



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN,  
IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA DE LAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS  
MAYORITARIAS DE  
*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I Ó L O G O**

Presenta:

**Francisco Enrique Zavala Navarrete**

Director de tesis:

Dr. Arturo Eduardo Cano Flores



Ciudad de México

Junio 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **ZAVALA NAVARRETE FRANCISCO ENRIQUE**, con número de cuenta **308278592**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **04 de junio de 2019** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

**VOCAL** Dr. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

**SECRETARIO** Dra. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ

**SUPLENTE** Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

Hortensia Rosas Acevedo

**SUPLENTE** M. en Biotec. JOSÉ RIGOBERTO RAMOS VELÁZQUEZ

El título de la tesis que presenta es: **Aislamiento, caracterización, identificación y evaluación de la actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas mayoritarias de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 07 de mayo de 2019

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**  
DIRECTOR  
ZARAGOZA  
DIRECCIÓN

VG. BO.  
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ  
JEFE DE CARRERA

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Al Personal Técnico Académico del Instituto de Química, UNAM.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química, UNAM.

El presente trabajo fue presentado en los congresos:

53° Congreso Mexicano de Química y el 37° Congreso Nacional de  
Educación Química, CDMX, México. 2018.

15° Reunión internacional de investigación en productos naturales. San Luis  
Potosí, S.L.P. 2019

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Sandra Navarrete Cuevas y Ricardo Zavala Delgadillo, por su infinito amor y su gran enseñanza. Gracias por apoyarme en todo momento y ser mi guía. A ustedes dedico cada logro en mi vida.

A mi hermana Nadia Zavala Navarrete, por ser siempre aquella persona que me motiva a ser mejor cada día y que siempre ha creído en mí. Gracias por soportarme en los momentos de más estrés.

A mis abuelas Carmen Cuevas García y Alicia Delgadillo Ortigoza, por compartir su sabiduría y cariño, durante mi desarrollo académico.

A toda mi familia por siempre mostrarme su apoyo y extender su mano en momentos difíciles.

Al Dr. Arturo Eduardo Cano Flores, por ser una guía en este proceso de crecimiento académico y personal.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por siempre hacer del trabajo algo tan entretenido y apoyarnos mutuamente en cada uno de nuestros proyectos. En especial a Javier por su aporte al desarrollo de esta tesis.

A mis amigos Jesús, David, Andrea y Lorena, por compartir todo el estrés de un examen, así como la felicidad al acreditar una materia, este proceso hubiera sido más complicado sin ustedes.

A Amanda Chávez Mosco, por acompañarme durante toda la carrera, por siempre apoyarme en los momentos más complicados, por sus regaños cuando me salía del camino y por sus palabras de aliento en mis momentos de duda.

A mis grandes amigos de Tlahuac, por distraerme en mis momentos de estrés y siempre estar ahí cuando los necesite.

## **A LA MEMORIA**

De mi abuela Constantina García López, por darme todo su cariño y amor hasta el final de sus días.

De mi abuelo Francisco Zavala Avalos, por inculcarme el amor por el conocimiento y el gusto por los museos.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
i. RESUMEN.....	1
ii. INTRODUCCIÓN.....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Metabolitos Secundarios.....	4
1.2. Terpenos.....	6
1.3. Sesquiterpenos.....	7
1.4. Lactonas Sesquiterpénicas.....	8
1.4.1. Otros esqueletos.....	10
1.4.2. Sesquiterpenoides diméricos.....	11
1.4.3. Grupo $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona.....	12
1.4.4. Actividades biológicas de las Lactonas Sesquiterpénicas.....	13
1.5. Importancia de las lactonas sesquiterpénicas.....	15
1.5.1. Importancia para las plantas.....	15
1.5.2. Importancia para el hombre.....	16
1.5.3. Otros usos importantes de las lactonas sesquiterpénicas.....	20
1.6. Generalidades del género <i>Artemisia</i> L. ....	20
1.6.1. Distribución y morfología.....	20
1.6.2. Características fitoquímicas.....	21
1.7. Generalidades de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> .....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	25
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
6. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	26
6.1. Material y equipo.....	26
6.2. Preparación de los extractos “ <i>crudos</i> ” de las partes aéreas de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> .....	26
6.3. Actividad antifúngica de los diferentes extractos “ <i>crudos</i> ” de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> .....	27

6.3.1.	Resiembra de los hongos.....	27
6.3.2.	Preparación de las soluciones de los diferentes extractos.....	28
6.3.3.	Preparación del medio de cultivo.....	28
6.3.4.	Determinación de la actividad antifúngica de los diferentes extractos “ <i>crudos</i> ” de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> .....	28
6.4.	Separación cromatográfica del extracto “ <i>crudo</i> ” con AcOEt .....	29
6.5.	Actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “ <i>crudo</i> ” con AcOEt	29
6.5.1.	Resiembra de los hongos.....	30
6.5.2.	Preparación de las soluciones.....	30
6.5.3.	Preparación del medio de cultivo .....	30
6.5.4.	Determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “ <i>crudo</i> ” con AcOEt .....	30
6.6.	Separación y purificación de las lactonas mayoritarias presentes en el extracto “ <i>crudo</i> ” con AcOEt .....	31
6.7.	Identificación de las lactonas sesquiterpénicas en el extracto con AcOEt de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i> subsp <i>mexicana</i> . .....	33
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	38
7.1.	Determinación de la actividad antifúngica de los diferentes extractos “ <i>crudos</i> ” de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> .....	38
7.2.	Determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “ <i>crudo</i> ” con AcOEt .....	43
7.3.	Identificación de la estafiatina (13).....	47
7.4.	Identificación de la achillina (8).....	49
7.5.	Identificación de la ridentina (4) .....	51
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	SUGERENCIAS .....	56
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
11.	ANEXOS (espectro).....	62
11.1.	Espectro 1. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz, TMS) de la estafiatina (13). .....	63
11.2.	Espectro 2. RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz, TMS) de la estafiatina (13). .....	64
11.3.	Espectro 3. RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz, TMS) de la achillina (8).....	65
11.4.	Espectro 4. RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 120 MHz, TMS) de la achillina (8).....	66

11.5. Espectro 5. RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ , 400 MHz, TMS) de la ridentina (4).....	67
11.6. Espectro 6. RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 120 MHz, TMS) de la ridentina (4). .....	68
11.7. Espectro 7. RMN $^{13}\text{C}$ (experimento DEPT) de la ridentina (4). .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AACS	Sintasa de la acetil coenzima A.
AcOEt	Acetato de etilo.
APD	Agar papa dextrosa.
AST	Agar de soya tripticaseina.
<i>c</i>	Cuarteto.
CC-Flash	Cromatografía en columna flash.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CCP	Cromatografía en placa preparativa.
CCV	Cromatografía en columna a presión reducida.
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado.
CDK	Quinasas dependientes de ciclina.
COS	Sintasa de la (+)-custonólida.
<i>d</i>	Doble.
<i>dd</i>	Doble de doble.
<i>ddd</i>	Doble de doble de doble.
<i>dddd</i>	Doble de doble de doble de doble.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DOXP	4-fosfato-deoxi-xilulosa.
EtOH	Etanol.
GAA	Ácido germacránico A.
GAO	Oxidasa del (+)-germacrano A.
GAS	Sintasa del (+)-germacrano A.
GSH	Glutación reducido intracelular.
HAc	Ácido acético
HMGS	Sintasa de la hidroximetilglutaril-CoA.
HMGR	Reductasa de la hidroximetilglutaril-CoA.
<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	Éter Isopropílico
IDP	Isomerasa del difosfato de isopentenilo.
<i>int. rel.</i>	Intensidad relativa.
IR	Infrarrojo.
J	Constante de acoplamiento (Hz).

LsS	Lactonas sesquiterpénicas.
<i>m</i>	Multiplete.
M <sup>+</sup>	Ion molecular.
Me <sub>2</sub> CO	Acetona.
MeOH	Metanol.
MHz	Mega Hertz.
MS	Metabolitos secundarios.
MVK	Kinasa del Mevalonato.
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
PDMA	Pirofosfato de dimetilalilo.
PMD	Dicarboxilasa del difosfato mevalonato.
PMK	Kinasa del fosfomevalonato.
PPF	Pirofosfato de farnesilo.
PPFS	Sintasa del pirofosfato de farnesilo.
PPG	Pirofosfato de geranilo.
PPGG	Pirofosfato de geranilgeranilo.
PPI	Pirofosfato de isopentenilo.
RCT	Receptores de linfocitos T.
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono.
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
<i>s</i>	Singulete.
<i>sa</i>	Singulete amplio.
TMS	Tetrametilsilano.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
αMγL	α-metilen-γ-lactona.
δ	Desplazamiento químico.
δ <sub>H</sub>	Desplazamiento químico de RMN- <sup>1</sup> H.
δ <sub>C</sub>	Desplazamiento químico en RMN- <sup>13</sup> C.
[α] <sup>25</sup> <sub>D</sub>	Rotación óptica.
Ω	Grados de instauración.

## i. RESUMEN

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* conocida como “estafiate” se caracteriza por tener una gran diversidad de metabolitos secundarios, dentro de los cuales destacan las lactonas sesquiterpénicas (LsS), compuestos que presentan como característica primordial al grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona ( $\alpha$ M $\gamma$ L); el cual es responsable de su amplia gama de actividades biológicas. Las LsS cumplen principalmente con funciones de protección para la planta, contra herbívoros y patógenos. La importancia de las LsS para el hombre estriba en su actividad antifúngica y antitumoral.

En el presente estudio se describe la evaluación antifúngica de los extractos “*crudos*” con *n*-hexano, AcOEt y MeOH frente a tres hongos filamentosos —*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*— en una concentración de 40 mg/mL. Donde los extractos “*crudos*” con *n*-hexano y AcOEt no mostraron inhibir a *A. niger* y *Trichoderma sp.*, sin embargo, inhibieron totalmente a *Penicillium sp.*, mientras el extracto con MeOH no inhibió a ninguno de los tres hongos ensayados.

Para ello, se realizó una separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt, utilizando mezclas de *n*-hex/AcOEt de polaridad creciente, obteniendo seis fracciones. A dichas fracciones se les realizó una evaluación antifúngica frente a tres hongos filamentosos —*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*— en una concentración de 40 mg/mL, las cuales no mostraron inhibición de *A. niger* y *Trichoderma sp.*, caso contrario de *Penicillium sp.* el cual se logró inhibir en todas las fracciones durante las 72 h.

Finalmente, de la separación cromatográfica de las fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt se obtuvo la purificación de tres lactonas sesquiterpénicas [achillina (**8**), estafiatina (**13**) y ridentina (**4**)], el  $\beta$ -sitosterol y un compuesto que se encuentra en proceso de caracterización. El presente estudio está encaminado a valorar al estafiate como fuente de LsS para su posterior evaluación antitumoral, antifúngica y como materia prima en su transformación química y biológica con hongos filamentosos.

## ii. INTRODUCCIÓN

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (estafiate) es una especie vegetal, se encuentra distribuida en la zona central de la República Mexicana. Es comercializada de manera importante en muchos mercados de plantas medicinales, debido a su elevado uso dentro de la medicina tradicional mexicana. Desde la antigüedad se le han atribuido diversas propiedades curativas y terapéuticas. Los aztecas utilizaban esta planta para tratar demencia, males debidos a opresión del corazón, “escupir” sangre, fiebre y exceso de flema. Además, de emplearse para la epilepsia, gota, parálisis, el entumecimiento, el empacho, cólicos y dolores por el frío. Dichos síntomas siguieron siendo tratados durante la época colonial con esta planta. En la actualidad, se continúa utilizando principalmente para tratar problemas concernientes al aparato digestivo. Sin embargo, no hay estudios biológicos que sustenten el uso del estafiate dentro de la medicina tradicional mexicana.

Aunado a lo anterior, uno de los problemas de salud más importante en la sociedad moderna es el cáncer, este consiste en la proliferación descontrolada de células anormales. En una célula cancerosa, los niveles de glutatión reducido son más altas que en las células normales. Por lo tanto, se requiere de fármacos que puedan inducir apoptosis de células cancerosas al disminuir los niveles de glutatión reducido intracelular, ya que este es un regulador del equilibrio redox, debido a que se asocia a una menor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Un amplio grupo de productos naturales que han llamado la atención actualmente son las lactonas sesquiterpénicas (LsS) —metabolitos secundarios— como principales componentes de las partes aéreas de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*, las cuales, en general tienen una amplia gama de actividades biológicas como: antimicrobiana, fitoalexinas, antimalárica, antineoplásica, citotóxica, antifúngica, antitumoral, entre otras; cabe señalar que la actividad biológica de las LsS está relacionada con su esqueleto base y su funcionalidad química.

Por ello, el presente estudio tiene como objetivo realizar el aislamiento, caracterización, identificación y evaluación de la actividad biológica de las LsS mayoritarias de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*. Para ponderar su utilidad como fuente principal de LsS y su posterior evaluación antitumoral, antifúngica y como materia prima en su transformación química y biológica con hongos filamentosos.

Con la finalidad a largo plazo de poder realizar correlaciones sobre su estructura química y actividad biológica; así como, mejorar sus rendimientos en la planta, o bien mediante su síntesis química. Por tanto, en un futuro las LsS podrán ser objeto de diversos estudios donde confluyan la biotecnología, la química médica, la biología, la ecología, la química de productos naturales, la ingeniería de enzimas, la ingeniería metabólica, entre otras.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Metabolitos Secundarios

Existen una serie de procesos que se le conoce como metabolismo, estos son llevados a cabo en las células vegetales y tienen como finalidad la obtención de energía y nutrientes necesarios para la supervivencia de las plantas, a través de la síntesis y degradación de moléculas orgánicas, dichos procesos conllevan a la formación de los metabolitos primarios, los cuales permiten a la planta realizar sus funciones básicas; mientras que los metabolitos secundarios (MS) son los encargados de las interacciones de la planta con su entorno y su origen está determinado por factores abióticos y bióticos [1].

Los MS son compuestos orgánicos que se encuentran en poca concentración en las plantas, tienen funciones ecológicas específicas, como proteger a la planta de animales herbívoros, dándole sabores amargos o haciéndolas venenosas para diferentes patógenos. También pueden jugar un gran papel en la reproducción atrayendo polinizadores por el olor o el color que le dan a las flores y frutos, entre otras funciones; como se muestra en la figura 1 [2, 3].

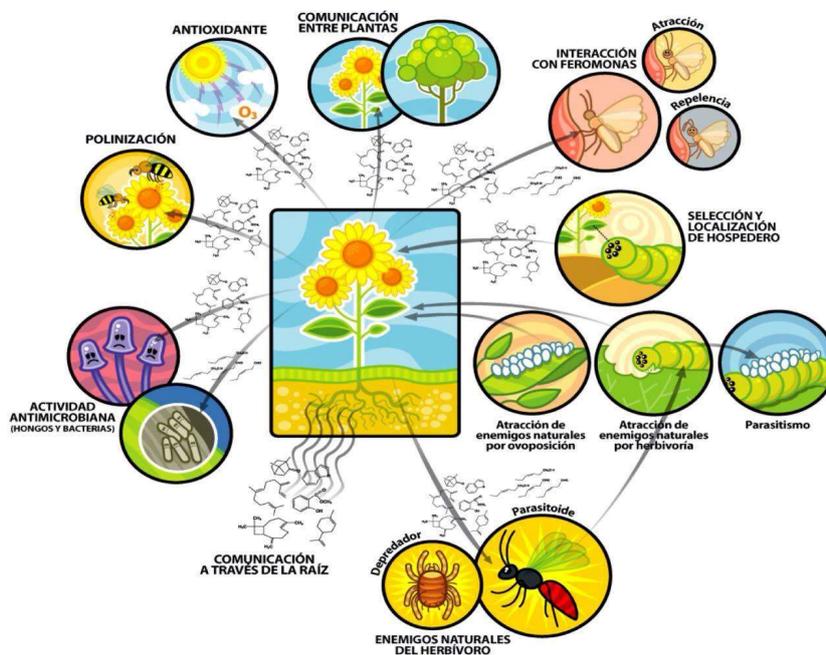


Figura 1. Principales funciones de los metabolitos secundarios (MS) en las plantas [3].

Los MS han tenido gran importancia en los últimos 200 años en la prevención y tratamiento de enfermedades. Estos compuestos presentan características moleculares similares a los fármacos puramente sintéticos y en comparación su obtención resulta más amigable con el medio ambiente. Estas propiedades les proporcionan un importante papel en el descubrimiento de nuevos fármacos [4].

Actualmente se han determinado alrededor de 20,000 estructuras de MS, estos se dividen en dos grupos principales: los que contienen nitrógeno y los que carecen de este. Los compuestos con nitrógeno están formados por alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas y glucosinolatos. El grupo de compuestos que conforman los no nitrogenados son: terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La diversidad de estructuras en un grupo específico de MS se debe a la modificación química de la estructura básica, por diferentes reacciones químicas como: hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y glucosilación. Gracias a esta variabilidad existe una diferencia en los MS que se encuentran en una población, de la misma especie y en los órganos de la planta, lo cual les da una ventaja adaptativa [5].

La presencia de estos compuestos depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta y la concentración varía como respuesta al estrés abiótico y biótico. Los procesos de síntesis y almacenamiento se dan en diferentes orgánulos de la célula vegetal; en el caso de algunos alcaloides y terpenos se da en los plástidos; mientras los esteroides y sesquiterpenos se generan en el retículo endoplásmico y en el citoplasma ver figura 2 [5, 6].

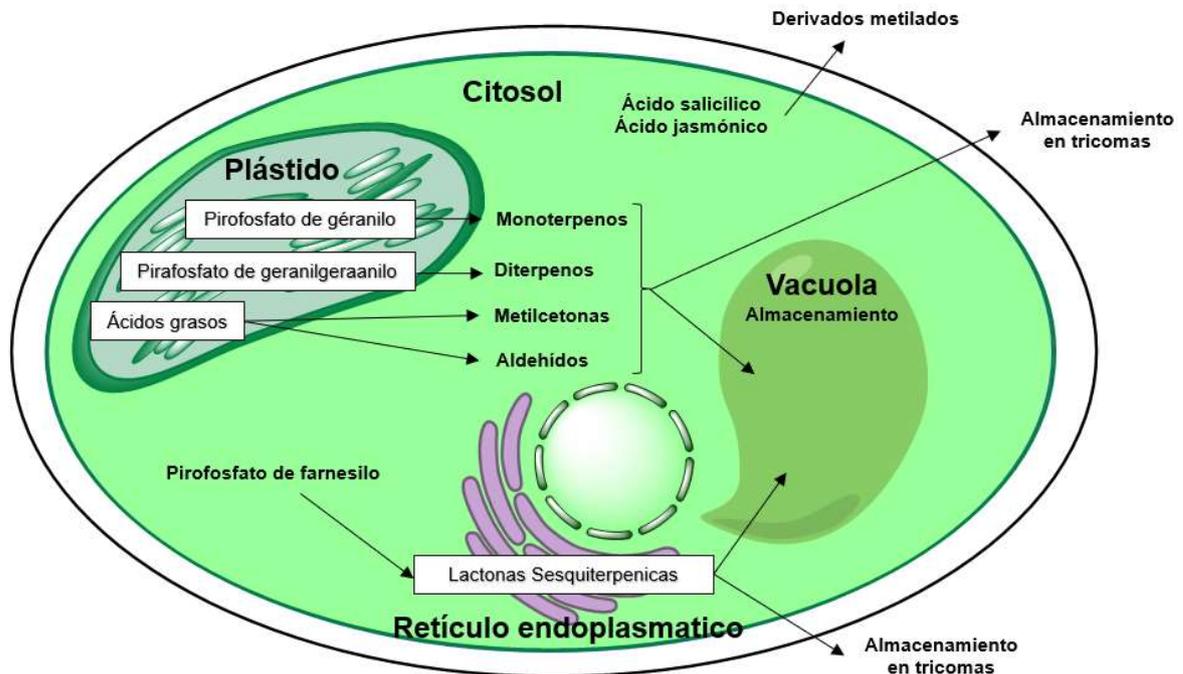


Figura 2. Biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios en una célula vegetal [6].

## 1.2. Terpenos

En la actualidad, se han aislado una gran cantidad de terpenos, los cuales se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno (5 C) que los conforman: monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C), estos representan alrededor de 400 familias estructurales distintas, tanto de plantas terrestres, como marinas, hepáticas y hongos [7]. Existen dos vías alternas para su biosíntesis, la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la ruta de la 4-fosfatodeoxi-xilulosa (DOXP), en los plástidos, ver figura 3 [5, 7-9].

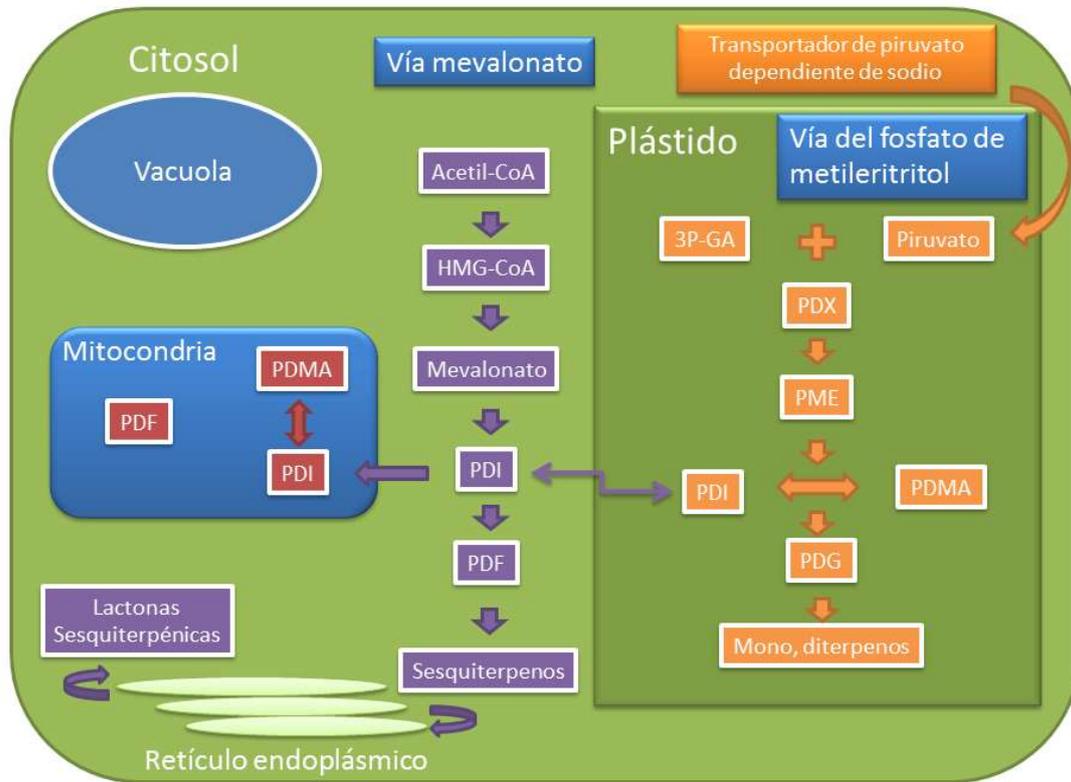


Figura 3. Rutas metabólicas secundarias relacionadas con la biosíntesis de los terpenos en diferentes orgánulos: vía mevalonato: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), IDP (Pirofosfato de Isopentenilo), PDF (Pirofosfato de Farnesilo), PDMA (Pirofosfato de Dimetilalilo). Vía del fosfato de metileritritol: 3P-GA (3-fosfato del Gliceraldehido), PDX (5-fosfato-1-deoxi-D-xilulosa), PME (Fosfato del Metileritritol), PDG (Pirofosfato de Geranilo) [9].

### 1.3. Sesquiterpenos

Dentro del grupo de los terpenos se ubican a los sesquiterpenos, estos son compuestos de 15 carbonos, lipofílicos e incoloros, son constituyentes de aceites esenciales de diversas plantas [8], su biosíntesis se origina de la vía del mevalonato, ver figura 4; la cual da lugar al pirofosfato de farnesilo (PPF), precursor inmediato de los sesquiterpenos. Debido a la longitud de esta cadena y a los dobles enlaces que posee, permiten que existan una gran cantidad de modos de ciclación y con ello una diversidad de estructuras: mono, bi y tricíclicas [10, 11].

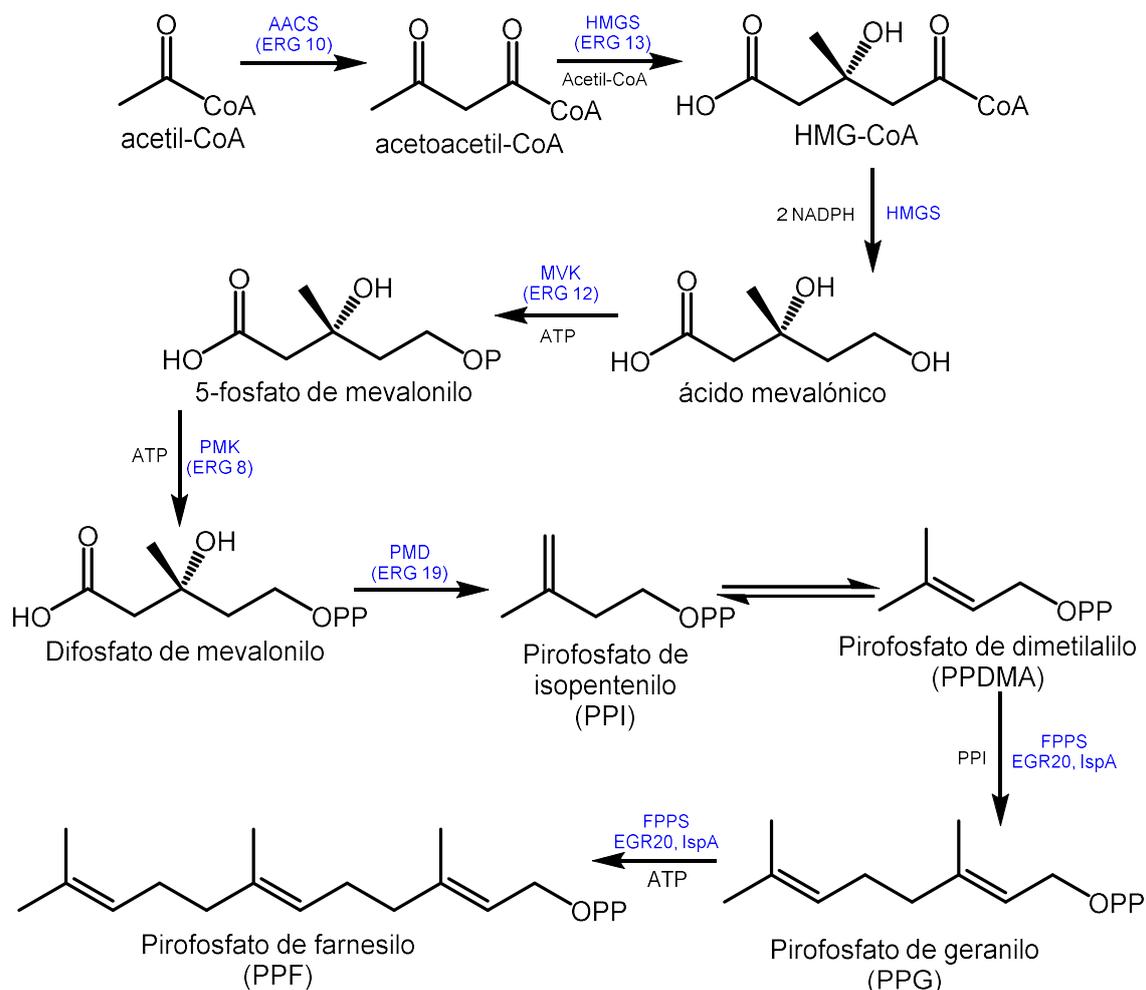


Figura 4. Biosíntesis de los sesquiterpenos: AACS (Sintasa de la acetil coenzima A), HMGS (Sintasa de la hidroximetilglutaril-CoA), HMGR (Reductasa de la hidroximetilglutaril-CoA), MVK (Kinasa del mevalonato), PMK (Kinasa del fosfomevalonato), PMD (Dicarboxilasa del Mevalonato Difosfato), IDI (Isomerasa de la isopentenil difosfato), PPFS (Sintasa de la difosfato de farnesilo) [11].

#### 1.4. Lactonas Sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas (LsS) son compuestos incoloros, amargos, estables y de carácter lipofílico, estos son aislados principalmente de la familia Asteraceae [12]. Su biosíntesis comienza con la ciclación del pirofosfato de farnesilo (PPF) por la enzima germacrano A sintasa (GAS) para formar germacrano A, como se ilustra en la figura 5. Posteriormente, una oxidación en tres etapas del grupo metilo en el C-12 del germacrano A por el citocromo P450 y la enzima germacrano A oxidasa (GAO) dan lugar al ácido

germácranico A (GAA) [13], el cual puede ser hidroxilado estereoespecíficamente por las enzimas ciocromo P450, la sintasa de la custonólida (COS) y 8 $\beta$ -hidroxilasa (G8H) en el C-6 (orientación  $\alpha$ ) o C-8 (orientación  $\beta$ ). La lactonización subsiguiente de la 6 $\alpha$ -hidroxi-GAA conduce a la custonólida la cual es la lactona sesquiterpénica precursora de otros esqueletos característicos de la familia Asteraceae y Apiaceae [14].

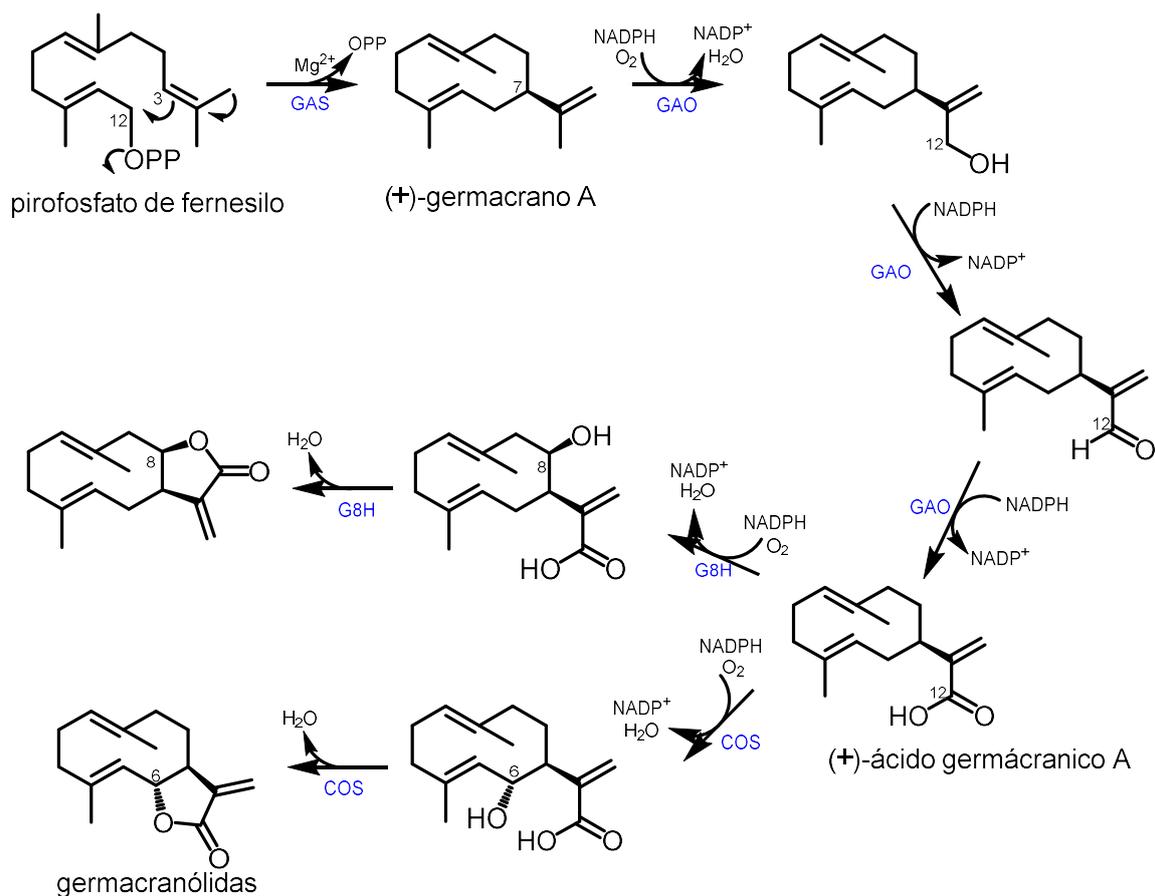


Figura 5. Biosíntesis de las lactonas sesquiterpénicas: GAS (Sintasa del (+)-germacrano A), GAO (Oxidasa del (+)-germacrano A), COS (Sintasa de la (+)-custonólida), G8H (8 $\beta$ -hidroxilasa). [13]

La clasificación de las LsS se realiza en función de sus esqueletos carbocíclicos, dando de 30 a 35 esqueletos diferentes, la mayoría se encuentran dentro de cuatro grupos: germacranólidas (I), eudesmanólidas (II), guayanólidas (III) y pseudoguayanólidas (IV) [15], ver figura 6.

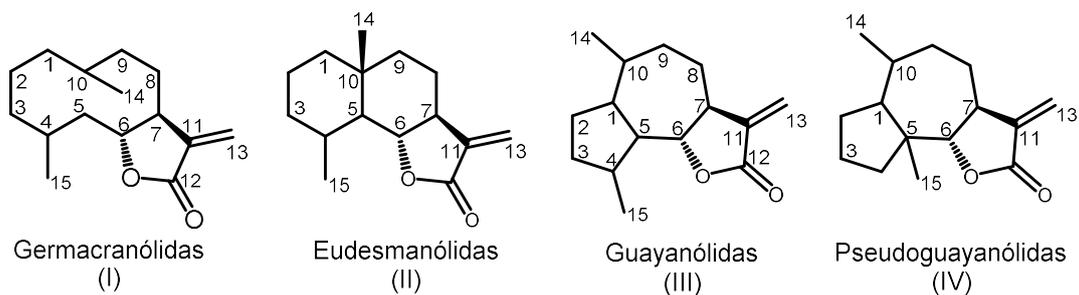


Figura 6. Principales esqueletos carbocíclicos presentes en las lactonas sesquiterpénicas [15].

### 1.4.1. Otros esqueletos

Las germacranolidas representan biogenéticamente el grupo más primitivo, dando lugar a los otros tres principales esqueletos, subtipos menores de LsS, los cuales incluyen helenanólidos, seco-germacranolidos, elemanólidos, entre otras, ver figura 7. Debido a la gran diversidad de estructuras, las LsS pueden ser organizadas según su nivel de complejidad biogenética [13].

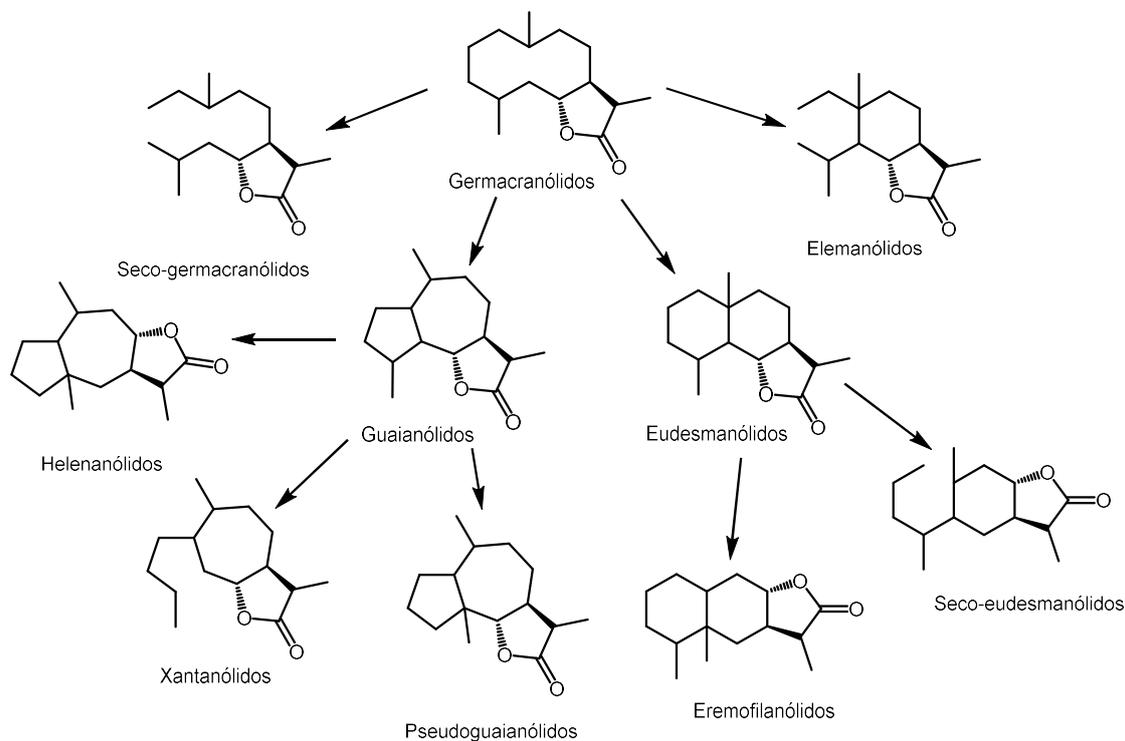


Figura 7. Algunas lactonas sesquiterpénicas que derivan de las germacranólidas [13].

### 1.4.2. Sesquiterpenoides diméricos

Existen compuestos con esqueleto de 30 carbonos que se originan a partir de dos moléculas sesquiterpénicas (idénticas o diferentes), tales compuestos se denominan disesquiterpenoides o sesquiterpenoides diméricos. Estos se clasifican en tres clases según su origen biosintético: tipo A los verdaderos disesquiterpenoides, el tipo B los pseudo disesquiterpenoides y tipo C los di-merosesquiterpenoides. Los sesquiterpenoides del tipo A y B se originan a partir del PPF y los de tipo C surgen de una vía biosintética mixta que se deriva parcialmente de un sesquiterpeno los cuales son aislados principalmente de microbios y organismos marinos [4].

Los disesquiterpenoides tipo A son estructuras en las que dos unidades de sesquiterpenos están unidas directamente por uno o dos enlaces C-C, los cuales están formados principalmente por la reacción Diels-Alder, hetero Diels-Alder o cicloadición [2+2]. El tipo B se distingue por estar constituidos por dos sesquiterpenos unidos por un éster, éter, entre otros. Los Tipo A y B pueden ser encontrados principalmente en las familias Asteraceae y Chloranthaceae., ver figura 8 [4].

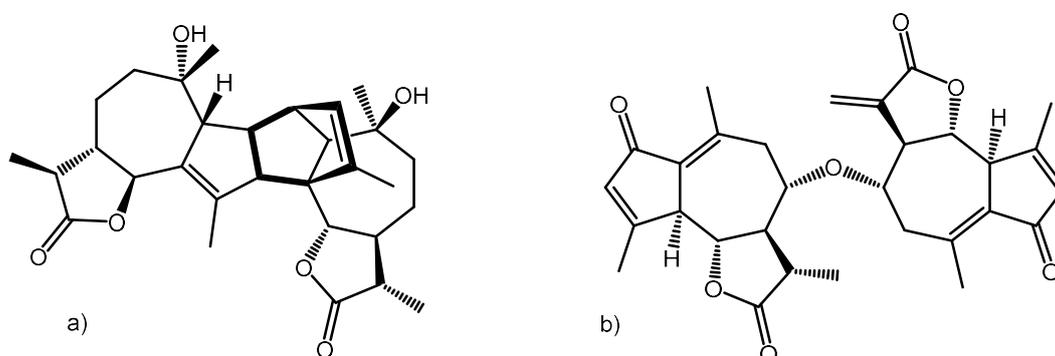


Figura 8. Ejemplos de sesquiterpenoides diméricos: (a) Tipo A y (b) Tipo B [4].

Algunos dímeros de guayanólidas, germacranólidas, entre otros, han mostrado tener notables actividades farmacológicas: actividad anti VIH [16], inhibidores de la ciclooxigenasa-2 y actividad citotóxica [12].

### 1.4.3. Grupo $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona

Una de las características generales de las LsS es la presencia del grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona ( $\alpha$ M $\gamma$ L), este se forma a partir de la oxidación del C-12, dando lugar al grupo carbonilo, seguido de una hidroxilación en el C-6 o C-8, lo que resulta en la formación de un anillo, proceso que se denomina lactonización [17]. Sin embargo, hay algunas LsS descritas que se encuentran hidrogenadas en la posición  $\alpha$  (C-11,  $\alpha$ -metil- $\gamma$ -lactona), ver figuras 9 [18].

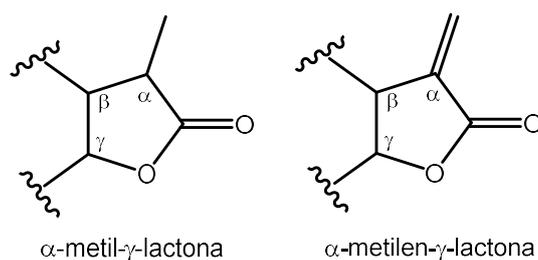


Figura 9. Anillos lactónicos encontrados en lactonas sesquiterpénicas [18].

Gran parte de las actividades biológicas de las LsS se debe a la presencia del grupo  $\alpha$ M $\gamma$ L, el cual reacciona con los grupos tioles (como el grupo sulfhídrico de la cisteína) que se encuentran comúnmente en las proteínas, mediante una reacción de tipo Michael, ver figura 10 [9, 17], interfiriendo en algunos procesos biológicos claves, como la señalización celular, la proliferación celular, la muerte celular y la respiración mitocondrial [19].

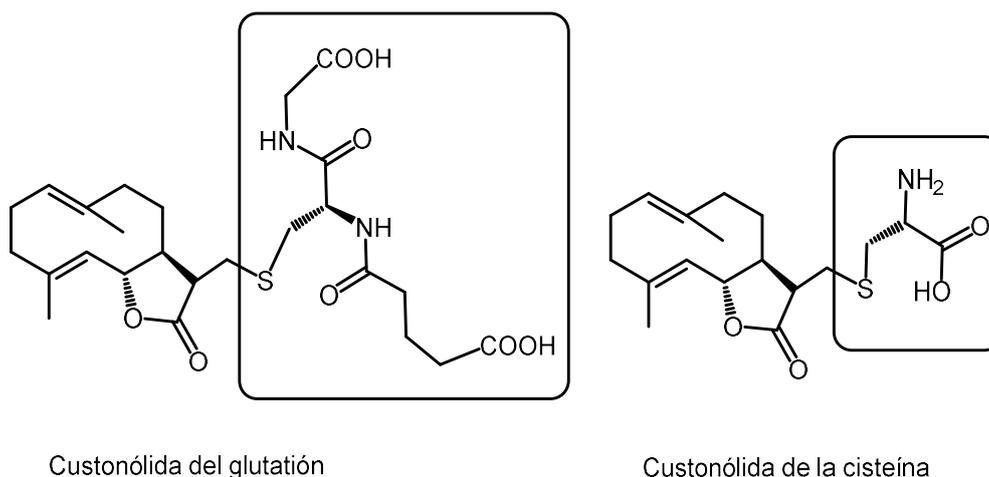


Figura 10. Aductos formados por la adición nucleofílica (Adición de Michael) de grupos tioles a la custonólida [9].

#### 1.4.4. Actividades biológicas de las Lactonas Sesquiterpénicas

En los últimos veinte años del siglo XX, el estudio de los productos naturales incorporo como rasgo importante su actividad biológica. Actualmente, conocer la actividad biológica de un producto natural ha ayudado a preservar la fuente biológica de la que se deriva. Aunado con los avances en el conocimiento del genoma de algunos organismos, se han incorporado ciencias relativamente nuevas, como la ingeniería metabólica, la proteómica y la metabolómica para conocer el origen, la biosíntesis y aplicación. Además, de las enzimas involucradas en la generación de diferentes metabolitos que pueden tener aplicaciones inmediatas a la química farmacéutica, química medicinal, a la agroquímica, a la química en alimentos, entre otras. Por lo que la realización de pruebas de toxicidad de los extractos de las plantas, fracciones o compuestos puros, son fundamentales para su posterior estudio en bioensayos más específicos y sofisticados [20].

Un ejemplo son las LsS, quienes presentan una amplia variedad de actividades biológicas, como antineoplásica, citotóxica [21], antimicrobiana, antifúngica, fitoalexinas, antimalárica<sup>1</sup>, antihelmíntica y antitumoral [22]. Recientemente se ha descubierto el potencial antileucémico de algunas LsS [18]. En la tabla 1, se describen algunas LsS aisladas de diferentes especies del género *Artemisia*, con su actividad biológica y sus respectivas estructuras, ver figura 11.

En general, las LsS se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas, su aislamiento está asociada con la selección de disolventes y la optimización del método de extracción y de síntesis multifacética, ya que por su polaridad pueden ser extraídas en disolventes orgánicos de baja y mediana polaridad, con cierto grado de toxicidad, lo cual depende de su naturaleza química. De ahí, que sean pocos los medicamentos basados en LsS como “Santonin”<sup>2</sup> y “Alanton” [23].

---

<sup>1</sup> La malaria es la principal causa de muerte, más de un millón de personas al año [27].

<sup>2</sup>  $\alpha$ -Santonina fue la primera LsS utilizada como fármaco antihelmíntico [22].

Tabla 1. Actividades biológicas de algunas lactonas sesquiterpénicas del género *Artemisia* L.

<b>Lactonas sesquiterpénicas</b>	<b>Fuente vegetal</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Ref.</b>
Qinghaosu (artemisinina) (1)	<i>A. annua</i>	Antimalárica	24
$\alpha$ -Santonina (2)	<i>Artemisia sp.</i>	Antihelmíntica e insecticida	24, 25
Canina (3)	<i>A. cana</i>	Insecticida	24, 25
Ridentina (4)	<i>Artemisia sp.</i>	Citotóxica, antitumoral y antimalárica	24, 25
Arteglasina A (5)	<i>A. douglasiana</i>	Citotóxica, antitumoral y dermatitis en humanos	25
Ludovicina A (6)	<i>A. ludoviciana</i>	Citotóxica, antitumoral y antimalárica	25, 26
Arbusculina A (7)	<i>A. tridentata</i>	Efecto tóxico en plantas	25
Achillina (8)	<i>A. tridentata</i> <i>A. ludoviciana</i>	Efecto tóxico en plantas y antimalárica	25, 26
Desacetilmatricarina (9)	<i>A. tridentata</i>	Efecto tóxico en plantas	26
Arglanina (10)	<i>A. ludoviciana</i>	Antimalárica	26
Santamarina (11)	<i>A. ludoviciana</i>	Antimalárica	26
Armefolina (12)	<i>A. ludoviciana</i>	Antimalárica	26
Estafiatina (13)	<i>A. ludoviciana</i>	Antimalárica	26
Crisartemina B (14)	<i>A. ludoviciana</i>	Antimalárica	26

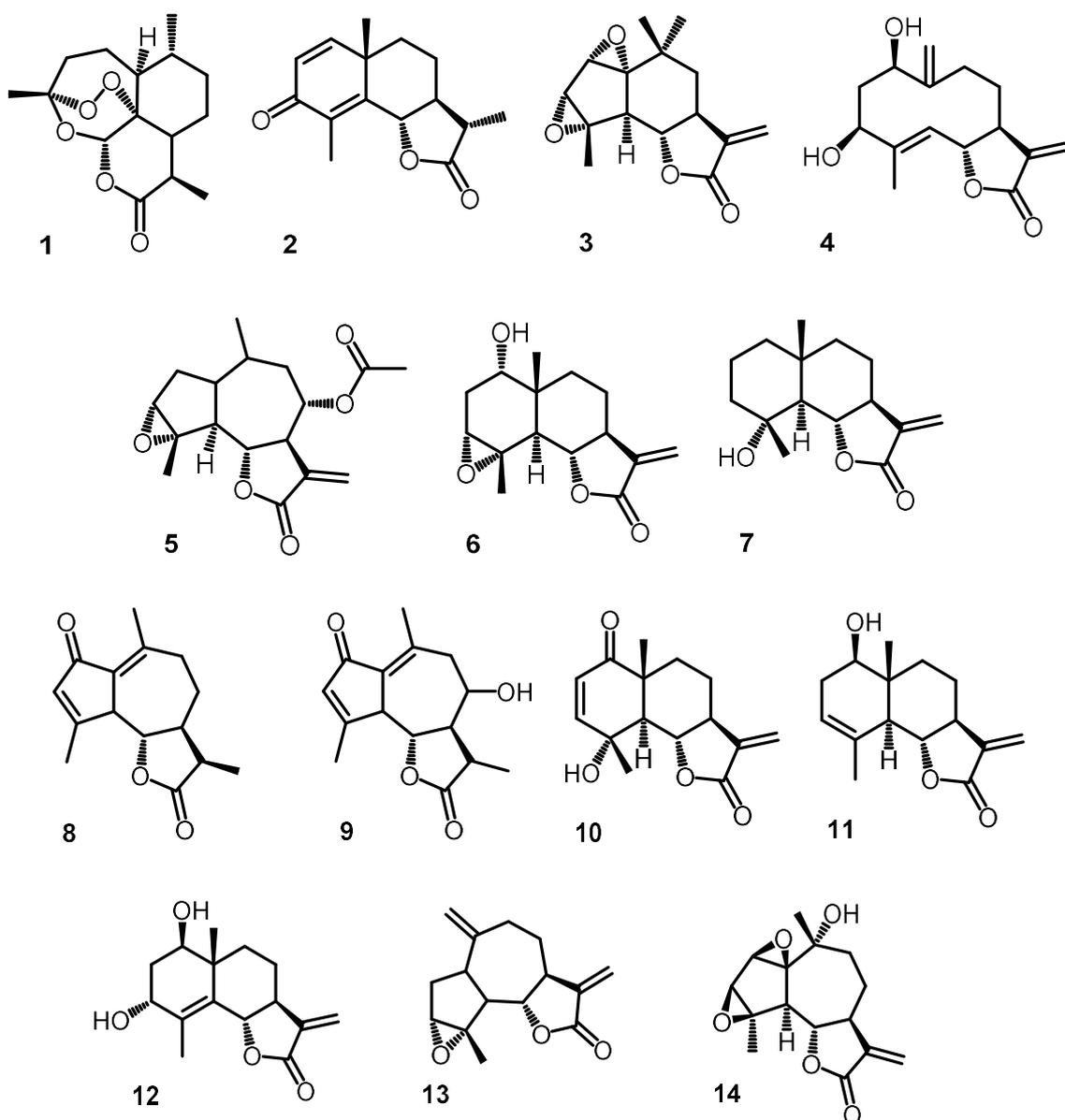


Figura 11. Estructuras de algunas lactonas sesquiterpénicas del género *Artemisia* L. [24-26].

## 1.5. Importancia de las lactonas sesquiterpénicas

### 1.5.1. Importancia para las plantas

Las LsS se encuentran habitualmente, en mayor cantidad, en órganos especializados de las plantas como tricomas glandulares capitados y laticíferos. Las concentraciones mayores a  $10^{-4}$  M generalmente se deben a las actividades protectoras contra insectos herbívoros, plantas competidoras y microorganismos [13]. De aquí su importancia.

Dentro de las actividades que presentan las LsS en las plantas, la protección contra la herbivoría es de las más destacables, ya que pueden actuar como disuasivos alimenticios, perjudicando el desarrollo o al afectar directamente la mortalidad de los insectos. Por ejemplo, se ha estudiado y confirmado experimentalmente que el glaucólido A (**15**, *Vernonia*) reduce la ingesta de planta en las larvas de *Spodoptera*<sup>3</sup>. También se ha informado que la partenólida (**16**) y argofilina A (**17**) poseen la propiedad de disuasión alimentaria contra *Diabrotica*<sup>4</sup> y *Acalymma*<sup>5</sup>. En la figura 12, se muestran otras LsS (**1**, **18-20**) con actividad antiherbivoría [13].

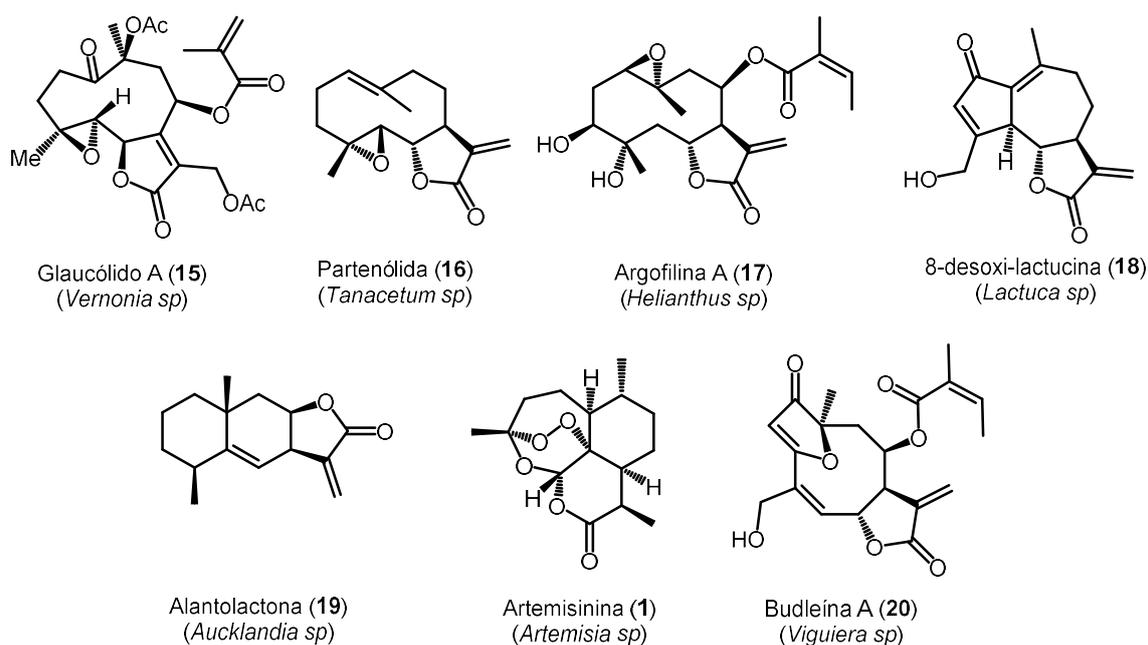


Figura 12. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con efecto antiherbivoría [13].

### 1.5.2. Importancia para el hombre

La base para la reproducción de los organismos es el ciclo celular, el cual no sólo sirve para originar nuevas células, además asegura que el proceso se complete de forma eficaz, de aquí la importancia para el hombre. El ciclo celular está conformado por dos etapas, la primera es conocida como interfase, esta se divide en tres fases: fase G1, se caracteriza por la formación de ATP que es necesario para el proceso de división e incremento del tamaño celular; la fase S, se caracteriza por la replicación del ADN nuclear. Finalmente,

<sup>3</sup> El género *Spodoptera* —*S. eridania*, *S. frugiperda*, *S. ornithogalli*— es un género fitófago que ataca plantas de gran interés económico —manzana, algodón, trigo, maíz, tomate, entre otros—.

<sup>4</sup> El género *Diabrotica* —*D. virgifera* *D. barberi*, *D. howardi* — está constituido por escarabajos de la familia Chrysomelidae y ataca cultivos como maíz, papa y pepino.

<sup>5</sup> *Acalymma* es un género de insectos de la familia Chrysomelidae.

en la fase G2, la célula se prepara para la siguiente fase. La mitosis etapa donde se divide la cromatina duplicada, para que cada célula hija obtenga una copia del material genético. La culminación de la mitosis da lugar a un nuevo ciclo en G1 [27].

Es así que el avance de las células a través del ciclo es regulado por señales extracelulares del medio y señales internas que coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases. Además, de diversos procesos celulares como: el crecimiento celular, la replicación del ADN y la mitosis, se coordinan durante el transcurso del ciclo celular. Esto, gracias a una serie de puntos de control que regulan la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular. Uno de los principales puntos de control en el ciclo celular se encuentra durante el desarrollo de la fase G1 y controla el paso de G1 a S, una vez que las células rebasan el punto de control quedan determinadas a pasar a la fase S, este determina si se encuentran las condiciones adecuadas para que la célula avance a la fase S. Otro punto de control importante se encuentra durante la fase G2, donde se detecta el ADN dañado o sin replicar, lo que provoca una detención del ciclo celular, por lo que este punto de control previene la iniciación de la mitosis antes de completar exitosamente la fase S, de modo que las células permanecen en G2 hasta que el genoma se replique o se repare correctamente [27].

Se encuentra bien establecido que el desarrollo tumoral está relacionado con la supresión de los mecanismos de control del ciclo celular mediante la sobreexpresión o activación de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) o la pérdida de sus inhibidores, lo que provoca una proliferación celular descontrolada. Se ha demostrado que las LsS tienen efecto sobre el ciclo celular en varias células de cáncer humano; por ejemplo, la partenólida (**16**) detiene el progreso del ciclo celular en el punto de control G2/M, especialmente en una línea celular de carcinoma hepatocelular sarcomatoide invasivo. Mientras la cinaropicrina (**22**) detiene el ciclo celular en la fase G1/S en varias líneas celulares de cáncer de leucocitos, ver figura 13. También se ha demostrado que la **16**, **21** y yomogina, trabajan en sinergia junto con fármacos quimioterapéuticos para potenciar la diferenciación de células leucémicas. Estas pruebas sugieren presumiblemente la potencialidad de las LsS como sustancias con actividad anticancerígena [19].

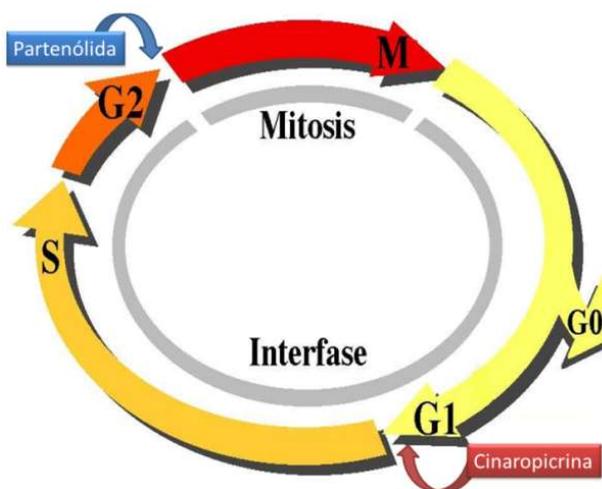


Figura 13. Puntos de control de la partenólida (16) y la cinaropirina (22) en el ciclo celular.

Existen una gran cantidad de estudios en células *in vitro*, en los cuales se ha demostrado que algunas LsS (16, 21-23) son capaces de inducir la apoptosis en células cancerosas, ver figura 14.

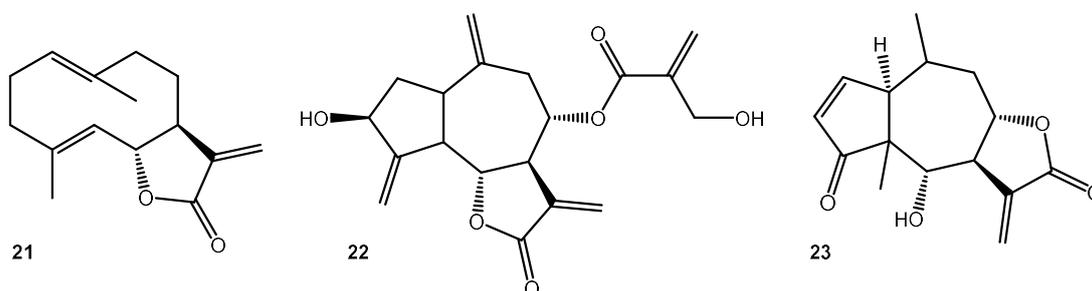


Figura 14. Lactonas sesquiterpénicas que inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer de humano [19].

En la tabla 2 se enlistan algunas LsS que inducen apoptosis; aunque aún no se conoce bien el mecanismo molecular detallado de como sucede, se cree que el grupo  $\alpha$ M $\gamma$ L es esencial para su actividad apoptogénica, mediante una reacción de tipo Michael con el glutatión reducido intracelular (GSH), lo que produce la reducción de la actividad enzimática, la interrupción del metabolismo de GSH y por consiguiente la pérdida del equilibrio redox en la célula [19].

Tabla 2. Inducción de apoptosis por algunas lactonas sesquiterpénicas (**16**, **21-23**) en líneas celulares de cáncer de humano [19].

LsS	Tipo de célula
Partenólida ( <b>16</b> )	Células de carcinoma hepatocelular sarcomatoide invasivo de humano
Partenólida ( <b>16</b> )	Células de cáncer de colon de humano (COLO205)
Partenólida ( <b>16</b> )	Células de cáncer de mama de humano (MDA-MB-231)
Custonólida ( <b>21</b> )	Células de leucemia de humano (HL-60)
Custonólida ( <b>21</b> )	Células de leucemia de humano (U937)
Cinaropicrina ( <b>22</b> )	Células de leucemia de humano (U937)
Helenalina ( <b>23</b> )	Células Jurkat de leucemia de humano

Otros estudios, muestran la actividad antiinflamatoria de las LsS en las úlceras estomacales, en los que se encontró que el grupo  $\alpha$ MyL era esencial en la reducción de la formación de úlceras gástricas inducidas con EtOH en ratones [28]. Sin embargo, falta enfocar los estudios en otras aplicaciones de las LsS en el tratamiento de diferentes enfermedades en humanos.

Una de las acciones que resulta de gran importancia de las LsS, es su actividad antifúngica, ya que los hongos son un grupo de organismos diversos, dentro de los cuales se encuentran algunos que son parásitos de plantas, estos causan afectaciones en cultivos de interés económico. Otros son responsables de enfermedades en animales, incluyendo al hombre [29]. Debido a la resistencia que desarrollan los microorganismos en la medicina y la agricultura, es fundamental el descubrimiento de nuevas sustancias con actividad antifúngica. Además, de encontrar productos que resulten más seguros para su utilización agrícola [30]. Existen diversos estudios en los que se evalúa la actividad antifúngica de diversas LsS, como la **21** y la dehidrocostuslactona (**24**), ver figura 15, las que mostraron tener una actividad equiparable al ketoconazol<sup>6</sup> frente a *Cunninghamella echinulata*<sup>7</sup>. En dicho estudio, se propone la relación entre la polaridad de las LsS y su actividad, mostrando que los compuestos menos polares inhibieron en mayor grado el crecimiento del hongo [31].

<sup>6</sup> Fármaco antimicótico azólico, de la clase imidazol.

<sup>7</sup> Hongo del orden Mucorales, que puede provocar mucormicosis principalmente en personas con diabetes y SIDA.

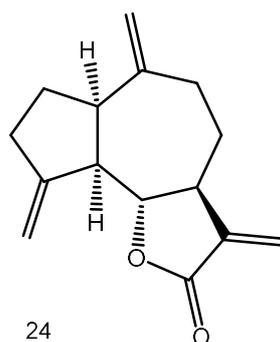


Figura 15. Dehidrocostuslactona (24).

### 1.5.3. Otros usos importantes de las lactonas sesquiterpénicas

La importancia de las LsS, no solo se debe a sus actividades biológicas, también han sido utilizadas como marcadores taxonómicos (quimiotaxonomía) desde el siglo XX. La quimiotaxonomía proviene de la “taxonomía numérica”, la cual establece que los cambios fenotípicos adquiridos a lo largo del tiempo pueden utilizarse para la clasificación. Debido a esto, muchos estudios han utilizado la diversidad de LsS para inferir las relaciones taxonómicas dentro de la familia Asteraceae [13].

## 1.6. Generalidades del género *Artemisia* L.

### 1.6.1. Distribución y morfología

El género *Artemisia* L. se encuentra principalmente distribuido en la región norte del planeta, se extiende hacia el sur hasta los trópicos. Este forma parte de la familia Asteraceae, la cual abarca más de 30 000 especies y más de 1 400 géneros. *Artemisia* L. cuenta con más de 500 especies [32, 33]. En la flora fanerogámica del Valle De México se describe la morfología botánica de *Artemisia* L., como plantas herbáceas o arbustivas, frecuentemente aromáticas al estrujarse; hojas alternas, indivisas a finamente divididas; cabezuelas por lo general paniculadas o racimosas, a menudo péndulas; involucreo ovoide, campanulado o hemisférico, sus brácteas dispuestas en varias series, las exteriores más cortas, todas o algunas con los márgenes escariosos; receptáculo plano a cónico, desnudo; flores periféricas femeninas presentes o ausentes, fértiles o infértiles, sus corolas cilíndricas o subcilíndricas, 2 a 4-dentadas, a menudo oblicuas, inconspicuas; flores del disco hermafroditas, o bien, funcionalmente masculinas, sus corolas campanuladas, infundibuliformes o tubulosas; anteras con las bases obtusas; ramas del estilo de las flores

hermafroditas linear-oblongas, truncadas en el ápice; aquenios obovoides, elipsoides, cilíndricos o comprimidos, vilano ausente o coroniforme [34].

### 1.6.2. Características fitoquímicas

En la Familia Asteraceae se han aislado principalmente LsS del género *Artemisia* L., las cuales se encuentran en mayor cantidad en las partes aéreas de la planta, donde pueden constituir más del 5% del peso seco [26].

Muchas de las especies de *Artemisia* L. han sido de gran importancia en la Etnobotánica, ya que las partes aéreas han sido utilizadas por sus efectos antisépticos, antihelmínticos, antitumorales, antipiréticos, antimicrobianos, antioxidantes, antifúngico, entre otros [35], algunos ejemplos de especies del género son: *A. absinthium*, la cual se ha utilizado como estimulante antiespasmódico, para tratar problemas estomacales y mejorar la memoria, *A. annua* es utilizada para tratar la fiebre y la malaria, *A. dracunculus* que se utiliza como antidiabético y anticoagulante, entre otras [32]. Más de 260 especies de *Artemisia* han sido estudiadas para revelar que con una gran cantidad de compuestos con diferentes estructuras, como son los flavonoides, cumarinas, monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas, esteroides, poliacetilenos, entre otros, ver figura 16 [28, 36]. Algunas sustancias mostraron ser antipalúdico, antiviral, antipirético, antihemorrágico, antiulcerogénico, entre otras [28].

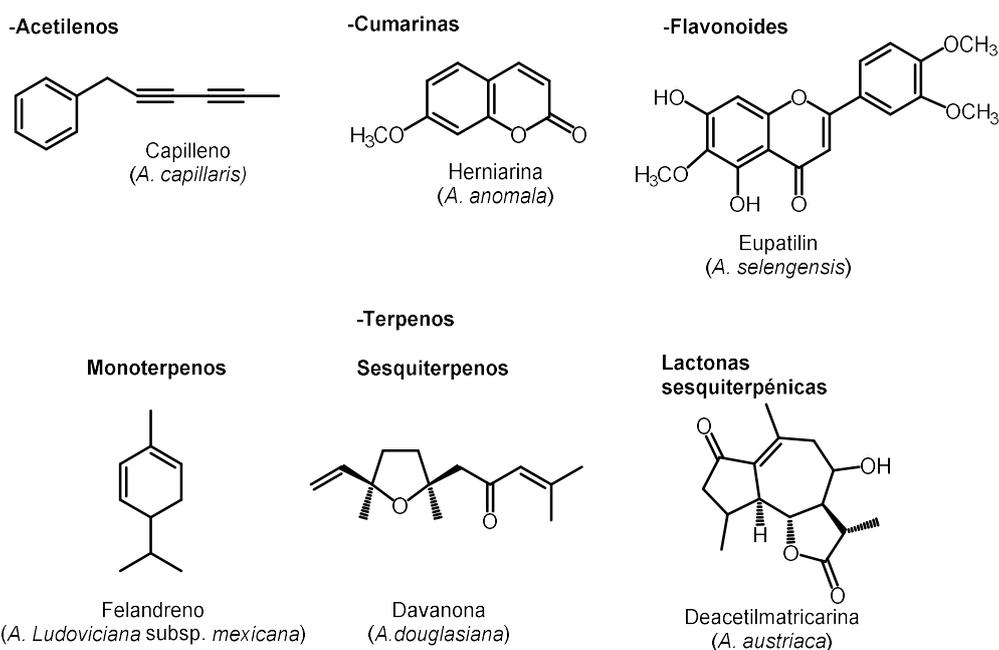


Figura 16. Ejemplos de algunos metabolitos secundarios presentes en el género *Artemisia* L. [28]

## 1.7. Generalidades de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, conocida popularmente como “estafiate” se encuentra principalmente en las regiones templadas del país, tiene un hábito herbáceo, puede alcanzar 1 m de altura; sus ramas tienen un color grisáceo o blanquecino; sus hojas son alternas, divididas en tres, llegan a alcanzar hasta 15 cm de largo y 10 mm de ancho, con forma lanceolada, el envés cuenta con un color blanquecino; sus flores son de color amarillo acomodadas en cabezuelas. Se localiza principalmente en clima cálido, semicálido, semiseco y templado, de 3900 msnm a nivel del mar. Puede ser encontrada a las orillas de los caminos, en cultivos abandonados y en vegetación perturbada, ver figura 17 [37].



Figura 17. Foto de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* tomada de Tropicós [38].

Desde la antigüedad, se le han atribuido diversas propiedades curativas o terapéuticas, de las cuales, pocas han sido comprobadas científicamente. Entre los usos que se le atribuyen hasta nuestros días se encuentran tratar cólicos, tos, vomito, parasitosis, reumatismo, diarrea, entre otras [20].

## 2. JUSTIFICACIÓN

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, es una especie vegetal muy utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos. Además de que existen estudios muy recientes que muestran su potencialidad como agente antimalárico.

Estudios químicos previos han demostrado que *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* biosintetiza una gran diversidad de productos naturales, entre los que destacan las lactonas sesquiterpénicas (LsS) por su alto contenido (aproximadamente 5% del peso seco de la planta) y su diversa estructura química —germacranólidas, eudesmanólidas, guayanólidas y pseudoguayanólidas—.

Las LsS actualmente son objeto de estudio por la importancia que tienen para la planta y el ser humano. Dentro de su amplia actividad biológica destaca su actividad antitumoral, antifúngica y citotóxica. Además, se han logrado realizar cambios estructurales a dichos compuestos para conocer la variación en su actividad biológica.

Motivo por el cual es relevante la investigación, esta va encaminada a realizar el estudio biodirigido de los extractos “*crudos*” —*n*-hexano, AcOEt y MeOH— de las partes aéreas de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* para aislar e identificar las LsS mayoritarias y poder ponderar su utilidad como fuente principal de dichos compuestos, para su posterior evaluación antitumoral, antifúngica, entre otras. Además, como materia prima en sus transformaciones químicas y biológicas en futuros proyectos de investigación.

### 3. HIPÓTESIS

*Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* es una especie vegetal muy apreciada en la medicina tradicional mexicana por sus diversas propiedades curativas, aunque muchas de las cuales no han sido plenamente comprobadas. Se ha descrito con anterioridad, que es una fuente importante de lactonas sesquiterpénicas (LsS) las cuales muestran una amplia actividad biológica, principalmente relacionadas a su hipotética actividad antifúngica, antitumoral, entre otras, las cuales están asociadas al grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona.

Entonces al determinar la actividad antifúngica de los diferentes extractos crudos a través del estudio biodirigido, se procederá al estudio químico de los extractos con mayor actividad para aislar, caracterizar e identificar las LsS mayoritarias presentes en ellos y ponderar su posterior utilidad como fuente de dichas sustancias y por lo tanto sus beneficios.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento, identificación y caracterización de las lactonas sesquiterpénicas mayoritarias y la evaluación de la actividad antifúngica de los residuos obtenidos de la separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* por medio de un estudio químico y ponderar su posterior utilidad como fuente de dichas sustancias.

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1. Preparar los extractos “*crudos*” de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* con *n*-hexano, AcOEt y MeOH, utilizando la planta comercializada en la Cd. de México.
- 5.2. Determinar la actividad antifúngica de los diferentes extractos “*crudos*” (*n*-hexano, AcOEt y MeOH) frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* utilizando el método de medio de cultivo envenenado.
- 5.3. Realizar la separación diferenciada del extracto “*crudo*” con AcOEt, mediante las diferentes técnicas cromatográficas y empleando mezclas de disolventes de polaridad creciente.
- 5.4. Determinar la actividad antifúngica de los diferentes residuos obtenidos de la separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt con mezclas de elución de polaridad creciente.
- 5.5. Separar y purificar por métodos cromatográficos y técnicas de cristalización las LsS mayoritarias presentes en las fracciones obtenidas de la separación diferenciada del extracto “*crudo*” de AcOEt.
- 5.6. Identificar y caracterizar las lactonas mayoritarias por medio de técnicas espectroscópicas —IR, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C—, espectrométricas —EM (IE)—, y aplicando las diferentes técnicas bidimensionales —COSY, NOESY, HMBC, HSQC—, propiedades físicas —pf., solubilidad, R<sub>f</sub>—.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### 6.1. Material y equipo

La molienda del material vegetal se realizó en una picadora eléctrica marca Moulinex®. La separación y purificación de los extractos “*crudos*” se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas usuales, como cromatografía en columna a presión reducida (CCV) y cromatografía en capa fina (CCF). En los procesos de purificación cromatográfica en columna se empleó como fase estacionaria gel de sílice (SiO<sub>2</sub>), marca Merck® con tamaño de malla 70/230 y 230/400 ASTM. Los análisis por CCF en cromatofolios de gel de sílice de la marca Merck® 60F<sub>254</sub> (0.20 mm de espesor). Para La fase móvil se emplearon diferentes disolventes (*n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, acetona y MeOH en diferentes proporciones). Como reveladores químicos: sulfato cérico amoniacal [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N]. Mezcla de ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O [HAc/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O, 80:4:16], solución de vainillina [vainillina (1 g), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (35 mL) EtOH (25 mL) H<sub>2</sub>O (25 mL)]. Las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas y de las extracciones con disolventes orgánicos se concentraron en un rotavapor marca BUCHI® Waterbath modelo B-480. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fischer-Johns.

Los análisis espectroscópicos se realizaron en: los espectros de IR se realizaron en un equipo *FT-IR Bruker Tensor 750*. Los espectros de masas en un espectrofotómetro *Joel JMS-AX505HA* utilizando la técnica de impacto electrónico con un potencial de 70 eV. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en los espectrofotómetros *Varian Inova 500* (500/125MHz), *Bruker* (400/100 MHz), *Varian XR-300* (300/75 MHz) y *Bruker ARX300* (300/75 MHz), utilizando TMS como referencia interna y como disolvente CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm).

### 6.2. Preparación de los extractos “*crudos*” de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*

El “estafiate” utilizado en el presente estudio fue adquirido en el Mercado de Sonora en la Cd. de México, en enero del 2016, fue identificada por la Profa. Clara Ramos del Instituto de Biología. El material vegetal fue secado a la sombra y a temperatura ambiente, para posteriormente realizar su molienda, de donde se obtuvieron 5.9 Kg de material seco.

El material vegetal se colocó en dos recipientes de vidrio con capacidad de 20 L. La técnica utilizada en la preparación de los extractos fue por maceración (ext. sólido-líquido) a temperatura ambiente, utilizando n-hexano (8 L aprox.) durante 24 h, posteriormente se realizó una filtración a gravedad para eliminar algún resto de planta o de tierra que impregnaba la planta. La concentración del extracto se realizó a baja presión por medio del rotavapor.

Para la preparación de los extractos con AcOEt y MeOH, se procedió de manera similar a la descrita en la obtención del extracto hexánico, ver tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de las partes aéreas de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*.

Partes aéreas	Extracto		
	<i>n</i> -hexano	AcOEt	MeOH
5.9 Kg	206.5 g (3.5%)	288.3 g (4.8%)	— <sup>a</sup>

<sup>a</sup>El rendimiento del extracto MeOH no fue determinando, la obtención del extracto se realizó a partir de una cantidad menor de planta.

### 6.3. Actividad antifúngica de los diferentes extractos “crudos” de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*

Se evaluó la actividad antifúngica de los tres extractos “crudos” de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* frente a los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp., utilizando el método de medio de cultivo envenenado [39-41].

#### 6.3.1. Resiembra de los hongos

Para la resiembra de los hongos se disolvieron 7.02 g de Agar Papa Dextrosa (APD) en 180 mL de agua destilada, al estar totalmente disuelto se agregaron 20 mL de medio a 9 matraces, se esterilizaron a 120°C/15 min/1.5lb. Se procedió a la resiembra del hongo utilizando el método de picadura, ver figura 18.

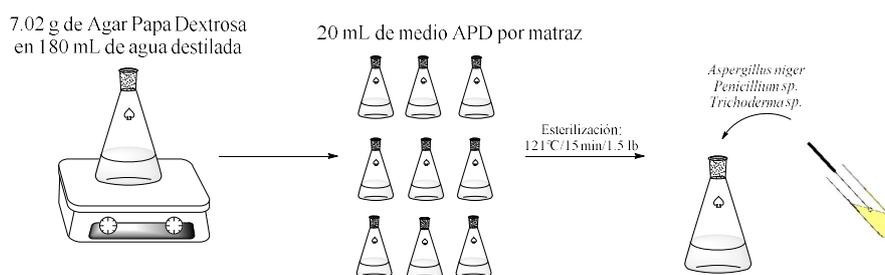


Figura 18. Resiembra de los hongos por el método de picadura [39-41].

### **6.3.2. Preparación de las soluciones de los diferentes extractos**

En la preparación de las soluciones de los diferentes extractos se pesaron 120 mg de extracto seco (*n*-hexano, AcOEt y MeOH), los cuales se disolvieron en 0.6 mL de tween 80 y 5.4 mL de solución salina estéril al 0.8 %, obteniendo una concentración de 20 mg/mL. Se probó una segunda concentración, utilizando 240 mg de extracto seco, para obtener una concentración de 40 mg/mL.

Adicionalmente, se preparó una solución de fluconazol (RAAM, capsulas de 150 mg), 150 mg/0.6 mL de tween 80 y 5.4 mL de solución salina estéril (0.8 %), obteniendo una concentración de 25 mg/mL, debido a que no se observó actividad a dicha concentración. se procedió a la preparación de una solución más concentrada de fluconazol 30 mg/mL en DMSO.

### **6.3.3. Preparación del medio de cultivo**

Al realizar la preparación del medio de cultivo se disolvieron 51.2 g de Agar Soya Trypticaseina (AST) en 1 280 mL de H<sub>2</sub>O destilada hasta disolución total; el medio se esterilizó a 120°C/15 min/1.5 lb. A cuatro matraces Erlenmeyer de 500 mL, a cada uno de ellos se les agregó 240 mL del medio AST y 6 mL de las soluciones de los extractos (*n*-hexano, AcOEt, MeOH) y fluconazol. Para los blancos del hongo y del medio, se emplearon 320 mL de medio AST.

### **6.3.4. Determinación de la actividad antifúngica de los diferentes extractos “crudos” de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana***

Para determinar la actividad antifúngica de los diferentes extractos “crudos” de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* se requirieron de seis cajas Petri, a estas se les adicionó 40 mL de medio AST con extracto hexánico, además se utilizaron ocho cajas Petri más como control —blanco de *Aspergillus niger* (2), *Penicillium* sp. (2), *Trichoderma* sp. (2) y blanco del medio (2)— este proceso se realizó por cada uno de los extractos ensayados y fluconazol. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, a partir de la solución densa de esporas (15 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril), se impregnó un hisopo para inocular las diferentes cajas Petri, a excepción del blanco del medio, ver figura 19. La evaluación de los tres extractos con los tres hongos se realizó por duplicado.

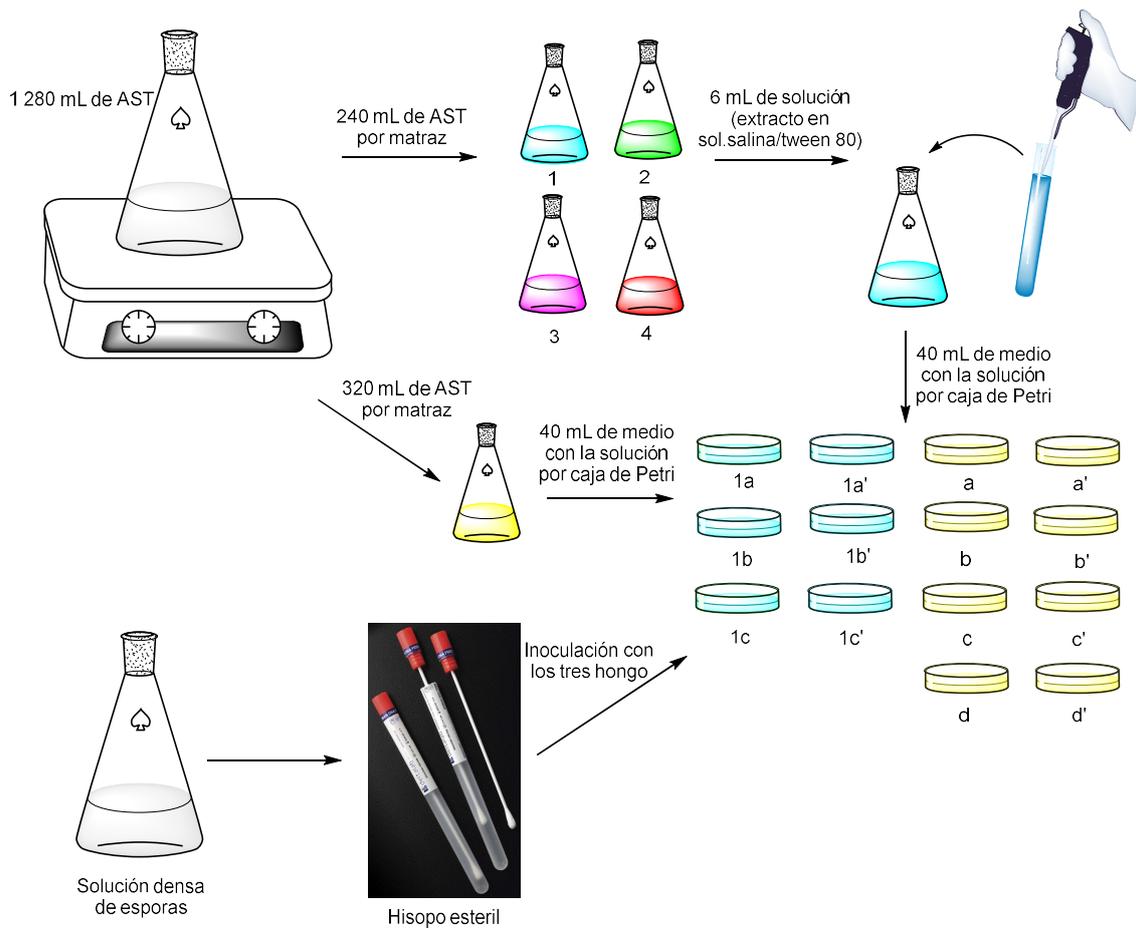


Figura 19. Método de medio envenenado. Soluciones de los diferentes extractos: 1) *n*-hexano, 2) AcOEt, 3) MeOH, 4) fluconazol.  
 Hongos utilizados: a) *Aspergillus niger*, b) *Penicillium* sp., c) *Trichoderma* sp., d) blanco del medio.

#### 6.4. Separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt

Al extracto “*crudo*” con AcOEt se le realizó una separación cromatográfica (CCV). El extracto (14 g) se adsorbió en florosil (23 g) y se colocaron en una columna cromatográfica de vidrio, previamente empacada con SiO<sub>2</sub>-gel para CC-Flash [42, 43]. La separación cromatográfica se realizó utilizando como eluyente, mezclas de *n*-hexano/AcOEt de polaridad creciente [*n*-hexano/AcOEt (80:20 a 20: 80)], cada fracción obtenida fue de 350 mL y concentradas a presión reducida por medio del rotavapor.

#### 6.5. Actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt

Para lograr la evaluación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (seis fracciones,

ver tabla 4) frente a los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*, se utilizó el método de medio de cultivo envenenado [39-41].

#### **6.5.1. Resiembra de los hongos**

Para esta prueba se utilizó el método de resiembra descrito anteriormente.

#### **6.5.2. Preparación de las soluciones**

En la preparación de las soluciones se pesaron 240 mg del residuo seco de cada fracción, las cuales se disolvieron en una solución de 5.4 mL de solución salina estéril (0.8 %) con 0.6 mL de tween 80, obteniendo una concentración de 40 mg/mL.

#### **6.5.3. Preparación del medio de cultivo**

Se disolvieron 68.6 g de Agar Papa Dextrosa (APD) en 1 760 mL de H<sub>2</sub>O destilada hasta disolución total. Posteriormente, se esterilizó a 120°C/15 min/1.5 lb. A seis matraces se les agregó 240 mL del medio APD y 6 mL de las soluciones de las fracciones obtenidas de la separación del extracto con AcOEt, y 320 mL de medio APD para los blancos del hongo.

#### **6.5.4. Determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt**

Para lograr la determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones a seis cajas Petri se les adicionó 40 mL de medio APD con la fracción *n*-hexano (100%), además se utilizaron ocho cajas Petri más como control —blanco de *Aspergillus niger* (2), *Penicillium sp.* (2), *Trichoderma sp.* (2) y blanco del medio (2)— este proceso se realizó por cada una de las fracciones ensayadas. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, a partir de la solución densa de esporas (15 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril), se impregnó un hisopo para inocular las diferentes cajas Petri, a excepción del blanco del medio, ver figura 20.

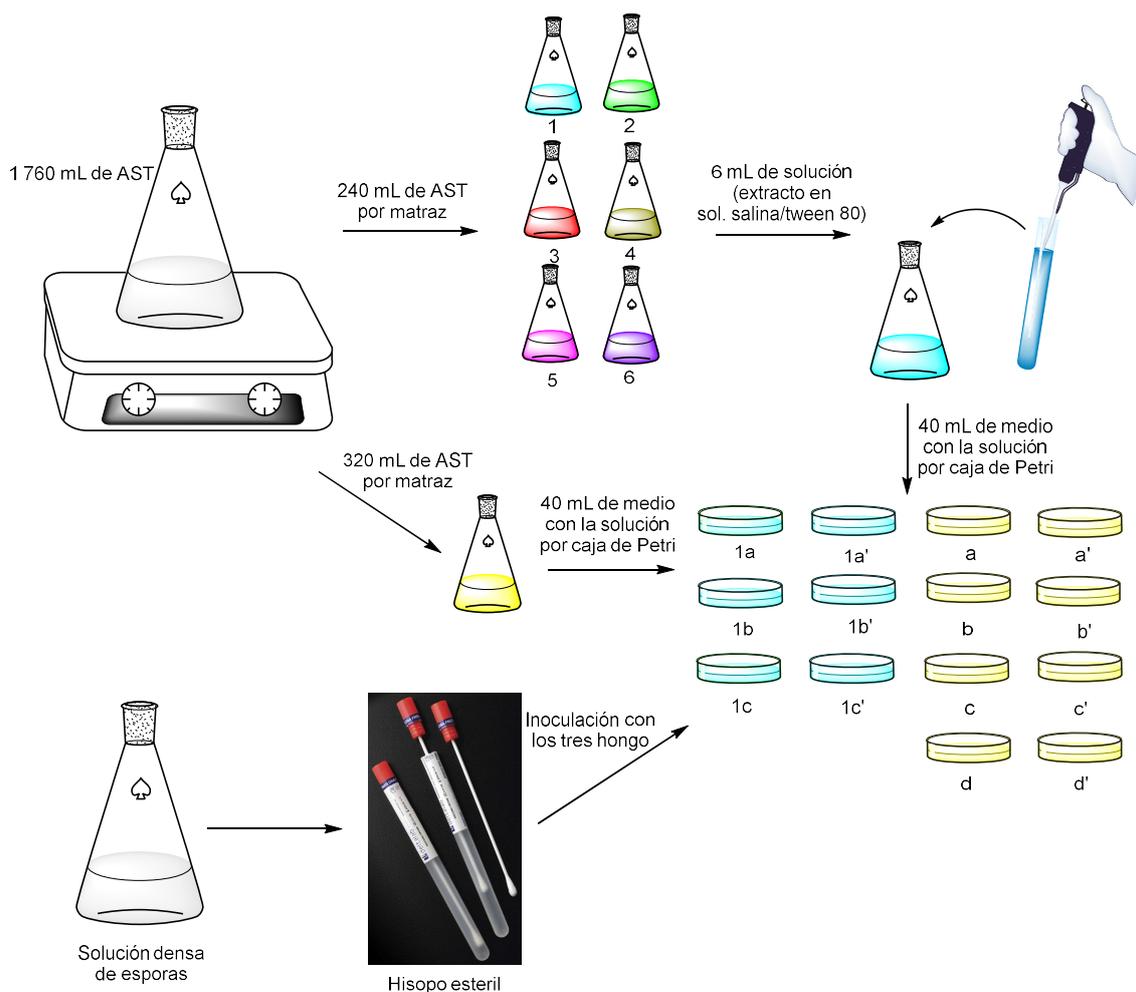


Figura 20. Método de medio envenenado. Soluciones con extracto seco: 1) *n*-hexano (100%), 2) *n*-hex/AcOEt (80:20), 3) *n*-hex/AcOEt (40:60), 4) *n*-hex/AcOEt (60:40), 5) *n*-hex/AcOEt (20:80), AcOEt (100%).

Hongos utilizados: a) *Aspergillus niger*, b) *Penicillium* sp., c) *Trichoderma* sp., d) blanco del medio.

### 6.6. Separación y purificación de las lactonas mayoritarias presentes en el extracto “crudo” con AcOEt

Al realizar la separación y purificación de las lactonas mayoritarias presentes en el extracto “crudo” con AcOEt se tomaron 274.3 g del extracto “crudo” con AcOEt para su separación mediante CCV. el extracto fue adsorbido en florisil y se empacó en una columna cromatográfica, previamente con SiO<sub>2</sub>-gel para CC-Flash. La separación cromatográfica se comenzó utilizando una mezcla *n*-hexano/Me<sub>2</sub>CO (80:20), con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de clorofilas, posteriormente se prosiguió con mezclas de *n*-hexano/AcOEt de polaridad creciente [n-hexano/AcOEt (80:20 a 20: 80)] hasta llegar a AcOEt (100 %), cada fracción obtenida fue de 500 mL, las cuales fueron

concentradas a presión reducida por medio del rotavapor. Al concentrar las diferentes fracciones se obtuvieron mezclas de sólidos. En la tabla 4 se pueden observar los rendimientos del residuo orgánico de cada fracción, respecto al total del extracto y los rendimientos de las mezclas de sólidos en función de las fracciones.

Tabla 4. Rendimiento de las mezclas de sólidos precipitados en las diferentes fracciones obtenidas de la separación del Extracto de AcOEt.

Fracción	Rendimiento % (g) <sup>a</sup>	Sólido (g)	Rendimiento (%) <sup>b</sup>
<i>n</i> -hex/Me <sub>2</sub> CO (80:20)	44.8 (123.5)	-	-
<i>n</i> -hex/AcOEt (80:20)	1.5 (4.3)	0.6417	14.9
<i>n</i> -hex/AcOEt (60:40)	3.6 (9.9)	0.3497	3.5
<i>n</i> -hex/AcOEt (40:60)	2.9 (8.0)	0.4958	6.1
<i>n</i> -hex/AcOEt (20:80)	1.7 (4.9)	0.8233	16.8
AcOEt	0.6 (1.9)	0.2624	13.8

<sup>a</sup>Rendimiento del residuo de cada fracción con respecto al total de extracto crudo.

<sup>b</sup>Rendimiento de la mezcla de sólidos con respecto al total de cada fracción.

Los diferentes residuos obtenidos de la separación cromatográfica del extracto “*crudo*” fueron purificados mediante técnicas cromatográficas, con la finalidad de poder conocer los metabolitos mayoritarios presentes en cada una de ellas. Una vez lograda la purificación, se procedió su identificación y caracterización por medio de técnicas espectroscópicas —IR, RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C—, espectrométricas —EM (IE)— y propiedades físicas —pf, solubilidad, R<sub>f</sub>—.

### 7.6.1 Identificación del β-sitosterol

La recromatografía de las fracciones 19-24 obtenidas con *n*-hex/AcOEt (7.5:2.5) de la separación del residuo con *n*-hex/Me<sub>2</sub>CO, se obtuvieron 32.7 mg de un sólido blanco cristalino, el cual fue identificado como el β-sitosterol, con base a sus propiedades físicas y por comparación con una muestra auténtica, ver figura 21.

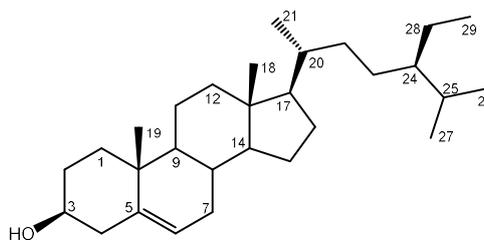


Figura 21. β-sitosterol.

## 6.7. Identificación de las lactonas sesquiterpénicas en el extracto con AcOEt de las partes aéreas de *A. ludoviciana* subsp *mexicana*.

### 6.7.1. Estafiatina (13)

Para la identificación de las lactonas sesquiterpénicas en el extracto con AcOEt de las partes aéreas de *A. ludoviciana* subsp *mexicana* de las fracciones 29-38 obtenidas al eluir la columna con *n*-hex/AcOEt (70:30), se obtuvo una mezcla de sólidos (1.0236 g). La purificación de 100 mg de la mezcla de sólido por CC-Flash, permitió la obtención de 64.7 mg (64.7%) de un sólido cristalino de pf 98-100°C [84-86 °C][26] y con un R<sub>f</sub> de 0.35 [*n*-hex/AcOEt (8.0:2.0)], el cual fue identificado como la estafiatina (**13**) con base en sus propiedades espectroscópicas, ver figura 22.

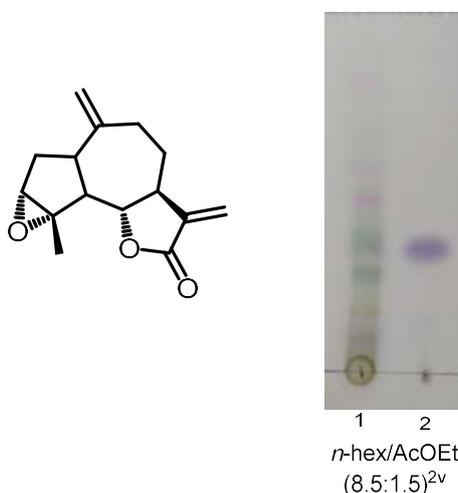


Figura 22. CCF de la purificación de la estafiatina (**13**).

1) fracción *n*-hex/Me<sub>2</sub>CO, 2) estafiatina pura.

Rotación óptica [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -21.82 (*c* 1.01, CHCl<sub>3</sub>)

IR (cm<sup>-1</sup>): 3023, 2945, 1763, 1261, 1142, 999.

RMN <sup>1</sup>H [CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz, TMS, espectro 1]:  $\delta_H$  2.06 (*dd*, *J* = 14.5, 7.5 Hz, 1H, H-1),  $\delta_H$  2.89 (*dd*, *J* = 18 Hz, 1H, H-2 <sub>$\alpha$</sub> ),  $\delta_H$  1.81 (*dd*, *J* = 1, 11, 14 Hz, 1H, H-2 <sub>$\beta$</sub> ),  $\delta_H$  3.38 (*sa*, 1H, H-3),  $\delta_H$  2.21 (*dd*, *J* = 9 Hz, 1H, H-5),  $\delta_H$  4.08 (*dd*, *J* = 11, 9 Hz, 1H, H-6),  $\delta_H$  2.26 (*m*, 1H, H-7),  $\delta_H$  2.20 (*m*, 1H, H-8 <sub>$\alpha$</sub> ),  $\delta_H$  1.52 (*m*, 1H, H-8 <sub>$\beta$</sub> ),  $\delta_H$  2.30 (*m*, 1H, H-9 <sub>$\alpha$</sub> ),  $\delta_H$  2.87 (*m*, 1H, H-9 <sub>$\beta$</sub> ),  $\delta_H$  5.48 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13 <sub>$\alpha$</sub> ),  $\delta_H$  6.20 (*d*, *J* = 3 Hz, 1H, H-13 <sub>$\beta$</sub> ),  $\delta_H$  4.94 (*d*, *J* = 1 Hz, 1H, H-14 <sub>$\alpha$</sub> ),  $\delta_H$  4.86 (*d*, *J* = 1 Hz, 1H, H-14 <sub>$\beta$</sub> ),  $\delta_H$  1.63 (*s*, 3H, H-15).

RMN <sup>13</sup>C [CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, TMS, espectro 2]:  $\delta_C$  44.9 (C-1),  $\delta_C$  33.0 (C-2),  $\delta_C$  63.2 (C-3),  $\delta_C$  65.8 (C-4),  $\delta_C$  50.8 (C-5),  $\delta_C$  80.5 (C-6),  $\delta_C$  44.1 (C-7),  $\delta_C$  28.6 (C-8),  $\delta_C$  29.2 (C-

9),  $\delta_c$  146.1 (C-10),  $\delta_c$  139.6 (C-11),  $\delta_c$  169.7 (C-12),  $\delta_c$  120.1 (C-13),  $\delta_c$  115.3 (C-14),  $\delta_c$  18.5 (C-15).

EM (IE) [ $m/z$ , *int. rel.*]: 246 [ $M^+$ , 2.5], 231 (98), 234 (25), 162 (34), 105 (37), 97 (100), 95 (97), 91 (72), 53 (46), 43 (66).

### 6.7.2. Achillina (8)

Las fracciones 56-72 obtenidas con *n*-hex/AcOEt (7.5:2.5) del residuo obtenido con la mezcla de *n*-hex/Me<sub>2</sub>CO, fueron recromatografiadas por medio de CC-Flash utilizando como mezcla de eluyente *n*-hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (8.0:1.0:1.0), en las fracciones 10-18 se obtuvo una mezcla de sólidos (728 mg), la cual en CCF se observa la presencia de dos sustancias mayoritarias, las cuales revelan de color naranja y negro al utilizar como revelador una sol. de vainillina en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>8</sup>. El residuo de las fracciones 14-311 fue decolorado con carbón activado<sup>9</sup>, el sobrante fue separado por CC-Flash con mezclas de *n*-hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de concentración (9.5:0.5) y (9.0:1.0). En las fracciones 14-22 y 32-48 se obtuvo una mezcla (215.8 mg) de dos sustancias de R<sub>f</sub> similares, las cuales fueron purificadas por cristalización por par de disolventes AcOEt/*n*-hexano), de donde se obtuvieron 130.5 mg (60.5 %) de un sólido de pf. 138-140°C [142-145°C] [24] y con un R<sub>f</sub> de 0.4 [*n*-hex/AcOEt (6.0:4.0)], ver figuras 23.

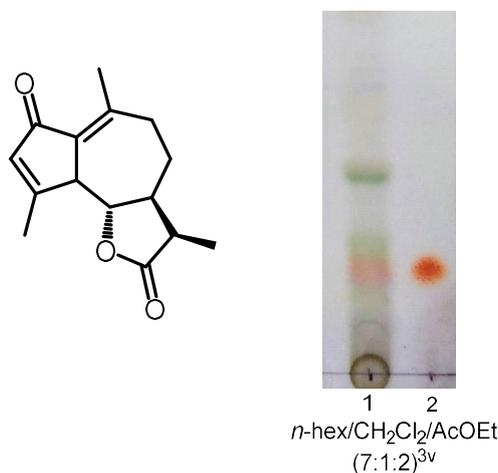


Figura 23. CCF de la purificación de la achillina (8).

1) fracción *n*-hex/Me<sub>2</sub>CO, 2) achillina pura.

Rotación óptica [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 145.70 (*c* 0.7, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>8</sup> Al utilizar una solución de vainillina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> la achillina revela de color rojo.

<sup>9</sup> Para la decoloración se empleó una columna de vidrio empacada con florisil/celita/carbón activado (1:1:0.5), la cual inicialmente se lavó con MeOH caliente, posteriormente se agregó el residuo disuelto en AcOEt.

IR (cm<sup>-1</sup>): 1780, 1685, 1638, 1620.

RMN <sup>13</sup>C [CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz, TMS, espectro 4]: δ<sub>C</sub> 131.8 (C-1), δ<sub>C</sub> 195.7 (C-2), δ<sub>C</sub> 135.4 (C-3), δ<sub>C</sub> 170.0 (C-4), δ<sub>C</sub> 53.0 (C-5), δ<sub>C</sub> 83.5 (C-6), δ<sub>C</sub> 57.9 (C-7), δ<sub>C</sub> 21.6 (C-8), δ<sub>C</sub> 37.5 (C-9), δ<sub>C</sub> 151.6 (C-10), δ<sub>C</sub> 39.4 (C-11), δ<sub>C</sub> 178.2 (C-12), δ<sub>C</sub> 9.9 (C-13), δ<sub>C</sub> 19.7 (C-14), δ<sub>C</sub> 21.5 (C-15).

EM (IE) [*m/z*, *int. rel.*]: 246 [M<sup>+</sup>, 100], 231 (7.3), 217 (26), 173 (23), 145 (15), 115 (10), 105 (16), 91 (44), 77 (16), 55 (15).

### 6.7.3. Ridentina (4)

La obtención de la ridentina se logró de la separación cromatografía del extracto “*crudo*” de AcOEt con la mezcla *n*-hex/AcOEt (60:40), se obtuvo una mezcla de sólidos (349.7 mg), el residuo de las aguas madres correspondientes (7 g) fue adsorbido en florisil (9.5 g) para su separación y purificación por medio de CC, la columna fue eluida con mezclas de *n*-hex/AcOEt de polaridad creciente.

En las fracciones 71-138 se observó por CCF una sustancia de color azul al revelar con vainillina, estas fracciones se reunieron con las obtenidas de la mezcla *n*-hex/AcOEt (60:40). A partir de 160.7 mg de la mezcla de residuos se purificó mediante cristalización por par de disolventes [MeOH caliente/*i*-Pr<sub>2</sub>O], un sólido cristalino blanco (157.3 mg, 97.8%) de pf. 198-200°C [202-203°C][24] y con un R<sub>f</sub> de 0.4 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt/MeOH (3.5:6.0:0.2)], ver figura 24.

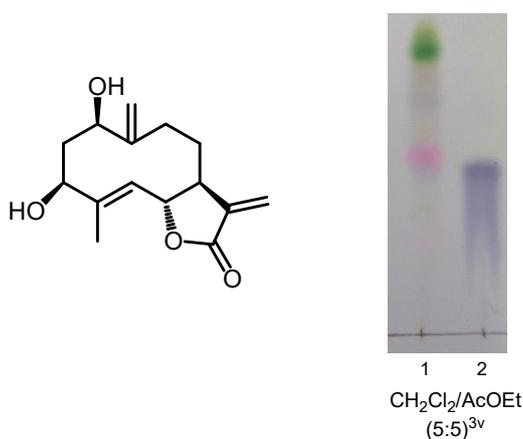


Figura 24. CCF de la purificación de la ridentina (4).  
1) fracción de *n*-hex/AcOEt (60:40), 2) Ridentina pura.

Rotación óptica [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 82.5 (*c* 1.6, MeOH).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3334, 1763.

RMN <sup>1</sup>H [CDCl<sub>3</sub> + DMSO, 400 MHz, TMS, espectro 5]: δ<sub>H</sub> 4.04 (*dd*, J=9, 4 Hz, 1H, H-1), δ<sub>H</sub> 1.89 (*dd*, J=14, 9 Hz, 1H, H-2<sub>β</sub>), δ<sub>H</sub> 1.82 (*ddd*, J=14, 7, 4 Hz, 1H, H-2<sub>α</sub>), δ<sub>H</sub> 3.76 (*dd*, J=9, 4 Hz, 1H, H-3), δ<sub>H</sub> 5.28 (*d*, J=10 Hz, 1H, H-5), δ<sub>H</sub> 4.48 (*t*, J=10 Hz, 1H, H-6), δ<sub>H</sub> 2.79 (*dddd*, J=10, 10, 3 Hz, 1H, H-7), δ<sub>H</sub> 1.90 (*ddd*, J=14, 10, 9 Hz, 1H, H-8<sub>β</sub>), δ<sub>H</sub> 1.52 (*dddd*, J=14, 10, 9, 3 Hz, 1H, H-8<sub>α</sub>), δ<sub>H</sub> 2.38 (*ddd*, J=14, 14, 3 Hz, 1H, H-9<sub>β</sub>), δ<sub>H</sub> 2.23 (*ddd*, J=9, 9, 3 Hz, 1H, H-9<sub>α</sub>), δ<sub>H</sub> 5.54 (*d*, J=3 Hz, 1H, H-13<sub>a</sub>), δ<sub>H</sub> 5.97 (*d*, J=3 Hz, 1H, H-13<sub>b</sub>), δ<sub>H</sub> 4.79 (*sa*, 1H, H-14<sub>a</sub>), δ<sub>H</sub> 5.03 (*sa*, 1H, H-14<sub>b</sub>), δ<sub>H</sub> 1.58 (*d*, J=1.5 Hz, 3H, H-15).

El espectro de RMN <sup>1</sup>H utilizando DMSO y D<sub>2</sub>O permitió asignar las señales en el intervalo δ<sub>H</sub> 3.0-1.6, como se muestra en la figura 25.

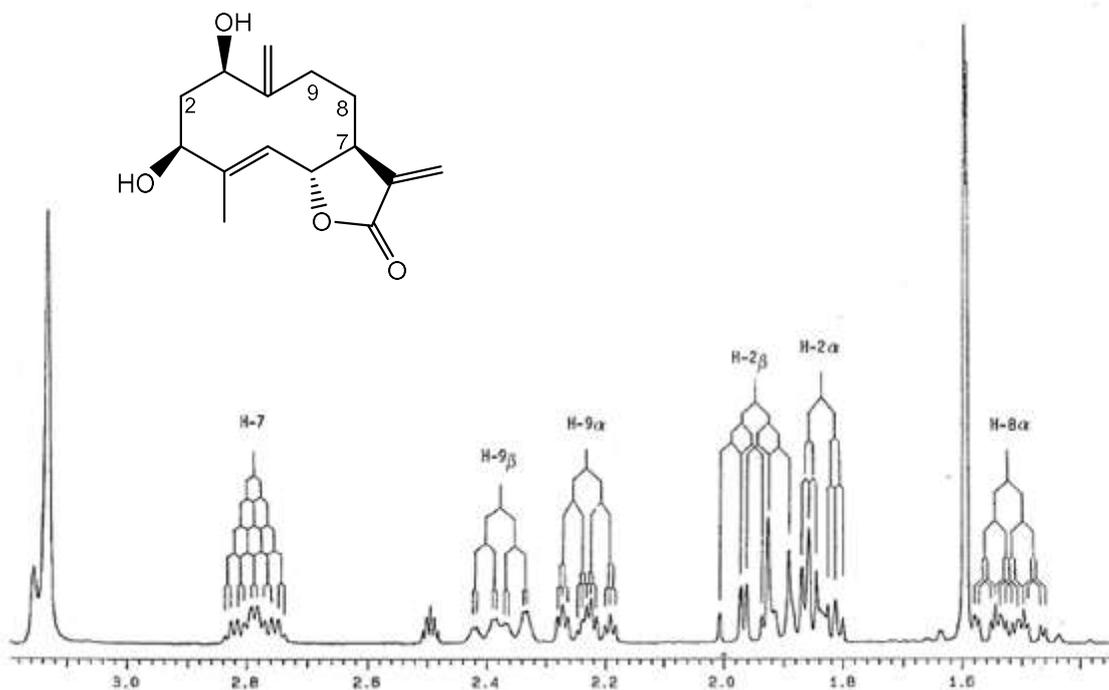


Figura 25. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO y D<sub>2</sub>O) de la ridentina (4).

RMN <sup>13</sup>C [CDCl<sub>3</sub>, 120 MHz, TMS, espectro 6]: δ<sub>C</sub> 73.0<sup>10</sup> (C-1), δ<sub>C</sub> 40.2 (C-2), δ<sub>C</sub> 74.1 (C-3), δ<sub>C</sub> 147.3<sup>11</sup> (C-4), δ<sub>C</sub> 119.9 (C-5), δ<sub>C</sub> 79.2 (C-6), δ<sub>C</sub> 47.3 (C-7), δ<sub>C</sub> 25.2 (C-8), δ<sub>C</sub> 28.5 (C-9), δ<sub>C</sub> 148.9 (C-10), δ<sub>C</sub> 139.1 (C-11), δ<sub>C</sub> 169.2 (C-12), δ<sub>C</sub> 117.5 (C-13), δ<sub>C</sub> 109.8 (C-14), δ<sub>C</sub> 10.8 (C-15).

<sup>10</sup> Señal intercambiable para C-3.

<sup>11</sup> Señal intercambiable para C-10

EM (IE) [ $m/z$ , *int. rel.*]: 264 [ $M^+$ , 0.1], 219 (10), 175 (32), 149 (40), 105 (48), 91 (100), 79 (50), 53 (66), 43 (60), 41 (55).

#### 6.7.4. Compuesto en proceso de caracterización.

De la separación cromatografía del extracto “*crudo*” de AcOEt con la mezcla *n*-hexano/AcOEt (20:80), se obtuvo una mezcla de sólidos (823.3 mg), de los cuales se tomaron 200 mg para su purificación por CC-Flash, utilizando mezclas de  $CH_2Cl_2$ /AcOEt de polaridad creciente. En las fracciones 70-79, 107-123 se obtuvo una mezcla de sólidos (52 mg), el cual fue purificado por medio de cristalización por par de disolventes [MeOH caliente/*i*-Pr<sub>2</sub>O], obteniendo un sólido blanco (16.2 mg), de pf. 110°C, ver figura 26.



Figura 26. CCF de la purificación del compuesto.  
1) mezcla de sólidos y 2) sólido puro.

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1. Determinación de la actividad antifúngica de los diferentes extractos “*crudos*” de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*

Para evaluar la actividad antifúngica de los extractos “*crudos*” se utilizó el método de medio envenenado, el cual es uno de los más utilizados para dicha valoración, en este se observa la reducción del crecimiento micelial de los hongos en placas con los extractos a evaluar y se compara con el crecimiento de los hongos en las placas control [44-45].

Durante el estudio el extracto MeOH (20 mg/mL) no mostró inhibición, mientras que a 40 mg/mL se observó un retraso en el crecimiento de los tres hongos durante las primeras 24 h en comparación al blanco del hongo, como se observa en la tabla 5. A partir de las 48 h, revisar tabla 6 y hasta las 72 h, distinguir los datos de la tabla 7, se puede ver que el crecimiento del hongo es similar al testigo. Resultado acorde con algunos otros estudios que muestran la poca o nula actividad antifúngica de algunos extractos con MeOH de diferentes plantas [46].

Los extractos con *n*-hexano y AcOEt (40 mg/mL) inhibieron el crecimiento de *Penicillium sp.*, durante las 72 h que duro el ensayo. Mientras que dichos extractos mostraron un retraso en el crecimiento a las 24 h (tabla 5) y 48 h (tabla 6) de *A. niger* y *Trichoderma sp.* Después de 72 h se observó un crecimiento similar para dichos hongos con respecto a sus blancos, como se puede observar en la tabla 7. Lo anterior puede ser fundamentado en función de la composición química de cada extracto. Por ejemplo, el extracto hexánico tiene compuestos de baja polaridad, como aceites esenciales, monoterpenos, grasas, ácidos grasos, ceras, entre otras [20]. En cuanto al extracto con AcOEt, presenta la mayor cantidad de LsS, debido a la mediana polaridad de estas, por lo que probablemente se puede atribuir su eficacia contra *Penicillium sp.* [30, 31]. Con base en lo anterior se planeó el estudio biodirigido del extracto con AcOEt para el aislamiento de las LsS presentes en el mismo.

El fluconazol no mostró inhibir a ninguno de los hongos a una concentración de 25 mg/mL; por lo que se evaluó a una concentración mayor (30 mg/mL) observando un retardo en el crecimiento durante las 24 h (tabla 5) y 48 h (tabla 6) de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*; mientras *A. niger* fue inhabilitado por dicha sustancia durante todo el ensayo.

En algunos textos se describe que el fluconazol no tiene ningún efecto sobre hongos filamentosos, por lo que difiere a los resultados de este ensayo, ya que *A. niger* fue inhibido en su totalidad [47].

Tabla 5. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos “*crudos*” —*n*-hexano, AcOEt y MeOH—<sup>a,b,c</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hexano	AcOEt	MeOH	Fluconazol
<i>Aspergillus niger</i>					
<i>Penicillium sp.</i>					
<i>Trichoderma sp.</i>					

<sup>a</sup>Concentración: 40 mg/mL

<sup>b</sup>Fluconazol: 30 mg /mL

<sup>c</sup>24 horas de incubación

Tabla 6. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos “*crudos*” —*n*-hexano, AcOEt y MeOH—<sup>a,b,c</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hexano	AcOEt	MeOH	Fluconazol
<i>Aspergillus niger</i>					
<i>Penicillium sp.</i>					
<i>Trichoderma sp.</i>					

<sup>a</sup>Concentración: 40 mg/mL

<sup>b</sup>Fluconazol: 30 mg /mL

<sup>c</sup>48 horas de incubación

Tabla 7. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos “*crudos*” —*n*-hexano, AcOEt y MeOH—<sup>a,b,c</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hexano	AcOEt	MeOH	Fluconazol
<i>Aspergillus niger</i>					
<i>Penicillium sp.</i>					
<i>Trichoderma sp.</i>					

<sup>a</sup>Concentración: 40 mg/mL

<sup>b</sup>Fluconazol: 30 mg /mL

<sup>c</sup>72 horas de incubación

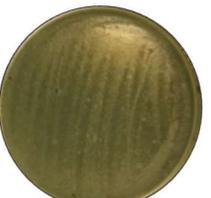
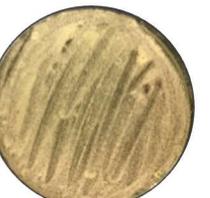
## 7.2. Determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt

En la determinación de la actividad antifúngica de las diferentes fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt, ninguna de las fracciones mostró inhibición en el crecimiento de *A. niger* durante las 72 h (ver tablas 8-10), tiempo en que se realizó el ensayo. En cambio, se observó un retraso en el crecimiento de *Trichoderma sp.* con las fracciones *n*-hex (100%), *n*-hex/AcOEt (80:20) y *n*-hex/AcOEt (60:40) durante las primeras 24 h (tabla 8). Mientras a las 48 h el crecimiento de *Trichoderma sp.* fue equiparable con el crecimiento del hongo en el blanco, como lo confirman los datos de la tabla 9.

Con respecto a *Penicillium sp.*, se observó que todas las fracciones mostraron una inhibición del crecimiento durante las 72 h, tiempo en que se llevó a cabo el ensayo (ver tablas 8-10); exceptuando la fracción de *n*-hex (100%), en la cual se comenzó a percibir un ligero crecimiento en comparación al blanco, a las 72 h, ver tabla 10.

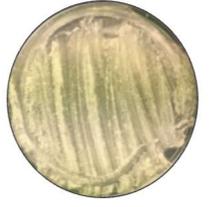
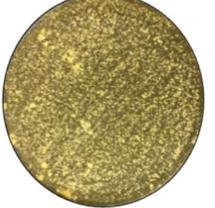
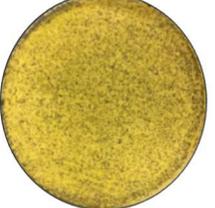
Dado que todas las fracciones mostraron tener actividad relevante frente a *Penicillium sp.* se prosiguió a realizar la separación cromatográfica de las fracciones con la finalidad de aislar e identificar las LsS mayoritarias presentes en las diferentes fracciones. En otras investigaciones se han descrito diversos estudios biodirigidos con la finalidad de identificar los compuestos responsables de la actividad en diferentes extractos de plantas [48-50].

Tabla 8. Determinación de la actividad antifúngica de las fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt <sup>a</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hex (100%)	<i>n</i> -hex/AcOEt (80:20)	<i>n</i> -hex/AcOEt (60:40)	<i>n</i> -hex/AcOEt (40:60)	<i>n</i> -hex/AcOEt (20:80)	AcOEt (100%)
<i>Aspergillus niger</i>							
<i>Penicillium sp.</i>							
<i>Trichoderma sp.</i>							

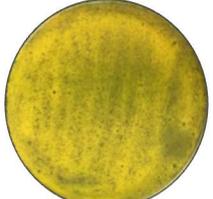
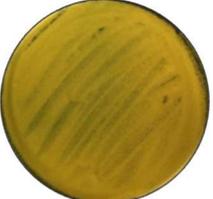
<sup>a</sup>24 horas de incubación

Tabla 9. Determinación de la actividad antifúngica de las fracciones del extracto “crudo” con AcOEt <sup>a</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hex (100%)	<i>n</i> -hex/AcOEt (80:20)	<i>n</i> -hex/AcOEt (60:40)	<i>n</i> -hex/AcOEt (40:60)	<i>n</i> -hex/AcOEt (20:80)	AcOEt (100%)
<i>Aspergillus niger</i>							
<i>Penicillium sp.</i>							
<i>Trichoderma sp.</i>							

<sup>a</sup>48 horas de incubación

Tabla 10. Determinación de la actividad antifúngica de las fracciones del extracto “*crudo*” con AcOEt <sup>a</sup>.

Hongos	Blanco	<i>n</i> -hex (100%)	<i>n</i> -hex/AcOEt (80:20)	<i>n</i> -hex/AcOEt (60:40)	<i>n</i> -hex/AcOEt (40:60)	<i>n</i> -hex/AcOEt (20:80)	AcOEt (100%)
<i>Aspergillus niger</i>							
<i>Penicillium sp.</i>							
<i>Trichoderma sp.</i>							

<sup>a</sup>72 horas de incubación

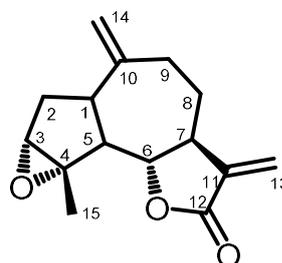
### 7.3. Identificación de la estafiatina (13)

Para realizar el proceso de identificación de la estafiatina se requirió de las fracciones menos polares obtenidas de la separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt, después de sucesivas recromatografías, se identificó a la estafiatina (13), la cual muestra en su EM (IE) un ion molecular de  $m/z$  246 (2.5 %) que corresponde a una forma molecular  $C_{15}H_{18}O_3$  ( $\Omega=7$ ). En su espectro de IR muestra las absorciones características del grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona  $1773\text{ cm}^{-1}$ .

En su espectro de RMN- $^1H$  (espectro 1), se observan las señales correspondientes al metileno exocíclico de la  $\gamma$ -lactona en  $\delta_H$  5.48 (*d*,  $J=3\text{ Hz}$ , 1H) y  $\delta_H$  6.20 (*d*,  $J=3\text{ Hz}$ , 1H); así como, la presencia de una señal *dd* en  $\delta_H$  4.08 ( $J=11, 9\text{ Hz}$ , 1H) que corresponde a H-6, característico del cierre de la lactona. Además, muestra un acoplamiento con la señal en  $\delta_H$  2.21 que corresponde a H-5, los cuales muestran una disposición *trans* diaxial *exo*-cíclico. La señal en  $\delta_H$  3.38 (*sa*, 1H) se asignó al hidrogeno geminal del C-3 base de epóxido. La presencia del oxirano se confirmó por RMN- $^{13}C$  donde los C-3 y C-4 presentan  $\delta_C$  63.2 y 65.8 ppm respectivamente. En la tabla 11 se muestran los desplazamientos químicos de todos los carbonos presentes en 13, de acuerdo con su espectro de RMN  $^{13}C$  aplicando la técnica del DEPT, ver figura 26.

Tabla 11. RMN  $^{13}C$  (120 MHz,  $CDCl_3$ ) para la estafiatina (13)

Carbono	$\delta_C$	Multiplicidad
C-1	44.9	CH
C-2	33.0	CH <sub>2</sub>
C-3	63.2	CH
C-4	65.8	C
C-5	50.8	CH
C-6	80.5	CH
C-7	44.1	CH
C-8	28.6	CH <sub>2</sub>
C-9	29.2	CH <sub>2</sub>
C-10	146.1	C
C-11	139.6	C
C-12	169.7	C
C-13	120.1	CH <sub>2</sub>
C-14	115.3	CH <sub>2</sub>
C-15	18.5	CH <sub>3</sub>



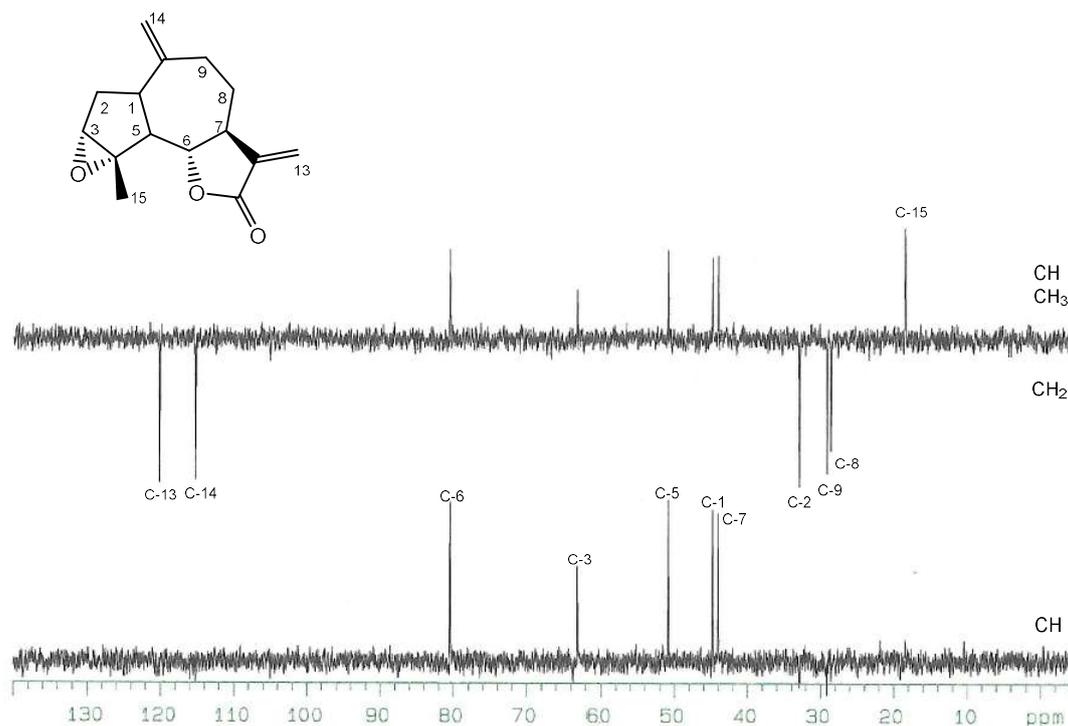


Figura 26. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (experimento DEPT) de la estafiatina (**13**).

Los desplazamientos químicos de los hidrógenos adicionales se lograron por medio del análisis del espectro bidimensional HMBC, ver figura 27, el cual se observa la correlación a dos y tres enlaces entre los átomos de C e H.

A partir de esta discusión, se confirmó que la LsS aislada es la estafiatina (**13**), esta es una sustancia que en estudios recientes ha mostrado su capacidad para inhibir selectivamente las fases iniciales de activación de los receptores de linfocitos  $\text{T}^{12}$  (RCT) [51].

<sup>12</sup> Los linfocitos T son esenciales en la respuesta inmunológica, la desregulación de estos puede contribuir en el desarrollo de enfermedades autoinmunes [51]

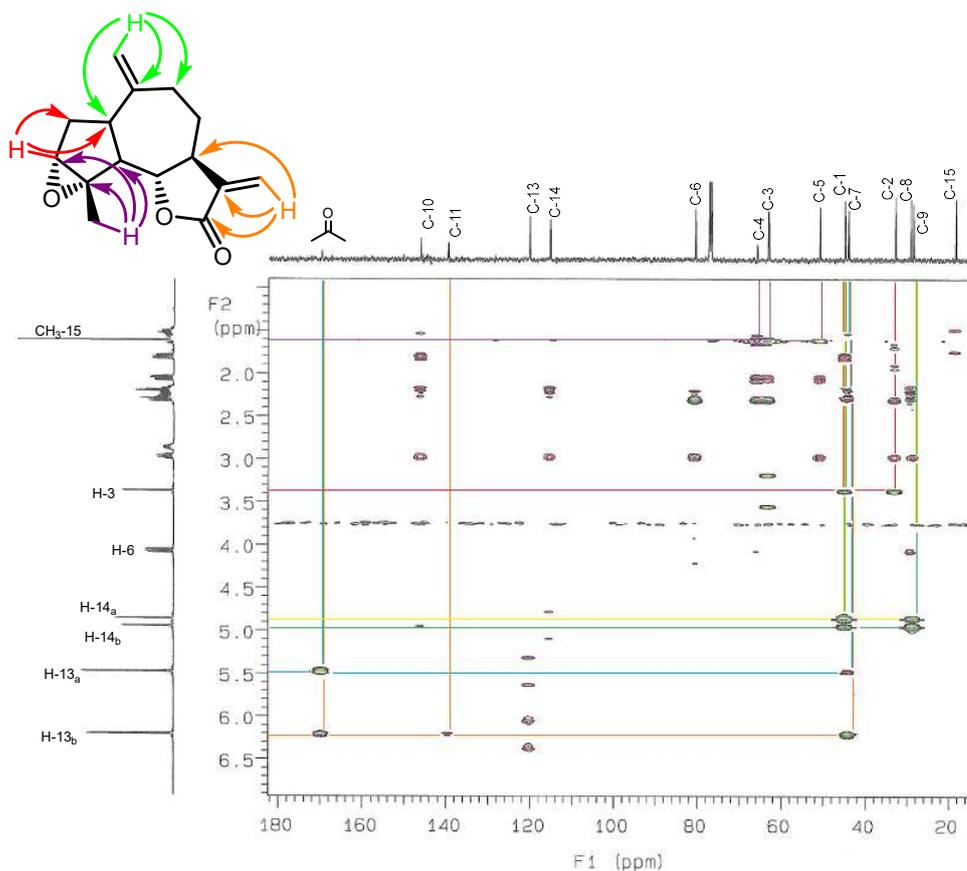


Figura 27. Experimento HMBC de la estafiatina (**13**).

#### 7.4. Identificación de la achillina (**8**)

Durante este proceso se requirieron las fracciones de menor polaridad obtenidas de la separación cromatográfica del extracto con AcOEt, se identificó a la achillina (**8**), ya que esta muestra en su EM (IE) un ion molecular de  $m/z$  246 (100%), el cual corresponde a una fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_3$  ( $\Omega=7$ ). En su espectro de IR se observa la absorción característica del grupo carbonilo en  $1780\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^{13}C$  (espectro 4) se confirmó la presencia de 15 carbonos, lo cual está acorde con la fórmula molecular propuesta, donde se observan seis C  $sp^2$  y nueve C  $sp^3$ . La naturaleza de los diferentes átomos de carbono fue determinada por el experimento DEPT, donde se observan tres metilos ( $CH_3$ ), dos metilenos ( $CH_2$ ), cinco metinos ( $CH$ ) y cinco carbonos cuaternarios (C), ver figura 28.

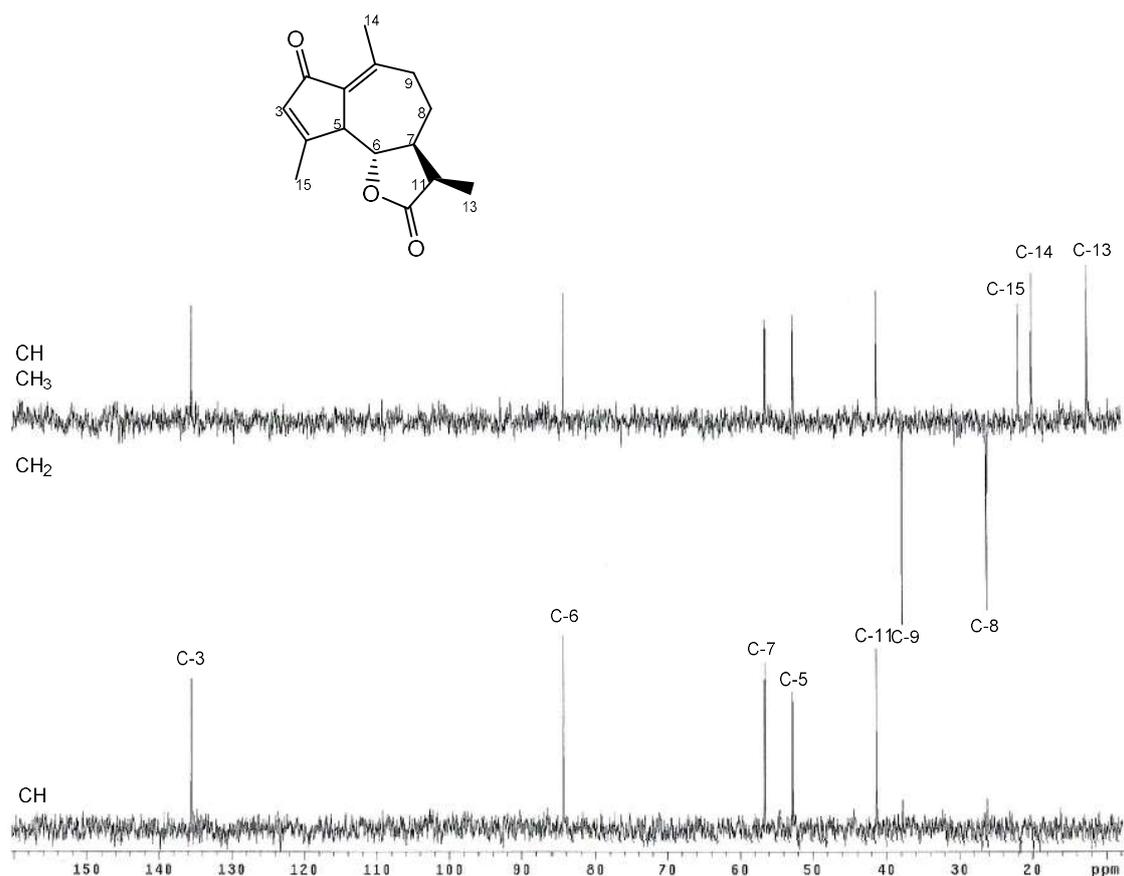


Figura 28. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (experimento DEPT) de la achillina (**8**).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 5) se observa una señal  $\delta_{\text{H}}$  3.8 (*t*,  $J= 10$  Hz, 1H) característica de H-6 con disposición  $\beta$ -axial del cierre de la lactona con fusión *trans*. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.38 (1 H) se asignó al H-alílico del C-5, el cual presenta un acoplamiento *trans*-diaxial con H-6, mientras que la presencia de los dos metilos vinílicos en 2.42 (*s*, 3H) y  $\delta_{\text{H}}$  2.31 (*d*,  $J= 1.5$  Hz, 3H) sugiriendo, que el esqueleto base corresponde al de una guayanólida, asignándose dichos desplazamientos al  $\text{CH}_3$ -14 y  $\text{CH}_3$ -15, el cual muestra un acoplamiento alílico con la señal  $\delta_{\text{H}}$  6.14, (*c*,  $J= 1.5$  Hz, 1H) que corresponde con H-3.

De la discusión anterior se pueden plantear dos hipótesis estructurales epiméricas achillina (**8**) y leucodina (**25**), ver figura 29.

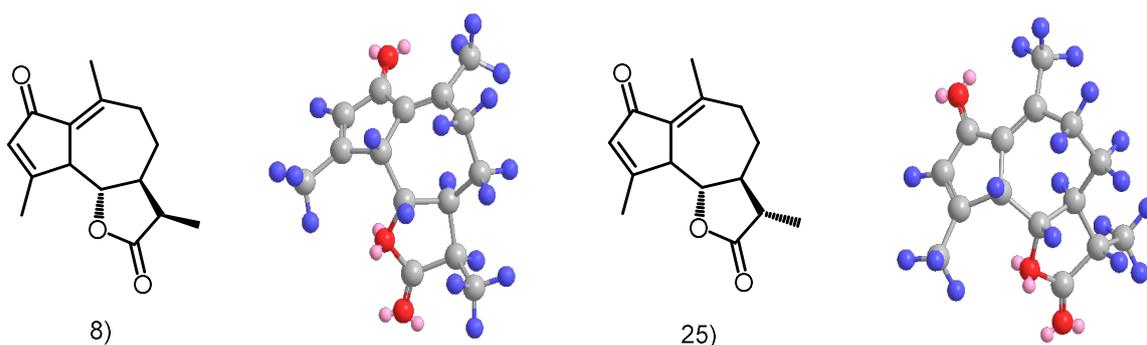


Figura 29. Estructuras epiméricas achillina (8) y leucodina (25)

La orientación relativa del CH<sub>3</sub>-13 se dedujo con base en la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 ( $J = 10$  Hz), este valor está de acuerdo con una disposición *cis* (sinclinal) de los hidrógenos mencionados, ver figura 30. Por consiguiente, el CH<sub>3</sub>-13 presenta una orientación  $\beta$ , mientras en la leucodina los hidrogenos tienen una disposición antiperiplanar.

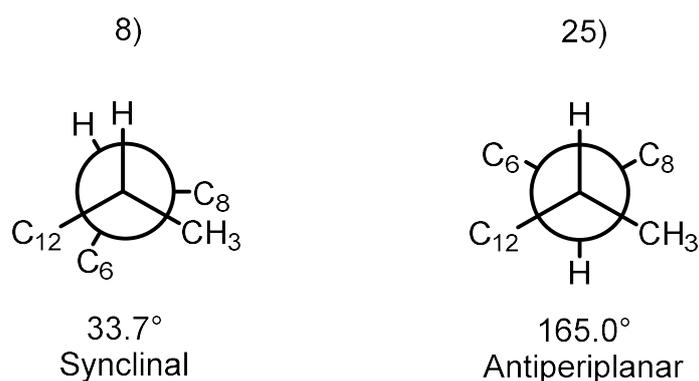


Figura 30. Proyecciones de Newmann para los C<sub>7</sub> – C<sub>11</sub> en la achillina (8) y leucodina (25).

Con base en la discusión anterior se corroboró que la LsS aislada es la achillina (8), sustancia aislada de varias especies vegetales de los géneros *Artemisia*, *Achillea*, *Tanacetum*, entre otros [52-54].

#### 7.5. Identificación de la ridentina (4)

El siguiente proceso partió de las fracciones más polares obtenidas de la separación cromatográfica del extracto “*crudo*” con AcOEt, y se logró identificar a la ridentina (4), la cual muestra en su EM (IE) un ion molecular de  $m/z$  264 (0.1 %) que corresponde a una fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> ( $\Omega=6$ ). En su espectro de IR muestra las absorciones características de un grupo OH (3334 cm<sup>-1</sup>) y del grupo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona 1773 cm<sup>-1</sup>.

En su espectro de RMN- $^1\text{H}$  (espectro 3), se observa un par de dobletes  $\delta_{\text{H}}$  5.97 (*d*,  $J=3$  Hz, 1H) y 5.54 (*d*,  $J=3$  Hz, 1 H) que corresponde a los hidrógenos del metileno exocíclico conjugado con la  $\gamma$ -lactona. Además de un triplete en  $\delta_{\text{H}}$  4.48 (*t*,  $J=10$  Hz, 1H) se asigna a H-6, este muestra un acoplamiento con el hidrogeno vinílico en H-5 en  $\delta_{\text{H}}$  5.28 (*d*,  $J=10$  Hz, 1H), el cual sugiere que existe un doble enlace ente los C-4 y C-5. En el C-4 se ubica el metilo que aparece en  $\delta_{\text{H}}$  1.58 (*d*, 3H) y que corresponde al  $\text{CH}_3$ -15. La señal amplia en  $\delta_{\text{H}}$  4.79 (2H) corresponde a los hidrógenos del metileno exocíclico localizado en el C-10. Lo anterior permite proponer una lactona sesquiterpénica con esqueleto de germacrano, como se muestra en la figura 31.

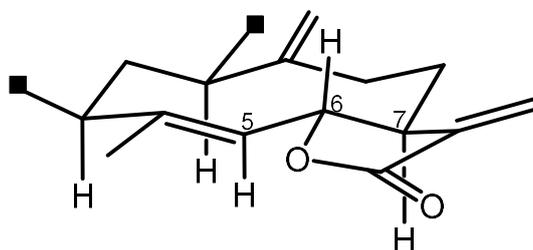


Figura 31. Fórmula parcial de la lactona sesquiterpénica.

Por otro parte, se observan señales correspondientes a dos hidrógenos germinales del grupo hidroxilo, que por su constante de acoplamiento tienen la misma orientación espacial, la ubicación de los grupos hidroxilo en la molécula se realizó mediante el análisis de su espectro COSY, ver figura 32.

En la figura 32 se observa que la señal entre 2.00-1.80 ppm interacciona con H-1  $\delta_{\text{H}}$  4.04 (*dd*,  $J=9$  y 4 Hz) y H-3  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (*dd*,  $J=$ ), Sugiriendo que los hidrógenos tienen una orientación relativa  $\alpha$ -axial.

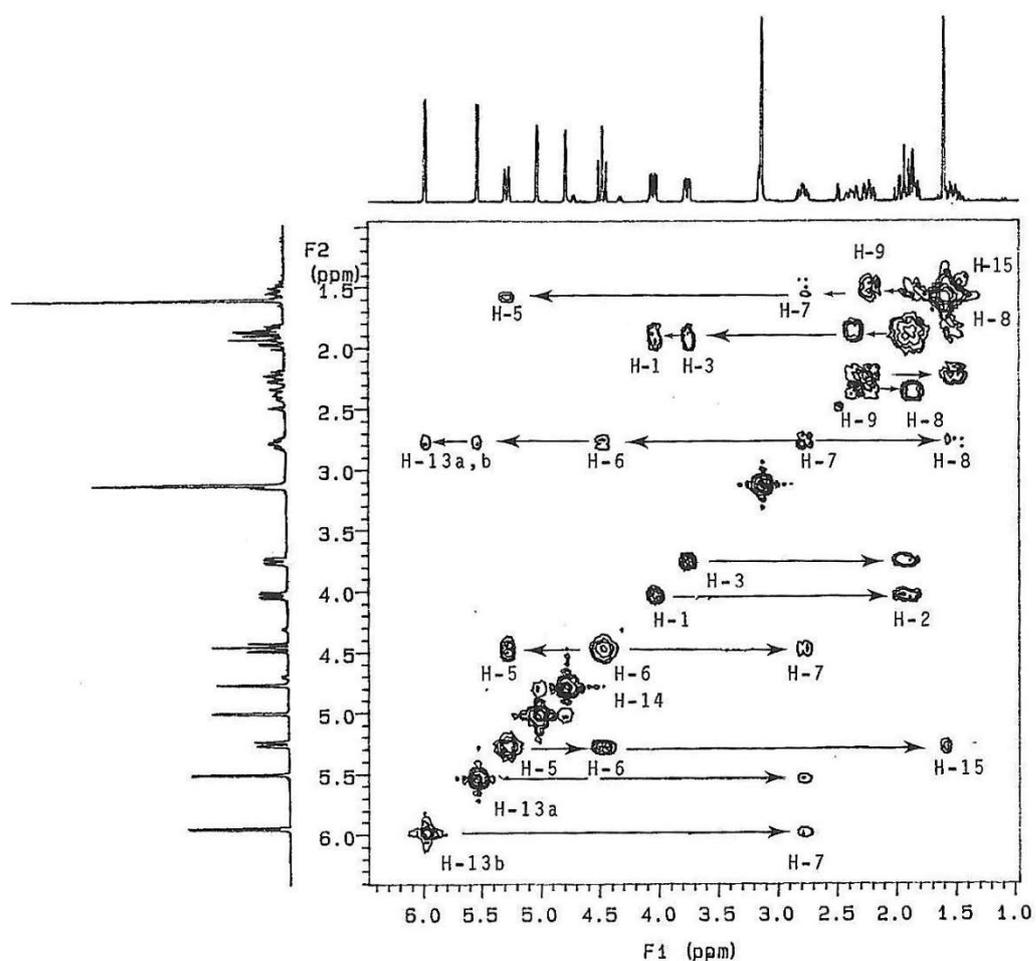


Figura 32. Experimento COSY de la ridentina (4).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 6) se confirmó la presencia de 15 carbonos, lo cual está acorde con la fórmula molecular propuesta, donde se observan siete  $\text{C sp}^2$  y ocho  $\text{C sp}^3$ . La naturaleza de los diferentes átomos de carbono fue determinada por los experimentos APT (ver figura 33) y DEPT (ver espectro 7), donde se observa un metilo ( $\text{CH}_3$ ), cinco metilenos ( $\text{CH}_2$ ), cinco metinos ( $\text{CH}$ ) y cuatro carbonos cuaternarios ( $\text{C}$ ).

De acuerdo con lo anterior se llegó a la conclusión de que la sustancia en cuestión es la ridentina (4), germacranólida aislada principalmente de diferentes especies de *Artemisia* [55-61].

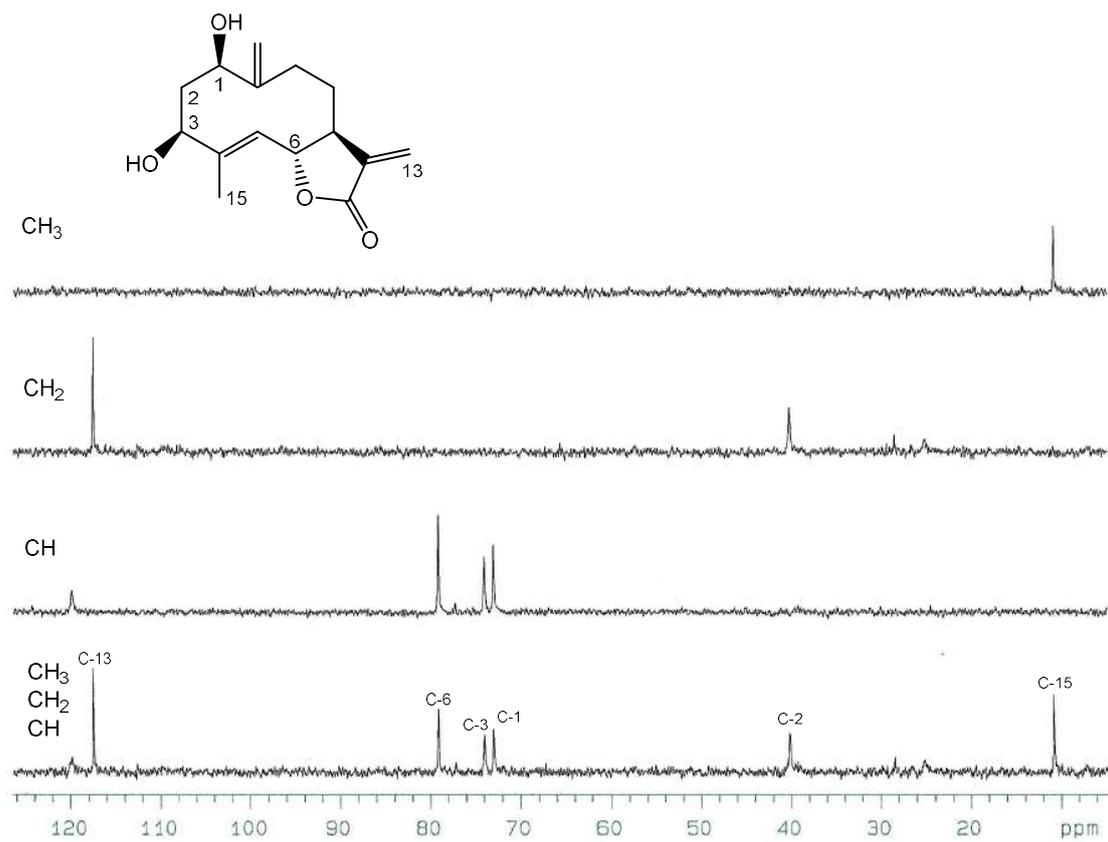


Figura 33. Experimento APT de la ridentina (4).

## 8. CONCLUSIONES

Después de realizar los diferentes estudios y obtener resultados se puede concluir que:

- Se obtuvieron los extractos *n*-hexánico, AcOEt y Metanólico a partir de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*.
- De la evaluación antifúngica de los extractos “*crudos*” —*n*-hexano, AcOEt y MeOH— se observó que los extractos con *n*-hexano y AcOEt mostraron actividad antifúngica frente a *Penicillium sp.*
- Los extractos con *n*-hexano y AcOEt mostraron un retraso en el crecimiento de *A. niger* y *Trichoderma sp.* durante las primeras 48 h.
- El extracto con MeOH no mostro inhibir a ninguno de los tres hongos ensayados a 40 mg/mL.
- De la evaluación antifúngica de las diferentes fracciones se observó que muestran actividad antifúngica frente a *Penicillium sp.*
- De la evaluación antifúngica de las fracciones obtenidas del extracto con AcOEt no inhiben el desarrollo de *A. niger*. Mientras que en las fracciones menos polares se observó que retardan el crecimiento de *Trichoderma sp.* durante las primeras 24 h.
- De la separación cromatográfica del extracto con AcOEt, se lograron aislar e identificar,  $\beta$ -sitosterol, ridentina (**4**), achillina (**8**) y estafiatina (**13**).

## 9. SUGERENCIAS

- A partir de los resultados obtenidos con un rendimiento moderado de las tres LsS identificadas —ridentina (4), achillina (8) y estafiatina (13)— y por la complejidad de su aislamiento, se propone purificar una mayor cantidad de extracto con AcOEt, para así determinar la actividad antifúngica de cada una de ellas y lograr el objetivo inicial del proyecto acorde con el título y.
- Evaluar la actividad antifúngica del extracto con AcOEt frente a un mayor número de hongos.
- Proponer otro tipo de pruebas biológicas con la finalidad de determinar otras actividades de las LsS como, antiherbivoría, antihelmíntica, antiprotozoaria, citotóxica y antitumoral.
- Realizar biotransformación de las lactonas sesquiterpénicas aisladas frente a hongos filamentosos para la obtención de derivados químicamente novedosos.
- Efectuar un estudio comparativo de especies de *Artemisia* recolectadas en diferentes zonas geográficas.
- Formalizar un estudio comparativo de especies de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* cultivada y silvestre.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Vaca, M.; González, A.; Maldonado, Y.; Fernandes, G.; Cuevas, P., Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biológicas*, **2016**, *18*, 10–20.
- 2) Robles, M.; Aguilar, A.; Gutiérrez, M.; Rodríguez, F.; Morales, J.; Guerrero, P.; Madrigal, J.; Del Toro, C., Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxy lumcapiri* PITTIER). *Biocetnia*, **2016**, *18*, 3-8.
- 3) Marín, C.; Céspedes, C. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotecnia Mex.*, **2007**, *30*, 327-351.
- 4) Zhan, Z.; Ying, Y.; Ma, L.; Shan, W., Natural disesquiterpenoids., *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 594-629.
- 5) Sepúlveda, G.; Porta, H.; Rocha, M., La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas, *Rev. Mex. Fitopatol.*, **2003**, *21*, 355-363.
- 6) Olguin, L.; *Transformación microbiológica de tres lactonas sesquiterpénicas — 11,13-dehidroeriolina, 7 $\alpha$ -hidroxi-3-desoxizaluzanina C y  $\alpha$ -santonina— empleando diferentes biocatalizadores (hongos)*. Tesis de licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM, **2016**, 8.
- 7) Yamada, Y.; Kuzuyama, T.; Komatsu, M.; Shin-ya, K.; Omura, S.; Cane, D.; Ikeda, H., Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, 857–862.
- 8) Asadollahi, M.; Maury, J.; Møller, K.; Nielsen, K.; Schalk, M.; Clark, A.; Nielsen, J., Production of Plant Sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 Repression on Sesquiterpene Biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **2008**, *99*, 666-677.
- 9) Majdi, M.; Ashengroph, M.; Abdollahi, M., Sesquiterpene lactone engineering in microbial and plant platforms: parthenolide and artemisinin as case studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, *100*, 1041–1059.
- 10) Dewick, P., Medicinal Natural Products. *A Biosynthetic Approach*. 2<sup>ª</sup>ed, England, Edit. John Wiley & Sons, LTD., **1997**, Pp. 191-194.

- 11) Chong, M.; Kim, E.; Rathwell, K.; Nam, S.; Joon, Y., Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 1497-1509.
- 12) Turak, A.; Shi, S.; Jiang, Y.; Tu, P., Dimeric guaianolides from *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry.*, **2014**, *105*, 109–114.
- 13) Padilla, G.; Antunes, F.; Batista, F., Sesquiterpene Lactones: More Than Protective Plant Compounds with High Toxicity. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **2016**, *35*, 18-37.
- 14) Frey, M.; Schmauder, K.; Pateraki, I.; Spring, O., Biosynthesis of Eupatolide—A Metabolic Route for Sesquiterpene Lactone Formation Involving the P450 Enzyme CYP71DD6. *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 1536–1543.
- 15) Seaman, F., Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* **1982**, *48*, 123-551.
- 16) Ma, C.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Zhu, S.; Komatsu, K., Guaiane dimers and germacranolide from *Artemisia caruifolia*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1626–1629.
- 17) Chadwick, M.; Trewin, H.; Gawthrop, F.; Wagstaff, C., Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*, 12780-12805.
- 18) Katarzyna, G.; Janecka, A.,  $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -lactones as a Novel Class of Anti-leukemic Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2014**, *14*, 688-694.
- 19) Zhang, S.; Won, Y.; Ong, C.; Shen, H., Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 239-249.
- 20) Balderas, J.; *Estudio químico y biológico de Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*. Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM, **1996**, 7-32.
- 21) Rosselli, S.; Bruno, M.; Raimondo, F.; Spadaro, V.; Varol, M.; Koparal, A.; Maggio, A., Cytotoxic Effect of Eudesmanolides Isolated from Flowers of *Tanacetum vulgare ssp. siculum*. *Molecules*, **2012**, *17*, 8186-8195.
- 22) Ruiz, E.; Suarez, M., Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, **2015**, *46*, 9-24.
- 23) Kishkentayeva, A.; Adekenov, S.; Drašar, P., Production Technologies of Pharmacologically Active Sesquiterpene Lactones, *Euras. Chem. Tech. J.*, **2018**, *20*, 325-333.
- 24) Picman, A., Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1986**, *14*, 255-281.

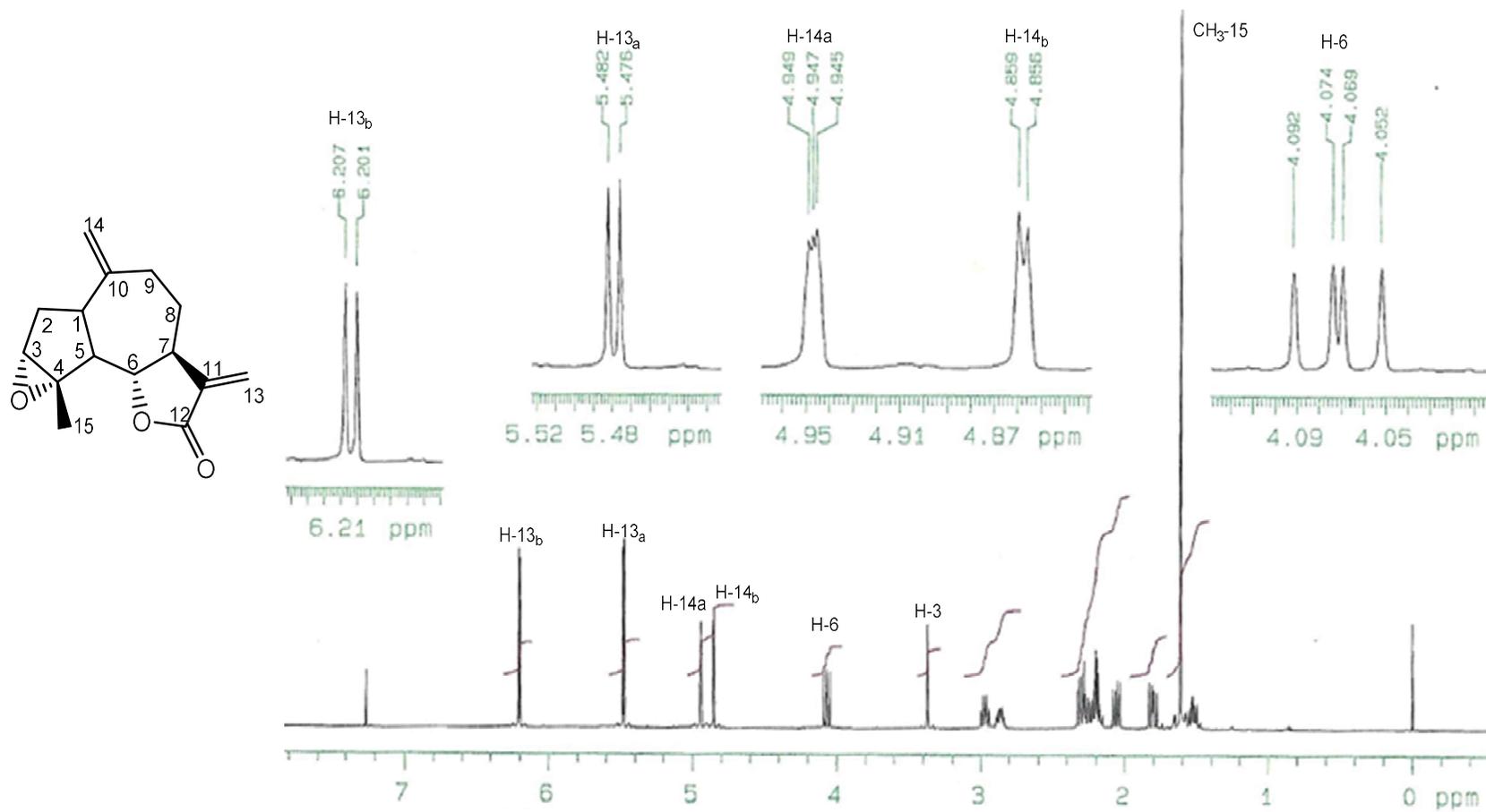
- 25) Rodríguez, E.; Towers, G.; Mitchell, J., Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 1573- 1580.
- 26) Ruiz, A., *Análisis fitoquímico de Artemisia ludoviciana en busca de sustancias con propiedades antimaláricas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales, U.A.E.M., México, **1991**.
- 27) Cooper, G.; Hausman, R., La célula, 5ª ed, Madrid, Marbán, **2002**, Pp 591-606.
- 28) Abad, M.; Bedoya, L.; Apaza, L.; Bermejo, P., The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Sesquiterpene Lactones. *Stud. Nat. Prod. Chem*, **2012**, *37*, 43-65.
- 29) García, D.; Rivas, C.; Leos, C., Actividad antifúngica. En Rivas, C.; Oranday, M.; Verde, M., Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, Esp: Omnia Science, **2016**, Pp 101-128.
- 30) Wedge, D.; Galindo, J.; Macías, F., Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*, **2000**, *53*, 747–757.
- 31) Barrero, A.; Oltra, J.; Álvarez, M.; Raslan, D.; Saúde, D.; Akssira, M., New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, **2000**, *71*, 60–64.
- 32) Bora, K.; Sharma, A., The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharm. Biol.*, **2011**, *49*, 49-109.
- 33) Rojas, A.; *Análisis de la Arquitectura foliar de la tribu Senecioneae (Asteraceae) de México y su significado filogenético*. Tesis de Doctorado, Instituto de Biología, UNAM, **2014**, 6-7.
- 34) Rzedowski, G. C. J. Rzedowski y colaboradores, **2005**. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 925-927 pp.
- 35) Kursat, M.; Emre, I.; Yilmaz, O.; Civelek, S.; Demir, E.; Turkoglu, I., Phytochemical Contents of Five *Artemisia* Species., *Not Sci Biol*, **2015**, *7*, 495-499.
- 36) Mehrdad I.; Seyed A.; Meysam M., Detection of Sesquiterpene Lactones in Ten *Artemisia* Species Population of Khorasan Provinces. *Iran J. Basic. Med. Sci.*, **2007**, *10*, 183–188.
- 37) <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=estafiate&id=7823>
- 38) <http://www.tropicos.org/Image/100158912>

- 39) Ochoa, Y.; Chávez, E.; Flores, J.; Camacho, S.; Ortiz, J., Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *PHYTON*. **2012**, *81*, 69-73.
- 40) Navarro, V.; González, A.; Fuentes, M.; Avilés, M.; Ríos, A.; Zepeda, D.; Rojas, M., Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, *87*, 85–88.
- 41) Davicino, R.; Mattar, M.; Casali, Y.; Correa, S.; Pettenati, E.; Micalizzi, B., Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Perú. Biol.*, **2007**, *14*, 247-251.
- 42) Targett, N., Kilcovne, J., Green, B; Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods. *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 4962-4964.
- 43) Coll, J., Bowden, B; The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.*, **1986**, *49*, 934-936.
- 44) Mishra, R.; Gupta, R., In vitro evaluation of plant extracts, bio-agents and fungicides against Purple blotch and Stemphylium blight of onion. *J Med Plants Res*. **2012**, *6*, 5840-5843.
- 45) Sahana, B.; Priyanka, G.; Kavya, S.; Shwetha, R.; Vinayaka, K.; Prashith, T., Antifungal activity of some botanical extracts against seed-borne *Penicillium* species, *J. Med. Plants Stud*. **2018**, *6*, 91-94.
- 46) Güllüce, M.; Sökmen, M.; Daferera, D.; Açar, G.; Özkan, H.; Kartal, N.; Polissiou, M.; Sökmen, A.; Şahin, F., In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem*. **2003**, *51*, 3958–3965.
- 47) Fico, A., Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas: Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol, *Rev. Chil. Infect*. **2004**, *21*, 26-38.
- 48) Monroy, M.; Soto, M.; Cadena, J.; Santiago, E.; Ruiz, L.; Rosas, H., ESTUDIO BIODIRIGIDO DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE FRUTOS DE *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, *Agrociencia*, **2009**, *43*, 777-790.
- 49) Sgariglia, M.; Soberón, J.; Sampietro, D.; Quiroga, E.; Vattuone, M.; Isolation of antibacterial components from infusion of *Caesalpinia paraguariensis* bark. A bio-guided phytochemical study, *Food Chem*. **2011**, *126*, 395-404.

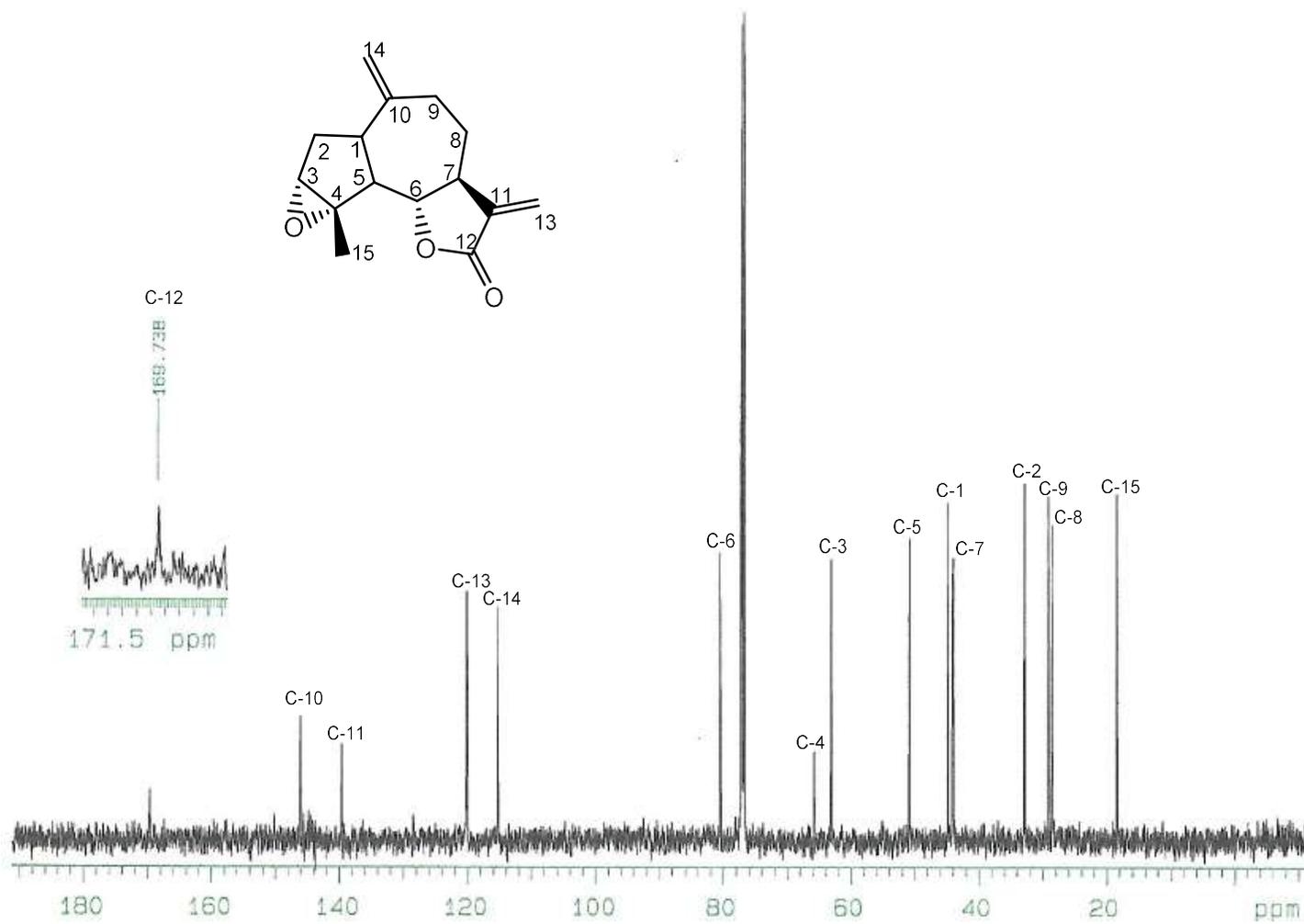
- 50) Saliba, N.; Dakdouki, S.; Homeidan, F.; Kogan, J.; Bouhadir, K.; Talhouk, S.; Talhouk, R., Bio-guided identification of an antiinflammatory guaianolide from *Centaurea ainetensis*, *Pharm Biol*, **2009**, *47*, 701–707.
- 51) Schepetkin, I.; Kirpotina, L.; Mitchell, P.; Kishkentaeva, A.; Shaimerdenova, Z.; Atazhanova, G.; Adekenov, S.; Quinn, M., The natural sesquiterpene lactones arglabin, grosheimin, agracin, parthenolide, and estafiatin inhibit T cell receptor (TCR) activation, *Phytochemistry*, **2018**, *146*, 36-46.
- 52) Zaghoul, A.; Yusufoglu, H.; Salkini M.; Alam, A., New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Anthemis scrobicularis*, *J Asian Nat Prod Res*, **2014**, *16*, 922-929.
- 53) Triana, J.; Eiroa, J.; Morales, M.; Pérez, F.; Brouard, I.; Marrero, M.; Estévez, S.; Quintana, J.; Estévez, F.; Castillo, Q.; León, F., A chemotaxonomic study of endemic species of genus *Tanacetum* from the Canary Islands, *Phytochemistry*, **2013**, *92*, 87–104.
- 54) Zapata, J.; Sánchez, G.; Chaín, F.; Catalán, C.; Bühler, M., Effect of guaianolides in the meiosis reinitiation of amphibian oocytes, *Zygote*, **2016**, *25*, 10-16.
- 55) Lee, K.; Simpson, R.; Geissman, T., Sesquiterpenoid lactones of *Artemisia constituents of Artemisia cana* spp. CANA. The structure of canin. *Phytochemistry*. **1969**, *8*, 1515.
- 56) Mata, R.; Delgado, G.; Romo de Vivar, A., Sesquiterpene lactones of *Artemisia Mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 1665.
- 57) Irwin, M.; Lee, K.; Simpson, R.; Geissman, T., Sesquiterpene lactones of *Artemisia Ridentin*. *Phytochemistry*, **1969**, *8*, 2009.
- 58) Irwin, M.; Geissman, T.; Ridentin-B: and eudesmanolide from *Artemisia tripartita* ssp. *rupicola*. *Phytochemistry*, **1972**, *12*, 871.
- 59) Guang-Chun, P.; Yi-Xian, L.; Hai-Dan, Y.; Guang-Zhu, J., Cytotoxic fraction from *Artemisia sacrorum* Ledeb. Against three human cancer cell lines and separation and identification of its compounds, *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*, 1483–1491.
- 60) Ortet, R.; Prado, S.; Mouray, E.; Thomas, O., Sesquiterpene lactones from the endemic Cape Verdean *Artemisia gorgonum*, *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 2961–2965.
- 61) Trifunovic, S.; Aljancic, I.; Vajs, V.; Macura, S.; Milosavljevic, S., Sesquiterpene lactones and flavonoids of *Achillea depressa*, *Biochem Syst Ecol*, **2005**, *33*, 317–322.

## **11. ANEXOS (espectro)**

### 11.1. Espectro 1. RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz, TMS) de la estafiatina (13).

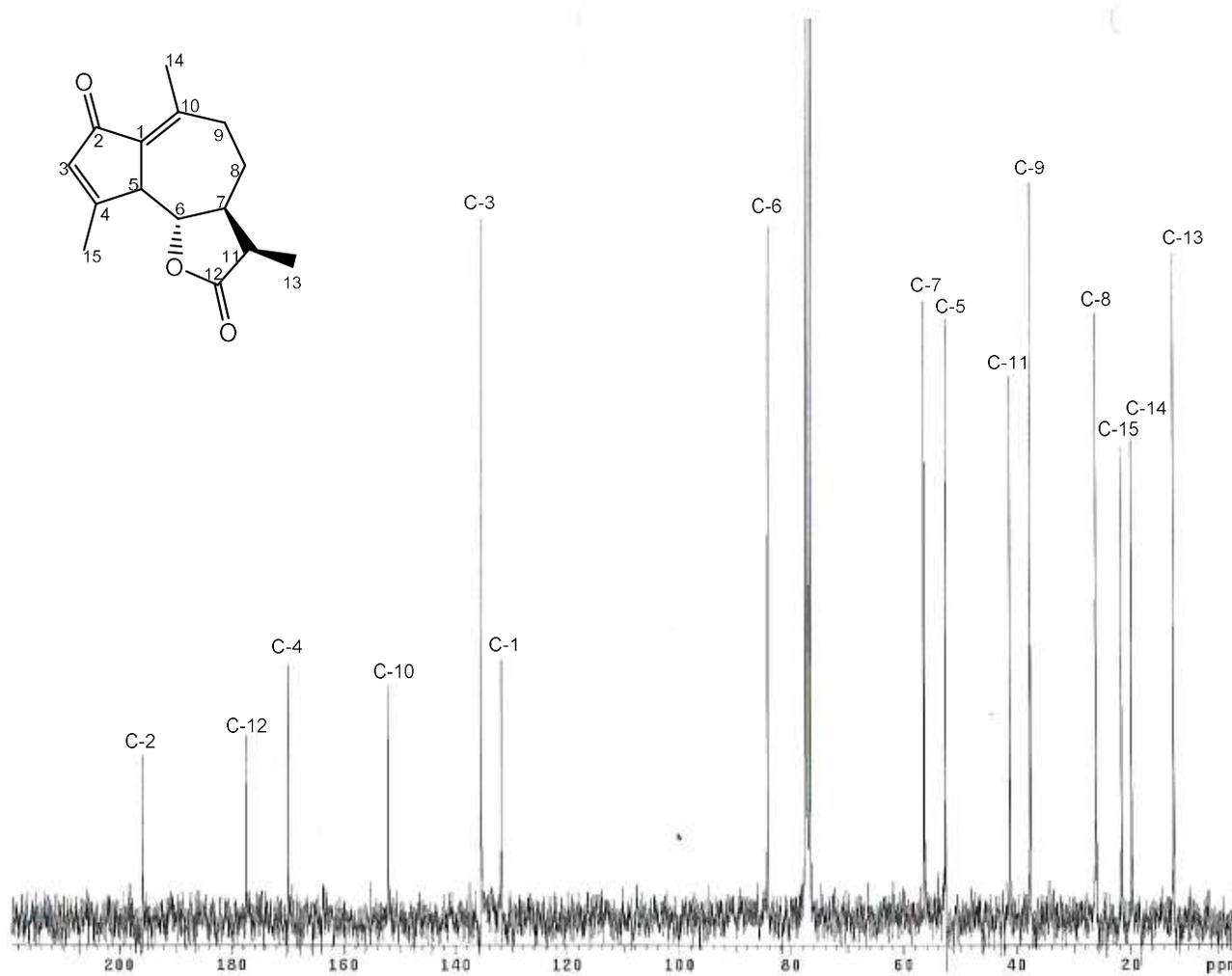


11.2. Espectro 2. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz, TMS) de la estafiatina (13).

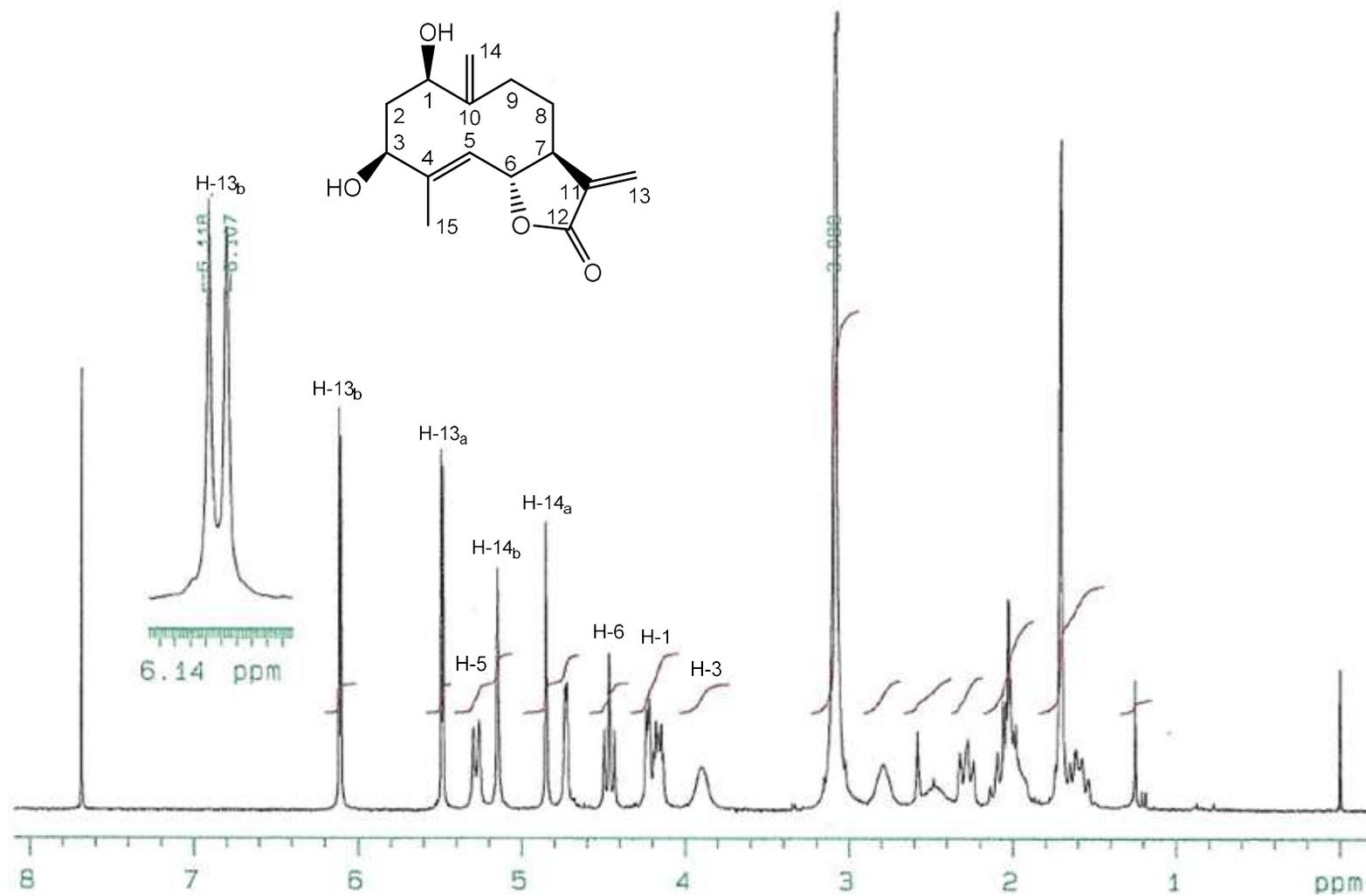




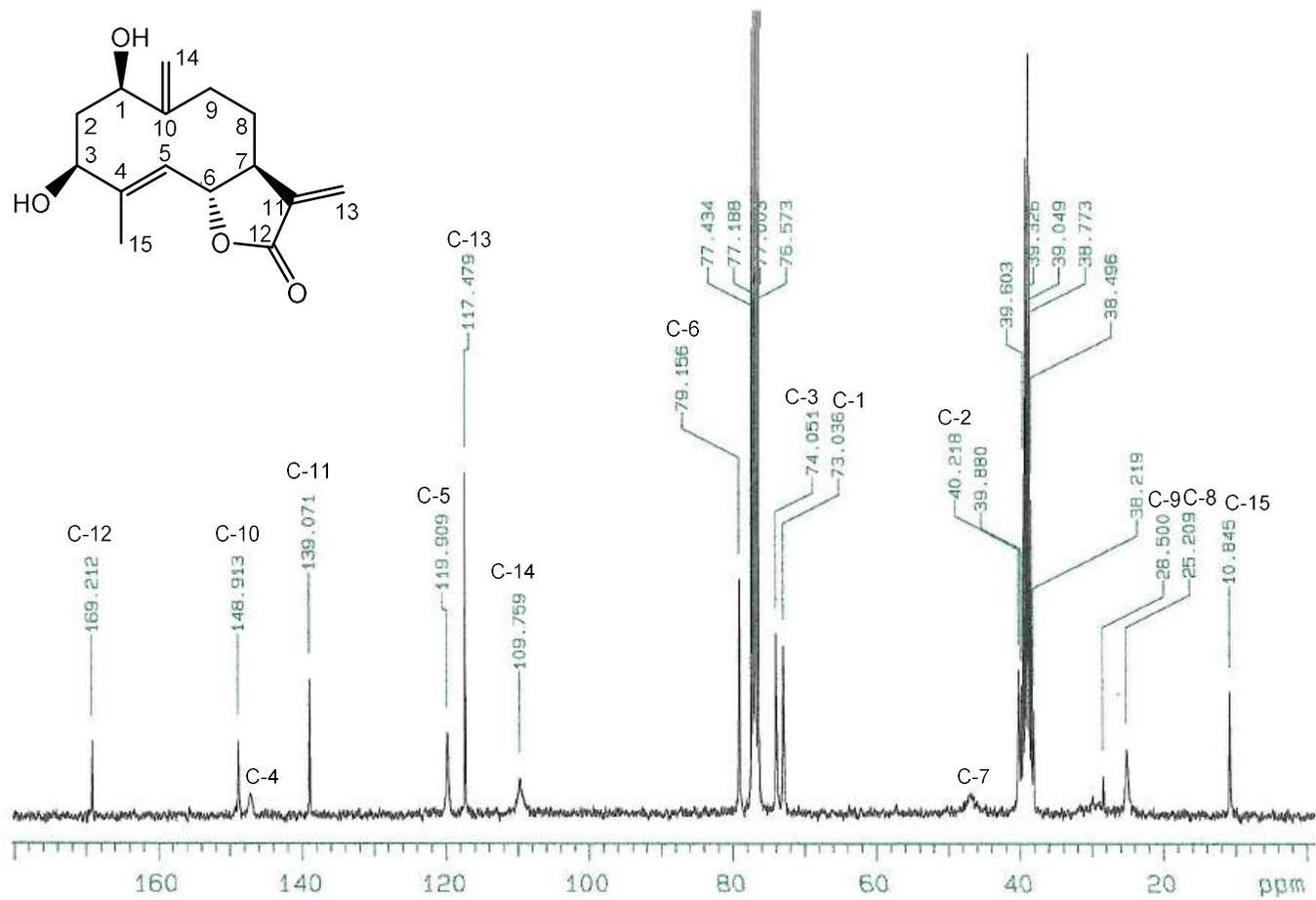
11.4. Espectro 4. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 120 MHz, TMS) de la achillina (8).



11.5. Espectro 5. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ , 400 MHz, TMS) de la ridentina (4).



11.6. Espectro 6. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 120 MHz, TMS) de la ridentina (4).



11.7. Espectro 7. RMN  $^{13}\text{C}$  (experimento DEPT) de la ridentina (4).

