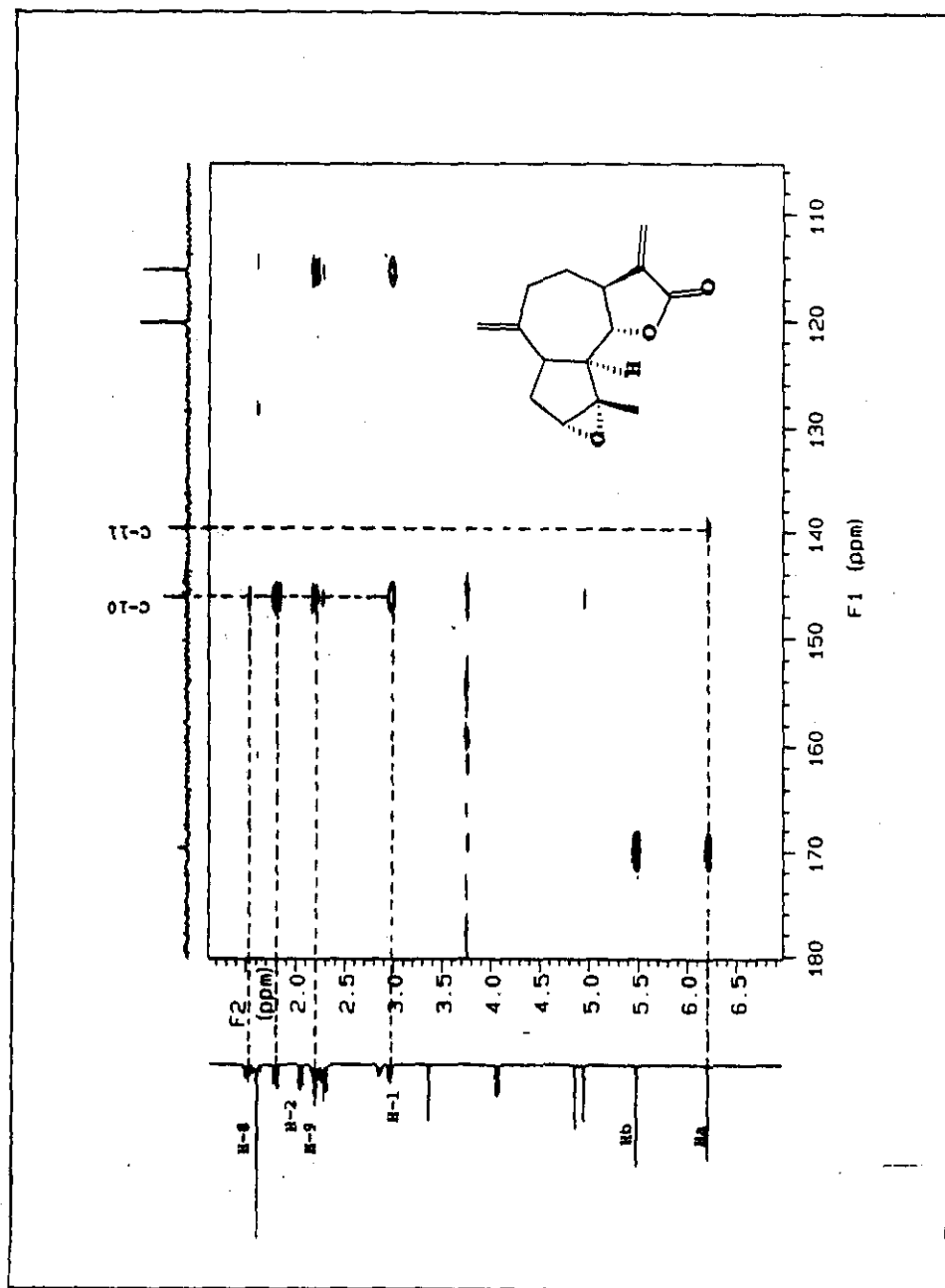
Por medio del espectro $^1\text{H NMR}$ también se lograron definir las posiciones para el C-10 y C-11, como se muestra en el esquema 12. La señal en δ 146.15 se asignó al C-10, debido a la interacción a dos enlaces con H-1 y H-9, y a tres enlaces con H-2 y H-8; por lo que al C-11 corresponde la señal en δ 139.61 que interactúa con los hidrógenos del sistema α,β insaturado.



Esquema 10. Espectro HMBC de la sustancia I, que muestra las interacciones de los H-2, H-8 Y H-9.



Esquema 11. Espectro HMBC, que muestra la interacción a distancia entre C-9 y los hidrógenos vinílicos de C-10.



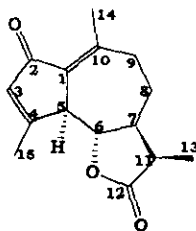
Esquema 12. Espectro HMBC mostrando las interacciones para C-10 y C-11.

Ya definidas la mayoría de las señales en ^{13}C , las restantes se asignaron de acuerdo a la tabla XIX, donde se comparan los desplazamientos químicos obtenidos para la Estafiatina, con los informados en la literatura [28].

Datos de RMN-^{13}C de la Estafiatina (ppm)			
CARBONO	δ^{ref}	δ^{a} (Experimental)	δ^{b} (Experimental)
1	44.84	44.89	44.86
2	32.96	32.99	32.97
3	63.20	63.20	63.17
4	65.85	65.85	65.82
5	50.80	50.87	50.85
6	80.51	80.54	80.53
7	44.03	44.11	44.10
8	28.55	29.21	29.18
9	29.15	28.65	28.64
10	146.03	146.12	146.15
11	139.50	139.58	139.61
12	169.78	169.73	169.74
13	120.22	120.16	120.14
14	115.28	115.26	115.25
15	18.52	18.52	18.49

δ^{ref} : 75 MHz, CDCl_3
 δ^{a} : 75 MHz, CDCl_3
 δ^{b} : 125 MHz, CDCl_3

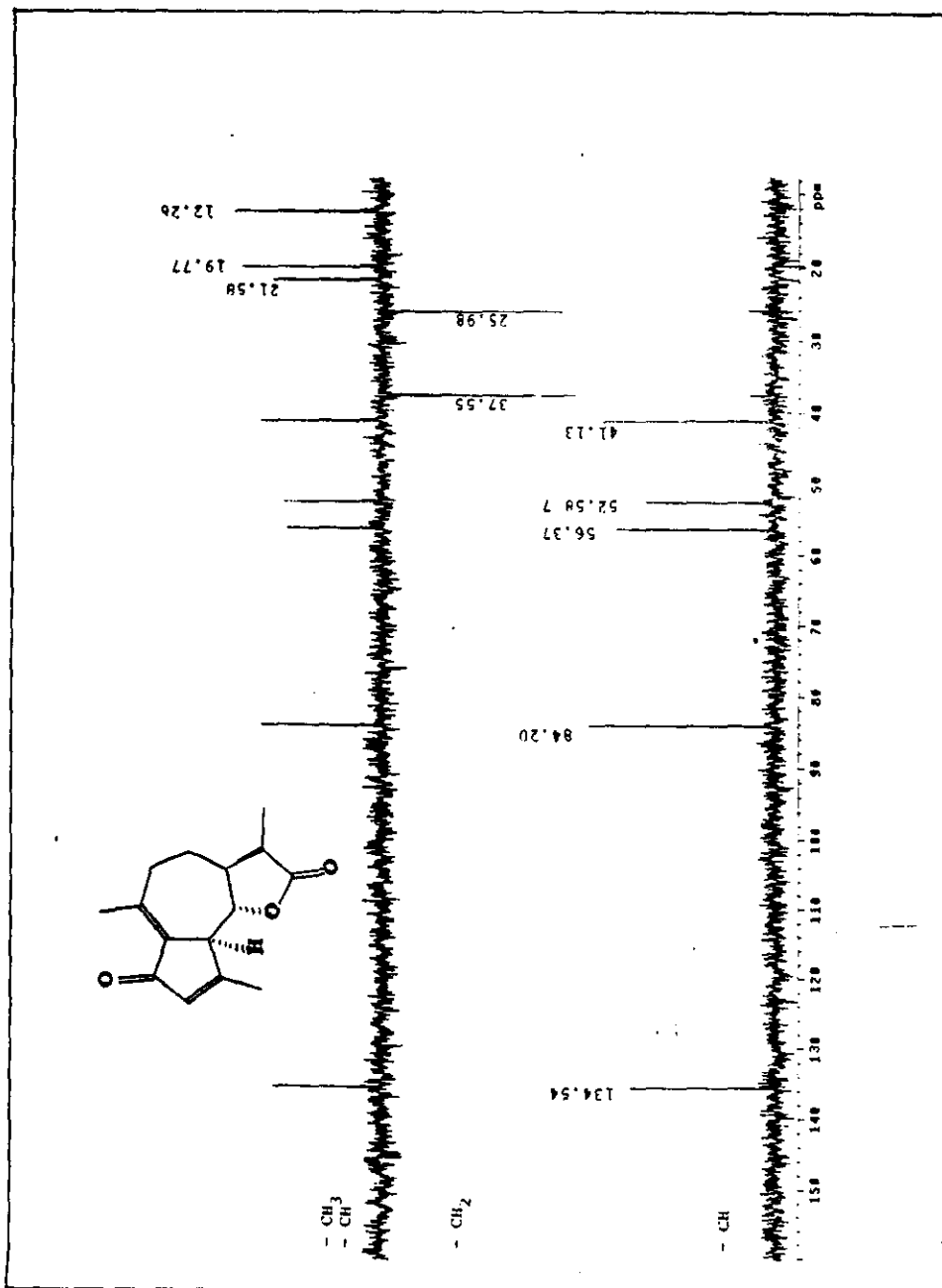
Tabla XIX. Desplazamientos químicos de ^{13}C para la Estafiatina.

Achillina (II)

A partir de las fracciones 188-217, obtenidas al eluir la columna con mezcla hexano- AcOEt (85:15), se aisló un sólido cristalino blanco, el cual tras purificarse por cristalización por par de disolventes (CHCl₃-Propanol), presentó en su espectro de IR (espectro 4), bandas en 2929 cm⁻¹, correspondiente a la ν (C-H), a 1772 cm⁻¹ que se asigna a la ν (C=O) y a 1683 cm⁻¹, que corresponde a la ν (C=O) con un sistema α,β -insaturado.

En su espectro de masas por impacto electrónico, se observa un ion molecular de m/z 246 que sugiere una fórmula C₁₅H₁₈O₃ ($\Omega=7$), lo cual se confirma parcialmente con su espectro de RMN-¹³C (espectro 6) que muestra 15 señales, seis de ellas desplazadas hacia campo bajo (sobre 100 ppm), correspondientes a carbonos con hibridación sp². A su vez, el espectro de ¹³C (DEPT, esquema 13) muestra que de estas últimas, sólo una corresponde a carbono hidrogenado (δ 136.15). De las nueve señales restantes, cuatro son metinos (δ 84.82, 57.01, 53.21 y 41.74), dos son metilenos (δ 38.19 y 26.62) y tres son metilos (δ 22.23, 20.40 y 12.90).

Por otra parte, en su espectro de RMN-¹H (espectro 5), se observa un triplete a δ 3.59 ($J=10$) que se asigna al H-6 de una lactona sesquiterpénica con una fusión de anillo *trans*, que de acuerdo a los datos antes mencionados, posee un esqueleto de guayano.



Esquema 13. Espectro de RMN- ¹³C (DEPT) de la Achilina.

La ausencia de dos señales dobles en δ 6.2 y δ 5.5 aproximadamente, indica la ausencia del sistema α,β -insaturado en el anillo de la lactona por lo que seguramente, los carbonos sp^2 corresponden a dos dobles enlaces dentro de la molécula, además de los pertenecientes a los grupos carbonilo.

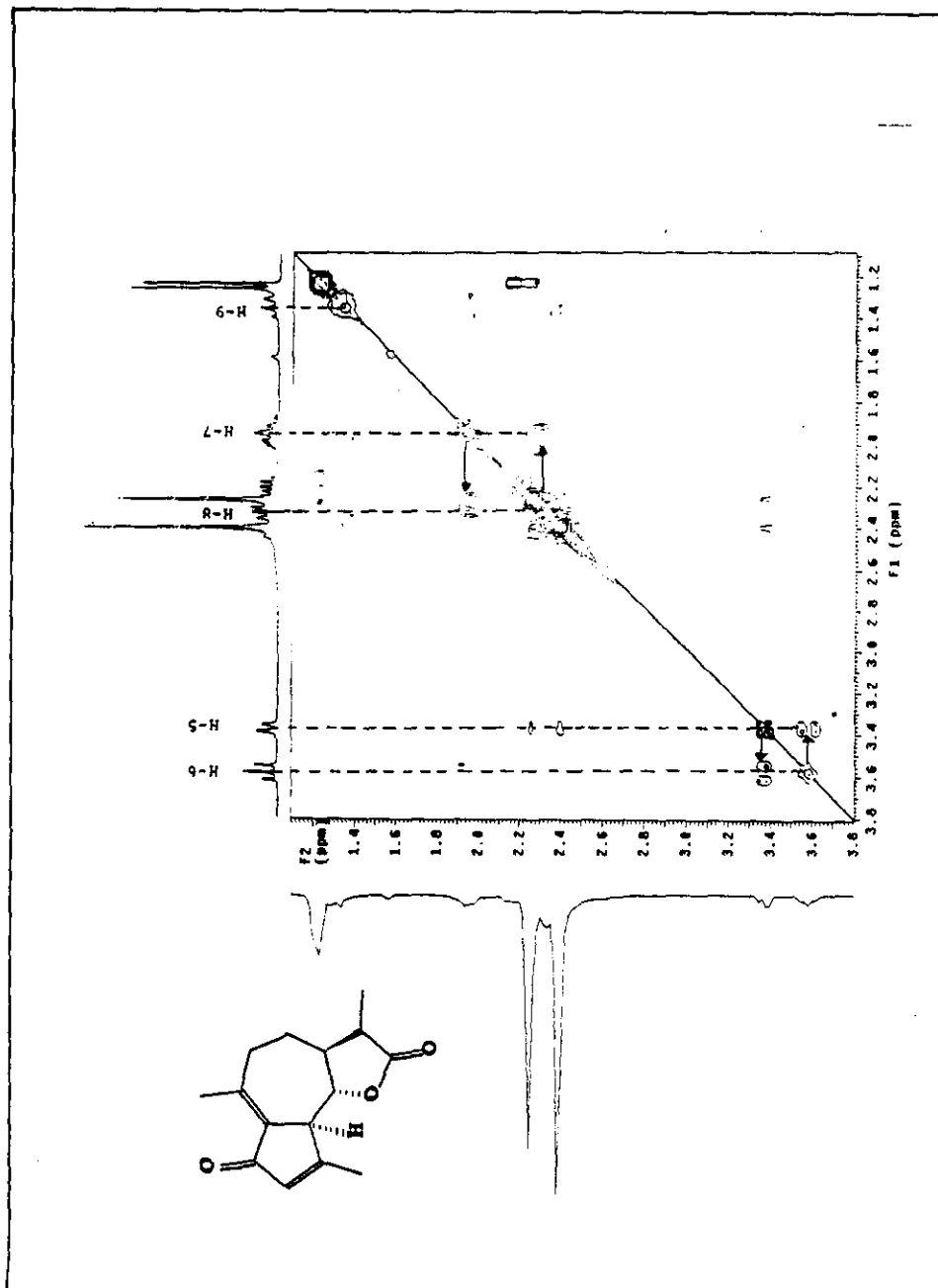
La señal doble a δ 3.38 ($J= 10$) corresponde al H-5; el cual presenta un acoplamiento *trans*-diaxial con H-6, esto se confirma en su espectro *cosy* (esquema 14), que muestra el acoplamiento existente entre ambos protones.

El H-3 aparece como un triplete en δ 6.13 ($J=1.5$), mientras que el cuarteto en δ 2.22 ($J= 12.3$ y 7) corresponde a H-11. En su espectro *cosy* se observan dos señales múltiples a δ 2.36- 2.31 y δ 1.33- 1.30, las cuales se acoplan entre sí, por lo que se asignaron a H-8 y H-9 respectivamente. Asimismo la señal en δ 2.32 se acopla a la señal múltiple en δ 2.00- 1.90 que pertenece a H-7.

La presencia de los grupos metilo se confirma por las señales simples en δ 2.41, δ 2.27 y δ 1.23 (C-14, C-15 y C-13 respectivamente), y por la presencia del ion 231 (M^+-CH_3 , 9.3%) en su espectro de masas, ocasionado por la pérdida de 15 uma ($-CH_3$) sobre la estructura original.

Los desplazamientos químicos de los carbonos en el espectro de ^{13}C se asignaron comparándolos con los datos obtenidos para la Achillina, de acuerdo a Ohno y Ruiz-Cancino [48, 28], como se muestra en la tabla XX.

Con base en la comparación y en el análisis previamente realizado, se concluyó que la sustancia aislada es la Achillina.



Esquema 14. Espectro COSY de la Achillina, para los H-5 y H-6.

Datos de RMN- ¹³ C de la Achillina (ppm)				
CARBONO	II [48]	II (experimental)	II [28]	Δ δ
1	131.8	132.50	131.85	- 0.65
2	195.9	196.78	195.66	- 1.12
3	135.5	136.15	135.44	- 0.71
4	170.3	170.49	170.00	- 0.49
5	52.9	57.01	53.01	- 4.0
6	83.6	84.82	83.53	- 1.29
7	51.8	53.21	51.96	- 1.25
8	23.5	26.62	23.68	- 2.94
9	37.6	38.19	37.65	- 0.54
10	152.4	152.67	152.01	- 0.66
11	39.3	41.74	39.36	- 2.38
12	179.6	178.11	178.22	0.11
13	10.0	12.90	9.90	- 3.0
14	21.5	20.40	19.67	- 0.73
15	19.8	22.23	21.49	- 0.74

II [49] : CDCl₃
 II [28]: 20 MHz, CDCl₃
 II (experimental): 75 MHz, CDCl₃

Tabla XX. Desplazamientos químicos de ¹³C para la Achillina.

La orientación espacial en el C-11, se pudo determinar en función de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 ($J = 10$). Este valor está de acuerdo para una posición *cis* de los hidrógenos mencionados y por consiguiente, el CH₃-13 presenta una configuración β , como se muestra en la figura 11. Lo anterior, se puede discutir también en función del efecto γ -gauche que sufre el C-8 por la orientación del grupo metilo en el C-13.

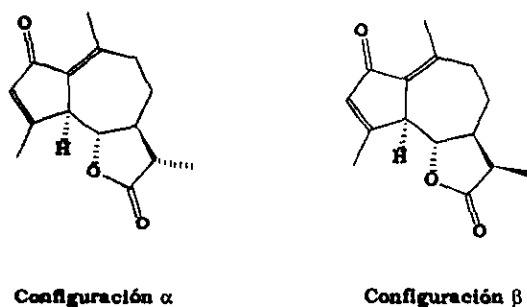


Figura 11. Posibles configuraciones para el C-13 de la sustancia II.

En la tabla XXI [49-50], se muestran los desplazamientos químicos correspondientes a C-7, C-8 y C-11 para sustancias con esqueleto similar al de la Achillina.

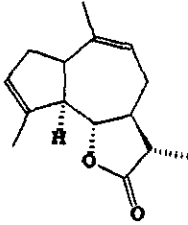
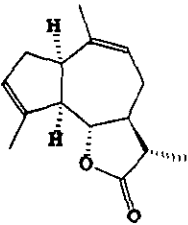
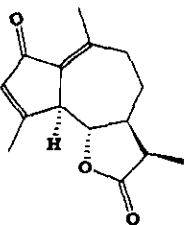
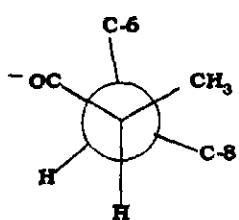
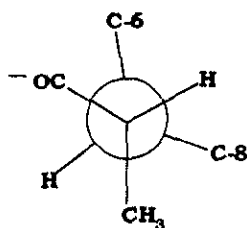
EFECTO γ -GAUCHE SOBRE EL C-8 EN DIFERENTES SUSTANCIAS			
			
	1	2	II
C-7	48.90	48.70 ($\Delta\delta^{1-2} = 0.2$)	53.21 ($\Delta\delta^{1-II} = -4.31$)
C-8	29.60	30.30 ($\Delta\delta^{1-2} = -0.5$)	26.62 ($\Delta\delta^{1-II} = 3.18$)
C-11	42.20	42.70 ($\Delta\delta^{1-2} = -0.5$)	41.74 ($\Delta\delta^{1-II} = 0.46$)

Tabla XXI. Efecto γ -gauche sobre el C-8 ocasionado por la orientación de CH_3 -13.

En el esquema 15, se muestran las proyecciones de Newman de las dos posibles orientaciones del grupo metilo. La orientación en posición α ($\Delta\delta = -0.5$), ocasiona un desplazamiento a campo más bajo con respecto a aquella en la cual el grupo metilo se orienta en posición β ($\Delta\delta = 0.46$), confirmando la estructura propuesta.

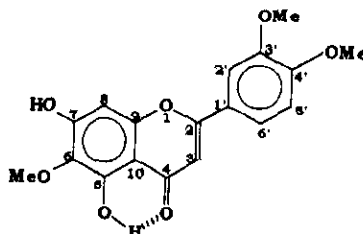


Orientación β

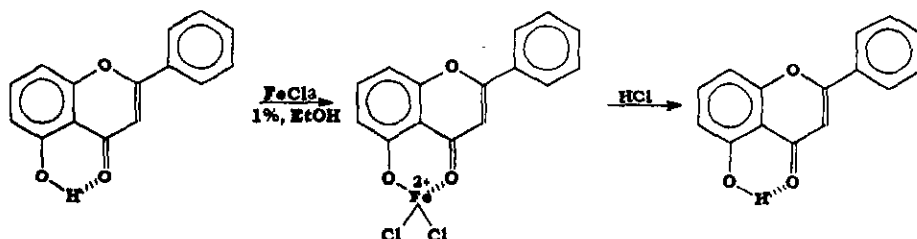


Orientación α

Esquema 15. Proyecciones de Newman de las posibles orientaciones del grupo metilo unido a la posición 11.

Eupatilina (III)

De las fracciones 279-307, obtenidas al eluir la columna con una mezcla hexano- AcOEt (80:20), se observó en ccr la presencia de un flavonoide, al revelar ésta con luz ultravioleta (onda larga) -donde se observa una coloración café- mientras que al emplear revelador químico $\text{FeCl}_3 \cdot \text{EtOH}$ (1%)¹, dió prueba positiva para la identificación de flavonoides² (se observa una mancha café). Lo anterior se explica debido a que el revelador forma un quelato con el flavonoide [54] como se indica en el esquema 16.



Esquema 16. Quelato formado entre el FeCl_3 y la flavona en ccr.

¹ El FeCl_3 acuoso o etanólico forma colores con los compuestos fenólicos en general. Sin embargo, una coloración verde sugiere derivados del catecol y un color azul, derivados del pirogalol [51].

² Algunas otras reacciones cualitativas para la identificación de flavonoides son las siguientes: con cloruro de aluminio, adquieren un color amarillo fluorescente, mientras que con vapores de amoníaco adquieren un color amarillo pálido, amarillo verdoso o azul intenso. Con el reactivo cloruro óxido de zirconio IV, se detecta un color amarillo verdoso [52- 53].

La formación del quelato se comprobó con base en su espectro de IR (espectro 7), ya que muestra una banda en 1655 cm^{-1} que corresponde a la ν (C=O) de un sistema conjugado. En su espectro de masas por impacto electrónico, se observa un ion molecular de m/z 344 que corresponde a una fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_7$ ($\Omega= 11$); el ion 329 ($M^+ -CH_3$, 64.3%), sugiere la presencia del grupo metoxilo en el C-6 [55].

En su espectro RMN- 1H (espectro 8), se observa en δ 12.99, una señal simple que corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo del C-5, mientras la señal en δ 10.35 se asigna al hidrógeno de otro grupo hidroxilo. Por otro lado, la señal en δ 6.57 corresponde al H-3, lo cual confirma que el esqueleto base de la sustancia aislada es el de una flavona.

La señal simple en δ 6.76 corresponde al H-8, como se ilustra en la figura 12. El desplazamiento químico mostrado a campo alto por éste hidrógeno, se debe al efecto electrodonador que ejercen los diferentes sustituyentes localizados en el anillo A.

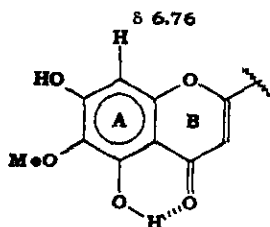


Figura 12. Posible patrón de sustitución del anillo A de la flavona.

Finalmente las señales simples entre δ 3.93- δ 3.83 (9H), corresponden a tres metoxilos unidos a un anillo aromático; donde existe la posibilidad de tener diferente patrón de sustitución en el anillo B, por la incorporación de los dos grupos metoxilo restantes. Para ello se tomó en consideración su espectro de Correlación Homonuclear H-H (cosy, esquema 17), el cual indica que se encuentra trisustituido.

En δ 7.60 se observa una señal doble de doble ($J= 8.4$ y 2.1) que integra para un hidrógeno, y que se acopla con la señal doble en δ 7.47 ($J= 2.1$). La constante de acoplamiento ($J= 2.1$) indica que la interacción entre estos dos hidrógenos es de tipo *meta* [46]. La misma señal en δ 7.60 se acopla con el doblete en δ 7.06 ($J=8.7$), acoplamiento que de acuerdo a la constante, es de tipo *orto* [46]. Basándose en lo anterior, se pueden sugerir como posibilidades estructurales para dicho anillo, las que se muestran en la figura 13.

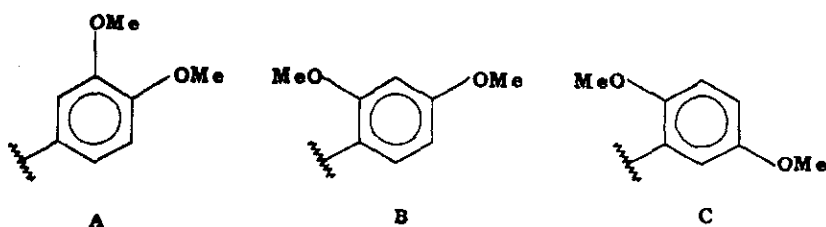
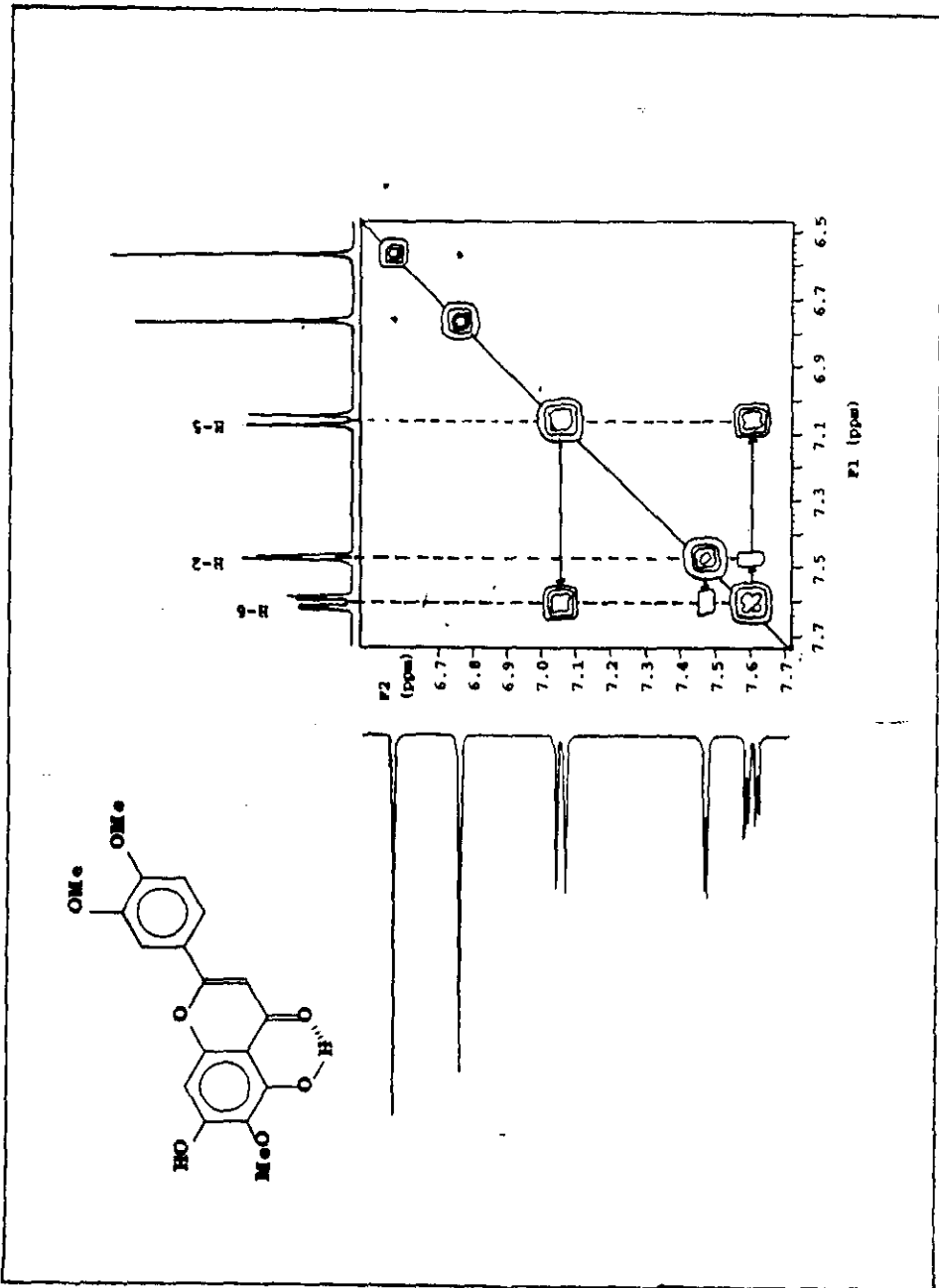
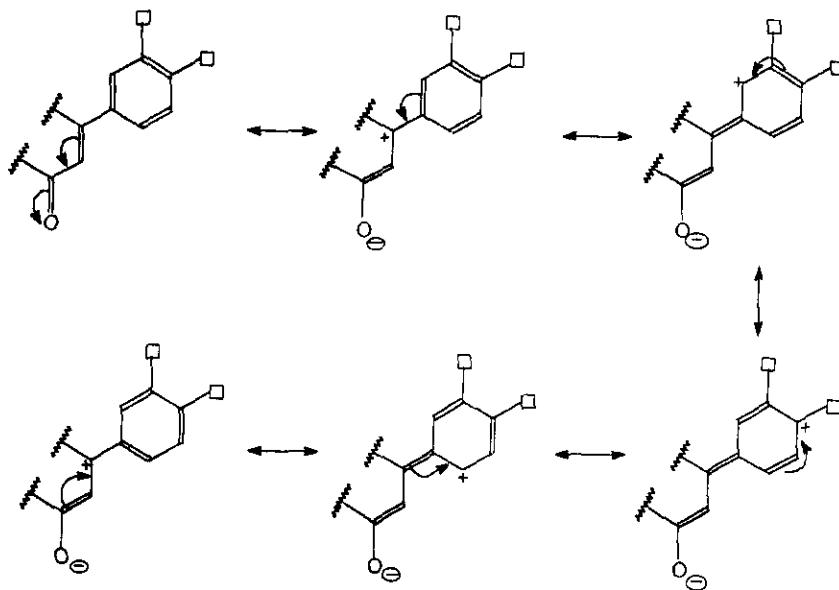


Figura 13. Fórmulas parciales para la sustitución en el anillo B de la flavona.



Esquema 17. Espectro COSY para la Eupafilina. Interacción entre los protones del anillo B.

Los desplazamientos químicos de los hidrógenos del anillo B se asignaron con base en las estructuras resonantes que se muestran en el esquema 18, el cual indica que los hidrógenos que llegaron a localizarse en las posiciones 2', 4' y 6' pueden desplazarse a campo bajo por la desprotección ocasionada por la presencia del grupo carbonilo conjugado en el C-4.



Esquema 18. Formas resonantes del anillo B de la flavona

De esta forma, las señales en δ 7.60 y δ 7.47 muestran cierta desprotección con respecto al doblete en δ 7.06, por lo que se asume que el hidrógeno se puede encontrar en las posiciones C-5' o C-3' (figura 13).

Con base en lo anterior, la fórmula parcial B no está de acuerdo al tipo de multiplicidad observada en el espectro, ya que sólo un hidrógeno se encontraría desprotegido, mostrando un doblete a campo bajo (H-6') y dos señales a campo más alto para H-5' (*dd*) y H-3' (*d*).

En lo que respecta a la fórmula parcial C, H-4' y H-6' se encuentran bajo el mismo ambiente. Ambos se encuentran protegidos por efecto electrodonador del grupo metoxilo adyacente y a su vez sufren desprotección ocasionada por el efecto resonante, lo que provoca que las señales se desplacen hacia campo bajo; sin embargo esta igualdad de circunstancias deben provocar que estas señales tengan prácticamente el mismo desplazamiento químico, lo cual no se observa en el espectro de RMN-¹H, quedando la sustitución que se plantea en la fórmula parcial A de la figura 13.

El espectro de RMN-¹³C (espectro 9), muestra en desacoplamiento total 18 átomos de carbono. La naturaleza del grupo funcional, así como el grado de hidrogenación de éstos, se dedujo en función de su desplazamiento químico y por la multiplicidad mostrada. Con base en lo anterior, se pudo establecer la presencia de un grupo carbonilo de cetona, 10 carbonos cuaternarios, cinco metinos y tres metilos, lo cual está de acuerdo para la fórmula C₁₈H₁₆O₇.

La asignación de los carbonos presentes en dicha sustancia se hizo considerando los desplazamientos químicos descritos en la literatura para la cromona y la luteolina [56- 57], los cuales se indican en la tabla XXII.

En dicha tabla, se muestran las variaciones en los desplazamientos químicos de la sustancia aislada con respecto a la luteolina, principalmente en el C-6 y en los carbonos del anillo B, atribuidas a la naturaleza de los grupos sustituyentes en dicho anillo, ya que como se sabe, la sustitución con

grupos hidroxilo tiende a proporcionar una mayor protección a los carbonos vecinos en comparación con el efecto generado por el grupo metoxilo, cuando se encuentran en posición *orto* o *para* con respecto a ellos.

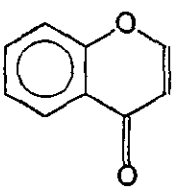
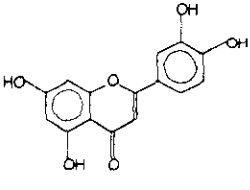
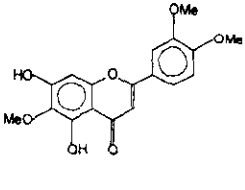
DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C DE ALGUNOS FLAVONOIDES			
	1) CROMONA	2) LUTEOLINA	EUPATILINA
C-2	145.5	164.5	163.1
C-3	113.0	103.3	104.13
C-4	177.6	182.2	181.9
C-5	125.3	157.9	156.88
C-6	125.8	99.2	108.9
C-7	133.8	164.7	163.1
C-8	118.3	94.2	93.9
C-9	156.0	162.1	156.88
C-10	125.0	104.2	103.2
C-1'	-----	119.3	119.62
C-2'	-----	113.8	119.61
C-3'	-----	146.2	151.74
C-4'	-----	150.1	152.59
C-5'	-----	116.4	11.08
C-6'	-----	122.1	123.05
			

Tabla XXII. Desplazamientos químicos de ^{13}C para la cromona, luteolina y la Eupatilina.

En δ 108.9 se aprecia la señal perteneciente al C-6 de la eupatilina, el cual posee un desplazamiento químico a campo más bajo que la luteolina, ya que ésta última no se encuentra sustituida en esa posición. El grupo metoxilo de la eupatilina es un grupo donador más débil que el grupo hidroxilo, provocando la desprotección de dicho carbono. En cambio, con respecto a la cromona, el desplazamiento para C-6 es a campo más alto, ya que esa posición se encuentra protegida por dos grupos hidroxilo adyacentes en posición orto.

Para los C-3, C-4, C-9 y C-10, se les puede asignar desplazamientos químicos similares a los de la luteolina por mostrar un patrón de sustitución similar.

Como se puede observar, la señal asignada al C-4, se encuentra en desplazamientos químicos similares para la sustancia II y la luteolina. El grupo cetona por sí solo mostraría un desplazamiento a δ 200 [46]; sin embargo, la resonancia que se da por la presencia del doble enlace en posición α , β hace que la señal se desplace hacia campo alto. Esta misma resonancia afecta el desplazamiento químico del C-2, ya que como se puede observar, para la luteolina y la sustancia en discusión, no hay diferencia significativa ($\Delta\delta=1.4$), pero al comparar la señal de C-2 con respecto a la cromona, se observa que la señal del C-2 se encuentra más protegida, ya que ésta no muestra quelación con el grupo hidroxilo del C-5, por lo que la deficiencia electrónica en el C-2 tiende a ser menor.

Para el C-5 y C-7, los desplazamientos químicos con respecto a la cromona tienden a ser a campo más bajo, ya que tanto la luteolina como la sustancia problema están sustituidas en dichas posiciones por un átomo electronegativo que tiende a desproteger al carbono por un efecto α .

Al C-8 se le asignó la señal en δ 93.9, el cual se encuentra desplazado a la región de los carbonos sp^3 , por el efecto protector de los grupos sustituyentes situados en posición *orto* y *para* con respecto a dicho átomo de carbono.

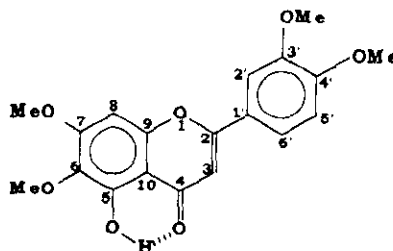
Para la determinación de los desplazamientos de los carbonos del anillo B se empleó como referencia la Luteolina. En ésta, se observa que los carbonos sustituidos C-3' y C-4' se desplazan hacia campo bajo, entre δ 140 y δ 150, mientras que para los carbonos sin sustituir, los desplazamientos se encuentran entre δ 113 y δ 123. Este mismo comportamiento se observa para la sustancia obtenida.

Finalmente, las señales de ^{13}C en δ 59.7, δ 55.6 y δ 55.4 se atribuyen a los carbonos de los grupos metoxilo unidos a C-4', C-3' y C-6 respectivamente. La asignación para C-6 se hizo considerando el efecto protector del grupo hidroxilo en los carbonos adyacentes (C-7 y C-5) y para el C-4', la señal a campo bajo por su participación en la deslocalización de la carga positiva generada por el grupo carbonilo α, β -insaturado del C-4.

Tomando en cuenta lo anterior, las señales en $RMN-^1H$ se definen de la siguiente forma: la señal doble de doble en δ 7.60 corresponde al H-6' que se acopla en posición *orto* a H-5' ($J= 8.7$) y en posición *meta* a H-2' ($J= 2.1$). El doblete en δ 7.47 corresponde al H-2' y la señal en δ 7.06 corresponde al H-5'.

Reuniendo las características descritas, aunadas a sus propiedades físicas, y confrontándolas con las descritas en la literatura [28, 58- 59], se pudo concluir que la sustancia aislada de *A. ludoviciana ssp. mexicana* es la Eupatilina, flavona metoxilada en las posiciones 6, 3' y 4'.

3',4',6,7-Tetrametoxi-5-
hidroxi-flavona (IV)



Las aguas madres de las fracciones 279-309, de donde se obtuvo la Eupatilina, fueron tratadas con una solución de diazometano en éter etílico a 0°C (ver figura 14), dando como producto un sólido amorfo cristalino, el cual fue cristalizado por par de disolventes (CHCl₃ - n-hexano). Dicho sólido, presenta en su espectro de IR bandas entre 2940 y 2840 cm⁻¹ correspondientes a la ν (C-H), y una señal más intensa en 1656 cm⁻¹ que pertenece a la ν (C=O). La banda observada en 1126 cm⁻¹ es debida a la ν (C-O-C).

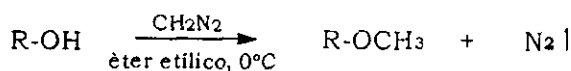


Figura 14. Reacción de metilación a partir de Diazometano en éter etílico (0°C).

Comparando este espectro con el perteneciente a la eupatilina (espectro 7), se observa una diferencia significativa: la desaparición de la banda correspondiente a la ν (O-H) alrededor de 3184 cm⁻¹, lo que hace suponer que se llevó a cabo la reacción de metilación.

La afirmación anterior se apoya en los datos proporcionados por el espectro de masas por impacto electrónico del producto de la metilación, el cual presenta un ion molecular de m/z 358, que indica la adición de una molécula de carbono y dos de hidrógeno con respecto a la eupatilina (ion molecular m/z 344). Aunado a ello se observa en su espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (espectro 10), una señal adicional en δ 3.93, que corresponde a los grupos metoxilo en las posiciones 3', 4' y 6, como se muestra en la tabla XXIII. Lo mismo sucede para el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (espectro 11), que presenta 4 señales (3 para la eupatilina) en la región donde resuenan los C de los grupos metoxilo.

	Eupatilina	Derivado metilado
-OCH₃	δ 3.94 (s)	δ 3.99 (s)
	δ 3.91 (s)	δ 3.98 (s)
	δ 3.83 (s)	δ 3.97 (s)
		δ 3.93 (s)
s: singulete		

Tabla XXIII. Datos de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de la Eupatilina y del derivado metilado para los H de los grupos metoxilo

La 3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona ha sido aislada previamente de especies de *Artemisia*, como *A. lanata* y más recientemente de *A. assoana* [60], mostrando los siguientes desplazamientos en su espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (ver tabla XXIV).

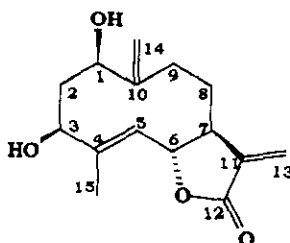
	3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona		Eupatilina
	IVa	IVb	IIIb
C-2	163.85	164.01	163.11
C-3	104.21	104.56	104.14
C-4	182.46	182.63	181.90
C-5	153.07	153.18	156.89
C-6	132.55	120.12	131.04
C-7	158.66	158.81	163.11
C-8	90.54	90.64	93.93
C-9	152.90	152.47	152.32
C-10	105.98	106.25	103.20
C-1'	123.58	123.95	123.05
C-2'	108.71	109.10	108.95
C-3'	149.25	152.47	148.73
C-4'	152.26	153.18	152.59
C-5'	111.11	111.36	111.08
C-6'	119.98	123.95	119.62
-OMe	60.72	60.84	59.68
	56.25	56.34	55.61
	56.04	56.21	55.44
	56.04	56.16	

a: Sustancia obtenida de *A. assoana*

b: Sustancia obtenida de *A. ludoviciana* ssp. mexicana.

Tabla XXIV. Datos de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de la flavona metilada en las posiciones 3', 4', 6 y 7 obtenida de *A. assoana* y *A. ludoviciana* ssp. mexicana.

Es importante mencionar que la metilación sólo se dio en el grupo hidroxilo del C-7, debido a que el hidrógeno del grupo -OH en el C-5, se encuentra formando un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de la posición 4, que a su vez, se estabiliza por deslocalización de los electrones del sistema α,β y del anillo B, como se mostró previamente en el esquema 18.

Ridentina (V)

De las fracciones 528-651, obtenidas al eluir la columna con mezcla *n*-hexano-AcOEt 55:45, 50:50 y 45:55, se aisló una sustancia que en su espectro de IR (espectro 12), muestra las absorciones características del grupo hidroxilo ν (OH) de la cetona α,β -insaturada del grupo α -metileno- γ -lactona en 3334 y 1763 cm^{-1} respectivamente. En su espectro de masas (IE) se observa un ion molecular de m/z 264 (8.5%) que corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ($\Omega = 6$).

En su espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de 300 MHz en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ (espectro 13), se observa un par de dobletes en δ 6.08 ($J = 3.6$ Hz) y δ 5.49 ($J = 3.3$ Hz) que corresponden a los hidrógenos del metileno exocíclico conjugado con la γ -lactona.

Por otro lado, en su espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$, la señal en δ 4.46 se simplifica cuando se equilibra con D_2O (espectro 15), observándose un triplete ($J = 9.9$) que se asigna a H-6, el cual se acopla con H-5, situado en δ 5.28 ($J = 9.9$), lo que sugiere que existe una doble ligadura entre los C-4 y C-5, y es sobre el C-4 donde se localiza el C-15 (δ 1.68, s, 1H). Las señales en δ 5.12 (s.a., $W_{1/2} = 6$ Hz) y δ 4.84 (s.a., $W_{1/2} = 6$ Hz) pertenecen a los hidrógenos del metileno exocíclico localizado sobre el C-10. Los resultados anteriores permitieron proponer que se trata de una lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano.

La integral de la señal entre 2.05- 1.92 ppm en su espectro unidimensional, corresponden a hidrógenos geminales a grupos hidroxilos, los cuales se pueden situar en los C-1 y C-3. El hidrógeno restante corresponde al C-8, el cual interacciona con los hidrógenos del C-9. Esto se puede deducir de su espectro cosy (esquema 19), en el intervalo δ 2.32- 2.24 que integra para 2H, los cuales corresponden a los hidrógenos alílicos del C-9 que interacciona con los hidrógenos del C-8, localizados entre δ 1.64- 1.56.

La asignación de las señales en el espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (espectro 14), se realizó comparándola con los datos obtenidos en estudios previos para una sustancia con propiedades similares [28]:

DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ DE LA RIDENTINA		
C	δ [28]	δ (experimental)
1	73.64*	73.04
2	41.46	40.22
3	73.75	74.05
4	147.26**	148.91
5	120.46	119.91

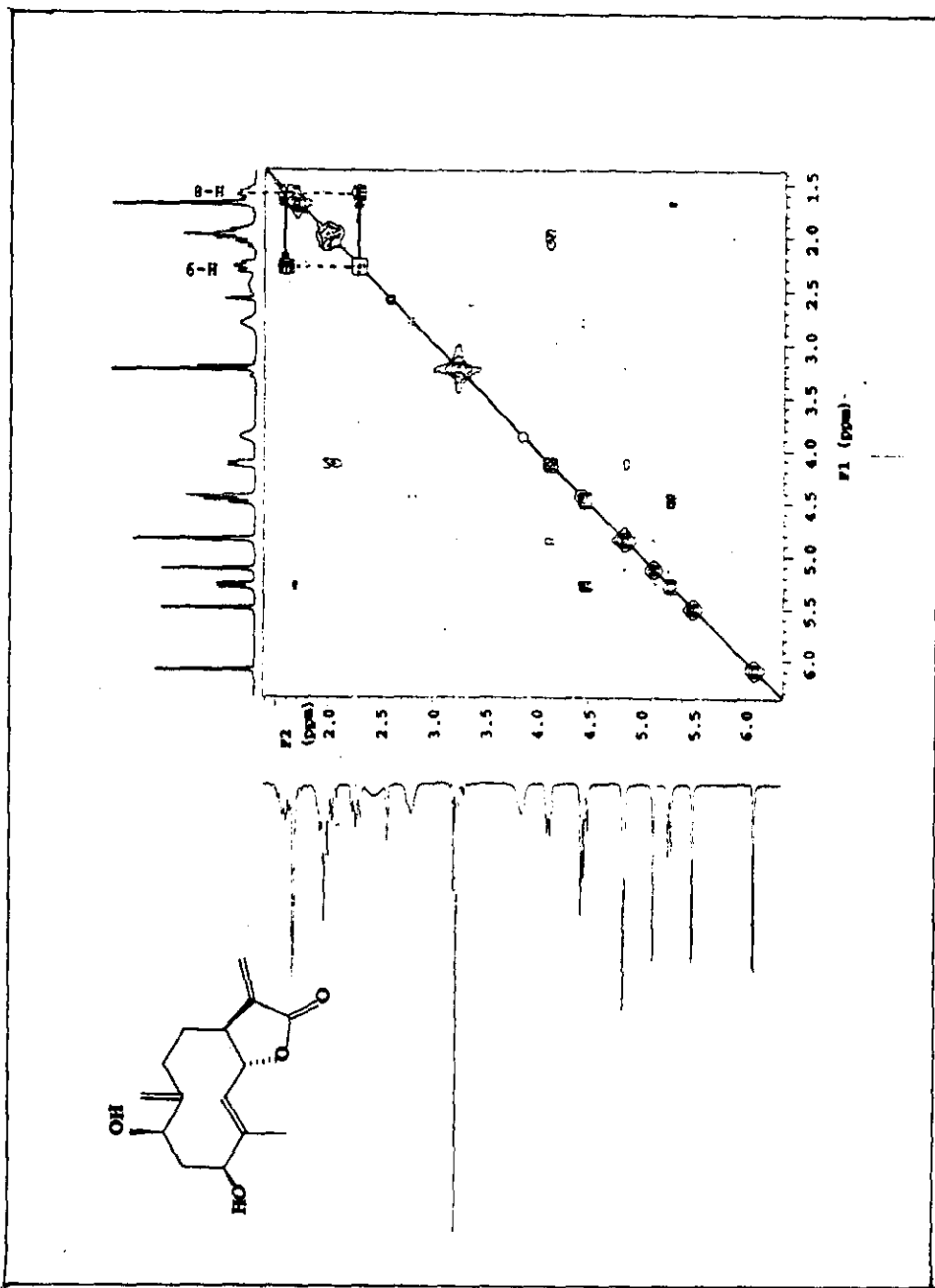
[28]: 75 MHz, DMSO + TMS *, ** Señales
experimental: 75 MHz, DMSO + TMS intercambiables.

Tabla XXV. Datos de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de la Ridentina.

C	δ [28]	δ (experimental)
6	79.58	79.16
7	47.30	
8	25.75	25.21
9	30.45	28.50
10	149.86**	148.91
11	140.07	139.07
12	169.31	169.21
13	117.56	117.48
14	109.60	109.76
15	11.20	10.84
[28]: 75 MHz, DMSO + TMS experimental: 75 MHz, DMSO + TMS		*, ** Señales intercambiables.

Tabla XXV. (continuación)

Como resultado de la discusión anterior, se concluyó que la sustancia obtenida fue la Ridentina, germacranólida aislada de especies de *Artemisia* [61-62].



Esquema 19. Espectro COSY de la Ridentina. Interacción entre H-7, H-8 y H-9.

9.2 Estudio biológico de la especie

Con base en la pruebas de toxicidad frente *Artemia salina* L., resultaron ser tóxicos ($CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) [40], los extractos hexánico y diclorometánico de cada especie, siendo de mayor toxicidad para *Artemisia absinthium*, el extracto diclorometánico con $76.4734 \mu\text{g/mL}$; para *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (San Rafael), el extracto diclorometánico ($264.3724 \mu\text{g/mL}$); y para *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (Milpa Alta), el extracto hexánico con una concentración letal media de $225.7676 \mu\text{g/mL}$.

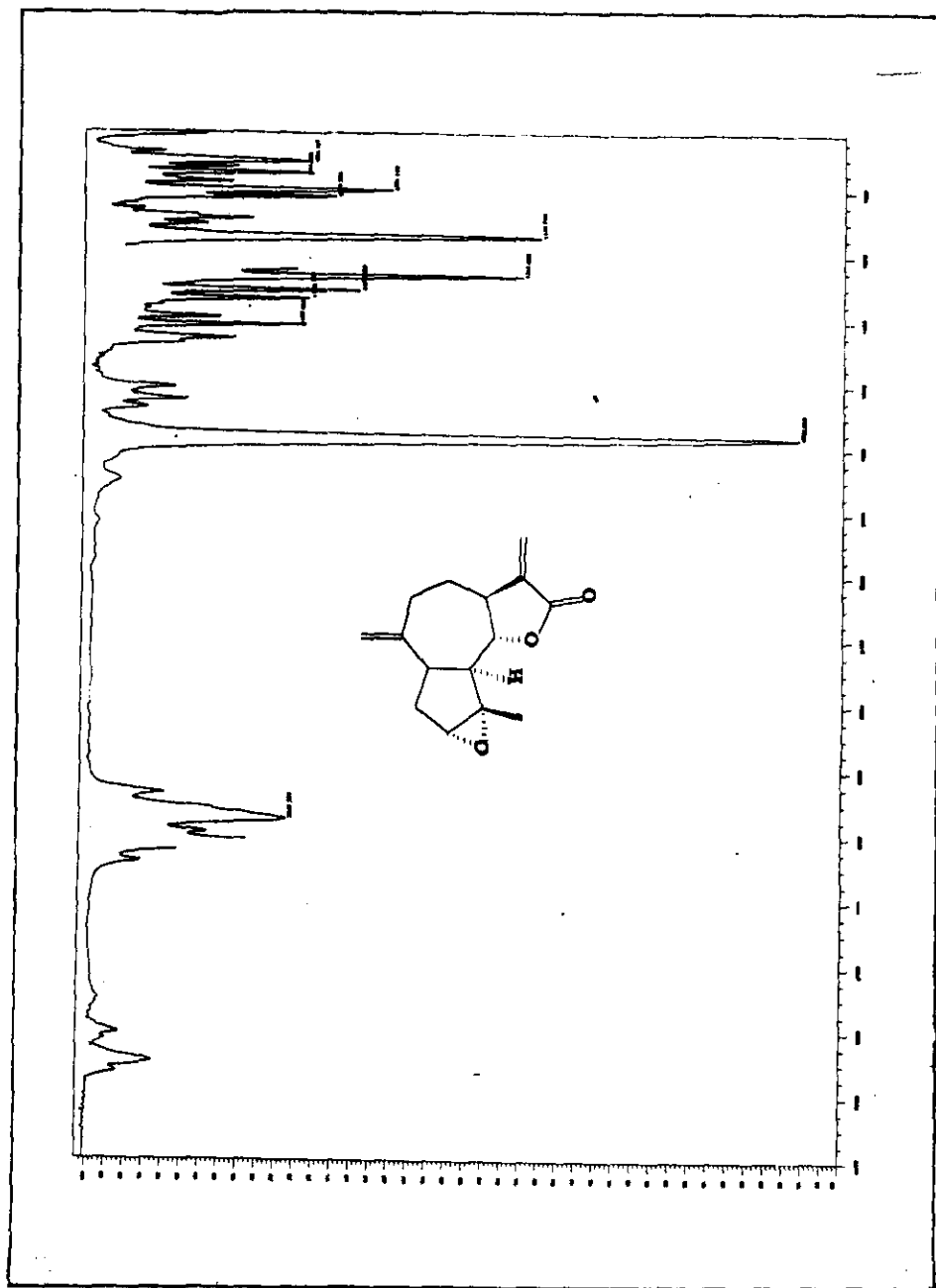
De la separación cromatográfica del extracto diclorometánico se aislaron nueve sustancias, de las cuales se purificaron y caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos:

- ♦ Estafiatina (I)
- ♦ Achillina (II)
- ♦ Eupatilina (III)
- ♦ Ridentina (V)

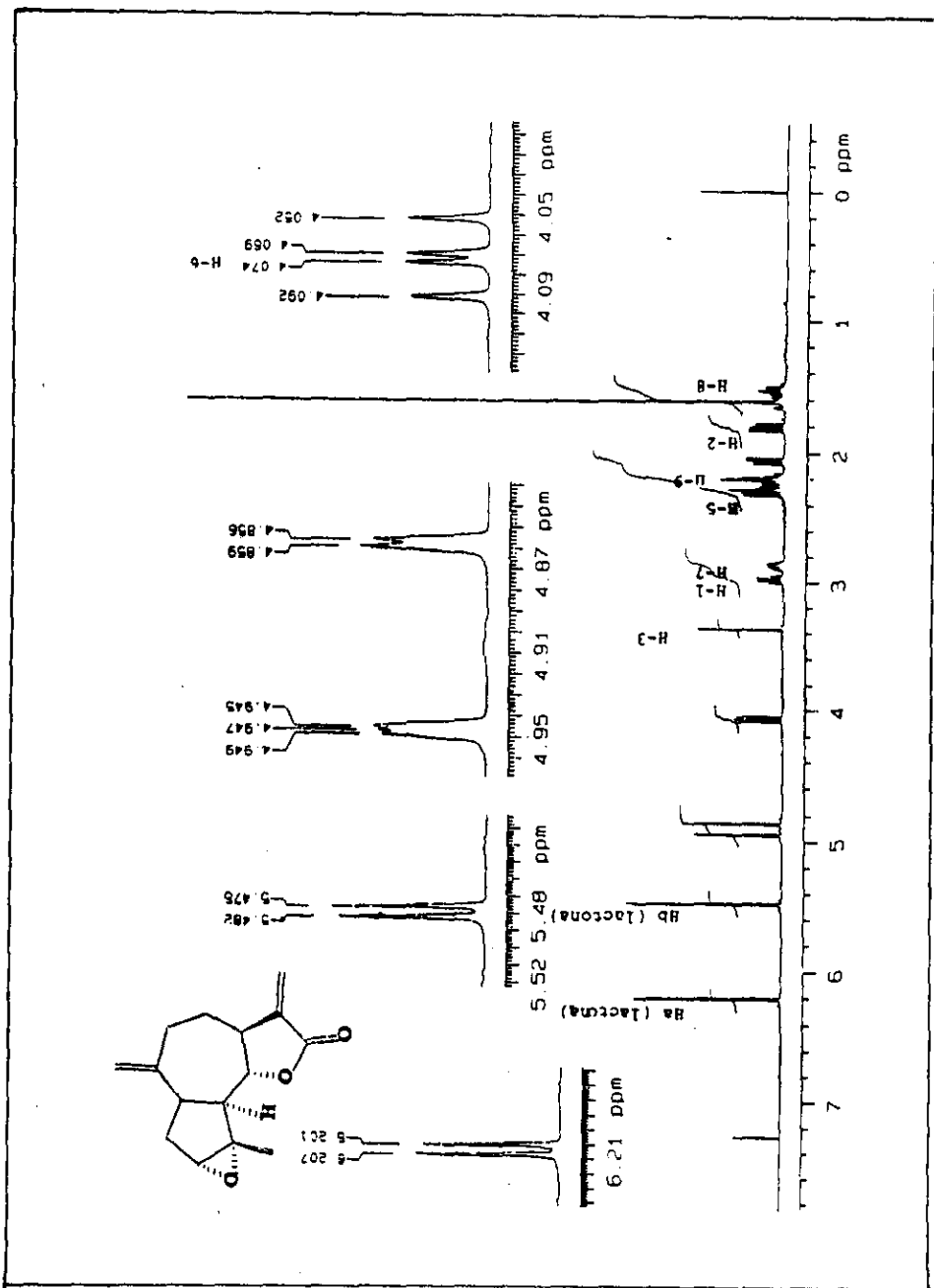
Las demás sustancias obtenidas se encuentran en proceso de purificación y caracterización. Además de estos compuestos, se obtuvo mediante transformación química la 3', 4', 6, 7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (IV), la cual había sido previamente aislada de esta especie, como metabolito secundario.

Se determinó la concentración letal media de los extractos hexánico, diclorometánico y etanólico de las partes aéreas de *A. ludoviciana ssp. mexicana*, colectada en Milpa Alta, D.F. y San Rafael, Tlalmanalco, Edo. de México; así como de *Artemisia absinthium*. Los extractos más tóxicos fueron para cada especie: el extracto diclorometánico de *Artemisia absinthium*, con CL_{50} de 76.4734 mg/ml; para *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (San Rafael), el extracto diclorometánico, con CL_{50} de 264.3724 mg/ml; y para *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana* (Milpa Alta), el extracto hexánico con una concentración letal media de 225.7676 mg/ml. La realización del ensayo de toxicidad para las sustancias puras obtenidas no pudo llevarse a cabo debido a los bajos rendimientos de los metabolitos obtenidos.

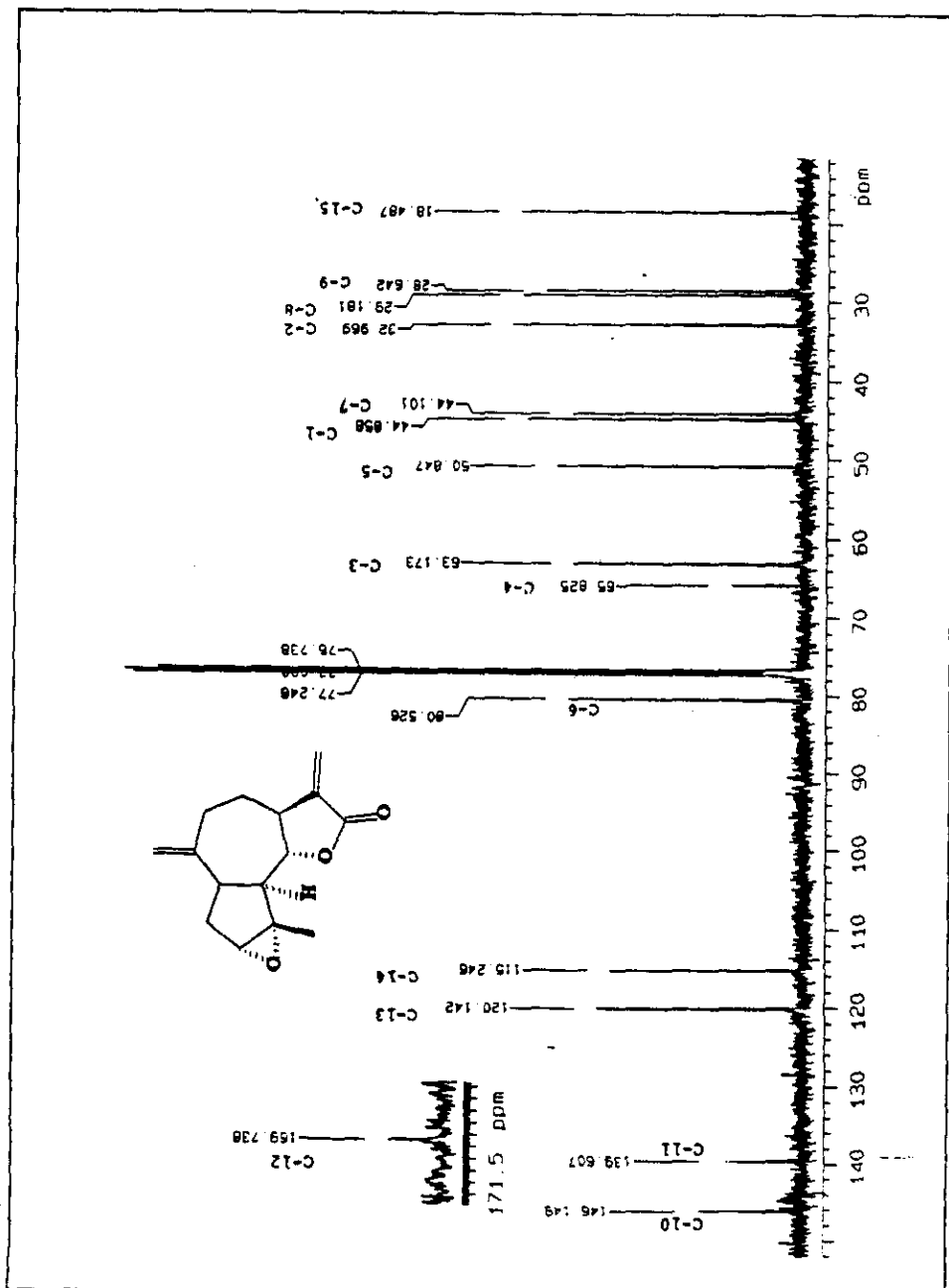
XI. Espectros de las sustancias



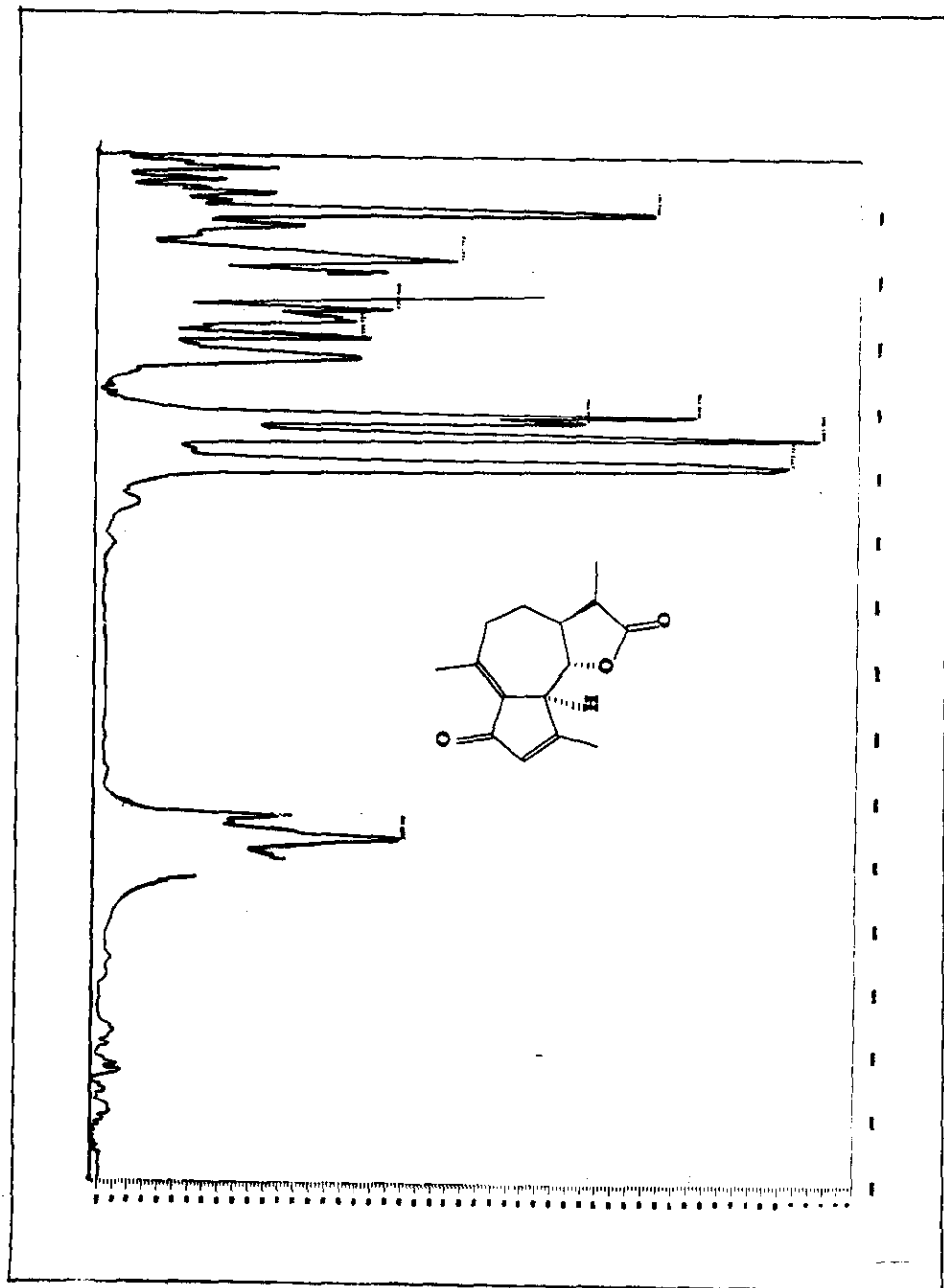
Espectro 1. IR (CHCl₃) de la Estafiatina.



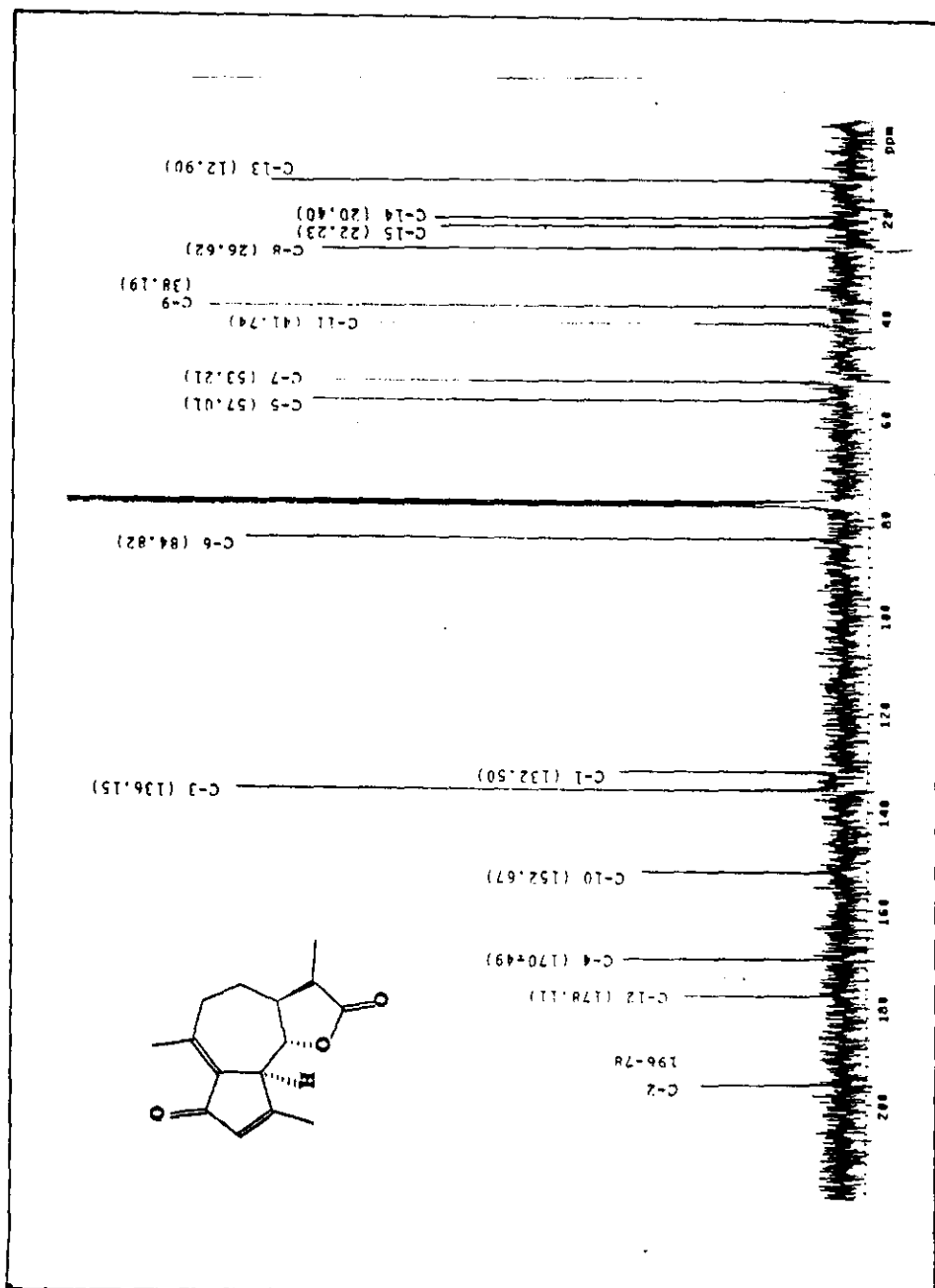
Espectro 2. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) de la Estafiatina.



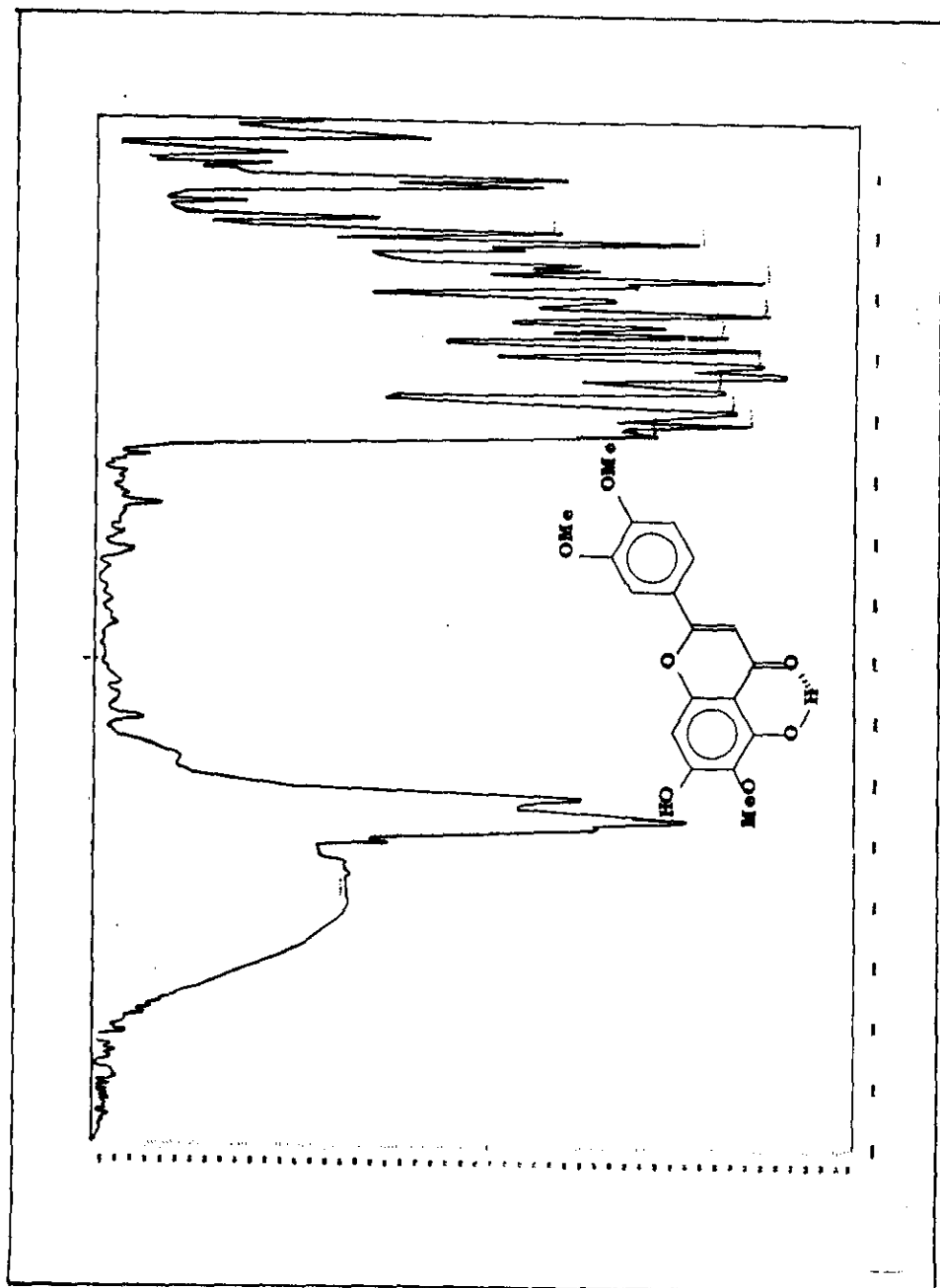
Espectro 3. RMN- 13C (125 MHz, CDCl₃) de la Estafiatina.



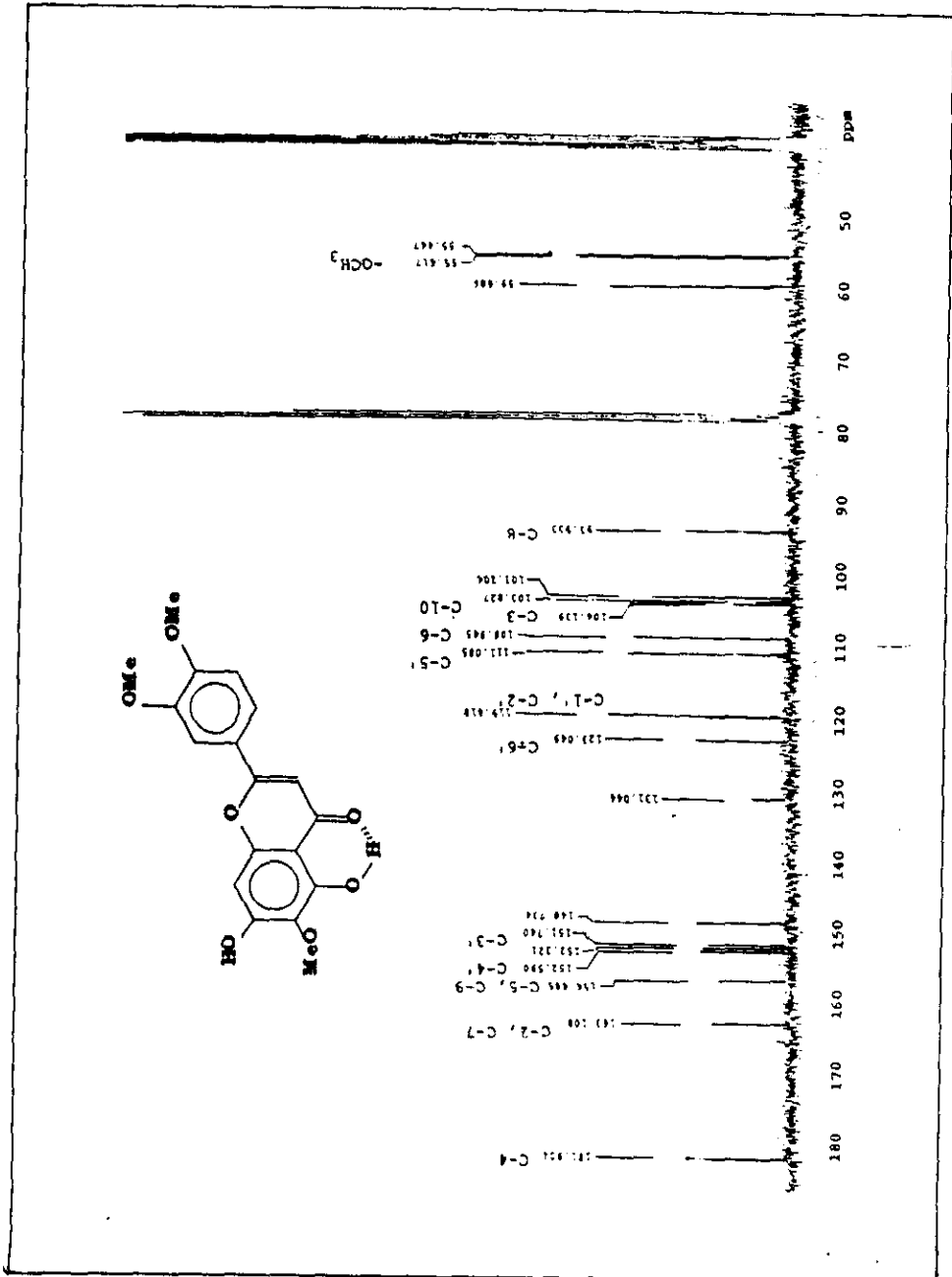
Espectro 4. IR (CHCl₃) de la Achillina.



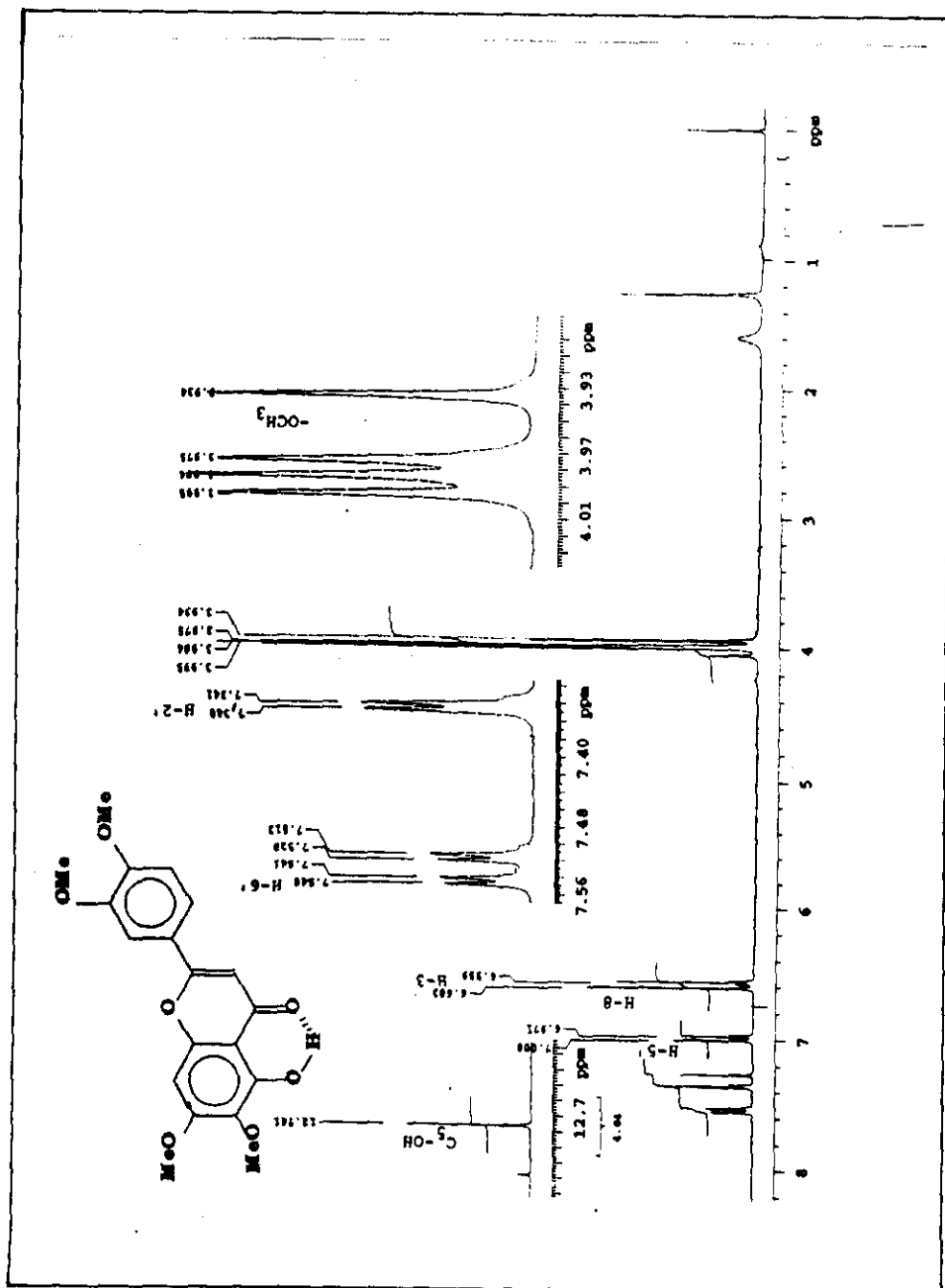
Espectro 6. RMN- ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la Achillinina.



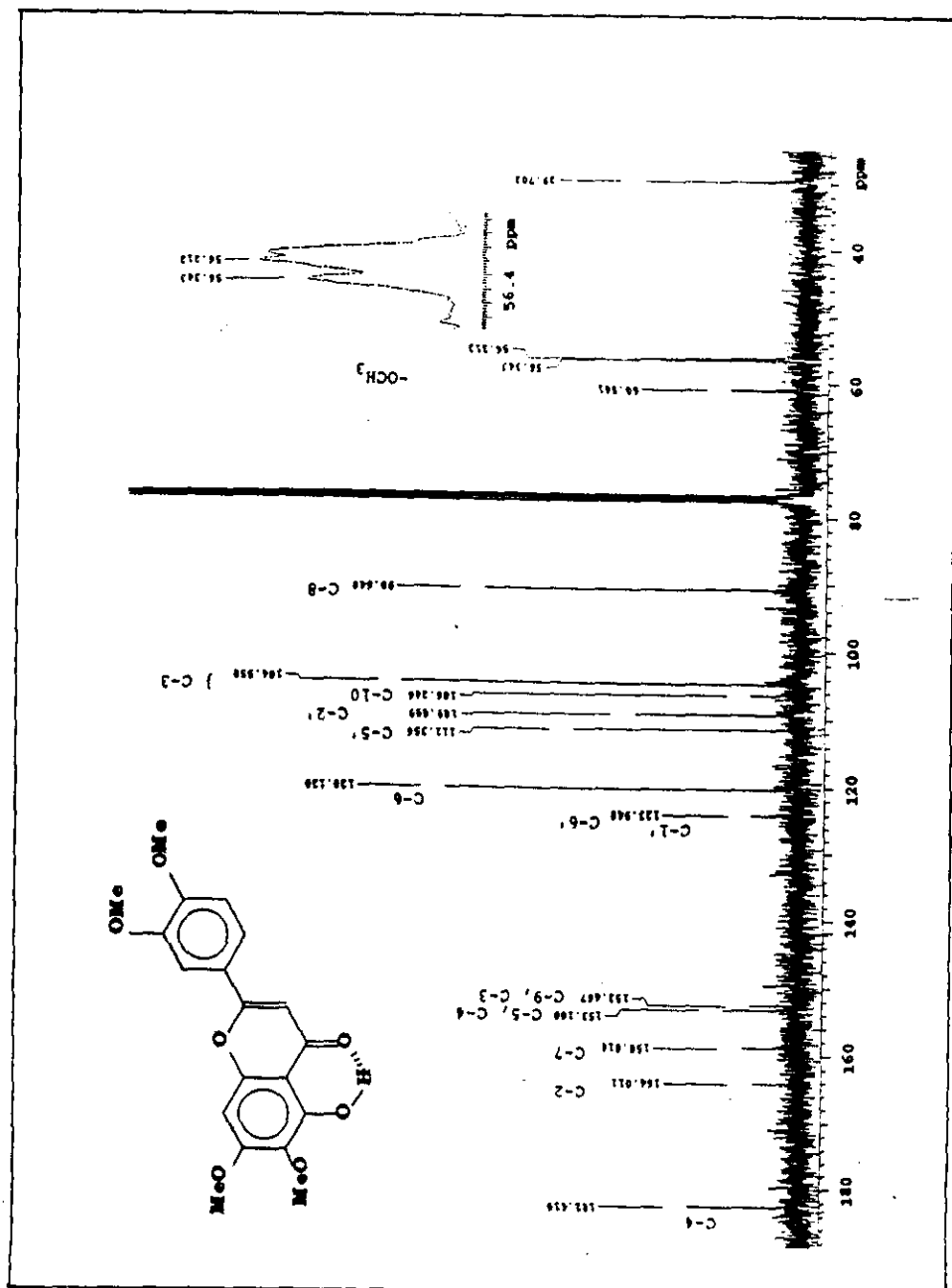
Espectro 7. IR (Nujol) de la Eupatiliina.



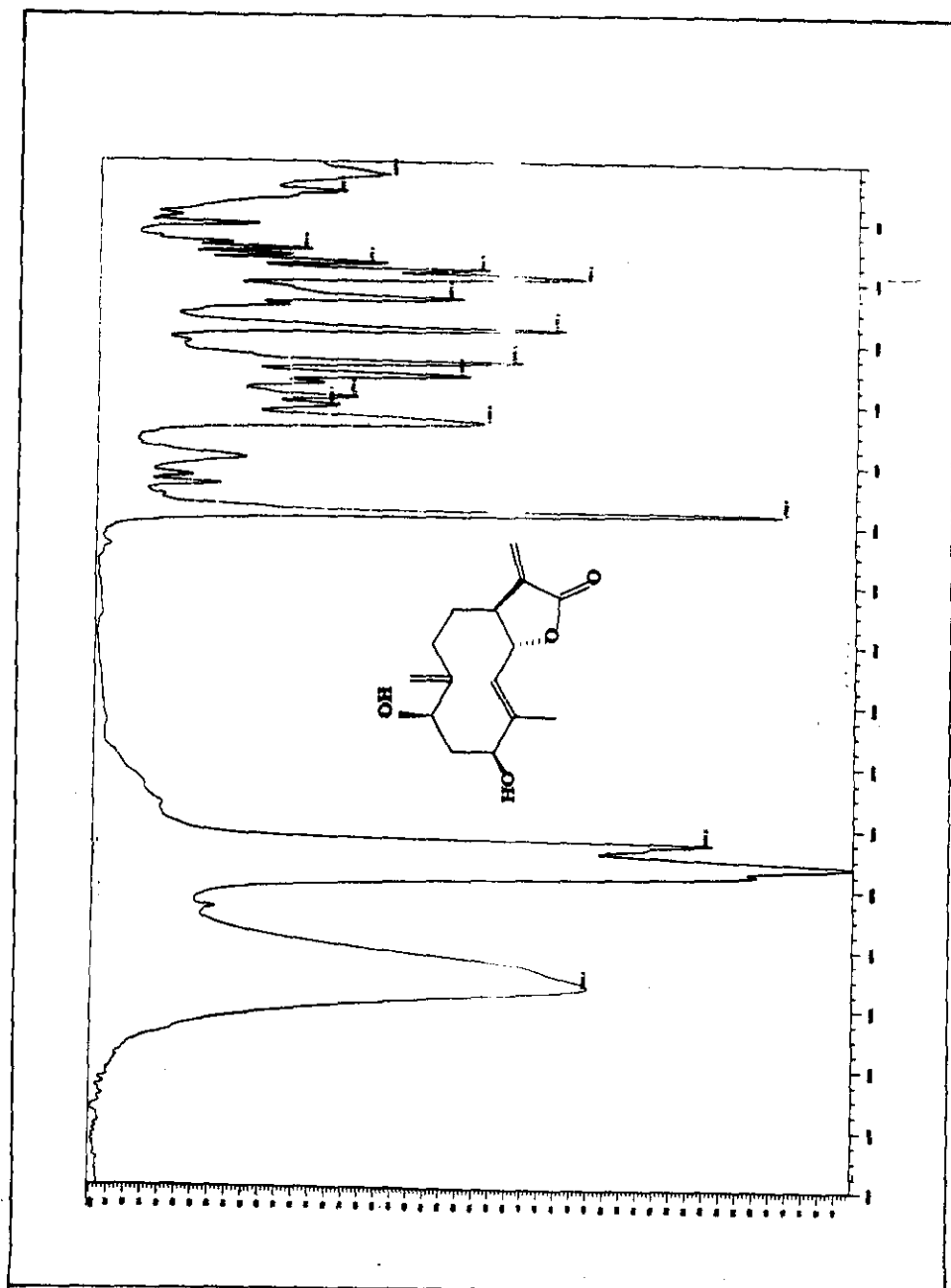
Espectro 9. RMN - 13C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO + TMS) de la Eupatilina.



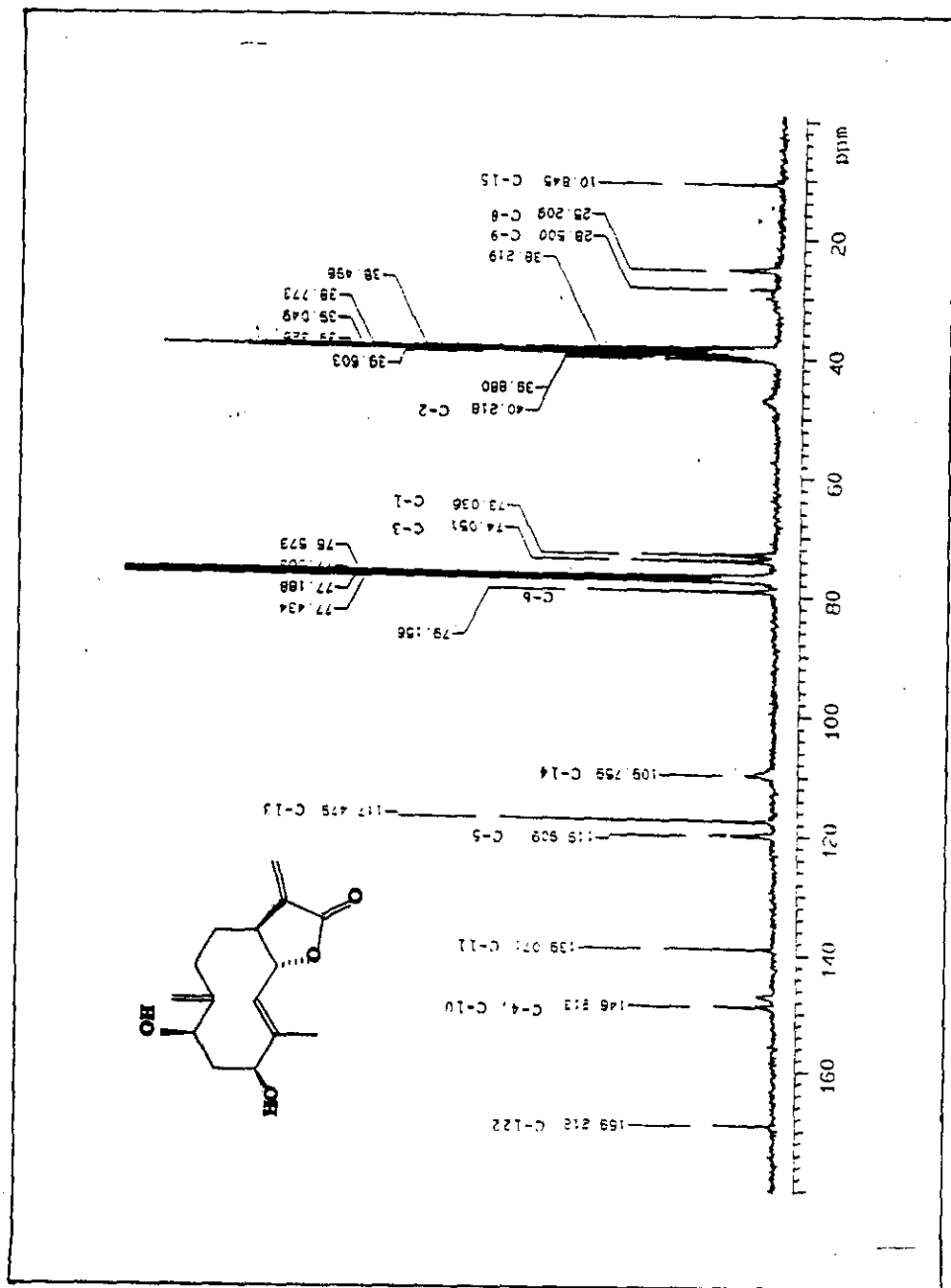
Espectro 10. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de la 3', 4', 6, 7.- Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona.



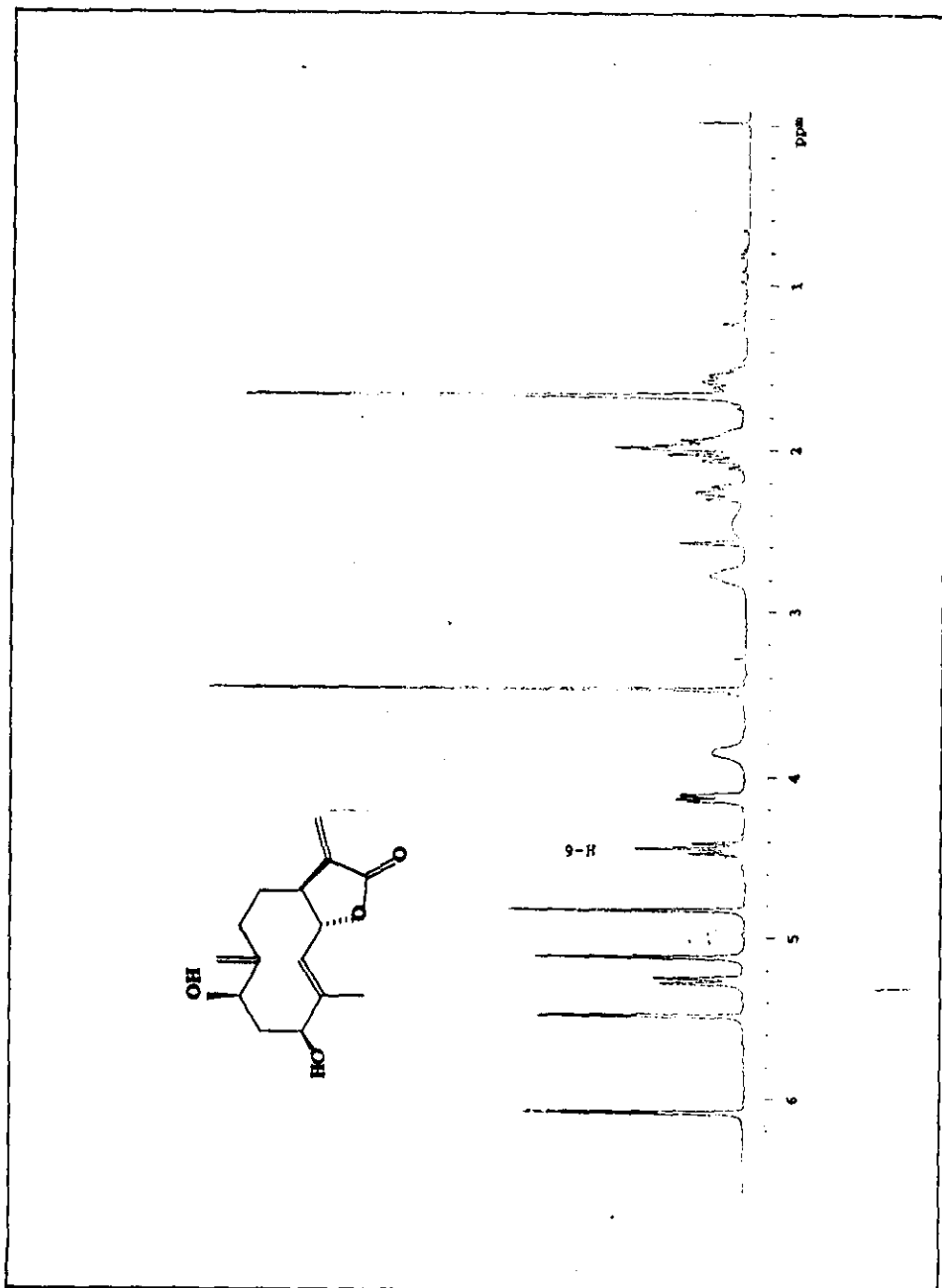
Espectro 11. RMN- 13C (CDCl₃ + DMSO + TMS) de la 3', 4', 6, 7- Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona.



Espectro 12. IR (CHCl₃) de la Ridentina.



Espectro 14. RMN- 13C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO) de la Ridentina.



Espectro 15. RMN- ^1H (D_2O) de la Ridentina.

1. **Hostettmann, K.**, Wolfender J. L., Rodriguez, S. (1997) Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts, *Planta Medica* **63**; 2-10.
2. **Harborne, J.B.** (1984) *Phytochemical methods*, 2nd. ed., Chapman and Hall, New York, 1-32.
3. **Pine, S.** (1988) *Química orgánica*, 4a. ed., Ed. McGraw-Hill, México, 165.
4. **Morris, G.A.** (1986) Modern NMR techniques for structure elucidation, *Magnetic Resonance in Chemistry* **24**; 371-403.
5. **Akitt, J.W.** (1992) *NMR and Chemistry*, 3rd. ed., Chapman & Hall, London, 207-225.
6. **Martin, G.**, Zektzer, A. (1988) *Two-Dimensional NMR methods for establishing molecular connectivity*, VCH Publishers, New York, 267, 305.
7. **Marco, J.A.**, Barbera, O. (1990) Natural products from the genus *Artemisia* L., *Studies in Natural Products Chemistry*, V. VII, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 201-264.
8. **Hegnauer, R.** (1964) *Chemotaxonomie der pflanzen*, V. III, Birkhäuser Verlag Basel, Stuttgart, 448-449.
9. **Bruneton, J.** (1991) *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 233.

10. **Miller**, L. (1973) *Phytochemistry*, V. II, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 254-255.
11. **Steelink**, C. (1966) Spitzer, J., Sesquiterpene lactones in chemotaxonomy, *Phytochemistry* 5; 357-365.
12. **Hegnauer**, R., *Chemotaxonomie der pflanzen...*, 447-544.
13. **Sánchez**, O. (1974) *La flora del Valle de México*, 2a. ed., Ed. Herrero, México, 432.
14. **Geissman**, T.A. (1970) Irwin, M.A., Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*, *Pure and Applied Chemistry* 21; 67-180.
15. **Evans**, W. (1991) *Farmacognosia*, 13a. ed., Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, 177-178, 239-241.
16. **Kelsey**, R., Shafizadeh, F. (1979) Sesquiterpen lactones and systematics of the genus *Artemisia*, *Phytochemistry* 18; 1591-1611.
17. **Rodríguez**, E., Towers, G.H.N., Mitchell, J.C. (1976) Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry* 15; 1573-1580.
18. **Picman**, A. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones, *Biochemical Systematics and Ecology* 14; 255-281.
19. **Bruneton**, J., *Elementos de fitoquímica...*, 286-290.

20. **Klayman**, D. (1984) Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States, *Journal of Natural Products* 47; 715-717.
21. **Jeremic**, D. (1973) A new type of sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia annua* L. Arteannuin B, *Tetrahedron Letters*, 3039-3042.
22. **Roth**, R. (1989) The isolation of sesquiterpenes from *Artemisia annua*, *Journal of Chemical Education* 66; 349-350.
23. **Mata**, R., Delgado, G., Romo de Vivar, A. (1985) Sesquiterpene lactones of *Artemisia klotzchiana*, *Phytochemistry* 24; 1515-1519.
24. **Romo**, J., Romo de Vivar, A., Treviño, R., Joseph-Nathan, P., Díaz, E. (1970) Constituents of *Artemisia* and *Chrysanthemum* species -the structures of Chrysartemins A and B, *Phytochemistry* 9; 1615-1621.
25. **Geissman**, T. A. (1970) Sesquiterpene lactones of *Artemisia* - *A. verlotorum* and *A. vulgaris*, *Phytochemistry* 9; 2377-2381.
26. **Geissman**, T. A., Lee, K. H. (1971) Sesquiterpene lactones of *Artemisia*: Artemorin and dehydroartemorin (anhydroverlotorin), *Phytochemistry* 10; 419-420.
27. **Duke**, J. (1988) *CRC Handbook of medicinal herbs*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 66-67.
28. **Ruiz**, A. (1991) *Análisis fitoquímico de Artemisia ludoviciana en busca de sustancias con propiedades antimaláricas*, Tesis de Maestría (Química Orgánica), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

- 29. Linares, E., Flores, B., Bye, R.** (1996) *Selección de Plantas Medicinales de México*, Ed. Limusa, México, 42-43.
- 30. Rzedowski, J., Rzedowski, G.** (1985) *Flora fanerogámica del Valle de México*, V. II., Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, 591-591.
- 31. Ortiz, B.** (1986) Aztec sources of some mexican folk medicine, *Folk Medicine. The Art and the Science*, (Steiner, R.), American Chemical Society, Washington, D.C., 1-22.
- 32. Jakupovic, J., Tan, R.X., Bohlmann, F., Boldt, P.E., Jia, Z.J.** (1991) Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*, *Phytochemistry* 30; 1573-1577.
- 33. Balderas, J.L.** (1996) Estudio químico de *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (FES Zaragoza), México.
- 34. Lee, K.H. and Geissman, T.A.** (1970) Sesquiterpene lactones of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana ssp. mexicana*, *Phytochemistry* 9; 403-408.
- 35. Ruiz-Cancino A., Cano, A.E. and Delgado, G.** (1993) Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*, *Phytochemistry* 33; 1113-1115.
- 36. Picman, A.** (1993) Inhibition of fungal growth by selected sesquiterpene lactones, *Biochemical Systematics and Ecology* 21; 307-314.

- 37. Hall, H.** (1978) Antitumor agents XXX: Evaluation of α -metilen- γ -lactone-containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67; 1235-1239.
- 38. Kupchan, S., Eakin, M.A., Thomas, A.M.** (1971) Tumor inhibitors. 69. Structure-citotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones, *Journal of Medicinal Chemistry* 14; 1147-1152.
- 39. Lee, K. H., Ibuka, T., Wu, R., Geissman, T.A.** (1977) Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds, *Phytochemistry* 16; 1177-1187.
- 40. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L.** (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica* 45; 31-34.
- 41. Coll, J.C., and Bowdu, B.F.** (1986) The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures, *Journal of Natural Products* 49; 934-936.
- 42. Torgett, N.M., Kilcoyne, J.P. and Green, B.** (1971) Vacuum liquid chromatography: An alternative to common chromatographic methods, *Journal of Organic Chemistry* 44; 4962-4964.
- 43. Clark, S.W., Kahn, M. and Mitra, A.** (1978) Rapid cromatography technique for preparative separations with moderate resolution, *Journal of Organic Chemistry* 43; 2923-2925.

44. **Barahona**, M.V., Cano, M. y Sánchez-Fortún, S. (1994) Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*, *Toxicología* 11; 92-95.
45. **Díaz**, E. y Joseph-Nathan, P. (1993) *Elementos de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno*, 2a. ed., Grupo Editorial Iberoamérica, México, 5-10.
46. **Wade**, L.G. (1993) *Química Orgánica*, 2a. ed., Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, México, 527-599.
47. **Romo de Vivar**, A. (1977) Sesquiterpene lactones in Compositae. Biogenesis and taxonomic implications, *Revista Latinoamericana de Química* 8; 63-74.
48. **Ohno**, N., Gershenzon, J., Roane C. and Mabry, T. (1980) 11,13-Dehydrodesacetylmaticarin and other sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana* and the identity of Artecamin and Chrysartemin B, *Phytochemistry* 19; 103-106.
49. **Wherli**, F.W. (1979) *Progress in the chemistry of organic natural products* 36; 44.
50. **Da Silva**, A.J.R., García, M., Baker, P.M. and Robi, J.A. (1981) ^{13}C -NMR spectra of natural products, *Organic Magnetic Resonance* 16; 230.
51. **Domínguez**, X. (1988) *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Ed. Limusa; 84.

- 52. Kork**, H., Funk, W., Fischer, W. and Wimmer, H. (1999) *Thin Layer Chromatography- reagents and detection methods*, Vol. 1a, Ed. VCH, Nueva York.
- 53. Liu**, Yong- Long., Newman, P., Timmermann, B. and Mabry, T. (1990) Techniques for flavonoid analysis. In *Phytochemistry Methods Frontiers* (Dominguez, X.) *Revista Latinoamericana de Química*; 90- 111.
- 54. Markham** K. R. (1982) *Techniques for Flavonoid Identification*, Academic Press, London; 45.
- 55. Timmermann**, B., Mues, R., Mabry, T.J. and Powell, M. (1979) 6-metoxylavonoids from *Brickellia lacinata* (Compositae), *Phytochemistry* 18; 1855.
- 56. Ternai**, B. and Markham K.R. (1976) Carbon- 13 NMR studies of flavonoids -I, flavones and flavonols, *Tetrahedron* 32; 565-569.
- 57. Voelter**, W. y Breitmaier, E. (1990) *Carbon- 13 NMR Spectroscopy*, 3rd. ed., VCH Publishers, New York, 450-453.
- 58. Wagner** H., Flores, G. und Geissman T.A. (1972) Eupatilin aus *Tanacetum vulgare*, *Phytochemistry* 11; 451.
- 59. Liu**, Y. and Mabry, T.J. (1981) Flavonoids from *Artemisia frigida*, *Phytochemistry* 20; 1389-1395.
- 60. Martínez**, V., Barbera, O., Sánchez-Parareda, J., and Marco, J.A. (1987) Phenolic and acetylenic metabolites from *A. assoana*, *Phytochemistry* 26 2619-2624.

61. Irwin, M.A., Lee, K.H., Simpson, R.F. and Geissman, T.A. (1969) Sesquiterpen lactone of *Artemisia*: Ridentin, *Phytochemistry* 8; 2009.

62. Irwin, M.A. and Geissman, T.A. (1973) Ridentin B: A eudesmanolide from *Artemisia tripartita* ssp. *rupicola*, *Phytochemistry* 12, 871.