

Valorización y producción  
biotecnológica de biocidas a partir de  
dos especies de *Artemisia*  
(*A. armeniaca* y *A. assoana*).

---

**PAULA SAINZ SOTOMAYOR**

**AZUCENA GONZÁLEZ COLOMA  
MARÍA FE ANDRÉS YEVES  
CARMEN ELISA DÍAZ HERNÁNDEZ**

2017

La **Dra. Azucena González Coloma**, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la **Dra. María Fe Andrés Yeves**, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la **Dra. Carmen Elisa Díaz Hernández**, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

AUTORIZAN:

La presentación de la Memoria Titulada “**Valorización y producción biotecnológica de biocidas a partir de dos especies de *Artemisia* (*A. armeniaca* y *A. assoana*)**” que ha sido realizada en el Grupo de Investigación Bioplaguicidas: Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC) durante el periodo (2014-2017), bajo nuestra dirección, dado que reúne la cantidad y calidad de trabajo necesaria para constituir la Tesis Doctoral, que la licenciada en Biología **Paula Sainz Sotomayor** presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid en el Programa de Doctorado en Microbiología, cumpliendo los requisitos exigidos por esta Universidad para optar a la Mención Internacional.

En Madrid,

Dra. Azucena González Coloma

Dra. María Fe Andrés Yeves

Dra. Carmen Elisa Díaz Hernández

*A mi familia*

## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que me han ayudado y acompañado durante los años de doctorado:

A las Dras. Azucena González Coloma, María Fe Andrés Yeves y Carmen Elisa Díaz Hernández, directoras de este trabajo, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y por la confianza que han depositado en mi persona para llevar a cabo este trabajo. A mi tutor y profesor Rafael Martínez Díaz por su apoyo incondicional y por enseñarme todo lo que sé sobre la Parasitología, una de mis pasiones.

Al Instituto de Ciencias Agrarias y todo el personal que en el trabaja por la colaboración prestada como alumna de doctorado. A todo el personal técnico y de apoyo que han participado en este proyecto de Tesis doctoral, ya que sin ellos hubiese sido imposible. A Felipe y a Rubén, es un placer trabajar con vosotros, no sé cómo lo hubiese hecho sin vosotros.

Al Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC) y al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de La Laguna, por permitirme desarrollar parte de mi trabajo en sus instalaciones.

Al Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Lisboa, en especial, a la Dra. Cristina Moiteiro por todo su conocimiento, que complementó mi formación en el area de la química, por su paciencia y su cariño.

A mis compañeros de Universidad, muchos de ellos ya doctores, con los que pasé unos de los mejores años de mi vida. A mi Club de las Locas, no sé qué haría sin vosotras, os quiero. A Sol, Cleren, Paquito y Pipa, mi segunda familia. A todos mis amigos, gracias por todo.

Finalmente, a mi familia, por vuestro amor y vuestro apoyo. A mis padres, porque siempre me habéis animado y apoyado, porque siempre habéis creído en mí. A mis hermanos, Marta y Gonzalo, por estar siempre a mi lado, por lo bien que me conocéis y por haberme cuidado siempre. A mi cuñado, Richi, por todo tu cariño y tu optimismo. Por último, a mis cinco sobris, Polly, Marti, Julia, James y John, porque sois lo más bonito del mundo.

Gracias a todos

# ÍNDICE GENERAL

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Género <i>Artemisia</i> (Asteraceae).....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Distribución del género <i>Artemisia</i> en la Península Ibérica y archipiélagos (Canarias y Baleares) y estado de conservación.....	10
1.1.2 Compuestos mayoritarios del género <i>Artemisia</i> .....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Material Biológico .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Especies vegetales .....	39
3.1.1.1 <i>Artemisia pedemontana</i> subsp. <i>assoana</i> (Willk.) Rivas Mart. ....	39
3.1.1.2 <i>Artemisia armeniaca</i> Lam. ....	40
3.1.2 Producción de biomasa.....	42
3.1.2.1 Cultivo aeropónico .....	42
3.1.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas y raíces transformadas .....	43
3.1.3 Organismos diana .....	48
3.1.3.1 Protozoos.....	48
3.1.3.1.1 Medio de cultivo para protozoos .....	53
3.1.3.2 Líneas celulares .....	53
3.1.3.2.1 Medios de cultivo para las líneas celulares .....	55
3.1.3.3 Hongos: <i>Aspergillus niger</i> .....	56
3.1.3.4 Nematodos fitoparásitos: <i>Meloidogyne javanica</i> .....	57
3.1.3.5 Insectos.....	59
3.1.3.5.1 Cría y mantenimiento de insectos .....	62
3.1.3.6 Garrapatas: <i>Hyalomma lusitanicum</i> .....	63

3.1.3.7 Semillas .....	65
<b>3.2 Ensayos de actividad biológica.....</b>	<b>65</b>
3.2.1 Ensayos de actividad frente a protozoos .....	65
3.2.2 Ensayos de citotoxicidad .....	67
3.2.3 Ensayo con hongos .....	69
3.2.4 Actividad nematocida.....	71
3.2.5 Ensayos con insectos .....	73
3.2.6 Ensayo con garrapatas .....	76
3.2.7 Ensayo de fitotoxicidad .....	78
<b>3.3 Técnicas generales .....</b>	<b>79</b>
3.3.1 Técnicas instrumentales .....	79
3.3.2 Técnicas cromatográficas .....	80
3.3.3 Técnicas de extracción .....	84
<b>3.4 Biotransformación de achillín (1) .....</b>	<b>87</b>
<b>3.5 Reacciones de semi-síntesis.....</b>	<b>89</b>
<b>3.6 Soluciones, colorantes, reactivos y fármacos de referencia....</b>	<b>92</b>
<b>4. PUESTA A PUNTO Y ESTANDARIZACIÓN DE NUEVOS</b>	
<b>BIOENSAYOS.....</b>	<b>99</b>
<b>4.1 <i>Phytomonas</i> sp.....</b>	<b>99</b>
4.1.1 Comportamiento de <i>P. davidi</i> en cultivo: curvas de crecimiento.....	101
4.1.2 Determinación del momento de siembra para los ensayos.....	103
4.1.3 Determinación de los reactivos y concentraciones a utilizar para la lectura de las placas.....	105
4.1.4 Aceites esenciales y compuestos puros ensayados sobre <i>Phytomonas</i> ..	111
<b>4.2 Ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de garrapatas</b>	
.....	<b>116</b>

4.2.1 Líneas celulares de garrapatas .....	118
4.2.2 Comportamiento de las líneas celulares: curvas de crecimiento .....	120
4.2.3 Determinación del momento de siembra: curvas de absorbancia.....	122
4.2.4 Citotoxicidad de aceites esenciales.....	125
<b>5. ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO .....</b>	<b>133</b>
<b>5.1. Aceites esenciales .....</b>	<b>134</b>
5.1.2. Actividad biológica de los AEs .....	139
<b>5.2 Extractos etanólicos.....</b>	<b>152</b>
<b>5.3 Fraccionamiento químico biodirigido de <i>A. assoana</i> .....</b>	<b>161</b>
5.3.1 Parte aérea.....	161
5.3.2 Raíz.....	171
<b>5.4 Fraccionamiento químico biodirigido de <i>A. armeniaca</i> .....</b>	<b>177</b>
5.4.1 Parte aérea.....	177
5.4.2 Raíz.....	181
<b>5.5. Derivados estructurales de achillin (1).....</b>	<b>186</b>
5.5.1 Biotransformación de achillin (1).....	186
5.5.2 Derivados semisintéticos de achillín (1).....	194
<b>5.6 Perfiles químicos de los extractos etanólicos .....</b>	<b>208</b>
5.6.1 Perfiles químicos de los extractos de <i>A. assoana</i> .....	208
5.6.2 Perfiles químicos de los extractos de <i>A. armeniaca</i> .....	213
<b>6. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS .....</b>	<b>219</b>
<b>6.1 Lactonas sesquiterpénicas .....</b>	<b>220</b>
<b>6.2 Compuestos fenólicos: flavonas, cumarinas y fenilpropanoides</b> .....	<b>231</b>
<b>6.3 Poliacetilenos, espiroacetales y ácidos grasos .....</b>	<b>241</b>



<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>251</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>257</b>
<b>ANEXO I: LISTADO DE PRODUCTOS IDENTIFICADOS ..</b>	<b>289</b>
<b>ANEXO II: ESTRUCTURAS .....</b>	<b>293</b>
<b>ANEXO III: COLECCIÓN DE ESPECTROS .....</b>	<b>299</b>

## Abreviaturas

%AE	Porcentaje de actividad en epimastigotes
%AP	Porcentaje de actividad en promastigotes
AA	Parte aérea aeropónico
Aar	<i>Artemisia armeniaca</i>
AarA	Aceite esencial de <i>A. armeniaca</i> cultivo aeropónico
AarM	Aceite esencial de <i>A. armeniaca</i> cultivo en cámara
Aas	<i>Artemisia assoana</i>
AasA	Aceite esencial de <i>A. assoana</i> cultivo aeropónico
AasS	Aceite esencial de <i>A. assoana</i> planta silvestre
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN <sub>R</sub>	ADN ribosómico
ADN-T	ADN de transferencia
AE	Aceite esencial
AM	Parte aérea cultivo en cámara
ATP	Adenosín trifosfato
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
AS	Parte aérea silvestre
B	Baleares
BME/CTVM	Línea celular embrionaria de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
BT	Biotransformación
CCF	Cromatografía en capa fina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
COSY	Espectroscopia homonuclear de correlación <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H
DCM	Diclorometano
DE <sub>50</sub>	Dosis Eficaz 50
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
DL <sub>90</sub>	Dosis Letal 90

DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectroscopía de masas
EMAR	Espectroscopía de masas de alta resolución
ESI	Ionización por electroespray
EtOH	Etanol
FI	Inhibición de la alimentación
Fig	Figura
Fr	Fracción
GB	Medio de cultivo Gamborg's
GC	Cromatografía de gases
H	Hidrolato
H16	Hongo <i>Loratospora</i> sp.
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HR	Humedad relativa
HS	Hemisíntesis
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) a un enlace
I	Agua Infusión
IE	Ionización por impacto electrónico
IC	Islas Canarias
IRE/CTVM	Línea celular embrionaria de <i>Ixodes ricinus</i>
ITS	Secuencia espaciadora interna
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
J2	Juveniles de segundo estadio
L-15	Medio de cultivo Leivovitz
LC5	Línea celular de fibroblastos de pulmón humano
LDA	Diisopropilamida de litio
LIC	Lugar de importancia comunitaria
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LnA8	Hongo <i>Xilaria</i> sp.

LSD	Test de mínima diferencia significativa
LSQ	Lactonas sesquiterpénicas
m/z	Relación masa/carga
NOESY	Espectroscopía Efecto Nuclear Overhauser
MCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
MeOH	Metanol
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	Norte
n-Hex	Hexano
NBS	N-bromosuccinimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Península Ibérica
RA	Raíz aeropónica
Ri	Inductor de raíces
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raíz transformada
S	Sur
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB <sub>i</sub>	Suero Fetal Bovino inactivado
SI	Inhibición del asentamiento
TFM	Trabajo de fin de máster
THF	Tetrahidrofurano
UE	Unión Europea
VLC	Cromatografía líquida de vacío
YMB	Medio <i>Yeast manitol broth</i> (medio de manitol y levadura)

## ABSTRACT

As part of our ongoing, chemical and biotechnological research on the sustainable production of natural agrochemicals from plants of the genus *Artemisia*, we have selected two species, *Artemisia pedemontana* subsp. *assoana* and *A. armeniaca*, endemic and rare to the Iberian Peninsula. The plant biomass needed to study their biological activities and phytochemical composition has been produced by aeroponic cultivation (aerial and roots) and *in vitro* culture of transformed roots. The plant biomass yields and the comparative analysis of the different extracts have been used to determine the best plant production method.

The essential oils, ethanolic extracts and fractions were bioassayed against different crop pests including insects (*Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*), the nematode *Meloidogyne javanica*, the phytoparasite *Phytomonas davidi* and the fungus *Aspergillus niger* and their phytotoxic effects were tested on *Lactuca sativa* and *Lolium perenne*. Also their antiparasitic activity was tested on *Trypanosoma cruzi* and against the tick *Hyalomma lusitanicum* and a tick cell line (IRE/CTVM20). From the methodological point of view, test protocols have been developed and standardized to evaluate *in vitro* the activity of extracts and natural products against the plant parasite *Phytomonas davidi* and three tick cell lines.

The essential oil of *A. assoana* was characterized by two major compounds, 1,8-cineol and camphor and showed ixodicidal (*in vitro* and *in vivo*), fungicidal and antiparasitic activities. The hydrolate (byproduct from the essential oil extraction) had nematocidal and nemostatic effects. *A. armeniaca* essential was characterized by 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone as major compound and showed *in vitro* ixodicidal effects.

The selected extracts were submitted to bioguided fractionation and the structures of the isolated compounds were elucidated spectroscopic techniques and comparison with bibliographic data. The study of the extract of *Artemisia assoana* aerial parts gave the sesquiterpene lactones **1** (antifeedant against *S. littoralis* and phytotoxic to *L. perenne*), **2**, **3**, **4** and **5** (**4**, **5** and **2** also had selective action against *L. perenne*) and flavones **6**, **7** and **8** (antiparasitic against *T. cruzi*). The study of the transformed root extract yielded acetylenic spiroacetal enol ethers (**20**, **21** and **22**) that were not active and phenylpropanoids **23** and **24**, the most potent antiparasitic (*T. cruzi*) compounds.

The biotransformation of achillín (**1**) by two endophytic fungi gave 4 sesquiterpene lactone derivatives (**5**, **11**, **12** and **13**). Halogenation reactions of achillín (**1**) gave six bromo-derivatives (**14**, **15**, **16**, **17**, **18** and **19**). None of the reaction products was more active than **1** against insects and plants (**5**, **14**, **16**, **18** had selective action against the monocotyledoneous species *L. perenne*). Compounds **16** and **19** showed antiparasitic effects against *T. cruzi* (**16** and **19**) and *P. davidi* (**16**).

The extracts of aerial parts of *A. armeniaca* showed antifeedant effects against the target insects. Two coumarins (**26** and **27**) were isolated and showed synergetic antifeedant (*S. littoralis*) and phytotoxic (*L. perenne*) effects. The aeroponic root extract showed mostly nematicidal and antiparasitic activity. The phytochemical study of the extract resulted in the isolation of polyacetylenes of the falcarinol-type (**28**, **29**, **30** and **31**) and a fatty acid (**32**).

## RESUMEN

Con el fin de obtener una producción sostenible de agroquímicos con actividad antiparasitaria y bioplaguicida se han seleccionado para su estudio dos especies del género *Artemisia*: *A. pedemontana* subsp. *assoana* y *A. armeniaca*. Se han establecido diferentes tipos de cultivos biotecnológicos (aeropónico e *in vitro* de raíces transformadas) con el fin de obtener la biomasa necesaria para llevar a cabo el estudio de la actividad biológica de los extractos y su composición química. El rendimiento de biomasa junto con el análisis químico comparativo de los diferentes extractos son los parámetros que se han utilizado para determinar el mejor método de producción vegetal.

Se ha evaluado la actividad de los distintos extractos (aceites esenciales, extractos etanólicos) obtenidos de *A. assoana* y *A. armeniaca* frente a insectos-plaga de interés agrícola (*Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*), el nematodo fitopatógeno *Meloidogyne javanica*, el parásito de plantas *Phytomonas davidi* y el hongo *Aspergillus niger*. Además se han estudiado sus efectos sobre el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, la garrapata *Hyalomma lusitanicum* y la línea celular de garrapata (IRE/CTVM20). Por último se han descrito sus efectos fitotóxicos frente a *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*. Desde el punto de vista metodológico se han puesto a punto y estandarizado los protocolos de ensayo para evaluar *in vitro* la actividad de los extractos y productos naturales frente al parásito de plantas, *Phytomonas davidi* y a tres líneas celulares de garrapatas.

El aceite esencial de *A. assoana* se caracteriza por poseer dos compuestos mayoritarios, el 1,8-cineol y el alcanfor. Dicho aceite mostró actividad ixodocida (*in vitro* e *in vivo*), fungicida y antiparasitaria. El hidrolato tuvo efectos

nematicidas y nemostáticos. El aceite de *A. armeniaca* se caracteriza por su contenido en 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y su actividad ixodicida *in vitro*.

Los extractos etanólicos se han fraccionado mediante técnicas cromatográficas y las estructuras de los compuestos puros se han descrito mediante técnicas espectroscópicas y comparación con las bases de datos. De la parte aérea de *A. assoana* se aislaron las lactonas sesquiterpénicas achillín **1**, **2**, **3**, **4** y **5** y las flavonas **6**, **7** y **8**. El extracto mostró actividad antialimentaria frente a insectos plaga, fitotóxica y antiparasitaria (*T. cruzi*). Del estudio fitoquímico de la raíz transformada se describieron tres espiroacetales (**20**, **21** y **22**) que mostraron actividad fitotóxica y antiparasitaria y dos fenilpropanoides (**23** y **24**) con efectos sobre *T. cruzi*.

Se han obtenido derivados de achillín (**1**) mediante biotransformación con dos hongos endófitos, resultando en cuatro derivados (**5**, **11**, **12** y **13**). Mediante reacciones de semi síntesis se obtuvieron seis compuestos bromados (**14**, **15**, **16**, **17**, **18** y **19**). Ninguno de los derivados mostró mayor actividad que el achillín (**1**), a excepción de los derivados **16** y **19** que mostraron actividad antiparasitaria.

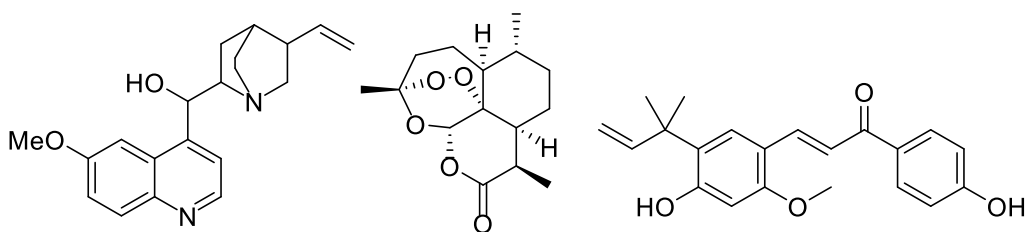
El estudio fitoquímico de parte aérea de *A. armeniaca* resultó en el aislamiento de dos cumarinas (**26** y **27**) con efectos sinergistas antialimentarios y fitotóxicos. El estudio de la raíz, con actividad nematicida y antiparasitaria, resultó en el aislamiento de poliacilenos del tipo falcarinol (**28**, **29**, **30** y **31**) y un ácido graso (**32**).



# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una gran variedad de productos naturales que actúan como defensas químicas, se conocen como metabolitos secundarios y han sido desarrollados a lo largo de su evolución como compuestos tóxicos, repelentes, etc. Estos productos han sido utilizados por el hombre desde la antigüedad por sus propiedades medicinales, antiparasitarias y para el control de las plagas de los cultivos. Existen numerosos ejemplos de fármacos, antiparasitarios y biocidas derivados de productos naturales, siendo los dos últimos casos el objeto de este estudio.

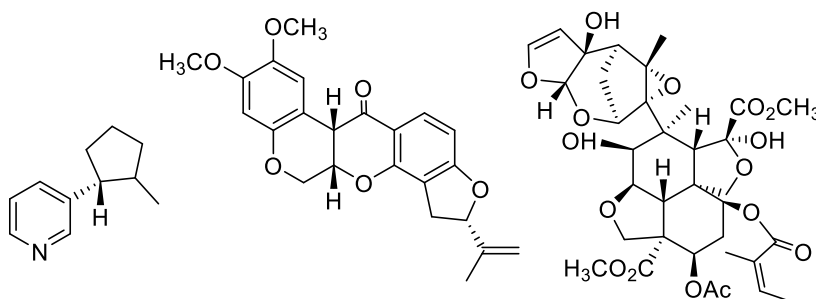
Entre los agentes antiparasitarios de origen botánico destacan la artemisinina, una lactona sesquiterpénica antimalárica aislada de *Artemisia annua*, cuyos derivados forman parte de tratamientos antimaláricos en combinación con otros fármacos (OMS 2017); la quinina, aislada de *Cinchona succiruba* y la licochalcona A aislada de la raíz de *Glycyrrhiza glabra* (regalíz) y de *G. inflata*, todos ellos ejemplos de productos derivados de plantas (Figura 1). Muchos otros productos naturales han puesto de manifiesto su potencial antiparasitario en el laboratorio y representan estructuras interesantes para el desarrollo de nuevos y necesarios agentes antiparasitarios (Kayser et al., 2003).



**Figura 1.** Estructura química de la quinina, artemisinina y licochalcona A

El incremento del coste de los tratamientos farmacológicos en zonas endémicas, así como el aumento de las resistencias a los productos actuales, justifican la necesidad de una búsqueda continua de nuevos compuestos. Siendo los productos naturales una fuente de diversidad estructural y bioactividad selectiva, que los hacen perfectos candidatos en la búsqueda de nuevos tratamientos (Newman y Cragg, 2012).

Entre los bioplaguicidas de origen botánico, destaca la nicotina extraída de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), cuyo uso como insecticida se remonta al siglo XVII (Fig. 2). En 1848 se introdujo un insecticida botánico de esqueleto isoflavonoide, la rotenona, aislado de las raíces de *Lonchocarpus nicou* y *Derris elliptica* (Fabaceae). Entre los insecticidas botánicos comerciales de uso actual destaca el aceite de neem obtenido del árbol *Azadirachta indica* (Meliaceae), cuya actividad insecticida se basa en su contenido en compuestos triterpénicos de tipo limonoide como azadiractina, salanina y nimbina (Fig. 2) (González-Coloma et al., 2013).



**Fig. 2.** Estructura química de nicotina, rotenona y azadiractina

Los plaguicidas botánicos incluyen también compuestos nematocidas como el cinamaldehído aislado de la canela (Caboni et al., 2013), o la esquamosina G, presente en las semillas de *Annona squamosa* (Dang et al., 2011), productos herbicidas o inhibidores de la germinación como la sorgoleona,

aislada del sorgo bicolor (Uddin et al., 2014), o el eugenol, un componente de aceites esenciales (Ahuja et al., 2015).

El uso intensivo de plaguicidas sintéticos durante los años cuarenta y cincuenta desplazó el uso de biocidas naturales. Sin embargo, los problemas de contaminación, daños en el medio ambiente, salud pública, selección de poblaciones resistentes (Isman, 2006) y los graves efectos negativos sobre organismos beneficiosos como las abejas (insecticidas neonicotinoides) (Whitehorn, 2012) causados por estos productos han provocado cambios legislativos en la UE tendentes a la reducción y/o eliminación de productos tóxicos de síntesis para el control de plagas (Directiva 91/414/CE del Consejo; Reglamento 2009/1107 / E y la Directiva 2009/128 / CE), dando prioridad al uso de métodos alternativos y al establecimiento del Control Integrado de Plagas (Waterfield, 2012; Popp et al., 2013).

Por todo ello en el contexto actual, la búsqueda de productos naturales bioactivos para el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios y biocidas adquiere una gran relevancia.

## **1.1 Género *Artemisia* (Asteraceae)**

El género *Artemisia* está incluido en la familia Asteraceae, una de las familias más amplias y cosmopolitas del reino vegetal. El género está comprendido por plantas vasculares pudiendo ser pequeñas herbáceas o arbustos, y se distribuyen principalmente en el Hemisferio Norte. Son plantas aromáticas y medicinales de interés etnofarmacológico (Bézanger-Beauquesne et al., 1990; Vallés et al., 2011). Existen numerosos trabajos documentando todos los usos medicinales atribuidos a este género (Wright, 2002; Parada et al., 2009). Varias especies de este género se han usado para el tratamiento del cáncer (Ferreira et al., 2010), para el tratamiento del síndrome premenstrual, como antidiabético y

anticoagulante, problemas en las vías respiratorias, etc (Bora y Sharma, 2011). Entre ellas destacan *Artemisia absinthium*, conocida como “wormwood” o “madre de todas las hierbas”, dadas sus múltiples aplicaciones curativas como tónico, febrífugo y antihelmíntico. Las hojas de *A. vulgaris* son el componente más importante en la preparación de moxa. La moxa se quema directamente sobre la piel de los pacientes en un proceso conocido como moxibustión y una de sus funciones es la activación del sistema inmune (Abbate, 2002). *A. vulgaris* también ha sido empleada como analgésico, antiinflamatorio, antiespasmódico y para afecciones del hígado (Bora y Sharma, 2011). Otra especie muy conocida por su actividad antimalárica es *A. annua*, utilizada contra *Plasmodium* sp. desde la antigüedad en China (Hsu, 2006), cuyo compuesto activo es artemisinina, con actividad endoperoxidasa (Ivanescu et al., 2015).

Los compuestos activos del género *Artemisia* incluyen terpenos, flavonas, cumarinas, ácidos cafeoilquínicos, esteroides y acetilenos (Bora y Sharma, 2011). Se han estudiado los metabolitos de alrededor de 260 especies y en algunos casos se han descrito sus actividades biológicas (Abad et al., 2012).

### **1.1.1 Distribución del género *Artemisia* en la Península Ibérica y archipiélagos (Canarias y Baleares) y estado de conservación**

En la Península Ibérica (PI), Islas Canarias (IC) y Baleares (B) hay 31 especies de *Artemisia* descritas (Anthos: <http://www.anthos.es>). En la Tabla 1 se enumeran las especies de *Artemisia* presentes en las zonas mencionadas, el número de registros de cada una de ellas, así como, sus sinónimos y su distribución.

De las 31 especies descritas, 7 son endémicas de la PI: *Artemisia barrelieri*, *A. caeruleascens* subsp. *gargantae*, *A. chamaemelifolia* subsp. *cantábrica*, *A. granatensis*, *A. lucentica*, *A. pedemontana* subsp. *assoana* y *A. umbelliformis* subsp. *umbelliformis*, y 3 son endémicas de las IC: *A. ramosa*, *A. reptans* y *A. thuscula*.

## Especies vulnerables

Algunas de las especies se encuentran en situación vulnerable o en peligro de extinción por la presión humana o por tener hábitats restringidos. Dentro de la PI, las especies *A. armeniaca*, *A. alba* y *A. granatensis* están declaradas en peligro de extinción (Fig. 3) de acuerdo con la Lista Roja de la Flora Vasculare Española (Moreno, 2008).

*Artemisia armeniaca* tiene una distribución muy fragmentada. Es una especie nativa de Armenia, que se distribuye además en el centro y sur de Rusia, este de Anatolia y Caúcaso y el norte de Irán. En la PI se ha encontrado una población limitada a unas pocas localidades de la Sierra de Gúdar y su presencia se considera reléctica. Dentro de la Sierra de Gúdar se distribuye de forma fragmentada en cuatro núcleos poblacionales de diversa magnitud: Allepuz, con casi 2.500 individuos; Fortanete, de menor tamaño; y las poblaciones de Mosqueruela y Valdelinares, más alejadas y con menos de 250 individuos (Sanz et al., 1994). La principal amenaza sobre las poblaciones de *A. armeniaca* de la PI es el pastoreo, por lo que para su conservación se propone realizar seguimientos de las poblaciones y levantar vallados para proteger las poblaciones del ganado. Los estudios fitoquímicos realizados sobre esta especie se han llevado a cabo con poblaciones de Armenia (Rybalko et al., 1975) e Irán (Mojarrab et al., 2010; 2011; 2013; Kazemi et al., 2010). No hay estudios realizados sobre las poblaciones de la PI.

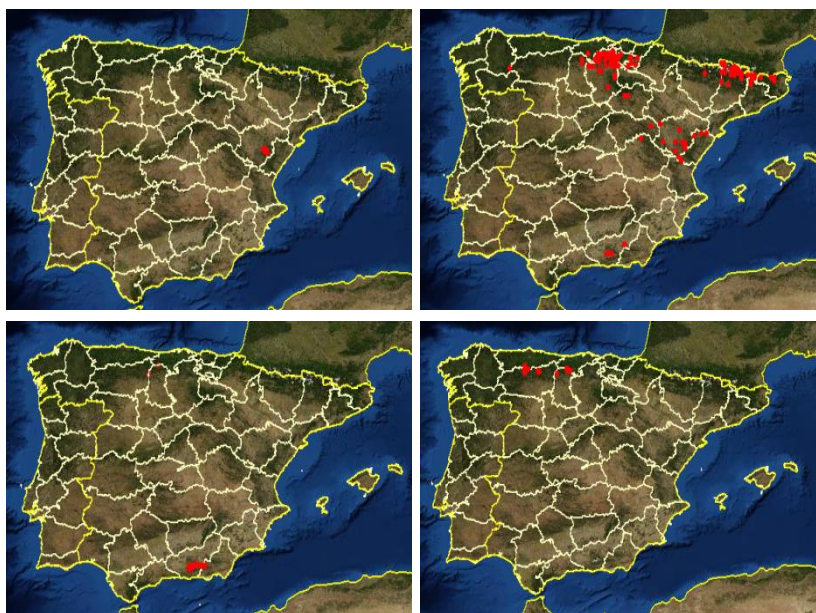
*Artemisia alba* Turra fue declarada taxón en peligro de extinción en 2010. Es endémica de la PI y habita en las sierras orientales de Andalucía, concretamente en Sierra Nevada y Sierra de Baza, también es conocida como *A. alba* subsp. *nevadensis* (Fig. 3). Se conocen cinco poblaciones, que se distribuyen en pequeños grupos compactos muy dispersos en su área de ocupación. Dichas poblaciones se encuentran en espacios naturales protegidos (Parque Natural de la

Sierra de Baza y Espacio Natural de Sierra Nevada). Están sometidas a predación por ungulados y ganado doméstico. Para su conservación, se han almacenado semillas en el Banco de Germoplasma Vegetal Andaluz para programas de recuperación de la Junta de Andalucía (Bañares et al., 2011). A partir de esta especie se han aislado compuestos como germacrenos altamente oxigenados, eudesmanos y oplopanos, (Todorova et al., 2015).

*Artemisia granatensis* Boiss es otro endemismo, en peligro de extinción localizado en las montañas de Sierra Nevada (Fig. 3) (Hernández-Bermejo et al., 2004). En 1981 fue declarada taxón de flora estrictamente protegido, según la legislación europea relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres (Directiva 82/72/EEC). Unos años después, en 1992, fue calificada como especie vegetal de interés comunitario que requiere una protección estricta y para cuya conservación es necesario designar zonas especiales de conservación (Directiva 92/43/EEC). En España, se declaró especie en peligro de extinción por el decreto 139/2011, debido a la dramática disminución de los individuos que se produjo entre los años 1994 y 2003 (se estima que se perdió un 50% de las poblaciones). Actualmente su distribución sigue estando muy fragmentada y continua reduciéndose el número de subpoblaciones (Bilz et al., 2011; Hernández-Bermejo et al., 2011). El estudio fitoquímico de cultivos de *A. granatensis* en sistemas aeropónicos e *in vitro* (raíces transformadas) ha demostrado la presencia de monoterpenos, lactonas sesquiterpénicas y espiroacetales poliacetilénicos (Barrero et al., 2013).

*Artemisia chamaemelifolia* subsp. *cantabrica* M. Laínz, también conocida como *A. cantábrica*, es una especie vulnerable incluida en la Lista Roja del 2008. Inicialmente, se consideraba una planta endémica de la Cordillera Cantábrica pero su distribución abarca también Asturias, León y Palencia (Fig. 3). En el pasado, las poblaciones se vieron afectadas negativamente por una elevada presión ganadera que actualmente ha disminuido considerablemente (Mazuelas et

al., 2013). Estudios fitoquímicos de la parte aérea de esta subespecie demostraron un alto contenido en sesquiterpenos ácidos (San Feliciano et al., 1986). Esta especie se ha usado tradicionalmente, como antimicrobiano, antifúngico, antitumoral y antihelmíntico ya que produce alcaloides, saponinas, flavonoides y polifenoles. El aceite esencial de *A. chamaemelifolia* de una población de Irán contenía 1,8-cineol, davanona y crisantenona, compuestos con actividad antibacteriana (Ghasemi Pirbaloutia et al., 2013).



**Fig. 3.** De izquierda a derecha y de arriba abajo, distribución en la PI de *Artemisia armeniaca*, *A. alba*, *A. granatensis* y *A. chamaemelifolia* subsp. *cantabrica*.

### Especies endémicas

Además de las especies vulnerables descritas, en la PI hay cinco endemismos más:

*Artemisia barrelieri*, crece principalmente en el sureste de la Península (Fig. 4). A partir del estudio fitoquímico de una población localizada en Alicante

se aislaron compuestos como lactonas sesquiterpénicas y eudesmanos (Villar et al., 1983; Marco et al., 1991).

*Artemisia caerulescens* subsp. *gargantae* localizada en Cataluña (Lleida), con una sola población descrita en esta región (Fig. 4). En 2007, se declaró como taxón de atención preferente (Real Decreto 63/2007).

*Artemisia pedemontana* subsp. *assoana*, localizada en Aragón (Fig. 4). Se han identificado dos lactonas sesquiterpénicas en el extracto de la parte aérea (Marco et al., 1987), se han realizado estudios sobre la composición química de sus raíces (Martínez et al., 1987) y se ha descrito la composición química de su aceite esencial (Perez-Alonso et al., 2003).

*Artemisia umbelliformis* subsp. *umbelliformis* es una especie alpina que crece en los Pirineos (Fig. 4), es un endemismo del que no hay ningún estudio fitoquímico realizado aunque hay algunos estudios sobre poblaciones alpinas, de los montes Cárpatos y los Balcanes donde tradicionalmente se emplea en la elaboración de un licor conocido como “genepi”, importante en la medicina popular (Voillamoz et al., 2015).

*Artemisia lucentica* crece principalmente en el sureste (Alicante y Murcia) localizándose alguna población en Andalucía (Fig 4). Se han aislado compuestos fenólicos, flavonas y sesquiterpenos de las partes aéreas (Marco et al., 1988; Sanz et al., 1989; Marco et al., 1997).





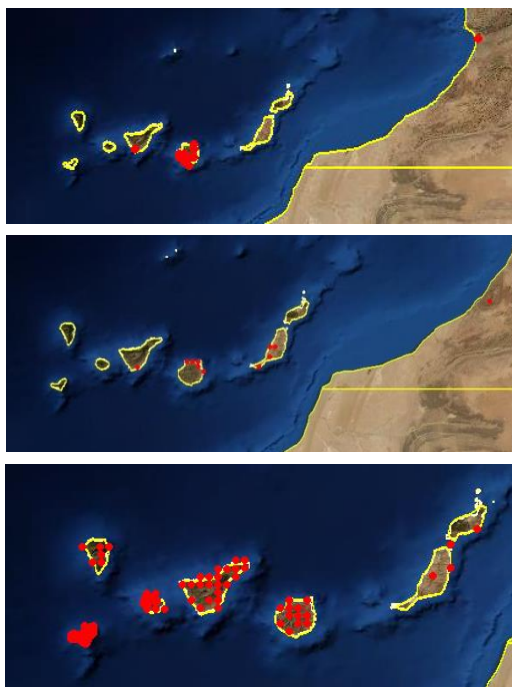
**Fig. 4.** De izquierda a derecha y de arriba abajo, distribución en la PI de *A. barrelieri*, *A. caerulescens* subsp. *gargantae*, *A. pedemontana* subsp. *assoana*, *A. umbelliformis* subsp. *umbelliformis* y *A. lucentica*.

*Artemisia ramosa*, es un endemismo que crece en Gran Canaria y Tenerife, aunque también se describió una población en Marruecos en 1985 (Fig. 5). A partir de su estudio fitoquímico se describió la presencia de cumarinas y lactonas sesquiterpénicas en su composición (González et al., 1975).

*Artemisia reptans* C. Sm., fue declarada vulnerable (Lista Roja 2008) (Fig. 5). A su vez, en 2010 fue incluida en el Catálogo de especies protegidas canarias en la categoría de taxón de interés para los ecosistemas canarios (Ley 4/2010). Igual que en el caso de *A. ramosa*, existe una población en Marruecos. El único estudio fitoquímico disponible de esta especie se realizó con una

población de Marruecos y se caracterizó por poseer lignanos, sesquiterpenos acíclicos, achillín y espatulenol (Marco et al., 1994).

*Artemisia thuscula* (*A. canariensis*) crece en las siete islas del Archipiélago (Fig. 5). De esta especie se conoce la composición del aceite esencial (Bellomaria et al., 1993; Perfumi et al., 1995) y se han aislado eudesmanolidos y una nueva lactona sesquiterpénica (González et al., 1983; Breton et al., 1985; Mansilla y Palenzuela 1999).



**Fig. 5.** De arriba abajo, distribución en las IC de *A. ramosa*, *A. reptans* y *A. thuscula*.

**Tabla 1.** Especies del género *Artemisia* en la Península Ibérica y Archipiélagos. Número de registros, sinónimos y área de distribución ([www.anthos.es](http://www.anthos.es)).

Especies	Registros	Sinónimos	Distribución
<i>A. abrotanum</i> L.	13	<i>A. elatior</i> Klokov <i>A. herbacea</i> Willd. <i>A. paniculata</i> Lam. <i>A. procera</i> Willd. <i>A. proceriformis</i> Krasch	UE, Asia y América
<i>A. absinthium</i> L.	297	<i>A. baldaccii</i> Degen	UE, N África, N S América, Asia y Australia
<i>A. alba</i> Turra	168	<i>A. biasolettiana</i> Vis. <i>A. camphorata</i> var. <i>canescens</i> DC. <i>A. camphorata</i> Vill. <i>A. fruticosa</i> Asso <i>A. humilis</i> Wulfen <i>A. incanescens</i> var. <i>glabrescens</i> Willk. <i>A. incanescens</i> Godr. <i>A. lobelii</i> All. <i>A. saxatilis</i> Willd. <i>A. suavis</i> Jord. <i>A. subcanescens</i> Willd.	UE (región del mediterráneo)
<i>A. annua</i> L.	10	-	Distribución mundial
<i>A. arborescens</i> (Vaill.) L.	56	-	UE, África y Asia (distribución mediterránea) y Australia
<i>A. armeniaca</i> Lam.	14	<i>A. potentillifolia</i> Spreng.	Península Ibérica (Teruel, Sierra de Gúdar), Rusia, este de Anatolia y Cáucaso, hasta el norte de Irán
<i>A. barrelieri</i> Besser	137	<i>Seriphidium barrelieri</i> (Besser) Soják	Endémica de la Península Ibérica (Alicante, Almería, Granada, Guadalajara, Huelva, Jaén, Murcia y Tarragona)
<i>A. caerulea</i> subsp. <i>caerulea</i> L.	6	-	S Península Ibérica y distribución mediterránea
<i>A. caerulea</i> subsp. <i>gallica</i> (Willd.) K.M. Perss.	193	<i>A. gallica</i> Willd. <i>A. maritima</i> subsp. <i>gallica</i> (Willd.) Corb. <i>Seriphidium caerulea</i> subsp. <i>gallicum</i> (Willd.) Soják	S Península Ibérica, Islas Baleares y zona del mediterráneo
<i>A. caerulea</i> subsp. <i>Gargantae</i> Vallés-Xirau & Seoane-Camba	1	<i>A. caerulea</i> subsp. <i>sipontina</i> (Ten.) Nyman	Endémica de la Península Ibérica (Lleida)

<i>A. caerulescens</i> L.	220	<i>A. gallica</i> Willd. <i>A. maritima</i> subsp. <i>gallica</i> (Willd.) Corb. <i>A. palmata</i> Lam. <i>A. sipontina</i> Ten. <i>Seriphidium caerulescens</i> subsp. <i>gallicum</i> (Willd.) Soják <i>Seriphidium caerulescens</i> (L.) Soják	S Península Ibérica y región del mediterráneo
<i>A. campestris</i> subsp. <i>campestris</i> L.	35	-	Península Ibérica, UE, Asia y África
<i>A. campestris</i> subsp. <i>glutinosa</i> (Besser) Batt.	573	<i>A. glutinosa</i> Besser <i>A. jussiaeana</i> Besser	N Península Ibérica, Italia, Francia y África
<i>A. campestris</i> subsp. <i>Maritima</i> (DC.) Arcang.	140	<i>A. campestris</i> var. <i>maritima</i> DC. <i>A. crithmifolia</i> L. <i>A. gayana</i> Besser	Costa de la Península Ibérica, Francia y Holanda
<i>A. campestris</i> L.	965	<i>A. campestris</i> subsp. <i>lloydii</i> (Roudy) Cout <i>A. crithmifolia</i> L. <i>A. dniproica</i> Klokov <i>A. gayana</i> Besser <i>A. glutinosa</i> Besser <i>A. jussiaeana</i> Besser <i>A. odoratissima</i> Desf. <i>A. sosnovskyi</i> Novopokr. <i>A. cantabrica</i> (M. Laínz) M. Laínz	UE y Asia
<i>A. chamaemelifolia</i> subsp. <i>cantabrica</i> M. Laínz	33	-	Endémica de la Península Ibérica (Asturias, Cantabria, León y Palencia)
<i>A. chamaemelifolia</i> subsp. <i>chamaemelifolia</i> Vill.	3	-	UE y Asia
<i>A. chamaemelifolia</i> vill.	52	<i>A. iberica</i> Boiss.	UE y Asia
<i>A. granatensis</i> Boiss.	94	-	Endémica de la Península Ibérica (Almería y Granada)
<i>A. herba-alba</i> Asso.	481	<i>A. valentina</i> Lam. <i>A. aragonensis</i> Lam. <i>A. herba-alba</i> subsp. <i>valentina</i> (Lam.) Masclans <i>Seriphidium herba-alba</i> (Asso) Soják	Península Ibérica, Francia, Inglaterra y Marruecos
<i>A. lucentica</i> O. Bolòs & al.	87	<i>A. hispanica</i> Lam.	Endémica de la Península Ibérica (Albacete, Alicante, Cádiz, Granada, Málaga, Murcia y Valencia)
<i>A. pedemontana</i> subsp. <i>assoana</i> (Willk.) Rivas Mart.	141	<i>A. assoana</i> Willk.	Endémica de la Península Ibérica (Aragón)

<i>A. ramosa</i> C. Sm.	47	<i>A. lanata</i> Willd. <i>A. herba-alba</i> var. <i>incana</i>	Endémica de las Islas Canarias con una población en Marruecos
<i>A. reptans</i> C. Sm.	38	<i>A. hispanica</i> var. <i>reptans</i>	Endémica de las Islas Canarias con una población en Marruecos
<i>A. thuscula</i> Cav.	401	<i>A. argentea</i> Buch. <i>A. canariensis</i> Less.	Endémica de las Islas Canarias
<i>A. tournefortiana</i> Rchb.	14	-	UE, Asia y N América
<i>A. umbelliformis</i> subsp. <i>eriantha</i> (ten.) VallèsXirau & Oliva Brañas	29	<i>Absinthium petrosum</i> Baumg. <i>A. baumgartenii</i> Besser <i>A. eriantha</i> Ten. <i>A. genipi</i> subsp. <i>eriantha</i> (Ten.) P. Fourn. <i>A. petrosa</i> subsp. <i>eriantha</i> (Ten.) Giacom. & Pignatti <i>A. petrosa</i> (Baumg.) Jan <i>A. umbelliformis</i> subsp. <i>gabriellae</i> (Braun-Blanq.) Vigo	Península Ibérica, Los Pirineos (Huesca y Lleida), UE (especie alpina)
<i>A. umbelliformis</i> subsp. <i>umbelliformis</i> Lam.	2	-	Endémica de la Península Ibérica, en los Pirineos (Gerona y Huesca)
<i>A. umbelliformis</i> Lam.	100	<i>A. villarsii</i> Godr. & Gren.	Península Ibérica, en los Pirineos, una población en la Cordillera Cantábrica y otra en Sierra Nevada. C y S de Europa en zonas de montaña
<i>A. verlotiorum</i> Lamotte	232	<i>A. vulgaris</i> subsp. <i>verlotiorum</i> (Lamotte) Bonnier	UE, África, Asia y Sudamérica
<i>A. vulgaris</i> L.	322	-	Distribución mundial

### 1.1.2 Compuestos mayoritarios del género *Artemisia*

El género *Artemisia* comprende numerosas plantas productoras de aceites esenciales (Abad et al., 2012). Los aceites esenciales contienen mayoritariamente compuestos volátiles que se agrupan en, terpenos, compuestos fenólicos y alifáticos. Generalmente son extractos con un espectro de actividad muy amplio y los compuestos secundarios que lo constituyen además de atraer a insectos polinizadores intervienen en la defensa química de las plantas y tienen efectos medicinales. Estos efectos biológicos están determinados por la composición y la concentración de los compuestos en el aceite esencial y puede variar significativamente dependiendo del quimiotipo. La tabla 2 enumera los aceites esenciales y quimiotipos de poblaciones de la PI y Archipiélagos junto con sus actividades biológicas descritas. En el caso de especies con amplia distribución geográfica se han incluido estudios de plantas recolectadas fuera de la PI y/o Canarias.

*Artemisia annua*, *A. campestris* y *A. alba* Turra han sido extensamente estudiadas y se ha comparado la composición química de distintas poblaciones (Bilia et al., 2014; Dib et al., 2016; Perón et al., 2016). En el caso de *A. absinthium*, se han descrito varios quimiotipos en la PI y otras zonas geográficas. Recientemente se ha domesticado una población de *A. absinthium* de Teruel, cuyo quimiotipo se caracteriza por los compuestos (-)-(Z)-epoxicimeno (44,6 %), (-)-*cis*-crisantenol (18,1 %) y por la ausencia de tujonas tóxicas, que ha sido registrada como una nueva variedad vegetal, ®Candial para la producción de aceite esencial y otros extractos con efectos antifúngicos (Julio et al., 2015), nematocidas y antiparasitarios (García-Rodríguez et al., 2015; Martínez-Díaz et al., 2015, Julio et al, 2017).

**Tabla 2.** Aceites esenciales, quimiotipos y bioactividades de especies de *Artemisia* presentes en la Península Ibérica, Islas Canarias y Baleares.

<b>Especies</b>	<b>Quimiotipo</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencias</b>
<i>A. abrotanum</i>	1,8-Cineole (32.6%), borneol (13.5%) y presil-piperfolan-9 $\alpha$ -ol (10.2%)	Repelente	Tabanca et al., 2011
<i>A. absinthium</i>	(-)-(Z)-Epoxyocimene (44.6%) y (-)- <i>cis</i> -chrysanthenol y (18.1%) (Z)-Epoxyocimene (49.7%) y <i>cis</i> -chrysanthenyl acetate (11.4%) Carvacrol (25.5%), thymol (25.7%) y <i>p</i> -cymene (11.9%) (-)-(Z)-Epoxyocimene (44.6%) y (-)- <i>cis</i> -chrysanthenol (18.1%) $\alpha$ -Phellandrene (41.1%), sabinene (15.5%) y <i>cis</i> -sabinene hydrate (10.6%) Chamazulene (29.5%) y $\beta$ -thujone (22.1%) Davana-ether 1 (9.9%) y artedoaglasia oxide A, C and D (11.5, 8.3 and 8.2%) Sabinene (21.5%) y <i>ortho</i> -cymene (19.2%) Borneol (18.7%), methyl hinokiate (11.9%) y isobornyl acetate (4.0%)	Antifúngica   Nematicida  Antibacteriana	Julio et al., 2015*  Juteau et al., 2002  Eblaghi et al., 2016 García-Rodríguez et al., 2015*  Asili et al., 2015  Msaada et al. 2015 Asili et al., 2015  Stanković et al., 2016
<i>A. alba</i>	Chamazulene (17.8%) y nuciferol butanoate (8.2%) (-)-(Z)-Epoxyocimene (44.6%) and (-)- <i>cis</i> -chrysanthenol (18.1%) Spathulenol (11.8%), artemisia ketone (10.1%), camphor (7.5%) y 1,8-cineole (7.4%)	Insecticida Antiparasítica  -	Kordali et al., 2006 Martínez-Díaz et al., 2015*  Radulović y Blagojević, 2010
<i>A. arborescens</i>	Camphor (24.7%), Chamazulene (20.9%), Bornyl acetate (4.9%)	Antimicrobiana	Janačkovic et al., 2015
<i>A. armeniaca</i>	$\alpha$ -pinene (10.7%), nonadecane (10.0%) 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (9.4%), spathulenol (7.8%) y z-verbenaol (5.8%) $\alpha$ -pinene (41.9%), 1,8-cineole (20.6%), spathulenol (6.7%), y davanone (2.0 %)	Toxicidad general	Mojarrab et al., 2013  Kazemi et al., 2010
<i>A. barrelieri</i>	1,8-cineole (30.0%), chrysanthenone (24.3%), filifolone (6.3%), $\alpha$ -thujone (5.1%) y camphor (4.4%)	-	Velasco-Negueruela et al., 2001 *
<i>A. caerulescens subsp. caerulescens</i>	$\alpha$ -thujone (hasta 56.2%), $\beta$ - thujone (hasta 26.3 %) y camphor (hasta 31.7%)	-	Biondi et al., 2000
<i>A. caerulescens subsp. gallica</i>	Santonin, thujone, camphor, $\beta$ -caryophyllene, borneol, nerol	Analgésico,	Morán et al., 1989 *

	y $\alpha$ -terpineol	antipirético, anti-inflamatorio y antimicrobiana	Villar et al., 1983*
<i>A. caerulea</i> subsp. <i>gargantae</i>	-	-	-
<i>A. chamaemelifolia</i>	1,8-Cineole (31.8%), camphor (7.9%) and borneol (6.9%) Carvacrol (25.5%), thymol (25.7%) y <i>p</i> -cymene (11.9%)	Antibacteriana Antifúngica	Ghasemi Pirbaloutia et al., 2013 Eblaghi et al., 2016
<i>A. granatensis</i>	-	-	-
<i>A. herba-alba</i>	Camphor (15%), 1,8-cineole (13.3%), $\alpha$ -terpineol (6.3%), terpinen-4-ol (4,8%) y borneol (4,8%)	-	Feuerstein et al., 1988*
<i>A. lucentica</i>	-	-	-
<i>A. pedemontana</i> subsp. <i>assoana</i>	Camphor (49.2%) y 1,8-cineole (12.6%) Davanone (28.4%)	-	Perez-Alonso et al., 2003*
<i>A. ramosa</i>	-	-	-
<i>A. reptans</i>	-	-	-
<i>A. thuscula</i>	Davanone (hasta 62.3%) y camphor (hasta 12.2%) Camphor (36.7%), chrysanthenone (14.7%) y $\beta$ -thujone (10.3%)	Actividad espasmolítica	Bellomaria et al., 1993* Perfumi et al., 1995*
<i>A. tournefortiana</i>	( <i>Z</i> )-Nerolidol (22.4%), $\beta$ -caryophyllene (15.6%) y santolina triene (10.1%)	Antibacteriana	Kazemi y Akhavani, 2013
<i>A. umbelliformis</i> subsp. <i>eriantha</i>	$\alpha$ -Thujone (61.26%) y $\beta$ -thujone (12.32%)	-	Reale et al., 2014
<i>A. umbelliformis</i> subsp. <i>umbelliformis</i>	-	-	-
<i>A. umbelliformis</i>	Thujone (45-76%) Borneol (hasta 68%) Cineol (25%) y borneol (21%) $\beta$ -pinene (48%) y $\alpha$ -pinene (22%)	Bioactividad	Vouillamoz et al., 2015 Review
<i>A. verlotiorum</i>	$\alpha$ -Thujone (26.0%) y camphor (17.7%).	-	Haider et al., 2006
<i>A. vulgaris</i>	Camphor (17.3%), $\alpha$ -thujone (10.7 %) y $\gamma$ -muurolene (9.0%) $\alpha$ -Thujone (30.5%), 1,8-cineole (12.4%) y camphor (10.3%)	Insecticida Fitotóxica	Govindaraj et al., 2013 Satyal et al., 2012
	$\alpha$ -Thujone (35.5%), camphor (26.0%) y 1,8-cineole (8.2%)	Antimalárica	Milhau et al., 1997

\*Poblaciones recolectadas en la Península Ibérica y Archipiélagos



En la Tabla 3 se enumeran los compuestos aislados de las especies de *Artemisia* presentes en la PI y Canarias. En general la familia Asteraceae se caracteriza por contener terpenoides, que conforman un grupo de productos naturales con un rango amplio de actividades. Destacan las lactonas sesquiterpénicas, formadas por esqueletos con 15 carbonos y que se clasifican en germacranólidas; eudesmanólidas y eremofilanólidas; guayanólidas, pseudoguayanólidas e hipocretenólidas (Chaturvedi 2011). De ellas en el género *Artemisia* las más comunes son las germacranólidas, eudesmanólidas y guayanólidas (Fig. 6) (Ivanescu et al., 2015).

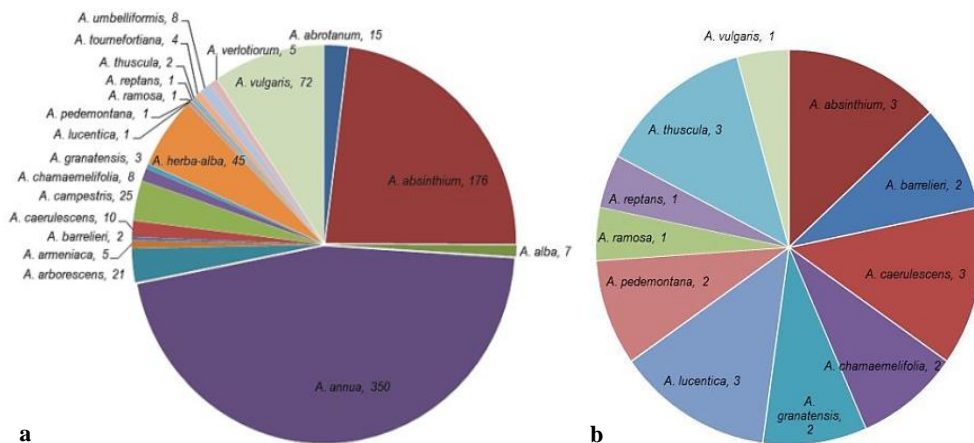
**Tabla 3.** Compuestos químicos aislados de plantas recolectadas en la Península Ibérica y las Islas Canarias y Baleares

<b>Especies</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Referencias</b>
<i>A. absinthium</i> L.	<b>1-3</b>	González-Coloma et al., 2012
	<b>4</b>	Bailén et al., 2013
	<b>5</b>	Julio et al., 2015
<i>A. barrelieri</i> Besser	<b>6-8</b>	Villar et al., 1983
	<b>9-12</b>	Marco et al., 1991
<i>A. caerulescens</i> subsp. <i>gallica</i> (Willd.)	<b>13-16</b>	San Feliciano et al., 1986
<i>A. caerulescens</i> subsp. <i>gargantae</i> Vallès-Xirau	<b>17-18</b>	Sanz y Marco 1990 a
<i>A. chamemelifolia</i> subsp. <i>cantabrica</i> M. Lainz	<b>19-21</b>	Sanz y Marco 1990 b
	<b>22-25</b>	San Feliciano et al., 1986
<i>A. chamemelifolia</i> subsp. <i>chamemelifolia</i>	<b>26-38</b>	Marco et al., 1996
<i>A. granatensis</i> Boiss.	<b>6-7</b>	González et al., 1975
	<b>39-58</b>	Barrero et al., 2013
	<b>59-75</b>	Marco et al., 1988
<i>A. lucentica</i> O. Bolòs & al.	<b>76-86</b>	Sanz et al., 1989
	<b>87-95</b>	Marco et al., 1997
	<b>96-97</b>	Martínez et al., 1987
<i>A. pedemontana</i> subsp. <i>assoana</i>	<b>98-104, 1, 57, 59, 64, 66, 67, 72 y 74</b>	Marco et al., 1987
<i>A. ramosa</i> C. Sm.	<b>102-106</b>	González et al., 1975
<i>A. reptans</i> C. Sm.	<b>107-116, 63, 96, 102</b>	Marco et al., 1994
<i>A. thuscula</i> Cav.	<b>117-121, 8</b>	González et al., 1983
	<b>122</b>	Breton et al., 1985
	<b>123-130</b>	Mansilla y Palenzuela, 1999
<i>A. tournefortiana</i> Rchb.	<b>131-134</b>	Sanz y Marco, 1990 c
<i>A. vulgaris</i> L.	<b>135-137</b>	Marco et al., 1991

Los compuestos fenólicos, flavonas (Fig.7), cumarinas (Fig.8) y los lignanos (Fig. 9) se caracterizan por presentar al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno (Ferreira et al., 2010) y se sintetizan en las plantas durante su desarrollo y en condiciones de estrés. Las especies de *Artemisia* también contienen poliacetilenos, una clase de policétidos relacionados con los ácidos grasos, que se caracterizan por la presencia de dos o más triples enlaces de carbono. Estos compuestos además de estar presentes en plantas, también se encuentran en hongos y animales (Fig. 9) y presentan un amplio rango de actividad (antitumoral, antibacteriana, antimicrobiana y antifúngica) (Negri 2015). También se han aislado en diversas especies del género compuestos como aminoácidos, ácidos grasos y el ácido cafeoilquínico (Borsutzki, 1955; Carnat et al., 2000), como en el caso de *A. armeniaca* de Armenia, a los que se les ha atribuido actividad antioxidante (Mojarrab et al., 2011).

La mayoría de los estudios fitoquímicos de las especies de *Artemisia* se han realizado sobre poblaciones de zonas geográficas distintas de la PI y Canarias. Por lo que la composición química descrita para estas poblaciones puede variar con respecto a la que presenten las poblaciones de la PI. Así, estudios recientes de *A. alba* Turra de Bulgaria describen la presencia de sesquiterpenos altamente oxigenados, mientras que las poblaciones italianas mostraron además la presencia de flavonoides (Todorova et al., 2015; Perón et al., 2016). Los estudios fitoquímicos de *A. abrotanum*, *A. arborescens*, *A. armeniaca* y *A. verlotiorum* se han realizado con poblaciones procedentes de Azerbaiyán, Italia e Irán, respectivamente (Serkerov y Ibragimova 2014; Marco et al., 1997; Costal et al., 2016; Rybalko et al., 1975; Szabó et al., 1985; Mojarrab et al., 2011). Todo ello confirma la importancia de realizar estudios químicos de las poblaciones de *Artemisia* de la PI e IC y en su caso, caracterizar los quimiotipos con el objetivo de valorar el potencial de las mismas. En la Figura 10 se muestra (a) el número de estudios fitoquímicos publicados relativos a especies

presentes en la zona PI-IC, incluyendo poblaciones de otras áreas de distribución (Fuente: web of science, 1940-2017), y (b) número de estudios fitoquímicos realizados exclusivamente con poblaciones de la zona PI-Canarias (Tabla 3).



**Fig. 10.** Número de artículos sobre composición química de las especies del género *Artemisia*. a) Según web of science (1940-2017); b) De acuerdo con la tabla 3.

Las especies con rangos de distribución amplios, como *A. annua* y *A. absinthium*, han sido poco estudiadas en la PI, lo mismo que *A. tournefortiana*, *A. verlotiorum* y *A. vulgaris*. Sólo se ha estudiado una población de *A. vulgaris* de la PI (Marco et al., 1993). El estudio de *A. tournefortiana* procedente de la PI resultó en el aislamiento de eudesmanolidos (Sanz y Marco, 1990) que también se aislaron de plantas de una población iraní (Rustaiyan et al., 1987) y de Kazakstán (Talzhánov et al., 2007). De *A. verlotiorum* sólo hay estudios de una población Iraní (Marco et al., 1993). La misma situación se da en el caso de *A. armeniaca* y *A. arborescens*.

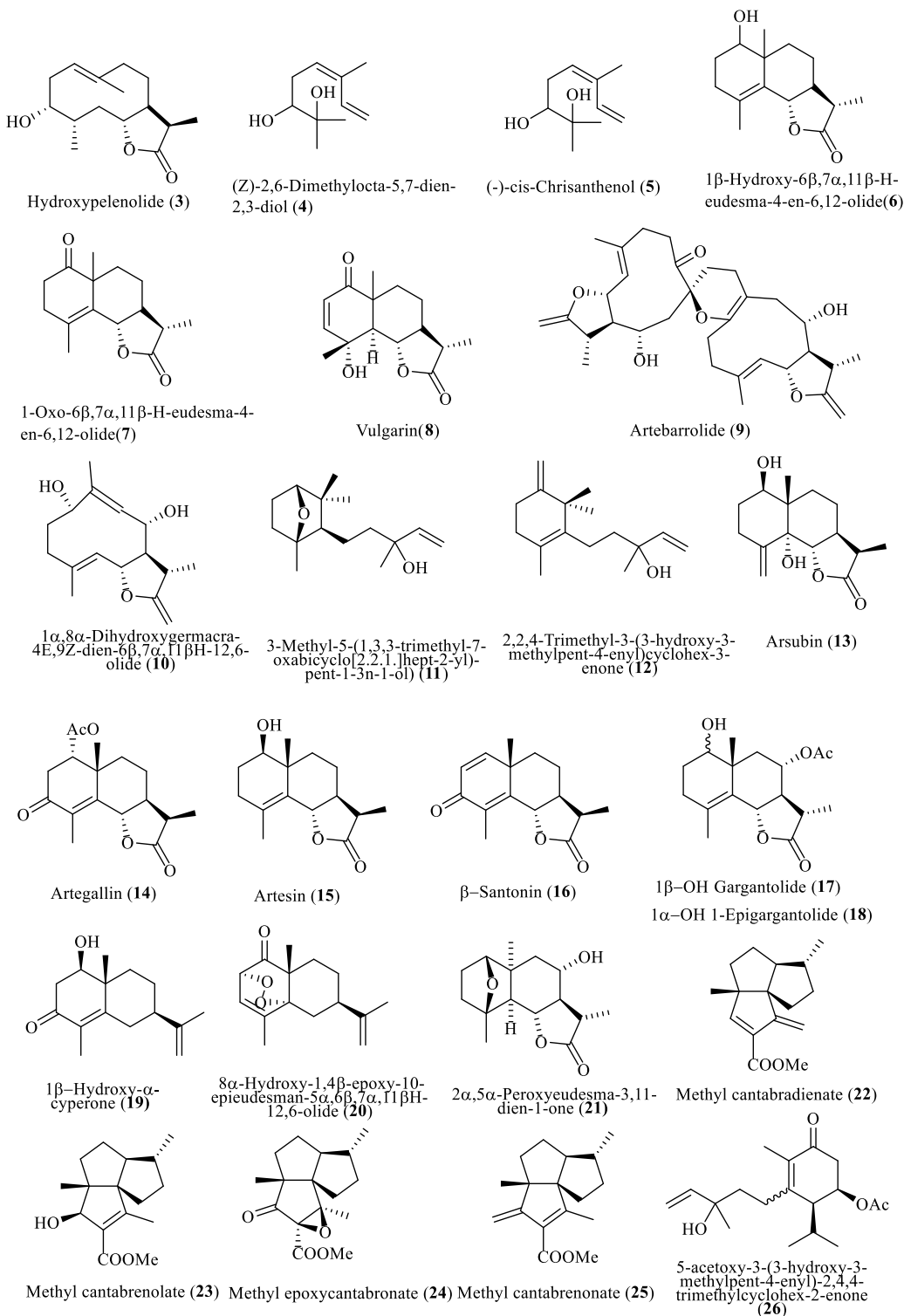
La mayoría de las especies de *Artemisia* raras o en peligro de extinción han sido poco o nada estudiadas, probablemente por la poca disponibilidad de

individuos. En estos casos es necesario el empleo de nuevas herramientas como la producción biotecnológica para generar biomasa de manera sostenible. La aplicación de estas técnicas biotecnológicas, aumenta considerablemente la disponibilidad del material vegetal necesario para llevar a cabo estudios fitoquímicos y biológicos, que pueden dar un valor añadido a estas especies de plantas y promover su conservación. Por ejemplo, *A. granatensis*, especie en peligro de extinción, ha sido recientemente estudiada usando raíces transformadas *in vitro* (Barrero et al., 2013) y el cultivo aeropónico, otra herramienta de producción, se ha empleado en el estudio de *A. absinthium* (González-Coloma et al., 2013).

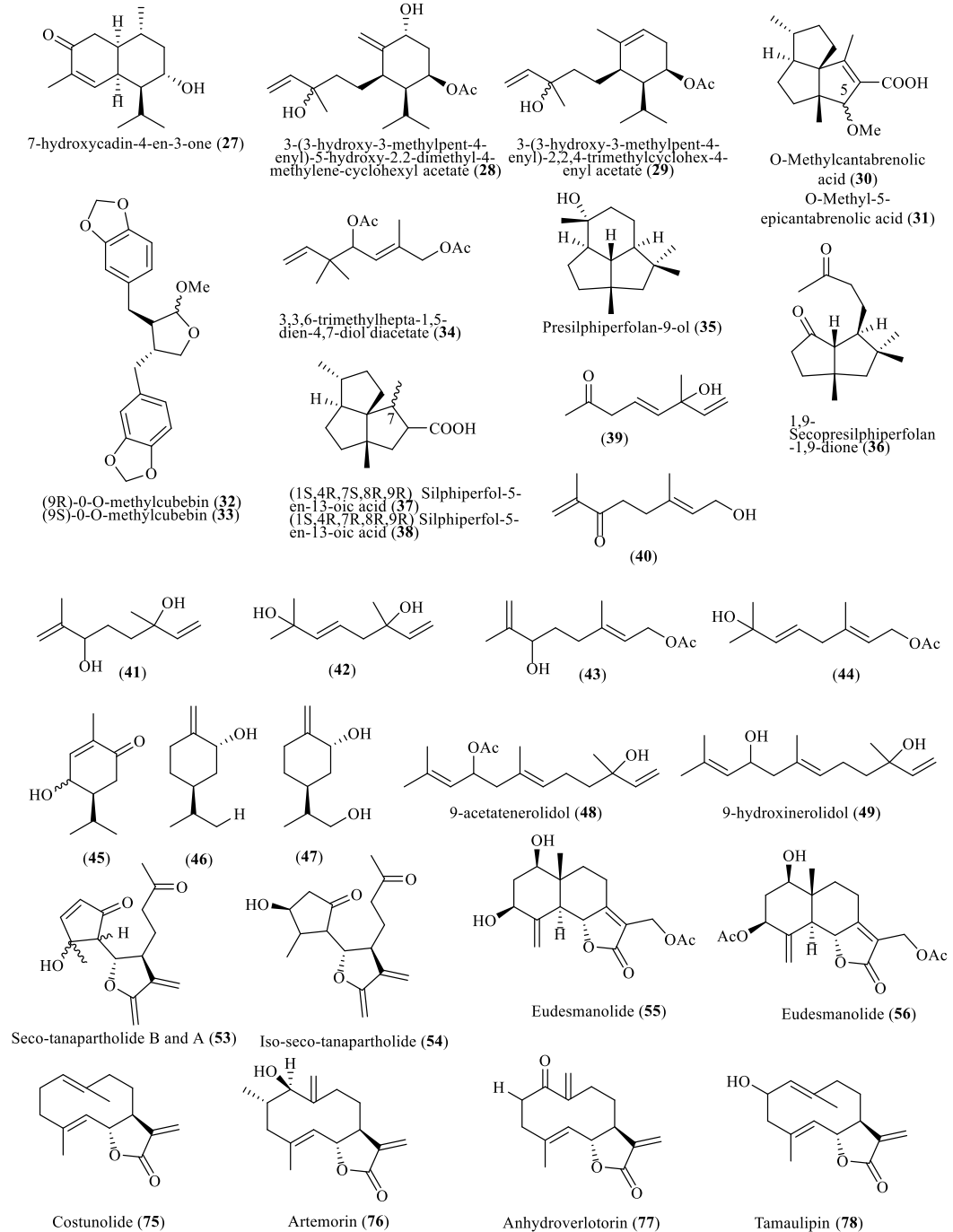
Todo ello pone de manifiesto la necesidad de profundizar en el estudio de las especies de *Artemisia* de la zona PI-IC con especial énfasis en las endémicas/raras por la falta de estudios realizados, y en las vulnerables para dotarlas de valor añadido y proveerlas de herramientas de producción de biomasa sostenible, contribuyendo así a su conservación.

Este trabajo se focaliza en las especies *Artemisia pedemontana* (*assoana*) y *Artemisia armeniaca* de la PI. El cultivo artificial de las plantas, mediante sistemas de producción biotecnológica (cultivo *in vitro* de raíces transformadas y cultivo aeropónico) ha permitido disponer de biomasa para llevar a cabo el estudio fitoquímico biodirigido de sus partes aéreas y raíces frente a especies seleccionadas de parásitos de animales y humanos así como a especies diana de insectos plaga y organismos patógenos de los cultivos.

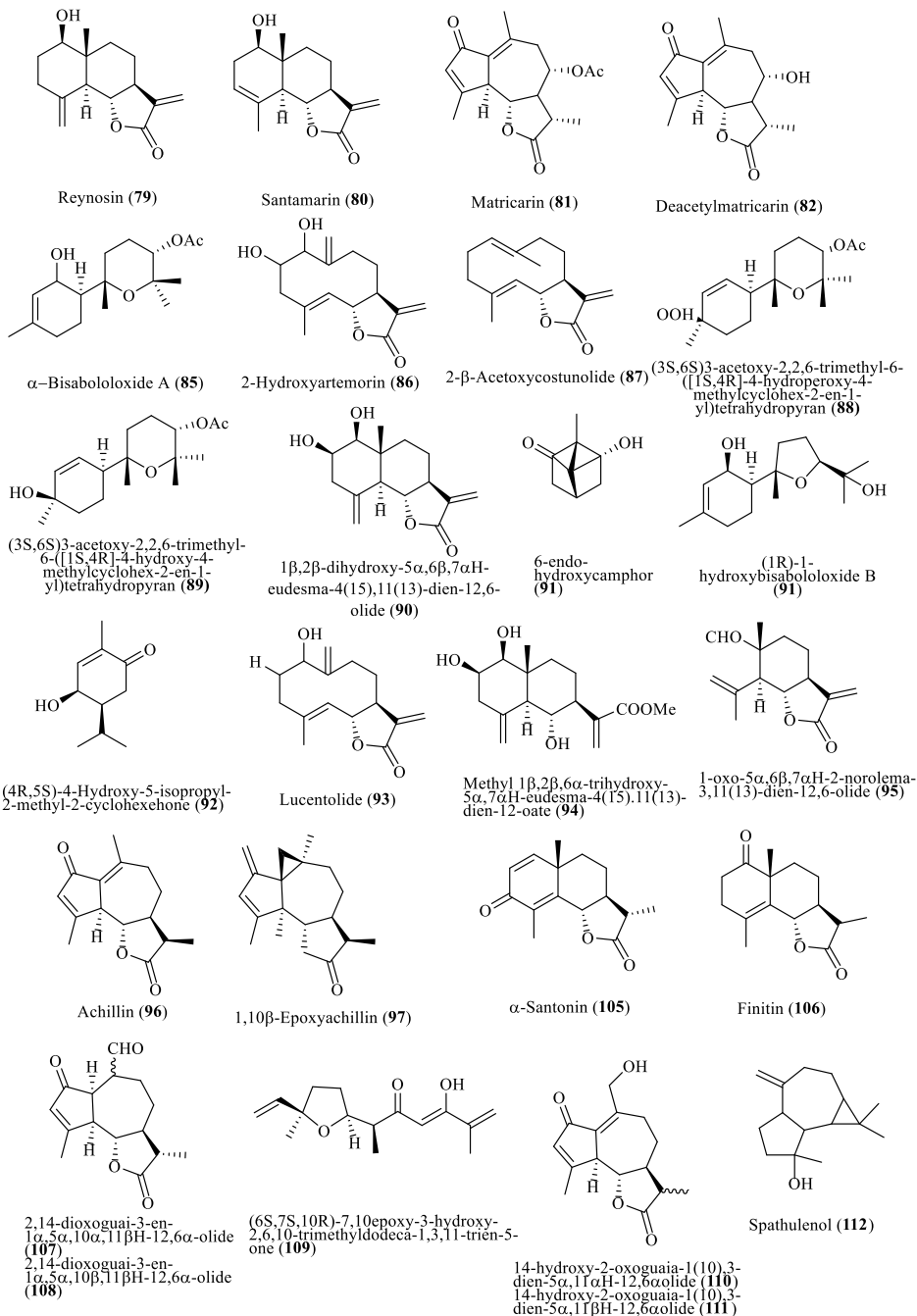
**Fig. 6.** Estructura química de compuestos terpenoides del género *Artemisia* (Tabla 3)



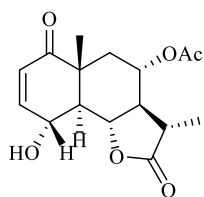
**Fig. 6. Continuación**



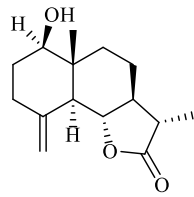
**Fig. 6.** Continuación



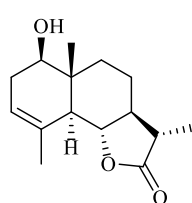
**Fig. 6. Continuación**



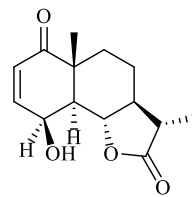
Acetyltabarin (117)



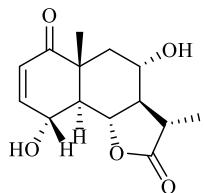
11,13-Dihydroreynosin (118)



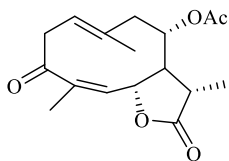
11,13-Dihydrosantamarin (119)



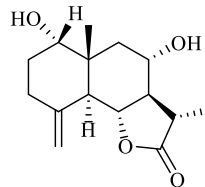
4-Epivulgarin (120)



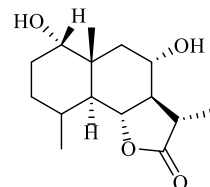
Tabarin (121)



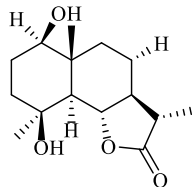
Heliangolidin (122)



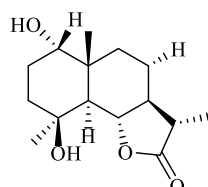
Artapshin (123)



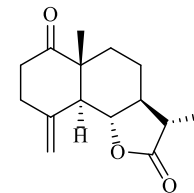
8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrobalchanin (124)



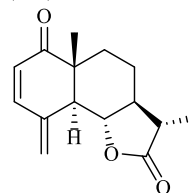
1 $\alpha$ -4 $\alpha$ -dihydroxyeudesma-2-en-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\beta$ H-12,6-olide (125)



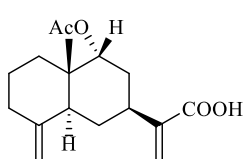
1 $\beta$ -hydroxycolarin (126)



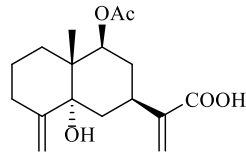
1-oxo-eudesma-4(15)-en-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\beta$ H-12,6-olide (127)



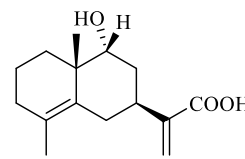
1-oxo-eudesma-2,4(15)-dien-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\beta$ H-12,6-olide (128)



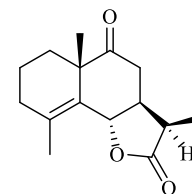
9 $\beta$ -acetoxycostic acid (131)



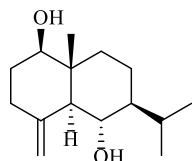
9 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -hydroxycostic acid (132)



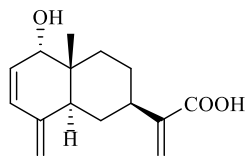
9 $\beta$ -hydroxyeudesma-4,11(13)-dien-7 $\alpha$ H-12-oic acid (133)



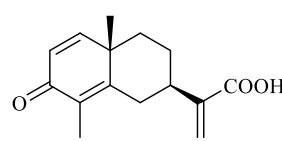
9-oxo-11 $\beta$ ,13-dihydrotournefortioldide (134)



Eudesmane dialcohol (135)



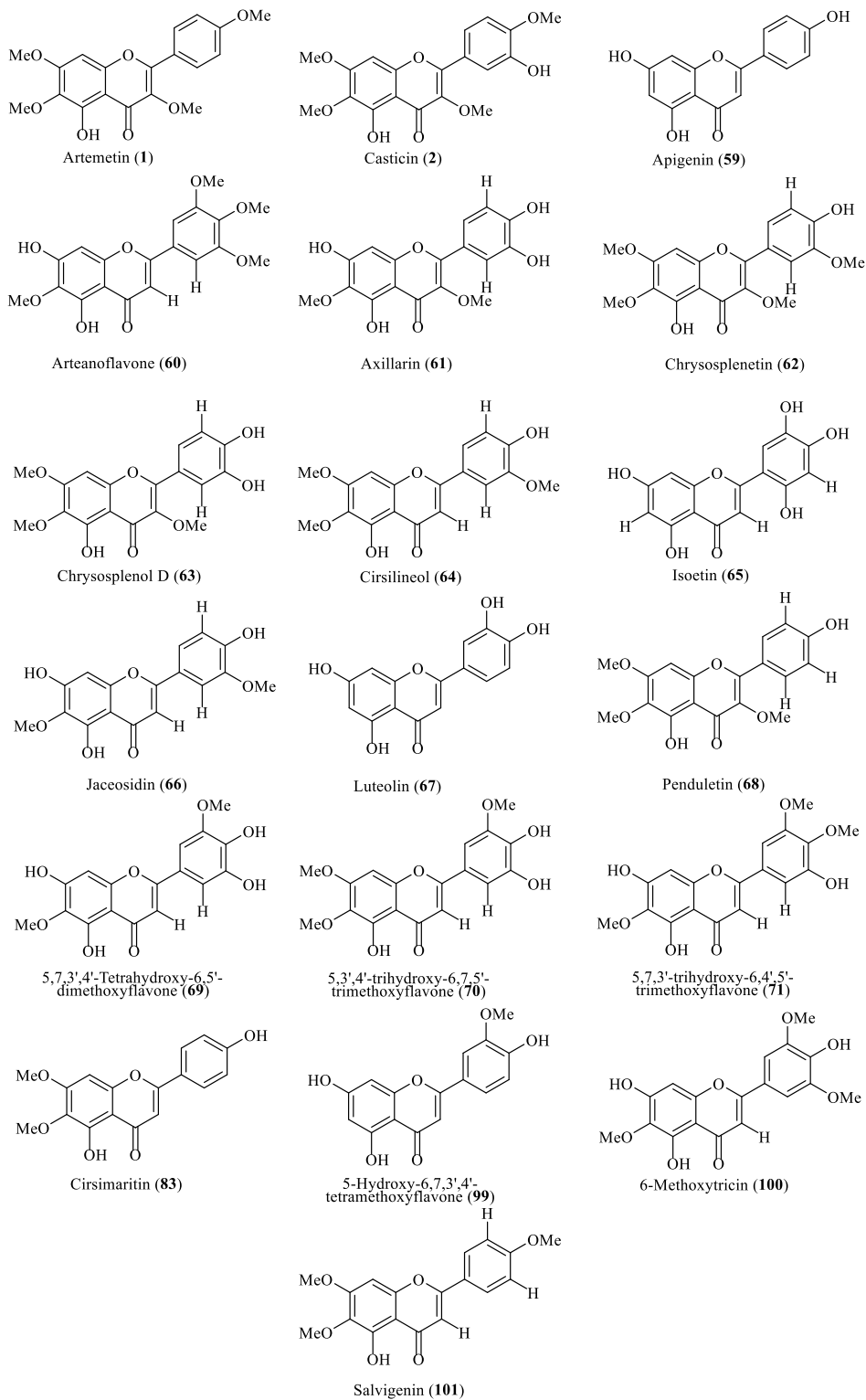
1 $\alpha$ -Hydroxyeudesma-2,4(15),11(13)-trien-5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ H-12-oic acid (136)



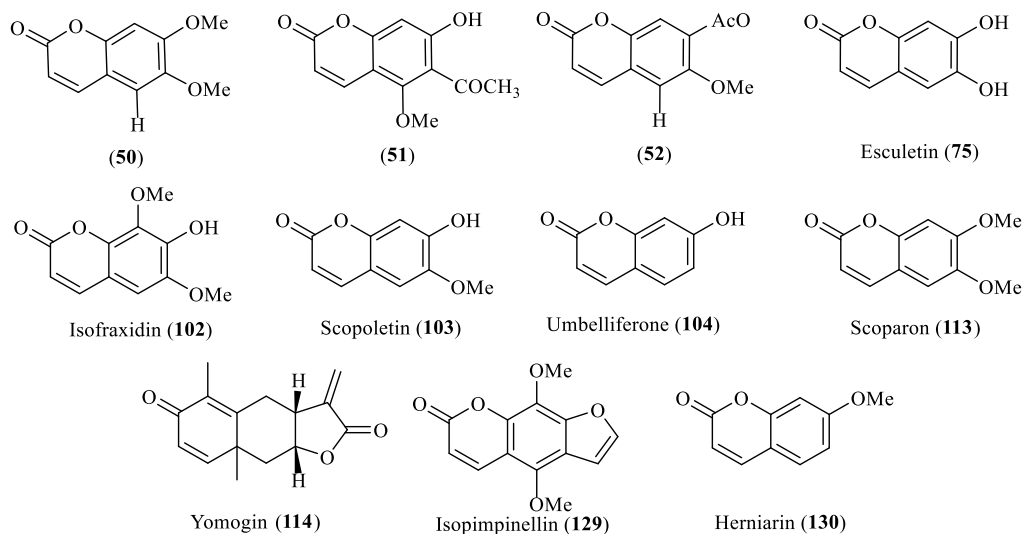
3-Oxo-eudesma-1,4,11(13)-trien-7 $\alpha$ H-12-oic acid (137)



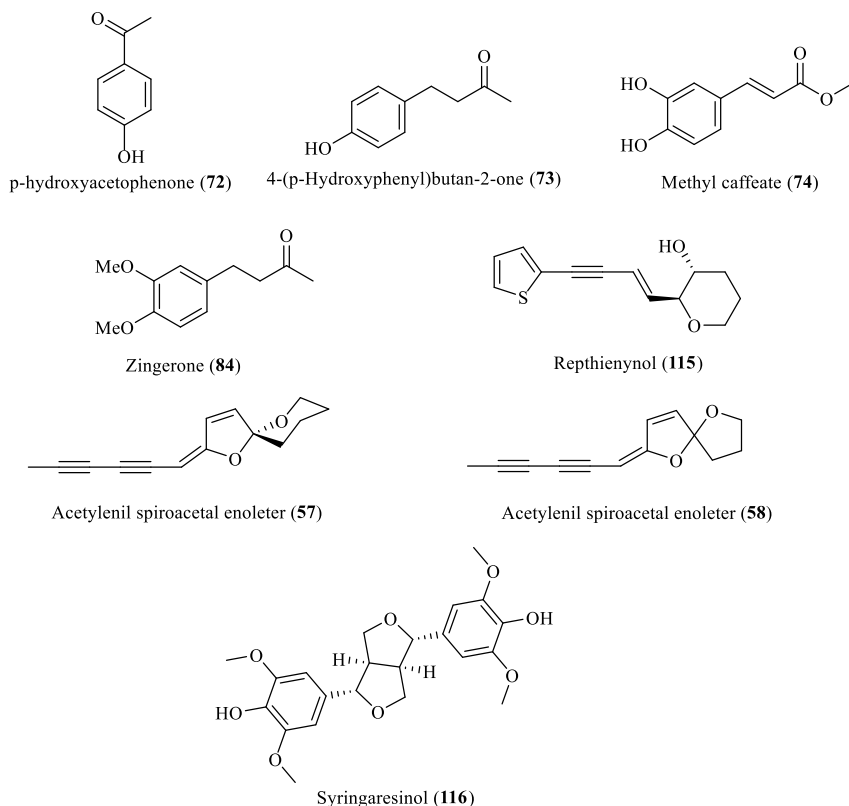
**Fig.7.** Flavonas del género *Artemisia* (Tabla 3)



**Fig. 8.** Cumarinas del género *Artemisia* (Tabla 3)



**Fig. 9.** Compuestos fenólicos, poliacetilenos y lignanos del género *Artemisia* (Tabla 3)



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio fitoquímico biodirigido de extractos de parte aérea y raíz de las especies *Artemisia pedemontana (assoana)* y *A. armeniaca* y su obtención mediante procesos biotecnológicos, con el fin de caracterizar extractos y compuestos que puedan servir de modelo para el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios y plaguicidas de origen botánico.

Objetivos específicos:

- Producción sostenible de las especies seleccionadas mediante la adaptación-optimización de cultivos artificiales (aeropónico, *in vitro*).
- Puesta a punto de nuevos ensayos *in vitro* frente a líneas celulares de garrapata y el patógeno vegetal *Phytomonas davidi*.
- Estudio químico biodirigido de las especies seleccionadas. Identificación de los compuestos activos.
- Biotransformación y transformaciones químicas del compuesto achillín.
- Estudio de las relaciones estructura-actividad de los compuestos identificados

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Material Biológico

#### 3.1.1 Especies vegetales

Las plantas seleccionadas para este estudio son dos especies del género *Artemisia*, una endémica *Artemisia pedemontana* subsp. *assoana* (Willk.) Rivas Mart y una en peligro de extinción, *Artemisia armeniaca* Lam. Según el “Catalogue of life” 2017 la clasificación sistemática es la siguiente:

Reino Plantae

Filo Tracheophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Género *Artemisia*

Especie *Artemisia pedemontana* subsp. *assoana*  
(Willk.) Rivas Mart

*Artemisia armeniaca* Lam.

##### 3.1.1.1 *Artemisia pedemontana* subsp. *assoana* (Willk.) Rivas Mart.

Los sinónimos empleados son *Artemisia assoana* (Willk.) y *Artemisia lanata* subsp. *assoana* (Willk.) A. Love & Kjellqvist.

Crece en ecosistemas degradados y pastoreados, adaptada a climas continentales y en un rango altitudinal de 900 a 2000 m. Se trata de una planta pequeña perenne y aromática, de aspecto pulviniforme (Fig. 11).



**Fig. 11.** Foto de *A. assoana*.

El material vegetal para su estudio fitoquímico se obtuvo de una población silvestre a 1.050 m de altitud, localizada en el municipio de Campillo de Aragón, en la Comarca de Calatayud, colindante a la Provincia de Guadalajara (Coordenadas GPS WL969514, 1077m). Se recolectó parte aérea para su extracción y semillas para su multiplicación. Las semillas se germinaron en cámara de cultivo (25°C, 70% HR y fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad) y las plántulas se cultivaron en sustrato compuesto por 3 partes de tierra y 1 de turba, con riego por aspersión durante los meses de verano, 1 vez por semana, o a demanda. Las plantas se multiplicaron vegetativamente y se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales para establecer su cultivo aeropónico e *in vitro* para la obtención de raíces transformadas. El aceite esencial se obtuvo de las flores de las plantas mantenidas en tiestos (con el mismo sustrato y riego descritos anteriormente) en un invernadero sin climatización

### **3.1.1.2 *Artemisia armeniaca* Lam.**

Se trata de una planta vivaz, con largos rizomas horizontales que dan lugar a rosetas estériles y tallos floríferos, solitarios y poco ramificados. Las hojas basales son de color gris-verdosas y pecioladas (Fig. 12).



**Fig. 12.** Foto de *A. armeniaca*.

*Artemisia armeniaca* es una especie con una distribución característica. Se localiza en Rusia, este de Anatolia y Caúcaso, hasta el norte de Irán, más una población disyunta en la Península Ibérica, donde presenta un pequeño número de individuos en la Sierra de Gúdar. En España, se encuentra en la categoría de taxón en peligro de extinción (Lista Roja 2008) pero a nivel mundial no ha sido evaluada. Sus poblaciones se encuentran incluidas en el LIC (Lugar de Importancia Comunitaria) “Maestrazgo y Sierra de Gúdar”. A nivel regional, por el Decreto 181/2005 del Gobierno de Aragón está en la categoría de taxón vulnerable.

Las plantas de *A. armeniaca* se obtuvieron a partir de semillas recolectadas de una población localizada en Linares de Mora (Teruel) (coordenadas GPS YK070734, 1776m). Las semillas germinaron en cámara de cultivo (25°C, 70% HR y fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad) y las plántulas se cultivaron en sustrato compuesto por 3 partes de tierra y una de turba, con riego por aspersión durante los meses de verano, 1 vez por semana, o a demanda. Las plantas se multiplicaron vegetativamente y se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales para establecer su cultivo aeropónico e *in vitro* para la obtención de raíces transformadas.

## 3.1.2 Producción de biomasa

### 3.1.2.1 Cultivo aeropónico

El cultivo aeropónico es una técnica que genera material vegetal libre de la interferencia de insectos y microorganismos independientemente de la estación del año, ya que las plantas se desarrollan en ausencia de suelo y las raíces crecen suspendidas en el aire. En este tipo de cultivo se puede controlar el ambiente en el que crecen las plantas, el régimen de riego y de nutrientes. El cultivo aeropónico permite obtener biomasa de todos los órganos de la planta, ofreciéndonos la posibilidad de realizar muestreos selectivos, como por ejemplo diferenciar entre raíces primarias y secundarias (Weathers y Zobel, 1992).

Para establecer el cultivo aeropónico se utilizaron plántulas procedentes del cultivo en cámaras a 25°C, 70% HR y un fotoperiodo 16:8. La cámara aeropónica, situada a su vez en un ambiente controlado de las mismas características, tiene unas dimensiones de 4 x 1.5 x 0.4 metros y un tanque de agua de 220 L (Fig 13). Las plántulas se colocaron sobre un soporte inerte de arcilla expandida manteniendo



**Fig. 13.** Imagen de la cámara de cultivo aeropónico.

una separación entre ellas de 20 cm. Las raíces se pulverizaron durante 15 minutos cada 2 horas con una solución nutritiva de 0.2 g/L de Nutrichem (20:20:20 de N, P, K- Miller Chemical & Fertilizer Corp) y 0.03 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33% W/V Panreac). Las partes aéreas y las raíces se recolectaron cuando su longitud alcanzaba los 20-30 cm para obtener los correspondientes extractos.

**Producción de biomasa de *A. armeniaca*:** Una vez seleccionado este método de producción para esta especie, la planta establecida en cultivo aeropónico se recolectó a lo largo del tiempo (un total de 2 años), se secó en una

estufa a 26°C y se molió hasta obtener una cantidad suficiente para su estudio químico biodirigido (505 g de parte aérea y 157 g de raíz).

### **3.1.2.2 Cultivo *in vitro* de plantas y raíces transformadas**

Las raíces transformadas están constituidas por células neoplásicas causadas por la infección de *Agrobacterium rhizogenes*. Durante la infección, se produce la inserción en el genoma de la planta del gen *rolB* de la región ADN-T<sub>L</sub> y el gen *ags* de la región ADN-T<sub>R</sub> del plásmido Ri. La expresión de estos genes causa el síndrome de las raíces en cabellera (Georgiev, et al., 2010; Chandra, 2012). Este tipo de cultivo se usa cada vez más para la obtención de metabolitos secundarios ya que estas raíces presentan unos rendimientos de producción comparables o superiores a los alcanzados a través de cultivos de raíces convencionales (Chandra, 2011). Del mismo modo, han demostrado tener un potencial de crecimiento mayor y una elevada estabilidad genética y bioquímica, siendo cultivos de larga duración y de alta producción cuando se llevan a medios líquidos (Srivastava y Srivastava, 2007).

Los medios de cultivos utilizados para el cultivo *in vitro* de plántulas y raíces transformadas fueron Murashige y Skoog (MS) y Gamborg's (GB), respectivamente. (Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, et al., 1968) Se usaron las mezclas basales de sales de la casa comercial Sigma y soluciones stock de vitaminas MS y GB (a concentración 10x).

La preparación de los medios nutritivos líquidos se realizó disolviendo la cantidad de sacarosa en un 50-60% del volumen final de medio, y añadiéndoles la correspondiente cantidad de sales y vitaminas. Se completó el volumen con agua destilada y se ajustó el pH a 5.72-5.75 con soluciones de HCl 1N o NaOH 1N. A continuación, se distribuyó en Erlenmeyers para su esterilización en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión.



En los medios de cultivo sólidos, para el mantenimiento de plántulas, se utilizó como agente solidificante agargel (Sigma) al 0.4%. Las sustancias termolábiles y los antibióticos se esterilizaron por filtración con filtros estériles de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore tipo GV).

El cultivo *in vitro* de *A. assoana* y *A. armeniaca* se estableció a partir de esquejes de plantas cultivadas según lo descrito anteriormente (Fig. 14). Los esquejes se esterilizaron con una solución al 10% (v/v) de hipoclorito sódico comercial (5% de cloro) durante 20 minutos, seguido de 5 lavados consecutivos con agua destilada estéril. Los esquejes estériles se cultivaron en medio MS a mitad de concentración ( $\frac{1}{2}$  MS) solidificado con un 0.4% de agargel (Sigma) a 25°C y 70% HR en un régimen de fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad.



**Fig. 14.** Imagen de una planta *in vitro*.

### **Transformación genética**

Las raíces de *A. assoana* y *A. armeniaca* se transformaron con la cepa bacteriana *Agrobacterium rhizogenes* ATTC 15834, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en la Facultad de Biología de la Universidad de Valencia, España. La cepa se cultivó en medio YMB (“Yeast Mannitol Broth”) a pH 7.0 – 7.2 (Vervliet et al., 1975), solidificado con agar (12%) a 27°C. Posteriormente, se mantuvo en nevera a 4°C y periódicamente se realizaron subcultivos en el mismo medio para su mantenimiento.

Para la transformación, se partió de un cultivo de *A. rhizogenes* ATTC 15834 en placas Petri con medio YMB solidificado con agar, incubado a 27°C en estufa durante 5 días. De este cultivo fresco, se tomó una muestra para preparar

una suspensión bacteriana en 10 ml de medio YMB que se cultivó a 25°C durante dos días en un agitador orbital a 90 r.p.m. La infección de las plántulas se realizó inoculando una o dos gotas, de esta suspensión, con una jeringuilla hipodérmica en varios puntos del tallo de plántulas con 4-5 semanas de edad. Simultáneamente, como controles negativos se utilizaron plántulas inoculadas con medio YMB estéril. Tras la inoculación, las plántulas se cultivaron en medio sólido ½ MS sin hormonas a las condiciones ambientales descritas. Después de un periodo de incubación de 3-4 semanas, las raíces que aparecieron en los puntos de infección se separaron de la planta y se cultivaron en oscuridad en placas Petri con medio sólido ½ Gamborg's con 500 mg/l de ampicilina (Sigma) con el fin de eliminar la bacteria residual. Este procedimiento se repitió varias veces, a distintos intervalos de tiempo, hasta que se dejaron de observar colonias bacterianas en el medio de cultivo.

Las raíces transformadas obtenidas se cultivaron en medio sólido ½ GB en oscuridad controlando diariamente su crecimiento durante varias semanas. Las raíces que mostraron un mejor crecimiento se subcultivaron cada 25-30 días hasta obtener cantidad necesaria para establecer su cultivo en medio líquido (Fig 15).

La presencia de los fragmentos ADN-T<sub>L</sub> y ADN-T<sub>R</sub> en el genoma vegetal de las raíces transformadas, y la confirmación de su transformación genética, se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificaron el gen *rolB* de la región ADN-T<sub>L</sub>, que interviene en la activación de los genes de las defensas de la planta (fitoalexinas), y el gen *ags* de la agropina sintasa de la región ADN-T<sub>R</sub>, implicado en la biosíntesis de agropinas (Bulgakov et al., 2002; Zhou et al., 2011).

Las extracciones del ADN genómico total de las raíces transformadas y de las raíces de las plántulas cultivadas *in vitro* se realizaron con el “Gen Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit” (Sigma) con 25-30 mg de muestra de tejido

lío filizado y triturado en un mortero, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante la lectura de una alícuota de las muestras en un espectrofotómetro de la marca Eppendorf® modelo BioPhotometer 6131 a las longitudes de onda de 260-280 nm.

La amplificación por PCR se realizó con 120 ng de ADN genómico utilizando el kit comercial “REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit” (Sigma). El ADN del plásmido de *A. rhizogenes* se usó como control positivo. La amplificación se realizó en un termociclador de ADN (Applied Biosystem 2700, USA) realizando 30 ciclos de repetición de las siguientes etapas:

1. Desnaturalización de la doble hélice por aumento de temperatura a 94°C durante 2 minutos.

2. Hibridación de los primers a 55°C durante 1 minuto.

- Primers para el gen *rolB*: 5’-

ATGGATCCCAAATTGGTATTCCTTCCA-3’ y 5’-

TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTA-3’

- Primers para el gen *ags*: 5’-CGGAAATTGTGGCTCGTTGTGGAC-3’ y

5’-AATCGTTCAGAGAGCGTCCGAAGTT-3

3. Síntesis de la cadena complementaria a 72°C durante 5 minutos.

Los segmentos de ADN amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, utilizando Tris-acetato-EDTA como buffer con un campo de  $E = 6.25$  v/cm. Los gels se visualizaron con luz ultravioleta a 260 nm después de su tinción con bromuro de etidio. La presencia del fragmento 780 pb del gen *rolB* en el ADN de las raíces y de la bacteria (control positivo) confirmaron su transformación genética.

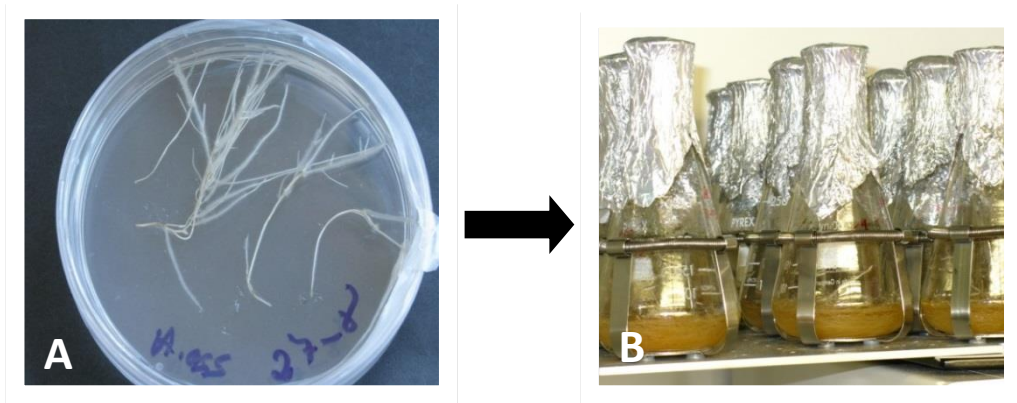
## Cultivo de raíces transformadas en medio líquido

El cultivo de raíces en medio líquido se realizó introduciendo fragmentos (apicales) de raíces de 3-5 cm de longitud (alrededor de 10-12 ápices) en Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio  $\frac{1}{2}$  GB. Las raíces se cultivaron a 25°C durante 5 semanas en oscuridad a 90 rpm en un agitador orbital. El medio de cultivo se separó por filtración a presión reducida y las raíces se secaron en un liofilizador. Una vez secas y molidas, se realizó su extracción con etanol en un sohxlet y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor dando lugar a los correspondientes extractos (Fig. 15)



**Fig. 15.** Cultivo de raíces transformadas en medio líquido

**Producción de biomasa de raíz transformada de *A. assoana*:** Se seleccionaron las mejores líneas de crecimiento para proceder al cultivo líquido a mayor escala. Se preparó 8L de medio  $\frac{1}{2}$  GB que se distribuyó en 158 Erlenmeyers con un volumen 50 ml. Cada uno de ellos se inoculó con puntas de raíces que fueron cultivadas durante 5 semanas a 25°C en oscuridad en un agitador orbital (90 r.p.m). Transcurrido este tiempo de cultivo, se recolectó el material radicular y se desecó por liofilización, obteniendo 84,75 g de peso seco (Fig. 16).



**Fig. 16.** Cultivo de raíces transformadas: (A) Cultivo en medio sólido. (B) Cultivo en medio líquido.

### 3.1.3 Organismos diana

#### 3.1.3.1 Protozoos

##### *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, catalogada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades olvidadas. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas.

Se transmite por contacto con las heces infectadas de insectos triatomíneos hematófagos. No obstante, también puede transmitirse por consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*, transfusión de sangre infectada, transmisión por vía congénita, trasplante de órganos infectados y por accidentes de laboratorio (OMS 2017). No hay una vacuna contra la enfermedad de Chagas, por lo que el control de la enfermedad se basa principalmente en el control vectorial por medio del rociamiento de las viviendas con insecticidas, mejora de

las mismas, medidas preventivas como uso de mosquiteras, almacenamiento adecuado de la comida y el cribado de la sangre y órganos donados así como el rápido diagnóstico de los recién nacidos infectados para realizar un tratamiento temprano (OMS 2017).

Actualmente, y desde hace más de 40 años, los únicos tratamientos disponibles para combatir la enfermedad son el benznidazol y el nifurtimox. La búsqueda de alternativas terapéuticas es una prioridad en la investigación de la enfermedad de Chagas.

La clasificación taxonómica según el Informe del Comité de expertos de la OMS es la siguiente (OMS, 2002):

Subreino Protozoa

Filo Sarcomastigophora

Subfilo Mastigophora

Clase Zoomastigophora

Orden Kinetoplastida

Suborden Tripanosomatida

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

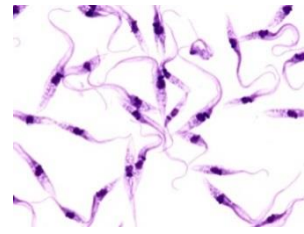
*Trypanosoma* sect. *Stercoraria*

Subgénero *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)

*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*

Chagas, 1909

Para realizar los ensayos *in vitro* de actividad tripanocida se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (Fig. 17). Esta cepa fue aislada por el Profesor Pereira de Freitas a partir de un caso humano agudo en 1950 (Sao Paulo, Brasil), y caracterizada morfo biológicamente por Silva y Nussenzweig en 1953.



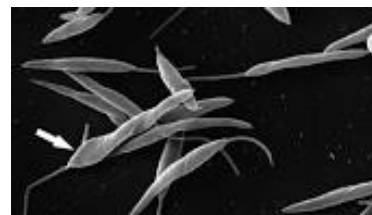
**Fig. 17.** Foto de epimastigotes de *T. cruzi*. Fuente: [www.imgarcade.com](http://www.imgarcade.com)

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* se mantienen en estufa a una temperatura de 28 °C, en cultivo axénico en medio de cultivo LIT, (Liver Infusion Tryptose; Camargo, 1964) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal inactivado (SFBi). Para ello, se mezclan todos los productos y soluciones enumeradas en el apartado 3.1.3.1.1, se ajusta el pH a 7.2-7.4 con HCl y se esteriliza por filtración.

Para el mantenimiento del cultivo se realizan pases semanales con un inóculo de  $2 \times 10^6$  epimastigotes / ml. La cepa se conserva mediante criopreservación en N<sub>2</sub> líquido a -80 °C, centrifugando el cultivo 10 minutos a 1.500 r.p.m, y resuspendiendo el sedimento obtenido en medio de cultivo con DMSO al 5%.

### ***Phytomonas davidi***

El género *Phytomonas* se encuentra dentro del grupo de los tripanosomátidos heteroxenos, grupo que comprende especies patógenas como *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), *Trypanosoma brucei* (enfermedad del sueño africana) y *Leishmania* spp. (leishmaniasis humana). Los insectos fitófagos son los



**Fig. 18.** *Phytomonas* aisladas del floema del Coco. Fuente: Keller & Miguens 2009.

principales vectores de estos parásitos, generalmente de las familias, *Coreidae*, *Lygaeidae*, *Pyrrhocoridae* y *Pentatomidae* (Santos et al., 2006). Cuando un insecto se alimenta de una planta infectada el parásito alcanza el tracto digestivo de éste y posteriormente migra por el hemocele hasta alcanzar las glándulas salivales. Cuando dicho insecto se alimenta de una planta sana, le transmite los protozoos flagelados contenidos en su saliva (Jankevicius et al., 1988; Camargo y Wallace, 1994).

La mayoría de especies que han sido aisladas hasta la fecha se muestran en la etapa morfológica de promastigote (Fig. 18). Dichos promastigotes, han sido aislados de los tubos laticíferos, del floema, de frutos y del insecto vector, aunque en el látex también se han detectado formas amastigote, sin flagelo (de Souza y Attias, 1991). La relación entre hospedador vegetal, parásito y hospedador invertebrado es compleja, debido al gran número de especies que se ven involucrados. Se ha llegado a aislar la misma especie de fitomonas en distintos continentes y de múltiples insectos fitófagos. Estos aislamientos tan dispares muestran lo versátiles que son (Jaskowska et al., 2015).

En cuanto a su morfología, las formas promastigote, tienen un cuerpo celular alargado con un flagelo que sobresale de un bolsillo flagelar en la parte anterior de la célula. Presentan kinetoplasto, estructura característica del grupo, que alberga ADN extranuclear compactado dentro de una doble membrana de una mitocondria. El kinetoplasto constituye aproximadamente el 5% del ADN del parásito (Santos et al., 2007). También poseen microtúbulos subpeliculares, una varilla paraxial y glicosomas. Cabe destacar, el gran número de glicosomas que poseen en comparación con el resto de tripanosomátidos. Los glicosomas son orgánulos que contienen enzimas de la glucólisis (Chaumont et al., 1994) y son clave en la etapa de desarrollo en la planta para la obtención de ATP (Lopes et al., 2010). Otros orgánulos presentes en estos parásitos son los acidocalcisomas, donde acumulan calcio, principalmente, pero también se han encontrado



elementos como, oxígeno, sodio, magnesio, fósforo, potasio y zinc (Docampo, 2008).

Para realizar los ensayos *in vitro* de actividad con un tripanosomátido patógeno de plantas, se utilizaron promastigotes de *Phytomonas davidi* de la cepa ATCC® 30287™ que fue comprada a la American Type Culture Collection en febrero de 2016. Esta cepa fue aislada en 1975 de un espécimen de *Euphorbia heterophylla*, recolectado en Florida, Estados Unidos.

Las clasificaciones más recientes, basadas en criterios moleculares, lo encuadran del siguiente modo (Sistema Natura, 2002):

Dominio Eukaryota, Chatton, 1925

Filo Euglenozoa, Cavalier-Smith, 1981

Subfilo Saccostoma, T. Cavalier-Smith, 1998

Clase Kinetoplastea (Honigberg, 1963), Margullis, 1974

Orden Trypanosomatida (Kent, 1880), Hollande, 1952

Familia Trypanosomatidae, Doflein, 1901

Género *Phytomonas*, Donovan, 1909

*Phytomonas davidi*

Las formas promastigote se mantienen en estufa a 28°C en cultivo axénico, en medio de cultivo LIT, siguiendo los mismos pasos que se usa para *T. cruzi* así como su mantenimiento y criopreservación.

### 3.1.3.1.1 Medio de cultivo para protozoos

#### Composición del medio de cultivo LIT (100 ml)

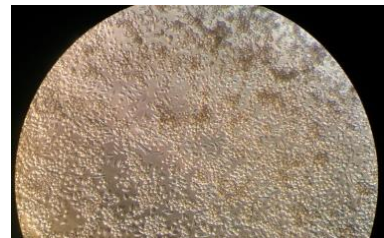
ClNa	0,4 g
ClK	0,04 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	0,315 g
Glucosa	0,2 g
Triptosa	0,5 g
Infusión de hígado	0,25 g
Hemina (25 mg en 1 ml de NaOH 1N)	100 µl
Antibiótico (penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10.000 µg/ml)	100 µl
SBFi	10 ml
H <sub>2</sub> O destilada	90 ml

### 3.1.3.2 Líneas celulares

#### **Líneas celulares de garrapatas**

Las líneas celulares de artrópodos son mucho menos abundantes, que las de mamíferos, no obstante, cada vez se van logrando establecer más, las cuales, son una importante herramienta para estudios de biología básica, inmunología, desarrollo de programas insecticidas, etc (Goodman et al., 2017).

Los medios de cultivo empleados para las células de garrapatas son parecidos a los empleados en células de mamífero y también se suplementan con suero. La temperatura a la que se mantienen ronda los 28 y 34°C, habiendo algunas que crecen a 37°C. Se desarrollan en condiciones de pH ácidas (pH6.5-6.8), neutras y alcalinas,



**Fig. 19.** Imagen de un cultivo de células de garrapatas.

dependiendo de la línea celular. No presentan inhibición de crecimiento por contacto y tampoco son muy adherentes por lo que los cultivos se caracterizan por tener células semi-adheridas y células en suspensión, sin formar la típica monocapa homogénea característica de muchas líneas celulares de mamífero (Fig. 19). Otra diferencia clara con las células de mamífero, es la lentitud de su crecimiento, por lo que no requiere realizar subcultivos con tanta frecuencia, pueden estar hasta varios meses en el mismo tubo y hasta tres semanas con el mismo medio de cultivo (Bell-Sakyi et al., 2007). En cuanto a su conservación, se ha visto que pueden mantenerse durante cortos periodos de tiempo a una temperatura de 12°C o incluso más baja, de 4°C, aunque siempre es preferible criopreservarlas en nitrógeno líquido donde pueden sobrevivir por lo menos 12 años (Bell-Sakyi et al., 2007; Lallinger et al., 2010).

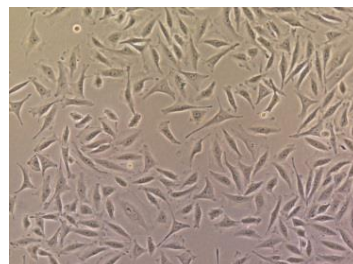
Las líneas celulares empleadas en este trabajo pertenecen a las especies *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM19 e IRE/CTVM20) y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME/CTVM2). Estas líneas celulares fueron donadas por la Dra. Lesley Bell-Sakyi (*The Pirbright Institute, UK*).

Todas las líneas celulares se cultivaron en las mismas condiciones. Para ello, se usaron tubos de plástico de 10 ml, con tapón de rosca y fondo plano, con 2,2 ml de medio de cultivo Leibovitz (L-15) suplementado con SFBi al 20%, y en una estufa a 28 °C. Para el mantenimiento de las células se realizaron pases mensuales despegando las células con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio.

Las 3 líneas celulares se conservaron mediante criopreservación a -80 °C en N<sub>2</sub> líquido, centrifugando a 1.300 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo el sedimento en 2,5 ml de L-15 con DMSO al 6%.

## LC5 (fibroblastos de pulmón humano)

Los ensayos de citotoxicidad inespecífica se realizaron sobre fibroblastos de pulmón humano, pertenecientes a la línea celular LC5. La línea LC5 fue donada por la Dra. Teresa Agulló Ortuño del Laboratorio de Oncología del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid.



**Fig.20.** Imagen de un cultivo de LC5.

Los cultivos se mantuvieron en frascos Roux de 25 cm<sup>2</sup>, con 3 ml de medio RPMI. Las células se incubaron en estufa a 37 °C, en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células crecen formando una monocapa confluyente tapizando los frascos (Fig. 20). Para realizar un pase de cultivo las células se despegaban empleando PBS-EDTA.

La línea se conservó mediante criopreservación a -80 °C en N<sub>2</sub> líquido, centrifugando a 1.000 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo el sedimento en 1 ml de SFBi con DMSO al 9%.

### 3.1.3.2.1 Medios de cultivo para las líneas celulares

#### Composición del medio de cultivo RPMI (50 ml)

RPMI (Sigma)	44 ml
SBFi	5 ml
L-glutamina	500µl
Antibiótico (penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10.000 µg/ml)	500µl

### Composición del medio de cultivo L-15 (102 ml)

L-15 (Sigma)	70 ml
Triptosa fosfato	10 ml
SFBi	20 ml
L-glutamina 200 Mm	1 ml
Antibiótico (penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10.000 µg/ml)	1 ml
pH final = 6,4 – 6,6	

Los componentes de ambos medios se mezclaron dentro de una campana de flujo laminar en condiciones estériles.

#### **3.1.3.3 Hongos: *Aspergillus niger***

Se ha seleccionado *Aspergillus niger* por su importancia como patógeno de plantas y otros organismos. Causa el moho negro y es responsable del deterioro de la comida almacenada (Samson et al., 2000). Por otro lado, *A. niger* es un patógeno oportunista causando importantes infecciones pulmonares, como la aspergilosis invasiva, en pacientes inmunodeprimidos, y produciendo micotoxinas (Schuster et al., 2002; Baker, 2006).

Su clasificación es:

Reino Fungi

Filo Ascomycota

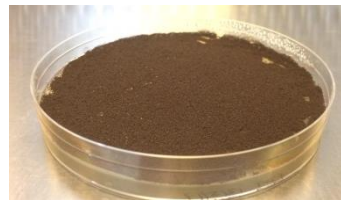
Clase Eurotiomycetes

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Aspergillus*

Especie *Aspergillus niger* (van Tieghem 1867)



**Fig. 21.** Imagen de un cultivo de *A niger*

Los cultivos de este hongo se mantuvieron en el laboratorio en placas Petri con PDA a 28°C, realizándose pases cada 15-20 días en medio fresco (Fig. 21). Cuando los cultivos están a 4°C pueden durar 3 meses sin necesidad de realizar pases. Para su criopreservación, las esporas se prepararon en medio de cultivo o solución salina (0,9%) con un 10% de glicerol, y en el caso de micelio se colocaron 4-5 trozos de micelio en criotubos con 1ml de agua con glicerol al 18%. Ambos se almacenaron a -80°C.

#### **3.1.3.4 Nematodos fitoparásitos: *Meloidogyne javanica***

Los nematodos patógenos de plantas son uno de los grupos patógenos más destructivos, capaces de parasitar una gran variedad de plantas de interés agrícola a las que causa importantes pérdidas económicas (Bird et al., 2009; Bleve-Zacheo et al., 2007). Los nematodos se pueden clasificar en ectoparásitos y endoparásitos. Dentro del grupo de los endoparásitos destacan los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne*. Este grupo de especies presenta una distribución mundial, son de naturaleza polífaga e infectan más de 3.000 especies de plantas cultivadas causando severos daños y grandes pérdidas económicas (Andrés et al., 2012). La infección se produce cuando el juvenil de segunda edad, móvil e infectivo, es atraído por el sistema radical de la planta huésped. Después de penetrar en el ápice de la raíz, migra intercelularmente hasta las proximidades del cilindro vascular donde selecciona un grupo de células vegetales de las cuales extrae nutrientes y agua para continuar su ciclo vital. La infección afecta al crecimiento de la planta, causa marchitamiento, aumenta su susceptibilidad a otros patógenos y en determinadas condiciones puede causar la muerte.

Clasificación:

División Nematoda

Clase Secernentea

Orden Tylenchida

Familia Meloidogynidae

Género *Meloidogyne*

Especie *Meloidogyne javanica*

Las poblaciones de *M. javanica* se mantuvieron en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var Marmande) (Fig. 22). Los semilleros se prepararon en yiffis con vermiculita y se mantuvieron en cámara a 24 °C. Aproximadamente unos 25 días después de la germinación de las semillas, las plántulas se trasplantaron a macetas de 12 cm de diámetro con sustrato de suelo areno limoso donde se procede a



**Fig. 22.** Imagen de dos juveniles teñidos con fucsina ácida en el interior de una raíz de tomate.

la inoculación. La inoculación se llevó a cabo colocando un trozo de raíz infectada. Pasados dos meses se levantaron las plantas, se lavaron las raíces y se extrajeron manualmente las masas de huevos. Finalmente las masas se colocaron en filtros parcialmente sumergidos en agua destilada y se incubaron en la cámara a 24 °C para obtener, mediante la eclosión continuada de los huevos durante un mes, los juveniles infectivos (J2) con los que se realizaron los ensayos de actividad.

### 3.1.3.5 Insectos

Los insectos plaga seleccionados fueron *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi* y *Leptinotarsa decemlineata*. Se seleccionaron por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su capacidad de transmisión de virus, así como, su disponibilidad y facilidad de mantenimiento en el laboratorio.

***Spodoptera littoralis* (Bois).** Rosquilla negra.

Clasificación (Balachowsky, 1972)

Filo Artropoda

Clase Insecta

Orden Lepidoptera

Superfamilia Noctuidea

Familia Noctuidea

Género *Spodoptera*

Especie *Spodoptera littoralis*



**Fig. 23.** Imagen de una larva de *S. littoralis*. Fuente [www.pyrgus.de](http://www.pyrgus.de)

La oruga es de color negruzca y se arrolla en espiral (Fig. 23). Presenta seis estadios larvales y en su mayor desarrollo puede alcanzar de 3,5 a 4 cm de longitud. Los adultos se caracterizan por llevar dibujado, en las alas anteriores, un 4 en la derecha y su simétrico en la izquierda. Es una especie muy polífaga y se conoce por su extrema voracidad. Las larvas se alimentan tanto de hojas y flores como de frutos, llegando a alcanzar un marcado gregarismo. Esto unido a su alta capacidad reproductora y de migración les confiere una gran importancia económica en el Norte de África y Europa meridional. Los principales cultivos afectados son los hortícolas, pimiento, alfalfa, maíz, algodón, tomate y patata entre otros (Pineda et al., 2007).



## ***Leptinotarsa decemlineata* (Say)**

Clasificación (Balachowsky, 1972)

Filo Artropoda

Clase Insecta

Orden Coleoptera

Suborden Polyphaga

Superfamilia Chrysomeloidea

Familia Chysomelidae

Género *Leptinotarsa*

Especie *Leptinotarsa decemlineata*



**Fig. 24.** Imagen de *L. decemlineata*. Foto: Scott Bauer.

Es un coleóptero de amplia distribución mundial. Su tamaño es de aproximadamente 1 cm y posee un patrón característico de coloración sobre sus élitro que consiste en 5 rayas oscuras sobre un fondo amarillo (Fig. 24). Posee un ciclo holometábolo, las hembras pueden depositar unos 800 huevos, las larvas pasan por 4 estadíos y posteriormente atraviesan una fase prepupal de varios días para pasar a pupa y finalmente emerger los adultos. Su principal hospedador es la patata (*Solanum* sp.), tanto las larvas como los adultos se alimentan de la parte aérea. También pueden ocasionar daños en cultivos de tomate y berenjena. Destruye toda la parte foliar, dejando sólo tallos principales, disminuyendo notablemente los rendimientos de las cosechas. Ello, unido a que ha desarrollado resistencia frente a la mayoría de los insecticidas empleados para su control hace necesaria la búsqueda de sistemas de control alternativos (Hough-Goldstein y Keil 1991; Weisz et al., 1994).

***Myzus persicae* (Sulzer).** Pulgón verde del melocotonero.

Clasificación (Blackman y Eastop,1984)

Filo Artropoda

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Suborden Homoptera

Superfamilia Phytophagoidea

Familia Aphididae

Tribu Macrosiphini

Género *Myzus*

Especie *Myzus persicae*



**Fig. 25.** Imagen de *M. persicae*.

Es un pulgón de tamaño medio, de 1,2 a 2,3 mm (Fig. 25). Las formas ápteras presentan color verde amarillento y entre verde y negro las formas aladas. Su hospedador primario suele ser una planta del género *Prunus*, sobre todo *Prunus pérsica* (L.). Aunque, es muy polífago y presenta más de cincuenta familias de hospedadores secundarios, causando enormes pérdidas en cultivos agroindustriales, cultivos hortícolas y frutales (Li et al., 2016). A su vez, ha desarrollado resistencia contra alrededor de 70 tipos de compuestos sintéticos (Samaniego et al., 2012). Es capaz de transmitir más de 100 tipos de virus (Kennedy y Day 1962) entre los que encontramos algunos muy persistentes como luteovirus del amarilleo occidental de la remolacha, el penamovirus de las excrecencias y mosaico del guisante, o el luteovirus del enrollado de la patata, virus semipersistentes como el closterovirus del amarilleo de la remolacha o el caulimovirus del masaico de la coliflor, y no persistentes como el virus del mosaico de la alfalfa, el potyvirus latente de la alcachofa, el potyvirus del mosaico amarillo de la judía, el fabavirus del marchitamiento del haba, el potyvirus del mosaico de la lechuga y de la remolacha. Al igual que su

hospedador primerio, es originario de Asia aunque actualmente se considera cosmopolita.

***Rhopalosiphum padi* (L.)** Pulgón de la avena, pulgón de los cereales.

Clasificación (Blackman y Eastop, 1984)

Filo Artropoda

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Suborden Homoptera

Superfamilia Phytophagoidea

Familia Aphididae

Tribu Aphidini

Género *Rhopalosiphum*

Especie *Rhopalosiphum padi*



**Fig. 26.** Imagen de *R. padi*.

Su tamaño varía entre 1,2 y 2,4 mm, su color va desde el verde al negro grisáceo, aunque generalmente es de color verde oliva y es uno de los 14 áfidos de mayor importancia económica con una distribución mundial (Fig. 26). El hospedador primario también es una planta del género *Prunus*, *Prunus padus* (L.), en cuanto a su hospedador secundario es bastante polífago. Tiene preferencia por las gramíneas, incluidos los cereales y las plantas de pasto. Es vector de virus vegetales persistentes y algunos no persistentes: BYDV (virus de la hoja manchada del maíz), el potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla, potyvirus del mosaico enanizante del maíz (Finlay y Luck, 2011).

#### **3.1.3.5.1 Cría y mantenimiento de insectos**

Las poblaciones de insectos se mantuvieron en cámaras climatizadas a una temperatura de  $22 \pm 1$  °C, humedad relativa del 60-70 % y fotoperiodo de 16:8 horas (luz: oscuridad).

*S. littoralis* se mantuvo en cajas de plástico de diferentes dimensiones dependiendo del estadio larval, tamaño y número. Las larvas se alimentaron de una dieta artificial general para noctúidos (Poitout y Bues, 1970) (Tabla 4) y los adultos con una solución azucarada.

**Tabla 4.** Composición de la dieta artificial para *S. littoralis*.

Agua destilada	1000 ml
Agar	2,5 g
Ác. benzoico	1,25 g
Sémola de maíz	140 g
Germen de trigo	35 g
Levadura de cerveza	37,5 g
Ác. ascórbico	5 g
Nipagin	1 g
Sales minerales	1.55 g
Vitaminas	12 g

Los escarabajos y pulgones se criaron sobre hospedadores secundarios. *L. decemlineata* se mantuvo en cajas de plástico ventiladas, alimentándose de partes aéreas de plantas de patata (*Solanum tuberosum* L. cv Desireé) cultivadas en invernadero. *M. persicae* sobre plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. var. California Wonder) y *R. padi* sobre cebada (*Hordeum vulgare*), en jaulones ventilados, transfiriéndoles a plantas frescas cada 7-10 días.

### 3.1.3.6 Garrapatas: *Hyalomma lusitanicum*

Las garrapatas son vectores hematófagos obligados pertenecientes a la subclase Acari, que presentan una amplia distribución y son consideradas, después de los mosquitos, los vectores más importantes en el mundo (Sonenshine et al., 2002; Bissinger y Roe, 2010). Transmiten el mayor número de especies patógenas entre

los que se encuentran protozoos, bacterias y virus, que producen enfermedad tanto en humanos como a otros animales silvestres o domésticos (Estrada-Peña et al., 2006; Kiss et al., 2012).

*Hyalomma lusitanicum* es una garrapata dura perteneciente a la familia *Ixodidae*, y englobada en el grupo de garrapatas exófilas ya que se encuentran en hábitats expuestos, como la vegetación, es decir no son nidícolas (Fig. 27). Su ciclo de vida está compuesto por 4 fases: huevo embrionado, larva, ninfa y adulto. Únicamente en el estadio adulto es evidente el dimorfismo sexual. *H. lusitanicum* tiene una distribución estrictamente mediterránea (Estrada-Peña et al., 2004). En España es la especie de garrapata más abundante en el centro de la Península Ibérica (86%) (Barandika, 2010). Se han detectado en ella mediante métodos moleculares cuatro patógenos: *Rickettsia* sp., *Anaplasma* sp., *Borrelia* sp. y *Coxiella burnetii* (Toledo, 2007; Toledo et al., 2009).

Clasificación:

Filo Artropoda

Clase Arachnida

Orden Ixodida

Superfamilia Ixodoidea

Familia Ixodidae

Género *Hyalomma*

Especie *Hyalomma lusitanicum* (Koch , 1844)



**Fig. 27.** Adultos de *H. lusitanicum*.

Las hembras grávidas de *H. lusitanicum* se capturaron regularmente en la finca “La Garganta”, localizada en el sur de la provincia de Ciudad Real a 39°24’78’’N 42°59’101’’E a 669 m.s.n.m. Una vez capturadas e identificadas se colocaron en tubos de ensayo de vidrio con un trozo de papel de filtro cortado en zigzag en el interior y un tapón de algodón. Los tubos se incuban a 24 °C con una

HR superior al 70 % hasta que tiene lugar la ovoposición. Tras 23-24 días los huevos eclosionan y posteriormente las larvas, necesitan 15-16 días para completar la quitinización (Ouhelli y Pandey, 1984).

### **3.1.3.7 Semillas**

Para evaluar la actividad fitotóxica se emplearon semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Teresa), empleada habitualmente en los estudios de interacciones alelopáticas, y la gramínea raygrass (*Lolium perenne*), hierba invasiva que compite con los cultivos, como modelos de di- y monocotiledóneas, respectivamente, por su alta capacidad germinativa y rápido crecimiento. Ambas especies fueron seleccionadas por su capacidad germinativa y por su crecimiento rápido, menos de 24 horas en el caso de *L. sativa* y menos de 72h *L. perenne*.

## **3.2 Ensayos de actividad biológica**

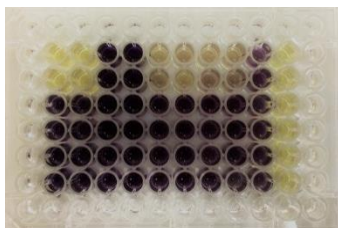
### **3.2.1 Ensayos de actividad frente a protozoos**

Lo ensayos de actividad sobre *T. cruzi* y *P. davidi* permiten determinar la capacidad citostática o citocida de un producto, comparando el crecimiento de un cultivo en fase de crecimiento exponencial tratado con respecto a un control sin tratar.

#### **Ensayo con *Trypanosoma cruzi***

Se partió de cultivos en masa de epimastigotes en medio LIT con un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$  epimastigotes/ml (los recuentos se realizaron en cámara de Neubauer mediante tinción con MYFb). Pasadas 72 horas, el inóculo se transfirió a una placa de 96 pocillos a razón de 90  $\mu$ l/pocillo. Los extractos crudos se ensayaron inicialmente a concentraciones de 800, 400, 200, 100, 10 y 1  $\mu$ g/ml y los productos puros a 100, 10 y 1  $\mu$ g/ml, con un volumen de 4,5  $\mu$ l/ pocillo, realizando al menos 4 repeticiones por placa. Las muestras se disolvían en DMSO

y se preparaban las diluciones en medio LIT de tal forma que la concentración final de DMSO por pocillo fuese menor al 0,2%. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos con dosis intermedias de los productos activos para calcular la Dosis Eficaz 50 mediante regresión logarítmica con el programa Statgraphics Centurion, empleando como fármaco de referencia el nifurtimox. Todas las placas contenían un control negativo, con medio de cultivo y un control positivo con medio de cultivo y parásitos. Una vez finalizadas las 72 horas de incubación del cultivo con las muestras, se analizó la viabilidad de los parásitos empleando una técnica colorimétrica modificada de reducción del MTT (González-Coloma et al., 2012). Para ello se añadieron 10 µl/pocillo de una solución de MTT-PMS a 2.5 mg/ml, tras 75 minutos de incubación se añadieron 100 µl/pocillo de SDS para disolver los cristales de formazán y después de 30 minutos se determinó la densidad óptica de cada pocillo con un espectrofotómetro a 630 nm (Fig. 28).



**Fig. 28.** Imagen de una placa del ensayo de *T. cruzi*

El porcentaje de actividad anti-epimastigote (%AE) de los extractos y productos ensayados se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%AE = 100 - [(A_p - A_b) / (A_c - A_b) \times 100]$$

A<sub>p</sub>: absorbancia del problema

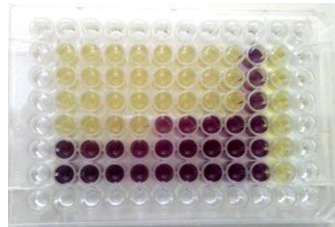
A<sub>b</sub>: absorbancia del control negativo

A<sub>c</sub>: absorbancia del control positivo

### **Ensayo con *Phytomonas davidi***

Los ensayos de actividad anti-promastigote frente a *P. davidi* se realizaron usando la misma metodología empleada con *T. cruzi*. Debido a diferencias en su dinámica de crecimiento el inóculo inicial usado fue tan solo de  $5 \times 10^4$  promastigotes/ml con una incubación de 24 horas a 28 °C antes de transferir 90  $\mu$ l/pocillo del cultivo en la placa de microtitulación. Los extractos y productos se ensayaron a las mismas concentraciones con el mismo volumen final pero las placas se incubaron 24 horas, a diferencia de las 72 horas necesarias con *T. cruzi*.

Por último, las placas se revelaron añadiendo 10  $\mu$ l/pocillo de una solución de 15 mg de MTT y 0.5 mg de menadiona en 3 ml de PBS. Se incubaron durante 75 minutos y se añadieron 100  $\mu$ l de SDS por pocillo con el mismo propósito que en el ensayo de *T. cruzi*. Tras 30 minutos de incubación se procedió a la lectura de las placas en el espectrofotómetro a 630 nm (Fig. 29).



**Fig. 29.** Imagen de una placa del ensayo de *P. davidi*

El porcentaje de actividad anti-promastigote se calculó usando la fórmula descrita en el apartado anterior.

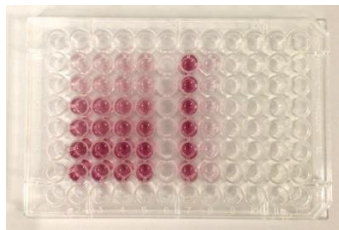
### **3.2.2 Ensayos de citotoxicidad**

#### **Ensayos con las líneas celulares de garrapatas**

Para determinar la actividad ixodicida *in vitro* se seleccionó la línea celular IRE/CTVM20. Se prepararon cultivos celulares con un inóculo inicial de  $2 \times 10^6$



células/ml en un volumen final de 2,2 ml. Tras 8 días de incubación a 28 °C se realizaron recuentos en cámara de Neubauer utilizando azul tripán para determinar el número de células vivas. Se sembraron 80.000 células/pocillo con un volumen final de 90µl de L-15 y se añadieron las muestras siguiendo el protocolo para los parásitos. Tras 24 h de incubación con los tratamientos, las placas se revelaron con 10µl/ pocillo de una solución de MTT-PMS a 5 mg/ml en PBS. Se incubaron durante 4 horas y se aspiró el medio de todos los pocillos para adicionar 100µl/pocillo de DMSO. Al igual que en los ensayos antiparasitarios se realizaron las lecturas de las placas en un espectrofotómetro a 630 nm y se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la misma fórmula (Fig. 30).



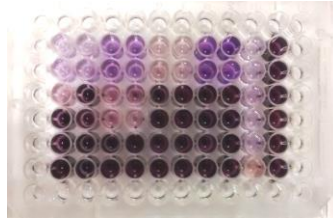
**Fig. 30.** Imagen de una placa del ensayo de IRE/CTVM20

### **Ensayos con la línea celular de mamífero LC5**

Estos ensayos se llevaron a cabo para determinar la citotoxicidad inespecífica de los productos activos frente a *T. cruzi*. Para ello se prepararon suspensiones celulares con una concentración de 50.000 células/90 µl de medio de cultivo RPMI, repartiendo 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Al igual que en los ensayos antiparasitarios se añadieron los controles.

Una vez sembradas, se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera enriquecida al 5 % de CO<sub>2</sub>, para favorecer su adhesión al fondo del pocillo. Pasado el periodo de incubación se aspiró el medio de cultivo de todos los pocillos y se adicionaron 90 µl de medio fresco y 4,5 µl de las muestras a ensayar (extractos y productos) a diferentes concentraciones. Se incubaron

durante 48 horas en las mismas condiciones y finalmente se revelaron siguiendo el protocolo empleado para las células de garrapatas. Finalmente, se realizaron las lecturas de las placas en un espectrofotómetro a 630 nm y se calculó el porcentaje de crecimiento de las células (Fig. 31).



**Fig. 31.** Imagen de una placa del ensayo de LC5

### **3.2.3 Ensayo con hongos**

#### **Ensayo *in vitro* de germinación de esporas**

Para la realización de este ensayo se prepararon suspensiones de esporas en NaCl 0.9 % con una concentración de  $7,5 \times 10^5$  esporas/ml. Para ello, se añadieron 10 ml de solución salina sobre una placa de PDA de 3 días de cultivo de *Aspergillus niger*. Mediante el uso de una torunda estéril se resuspenden las esporas y se filtran para eliminar restos de micelio. Finalmente, se cuentan las esporas en cámara de Neubauer para obtener la concentración deseada,  $7,5 \times 10^5$  esporas/ml.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano estériles. Se usaron dos controles, uno positivo (con Anfotericina B  $5\mu\text{g/ml}$ ) y uno negativo (con agua y DMSO al 1%).

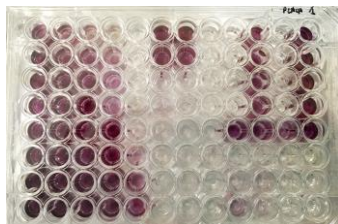
Los extractos y productos se prepararon en DMSO a  $80\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , respectivamente, y se hicieron diluciones seriadas en agua para ensayarlos a concentraciones de 800, 400, 200, 100 y  $50\mu\text{g/ml}$ . De cada dilución, se echaron

en cada pocillo 80µl junto con 20 µl de la solución de esporas y 100 µl de RPMI-MOPS (Tabla 5). Se realizaron 4 réplicas por concentración.

**Tabla 5.** Preparación de medio de cultivo RPMI-MOPS para el ensayo de germinación de esporas.

RPMI- 1640 (SIGMA)	1.042 g
MOPS	3.45 g
Estreptomicina y penicilina 1%	200 µl
Agua destilada	100 ml
Se mezclaron los reactivos, se ajustó el pH a 7 y se esterilizó mediante filtración	

A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Pasado este tiempo se añadieron 25 µl de revelador (15 mg de MTT, 3 ml de RPMI y 0,52 mg de menadiona) en cada pocillo y se incubaron durante 3 horas. Seguidamente, se eliminó todo el medio de los pocillos mediante aspiración y se añadieron 200 µl/pocillo de isopropanol ácido (95% isopropanol, 5% HCl 1M). Finalmente, se incubaron otros 30 minutos y se midió la absorbancia a 490 nm en el lector de placas (Fig. 32).



**Fig. 32.** Imagen de una placa del ensayo de germinación de esporas.

### 3.2.4 Actividad nematocida

#### Mortalidad de J2

Los ensayos con nematodos se realizaron según la metodología descrita para *M. javanica*, utilizando la fase biológica de juveniles infectivos (J2) (Andrés et al., 2012). Para ello, se preparó una solución de nematodos para obtener una concentración aproximada de 100 nematodos/95  $\mu$ l de solución. Para realizar este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U y se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento. En



**Fig. 33.** Imagen del ensayo de mortalidad de J2.

En cada pocillo se inocularon 95  $\mu$ l de solución de nematodos y 5  $\mu$ l del extracto/producto a ensayar (Fig. 33). Inicialmente los extractos se prepararon a 20  $\mu$ g/ $\mu$ l en DMSO+Tween 0.6% para obtener una concentración final en el pocillo de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l (factor de dilución 1:20), de aquellos activos se hicieron dosis más bajas. Los productos puros se ensayaron inicialmente a 10  $\mu$ g/ $\mu$ l. Los controles se prepararon con 95  $\mu$ l de solución de nematodos y 5  $\mu$ l del disolvente (DMSO+Tween 0.6%) empleado en la preparación de las muestras.

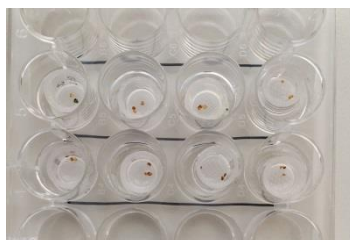
En el caso de extractos acuosos (hidrolato), la solución de nematodos se pasa por un filtro para que los nematodos queden retenidos en el, seguidamente se lavan y arrastran con un volumen de 100  $\mu$ l del tratamiento a ensayar o con el mismo volumen de agua en el caso del control negativo, y finalmente se añaden a la placa de 96 pocillos.

Una vez distribuidas las muestras en la placa se rellenaron todos los pocillos del borde de la placa con agua para mantener la humedad y evitar el efecto borde. Finalmente se sellaron las placas con parafilm y se envolvieron en papel de plata para evitar el paso de la luz. Las placas se incubaron a 24°C

durante 72 horas. Pasado el periodo de incubación, se procedió al recuento de nematodos por pocillo utilizando un microscopio estereoscópico. Los datos de actividad nematicida se presentan como porcentaje de J2 muertos, corregido según la fórmula de Scheider-Orelli. Las dosis letales eficaces, DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub>, se calcularon mediante análisis Probit con los resultados obtenidos en al menos cuatro concentraciones, empleando para ello el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### **Eclósión de masas de huevos**

Para llevar a cabo estos ensayos las masas de huevos del nematodo se obtuvieron manualmente de raíces infectadas. Se colocaron 3 masas de huevos para cada réplica en un filtro con un tamaño de poro que permite el paso de los J2 que han eclosionado de las masas, pero no permite el paso de éstas. Estos filtros se colocan a su vez en una placa de 24 pocillos con fondo plano y 400 µl



**Fig. 34.** Imagen de las masas de huevos en la placa.

del tratamiento o del control (agua) (Fig. 34). Cada tratamiento y control se hace por cuadruplicado. La placa se cubrió para evitar la evaporación y se incubaron a en oscuridad a 24°C. Después de una semana de incubación se retiraron las soluciones de todos los pocillos y se sustituyeron por agua destilada estéril y se procedió al recuento de juveniles. Los recuentos de juveniles se llevaron a cabo una vez por semana durante un mes, que finaliza la eclósión en el control.

### **Capacidad infectiva de nematodos (J2)**

Estos ensayos permiten evaluar la actividad del extracto sobre la capacidad infectiva de los juveniles en raíces de tomate. Para ello, se realizó un ensayo con nematodos J2 en placa de 96 pocillos tal y como se especifica en el apartado de

ensayos de actividad in vitro, pero en este caso se utilizó la dosis subletal ( $DL_{50}$  de los tratamientos activos). Tras 72 horas de incubación, se filtró el inóculo, se lavó y se aplicó en plántulas de tomates que previamente fueron trasplantados en pequeñas macetas con arena estéril. Se realizaron 6 réplicas por tratamiento, con sus respectivos controles (J2 sin tratar). Los tomates se cultivaron en una cámara a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60% HR, 16:8 h luz:oscuridad durante una semana. Posteriormente, se procesaron las raíces lavándolas con una solución de lejía y después agua. Se colocaron en vasos de precipitados pequeños con 40 ml de agua y 1 ml de colorante, fucsina. Se llevaron a ebullición en un microondas y se dejaron enfriar. A continuación, se lavaron y se conservaron en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Finalmente se cuantificó el número de J2 en el interior de las raíces con un microscopio estereoscópico (Fig. 35).



**Fig. 35.** Imagen de nematodos teñidos con fucsina.

### 3.2.5 Ensayos con insectos

#### Bioensayo de elección

##### *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata*

La finalidad de este ensayo es analizar la capacidad repelente de un extracto/producto a corto plazo. Se basó en la preferencia de las larvas de sexto estadio (L6) en el caso de *S. littoralis* y adultos de *L. decemlineata*, por discos de hojas tratados y control, de la planta huésped *Capsicum annuum*, colocados en la misma placa Petri. Los discos tienen una superficie de  $1\text{ cm}^2$ .

Cada ensayo consistió en 6 placas de Petri con dos larvas/adultos por placa, siguiendo la metodología previamente descrita (González-Coloma et al., 1995; 1996) (Fig. 36). Una vez consumido el 75% de la superficie de los discos control o tratamiento, las áreas foliares no consumidas se midieron, de acuerdo con la metodología de Escoubas et al., (1993), utilizando el programa de análisis de imagen Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij>).



**Fig. 36.** Imagen de del ensayo de elección.

Finalizado el ensayo, se calculó el índice de consumo % FI (inhibición de la alimentación, (Bentley et al., 1984), considerando que un extracto/producto es activo cuando su FI es superior al 75% mediante la fórmula:

$$\%FI=1-(\text{consumo del tratamiento}/\text{consumo del control}) \times 100$$

### ***Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi***

Los ensayos con los áfidos determinan el efecto de los compuestos sobre su asentamiento y alimentación. Cada ensayo consta de 20 cajas de plástico en las que se colocaron 20 áfidos/caja, tapadas y con ventilación. El sustrato del ensayo con *M. persicae* son medios discos de hojas de pimiento (Fig. 37) y para *R. padi* fragmentos de un tamaño determinado de hojas de la cebada. Los sustratos se impregnaron con la muestra a ensayar o solo con el disolvente empleado (control). Las cajas se incubaron bajo luz indirecta en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Después de 24 horas se contabilizaron los pulgones asentados en los fragmentos de hoja control y tratamiento, calculando así el índice de inhibición del asentamiento (Gutiérrez et al., 1997) (%SI) para cada tratamiento:

$$\%SI = [1-(\%T/\%C)] \times 100$$

Donde %C y %T son el porcentaje de áfidos asentados en los discos de hojas control y tratadas.

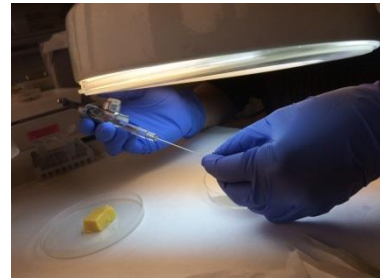
Los extractos crudo se ensayaron a una dosis inicial de  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y los productos puros a  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Kubo, 1991). Los productos que a estas dosis presentaron un índice de repelencia superior al 75% se sometieron a experimentos dosis-respuesta para poder calcular sus dosis efectivas mediante análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico Statgraphic Centurion.



**Fig. 37.** Imagen del ensayo con *M. persicae*.

### Canulación oral

Este ensayo permite diferenciar entre compuestos repelentes y tóxicos. Para ello se seleccionan larvas L6 de *S. littoralis* de  $\leq 24$  h desde la muda (0,2 – 0,3 g de peso) y se colocaron en placas Petri con una cantidad determinada de dieta artificial (de 4 a 5 g). Los experimentos consisten en la canulación oral de 20 larvas con 50  $\mu\text{g}$  del producto a ensayar disuelto en 5  $\mu\text{l}$  de DMSO



**Fig. 38.** Canulación de una larva.

(Fig. 38). El control se llevó a cabo mediante la canulación de 20 larvas con 5  $\mu\text{l}$  de DMSO, según la metodología descrita por (González-Coloma et al., 1998).

Al final del experimento (72h) se congelaron las placas y larvas y se secaron a  $60^\circ\text{C}$ , 48h para calcular el consumo de alimento y el crecimiento relativo de las larvas en base a los pesos secos, todo ello expresado como porcentaje del control.



Los datos se analizaron mediante análisis de covarianza con el peso inicial de las larvas como covariable 1, para valorar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento relativo y el consumo de alimento como covariable 2, para estudiar los efectos postingestivos del tratamiento con independencia del consumo (Horton y Redack, 1993; Raubenheimer y Simpson, 1992).

### 3.2.6 Ensayo con garrapatas

#### Ensayo de toxicidad en larvas y adultos de *H. lusitanicum*

Para evaluar la actividad acaricida de los extractos/productos se utilizan 20 larvas de *H. lusitanicum* de 10 días de vida o 10 adultos. Para ello, se prepararon 3 tubos eppendorf por cada muestra (3 réplicas) a ensayar con 25 mg/150 mg de celulosa (Celulosa cristalizada Merk). Se depositaron 50  $\mu$ l/300  $\mu$ l de cada muestra a la concentración deseada (partiendo de 20  $\mu$ g/ $\mu$ l en el caso de extractos y 10  $\mu$ g/ $\mu$ l con los productos puros) por eppendorf. Como control negativo se usó el disolvente utilizado para la preparación de las muestras y como control positivo el acibelte (0.5% cipermetrina). Finalmente se dejaron los tubos eppendorf abiertos a temperatura ambiente para que el disolvente se evaporase (González-Coloma et al., 2013).



**Fig. 39.** Tubos de ensayo con el tratamiento y las larvas.

A continuación, se prepararon en tubos de ensayo de vidrio lotes de 20 larvas/10 adultos de *H. lusitanicum* donde se vertieron el contenido de cada eppendorf, se taparon con algodón hidrófilo, se homogenizaron y se mantuvieron a 24°C con una HR >70% durante 24 h (Fig. 39).

Una vez finalizado el experimento se contabiliza la mortalidad de las larvas/adultos y se corrige respecto a la mortalidad del control negativo de acuerdo con la ecuación de Schneider Orelli.

$$\%M = (\%T - \%C / 100 - \%C) \times 100$$

%T: porcentaje de garrapatas muertas en el tratamiento

%C: porcentaje de garrapatas muertas en el control negativo.

### **Ensayo de actividad excito-repelente con adultos de *H. lusitanicum***

Para evaluar la actividad de los extractos / productos como repelentes de garrapatas se diseñó un sistema compuesto por dos matraces Erlenmeyer de 250 ml conectados por un tubo de vidrio hueco de 10 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro. En uno de los matraces se depositó un disco de papel de filtro de 25 mm de diámetro (Filter-Lab 1250) impregnado con 20 µl de la



**Fig. 40.** Imagen del ensayo excito-repelente.

solución tratamiento del aceite esencial a la concentración deseada (partiendo de una concentración máxima de 20 µg/µl). En el otro matraz, se depositó otro disco con 20 µl del disolvente utilizado para preparar la muestra y que constituyó el control. Posteriormente, se dejaron secar los discos de papel de filtro a temperatura ambiente y se depositaron 5 adultos de *H. lusitanicum* en cada uno de los matraces del sistema (Fig. 40). Finalmente, se colocaron los recipientes en la estufa a 28 °C en oscuridad y se registró la localización de los artrópodos a intervalos de 10 minutos durante una hora, realizando dos últimas anotaciones una y dos horas después para completar 3 horas de ensayo.

Se realizaron 4 réplicas por muestra a ensayar y concentración, y se calculó el índice de repelencia (IR) mediante la siguiente fórmula:

$$IR = [1-(\%T/\%C)] \times 100$$

%T: porcentaje de adultos ubicados en el matraz tratamiento

%C: porcentaje de adultos ubicados en el matraz control

### 3.2.7 Ensayo de fitotoxicidad

Mediante estos ensayos se estudió el efecto de los extractos y productos puros sobre la germinación y crecimiento radicular y foliar de *L. perenne* y sobre la germinación y crecimiento radicular de *L. sativa*.

El ensayo se realizó en placas de 12 pocillos. En cada pocillo se colocaron discos de papel (Whatman 1.20 cm de diámetro) tratados con 20  $\mu$ l de extracto o compuesto a una concentración de 100 o 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Como control se utilizó el disolvente empleado en la preparación de muestras. Después se añadieron 10 semillas y 500  $\mu$ l de agua por pocillo (Fig. 41). Las placas se sellaron con parafilm y se colocaron en una cámara de cultivo vegetal a 25°C con una HR >70% y un fotoperiodo 16:8, durante 7 días. De cada muestra se realizaron 4 réplicas por placa. La germinación de las semillas se controló cada 24 h hasta completar los 7 días, empezando a las 72 h para *L. perenne* y a las 24 h para *L. sativa*. Al final del experimento se midió la longitud radicular de las dos especies y la longitud foliar de *L. perenne* digitalmente (<http://imagej.nih.gov/ij>).



**Fig. 41.** Imagen del ensayo de fitotoxicidad.

### **3.3 Técnicas generales**

#### **3.3.1 Técnicas instrumentales**

##### **Actividad óptica, $[\alpha]_d$**

La determinación de las actividades ópticas se realizó en un polarímetro Perkin Elmer®, modelo 343 usando la línea D de una lámpara de sodio. Para ello, los productos se disolvieron en  $\text{CHCl}_3$  y la medida se realizó en una célula de 1 dm de longitud (l). La concentración de los productos se expresa en g/100 ml de disolución (c).

$$[\alpha]_d = \alpha \times 100/l \times c$$

##### **Espectroscopía de infrarrojo (IR)**

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer® modelo 1600 FT-IR. Los productos se disolvieron en  $\text{CHCl}_3$  seco y se aplicaron sobre una célula de NaCl de 0.5 cm de espesor. Los valores de  $\nu$  se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

##### **Cristalografía de Rayos-X.**

Las estructuras fueron resultas con un difractómetro Bruker Kappa Apex II CCD, usando una radiación de grafito monocromado Mo- $\text{K}_\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ).

##### **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Para el estudio y la determinación estructural de los compuestos aislados y purificados los espectros de RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker Avance 400 Mhz y Bruker AMX 500 Mhz (500 y 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

Los valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) en relación al disolvente empleado como referencia interna y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertzios. Como disolvente se utilizó el deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ).

Los experimentos de 2D con correlación homo y heteronuclear  $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC y NOESY, fueron realizados con programas de la firma Bruker.

### **Espectrometría de masas (EM)**

Los espectros de masas de alta y baja resolución se realizaron en un espectrómetro Micromass, Autospec®. La técnica empleada fue por Impacto Electrónico (IE) con un potencial de ionización de 70 eV y la fuente se mantuvo a 220 °C.

Los espectros de masas de alta resolución se realizan en un espectrómetro Micromass modelo LCT Premier XE, usando electroespray (ESI) como fuente de ionización de modo positivo y negativo a 70 eV.

### **Espectrofotometría**

Para medir tanto la viabilidad de las líneas celulares como la de los parásitos se utilizó un espectrofotómetro BIOTEK modelo ELX800 junto con el Gen5 2.01 Reader Software. La longitud de onda utilizada es de 490 y 630nm.

## **3.3.2 Técnicas cromatográficas**

### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

Los estudios cualitativos y cuantitativos de los compuestos y fracciones volátiles se analizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

(GC-MS) utilizando un equipo Shimadzu GC-2010 acoplado a un detector de masas Shimadzu GCMS-QP2010-Ultra con una fuente de ionización de electrones a 70 eV y usando Helio como gas portador. La cromatografía se llevó a cabo con una columna capilar (0,25 micras de espesor) Teknokroma TRB-5 (95%) Dimetil- (5%) diphenylpolisiloxane, 30 m x 0,25 mm ID. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: La inyección se llevó a cabo en modo Split inyectando 1 µl de muestra con una relación de división (20:1), temperatura del inyector 300°C, temperatura de la línea de transferencia conectada al espectrómetro de masas 250°C y temperatura de la fuente de ionización 220°. Para el análisis de los aceites esenciales la temperatura de la columna inicial fue de 70°C, después se calentó hasta 290°C en 6°C por minuto y dejando a 290°C durante 15 minutos. Para el análisis de los extractos de raíz, la temperatura inicial de la columna fue de 110°C, después se calentó hasta 290°C en 7°C por minuto y dejando a 290°C durante 20 minutos.

Para la identificación de los compuestos se han utilizado los espectros de masas y el tiempo de retención por comparación con la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database, 2001) y para la cuantificación se ha usado el % de área de los picos obtenidos en los cromatogramas.

### **Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos presentes en los extractos y fracciones no volátiles se utiliza como metodología la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) utilizando un equipo Shimadzu con bomba LC-20AD acoplado a un detector de masas con una fuente de ionización electroespray (ESI) y utilizando como analizador un cuadrupolo simple (LCMS-2020 QP). La cromatografía se llevó a cabo con una columna C18 ACE 3 C18 (150 mm x 4.6 mm, 3 µm de tamaño de

partícula) y con una pre-columna analítica ACE3 C18. El flujo de nitrógeno (gas de secado para la evaporación del solvente) fue de 15L/min. El potencial del capilar del electrospray fue de +4.50kV y se empleó un Full Scan en modo positivo (m/z 160-650) con un potencial de 1.20kV y una temperatura del capilar de 250°C.

Las muestras de *Artemisia assoana* fueron inyectadas a 0,20 µg/µl (10 µl) y los productos a 0,05 µg/µl. Los compuestos fueron eluidos con MeOH: Agua al 1% de Ácido acético, gradiente 15:100% MeOH durante 55 minutos, 100% MeOH durante 10 min y 100:15% durante 8 minutos con un flujo de 0,5 ml/min. Las muestras fueron inyectadas a 0,20 µg/µl (10 µl) y los productos a 0,05 µg/µl.

Las muestras de *A. armeniaca* fueron inyectadas a 0,25 µg/µl (10µl) y los productos a 0,05 µg/µl. Los compuestos fueron eluidos con MeOH:Agua al 1% de Ácido acético, gradiente 38:100% MeOH durante 45 minutos, 100% MeOH durante 10 min y 100:38% durante 10 minutos con un flujo de 0,5 mL/min.

La cuantificación relativa, se ha llevado a cabo utilizando los % de área relativos de todos los picos obtenidos en los cromatogramas, escogiendo en su caso, los de mayor porcentaje de área de cada muestra. La identificación de los compuestos se ha llevado a cabo por comparación de los tiempos de retención y espectro de masas de los productos puros, con los obtenidos en el cromatograma del extracto partida.

### **Cromatografía líquida de vacío (CLV)**

Para este tipo de cromatografía se utilizó gel de sílice de grano fino (0.015-0.040 mm, Merck) como fase estacionaria. Las dimensiones de las distintas columnas de vidrio utilizadas dependieron del peso del extracto y/o fracción de partida. La muestra se coloca en forma de adsorbida en gel de sílice (0.063-0.200 mm,

Merck). La elución se realizó en gradientes de polaridad creciente utilizando como eluyentes en la fase móvil mezclas de n-Hex, AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y/o MeOH.

### **Cromatografía en columna (CC)**

Para el fraccionamiento de los extractos se utilizaron columnas cromatográficas de vidrio de distintos diámetros empleando como fase estacionaria gel de Sílice 60 HF<sub>254</sub> (0.040-0.070 mm, Merck). La muestra se coloca de forma adsorbida en gel de sílice (0.063-0.200 mm, Merck). y como fase móvil mezclas de disolventes, n-hexano (n-Hex)-acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)-AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol (MeOH) y AcOEt-MeOH en polaridades crecientes.

### **Cromatografía Flash (FC)**

Por otro lado, se realizaron cromatografías utilizando dos tipos de columnas; la cromatografía flash de media presión (Jones Flash Chromatography) mediante columnas pre-empaquetadas de 20 g de sílice (ExtraBond Flash OT SI, 0.040-0.070 mm, 26.8 x 154 mm Scharlau) y una columna de media presión de vidrio de 5 cm de diámetro y 22 cm de altura empaquetada con gel de sílica (Acros, 0,035-0,070 mm, 60 A). En ambos tipos de columna las muestras fueron eluidas con mezclas de disolventes con un régimen isocrático o en gradiente de polaridad.

### **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron placas de gel de sílice de 0.20 mm (Merck, tipo SIL G-60 F<sub>254</sub>) con indicador fluorescente a 254 nm. La CCF se empleó para el seguimiento de las cromatografías en columna, observando las placas a la luz UV de 254 y 360 nm de longitud de onda. Las placas se revelaron por pulverización con *oleum* (solución de ácido sulfúrico (4%) y ácido acético (80%) en agua destilada) o vainillina (0.5 g vainillina, 100 ml de ácido sulfúrico/etanol (40:10) y calentamiento a 110-130 °C.



### **Cromatografía de exclusión molecular (SPH)**

Se emplearon Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) como fase estacionaria y las columnas se montaron en metanol. Para la fase móvil se emplearon sistemas n-Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH en distintas proporciones dependiendo de la polaridad de la muestra. La muestra se aplica disuelta en el eluyente en una cantidad no superior al 5% del volumen muerto de la columna.

### **Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Las cromatografías líquidas de alta presión se realizaron en un equipo Beckman Coulter 125P® acoplado a un detector de fotodiodo modelo 168, un equipo Shimadzu LC-20AD HPLC con detector diodo array y un equipo Varian ProStar. Las muestras filtradas (0,45 μm) se aplicaron sobre columnas de fase normal (Ultrasphere sílica Beckman, 5 SIL ACE de 250 mm x 10 mm y 5 μ de tamaño de partícula e Interstil sílica de 20 mm x 250 mm y de 10 μ de tamaño de partícula) y se emplearon disolventes de grado HPLC.

### **3.3.3 Técnicas de extracción**

#### **Hidrodestilación**

El proceso de hidrodestilación se llevó a cabo en un aparato Clevenger (Fig. 42) de acuerdo con el método recomendado por la Farmacopea Europea (<http://www.edqm.eu/en/Homepage-628.html>) con 100 g de peso seco de material vegetal seco y molido un matraz de fondo redondo con 500 ml de agua en ebullición durante una hora. El aceite esencial extraído se arrastra junto con el vapor de agua hacia un condensador que enfría la mezcla y se seca sobre anhídrido de sulfato de sodio en un vial. Los



**Fig. 42.** Aparato Clevenger

extractos acuosos obtenidos como residuo de la hidrodestilación (H, agua de condensación) y agua de infusión (I, agua en contacto con el material vegetal) también se recolectan. La tabla 6 muestra el listado de aceites esenciales y extractos acuosos obtenidos de cada planta.

**Tabla 6.** Listado de aceites esenciales y extractos acuosos de *A. assoana* y *A. armeniaca*.

<i>A. assoana</i>	<i>A. armeniaca</i>	Descripción
AasS	-	Aceite esencial de planta silvestre
-	AarM	Aceite esencial de plantas cultivadas en cámara de ambiente controlado
-	HAarM	Hidrolato obtenido de la extracción de los EOs de AM
-	IAarM	Agua infusión obtenido de la extracción de los EOs de AM
AasA	AarA	Aceite esencial de plantas cultivadas en cultivo aerónico
HAasA	HAarA	Hidrolato obtenido de la extracción de los EOs de AA
IAasA	IAarA	Agua infusión obtenido de la extracción de los EOs de AA

## Extracción por Soxhlet

La obtención de los extractos de los componentes no volátiles se llevó a cabo con una extracción sólido-líquido usando como disolvente etanol en un Soxhlet (Fig. 43). Se extrajo material vegetal seco y molido y raíces transformadas liofilizadas. Finalmente, el etanol fue evaporado, llevando la muestra a sequedad, con un rotavapor.



**Fig. 43.**  
Extracción en un soxhlet.

**Tabla 7.** Listado de extractos etanólicos de *A. assoana* y *A. armeniaca*.

<i>A. assoana</i>	<i>A. armeniaca</i>	Descripción
AasAS	-	Extracto etanólico de parte aérea de población silvestre.
-	AarAM	Extracto etanólico de parte aérea de plantas cultivadas en una cámara de ambiente controlado.
AasAA	AarAA	Extracto etanólico de parte aérea de plantas cultivadas en cultivo aerónico.
AasRA	AarRA	Extracto etanólico de raíces de plantas cultivadas en cultivo aerónico.
AasRT	AarRT	Extracto etanólico de raíces transformadas con <i>A. rhizogenes</i> cultivadas <i>in vitro</i> .

### 3.4 Biotransformación de achillín (1)

En este estudio se seleccionó el compuesto achillín (1) como sustrato y como sistema enzimático dos cepas de hongos endófitos de la colección disponible en nuestro laboratorio, H16 (*Loratospora sp.*) (Fig 44) aislado de *Senecio palmensis*, y LnA8 (*Xilaria sp.*) aislado de *Laurus novocanariensis* (Fig 44). Para su mantenimiento se cultivaron en medio sólido PDA (Potato Dextrosa Agar) constituido por extracto de patata 4 g/l, glucosa 20 g/l y agar 15 g/l.



**Fig 44:** Hongos empleados en la biotransformación. (izquierda) H16 (*Larotospóra sp.*) y (derecha) LnA8 (*Xilaria sp.*).

El medio líquido empleado para crecer ambos hongos contiene una mezcla de compuestos en las proporciones indicadas en la tabla 8.

**Tabla 8.** Medio de cultivo para la biotransformación.

Agua destilada	3 L
Glucosa	180 g
NaNO <sub>3</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	30 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.5 mg
Extracto de levadura	3 g

Una vez preparado el medio de cultivo líquido, se ajustó el pH a 7.0 utilizando disoluciones de HCl 1N o NaOH 1N. Después se distribuyó en

Erlenmeyer de 250 ml, cada uno con 50 ml de medio de cultivo. Los matraces se taparon con algodón y se esterilizaron en un autoclave.

Los hongos se cultivaron en placas Petri con PDA a 27°C en oscuridad., hasta que el hongo ocupó toda la superficie del medio (aprox. 7 días). Transcurrido este tiempo, se añadió 7-10 mL de agua destilada estéril y con la ayuda de una espátula se raspó suavemente la superficie del micelio, para que pasara finalmente dividido al medio acuoso. Esta suspensión se vertió en un Erlenmeyer con 50 ml de cultivo líquido y se cultivó a 25 °C con agitación (120 rpm) y luz continua.

Después de 48h, se realizó la inoculación de los restantes elermeryes con 50 ml de medio añadiendo 2 ml y 10 ml de los preinóculos de H16 y LnA8, respectivamente. Los hongos se dejaron crecer en las mismas condiciones descritas anteriormente y después de 48h se les añadió el sustrato.

Para incubar el sustrato con la cepa H16 se preparó una disolución de achillín (**1**) (250 mg) en etanol (5 ml). A cada uno de los Erlenmeyers del cultivo en suspensión se les añadió 0,2 ml de esta disolución, excepto a 5 matraces control a los que se les añadió 0,2 ml de etanol.

En la incubación con la cepa LnA8, se preparó una disolución de **1** (300 mg) en etanol (6 ml). A cada uno de los Erlenmeyers del cultivo en suspensión se les añadió 0,24 ml de esta disolución, excepto a los 5 matraces control que se les añadió 0,24 ml de etanol.



**Fig. 45.** Imagen del cultivo en medio líquido de los hongos con el sustrato (1).

En ambos casos, la incubación del sustrato se realizó durante 6 días comprobando su avance por CCF (Fig. 45). Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se filtró a través de un embudo Büchner, para separar el micelio del medio líquido, que se extrajo con un volumen igual de AcOEt (3x). La fracción orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y fue llevada a sequedad en un rotavapor, obteniendo 0,553 g y 0,901 g de extracto crudo respectivamente.

## 3.5 Reacciones de semi-síntesis

### Reacción de hidroxilación alílica

Los derivados hidroxilados se intentaron obtener por tratamiento del achillín (1) (0,2 mmol) disuelto en DCM seco (7 ml ó 4 ml) con dióxido de selenio ( $\text{SeO}_2$ ), en continua agitación y a temperatura ambiente, y añadiendo gota a gota el hidroperóxido de *terc*-butilo (TBHP). Se ensayaron diferentes proporciones de los agentes oxidantes,  $\text{SeO}_2$  y TBHP (1eq./8eq. ó 1eq./4eq.), modificando también el tiempo de reacción. En ambos casos, la reacción se detuvo filtrándola con sílica gel y se extrajo con una mezcla de DMC:AcOEt al 5%. Se eliminó el disolvente en un rotavapor y el crudo de la reacción fue purificado en CCF preparativa. No se obtuvo ningún producto de reacción.

## Reacción de epoxidación del doble enlace

El achillín (**1**) (0,2 mmol) disuelto en DCM seco (4 ml) se trató con distintas cantidades de ácido *meta*-cloroperbenzoico (MCPBA) (0,2 mmol; 0,6 mmol) en agitación y a temperatura ambiente. Para retirar el ácido formado durante la reacción se preparó una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se realizó una extracción líquido-líquido con DCM y con AcOEt. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio y se llevó a sequedad en un rotavapor. En la purificación por CCF preparativa se obtuvo el producto (**2**) (24,1 mg; 27 mg) con un rendimiento de 45-50,75%. La reacción se repitió 3 veces modificando la cantidad del MCPBA adicionada y el tiempo de reacción.

## Reacciones de bromación

Se realizaron cuatro tipos de reacciones:

1. Se disolvió el achillín (**1**) (0,2 mmol) en DCM seco (2 ml), y se añadieron 15 µl de piridina y 15 µl de bromo, en agitación y a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Al finalizar la reacción se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y se realizó una extracción con DCM. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl y finalmente con agua. Una vez eliminado el disolvente, se obtuvo un crudo que fue purificado en CCF preparativa (DCM:AcOEt 5%), obteniendo 2,2 mg (2,68 %) y 9,4 mg (14%) de los productos (**15**) y (**14**), respectivamente.

2. Se disolvió el achillín (**1**) (0,2 mmol) en DCM seco (10 mL) y se trató con 10  $\mu$ l de bromo, manteniendo la reacción en agitación, atmósfera de nitrógeno y a 0°C (durante 1h) (Fig. 46). Después de su extracción, como se ha descrito anteriormente, y cromatografía por CCF preparativa (DCM 100%) se obtuvieron 2,4 mg (2,12 %) (**16**), 11,8 mg (11,3 %) (**17**) y 10,8 mg (13%) (**18**). Esta reacción se repitió con 0,4 mmol de (**1**) en 30 ml de DCM seco y añadiendo 45  $\mu$ l de bromo, obteniendo de nuevo el producto (**18**) (11,6 mg y un rendimiento de 4,73 %).



**Fig. 46.** Imagen de una reacción de bromación.

3. Se trató el achillín (**1**) (0,2 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (6 ml) con 1,1 eq. de diisopropilamida de litio (35  $\mu$ l) y 2,3 eq. de N-bromosuccinimida (81 mg) a -78°C y se dejó calentar hasta llegar a temperatura ambiente. La reacción se dejó toda la noche, se lavó con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2x) y se extrajo con DCM. No se obtuvo ningún derivado bromado recuperando el producto de partida por CCF preparativa.

4. Finalmente, se disolvió el achillín (**1**) (0,2 mmol) en DCM seco (6 ml) y se trató con 2,5 eq. de N-bromosuccinimida (88 mg) a 0°C hasta alcanzar temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 12 h. La reacción se lavó con agua y se extrajo con DCM. Mediante CCF preparativa se obtuvo mayoritariamente el producto de partida y 1,2 mg del compuesto (**19**) (1,73 %).



### 3.6 Soluciones, colorantes, reactivos y fármacos de referencia

#### MYFb (tintura de yodo)

Yodo metálico	5 g
Yoduro potásico	10 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml
Filtrar la mezcla	

#### Azul tripán

Azul tripán 0,4%	10 ml
PBS	90 ml

#### Solución de SDS

SDS (Duchefa Biochemie)	10 g
HCl	31,5 µl
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

#### PBS ( Solución salina fosfatada)

ClNa	8 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	1,21 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,34 g
H <sub>2</sub> O destilada	1.000 ml

#### PBS – EDTA

ClNa	0,4 g
ClK	0,04 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	0,315 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,2 g
H <sub>2</sub> O destilada	90 ml
EDTA	0,05 g
Ajustar pH a 7,2 – 7,4	

MTT-PMS (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,4-difenil tetrazolio)

PBS	5 ml	5ml
MTT (Sigma)	0,0125 g	0,025 g
PMS (Sigma)	0.00117 g	0.00234 g
Concentración	2.5 mg/ml	5 mg/ml

**Reveladores utilizados en las cromatografías en capa fina**

*Oleum*

H <sub>2</sub> O	15 ml
CH <sub>3</sub> COOH	80 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 ml

Vainillina

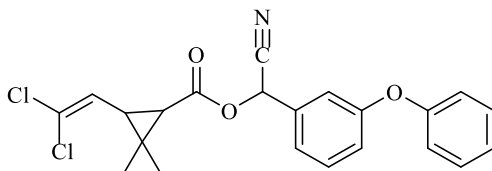
Vainillina	5 g
Etanol	95 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 ml

Revelador azul

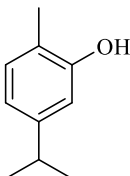
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	10 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml

## Reactivos

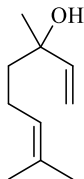
Acibelte (Cipermetrina) (Probelte)



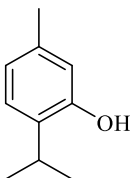
Carvacrol (Sigma Aldrich)



Linalool (Sigma Aldrich)

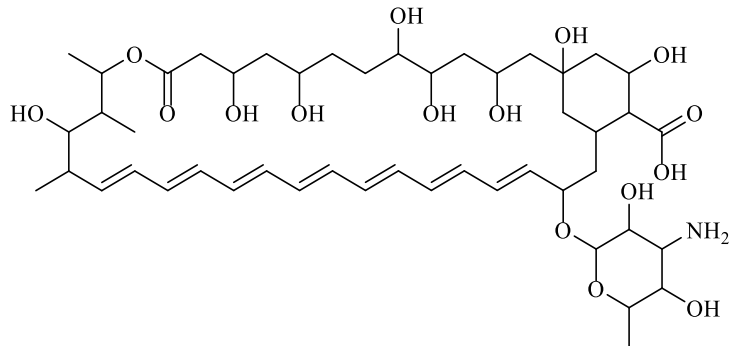


Timol (Sigma Aldrich)

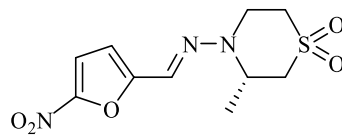


## Fármacos de referencia

### Anfotericina B (GIBCO)



### Nifurtimox (Lampit, BAYER 2502)



## 4. PUESTA A PUNTO Y ESTANDARIZACIÓN DE NUEVOS BIOENSAYOS

Con el fin de profundizar en la caracterización de la bioactividad de los extractos y compuestos objeto de este estudio se ha abordado la puesta a punto y optimización de ensayos frente a dos organismos dianas nuevos: *Phytomonas davidi* y líneas celulares de garrapatas.

*P. davidi* se ha seleccionado por ser un parásito de plantas poco estudiado y con características biológicas similares a parásitos humanos, aunque con respuestas potencialmente diferentes a los productos botánicos. Por otro lado, las líneas celulares de garrapatas pueden constituir un modelo/diana simplificado y alternativo de ectoparásitos de ciclo biológico complejo, como las garrapatas, de gran importancia sanitaria y económica, y muy difíciles de manejar en el laboratorio.

En este trabajo se realiza la estandarización de un método colorimétrico eficaz, rápido y fiable mediante la evaluación de la actividad de aceites esenciales y algunos de sus principales compuestos, previamente estudiados y caracterizados, frente a *Phytomonas* y células de garrapatas.

### 4.1 *Phytomonas* sp.

La primera vez que se aisló un tripanosomátido en un planta fue en 1909 en el látex de *Euphorbia pilulifera* en la isla Mauricio (Lafont, 1909). Posteriormente, Donovan la aisló de la misma planta pero en Asia, y debido a las diferencias morfológicas comparadas con tripanosomátidos patógenos de mamíferos, sugirió el nombre genérico de *Phytomonas* (Donovan, 1909).

Los genomas de *Phytomonas* son mucho más pequeños que los de *Leishmania* o *Trypanosoma* a pesar de la proximidad filogenética (Jaskowska et al., 2015). A partir del estudio de las isoenzimas, del ADN del kinetoplasto y del ADN ribosomal se ha podido determinar que son protozoos monofiléticos (Vainstein et al., 1987; Teixeira et al., 1997; Dollet et al., 2001; Sturm et al., 2007). Dichos estudios agrupan a las especies patógenas como floemícolas, porque habitan el floema de las plantas, mientras que las especies no patógenas se encuentran en frutos y látex (Dollet et al., 2001). Los estudios filogenéticos demuestran la gran diversidad que existe dentro de *Phytomonas*, siendo imposible predecir el hábitat o las especies hospedadoras.

Respecto a su acción patogénica, los trabajos como el de Lafont en 1909 y Franca en 1920 describen la infección en plantas causada por *Phytomonas*, como una disminución del crecimiento e incluso el marchitamiento de la planta. Se ha demostrado que la “marchitez letal” de *Cocos nucifera* (cocotero) y la “marchitez sorpresiva” y la “marchitez letal lenta” de *Elaeis guineensis* (palma de aceite) se deben a la infección por *Phytomonas staheli*. Ambas enfermedades causan síntomas como el marchitamiento de las hojas y la putrefacción de las raíces lo que provoca la muerte de la planta. Otra especie patógena de importancia es *P. leptovisorum*, agente causal de la necrosis del floema de *Coffea arabica* y *Coffea liberica*. Estas especies se han aislado en varios países de Sudamérica, donde la exportación del aceite de palma y el café son un importante pilar económico (Jaskowska et al., 2015). La aparición del síndrome de raíz vacía o “chochamento de raíces” en la yuca (*Manihot esculenta*) se relaciona con la presencia de *P. françai* (Vainstein y Roitman, 1986) y en tomate (*Solanum lycopersicum*) se ha identificado a *P. serpens* como la causante del cuadro conocido como “Yellow Spot”, ya que aparecen manchas amarillas en los frutos infectados (Santos et al., 2006).

Los insectos fitófagos son los principales vectores de estos parásitos, generalmente los pertenecientes a las familias, *Coreidae*, *Lygaeidae*, *Pyrrhocoridae* y *Pentatomidae* (Santos et al., 2006). Cuando un insecto se alimenta de una planta parasitada, el parásito migra desde el tracto digestivo por el hemocele hasta las glándulas salivales, desde donde son capaces de parasitar a una planta sana cuando el insecto se alimenta nuevamente (Jankevicius et al., 1988; Camargo y Wallace, 1994).

Actualmente no hay tratamientos eficaces de control de las enfermedades causadas por *Phytomonas*, y el único método que se aplica es la tala de las plantas enfermas. Debido a las pérdidas económicas que pueden causar estos patógenos en cultivos tan importantes como el del café, el coco y el aceite de palma, es evidente la necesidad de búsqueda de compuestos que actúen como fitofármacos. Además, son un importante modelo biológico para el estudio de tripanosomátidos patógenos humanos, ya que comparten muchas rutas metabólicas e incluso antígenos (Uttaro et al., 1999; Salas et al., 2001).

En este estudio se ha empleado la cepa ATCC<sup>®</sup> 30287<sup>TM</sup> de la especie *Phytomonas davidi*. Dicha especie fue descrita por primera vez por Lafont en 1909 en el látex de *Euphorbia pilulifera*. Presenta una amplia distribución geográfica, habiendo sido aislada de plantas de las familias Euphorbiaceae y Apocynaceae (Solarte et al., 1995).

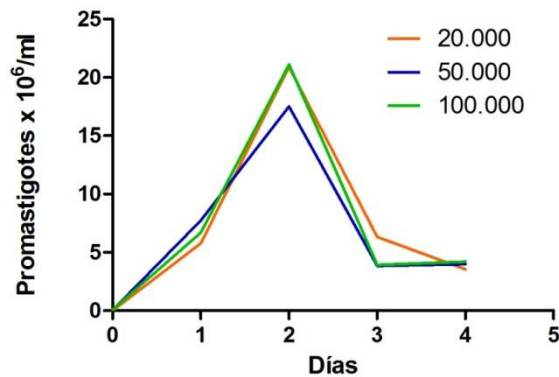
#### **4.1.1 Comportamiento de *P. davidi* en cultivo: curvas de crecimiento**

Para el cultivo de *P. davidi* se ha empleado el medio axénico LIT, ampliamente utilizado y optimizado para el cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Con el fin de conocer el comportamiento de los promastigotes de *P. davidi* en medio LIT se realizaron las curvas de crecimiento, que permiten establecer factores como, el tamaño del inóculo, el momento de adición del fármaco o el tiempo de actuación

de éste. El desarrollo de estas curvas constituye el primer paso en la adaptación del cultivo en el laboratorio para la posterior estandarización del método de reducción del MTT.

Se realizaron tres curvas de crecimiento en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad (10 cm de longitud x 1,8 cm de diámetro), partiendo de inóculos iniciales de  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$  y  $2 \times 10^4$  promastigotes/ml respectivamente. Para cada curva, el volumen final del tubo empleado fue de 3 ml de medio LIT y se realizaron 3 réplicas.

Una vez realizada la siembra de los tubos se llevó a cabo el recuento durante cinco días seguidos en cámara de Neubauer. Para ello se empleó MYFb que fija y da contraste a los parásitos. Los resultados de las curvas de crecimiento se muestran en la figura 47.



**Fig. 47.** Curvas de crecimiento en tubos de ensayo de promastigotes de *P. davidi* con 20.000, 50.000 y 100.000 promastigotes/ml como inóculos iniciales.

Tal y como se puede apreciar, después de una corta fase de crecimiento exponencial, se alcanza el máximo crecimiento a las 48 horas de cultivo, cayendo el mismo rápidamente a las 72 horas. Por tanto, se pudo determinar que la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 2 días, alcanzando la mayor



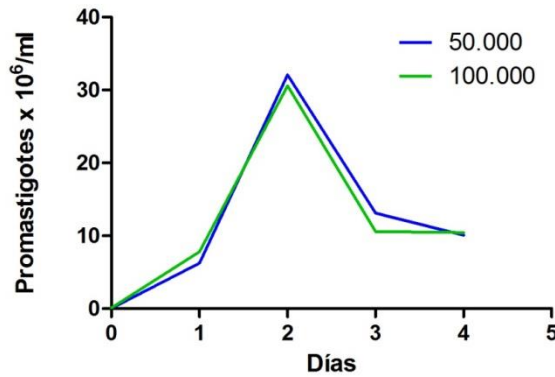
densidad parasitaria a las 48 horas. No hay diferencias significativas entre los diferentes inóculos probados.

En el estudio de la dinámica de crecimiento de *Phytomonas* sp. aislada de tomate y cultivada en un medio bifásico constituido por una parte sólida de agar sangre de conejo y una líquida de medio Roitman, también se determinó que la máxima densidad parasitaria se alcanzaba a las 48 horas (Fiorini et al., 1993).

La fase exponencial viene seguida de una fase estacionaria como consecuencia del agotamiento de los nutrientes del medio. No se deben emplear cultivos que se encuentren en una fase estacionaria para la realización de estos ensayos.

#### **4.1.2 Determinación del momento de siembra para los ensayos**

Con el fin de obtener la máxima cantidad de parásitos en fase exponencial, se realizaron curvas de crecimiento con inóculos iniciales de  $10^5$  y  $5 \times 10^4$  promastigotes/ml respectivamente, en frascos de cultivo de vidrio con una capacidad de 25 ml empleando un volumen final en cada frasco de 10 ml de medio LIT. Se procedió al recuento de parásitos/ml cada 24 horas durante cinco días en cámara de Neubauer, para así determinar el inóculo inicial óptimo y el momento adecuado para realizar la siembra de cultivo en masa a la placa de microtitulación. Los resultados se muestran en la figura 48.



**Fig. 48.** Curvas de crecimiento en frascos de vidrio de promastigotes de *P. davidi* con 50.000 y 100.000 promastigotes/ml como inóculos iniciales.

La dinámica de crecimiento del parásito en estos frascos es similar a la que presenta en los tubos de ensayo, alcanzando el pico de máximo crecimiento a los dos días. La única variación se observó en la densidad parasitaria alcanzada durante la fase exponencial, siendo mayor en el cultivo en frascos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Control del crecimiento del cultivo en tubos y frascos durante cinco días seguidos, partiendo de un inóculo inicial de  $5 \times 10^4$  promastigotes/ml.

Días	Tubos (promastigotes/ml)	Frascos (promastigotes/ml)
0	50.000	50.000
1	7.733.333	6.250.000
2	17.517.333	32.100.000
3	3.842.667	13.100.000
4	3.992.000	10.076.000

A la vista de estos resultados se decidió emplear un inóculo inicial de  $5 \times 10^4$  promastigotes/ml. Con respecto al momento adecuado para pasar los cultivos en masa a la placa de 96 pocillos y añadir los productos a ensayar, se determinó que a las 24 horas de cultivo ( $6,25 \times 10^6$  promastigotes/ml) es el momento idóneo. De tal manera, que el ensayo transcurra con poblaciones en fase de crecimiento, metabólicamente activas y disponiendo de una densidad

parasitaria adecuada, necesaria para discriminar los compuestos activos de los inactivos.

El hecho de alcanzar una alta densidad de parásitos en tan solo 2 días de cultivo permite completar un ensayo de actividad de compuestos frente a *P. davidi* en 3 días. Esto, hace posible que en una semana se puedan realizar varios ensayos, obteniéndose un mayor rendimiento que el alcanzado con otros parásitos de crecimiento más lento, como es el caso de *T. cruzi*.

### **4.1.3 Determinación de los reactivos y concentraciones a utilizar para la lectura de las placas**

Durante muchos años, el recuento microscópico manual del número de parásitos viables ha sido el método de referencia empleado para realizar un cribado de compuestos con actividad antiparasitaria. Por ejemplo, el recuento microscópico en cámara de Neubauer continúa siendo uno de los métodos a menudo empleado en el cribado farmacológico frente a epimastigotes de *T. cruzi* (Pizzo et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Salomão et al., 2013; Muro et al., 2014; Olmo et al., 2015; Wong-Baeza et al., 2015). La estandarización de técnicas colorimétricas y fluorimétricas basadas en la cuantificación de la actividad metabólica del parásito, ha supuesto una optimización de los métodos clásicos en cuanto al número de compuestos a evaluar, y a la mayor objetividad de los resultados obtenidos (Bustamante y Tarleton, 2011).

El ensayo colorimétrico con MTT es un método muy utilizado y nos permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Muelas-Serrano et al., 2000). Este método se basa en que la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazán tiene lugar en presencia de células metabólicamente activas. Dicha reducción, es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Los ensayos con MTT culminan con la lisis del parásito (end-point assays) para proceder a su revelado (Muelas-Serrano

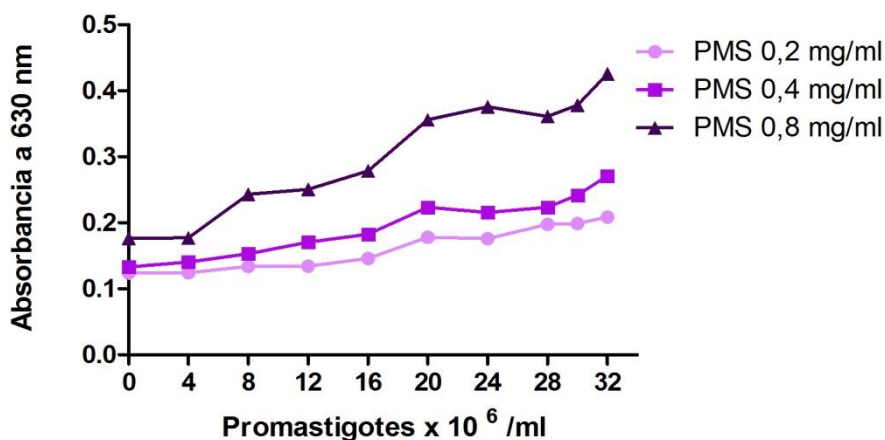
et al., 2000; Vega et al., 2005). Mosmann (1983) ensayó el MTT para utilizarlo como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación en la determinación de la supervivencia y la capacidad de proliferación de células de mamífero.

Los cristales de formazán tienen un color violeta y pueden ser disueltos con diferentes agentes, como por ejemplo el SDS, permitiendo así determinar la densidad óptica de cada pocillo mediante un espectrofotómetro (Siewwerts et al., 1995). La cantidad de células vivas es proporcional a la absorbancia derivada de los cristales de formazán producidos (González-Coloma et al., 2012).

Para obtener una cuantificación exacta y fiable del número de parásitos viables, es necesario controlar todos los parámetros relacionados con el ensayo de reducción del MTT (Sylvester et al., 2011). Dichos parámetros son: la concentración de MTT, los transportadores intermediarios de electrones, el periodo de incubación del MTT, la solubilización de los cristales de formazán, el tiempo de incubación para dicha solubilización y la actividad metabólica.

Debido a la experiencia de nuestro laboratorio en la realización de ensayos de actividad con kinetoplástidos como *Leishmania* sp. y *Trypanosoma cruzi*, parásitos con los que las *Phytomonas* comparten rutas metabólicas, se buscó un protocolo parecido al ya empleado y con el que se han realizado ensayos de actividad de productos naturales satisfactorios (Reina, M., et al., 2011; González-Coloma et al., 2012; Bailén et al., 2013; Martínez-Díaz et al., 2015; Alegre-Gómez et al., 2017). Se realizaron pruebas utilizando el ensayo colorimétrico con MTT modificado (González-Coloma et al., 2012). Tras comprobar que la concentración estándar empleada no provocaba una reducción significativa del MTT en el caso de las *Phytomonas*, se probaron distintas combinaciones. Por un lado, variar la concentración de PMS empleada, y por otro emplear otro aceptor de electrones, la menadiona, con el fin de mejorar el rendimiento de la reacción.

Para ello, se partió de un cultivo en masa en fase de crecimiento exponencial y se calcularon las diferentes densidades de cultivo a sembrar en placa, ajustando el volumen final a 90  $\mu$ l/pocillo. Se sembró una columna de pocillos por concentración dejando una como blanco en la que sólo se añadieron 90  $\mu$ l/pocillo de medio LIT. Una vez sembrada la placa con concentraciones de parásito conocidas se preparó una solución de MTT a 2,5 mg/ml con 3 concentraciones de PMS distintas (0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml y 0.8 mg/ml) a razón de 10  $\mu$ l/pocillo. Tras 75 minutos de incubación en oscuridad, se añadieron 100  $\mu$ l de SDS para disolver los cristales de formazán y 30 minutos después se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro a 630 nm. Así se obtuvieron 3 curvas de absorbancia con las distintas concentraciones de PMS (Fig. 49).



**Fig. 49.** Curvas de absorbancia con distintas concentraciones de PMS.

Observando estos resultados, se concluyó que la concentración de PMS que mejor rendimiento ofrece es la de 0.8 mg/ml. Aun así, la correlación entre la absorbancia y la densidad de cultivo no llegaba a ser tan buena como la observada en cultivos de otros kinetoplastidos como *Trypanosoma* o *Leishmania*. Por este motivo, se procedió a realizar el mismo protocolo descrito anteriormente pero empleando esta vez una solución de MTT a una concentración de 5 mg/ml

con tres concentraciones de Menadiona (0.08 mg/ml, 0.16 mg/ml, 0.33 mg/ml) en lugar de PMS (Fig. 50) (Garn et al., 1994).

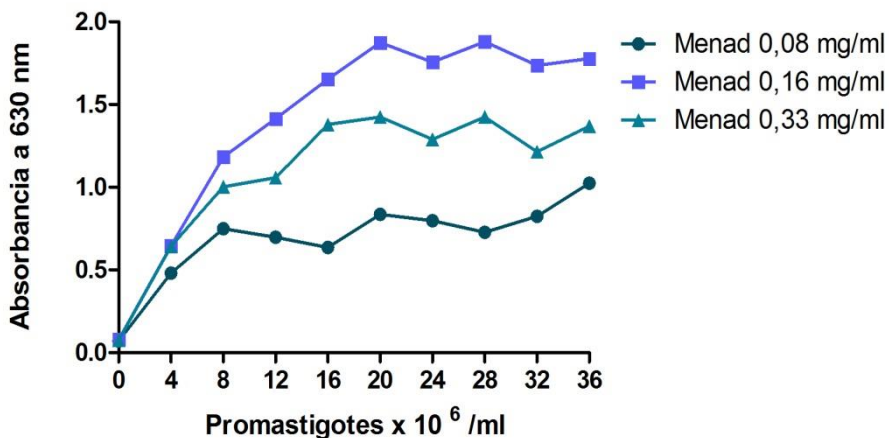


Fig. 50. Curvas de absorbancia con distintas concentraciones de Menadiona

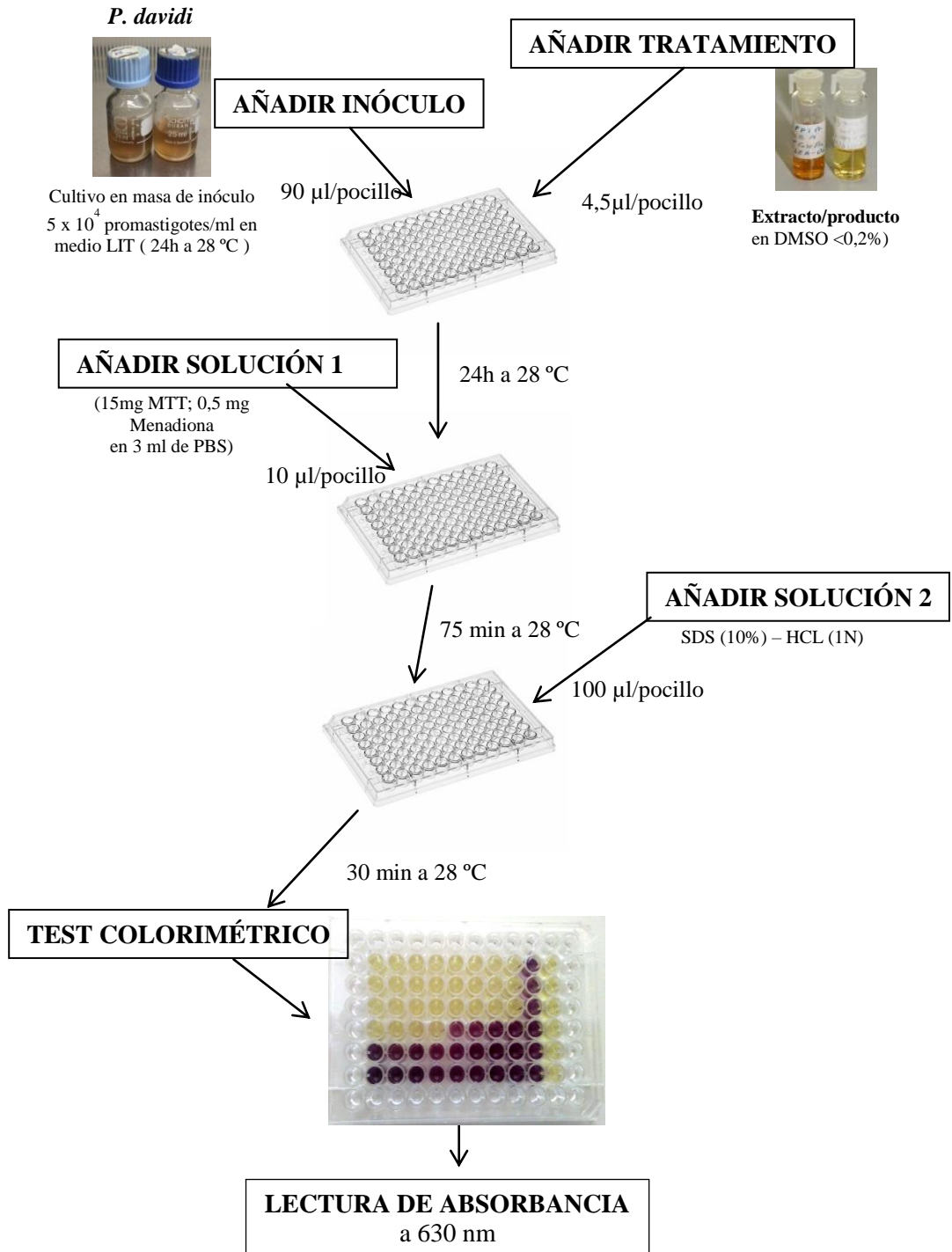
A la vista de los resultados, se determinó que la concentración de menadiona que mejor rendimiento ofrece es 0,16 mg/ml, existiendo una buena correlación entre las absorbancias y la densidad de cultivo y superando considerablemente al obtenido con MTT-PMS. El empleo de menadiona en el protocolo supone una aportación importante con respecto a otros protocolos realizados para otros kinetoplástidos como *Trypanosoma cruzi*, en los cuales se emplea como aceptor de electrones el PMS.

La producción de formazán está relacionada con el tiempo de incubación del MTT. Existe una correlación entre la absorbancia y el tiempo de incubación, pues esta aumenta casi de modo lineal al aumentar el tiempo, hasta llegar a un máximo donde se mantiene constante o incluso desciende (Sieuwerts et al., 1995). En los ensayos con *T. cruzi*, el tiempo de incubación con el MTT es de 75 minutos, resultando de la misma manera efectivo para *P. davidi*.

En cuanto a la solubilización de los cristales de formazán, existen una gran variedad de disolventes empleados, como el SDS, DMSO o el isopropanol. Para este estudio con *P. davidi* se optó por el SDS ya que es el mismo que se emplea en los ensayos con *T. cruzi*. El tiempo de incubación para la solubilización no debe ser excesivo, y depende del disolvente empleado. Se ha observado una disminución de la absorbancia al aumentar el tiempo por encima de lo necesario. Para la disolución de los cristales de formazán con SDS se utilizó un periodo de incubación de 30 minutos (Sieuwertz et al., 1995).

En base a estos resultados se propone el protocolo de ensayo definido en el siguiente esquema:

## ESQUEMA del ensayo frente a *Phytomonas davidi*





Con los datos de las absorbancias de cada pocillo se calculará el porcentaje de actividad anti-promastigote (AP) de los extractos y productos ensayados con la siguiente ecuación:

$$\%AP= 100-[(Ap-Ab)/(Ac-Ab)\times 100]$$

Ap: absorbancia del problema

Ab: absorbancia del control negativo

Ac: absorbancia del control positivo

#### **4.1.4 Aceites esenciales y compuestos puros ensayados sobre *Phytomonas***

Para la validación de este método se seleccionaron diversos aceites esenciales (AEs) y compuestos puros presentes en dichos aceites con actividad sobre *Trypanosoma cruzi*.

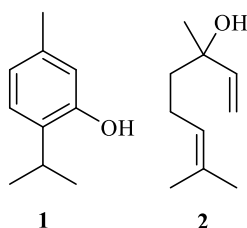
Los aceites esenciales (AEs) actualmente se están estudiando como alternativa a los fármacos para el control de enfermedades parasitarias (Newman y Cragg, 2012). Diversas combinaciones de compuestos como ascaridol, carvacrol y óxido de cariofileno han mostrado actividad frente a *Leishmania* sp. en estudios *in vivo* e *in vitro* (Pastor et al., 2015). Por otro lado los ensayos de actividad con geraniol frente a epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* muestran una actividad inhibitoria del crecimiento (Izumi et al., 2011) y estudios frente a epimastigotes de *T. cruzi* de AEs, sus productos mayoritarios y combinaciones de dichos productos, han mostrado resultados muy interesantes sobre la existencia de una acción sinérgica (Guardo et al., 2017, in press).

En este estudio se han empleado aceites esenciales de plantas aromáticas pertenecientes a los géneros *Hyssopus*, *Mentha* y *Thymus*, todas ellas de la familia *Lamiaceae* (Tabla 10) y dos componentes mayoritarios (comerciales): el

timol (**1**) y el linalool (**2**) (Fig. 47). Dichos aceites demostraron previamente una actividad significativa frente epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, (Guardo et al., 2017, in press). A su vez, se han ensayado los componentes mayoritarios de dichos AEs, entre los que esta el **2**, que no presentó actividad antiepipimastigote y el **1**, que fue el más activo frente a *T. cruzi* y el menos citotóxico frente a una línea celular de mamífero (Guardo et al., 2017, in press).

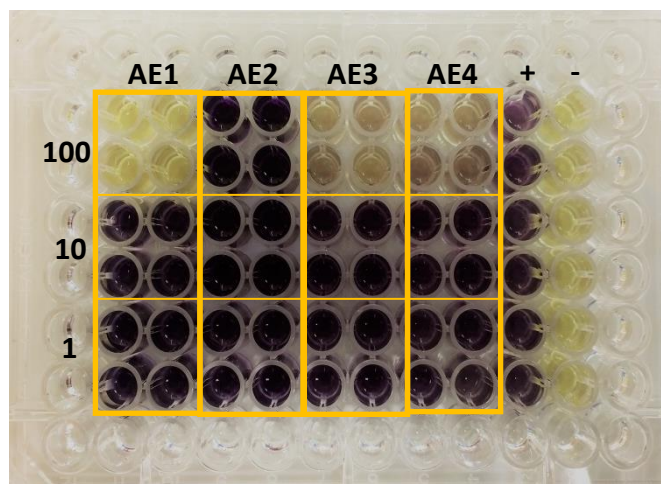
**Tabla 11.** Especies de plantas utilizadas para la obtención de aceites esenciales, localización y año de cosecha (ver Guardo et al., 2017)

Aceites esenciales	Origen	Año de cosecha
<i>Hyssopus officinalis</i>	Teruel (Aragón, España)	1994
<i>Mentha rotundifolia</i>	Zaragoza (Aragón, España)	2013
<i>Thymus zygis</i>	Aguarón (Aragón, España)	2007
<i>Thymus vulgaris</i>	Villarroya (Aragón, España)	2006



**Fig. 47.** Estructura molecular del timol (**1**) y del linalool (**2**)

Con el fin de validar el protocolo descrito se procedió al ensayo de los cinco aceites esenciales y los dos compuestos puros frente a *P. davidi*. En la figura 51 podemos observar la aparición de una placa tras el ensayo.



**Fig. 51.** Imagen de una placa tras el ensayo. De cada concentración se realizan 4 réplicas, cada columna es un aceite esencial distinto ensayado a 3 concentraciones (100,10 y 1 µg/ml) y las dos últimas columnas son el control positivo y el negativo. A simple vista, podemos observar que el aceite más activo es el AE1 y el menos el AE2 y que todos ellos pierden la actividad a 10 µg/ml.

Los resultados del ensayo de actividad anti-promastigote muestran que los aceites más activos son los de *Thymus zygis*, *T. vulgaris* y *Mentha rotundifolia*, alcanzando una actividad de casi el 100% a 100 µg/ml (Tabla 12).

**Tabla 12:** Actividad *in vitro* de los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas y productos frente a promastigotes de *P. davidi*. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de crecimiento  $\pm$  error estándar.

Aceite esencial	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
<i>T. zygis</i>	98,70 $\pm$ 0,24	0 $\pm$ 8,35	0 $\pm$ 11,55
<i>T. vulgaris</i>	94,10 $\pm$ 1,67	0 $\pm$ 5,15	0 $\pm$ 10,40
<i>M. rotundifolia</i>	86,71 $\pm$ 0,92	0 $\pm$ 5,16	0 $\pm$ 10,31
<i>H. officinalis</i>	31,24 $\pm$ 8,34	0 $\pm$ 18,13	0 $\pm$ 16,51
1	98,1 $\pm$ 0,6	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0

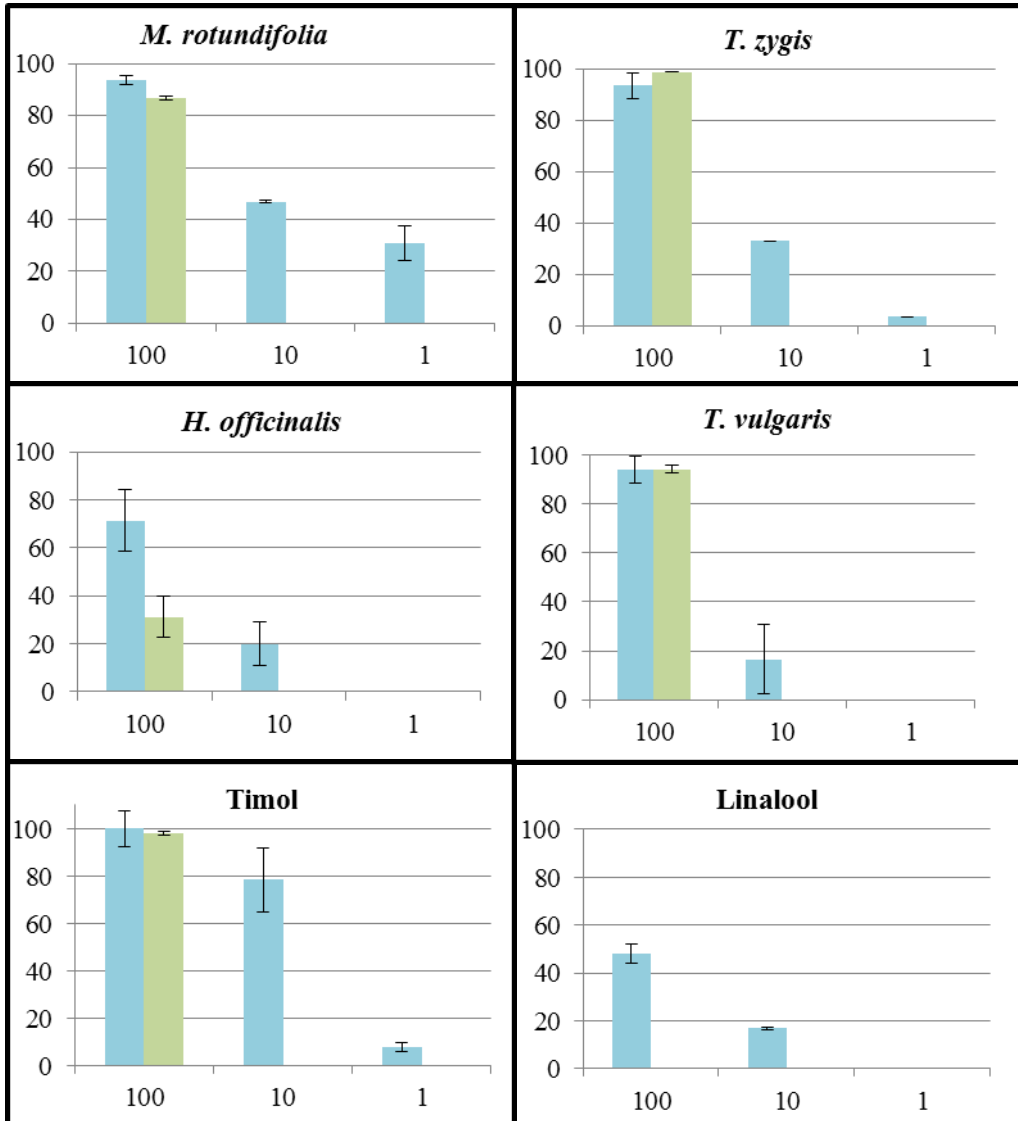
Estos resultados demuestran la elevada actividad antiparasitaria que tienen estos aceites, los cuales fueron evaluados previamente con *T. cruzi* y presentaron una actividad muy similar (Guardo et al., 2017, in press) (Fig. 49). El análisis

químico de estos aceites mediante GC-MS mostró que el timol representa el 74% de la composición de *T. zygis* y un 49% en *T. vulgaris* y el linalool un 2% y un 3%, respectivamente (Sainz et al., 2012; Guardo et al., 2017, in press), por lo que la eficacia de los aceites de *T. zygis* y *T. vulgaris* se puede atribuir a la presencia de timol en su composición.

Aunque los efectos de estos aceites sobre *T. cruzi* (Guardo et al., 2017, in press) dieron resultados similares a los observados en *P. davidi*, a dosis inferiores *T. cruzi* tiene mayor sensibilidad. Lo mismo ocurre con los productos ensayados, siendo el timol (**1**) más efectivo sobre *T. cruzi* que sobre *P. davidi* ( $78,5 \pm 13,5$  % de inhibición a  $10 \mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 52). En un ensayo previo, complejos metálicos de triazol-pirimidina (dos Pt(II) y uno Ru(III)) afectaron el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, y *T. brucei brucei* y promastigotes de *L. donovani* y *P. characias*, siendo dichos efectos menores en *P. characias* que en el resto de tripanosomatidos (Salas et al., 2001; Magán et al., 2004).

Ambos parásitos tienen muchas similitudes. Ratones inmunizados con *P. serpens* y posteriormente infectados con una dosis letal de *T. cruzi* mostraron una disminución en la parasitemia y un aumento en la supervivencia respecto al control, de lo que se deduce que *P. serpens* y *T. cruzi* comparten antígenos (Breganó et al., 2003; Santos et al., 2007). En *Phytomonas serpens* se ha identificado una metalopeptidasa, la gp63, que es considerada un factor de virulencia de *Leishmania* sp., así como la cisteín proteasa también conocida como cruzipaína, que es la proteasa más abundante de *Trypanosoma cruzi*. (Santos et al., 2006; Lopes et al., 2010).

Por tanto, el efecto diferencial observado de los aceites y compuestos entre *P. davidi* y *T. cruzi* podría ser debido a diferencias evolutivas motivadas por los hospedadores, ya que las plantas contienen metabolitos secundarios que no están presentes en los animales.



**Fig. 52.** Gráfica comparativa de los resultados de los cuatro AEs y los productos puros a 100, 10 y 1 µg/ml frente a *T. cruzi* (en azul) y *P. davidi* (en verde).

Podemos concluir que la técnica de reducción del MTT es una herramienta eficaz para la realización de ensayos de actividad frente a *Phytomonas davidi*, permitiendo descartar de forma rápida y segura los productos sin interés. Del mismo modo, dicha técnica es una herramienta útil a la hora de estudiar y comparar los efectos de los productos naturales frente a distintos modelos de tripanosomátidos.

## **4.2 Ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de garrapatas**

El control de las garrapatas se basa mayoritariamente en el uso de insecticidas químicos (Ostfeld et al., 2006). El uso indiscriminado de estos productos químicos va acompañado de serios problemas: muchas especies han desarrollado resistencia; son letales para insectos no diana, entre ellos insectos polinizadores o insectos que cumplen un papel fundamental en el control de plagas; y contaminan el medio ambiente (Kiss et al., 2012). Por todo lo mencionado el uso de estos productos está siendo reevaluado y la tendencia actual pasa por el control integrado, que incluye la utilización de agentes naturales con actividad ixodocida (George et al., 2014).

Una de las estrategias más estudiadas y prometedoras es el uso de acaricidas y repelentes de origen botánico. Recientemente, se ha publicado una revisión bibliográfica sobre la efectividad de las plantas como acaricidas y repelentes contra especies de garrapatas vectores de enfermedades. En dicha revisión se nombran 83 especies de plantas pertenecientes a 35 familias, siendo la más estudiada la familia Asteraceae (Benelli et al., 2016). Dichos extractos de plantas, han sido evaluados frente a distintos estadios: larvas, ninfas o hembras grávidas y generalmente la metodología más empleada es la de la inmersión de los individuos en una solución del extracto durante varios segundos, calculando la mortalidad a las 24, 48 o 72h de la aplicación (Benelli et al., 2016).

Existen numerosas metodologías para detectar compuestos con actividad acaricida o la aparición de resistencias. Las metodologías más utilizadas son el llamado ensayo de paquete larvario y el protocolo Drummond, así como algunas modificaciones que posteriormente se han ido incorporando.

El paquete larvario, es una adaptación de la prueba de diagnóstico de resistencia de la FAO (1995), cuyo diseño se basa en el trabajo de Stone y Haydock (1962). En él, se exponen larvas de edad conocida a los productos impregnados sobre papel de filtro, y se controla la mortalidad a las 24 y 48 h, mediante observación con lupa binocular. Posteriormente se han descrito modificaciones de este método en diversos trabajos, incluyendo el test de inmersión descrito por Shaw (1966) así como otro método que consiste en recubrir un vial con diferentes concentraciones de extracto/producto a ensayar, colocando posteriormente diez ninfas sin alimentar por vial y determinar la mortalidad transcurridas 24 h (Flor-Weiler et al., 2011).

El protocolo Drummond (Drummond et al., 1967) se realiza con hembras grávidas, teleoginas. Esta prueba ha sido modificada por numerosos autores (Álvarez et al., 2008; Sarda Ribeiro et al., 2008; Sarda Ribeiro et al., 2007). Para realizar este ensayo se sumergen grupos de 10 a 12 hembras previamente pesadas durante 5 minutos en un vaso de precipitados que contiene 10 ml de las soluciones. Posteriormente, las teleoginas se mantienen en placas de Petri e incuban en condiciones normales para realizar un registro de la mortalidad diario. A los 14 días se registra el número de hembras en oviposición, pesándose los huevos y trasvasándolos a tubos de vidrio para controlar la emergencia. Mediante este protocolo se estudia 3 parámetros: el porcentaje de mortalidad, la inhibición de oviposición e inhibición de emergencia.

Debido a las cantidades de productos/extractos necesarias para realizar un ensayo, problemas de solubilidad de extractos y productos orgánicos, así como el tiempo consumido por el protocolo Drummond, se han puesto punto metodologías que consumen menos tiempo y cantidad de muestra, permitiendo así su aplicación en los casos de cribados amplios y rápidos (González-Coloma et al., 2013). Este protocolo se basa en la aplicación del extracto / producto a celulosa cristalizada (25 mg) a distintas concentraciones que se vierte en tubos de

vidrio con 20 larvas/tubo y se incubaba durante 24 horas para determinar el porcentaje de mortalidad. Un ejemplo de búsqueda de larvicidas de origen botánico usando este protocolo es el publicado por Ruiz-Vásquez et al., (2016) en el que se ensayaron compuestos aislados del *Senecio adenotrichius*.

Los ensayos *in vivo* sobre garrapatas son complejos, ya que estos artrópodos presentan ciclos biológicos dependientes de uno o varios hospedadores y en muchas ocasiones no es factible disponer de ejemplares. Por tanto, la puesta a punto de ensayos sobre modelos *in vitro* puede representar un gran avance en el cribado de sustancias ixodicidas.

En este trabajo se ha puesto a punto y validado una nueva metodología de ensayo con tres líneas celulares de garrapatas establecidas a partir de células embrionarias de dos especies de ixódidos, basado en el protocolo empleado para los estudios de citotoxicidad con las células de mamífero LC5 descrito en el apartado de materiales y métodos (Mosmann T., 1983).

#### **4.2.1 Líneas celulares de garrapatas**

La primera línea celular continúa de garrapatas se estableció a partir de *Rhipicephalus appendiculatus* en 1975 tras 20 años de trabajo y mejoras (Varma et al., 1975). Actualmente, hay unas 57 líneas celulares de las cuales, 15 provienen de ejemplares de la familia Ixodidae (garrapatas duras), y 2 de la familia Argasidae (garrapatas blandas) (Bell-Sakyi et al., 2012).

Originariamente, la mayoría de las líneas celulares de garrapatas se instauraban a partir de ninfas, pero actualmente se establecen a partir de los embriones, ya que es mucho más fácil de procesar (Yunker 1987; Kurtti et al., 1988). Debemos tener presente, que las líneas de garrapatas existentes no son genotípicamente iguales, es decir, no son clones, son cultivos heterogéneos. La proporción de los distintos tipos celulares varía en función del tiempo del cultivo



y del número de subcultivos que haya sufrido. Tras numerosos intentos fallidos para obtener líneas celulares clonadas se cree que la heterogeneidad en dichos cultivos es crucial para la supervivencia celular (Munderloh et al., 1994).

Esta heterogeneidad en este tipo de cultivos puede exhibir cierta ventaja, por ejemplo, para los estudios de virus transmitidos por garrapatas, para determinar las células diana que utilizan para replicarse, para el aislamiento e identificación de nuevos virus, etc. (Bell-Sakyi et al., 2012). En total, se han cultivado 38 virus transmitidos por garrapatas y 16 virus transmitidos por mosquitos en distintas líneas celulares de garrapatas. Inicialmente, se empleaban mayoritariamente para ver la capacidad de replicación y propagación de distintos arbovirus en los cultivos celulares existentes. Posteriormente, y con ayuda de los avances en biología molecular y el establecimiento de nuevas líneas celulares, se comenzó a realizar estudios sobre la relación virus-vector (Senigl et al., 2004; 2006).

Además de los estudios en virología, las líneas celulares de garrapatas han sido empleadas para estudios bacteriológicos. La línea celular de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE25) se emplea en la propagación de la bacteria *Anaplasma centrale* con el fin de combatir a otra bacteria como *A. marginale* causante de la anaplasmosis (Bell-Sakyi et al., 2015). Así mismo, células de *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM20) e *Ixodes scapularis* (ISE6) pueden ser infectadas con diferentes aislados de *A. phagocytophilum* para la inhibición de células apoptóticas (Alberdi et al, 2015). La creación de una línea celular VII-SCC a partir de *B. microplus* resistente a insecticidas organofosforados ha hecho posible el desarrollo de nuevos métodos *in vitro* para el estudio de la aparición de resistencias (Cossio-Bayugar et al., 2002).

Para este estudio se han utilizado tres líneas celulares embrionarias, dos pertenecientes a la especie *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM19 e IRE/CTVM20) y una

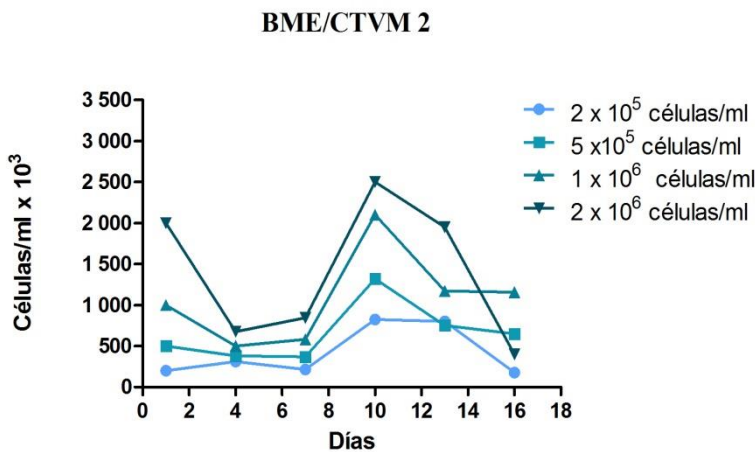
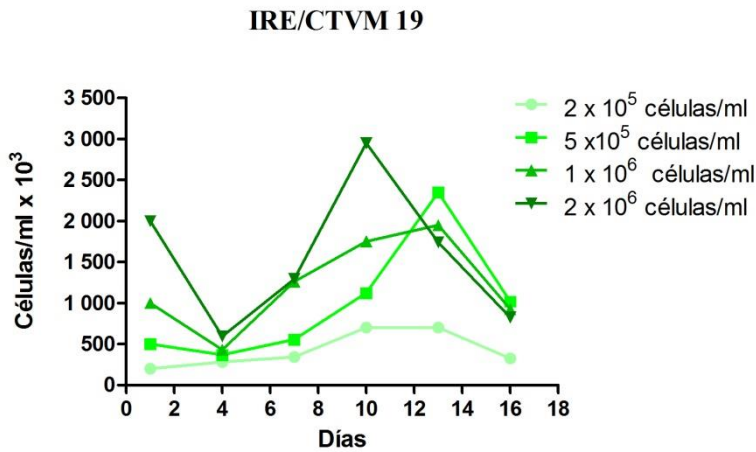
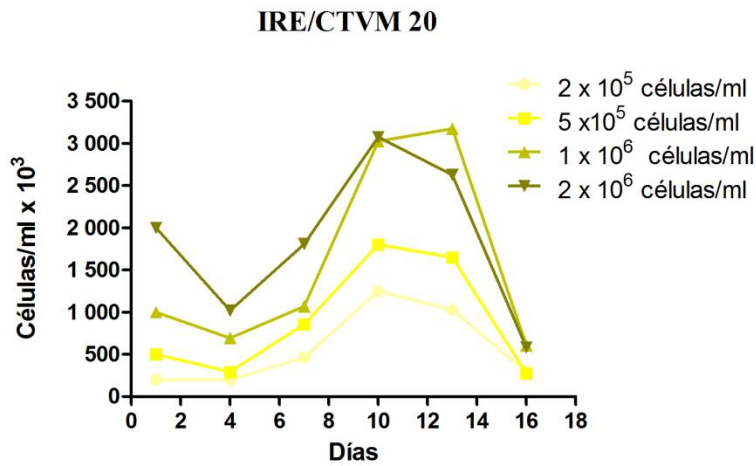
a la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME/CTVM2). Todas las líneas celulares se cultivaron en las mismas condiciones, descritas en materiales y métodos.

#### **4.2.2 Comportamiento de las líneas celulares: curvas de crecimiento**

Para poder diseñar un protocolo de ensayos de actividad, es necesario conocer previamente la dinámica de crecimiento de los cultivos con el fin de determinar el momento en el que alcanzan la fase de crecimiento exponencial y la concentración inicial de células adecuada.

Se realizaron curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares con diferentes inóculos iniciales:  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  células/ml en un volumen final de 2,2 ml de medio de cultivo L-15. Estos cultivos se mantuvieron en una estufa a 28°C y se realizaron recuentos de células cada tres días. Para ello, las células se despegaron con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y, mediante tinción con azul tripán (dilución 1:20), se comprobó su viabilidad y se cuantificaron en una cámara de Neubauer (Fig. 53).

Tal y como se observa en la figura 53, podemos determinar que las tres líneas celulares alcanzan la fase exponencial de crecimiento entre los seis y los diez días después de la siembra. El mayor pico de crecimiento se obtuvo con el inóculo de  $1 \times 10^6$  células/ml en el caso de IRE/CTVM20, llegando a alcanzar una concentración máxima de  $3,17 \times 10^6$  células/ml. En cuanto a IRE/CTV19 y BME/CTVM2 el mayor pico de crecimiento fue alcanzado con el inóculo de  $2 \times 10^6$ .

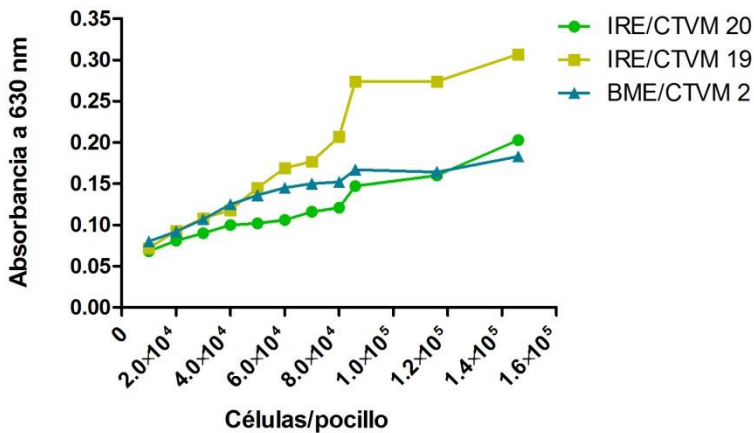


**Fig. 53.** Curvas de crecimiento de IRE/CTVM20, IRE/CTVM19 y BME/CTVM2.

Durante el desarrollo de las pruebas se ha podido comprobar que uno de los factores determinantes del ensayo es la capacidad de adherencia de las células. En este sentido la línea que mejor se comportó fue IRE/CTVM20, alcanzando el mayor crecimiento y con una curva similar para todos los inóculos iniciales empleados.

### 4.2.3 Determinación del momento de siembra: curvas de absorbancia

Se realizó una curva de absorbancia para cada línea celular, tras el tratamiento previo con MTT y así poder determinar la concentración de células óptima para la realización de los ensayos. Para ello en una placa de microtitulación se inocularon por filas distintas concentraciones conocidas de células, con sus respectivas réplicas (90  $\mu$ l/pocillo). Las concentraciones empleadas fueron desde las 10.000 células/pocillo hasta las 150.000 células/pocillo (Fig. 54).



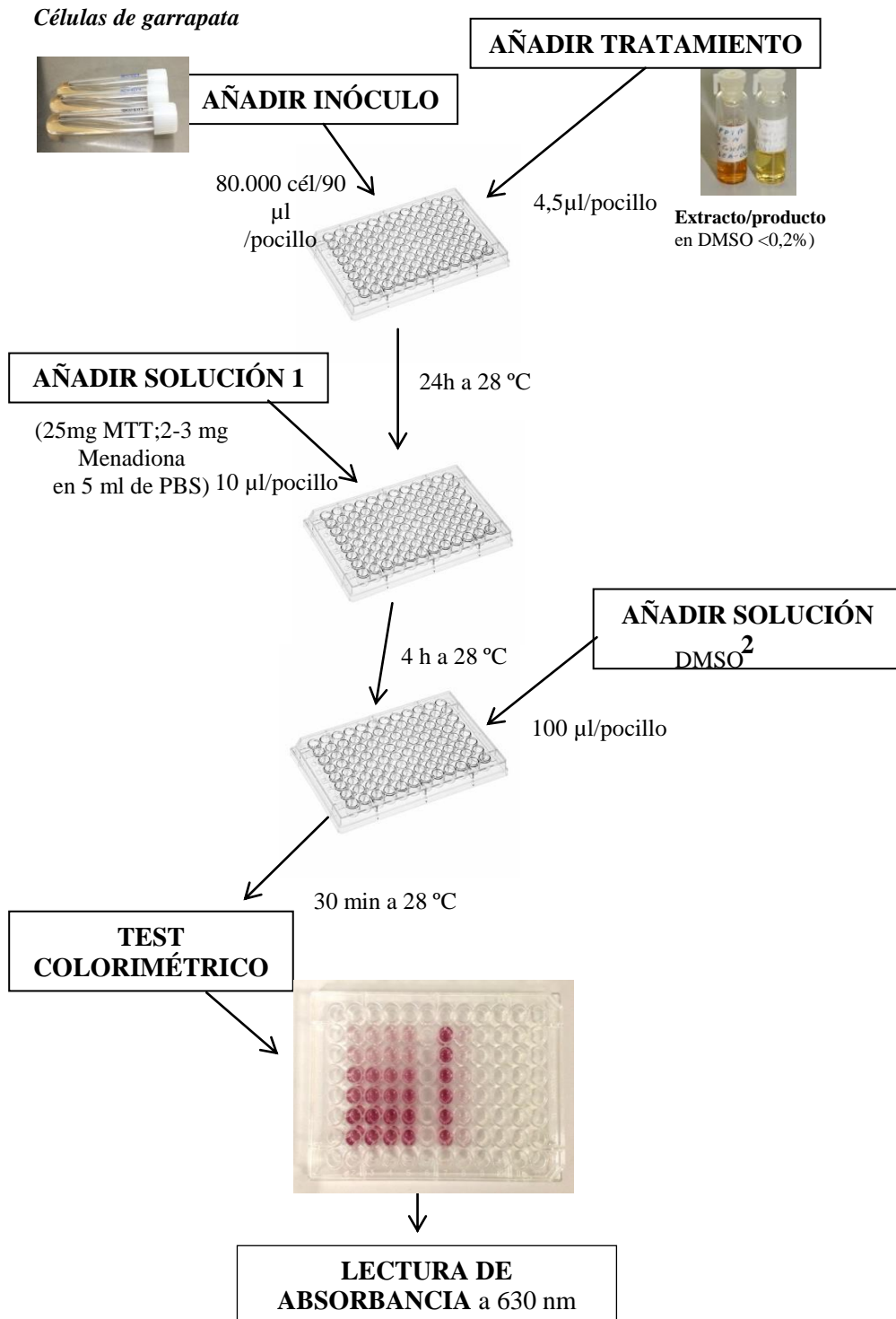
**Fig. 54.** Curvas de absorbancia de IRE/CTVM20, IRE/CTVM19 y BME/CTVM2.

A partir de los resultados obtenidos, se optó por seleccionar la concentración de 80.000 células/90  $\mu$ l como la más idónea para realizar los ensayos. Esta concentración da unos valores de absorbancia diferenciales con

respecto a los del control negativo (medio de cultivo) y además constituye una cantidad de células asequible de conseguir. Debido al lento crecimiento de las células en el cultivo y a su baja tasa metabólica es necesario utilizar elevadas concentraciones de células para que la reducción del MTT ofrezca valores significativos con una buena discriminación entre los pocillos con diferentes tratamientos. En general, las tres líneas celulares presentan unos valores de absorbancia adecuados para su uso en los ensayos.

En base a estos datos, se propone un protocolo para la realización de los ensayos de citotoxicidad con líneas celulares de garrapatas que se expresa en el siguiente esquema:

# ESQUEMA del ensayo frente a *CÉLULAS DE GARRAPATA*



El porcentaje de citotoxicidad se determina de la misma manera que en los ensayos con *T. cruzi* y *Phytomonas*, con la fórmula:

$$\%CT= 100- [(Ap-Ab)/(Ac-Ab)\times 100]$$

Ap: absorbancia del problema

Ab: absorbancia del control negativo

Ac: absorbancia del control positivo

#### 4.2.4 Citotoxicidad de aceites esenciales

Para este estudio se han seleccionado una serie de aceites esenciales y productos puros ensayados previamente *in vivo* con larvas de *Hyalomma lusitanicum* (Tabla 13) (Sainz, P., TFM 2012).

**Tabla 13.** Especies de plantas utilizadas para la obtención de aceites esenciales, localización y año de cosecha.

Aceites esenciales	Origen	Año de cosecha
<i>Mentha rotundifolia</i> A	La Alfranca (Aragón, España)	1993
<i>Satureja montana</i>	Escuela de Capacitación Agraria(Aragón, España)	1994

Los productos seleccionados para los ensayos con células fueron el timol (1), el linalool (2) y carvacrol (3) y como control positivo el acaricida Acibelte (Sainz, P., TFM 2012). Todas las muestras fueron ensayadas con las células de mamífero LC5 (ensayo de citotoxicidad descrito en el apartado. 3.2.2 de materiales y métodos).

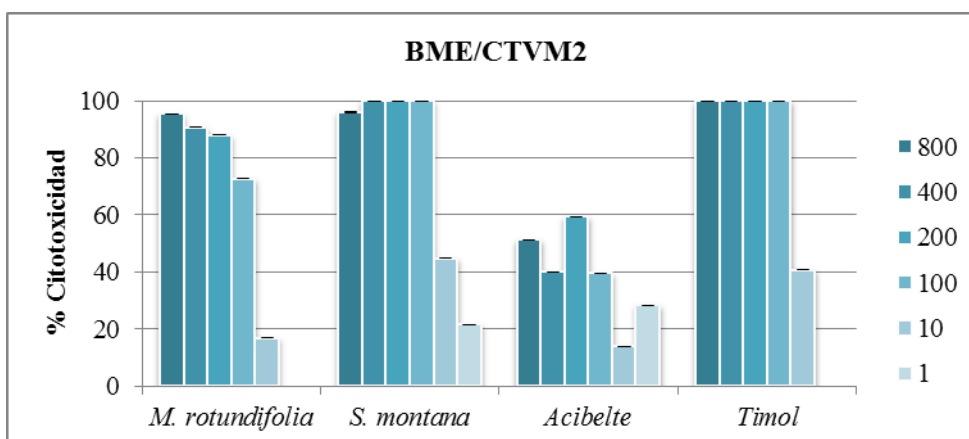
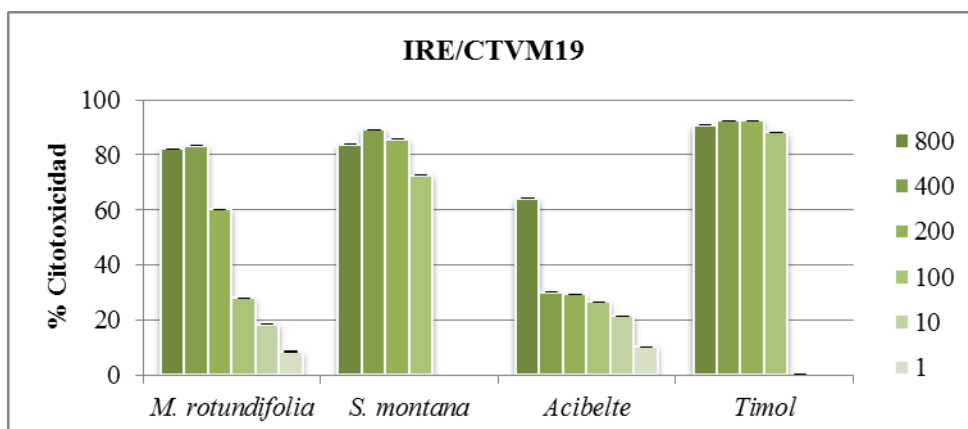
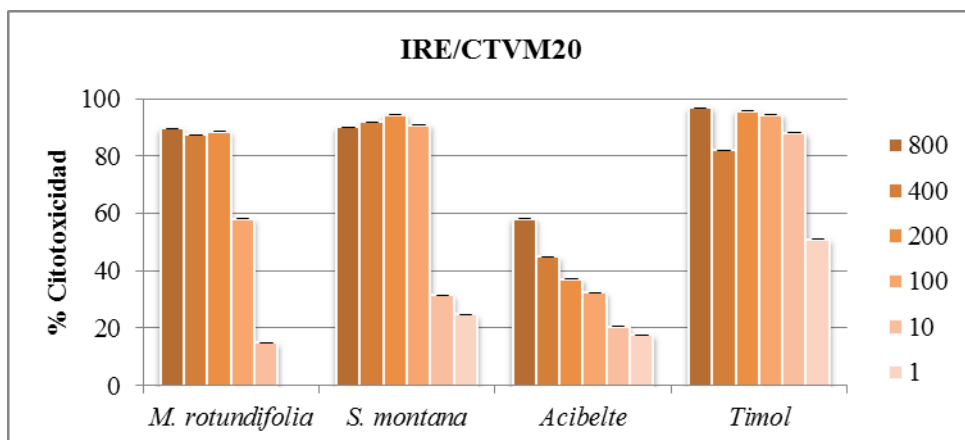
**Tabla 14.** Efecto larvicida de los Aes (*M. rotundifolia* y *S. montana*) y los compuestos puros (**1**, timol; **3**, carvacrol y **2**, linalool). Dosis letales 50 y 90 de cada muestra expresado en  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . \* % de mortalidad a 20  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Muestras	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>
<i>M. rotundifolia</i>	4,56 (4,2-5,0)	6,19 (5,6-7,2)
<i>S. montana</i>	4,46 (4,0-5,1)	7,04 (6,2-8,6)
<b>Timol (1)</b>	2,94 (2,0-3,5)	6,14 (5,3-7,9)
<b>Carvacrol (3)</b>	1,43 (1,3-1,6)	1,73 (1,6-2,2)
<b>Linalool (2)</b>	9,73 $\pm$ 5,02 *	-

Siguiendo el protocolo propuesto, se ensayaron todas las muestras (aceites esenciales y productos puros) a las siguientes concentraciones; 800, 400, 200, 100, 10 y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con cada una de las tres líneas celulares de garrapatas. De cada concentración se realizaron 4 réplicas por placa.

Los aceites de *Mentha rotundifolia* y *Satureja montana* fueron citotóxicos a partir de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , especialmente el de *S. montana*. El timol (**1**) fue más activo que el insecticida acibelte (Fig. 55).





**Fig. 55.** Ensayos de citotoxicidad sobre las líneas IRE/CTVM20, IRE/CTVM19 y BME/CTVM2 de los aceites esenciales de *M. rotundifolia* y *S. montana*, y de los productos acibelte y timol (1). Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad.

Para la línea IRE/CTVM20 el aceite con mayor actividad es el de *S. montana*. Tanto el aceite de *S. montana* como el de *M. rotundifolia* superan el 50% de actividad a 100 µg/ml. El timol muestra toxicidad a todas las concentraciones ensayadas, presentando un 50% de efecto a 1 µg/ml frente a IRE/CTVM20. El acibelte, a la mayor concentración tiene una actividad citotóxica de tan solo un 58%.

En el caso de la línea IRE/CETVM19, vemos que los resultados son parecidos, el aceite de *S. montana* es el que posee mayor actividad y el acibelte presenta el menor efecto, Sin embargo el timol aun siendo el más activo, ya que a 100 µg/ml el porcentaje de citotoxicidad es del 88%, tiene menor actividad que con la línea anterior.

Observando los resultados con la línea celular de *R. (Boophilus) microplus* (BME/CTVM2), vemos que el aceite esencial de *S. montana* tiene valores de citotoxicidad cercanos al 50% para la concentración de 10 µg/ml y el timol al 40% para la misma concentración. El acibelte, nuevamente se muestra inactivo para esta línea celular.

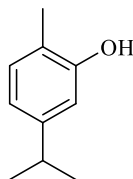
*R. (Boophilus) microplus* es una garrapata causante de importantes pérdidas económicas en la ganadería. Numerosas poblaciones de esta especie a lo largo de todo el mundo han comenzado a desarrollar resistencia a la mayoría de acaricidas, que suponen el pilar de su control (Rodríguez-Vivas et al., 2006; 2011). Los estudios *in vitro* (mediante inmersión de las larvas) de la actividad larvicida de acaricidas como la cipermetrina (componente del acibelte) y el amitraz, mostraron un porcentaje de mortalidad de tan solo un 47-57% y un 26-32%, respectivamente. Las combinaciones de estos acaricidas y de estos acaricidas con el piperonil butóxido (sinérgico de plaguicidas) mostraron un incremento en el porcentaje de mortalidad de las larvas (cipermetrina+amitraz, 56-74%; cipermetrina+PBO, 84-85% y los tres, 97-100%) (Rodríguez-Vivas et

al., 2013). Los valores de citotoxicidad del acibelte en este trabajo son similares a los descritos por Rodríguez-Vivas et al., (2013).

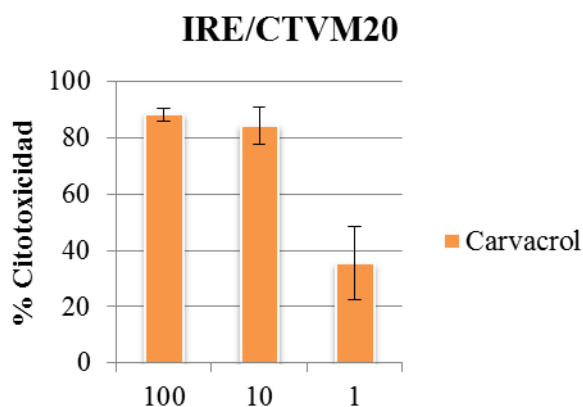
La toxicidad del timol frente a estas líneas celulares concuerda con la toxicidad *in vivo* mostrada en el estudio de Daemon et al., (2012) en el que obtuvieron unos valores de toxicidad superiores al 90% con una concentración de 10 mg/ml frente a larvas de *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor nitens*. Los ensayos previos realizados en larvas de *H. lusitanicum* dieron como resultado una DL<sub>50</sub> de 2,94 µg/mg (Sainz, P., TFM 2012).

Una revisión sobre la actividad insecticida de especies del género *Mentha* sp. realizada en el 2011 frente a diversas plagas de insectos reveló unos valores de actividad comprendidos entre el 85 y el 100% (Kumar et al., 2011). El valor del mismo aceite esencial de *Mentha* frente a larvas de *H. lusitanicum* resultó en una DL<sub>50</sub> de 4,56 µg/mg (Sainz, P., TFM 2012).

Los ensayos sobre larvas de *H. lusitanicum* con *S. montana* mostraron una actividad parecida a la obtenida con *M. rotundifolia* (Sainz, P., TFM 2012). El carvacrol (3)(Fig. 56), componente mayoritario de dicho aceite, fue el que mayor actividad larvicida presentó con una DL<sub>50</sub> de 1,43 µg/mg. El ensayo del carvacrol (3) con la línea celular de garrapatas IRE/CTVM20 demostró su citotoxicidad (Fig. 57).



**Fig. 56.** Estructura molecular del carvacrol (3)



**Fig.57.** Actividad citotóxica (%) del carvacrol (**3**) frente a IRE/CTVM20 a 100, 10 1 µg/ml.

Los resultados de los ensayos demuestran que el protocolo propuesto es eficaz y que, debido al lento crecimiento de las células en cultivo y su baja actividad metabólica, es necesaria una elevada concentración de células (80.000/pocillo) para que la reducción del MTT ofrezca valores con una buena discriminación entre pocillos con diferentes tratamientos. La línea que mejor se comporta es IRE/CTVM20 con la que se obtienen los mayores picos de crecimiento y una curva de crecimiento con un patrón similar para todos los inóculos iniciales empleados.

Finalmente, se constata una alta correlación entre los resultados de los ensayos *in vivo* e *in vitro*, por lo que esta metodología propuesta demuestra ser útil en el cribado de extractos y productos como potenciales acaricidas para el control de garrapatas.

## 5. ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO

En este capítulo se presentan los resultados del fraccionamiento biodirigido de los distintos extractos (aceites esenciales y extractos etanólicos) obtenidos a partir del material vegetal (recolectado y/o cultivado) con el fin de aislar e identificar los compuestos activos. Para ello se ensayaron los extractos frente a las dianas seleccionadas (artrópodos, nematodos, parásitos, hongos, células y semillas) y una vez detectada la actividad principal de cada uno de ellos, se fraccionaron mediante cromatografía biodirigida por la diana/s seleccionada/s. La biomasa necesaria para la extracción de cada una de las plantas estudiadas se obtuvo aplicando metodologías de cultivo distintas en cada caso.

La biomasa de *Artemisia pedemontana* se obtuvo mediante recolección en campo (silvestre). Además, a partir de semillas silvestres germinadas y multiplicadas en el CITA se estableció su cultivo aeropónico, *in vitro* y de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (Fig. 58).



**Fig 58.** Imagen de *A. assoana* cultivada en el CITA, en cultivo aeropónico, en cultivo *in vitro* y raíces transformadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

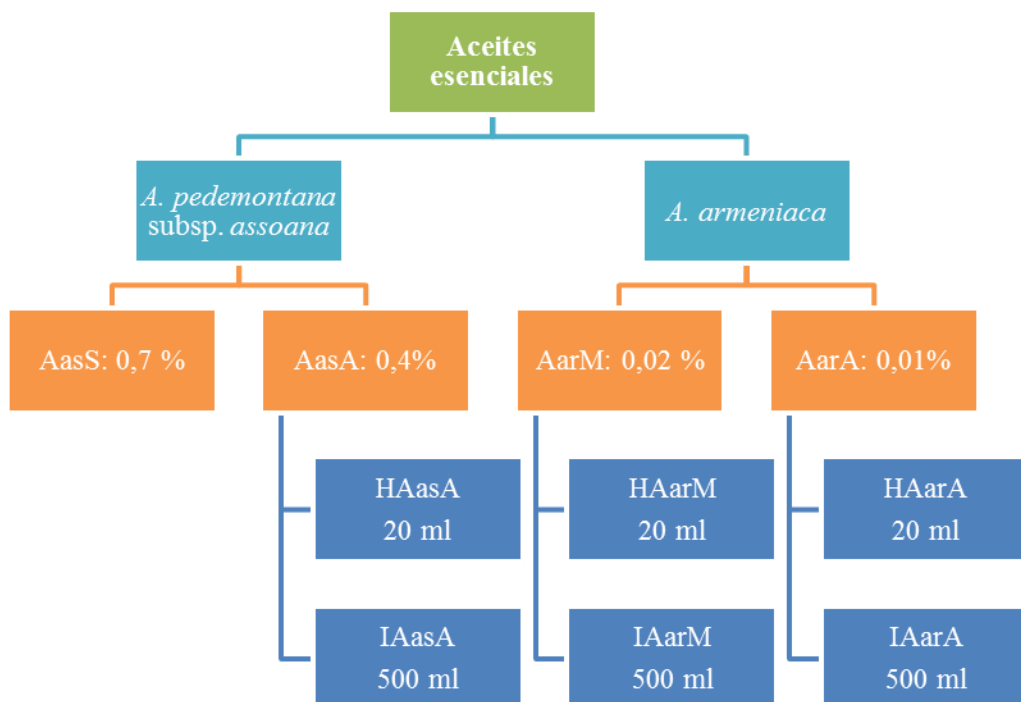
La biomasa de *Artemisia armeniaca* se obtuvo a partir de semillas silvestres germinadas y multiplicadas en el CITA, a partir de las cuales se estableció su cultivo aeropónico, *in vitro* y de raíces transformadas (Fig. 59).



**Fig. 59.** Imagen de *A. armeniaca* cultivada en el CITA, en cultivo aeropónico, en cultivo *in vitro* y raíces transformadas (de izquierda a derecha y de arriba abajo).

## 5.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) se obtuvieron a partir de plantas en floración de *A. assoana* cultivada en invernadero (AasS), *A. armeniaca* cultivada en cámara (ArAM) y de las dos especies cultivadas en aeroponía (AasA y AarA). El mayor rendimiento de aceite esencial fue de *A. assoana*, en estado de floración y el rendimiento más bajo fue el de *A. armeniaca* (Fig. 60).



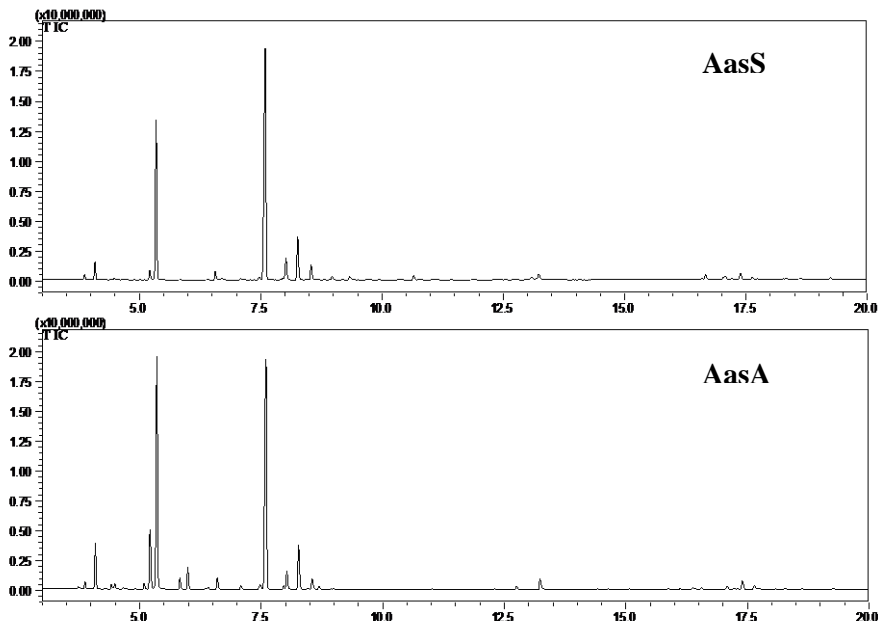
**Fig. 60.** Extracción y rendimientos de los aceites esenciales de *A. assoana*: planta silvestre (AasS) y planta en cultivo aeropónico (AasA), y *A. armeniaca*: planta en cámara de cultivo (AarM) y en aeropónico (AarA). El hidrolato (H) y el agua infusión (I) sólo se recolectó de planta en cámara y planta en aeropónico.

La composición química de los aceites esenciales se analizó mediante GC-MS (*A. assoana* en Tabla 15 y *A. armeniaca* en Tabla 16). Las imágenes de los cromatogramas se muestran en las figuras 61 (AasS y AasA) y 62 (AarM y AarA).

El género *Artemisia* presenta una variabilidad significativa en cuanto a la composición química de los AEs, a nivel inter- e intraespecífico. Dicha variabilidad se debe a factores ambientales e intrínsecos (nivel de desarrollo de la planta, altitud, localización, época de cosecha, pH y fertilizantes de la tierra, etc) (Abad et al., 2012). Así mismo, el método elegido para el secado y extracción del aceite puede hacer variar dicha composición (Martín et al., 2011; Julio et al., 2014).

**Tabla 15.** Composición química (% relativo) de los aceites esenciales de *A. assoana* cultivada en distintas condiciones ambientales.

Compuestos	IR	Silvestre (AaS)	Aerónico (AaA)
$\alpha$ -pineno	3,945	0,54	0,89
Canfeno	4,16	1,77	5,34
$\beta$ -pineno	4,567	0,22	0,71
$\alpha$ -Terpineno	5,15	-	0,99
<i>p</i> -Cimeno	5,297	1,75	7,4
<b>1,8-Cineol</b>	5,431	<b>22,88</b>	<b>25,78</b>
$\gamma$ -Terpineno	5,92	-	1,73
Sabineno	6,074	-	2,53
Linalool	6,665	1,56	-
Sabineno Isómero	6,686	-	1,45
<b>Alcanfor</b>	7,69	<b>44,03</b>	<b>32,4</b>
Borneol	8,12	4,79	2,77
4-Terpineol	8,36	8,86	5,77
1- $\alpha$ -Terpineol	8,64	3,6	1,6
Acetato de bornilo	10,77	0,98	-
Metil eugenol	13,34	1,27	1,82
Nerolidol	16,78	0,82	-
Espatulenol	17,19	1,03	0,59
Viridiflorol	17,51	1,69	1,59



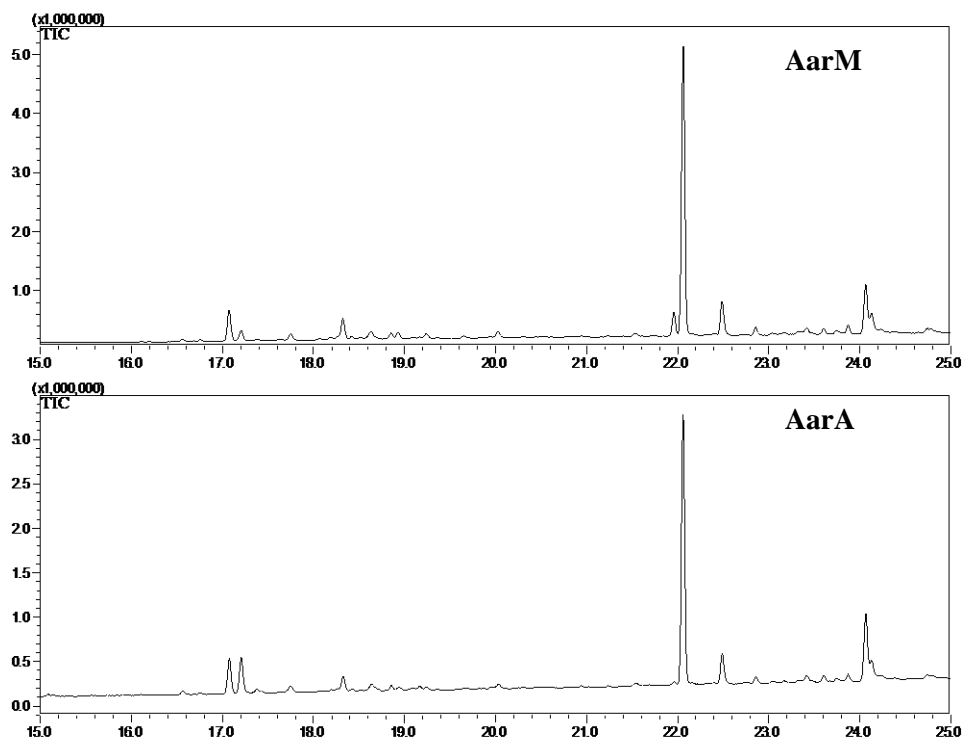
**Fig. 61.** Cromatogramas GC-MS de los aceites esenciales AaS y AaA.



**Tabla16.** Composición química (% relativo) de los aceites esenciales de *A. armeniaca* cultivadas en distintas condiciones ambientales.

Compuestos	IR	Cámara (AarM)	Aeropónico (AarA)
Espatulenol	17,19	8,27	11,62
Óxido de cariofileno	17,33	11,57	11,89
δ-Cadineno 87%*	18,44	5,56	0,32
61/204/105/43/81/119/162/134/95/121			
Neofitadieno	22,07	5,58	2,10
<b>6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona</b>	22,17	<b>40,28</b>	<b>19,35</b>
Isobutil ftalato 95%*	22,61	5,67	13,05
Ácido oleico / Ácido palmítico 90%*	24,17	0,57	4,76
45/43/73/41/60/57/55/71/129			
Isobutil ftalato Isómero	24,25	2,60	4,57
82/81/95/41/43/44/83/69/109/55	24,35	1,05	3,47

\*% de similitud con la base de datos



**Fig. 62.** Cromatogramas GC-MS de los aceites esenciales AarM y AarA.

Los compuestos mayoritarios de *A. assoana* fueron 1,8-cineol (22,88 - 25,78 %) y alcanfor (32,4 - 44,03%). El cineol y alcanfor son dos monoterpenos comunes en la composición química de numerosos aceites esenciales de *Artemisia*. Especies como *A. annua*, *A. fragans*, *A. longifolia* y *A. ludoviciana* son ricos en estos dos monoterpenos (Abad et al., 2012). El alcanfor se encuentra en mayor cantidad en el AE de planta silvestre, mientras que 1,8-cineol está en mayor cantidad en el AE de planta en cultivo aeropónico. El 4-terpineol es el tercer compuesto mayoritario en el AaS, seguido del borneol y el 1 $\alpha$ -terpineol, sin embargo, en AasA es el *p*-cimeno seguido de 4-terpineol y canfeno. Se ha descrito la presencia de dos quimiotipos de *A. assoana*. Uno caracterizado por alcanfor (49,2 %) y 1,8-cineol (12,6%), y otro por davanona (28,4%) con una baja concentración de alcanfor (5%) y 1,8- cineol (1,3 %) (Pérez-Alonzo et al., 2003). Por tanto, la población objeto de este estudio pertenece al quimiotipo alcanfor+1,8-cineol.

El compuesto mayoritario del AE de *A. armeniaca* fue 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (40,28 % - 19,35%). Ambos aceites presentan óxido de cariofileno y espatulenol en una proporción parecida. Destaca la presencia de dos ftalatos, con mayor concentración en el AE del cultivo aeropónico, lo que sugiere una posible contaminación procedente de los materiales plásticos empleados en el cultivo.

Estudios previos relativos a la composición del AE de *A. armeniaca*, se han realizado con poblaciones procedentes de Irán. En un caso se caracteriza por la presencia de  $\alpha$ -pineno (41,9%) y 1,8-cineol (20,6%), seguidos de espatulenol (6,7%), limoneno (5,6%), mirceno (4,8%) y  $\beta$ -pineno (3,2%) (Kazemi et al., 2010). Otra población estudiada presentó  $\alpha$ -pineno (10,7%), nonadecano (10,0%), 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (9,4%), espatulenol (7,8%) y Z-verbenol (5,8%) y toxicidad frente a *Artemia salina* (Mojarrab et al., 2013). Por tanto, este es el primer estudio del AE de una población Ibérica de *A. armeniaca*, presentando una

composición diferente a la descrita para las poblaciones de Irán a excepción de la presencia de espatulenol y 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

### 5.1.2. Actividad biológica de los AEs

#### Artrópodos (insectos y ácaros)

Los aceites esenciales (AEs) presentan actividad insecticida por ser una parte importante de las defensas químicas de las plantas. Se han descrito efectos antialimentarios de AEs de especies de *Artemisia*. Concretamente, AE y extractos supercríticos de *Artemisia absinthium* presentaron esta actividad frente a los insectos *S. littoralis*, *M. persicae* y *R. padi* (Martín et al., 2011). Por tanto, en este estudio hemos procedido a la evaluación de las actividades antialimentarias de los AEs obtenidos frente a las especies de insectos diana.

El estudio de la actividad antialimentaria de los AEs de *A. assoana* y *A. armeniaca* frente a insectos (*S. littoralis*, *M. persicae* y *R. padi*) se muestra en la Tabla 17. El insecto más sensible fue *M. persicae* (AarA > AasA, AarM). *S. littoralis* respondió al AE de AasS, con una proporción de cineol:alcanfor próxima a 1:2, mientras que el AE AarA con una proporción próxima a 1:1 fue activo frente al pulgón *M. persicae*. Cada uno de estos compuestos por separado no producen efectos antialimentarios significativos frente a *S. littoralis* o *M. persicae* (González-Coloma et al., 2006). Sin embargo, la combinación binaria cineol:alcanfor (1:1) presentó un efecto tóxico sinergista frente a larvas de *S. littoralis* (Pavela, 2014), por tanto el efecto antialimentario observado para los AEs de *A. assoana* podría ser debido a la presencia de ambos compuestos.

En el caso de *A. armeniaca*, ambos AEs presentaron efectos antialimentarios frente a los pulgones diana (AarA frente a *M. persicae* y ArM frente a *R. padi*) (Tabla 17).

**Tabla 17.** Actividad antialimentaria de los AEs de *A. assoana* (Aas) y *A. armeniaca* (Aar) de planta silvestre (S), cultivo aeropónico (A) y planta cultivada en cámara (M).

AEs	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	<i>S. littoralis</i> %FI <sup>a</sup>	<i>M. persicae</i> %SI <sup>b</sup>	<i>R. padi</i> %SI <sup>b</sup>
<b>AasS</b>	10	85,6±7,9	46,1±8,9	56,9±8,1
	5	43,3±19,2	-	-
<b>AasA</b>	10	53,0±8,9	76,1±7,2	60,3±7,2
	5	-	29,7±7,6	-
<b>AarM</b>	10	62,5±14,2	66,3±8,1	76,12±6,2
<b>AarA</b>	10	n.e	81,3±5,3	57,4±8,8

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. <sup>b</sup>Porcentaje de inhibición del asentamiento.

El componente principal identificado en el AE de *A. armeniaca* fue la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. Las metilcetonas (MC) de longitud media son una clase de compuestos reconocidos como efectivos pesticidas naturales (Antonious et al., 1999). Están presentes en las hojas de tomate de la variedad *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum* (Antonious et al., 2003; Antonious et al., 2005). Estas MCs contribuyen a la resistencia de la planta frente a insectos y ácaros, actuando como repelentes (Antonious et al., 2006) y tóxicos (Antonious et al., 2003; Chatzivasileiadis et al., 1997). Por tanto, la actividad antialimentaria frente a pulgones del AE de *A. armeniaca* probablemente se deba a la presencia de la MC 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. Sin embargo, esta es la primera descripción del efecto antialimentario de los AEs de *A. assoana* y *A. armeniaca*.

## Ácaros

El control de garrapatas se basa principalmente en el uso de plaguicidas sintéticos de acción rápida (Ostfeld et al., 2006), aumentando la selección de garrapatas resistentes a acaricidas y causando contaminación ambiental (Kiss et al., 2012). Los extractos de plantas, incluyendo los aceites esenciales y sus componentes terpénicos, han sido descritos como tóxicos y / o repelentes de garrapatas (Kiss et

al., 2012; Cruz et al., 2013; Kröber et al., 2013) y por tanto son una fuente prometedora de agentes ixodicidas naturales.

Los resultados del ensayo de toxicidad de los AEs de ambas especies de *Artemisia* sobre las larvas de la garrapata *Hyalomma lusitanicum* se muestran en la tabla 18. Los AEs de *A. assoana* mostraron actividad larvicida pero no fueron activos sobre adultos (mortalidad de 36,06±16,98 %). Los productos mayoritarios de este AE, 1,8-cineol y alcanfor, no tuvieron efecto sobre las larvas (datos no mostrados), lo que sugiere que el AE de *A. assoana* podría ser activo por un efecto sinergista de sus componentes, siendo las larvas más sensibles que los adultos. El AE de *A. armeniaca* no tuvo ningún efecto ixodicida *in vivo*. El ensayo de actividad excito-repelente frente adultos de *H. lusitanicum* del aceite de *A. assoana* (AasS) (protocolo adaptado de Sainz et al., 2012) resultó inactivo (datos no mostrados).

**Tabla 18.** Porcentaje de toxicidad frente a larvas de *H. lusitanicum* de los AEs.

AE	µg/mg de celulosa	
	40 <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> <sup>b</sup>
<b>AasS</b>	95,2±2,4	21,4 (19,4-23,7)
<b>AasA</b>	100±0	20,9 (18,8-23,4)
<b>AarM</b>	31,5±29,03	-

<sup>a</sup>Porcentaje de mortalidad corregido según la ecuación de Schneider-Orelli's a 40 µg/mg de celulosa. <sup>b</sup>DL<sub>50</sub> = dosis necesaria para producir un 50% de mortalidad.

El efecto de estos AEs sobre la línea celular IRE/CTVM20 de *Ixodes ricinus* se muestra en la tabla 19. Todos los AEs fueron citotóxicos, los de *A. assoana* (AasS > AasA) fueron más activos que los de *A. armeniaca*, en consonancia con lo observado *in vivo*. Los compuestos 1,8-cineol y alcanfor no presentaron actividad citotóxica (datos no mostrados), lo mismo que ocurre *in vivo*. La citotoxicidad del AE de *A. armeniaca* en ausencia de toxicidad *in vivo* sugiere la detoxificación del mismo por parte de *H. lusitanicum*.

**Tabla 19.** Actividad *in vitro* de los AEs frente a la línea celular de garrapatas IRE/CTVM20 expresado como % de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar.

<b>AE</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>IRE/CTVM20</b>
<b>AasS</b>	800	84,8 $\pm$ 6,4
	400	89,0 $\pm$ 4,0
	200	83,6 $\pm$ 4,0
	100	12,8 $\pm$ 4,6
<b>AasA</b>	800	100 $\pm$ 2,2
	400	99,0 $\pm$ 0,8
	200	65,5 $\pm$ 7,0
	100	15,0 $\pm$ 5,9
<b>AarM</b>	800	83,4 $\pm$ 3,7
	400	77,1 $\pm$ 2,6
	200	36,6 $\pm$ 2,1
	100	25,7 $\pm$ 3,7
<b>AarA</b>	800	97,4 $\pm$ 6,8
	400	68,0 $\pm$ 18,3
	200	57,4 $\pm$ 10,6
	100	25,4 $\pm$ 11,5

## Nematodos

Algunos AEs y extractos acuosos (hidrolatos, infusiones) procedentes de la hidrodestilación del material vegetal presentan potentes efectos nematocidas (Andrés, et al 2012; Andres et al., 2017; Julio et al., 2017), incluyendo especies como *Artemisia absinthium*, *Lavandula luisieri*, *Thymus zygis* y *T. vulgaris*. Por tanto, en este trabajo hemos procedido a estudiar la actividad nematocida de los AEs, hidrolatos (H) e infusiones (I) de *A. assoana* y *A. armeniaca*.

En la tabla 20 se muestra la actividad de los aceites esenciales (AEs), hidrolatos (H) y agua de infusión (I) obtenidos en el proceso de extracción de los aceites de las especies de *Artemisia* objeto de estudio. Los aceites esenciales de ambas especies fueron inactivos (datos no presentados), mientras que los extractos

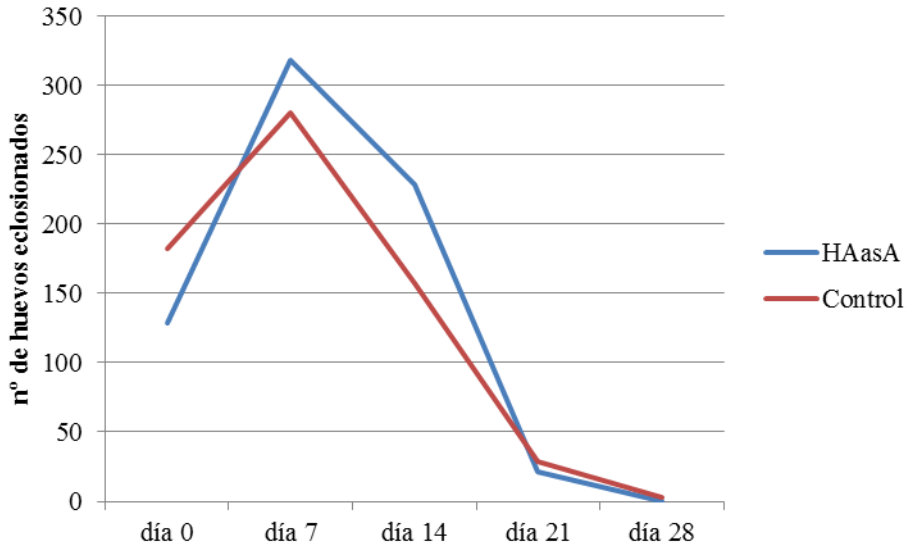
acuosos de *A. assoana* (cultivo aeropónico) presentaron una fuerte actividad nematocida, lo mismo que en el caso de *A. armeniaca*.

**Tabla 20.** Actividad nematocida de los extractos acuosos (hidrolato H y agua infusión I) de *A. assoana* (Aas) y *A. armeniaca* (Aar) procedentes de cultivo aeropónico (A) y cámara de cultivo (M).

<b>Extractos acuosos</b>	<b>1 mg/ml<sup>a</sup></b>	<b>DL<sub>50</sub></b>
<b>HAasA</b>	96,4±1,1	74 (70-80)*
<b>IAasA</b>	98,7±0,8	-
<b>HAarM</b>	72,0±6,5	-
<b>IAarM</b>	67,9±20,2	-
<b>HAarA</b>	87,2±1,7	-
<b>IAarA</b>	91,5±2,4	-

<sup>a</sup>Porcentaje de nematodos paralizados (n=100) corregido según la fórmula de Scheider-Orelli's. \*DL<sub>50</sub>: dosis capaz de producir el 50% de mortalidad

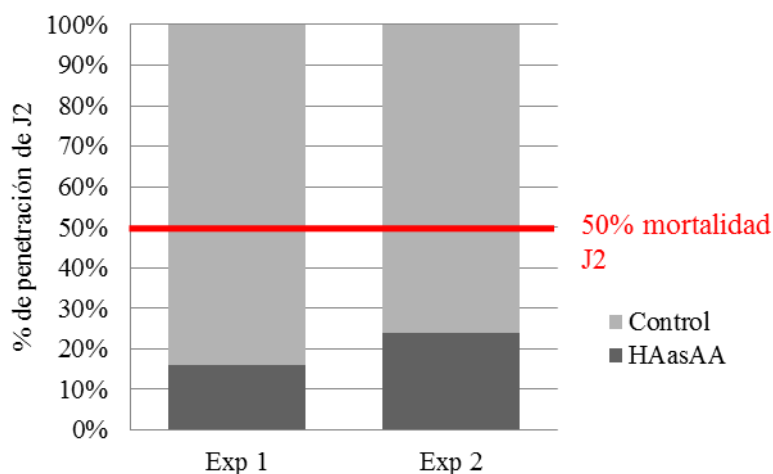
Dada la actividad nematocida del hidrolato de AasA y su disponibilidad, se evaluó su capacidad para inhibir la eclosión de masas de huevos. En la figura 63 se observa que no hay diferencias significativas entre las dinámicas de la eclosión de juveniles a partir de masas de huevos tratadas con el hidrolato de las no tratadas (control), de lo que se deduce que el hidrolato no afecta a la eclosión de juveniles infectivos de *M. javanica*. Estos resultados confirman que los J2 son más sensibles a los efectos del hidrolato que las masas de huevos (Andres et al. 2012).



**Fig. 63.** Número de huevos eclosionados. Día 0: después de la inmersión durante 7 días de las masas de huevos en el hidrolato HAasA.

También se han estudiado los efectos del hidrolato de HAasA sobre la capacidad infectiva de los nematodos. Para ello, se ha utilizado la concentración subletal de hidrolato (dilución del 74%) (Julio et al., 2017; Massuh et al., 2017). En la figura 64 se muestran los resultados de dos réplicas del ensayo experimental. Tal y como se puede observar, en ambos ensayos el tratamiento con el hidrolato produce una inhibición significativa (del 34% y 26%, con respecto al control) del número de nematodos que penetran en las raíces. Estos resultados indican que el hidrolato HAasA a una concentración subletal es capaz de alterar el comportamiento de los juveniles de *M. javanica* y suprimir significativamente la capacidad de infectar al hospedador.





**Fig. 64.** Acción del hidrolato HAasA a una dosis subletal del 50% sobre la capacidad infectiva de los juveniles de *M. javanica*. Las barras representan el porcentaje de juveniles presentes en el interior de las raíces con respecto al control.

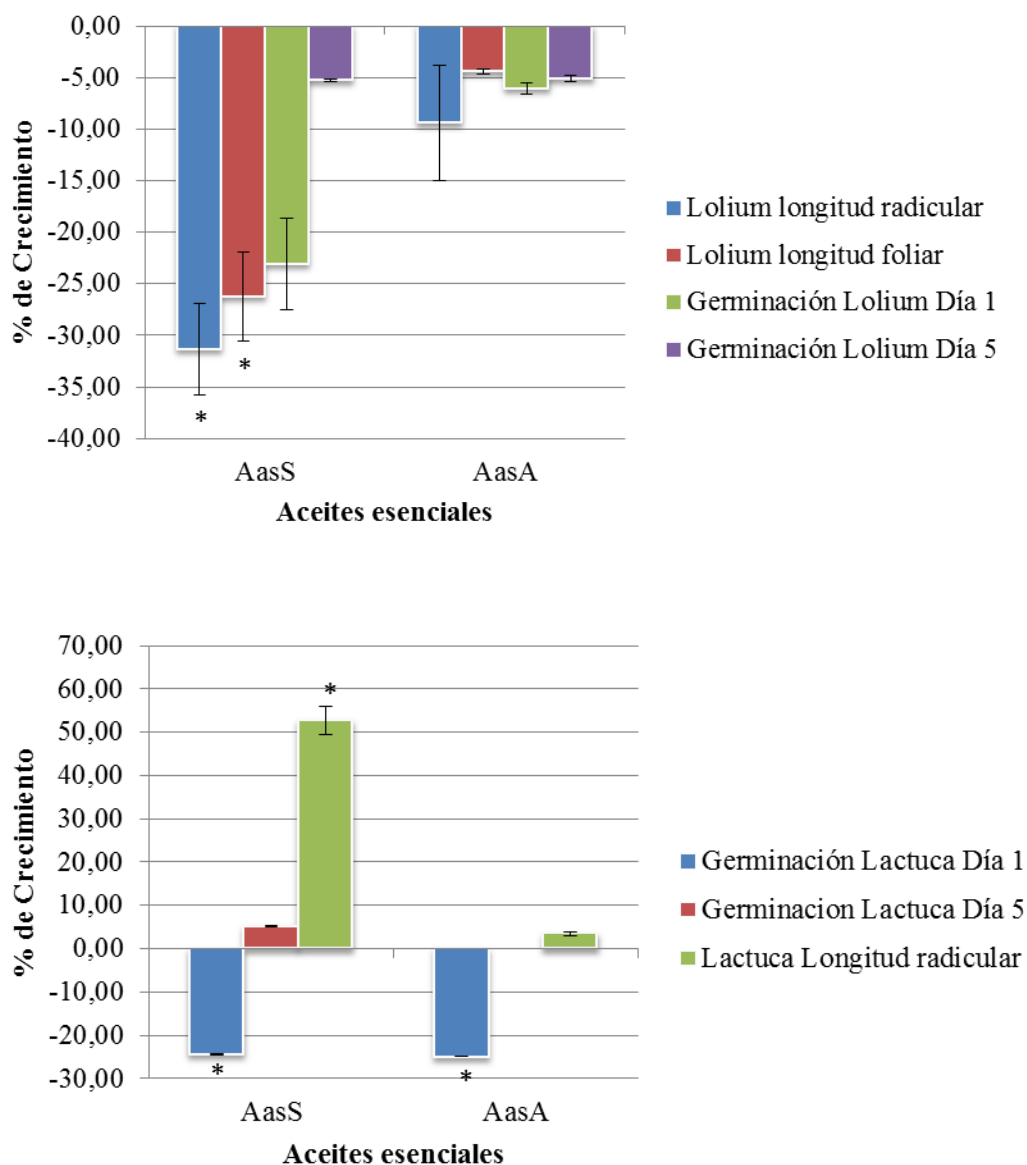
A partir de estos resultados se puede concluir que el hidrolato de *A. assoana* induce *in vitro* una fuerte mortalidad de los juveniles de *M. javanica*, aunque no es capaz de afectar a la eclosión de las masas de huevos. Así mismo hay que destacar los efectos sobre la capacidad infectiva de los juveniles a una dosis subletal. En el proceso de obtención del aceite esencial por arrastre de vapor se produce una extracción selectiva de compuestos polares que se disuelven en el agua residual y que son responsables de la actividad nematocida. Es necesario seguir investigando en la caracterización química de este hidrolato para determinar qué compuestos son los responsables de dicha actividad.

La actividad nematocida de este tipo de extractos acuosos está muy poco estudiada, aunque recientemente se han demostrado los fuertes efectos nematocidas de hidrolatos de distintas especies aromáticas como *A. absinthium*, lavandin, *Lavandula luisieri*, *Tagetes minuta*, *Thymus zygis* y *T. vulgaris* (Andres et al., 2017; Massuh et al., 2017; Julio et al., 2017). Por todo ello, se puede considerar a estos extractos como una nueva fuente de productos activos frente a nematodos fitopatógenos.

## **Fitotoxicidad e inhibición de germinación de esporas**

Los aceites esenciales tienen efectos alelopáticos que forman parte del mecanismo de defensa de las plantas. Recientemente se han descrito estos efectos para el AE de *Lavandula luisieri* y sus componentes (Julio et al., 2016). Estos efectos fitotóxicos podrían comprometer la posible aplicación de los mismos como agentes biocidas.

El estudio de los efectos fitotóxicos de los AEs de *A. assoana* frente a *Lolium perenne* y *Lactuca sativa* se muestra en la Fig. 65. El AE de *A. armeniaca* no se pudo evaluar por falta de disponibilidad. El aceite AaS promueve el crecimiento radicular de *L. sativa* (152,7%) mientras que AasA no afectó a ninguna de las dos dianas. El aceite AaS inhibe moderadamente el crecimiento radicular (-31,3%) y foliar (-26,2%) de *L. perenne*. A su vez, ambos AEs mostraron un efecto leve sobre la germinación que no perdura en el tiempo. Por tanto, los efectos fitotóxicos del AE de *A. assoana* (AaS > AasA) fueron moderados, afectando selectivamente al crecimiento radicular y foliar de la monocotiledónea *Lolium perenne*.

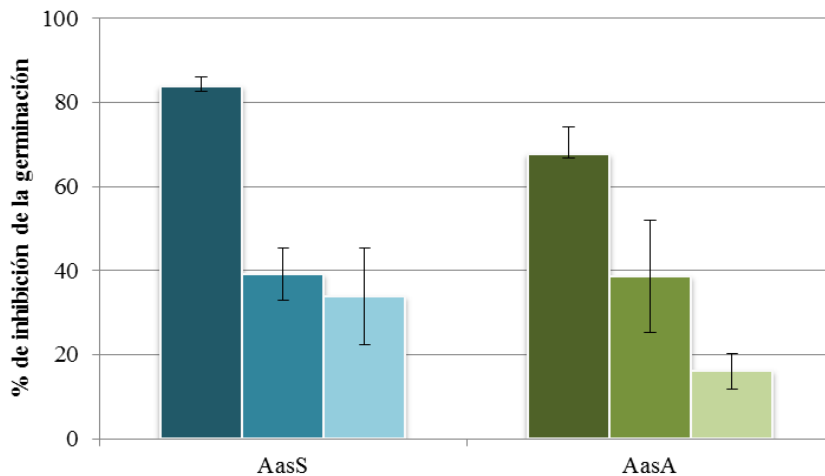


**Fig. 65.** Actividad fitotóxica de los AEs sobre la germinación y longitud radicular y foliar de *L. perenne* (arriba) y la germinación y longitud radicular de *L. sativa* (abajo) (% respecto al control; n=25; ensayos a 100µg/cm<sup>2</sup>). \* diferencia significativa respecto al control, p>0.05, Test LSD.

El hongo *Aspergillus niger* es capaz de crecer en numerosos sustratos orgánicos, afectando principalmente a la comida almacenada (Sharma y Tripathi 2008). Algunos aceites esenciales han mostrado efectos negativos sobre el

crecimiento del micelio y la germinación de esporas (Gemada et al., 2014). Un ejemplo de ello son los estudios realizados con nanoemulsiones de aceites esenciales de canela, limón y bergamota (Ribes et al., 2017).

En este contexto hemos ensayado los efectos de los AEs de las especies de *A. assoana* (no hubo disponibilidad de AE de *A. armeniaca*) sobre la germinación de esporas de *A. niger* (Fig. 66). El aceite con un mayor % de inhibición a la máxima concentración (800  $\mu\text{g/ml}$ ) fue AaS (83%). Los compuestos mayoritarios fueron ensayados, 1,8-cineol y alcanfor, así como una combinación de ellos con una proporción 1:1, y no mostraron actividad (datos no mostrados). Por lo que podemos concluir, que los compuestos mayoritarios no son los responsables de la inhibición de la germinación de las esporas.



**Fig. 66.** Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas frente a *A. niger* tras el tratamiento con los aceites esenciales a dosis de 800, 400 y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

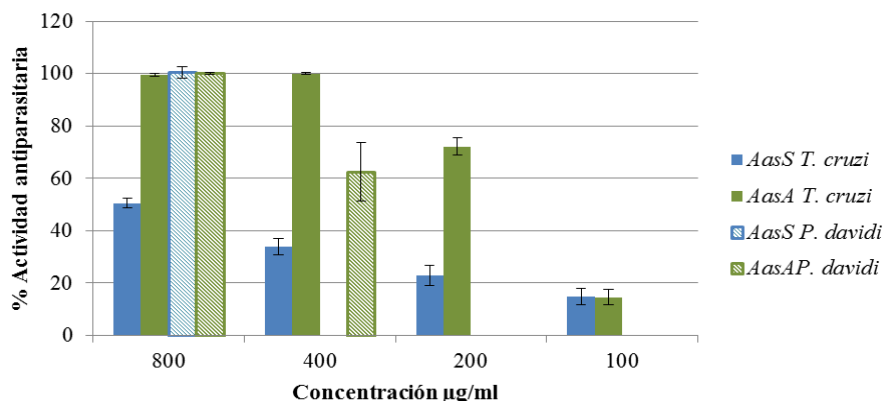
## Antiparasitaria

Los parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae son agentes de enfermedades humanas, animales y vegetales (Camargo, 1999). *Trypanosoma cruzi* es un protozoo responsable de la enfermedad de Chagas, uno de los problemas más graves de salud en América Latina. Esta infección también se ha registrado en otras áreas como América del Norte, Europa y Asia debido al flujo migratorio (OMS, 2016). Actualmente, el tratamiento de esta enfermedad se basa principalmente en dos fármacos: Benznidazol (BZ) y Nifurtimox (NFX), pero ambos tienen muchas desventajas: la efectividad varía con las etapas de la enfermedad y cepas de parásito, efectos secundarios indeseables y problemas en su producción y distribución (OMS, 2017). Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos agentes de control más seguros, fiables y eficientes para luchar contra esta enfermedad. En este sentido, está documentada la eficiencia de distintos AEs y sus componentes sobre este parásito (Martínez-Díaz et al., 2015; Guardo et al., 2017).

El género *Phytomonas* (descrito en el capítulo 4, sección 4.1) incluye todos los trypanosomatidos que parasitan las plantas transmitidos por insectos hemípteros (Teixeira et al., 1997). No hay ningún trabajo publicado sobre la actividad de aceites esenciales frente a *P. davidi*.

La actividad de los aceites de *A. assoana* frente a los parásitos *T. cruzi* y *P. davidi* se muestra en la figura 67. El aceite más activo frente a los dos trypanosomatidos es el de plantas cultivadas en aeroponía (AasA > AasS). *T. cruzi* resultó más sensible a la acción del AE que *P. davidi*, de forma similar a lo observado para los AEs de *Mentha rotundifolia*, *Hissopus officinalis*, *Thymus zygis* y *T. vulgaris* (capítulo 4), y que podría ser debido a diferencias evolutivas motivadas por los hospedadores ya que las plantas contienen metabolitos secundarios que no están presentes en los animales. Los compuestos 1,8-cineol y

alcanfor por separado y combinados no tuvieron efecto antiparasitario (datos no mostrados).



**Fig. 67.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *P. davidi* tratados con los aceites AasS y AasA a dosis de 800, 400, 200 y 100 µg/ml.

Muchos de los monoterpenos presentes en el aceite esencial de *A. assoana* han sido ensayados frente alguna de las fases del ciclo de *T. cruzi*. Generalmente en la búsqueda de antiparasitarios contra *T. cruzi* primero se evalúan los extractos/compuestos frente a la fase epimastigote, después frente a los tripomastigotes y finalmente frente a los amastigotes (Saeidnia y Reza Gohari, 2012). Los estudios realizados con *p*-cimeno frente a epimastigotes mostraron una actividad moderada (Saeidnia y Reza Gohari, 2012). El linalool, otro componente común en los aceites, es un monoterpeno alcohólico que no fue activo frente a *T. cruzi* (Mazzanti et al., 1998). El  $\alpha$ -pineno fue más activo que  $\beta$ -pineno frente a *T. brucei* (Pichersky y Gang, 2000; Dudareva et al., 2005), el sabineno también mostró una actividad moderada frente a *T. cruzi* (Harborne et al., 2009), se piensa que dicha actividad podría estar relacionada con el metileno exocíclico que poseen en su estructura. Todo ello hace que seguramente la actividad de estos aceites se deba a sinergismos entre los monoterpenos que lo componen. Los monoterpenos son compuestos volátiles, estructuralmente

simples, fáciles de sintetizar y modificar y por todo ello, son buenos candidatos para la búsqueda de antiparasitarios.

En resumen, las dos especies de *Artemisia* estudiadas producen aceite esencial (AE) con mayor rendimiento en el caso de *A. assoana* y dependiendo del tipo de cultivo (silvestre, S; cultivo en cámara, M; aeropónico, A). El aceite esencial de *A. assoana* se caracteriza por la presencia de 1,8-cineol y alcanfor, mientras que el de *A. armeniaca* se caracteriza por 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. El tipo de cultivo genera diferencias cuantitativas en la composición.

El efecto antialimentario frente a insectos (*Spodoptera littoralis* y *Myzus persicae*) observado para los AEs de *A. assoana* podría ser debido a la presencia de cineol y alcanfor, mientras que su efecto larvicida sobre la garrapata *Hyalomma lusitanicum* y citotóxico (línea celular IRE/CTVM20, AaS > AAs) se podría atribuir a una acción sinérgica de sus componentes. La actividad antialimentaria frente a pulgones del AE de *A. armeniaca* probablemente se deba a la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. Este AE no es ixodocida *in vivo* pero sí citotóxico (AarA > AarM), lo que sugiere un mecanismo de detoxificación del mismo por parte del ácaro.

Los extractos acuosos residuales de la obtención de aceite esencial de *A. assoana* fueron nematocidas (juveniles de *Meloidogyne javanica*) (AaS > AAs), sin afectar a las masas de huevos. Además, *in vivo* inhibieron la capacidad de los juveniles de invadir las raíces de tomate. Durante el proceso de obtención del aceite esencial por arrastre de vapor se produce una extracción selectiva de compuestos polares que se disuelven en el agua residual y que son responsables de la actividad nematocida.

Los efectos fitotóxicos del AE de *A. assoana* (AaS > AAs) fueron moderados, afectando selectivamente al crecimiento radicular y foliar de la

monocotiledónea *Lolium perenne*. Este aceite inhibió la germinación de las esporas de *Aspergillus niger* (AasS > AasA).

Los AEs de *A. assoana* fueron activos frente a los tripanosomatidos (*Trypanosoma cruzi* y *Phytomonas davidi*) (AasA > AasS). El parásito animal *T. cruzi* resultó más sensible a la acción del AE que el parásito vegetal *P. davidi*, lo que podría ser debido a diferencias evolutivas relacionadas con los hospedadores.

## 5.2 Extractos etanólicos

Los extractos etanólicos se obtuvieron a partir del material vegetal obtenido de cada especie de *Artemisia* mediante las distintas técnicas de cultivo ya descritas. Los rendimientos de cada extracción se muestran en la tabla 21. El mayor rendimiento de *Artemisia assoana* se obtuvo con el extracto de raíz transformada (35%) seguido de parte aérea aeropónica (16%). Las raíces transformadas mostraron una tasa rápida de crecimiento sin necesidad de la adición de fitohormonas, pérdida del geotropismo positivo (ageotropismo) y una gran ramificación lateral (Wahby et al., 2013), por lo que proponemos esta técnica de cultivo como óptima para esta especie.

**Tabla 21.** Rendimientos de los extractos de *A. assoana* (Aas) y *A. armeniaca* (Aar). Parte aérea silvestre (AS), aeropónica (AA) y maceta (AM), y raíz aeropónica (RA) y transformada (RT).

<i>Artemisia assoana</i>		<i>Artemisia armeniaca</i>	
Muestra	Rendimiento (% peso seco)	Muestra	Rendimiento (% peso seco)
AasAS	8,24	AarAM	14,45
AasAA	16,12	AarAA	19,97
AasRA	7,09	AarRA	8,15
AasRT	34,77	AarRT	27,21

El mayor rendimiento de extracto de parte aérea de *A. armeniaca* se obtuvo del cultivo aeropónico. Con las raíces el mayor rendimiento se obtuvo mediante cultivo *in vitro* de raíz transformada, pero en este caso no se adaptaron



igual de bien al crecimiento en placa Petri para su posterior cultivo en medio líquido, y la tasa de crecimiento fue menor. Por tanto, se propone la técnica del cultivo aeropónico como óptima para la producción de *A. armeniaca*.

A continuación se describen los resultados de los ensayos biológicos de los extractos etanólicos.

### Artrópodos (insectos y ácaros) y nematodos

**Tabla 22.** Actividad antialimentaria y nematicida de los extractos de *A. assoana* (Aas) y *A. armeniaca* (Aar) cultivadas en distintas condiciones

Extracto	<i>S. littoralis</i>	<i>L. decemlineata</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>M. javanaica</i>
	%FI <sup>a</sup> (DE <sub>50</sub> µg/cm <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>				% Mortalidad <sup>d</sup>
<b>AasAS</b>	84.1±5.9 15,8 (9,4-26,4)	94.2±4.9 1,40 (0,1-18,4)	56,3±9,1	38,2±8,2	4,7±0,9
<b>AasAA</b>	89.5±6.2 13,4 (5,9-30,5)	97,1±1,8	81.8±6.8 50,8 (38,7-66,8)	63,6±6,8	4,6±1,3
<b>AasRA</b>	34,4±13,7	n.e	31,1±10,9	62,9±7,6	4,3±0,8
<b>AasRT</b>	13,8±6,5	88.6±4.5 4,2 (1,2 - 14,4)	35,7±7,7	47,3±6,3	11,5±1,5
<b>AarAM</b>	81.3±9.2 30,1 (21,1-42,7)	91.5±3.9 3,9 (1,3-11,6)	88.79±3.29 11,8 (7,7-18,2)	94.2±2.8 0,8 (0,3-1,9)	0
<b>AarAA</b>	44,8±12,4	80.4±9.1 0,01 (0,00-1,4)	68,7±7,2	68,3±6,7	74,7±4,6
<b>AarRA</b>	10,8±6,8	92.7±3.3 7,9 (3,1-20,1)	72,0±6,6	64,2±6,4	74,4±0,9
<b>AarRT</b>	9,9±5,7	83.4±5.6 1,4 (0,1-13,2)	79,8±8,2 39,2 (27,0-56,7)	60,5±7,1	95,2±2,7 (1,0>DL <sub>50</sub> >0,5)

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación (*S. littoralis* y *L. decemlineata*) y del asentamiento (*M. persicae* y *R. padi*). Ensayados a 100µg/cm<sup>2</sup>. <sup>c</sup>DE<sub>50</sub>: dosis capaz de producir un 50% de actividad. <sup>d</sup>Porcentaje de mortalidad (n=100, dosis 1 mg/ml) corregido según Scheider-Orelli. n.e: no ensayado.

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos sobre los insectos *S. littoralis*, *L. decemlineata*, *M. persicae* y *R. padi*, y juveniles del nematodo *M. javanica*.

En todos los casos, el insecto más sensible a los efectos de los extractos fue el escarabajo de la patata (*L. decemlineata*). La actividad de los extractos varía según el método de producción de la planta, lo que indica que la concentración de los compuestos activos también varía. Los extractos de *A. assoana* fueron activos frente a *S. littoralis* (AasAS, AasAA) y *L. decemlineata* (todos). Los de *A. armeniaca* fueron activos con *S. littoralis* (AarAM), *L. decemlineata* (todos), *M. persicae* (AarAM>AarRT) y *R. padi* (AarAM), siendo esta especie mucho más activa que *A. assoana* sobre *L. decemlineata* y los pulgones (*M. persicae* y *R. padi*). El extracto de *A. armeniaca* fue el único activo frente al nematodo *M. javanica* (AarRT > AarAA, AarRA).

La mayoría de los estudios referentes a la actividad insecticida y/o antialimentaria de los extractos de *Artemisia* se han realizado con aceites esenciales, sin embargo existen referencias de extractos orgánicos (etanólicos, metanólicos, acuosos) de *Artemisia* activos frente a insectos. Concretamente de *A. absinthium* (Dane et al., 2016; González Coloma et al., 2012), *A. arboescens* (Creed et al., 2015); *A. granatensis* (Barrero et al., 2013); *A. molinieri* (Masotti et al., 2012) y *A. annua* (Maggi et al., 2005).

Estos extractos no han mostrado efectos larvicidas frente a *H. lusitanicum*. Estos datos también correlacionan con la baja citotoxicidad observada sobre la línea celular de *Ixodes ricinus* IRE/CTVM20 (Tabla 23).

**Tabla 23.** Actividad ixodicida de los extractos sobre larvas de *H. lusitanicum* (% mortalidad) y la línea celular de garrapatas IRE/CTVM20 (% de inhibición del crecimiento)  $\pm$  error estándar.

Extracto	<i>H. lusitanicum</i> <sup>a</sup>	IRE/CTVM20 <sup>b</sup>
AasAS	0,00	70,47 $\pm$ 1,3
AasAA	2,38 $\pm$ 1,8	74,05 $\pm$ 1,8
AasRA	39,51 $\pm$ 15,8	73,63 $\pm$ 2,6
AasRT	9,19 $\pm$ 3,0	73,73 $\pm$ 1,6
AarAM	6,67 $\pm$ 6,7	70,23 $\pm$ 3,8
AarAA	15,88 $\pm$ 10,2	64,99 $\pm$ 4,8
AarRA	2,99 $\pm$ 7,4	76,36 $\pm$ 2,2
AarRT	0,00	67,22 $\pm$ 1,5

<sup>a</sup>Porcentaje de mortalidad corregido de acuerdo con la fórmula de Scheider-Orelli's, ensayados a 40  $\mu$ g/mg de celulosa.  
<sup>b</sup>Ensayados a 800  $\mu$ g/ml.

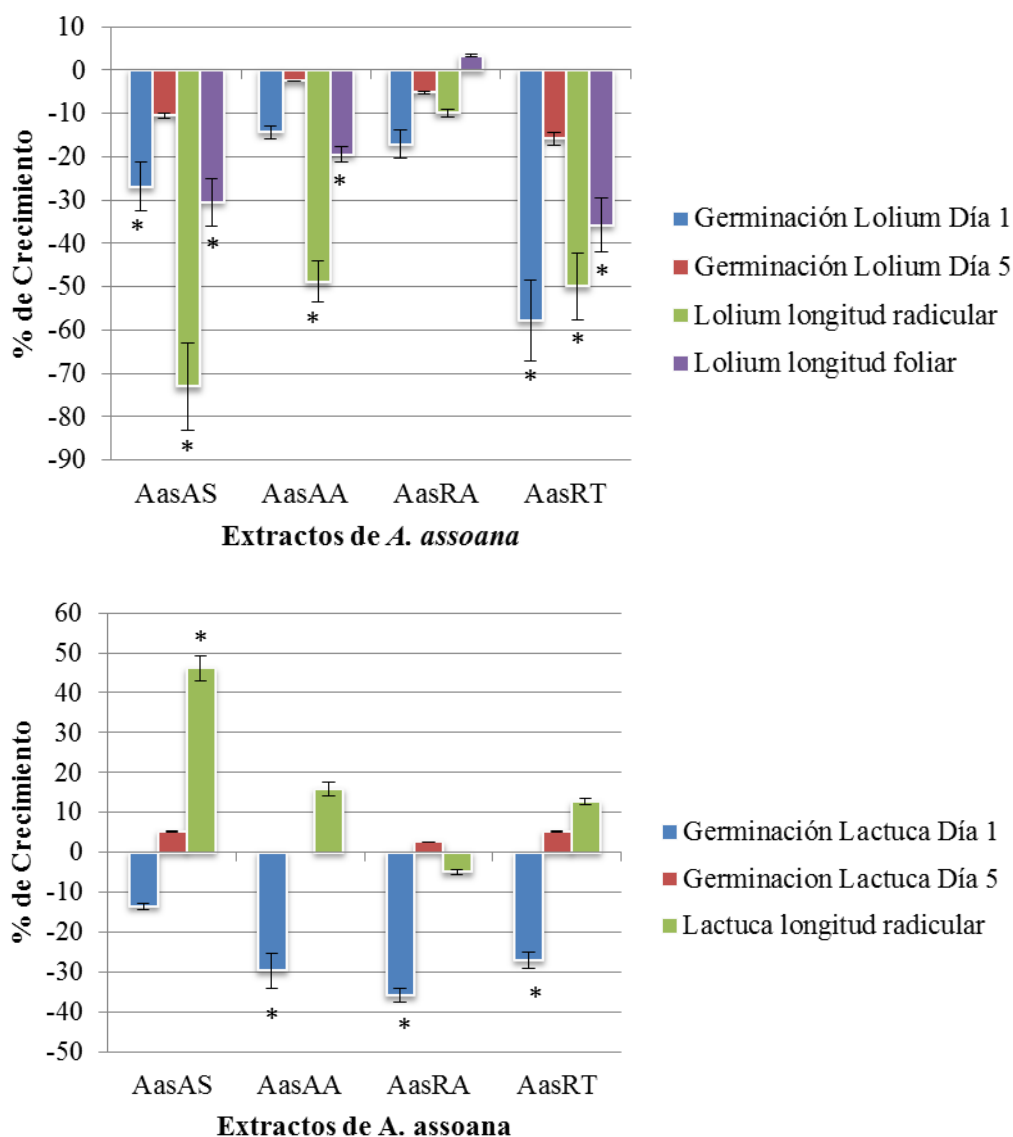
Por tanto, se puede concluir que los extractos etanólicos de *A. assoana* y *A. armeniaca* son antialimentarios efectivos frente a los insectos diana (*A. armeniaca* > *A. assoana*), siendo *L. decemlineata* la especie más sensible. Estos extractos no son ixodicidas y sólo el de raíz transformada de *A. armeniaca* es nematicida.

### Fitotoxicidad e inhibición de germinación de esporas

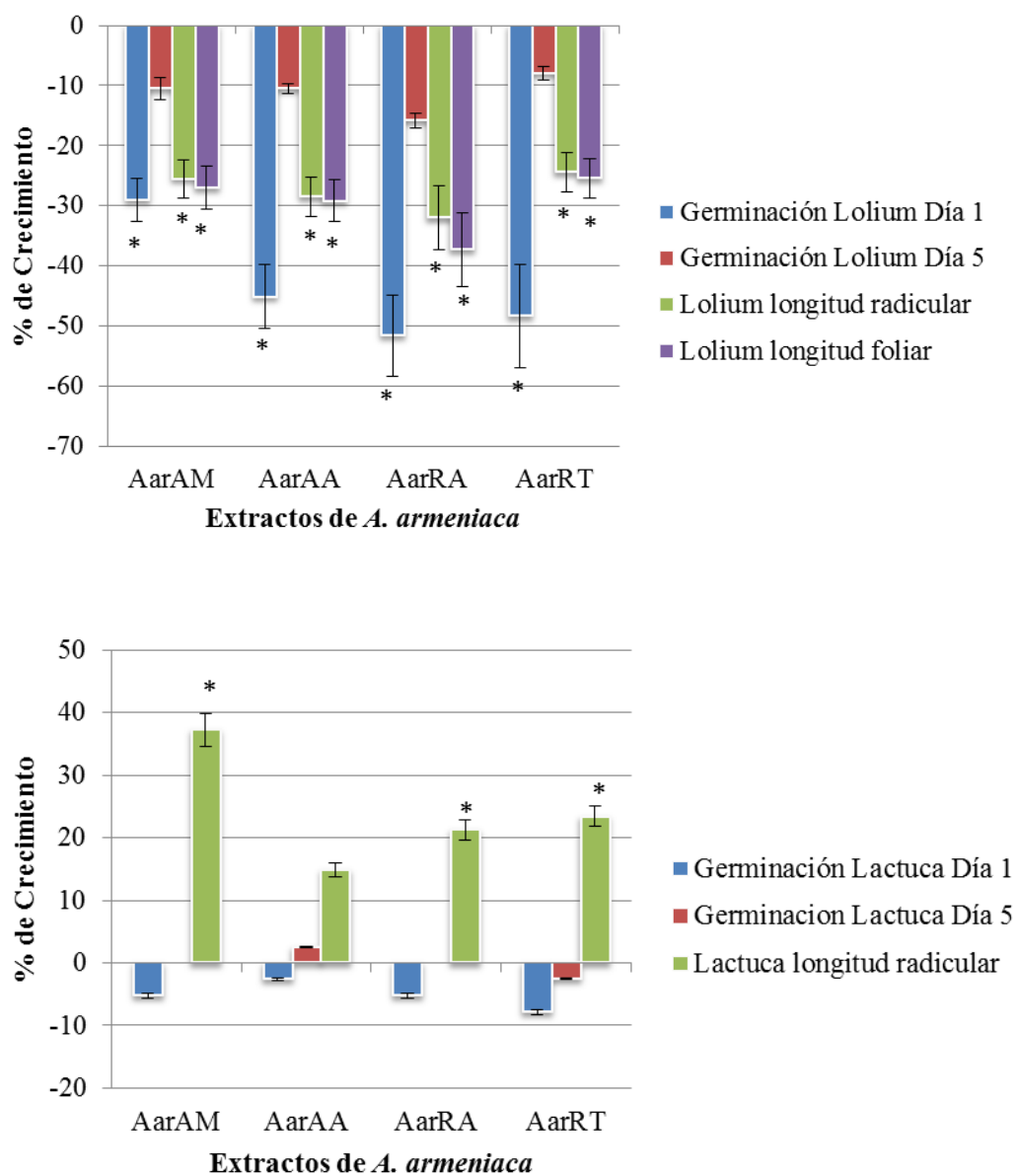
Los extractos etanólicos de *A. assoana* y *A. armeniaca* presentaron fitotoxicidad (Fig. 68 y Fig. 69), siendo estos efectos, en general, selectivos sobre *Lolium perenne*. Los efectos de los extractos sobre el crecimiento de *L. perenne* (*A. assoana* sobre crecimiento foliar y *A. armeniaca* sobre crecimiento radicular y foliar) fueron moderados (<40%) excepto para la inhibición del crecimiento radicular provocada por *A. assoana* (AasAS > AasAA > AasRA > AasRT). Se observó inhibición de la germinación a las 24h sobre *L. perenne* (AasRT > AasAS; AarRA, RT > AarAA, AM), desapareciendo al final del experimento.

Los extractos etanólicos de las especies de *Artemisia* estudiadas no inhibieron la germinación de esporas de *Aspergillus niger* a la máxima concentración ensayada (800µg/ml) (datos no mostrados). Por tanto, se puede concluir que al contrario que los aceites esenciales, los extractos etanólicos de *A. armeniaca* y *A. assoana* no tienen actividad antifúngica frente a *A. niger*.

Los efectos alelopáticos y fitotóxicos descritos para extractos de *Artemisia* incluyen supercríticos (*A. absinthium*) (Martín et al., 2011), etanólicos (*A. arborescens*, *A. judaica*) (Araniti et al., 2016; Zeng et al., 2009) y sobre todo acuosos (*A. afra*, *A. arborescens*, *A. absinthium*, *A. annua*, *A. vulgaris*) (Amman y Pieterse, 2005; Araniti et al., 2013; 2012; Corbu y Cachita-Cosma, 2009; Magiero et al., 2009; Pannacci et al., 2015). Además de forma similar a lo descrito anteriormente, estos efectos son potentes sobre especies de *Lolium* (*A. vulgaris* sobre *L. multiflorum*) (Pannacci et al., 2015), *A. absinthium* sobre *L. perenne* (Corbu and Cachita-Cosma, 2009; Martín et al., 2011); *A. afra* sobre *Lolium* sp. resistente y sensible a herbicida (Amman and Pieterse, 2005). Sin embargo, esta es la primera descripción de estos efectos para extractos de *A. assoana* y *A. armeniaca*.



**Fig. 68** Actividad fitotóxica de los extractos etanólicos de *A. assoana*, sobre la germinación y longitud foliar y radicular de *Lolium perenne* (arriba) y sobre la germinación y longitud radicular de *Lactuca sativa* (abajo) (n=25; 100µg/cm<sup>2</sup>). \* diferencia significativa respecto al control, p>0.05, Test LSD.



**Fig. 69.** Actividad fitotóxica de los extractos etanólicos de *A. armeniaca*, sobre la germinación y longitud foliar y radicular de *Lolium perenne* (arriba) y la germinación y longitud radicular de *Lactuca sativa* (abajo) (n=25; 100µg/cm<sup>2</sup>). \* diferencia significativa respecto al control, p>0.05, Test LSD.

## Antiparasitaria

Los extractos de *A. assoana* (todos) y *A. armeniaca* (raíz) fueron activos sobre *T. cruzi* (Tabla 24). De forma similar a lo observado para los aceites esenciales, *T. cruzi* fue más sensible a los extractos de *Artemisia* que *P. davidi*, a los que sólo afectaron extractos de raíz de ambas especies (AasRT, AarRA, AarRT). Esto puede ser debido a que *P. davidi* es un parásito de plantas que infecta la parte aérea de las mismas y no está en contacto con las raíces, de ahí esa mayor sensibilidad a los extractos de raíz.

No se han documentado estudios relativos a los efectos antiparasitarios de *A. assoana*. De *A. armeniaca*, se ha descrito la actividad citotóxica y los efectos sobre la apoptosis celular de fracciones de la parte aérea (Mojarrab et al., 2013). Posteriormente se evaluó la actividad antimalárica *in vitro* de extractos de la parte aérea de *A. armeniaca* mediante un ensayo que mide la formación de  $\beta$ -hematin, resultando ser el más activo el extracto de diclorometano (Mojarrab et al., 2014). Recientemente se ha publicado la actividad citotóxica de 3 cumarinas aisladas de la parte aérea, armenin, isoarmenin y desoxilacarol. Solo el armenin mostró actividad sobre una línea celular tumoral acompañada de una baja toxicidad sobre una línea celular humana normal (Mojarrab et al., 2017).

Por tanto, de acuerdo con la producción de biomasa y los rendimientos de los extractos, el método elegido para la producción biotecnológica de *A. assoana* fue el de cultivo *in vitro* de raíz transformada y el cultivo aeropónico para la producción de *A. armeniaca* parte aérea y raíz.

Los extractos de parte aérea de *A. assoana* tienen como actividad más destacada el efecto antialimentario de insectos (*S. littoralis* y *L. decemlineata* y *M. persicae*), la inhibición del crecimiento radicular de *L. perenne* (aérea > raíz) y la inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Los extractos de raíz

tuvieron efecto antialimentario (*L. decemlineata*), destacando la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* y *P. davidi*.

**Tabla 24.** Actividad *in vitro* de los extractos frente a *T. cruzi* y *P. davidi* expresado como porcentaje de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar.

Extractos	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>T. cruzi</i>	<i>P. davidi</i>
AasAS	800	<b>93,4<math>\pm</math>0,4</b>	16,3 $\pm$ 14,0
	400	41,5 $\pm$ 2,8	0,00
	200	17,0 $\pm$ 2,4	0,00
	100	10,3 $\pm$ 2,7	-
AasAA	800	<b>95,3<math>\pm</math>0,2</b>	0,00
	400	61,4 $\pm$ 7,0	0,00
	200	30,3 $\pm$ 1,7	0,00
	100	14,0 $\pm$ 0,6	-
AasRA	800	<b>88,5<math>\pm</math>8,7</b>	0,00
	400	24,6 $\pm$ 2,6	0,00
	200	13,0 $\pm$ 4,8	0,00
	100	21,5 $\pm$ 4,0	-
AasRT	800	<b>98,1<math>\pm</math>0,3</b>	<b>96,5<math>\pm</math>0,8</b>
	400	<b>95,7<math>\pm</math>1,0</b>	27,4 $\pm$ 30,7
	200	<b>64,0<math>\pm</math>2,0</b>	7,2 $\pm$ 3,6
	100	33,9 $\pm$ 2,3	-
AarAM	800	0,00	0,00
	400	0,00	0,00
	200	0,00	0,00
AarAA	800	0,00	0,00
	400	0,00	0,00
	200	0,00	0,00
AarRA	800	<b>92,9<math>\pm</math>1</b>	<b>91,5<math>\pm</math>0,8</b>
	400	<b>84,4<math>\pm</math>0,6</b>	0,00
	200	67,7 $\pm$ 3,7	0,00
	100	22,5 $\pm$ 7,4	0,00
AarRT	800	<b>86,5<math>\pm</math>0,5</b>	44,9 $\pm$ 5,8
	400	77,9 $\pm$ 1	0,00
	200	50,7 $\pm$ 4,6	0,00
	100	11,8 $\pm$ 4,4	0,00



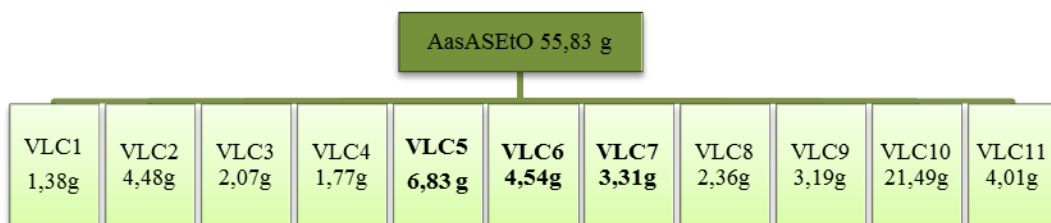
Los extractos de parte aérea de *A. armeniaca* se caracterizaron por su actividad antialimentaria (*L. decemlineata*, *M. persicae* y *R. padi*). Los extractos de raíz fueron antialimentarios (*L. decemlineata*, *M. persicae*, *R. padi*) y nematicidas, destacando sus efectos antiparasitarios (*T. cruzi*, *P. davidi*).

### 5.3 Fraccionamiento químico biodirigido de *A. assoana*

#### 5.3.1 Parte aérea

El material disponible de parte aérea de *A. assoana* fue el silvestre (AasAS). El material seco molido (884,32 g) se extrajo en Soxhlet con EtOH para dar 55.83 g (6.3 % de rendimiento). Este extracto se sometió a un fraccionamiento biodirigido mediante cromatografía VLC eluida con un gradiente de polaridad de n-Hexano:AcOEt, AcOEt:MeOH y CH<sub>3</sub>COOH:MeOH, obteniéndose 11 fracciones (esquema 1, tabla 25).

**Esquema 1:** Fraccionamiento del extracto etanólico de parte aérea de *A. assoana*.



**Tabla 25.** Fracciones obtenidas del extracto de AasAS, polaridad, porcentaje de los disolventes y rendimiento.

Fracciones	Polaridad	Porcentaje	Rendimiento
VLC1	n-Hex:AcOEt	100:0	2,49%
VLC2	n-Hex:AcOEt	90:10 – 80:20	14%
VLC3	n-Hex:AcOEt	80:20	17,60%
VLC4	n-Hex:AcOEt	70:30	4,02%
VLC5	n-Hex:AcOEt	50:50 – 20:80	13,27%
VLC6	n-Hex:AcOEt	20:80 – 0:100	8,83%
VLC7	AcOEt	100	6,35%
VLC8	AcOEt:MeOH	99:1 – 90:10	4,46%
VLC9	MeOH	100	6,25%
VLC10	MeOH	100	38,48%
VLC11	CH <sub>3</sub> COOH:MeOH	10:99	7,65%

Los extractos de parte aérea de *A. assoana* presentaron como actividades más destacadas el efecto antialimentario frente a insectos (*S. littoralis* y *L. decemlineata* y *M. persicae*), la inhibición del crecimiento radicular de *L. perenne* y la inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Por tanto, las fracciones se han ensayado frente a esas dianas (Tabla 26).

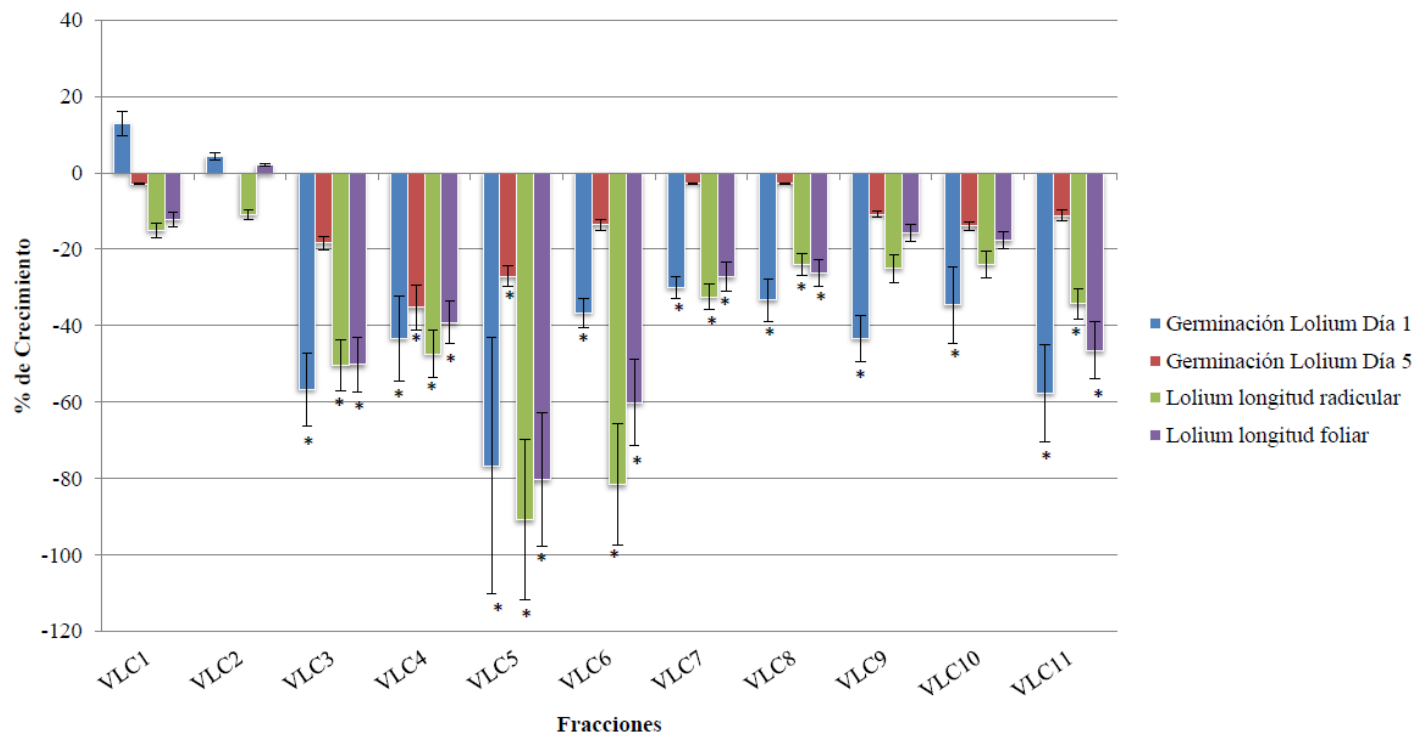
La fracción que presentó mayor actividad frente a *S. littoralis* y también fue muy activa frente a *L. decemlineata* fue la VLC5 sin observar efectos superiores al 75% de inhibición de asentamiento de *M. persicae*.

Las fracciones VLC3, 4, 5 y 6, inhiben el crecimiento radicular de *L. perenne*, siendo las VLC5 y 6 las más efectivas (> 50%) (Fig. 69). Estas fracciones también inhibieron el crecimiento foliar. También se observa una inhibición en el porcentaje de germinación de la fracción VLC 3 a la VLC11 (día 1) que en el caso de las fracciones VLC 4 y 5 se mantuvo hasta el final del ensayo (Fig. 70).

**Tabla 26.** Actividad antialimentaria e inhibición del asentamiento de las fracciones de la parte aérea de *A. assoana* (AS).

Fracciones	<i>S. littoralis</i> %FI <sup>a</sup>	<i>L. decemlineata</i> %FI <sup>a</sup>	<i>M. persicae</i> %SI <sup>b</sup>
AasVLC1	70,2±15,2	-	53,0±10,7
AasVLC2	55,2±16,7	-	51,0±9,5
AasVLC3	29,5±10,4	-	33,1±11,6
AasVLC4	22,8±16,6	-	63,0±7,8
AasVLC5	<b>82,4±7,4</b>	<b>79,7±11,2</b>	35,6±7,5
AasVLC6	31,7±10,3	71,6±13,1	40,9±7,5
AasVLC7	43,6±13,8	-	39,1±8,3
AasVLC8	41,0±13,6	-	48,7±8,2
AasVLC9	46,7±16,4	-	48,1±7,5
AasVLC10	33,4±7,5	-	25,8±10,3
AasVLC11	27,6±11,5	-	37,2±9,5

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. <sup>b</sup>Porcentaje de inhibición del asentamiento. Ensayados a 100 µg/cm<sup>2</sup>.



**Fig. 70.** Actividad de las fracciones de AasAS frente a *L. perenne* (n=25; 100µg/cm<sup>2</sup>). Porcentaje de germinación y crecimiento radicular y foliar. \* diferencia significativa respecto al control, p>0.05, Test LSD.

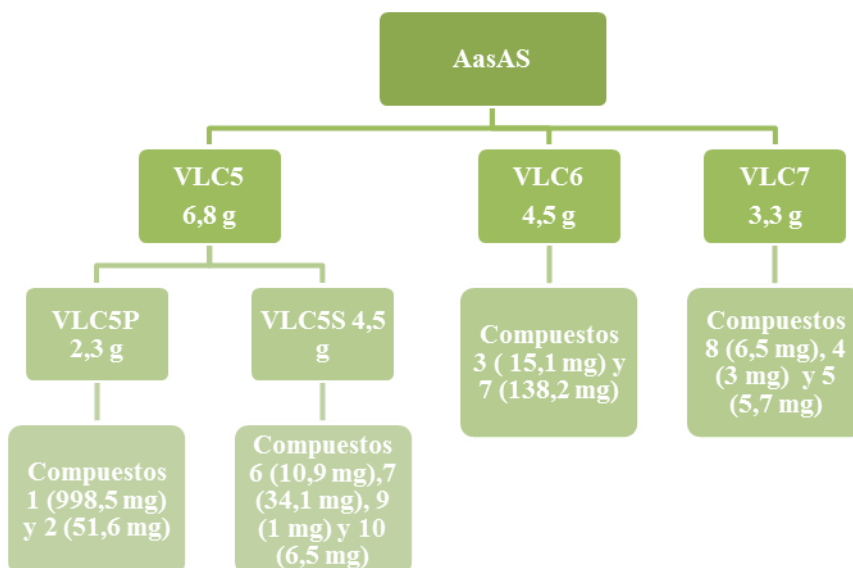
En la tabla 27 se muestra la actividad antiepipimastigote de las fracciones frente a *T. cruzi*. Las fracciones VLC7 y VLC8 fueron las más activas.

**Tabla 27.** Actividad antiparasitaria de las fracciones contra epimastigotes de *T. cruzi*. Datos mostrados como porcentaje de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar.

Fracciones	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>T. cruzi</i>
AasVLC1	100	3,0 $\pm$ 1,7
AasVLC2	100	1,4 $\pm$ 0,9
AasVLC3	100	3,0 $\pm$ 1,7
AasVLC4	100	-5,8 $\pm$ 1,0
AasVLC5	100	19,8 $\pm$ 4,7
AasVLC6	100	30,4 $\pm$ 1,6
AasVLC7	100	<b>98,8<math>\pm</math>0,3</b>
AasVLC8	100	<b>83,0<math>\pm</math>8,5</b>
AasVLC9	100	4,7 $\pm$ 1,0
AasVLC10	100	-9,7 $\pm$ 4,9
AasVLC11	100	-1,7 $\pm$ 3,5

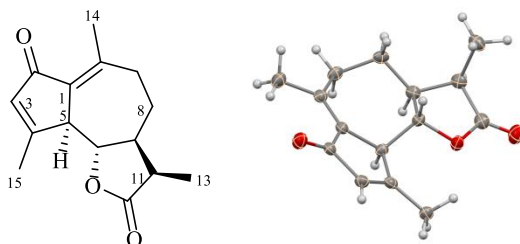
Por tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron las fracciones VLC5-7 para su estudio químico (Esquema 2)

**Esquema 2:** Fraccionamiento biodirigido de *A. asoana*.

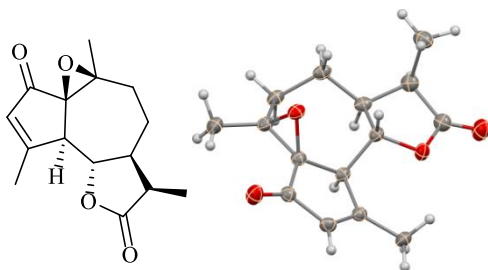


- ❖ VLC5: La fracción 5 precipitó y se dividió en sobrenadante 5S (4,5 g) y precipitado 5P (2,3 g) en la que el producto mayoritario cristalizó.
  - VLC5P (2,3 g): Mediante CC eluída con DCM:AcOEt 97:3-95:5 y HPLC preparativo eluído con DCM:AcOEt 98:2 se obtuvieron los compuestos **1** (998,5 mg; 1,78%) y **2** (51,6 mg; 0,10%).
  - VLC5S (4,5 g): Mediante dos cromatografías flash de media presión en DCM:Isopropanol 97:3 y DCM:AcOEt 90:10 y una cromatografía por HPLC en DCM:AcOEt 92:8 se obtuvieron los productos **9** (1 mg, 0,001%) y **10** (6,5 mg, rto: 0,011%). Por otro lado, una de las subfracciones obtenidas precipitó y se purificó el compuesto **7** (16,8 mg) por cristalización en n-Hex/ AcOEt. El resto se cromatografió mediante flash de media presión CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (0-10%) y HPLC eluído con DCM:AcOEt 95:5 aislando nuevamente el compuesto **7** (34,1 mg; 0,0061%) y el compuesto **6** (10,9 mg; 0,019%).
  
- ❖ VLC6 (4,5 g): Se fraccionó mediante cromatografía flash de media presión (5 cm de diámetro, 12 cm de longitud) eluída con una polaridad creciente de DCM:AcOEt 98:2 0:100%. De la fracción 5 (de un total de 11 fracciones) se obtuvo por CC de media presión (DCM:AcOEt 10-40%) el producto **3** (15,1 mg; 0,026%). También se aisló el producto **7**, presente en la VLC5 (138,2 mg; 0,24%).
  
- ❖ VLC7 (3,3 g): Se aisló el producto **8** (6,5 mg; 0,011%) mediante sucesivas columnas de media presión con un gradiente de polaridad de n-Hex:AcOEt (10-100%) y por HPLC eluído con n-Hex:AcOEt 50:50. A su vez mediante una cromatografía por HPLC (n-Hex:AcOEt 50-60%) de subfracciones se logró el aislamiento de los productos **4** (3 mg; 0,005%) y **5** (5,7 mg; 0,010%).

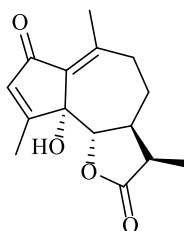
- **Achillín (1):** 3,6,9-trimetil-3,3 $\alpha$ ,4,5,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -hexahidroazuleno[4,5- $\beta$ ]furan-2,7-diona. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Marco et al., 1987.



- **1,10 $\beta$ -epoxiachillín (2).** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Marco et al., 1987.



- **5 $\alpha$ -hidroxiachillín (3).** Los datos de RMN de  $^1\text{H}$  coinciden con los publicados por Bohlmann et al., 1982. En esta memoria hemos asignado los datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  con el estudio de sus espectros de RMN 2D.



$[\alpha]_{\text{D}} = +25.9$  ( $c=0.22$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**IR (CHCl<sub>3</sub>) $\nu_{\text{máx}}$ :** 3307, 2919, 1777, 1771, 1666, 1613, 1419, 1215, 1141, 996, 898 cm<sup>-1</sup>.

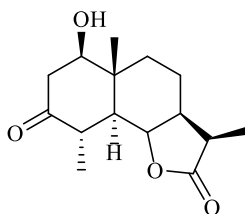
**EM  $m/z$  (int. rel.):** 262 [M]<sup>+</sup> (77), 261 (18), 216 (19), 201 (19), 190 (15), 189 (100), 173 (7), 163 (8), 135 (5), 123 (6), 95 (7), 93 (7).

**EMAR [M]<sup>+</sup>  $m/z$  :** 262.1195. Calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 262.1205.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz):**  $\delta_{\text{H}}$  6.11 (1H, d, J=1.6 Hz, H-3), 4.06 (1H, d, J=11.0 Hz, H-6), 3.22 (1H, m, H-7), 1.86 (1H, m, H-8 $\alpha$ ), 1.46 (1H, m, H-8 $\beta$ ), 2.91 (1H, t, J=12.8 Hz, H-9  $\alpha$ ), 2.15 (1H, ddd, J= 14.1, 6.1, 1.3 Hz, H-9 $\beta$ ), 2.68 (1H, quin, J=7.6 Hz, H-11), 1.13 (3H, d, J=7.9 Hz, H-13), 2.39 (3H, s, H-14), 2.26 (3H, d, J=1.3 Hz).

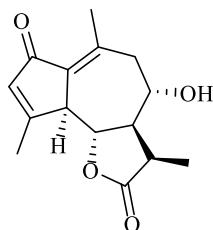
**<sup>13</sup>C RMN (125 MHz):**  $\delta_{\text{C}}$  134.0 (C-1), 194.0 (C-2), 135.1 (C-3), 171.6 (C-4), 79.7 (C-5), 85.3 (C-6), 42.8 (C-7), 24.8 (C-8), 35.3 (C-9), 155.5 (C-10), 39.1 (C-11), 178.5 (C-12), 9.8 (C-13), 22.2 (C-14), 15.6 (C-15).

- **Arsanina (4):** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Marco et al., 1997.





➤ **8 $\alpha$ -hidroxiachillín (5)**



$[\alpha]_D = +120.9$  (c=0.93, CHCl<sub>3</sub>)

**IR (CHCl<sub>3</sub>)**  $\nu_{\text{máx}}$ : 3492, 2904, 1783, 1769, 1681, 1645, 1618, 1258, 1204, 1064, 974, 935 cm<sup>-1</sup>

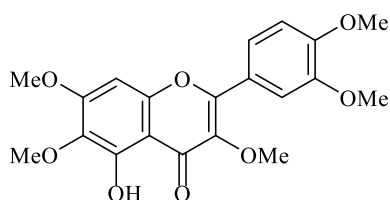
**EM**  $m/z$  (int. rel.): 262 [M]<sup>+</sup> (73), 262 (85), 189 (9), 188 (4)

**EMAR:**  $m/z$  [M]<sup>+</sup> 262.1208. Calculado para un C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 262.1208.

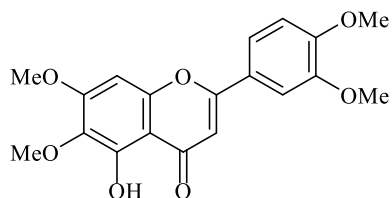
**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** Descrito en la tabla 35.

**<sup>13</sup>C RMN (125 MHz):** Descrito en la tabla 36.

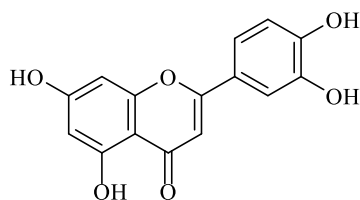
➤ **Artemetina (6).** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Li et al., 2007.



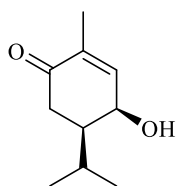
- **5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona (7).** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Li et al., 2007 y Sugiyama et al., 1993.



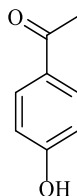
- **Luteolina (8).** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Lin et al., 2015.



- **(4R,3R)-3-hidroxipiperitona (9):** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Delort et al., 2015.



- **4-hidroxiacetofenona (10):** 1-(4-hidroxifenil)-etanona. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Ding, et al., 2000.



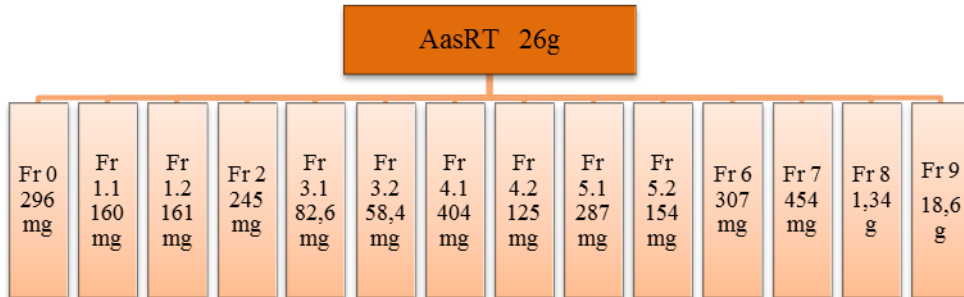
### 5.3.2 Raíz

El material vegetal seco (84,75 g) se obtuvo mediante cultivo *in vitro* de las raíces transformadas (Fig. 71) con *A. rhizogenes*, cuya extracción por Soxhlet con etanol generó un extracto (26 g; 30% de rendimiento) para estudio fitoquímico biodirigido. Su fraccionamiento mediante columna VLC eluída con una polaridad creciente de n-Hexano:AcOEt y AcOEt:MeOH resultó en 9 fracciones (Esquema 3, Tabla 28).



**Fig. 71.** Imagen del cultivo de raíces transformadas de *A. assona*.

**Esquema 3:** Fraccionamiento del extracto etanólico de raíz transformada de *A. assoana*.



**Tabla 28.** Fracciones obtenidas del extracto AasRT, polaridad, porcentaje de los disolventes y rendimiento.

Fracciones	Polaridad	Porcentaje	Rendimiento (%)
<b>Fr 0</b>	n-Hex:AcOEt	100:0	1,14
<b>Fr 1.1-1.2</b>	n-Hex:AcOEt	95:5	0,62
<b>Fr 2</b>	n-Hex:AcOEt	90:10	0,98
<b>Fr 3.1-3.2</b>	n-Hex:AcOEt	75:25	0,32-0,22
<b>Fr 4.1-4.2</b>	n-Hex:AcOEt	50:50	1,55-0,48
<b>Fr 5.1-5.2</b>	n-Hex:AcOEt	20:80	1,10-0,59
<b>Fr 6</b>	n-Hex:AcOEt	0:100	1,18
<b>Fr 7</b>	AcOEt: MeOH	95:5	1,75
<b>Fr 8</b>	AcOEt: MeOH	80:20	5,15
<b>Fr 9</b>	AcOEt: MeOH	100	71,6

La actividad más destacada de los extractos (sección 5.2) fue la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* y *P. davidi*.

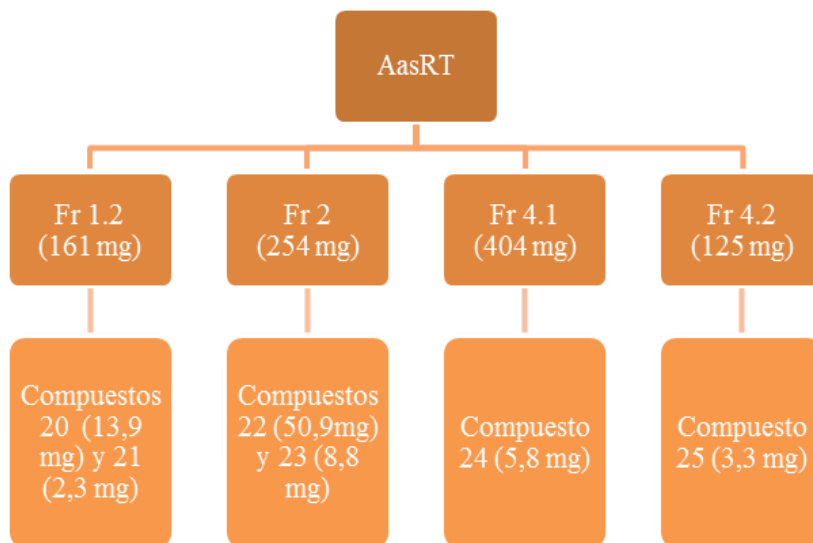
**Tabla 29.** Actividad de las fracciones frente a *T. cruzi* y *P. davidi*. Datos expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar.

Fracciones	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>T. cruzi</i>	<i>P. davidi</i>
Fr 1.1	100	0,0	0,0
Fr 1.2	100	<b>61,2<math>\pm</math>3,9</b>	53,6 $\pm$ 6,6
Fr 2	100	<b>98,9<math>\pm</math>0,6</b>	<b>70,5<math>\pm</math>7,0</b>
Fr 3.114	100	18,8 $\pm$ 2,4	5,0 $\pm$ 4,0
Fr 3.2	100	11,4 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 5,7
Fr 4.1	100	<b>88,7<math>\pm</math>4,8</b>	4,5 $\pm$ 4,9
Fr 4.2	100	<b>66,7<math>\pm</math>2,0</b>	5,7 $\pm$ 2,5
Fr 5.1	100	0,0	13,1 $\pm$ 4,6
Fr 5.2	100	12,6 $\pm$ 2,0	14,3 $\pm$ 4,5
Fr 6	100	0,0	1,1 $\pm$ 4,2
Fr 7	100	4,9 $\pm$ 2,3	2,9 $\pm$ 4,8
Fr 8	100	0,0	0,0
Fr 9	100	0,0	0,0

La actividad de las fracciones frente a *T. cruzi* y *P. davidi* se muestra en la tabla 29. Las fracciones 2 y 4.1 fueron las más activas seguidas de 1.2 y 4.2. La actividad de las fracciones concuerda con los resultados obtenidos para el extracto que también fue mayor frente a *T. cruzi*.

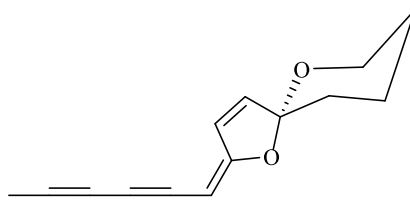
Por tanto, el fraccionamiento biodirigido se realizó en base al efecto antiparasitario frente a *T. cruzi*, y se cromatografiaron las fracciones Fr 1.2, 2, 4.1 y 4.2 (Esquema 4)

**Esquema 4:** Fraccionamiento biodirigido de la RT de *A. assoana*.

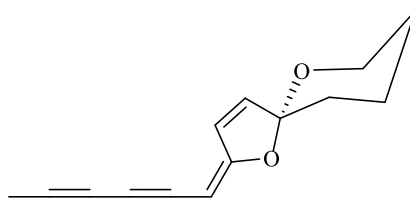


- ❖ Fr 1.2 (161 mg): Mediante CC (25x300) eluída con n-Hex:AcOEt 93:7 se obtuvieron los compuestos **20** (13,9 mg; 0,05%) y **21** (2,3 mg; 0,008%).
- ❖ Fr 2 (254 mg): Se fraccionó mediante una CC (25x300) (n-Hex:AcOEt 100:5; 100:10) para dar 11 fracciones. De la fracción 3 se aisló el compuesto **22**. La fracción 4 se cromatografió mediante CCF preparativa (n-Hex:AcOEt 92:8) y se obtuvo otra vez el compuesto **22** (total de 50,9 mg; 0,19%) y el **23** (8,8 mg; 0,03%).
- ❖ Fr 4.1 (404 mg): Se cromatografió mediante CC (25x300), con un gradiente de polaridad de n-Hex:AcEOt (90:10) hasta 100% AcOEt y se obtuvieron 9 fracciones. La fracción 5 se cromatografió mediante un HPLC con una polaridad de n-Hex:AcEOt (90:10) para dar el producto **24** (5,8 mg; 0,02%).
- ❖ Fr 4.2 (125 mg): Mediante cromatografía CC (25x300), con un gradiente de polaridad de n-Hex (100%) hasta AcEOt 100% se obtuvieron 10 fracciones. Se reunieron las fracciones 8 y 9 y por HPLC (n-Hex:AcEOt 80:20) se aisló el compuesto **25** (3,3 mg; 0,012%).

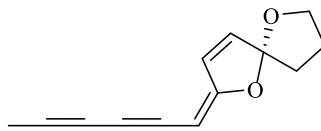
- **Compuesto (20):** (E)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.5]dec-3-eno. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Robertson y Naud, 2008.



- **Compuesto (21):** (Z)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.5]dec-3-eno. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Robertson y Naud, 2008.

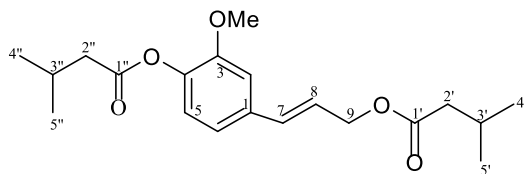


- **Compuesto (22):** (E)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-eno. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Martinez et al., 1987.

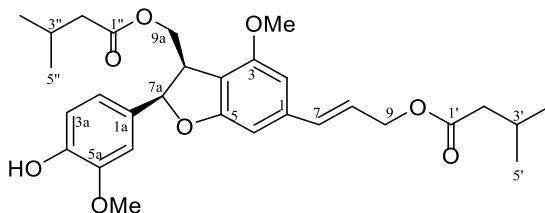


- **Compuesto (23):** (E)-3-(3-metoxi-4-(3-metilbutanoil)-fenil)-alil 3-metilbutanoato. Los datos de RMN de  $^1\text{H}$  coinciden con los publicados

por El Dahmy et al., 1985. En esta memoria hemos asignado los datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  con el estudio de sus espectros de RMN 2D (Tabla 30).



- **Compuesto (24):** (E)-3-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-metoxi-3-(((3-metilbutanoil)oxi)metil)-2,3-dihidrobenzofuran-6-il)alil 3-metilbutanoato. Los datos de RMN de  $^1\text{H}$  coinciden con los publicados por Bohlmann et al., 1986. En esta memoria hemos asignado los datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  con el estudio de sus espectros de RMN 2D (Tabla 30).





**Tabla 30: Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 23 y 24.**

Carbono	23	24	Carbono	23	24
1	135.2	130.5	1'	172.9	172.8
2	119.3	110.6	2'	43.4	43.2
3	151.2	144.4	3'	25.7	25.6
4	140.1	127.7	4'	22.4	22.3
5	122.9	148.2	5'	22.4	22.3
6	110.2	115.3	1''	171.0	172.9
7	133.5	134.2	2''	43.0	43.4
8	123.6	121.3	3''	25.9	25.7
9	64.6	64.9	4''	22.4	22.4
1a		132.2	5''	22.4	22.4
2a		108.6			
3a		114.3			
4a		145.9			
5a		146.7			
6a		119.6			
7a		88.8			
8a		50.4			
9a		65.0			
OMe	55.7	56.0			
OMe		56.9			

- **Compuesto (25):** se descompuso en el tubo de RMN antes de que pudiera completarse su estudio. Se trata de un derivado del alcohol coniferílico con varios grupos hidroxilo en su cadena lateral.

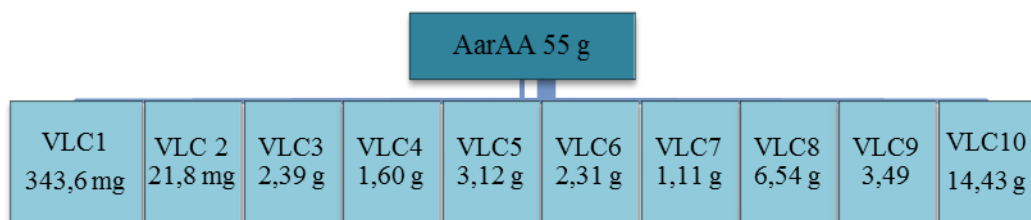
## 5.4 Fraccionamiento químico biodirigido de *A. armeniaca*

### 5.4.1 Parte aérea

Para el estudio fitoquímico de *A. armeniaca* se seleccionó como mejor método de cultivo el sistema aeróbico. El material vegetal seco y molido (505 g) se sometió a extracción con etanol en Soxhlet para dar 75 g de extracto (14 % de rendimiento).

El fraccionamiento se realizó mediante cromatografía VLC (55 g de extracto) eluida con polaridades crecientes de n-Hexano:AcOEt y AcOEt:MeOH para dar 10 fracciones (Esquema 5, Tabla 31).

**Esquema 5:** Fraccionamiento del extracto etanólico de la parte aérea de *A. armeniaca*.



**Tabla 31.** Fracciones obtenidas del extracto de AarAA, polaridad y porcentaje de los disolventes y rendimiento.

Fracciones	Polaridad	Porcentaje	Rendimiento (%)
ArVLC1	n-hex:AcOEt	100:0	0,62
ArVLC2	n-hex:AcOEt	95:5 - 90:10	0,04
ArVLC3	n-hex:AcOEt	80:20	4,35
ArVLC4	n-hex:AcOEt	70:30	2,91
ArVLC5	n-hex:AcOEt	70:30	5,68
ArVLC6	n-hex:AcOEt	50:50 - 20:80	4,22
ArVLC7	n-hex:AcOEt	20:80	2,04
ArVLC8	n-hex:AcOEt	0:100	11,90
ArVLC9	AcOEt: MeOH	99:1 - 90:10	6,35
ArVLC10	AcOEt: MeOH	0:100	26,2

Los extractos de parte aérea de *A. armeniaca* se caracterizaron por su actividad antialimentaria, por tanto las fracciones se ensayaron con los insectos diana. Debido al bajo peso, rendimiento y su aspecto por CCF las fracciones VLC1 y 2 no se ensayaron.

Los resultados mostrados en la tabla 32, indican que la actividad frente a *S. littoralis* se encuentra localizada en las fracciones 7 y 8. La actividad sobre los áfidos (moderada) se localiza en la fracción 6 y 8.

**Tabla 32.** Actividad antialimentaria e inhibición del asentamiento de las fracciones

Fracciones	<i>S. littoralis</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
	%FI <sup>a</sup>	%SI <sup>b</sup>	
<b>AarVLC3</b>	20,2±13,4	34,3±7,3	59,0±5,9
<b>AarVLC4</b>	13,1±7,4	56,4±11,2	39,4±7,1
<b>AarVLC5</b>	31,3±15,1	52,3±9,6	37,7±7,1
<b>AarVLC6</b>	39,7±14,8	70,5±7,7	44,8±7,8
<b>AarVLC7</b>	<b>81,1±13,9</b>	59,7±9,0	24,2±6,2
<b>AarVLC8</b>	<b>93,8±3,0</b>	67,8±8,6	37,1±7,0
<b>AarVLC9</b>	44,9±14,5	39,5±8,4	44,7±7,5
<b>AarVLC10</b>	48,9±7,3	46,7±9,1	61,0±8,1

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. <sup>b</sup>Porcentaje de inhibición del asentamiento. Ensayados a 100µg/cm<sup>2</sup>.

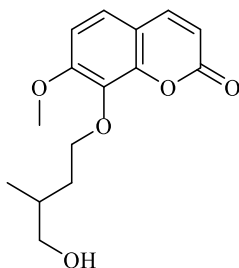
Tras observar los rendimientos de las fracciones obtenidas y la actividad se selecciona la fracción VLC8 para continuar con el fraccionamiento biodirigido (Esquema 6).

**Esquema 6:** Esquema del fraccionamiento biodirigido de la fracción seleccionada.

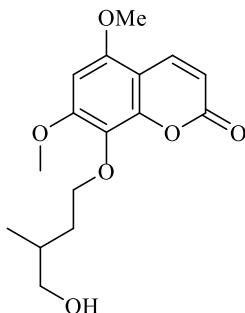


- ❖ VLC 8 (6,5 g): Mediante cromatografía Flash de media presión (5 cm de diámetro, 12 cm de longitud) eluída con n-hexano:AcOEt:MeOH 40:60:0,33 se obtuvieron 10 fracciones. La fracción 6 se cromatografió usando la misma columna y polaridad y se obtuvieron los productos **26** (227,7; 0,50%) y **27** (79,2 mg; 0,14%).

- **Desoxilacarol (26):** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Szabó et al., 1985.



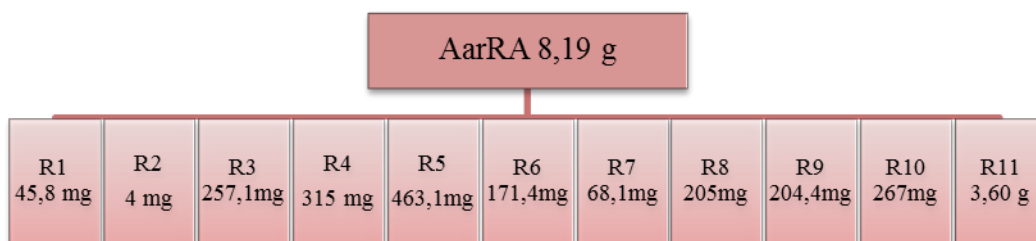
- **Metil-lacarol (27):** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Szabó et al., 1985.



## 5.4.2 Raíz

El material vegetal se obtuvo mediante cultivo aeropónico (157 g de material seco molido) cuya extracción por Soxhlet en etanol generó un extracto (8,19 g, 5,46% de rendimiento) que se fraccionó mediante columna VLC eluida con polaridades crecientes de n-Hexano:AcOEt y AcOEt:MeOH para dar 11 fracciones (Esquema 7, Tabla 33).

**Esquema 7:** Fraccionamiento del extracto de raíz aeropónica de *A. armeniaca*.



**Tabla 33.** Fracciones obtenidas del extracto de AarRA, polaridad, porcentaje de los disolventes y rendimiento.

Fracciones	Polaridad	Porcentaje	Rendimiento (%)
R1	n-hex:AcOEt	100:0	0,56
R2	n-hex:AcOEt	100:0	0,04
R3	n-hex:AcOEt	95:5	3,14
R4	n-hex:AcOEt	90:10	3,84
R5	n-hex:AcOEt	80:20	5,65
R6	n-hex:AcOEt	60:40	2,96
R7	n-hex:AcOEt	60:40 - 40:60	1,22
R8	n-hex:AcOEt	40:60 - 0:100	2,50
R9	n-hex:AcOEt - AcOEt: MeOH	0:100 - 99:1	2,49
R10	AcOEt: MeOH	90:10	3,26
R11	AcOEt: MeOH	0:100	43,93

Los extractos de raíz de *A. armeniaca* tuvieron actividad antialimentaria (*L. decemlineata*, *M. persicae*, *R. padi*) y nematicida, destacando sus efectos antiparasitarios (*T. cruzi*, *P. davidi*). Por tanto, la actividad de las fracciones se ha seguido mediante efectos sobre el asentamiento de áfidos, sobre el nematodo (Tabla 34) y antiparasitarios (Tabla 35). Las fracciones activas frente a los pulgones fueron R5,6, 9 y 10. Las fracciones R7 y R8 mostraron una fuerte actividad nematicida (Tabla 34).

**Tabla 34.** Actividad insecticida y nematicida de las fracciones de la raíz de *A. armeniaca*.

Fracciones	%FI <sup>a</sup>		% Mortalidad <sup>b</sup>
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>M. javanica</i>
<b>R3</b>	47,5±8,6	50,7±8,4	8,9±1,7
<b>R4</b>	54,9±7,5	74,4±5,3	14,6±4,0
<b>R5</b>	<b>89,0±2,5</b>	70,3±6,6	15,6±1,6
<b>R6</b>	<b>82,2±5,7</b>	<b>80,3±7,0</b>	31,1±2,8
<b>R7</b>	66,2±7,5	59,3±7,6	<b>98,1±1,5</b>
<b>R8</b>	65,4±7,5	54,9±6,4	<b>100±0</b>
<b>R9</b>	81,7±5,9	73,4±4,2	30,9±6,2
<b>R10</b>	77,5±5,3	<b>88,0±3,1</b>	n.e
<b>R11</b>	73,4±5,6	58,5±8,6	n.e

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición del asentamiento a 100 µg/cm<sup>2</sup>. <sup>b</sup> Porcentaje de mortalidad corregido según la fórmula de Scheider-Orelli's. (n=100), ensayados a ( 1 mg/ml)

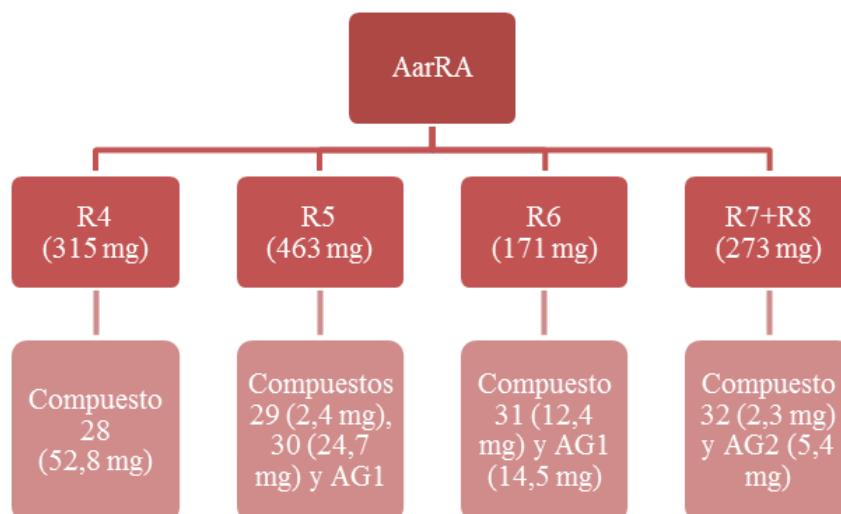
Los ensayos antiparasitarios mostraron que la actividad frente a *T. cruzi* se localiza en las fracciones R4-7. La única fracción activa frente a *P. davidi* fue R4. Los resultados concuerdan con lo obtenido en los ensayos con los extractos, donde se observó que *T. cruzi* es más sensible que *P. davidi* (Tabla 35).

**Tabla 35.** Actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* y *P. davidi* de las fracciones de raíz de *A. armeniaca* (Ensayadas a 100 µg/ml)

Fracciones	% Inhibición del crecimiento	
	<i>T. cruzi</i>	<i>P. davidi</i>
<b>R3</b>	4,2±3,3	0
<b>R4</b>	<b>100</b>	<b>98,5±0,3</b>
<b>R5</b>	<b>100</b>	0
<b>R6</b>	<b>100</b>	41,8±12,0
<b>R7</b>	<b>69,1±2,6</b>	0
<b>R8</b>	28,2±2,6	0
<b>R9</b>	50,0±5,2	0
<b>R10</b>	17,4±5,7	-13,8±5,2
<b>R11</b>	-10,4±2,0	0,7±0,9

Teniendo en cuenta los resultados de actividad y los rendimientos se seleccionaron las fracciones R4-8 para fraccionamiento biodirigido (Esquema 8).

**Esquema 8:** Esquema del fraccionamiento biodirigido de la raíz aeropónica de *A. armeniaca*.

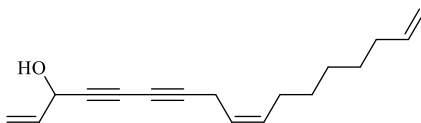


- ❖ R4 (315 mg): Se realizó una flash de media presión con una mezcla isocrática de n-Hex-AcEOt 97:3 y se aisló el compuesto **28** (51,8 mg).

Posteriormente debido a la degradación del compuesto **28**, una fracción posterior que lo contenía se cromatografió por HPLC (n-Hex:AcEOt 90:5) y se obtuvo nuevamente (1mg; 0,64%).

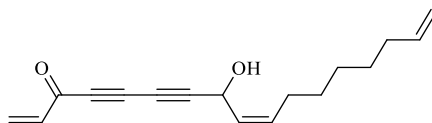
- ❖ R5 (463 mg): Se cromatografió mediante CC (25x300), con un gradiente de polaridad de n-Hex:AcEOt (97:3; 80:20) para dar 7 fracciones. La fracción 3 se fraccionó en una cromatografía por HPLC y una polaridad de n-Hex:AcEOt 90:10. Así, se aislaron los compuestos **29** (2,4 mg; 0,02%) y **30** (24,7 mg; 0,30%), además de un **AG1** (14,5 mg).
- ❖ R6 (171 mg): La fracción R6 se fraccionó por HPLC (n-Hex:AcEOt 80:20) obteniendo 9 fracciones. Se volvió a aislar **AG1** (64,8 mg; 0,96 %) de la fracción R5. Mediante una CCF preparativa (n-Hex:AcEOt 85:15) de la reunión de las fracciones 4 y 5 se obtuvo el compuesto **31** (12,4 mg; 0,15%).
- ❖ R7+R8 (273 mg): Se reunieron las fracciones R7 y R8 por similitud y se realizó una flash de media presión (25x300) con un gradiente de polaridad de n-Hex (100%) hasta el 100% de AcEOt, obteniendo 9 fracciones. Se reunieron las fracciones 2 y 3 que se purificaron por HPLC (n-Hex:AcEOt 88:12) aislando un ácido graso **AG2** (5,4 mg; 0,06%). La fracción 4 se cromatografió por HPLC usando la misma polaridad y se obtuvo el compuesto **32** (2,3 mg; 0,02%).

- **Compuesto (28):** (Z)-heptadeca-1,9,16-trien-4,6-diin-8-ol. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Wang et al., 1990 y Bernart et al., 1996.

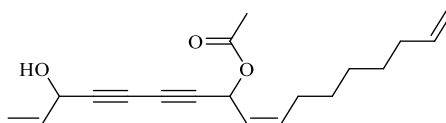




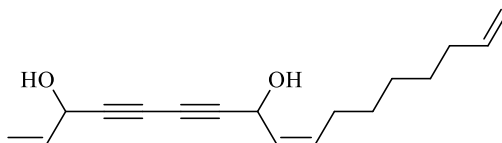
- **Compuesto (29):** (Z)-8-hidroxiheptadeca-1,9,16-trien-4,6-diin-3-ona. Los datos espectroscópicos coinciden con los de Bohlmann y Fritz, 1978.



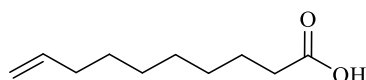
- **8-acetato-dehidrofalcarindiol (30):** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Bohlmann y Fritz, 1978 ( $^1\text{H}$ ) y Dawid et al., 2015 ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).



- **3,8-dehidrofalcarindiol (31).** Los datos espectroscópicos coinciden con los publicados por Stavri et al., 2005.



- **Ácido-9-decenoico (32).** Los datos espectroscópicos coinciden con los de Qiu et al., 2012.



## **5.5. Derivados estructurales de achillin (1)**

Con el objetivo de obtener nuevos derivados estructurales del compuesto mayoritario de *A. assoana* y estudiar su relación estructura–actividad, realizamos transformaciones microbiológicas del achillín (1) con cepas de hongos endófitos y se prepararon derivados semisintéticos mediante diferentes reacciones químicas.

### **5.5.1 Biotransformación de achillin (1)**

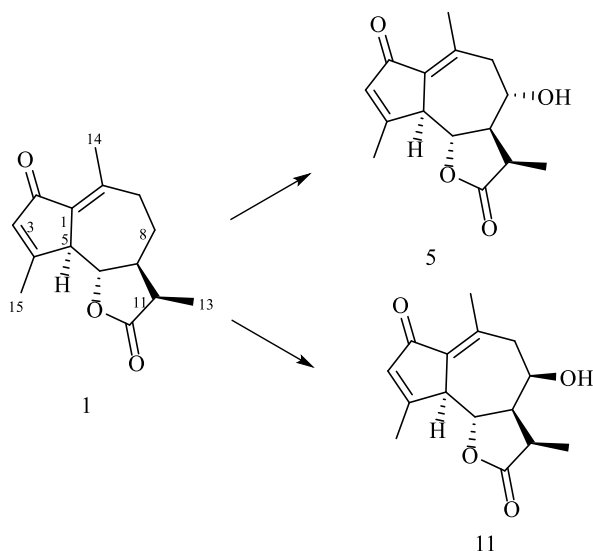
Las biotransformaciones son procesos en los que se hace uso de sistemas biológicos (animales, vegetales, microorganismos o enzimas) para producir modificaciones químicas en compuestos que no son sus sustratos naturales. Las más estudiadas y empleadas en la industria, en la obtención de compuestos de interés biológico son las transformaciones microbiológicas con hongos, debido a su amplia diversidad y fácil acceso.

Las reacciones más frecuentes son las hidroxilaciones, oxidaciones, reducciones, glicosilaciones, esterificaciones y epoxidaciones; las cuales son posibles gracias a las enzimas que de forma natural emplean los microorganismos para catalizar sus reacciones metabólicas. Éstas se pueden llevar a cabo empleando el organismo completo o bien sus enzimas aisladas, aunque es mucho más eficiente y rentable el uso del organismo íntegro, al mantenerse sus estructuras enzimáticas en su conformación natural y con disponibilidad de los cofactores necesarios. Las reacciones enzimáticas mediadas por microorganismos tienen la capacidad de introducir nuevos grupos funcionales sobre carbonos químicamente inactivos en un solo paso de reacción, y llevar a cabo reacciones regio, estereo y quimioselectivas de compuestos, que no son fáciles de lograr mediante conversiones químicas convencionales. Estas biotransformaciones han demostrado ser una alternativa eficiente a los métodos químicos para generar diversidad química ya que son reacciones sostenibles que tienen lugar en medio

acuoso, bajo condiciones muy suaves, en lo que se conoce como química verde (Shah et al., 2014).

### Biotransformación con el hongo *Loratospora* sp. (H 16)

Después de la biotransformación del achillín (**1**) con **H16**, como se describe en la parte experimental de esta memoria, se obtuvo un extracto crudo de 553 mg. En la cromatografía en CC (n-Hex:AcEOt 60:40 al 100% AcEOt) del extracto y posterior purificación por HPLC (n-Hex:AcEOt 50:50) se aislaron dos compuestos (Fig. 72).



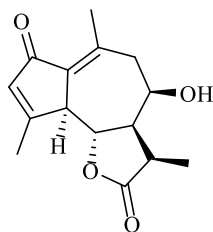
**Fig. 72** Esquema de biotransformación de (**1**) con H16

El compuesto (**11**), de más baja polaridad, mostró en su espectro de masas de alta resolución el ión molecular a 262.1200  $m/z$ , correspondiente a la fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_4$ , indicativo de la introducción de un nuevo oxígeno en la molécula del sustrato **1** durante la incubación con el hongo H16. Este oxígeno debe formar parte de un grupo hidroxilo secundario, ya que el espectro de  $^1H$ -RMN (Tabla 36) muestra, en comparación con el achillín (**1**), una nueva señal

como un triplete ancho a 3.81  $\delta$  que es indicativa de un protón geminal a un grupo hidroxilo en C-8. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Tabla 37), se puede apreciar un nuevo doblete a 75.9 $\delta$  y desplazamientos químicos de C-6, C-7, C-9, y C-13, en comparación con los correspondientes carbonos del sustrato. Estos datos fueron confirmados por el estudio de los espectros de RMN bidimensionales. La estereoquímica  $\beta$  del hidroxilo sobre C-8, se asignó en base a los datos del experimento NOESY, donde se no se observaron efectos NOE de H-8 con H-6 $\beta$ . Este compuesto se identificó como el 8 $\beta$ -hidroxi-achillín (**11**) (1,3 mg, 0,2%) aislado anteriormente de *Achillea shischkinii* (Ulubelen et al., 1988). Ahora, utilizando RMN 2D hemos completado sus datos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

El segundo producto obtenido de esta biotransformación se identificó como el 8 $\alpha$ -hidroxi-achillín (**5**) (25,1 mg; 4,5%), un isómero del producto anterior ( $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ). La principal diferencia en su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 36) es la señal del hidrógeno geminal al grupo OH que aparece a 3.73  $\delta$  (td,  $J=10.6, 2.5$  Hz). Además, se observa el efecto de este grupo sobre las señales correspondientes a H-11, H-9 $\alpha$  y el metilo H-13 que se han desplazado a campo bajo. Asimismo, en el experimento NOESY se observaron las correlaciones de H-8 con H-6 y H-13. Este compuesto había sido aislado de *Achillea sibirica* (Kaneko et al., 1971) y en este trabajo de la parte aérea de *A. assona*, asignando sus datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (tabla 37) con sus espectros bidimensionales HSQC y HMBC.

➤ **8β-hidroxi-achillín (11)**



$[\alpha]_D = +10.7$  (c= 0.13, CHCl<sub>3</sub>)

**IR (CHCl<sub>3</sub>)**  $\nu_{\text{máx}}$ : 3372, 2924, 2854, 1775, 1751, 1701, 1686, 1560, 1560, 1543, 1459, 1375, 976, 772 cm<sup>-1</sup>.

**EM**  $m/z$  (int. rel.): 262 [M]<sup>+</sup> (100), 244 (17), 229 (5), 189 (13), 173 (18), 171 (17), 160 (10), 159 (17), 147 (29), 136 (26), 122 (14).

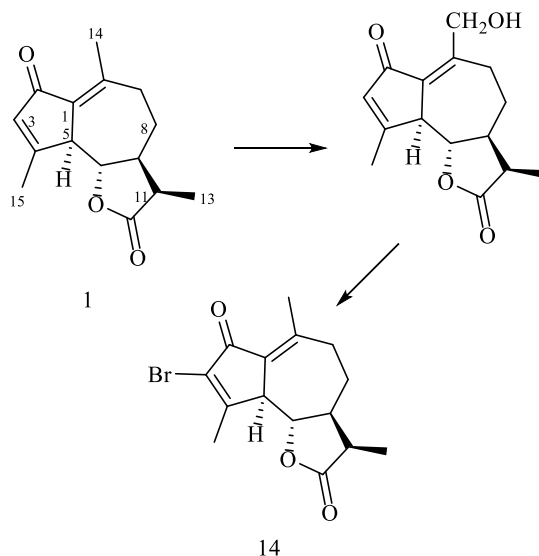
**EMAR:**  $m/z$  [M]<sup>+</sup> 262.1200. Calculado para un C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 262.1205.

**<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** Descrito en la tabla 35.

**<sup>13</sup>C RMN (125 MHz):** Descrito en la tabla 36.

**Biotransformación con el hongo *Xilaria* sp. (LnA8)**

En la biotransformación del achillin (**1**) con el endófito **LnA8** se obtuvo un extracto crudo de 901,4 mg que fue cromatografiado en una CC (n-Hex:AcEot 40:60 al 100% AcEot). Las fracciones que contenían los productos de transformación, respecto al control, fueron purificadas por HPLC (n-Hex:AcEot 50:50), aislando los compuestos (**12**) (127 mg; 14,1 %) y (**13**) (4,8 mg; 0,5%) (Fig. 73).



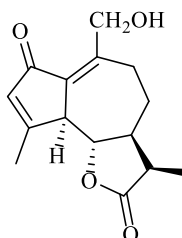
**Fig. 73.** Esquema de biotransformación de (1) con LnA8

El compuesto (**12**) fue identificado como el 14-hidroxi-achillín por comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados en la bibliografía. Se había aislado en pequeña cantidad de *Artemisia reptans* (Marco et al., 1994) pero no se observaron todas las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$ . En este estudio hemos completado las asignaciones de estos carbonos (Tabla 37).

El derivado (**13**) presentó en su espectro de masas de alta resolución el ion molecular a  $262\ m/z$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ). El análisis de los datos de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabla 36) indicaban la introducción de un grupo aldehído en el sustrato en C-14, con la aparición de una señal a campo bajo de un aldehído a  $9.87\delta$  y la ausencia del singlete del metilo sobre el doble enlace entre C-1 y C-10. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabla 37) se observan modificaciones en los desplazamientos de los C-1 ( $51.0\ \delta$ ) y C-10 ( $50.2\ \delta$ ) que han pasado a ser carbonos metínicos y la aparición de un carbono cuaternario a  $200.9\delta$  debido al grupo aldehído. La configuración en los C-1 y C-10 se asignó por los efectos NOE observados entre H-6 y H-10 y entre H-1 y H-8 $\beta$ . Este compuesto se identificó como el 3,9-dimetil-2,7-dioxo-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -decahidroazuleno[4,5- $\beta$ ]furan-6-carbaldehído (**13**)

y no había sido descrito anteriormente. Un isómero de este producto, epímero en C-1 y C-10, se había obtenido de *Artemisia reptans*.

- **Compuesto (12):** 6-(hidroximetil)-3,9-dimetil-3 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -hexahidroazuleno[4,5- $\beta$ ]furan-2,7-diona,



$[\alpha]_D = +125,5$  ( $c=1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR** ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{máx}}$ : 3497, 2939, 1769, 1729, 1712, 1693, 1209, 998, 751  $\text{cm}^{-1}$ .

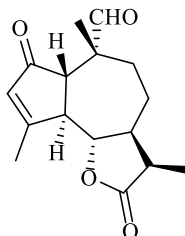
**EM**  $m/z$  (int. rel.): 262  $[\text{M}]^+$ (29), 248 (15), 234 (100), 219 (77), 189 (12), 175 (20), 161, (76), 121 854), 109 (59), 91 (56), 77 846), 67 (25), 55 (70).

**EMAR:**  $m/z$   $[\text{M}]^+$  262.1209. Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , 262.1205.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** Descrito en la tabla 36.

**$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz):** Descrito en la tabla 37.

- **Compuesto (13):** 3,9-dimetil-2,7-dioxo-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -decahidroazuleno[4,5- $\beta$ ]furan-6-carbaldehido.



$[\alpha]_D = +70,8$  ( $c=0,48$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**IR** ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu_{\text{máx}}$ : 3435, 2930, 2872, 2729, 1771, 1731, 1699, 1621, 1446, 1380, 1318, 1211, 1032, 999, 929, 850  $\text{cm}^{-1}$ .

**EM**  $m/z$  (int. rel.): 262  $[\text{M}]^+$  (29), 260 (13), 162 (8), 137 (23), 125 (20), 124 (15), 123 (30), 122 (47), 121 (69), 119 (10), 94 (12), 66 (21).

**EMAR:**  $m/z$   $[\text{M}]^+$  262.1200. Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , 262.1205.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** Descrito en la tabla 36.

**$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz):** Descrito en la tabla 37.



**Tabla 36.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos 1, 5, 11-13.

Protón	1	5	11	12	13
1	-	-	-	-	3.36 (dd, $J = 11.3, 7.2$ Hz)
2	-	-	-	-	-
3	6.14 (quin, $J=1.3$ Hz)	6.16(m)	6.18 (s)	6.20 (p, $J = 1.4$ Hz)	6.06(p, $J = 1.4$ Hz)
4	-	-	-	-	-
5	3.40(d, $J=10.4$ Hz)	3.38(d, $J=10.1$ Hz)	3.30 (d, $J=9.46$ Hz)	3.46 (d, $J = 10.1$ Hz)	3.18 (dd, $J = 10.4, 7.2$ Hz)
6	3.79(t, $J=10.2$ Hz)	3.85(t, $J=10.2$ Hz)	3.62 (t, $J=8.51$ Hz)	3.85 (t, $J = 10.2$ Hz)	3.99 (t, $J = 10.2$ Hz)
7	2.45 (m)	2.50(td, $J=10.4, 7.3$ Hz)	2.16 (q, $J=10.40$ Hz)	2.46 (m)	2.36 (dt, $J = 9.8, 3.0$ Hz)
8	1.84(m); 1.41(dtd, $J=13.7, 12.3, 12.3, 1.7$ Hz)	3.73(td, $J=10.6, 2.5$ Hz)	3.81 (1t, $J=10.40$ Hz)	2.40 (m); 2.61 (m)	2.42 (m); 2.02 (m)
9	2.42(m); 2.30(m)	2.40 (m); 2.75(dd, $J=13.4, 10.9$ Hz)	2.74 (dd, $J = 14.2, 10.9$ Hz), 2.67 (m)	4.49 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H); 4.62 (dd, $J = 15.0, 0.7$ Hz)	1.40 (dd, $J = 9.5, 6.3$ Hz); 1.45 (dd, $J = 6.9, 3.2$ Hz)
10	-	-	-	-	2.45(m)
11	2.68 (quin, $J=7.7$ Hz)	2.91(quin, $J=7.6$ Hz)	2.59 (m)	2.70 (pd, $J = 7.8, 6.1$ Hz)	2.72 (m)
12	-	-	-	-	-
13	1.12 (d, $J=7.9$ Hz)	1.26 (d, $J=7.6$ Hz)	1.47 (d, $J=6.62$ Hz)	1.13 (dd, $J = 7.7, 2.6$ Hz)	1.18 (d, $J = 7.9$ Hz)
14	2.41(s)	2.42(s)	2.42 (s)	1.91 (dddd, $J = 13.7, 6.3, 3.0, 2.0$ Hz), 1.46 (dtd, $J = 14.0, 12.4, 1.6$ Hz)	9.87 (d, $J = 2.6$ Hz)
15	2.27(m)	2.29 (m)	2.32 (s)	2.32 (m)	2.33(m)

**Tabla 37.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 1, 5, 11-13.

Carbono	1	5	11	12	13
1	131.7	132.8	133.0*	133.9	51.0
2	195.9	195.6	197.5	196.6	206.8
3	135.5	135.5	135.9	134.8	130.7
4	170.1	170.2	171.0	173.4	179.4
5	52.9	51.9	56.3	53.1	53.2
6	83.5	80.8	76.3	82.8	84.1
7	51.9	58.0	62.2	51.8	47.8
8	23.6	65.2	75.9	23.9	26.6
9	37.6	48.3	41.3	33.6	27.0
10	152.1	145.6	145.6	155.8	50.2
11	39.3	38.0	42.2	39.2	38.8
12	178.4	178.1	177.2	178.1	178.4
13	9.9	9.4	15.9	9.9	11.2
14	21.5	21.7	21.3	65.5	200.9
15	19.8	19.7	20.9	20.1	20.8

## 5.5.2 Derivados semisintéticos de achillín (1)

### Reacciones de hidroxilación

Los grupos hidroxilo, son grupos funcionales con un amplio rango de utilidades. Los procesos oxidativos son métodos comunes en la industria y en la investigación para obtener compuestos orgánicos o derivados más oxidados. Como agente oxidante cada vez se emplean más compuestos de selenio, como el dióxido de selenio (óxido de selenio (IV)). Éste se utiliza, en cantidades catalíticas junto con otro agente oxidante como el hidróxido de *ter*-butilo (TBHP) o el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) con el objetivo de aumentar el rendimiento de la reacción. A su vez, son reactivos de fácil disponibilidad, de bajo peso molecular y

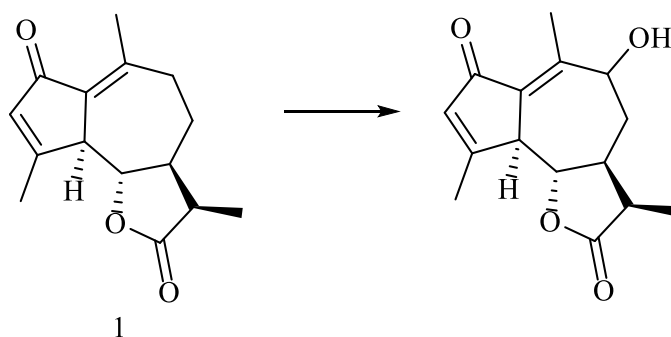
considerados respetuosos con el medio ambiente ya que los productos de su reducción son el agua o el *tert*-butanol, fáciles de retirar del medio de reacción (Młochowski y Wójtowicz-Młochowska, 2015).

El óxido de selenio (IV) produce oxidaciones de olefinas substituidas y es uno método fiable y predecible para la introducción de uno grupo hidroxilo en posiciones alílicas sin afectar al doble enlace. Estas reacciones se muestran regio- y estereoselectivas cuando en la molécula hay dobles enlaces trisustituidos, como en el caso del achillín (**1**) en los carbonos C1-10 y C3-4. En este contexto la hidroxilación tiene lugar en posición  $\alpha$ , en el carbono más sustituido con un orden de reactividad de  $\text{CH}_2 > \text{CH}_3 > \text{CH}$  (Młochowski y Wójtowicz-Młochowska, 2015). Por tanto y siguiendo la metodología descrita por Macias et al., (2000) sería de esperar la introducción de un grupo OH (o  $\alpha$ -hidroxilación alílica) en la posición 9 o 5 de la molécula de achillín.

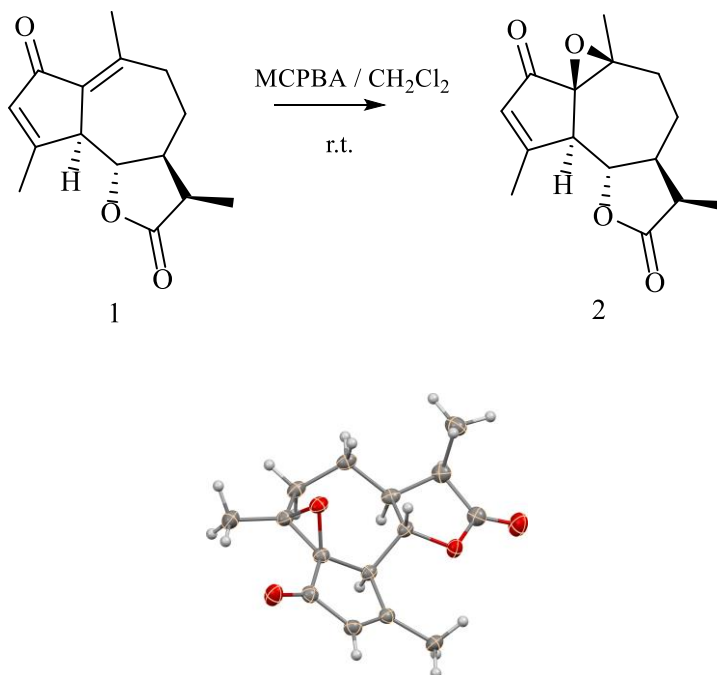
Otra manera de introducir grupos hidroxilos en la molécula es mediante el uso de perácidos, como el ácido meta-cloroperbenzoico (MCPBA). El MCPBA es un agente oxidante que reacciona con el doble enlace introduciendo un átomo de oxígeno formando un epóxido. En condiciones de hidrólisis ácidas o básicas podemos lograr la apertura del epóxido y dependiendo del disolvente utilizado origina compuestos con grupos hidroxilos, por ejemplo dioles (Fringuelli et al., 1989). El achillín (**1**), presenta un doble enlace entre el C1 y C10, y es de esperar que mediante la acción del MCPBA la epoxidación ocurra en esa posición (Stefanović et al., 1989).

**1. Reacción de hidroxilación alílica:** Inicialmente, se intentó obtener derivados con grupos hidroxílicos en posición alílica. Al Achillín (**1**) (0,2 mmol) disuelto en DCM seco se adicionó dióxido de selenio ( $\text{SeO}_2$ ) a temperatura ambiente adicionando a continuación el hidroperóxido de *terc*-butilo (TBHP). La proporción de los agentes oxidantes,  $\text{SeO}_2$  y TBHP se varió (1eq./8eq. ó

1eq./4eq., respectivamente) haciendo también variar el tiempo de reacción (43h ó 144h). Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas y siguiendo las reacciones por cromatografía en capa fina (CCF) se verificó que no ocurrió reacción. Mediante esta reacción se pretendía conseguir la incorporación de un grupo hidroxilo en el C9 de la molécula, pero no se logró probablemente porque el achillín tiene una débil reactividad y necesita condiciones de reacción más drásticas.



**2. Reacción de epoxidación del doble enlace:** siguiendo la metodología empleada por Stefanović et al., 1989, se utilizó como agente oxidante el ácido *meta*-cloroperbenzóico (MCPBA) con el objetivo de introducir un grupo epóxido en el doble enlace presente entre el C1 y el C10 en el Achillín (**1**). La epoxidación de alquenos es quimioselectiva, reaccionando mejor con los alquenos más sustituidos y presentando a su vez, una elevada diastereoselectividad. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Stefanović et al., (1989) y las condiciones empleadas en la reacción se esperaba obtener el 1 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxiachillín (**2a**). Por el contrario, en la oxidación con el achillín (**1**) se obtuvo el epóxido con la estereoquímica 1 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxiachillín (**2**) como se pudo comprobar por la estructura de Rayos-x (Fig. 74), cuya estereoquímica coincide con la del epóxido (**2**) aislado de la parte aérea de *A. assoana*.



**Fig. 74.** Estructura molecular del compuesto (2) por rayos-X. En color gris los C, en blanco los H y en rojo los O.

La reacción se repitió varias veces utilizando distintas cantidades de MCPBA (2 eq ó 6 eq) y con distintos tiempos de reacción (72 y 216 h). Se observó, que al aumentar el número de equivalentes de MCPBA, el ácido benzoico resultante de la reacción dificulta el aislamiento del producto de la reacción. El rendimiento obtenido con 72 h fue del 45% y tras 216 h del 48%, por lo que se concluyó que el aumento del tiempo de reacción no es significativo en cuanto al rendimiento.

Los datos espectroscópicos, RMN, en el mismo disolvente ( $\text{CDCl}_3$ ), MS y Rayos-x de cristal único, del epóxido obtenido por síntesis, 1 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxiachillín (2) coinciden con los datos del epóxido aislado (Tabla 38).

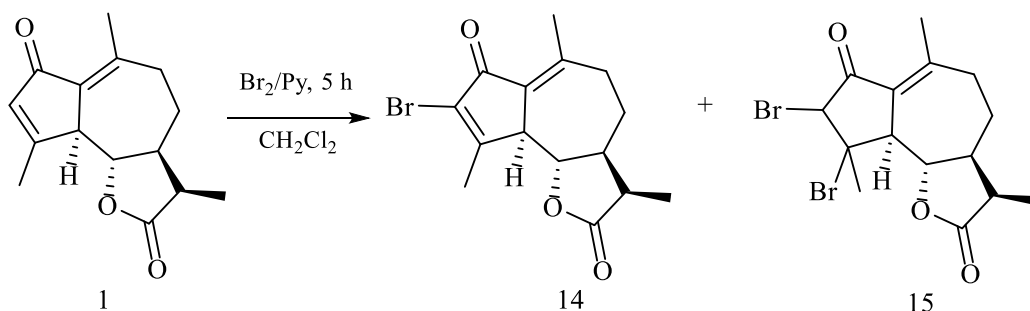
**Tabla 38.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN, en  $\text{CDCl}_3$ , del  $1\beta,10\beta$ -epoxiachillín aislado de la planta y obtenido en la reacción con MCPBA.

H/C	(2) <i>A. assoana</i>	(2) Reacción de epoxidación
	$\delta_c$ (125 MHz)	$\delta_c$ (100 MHz)
1	65.2	66.0
2	200.9	201.5
3	133.2	132.6
4	176.6	178.7
5	49.7	53.4
6	79.6	85.6
7	51.8	50.0
8	19.8	21.9
9	34.6	39.0
10	67.0	67.3
11	39.3	39.0
12	179.0	177.9
13	9.91	10.2
14	18.8	17.2
15	20.9	21.3

### Reacciones de bromación

La estrategia para la incorporación de átomos de bromo se realizó siguiendo las metodologías descritas por Iikawa et al., 2013. La bromación regioselectiva de achillín (**1**) en diferentes condiciones de reacción fueron seleccionadas con el fin de incorporar átomos de bromo en posiciones diferentes de cada uno de los doble enlaces exocíclicos del achillín (**1**).

La adición de bromo (1.0 eq) en el achillín (**1**) (0,2 mmol) disuelto en DCM y en presencia de piridina (1.1 eq), a temperatura ambiente durante 5 h, se obtuvo uno producto mayoritario, en el que el átomo de bromo entró en posición 3 del doble enlace (**14**) (Fig. 75). El producto mayoritario, 3-bromoachillín (**14**) y 3,4-dibromoachilín (**15**) fueron obtenidos con rendimientos del 14% y 2,7%, respectivamente (Fig. 75), con *ca.* de 50% de achillín que no reaccionó. Los dos compuestos fueron caracterizados por RMN y EMAR. En el derivado dibromado **16** no fue posible definir cuál es la estereoquímica de los átomos de bromo, sin embargo la adición en el doble enlace ocurre *trans*.

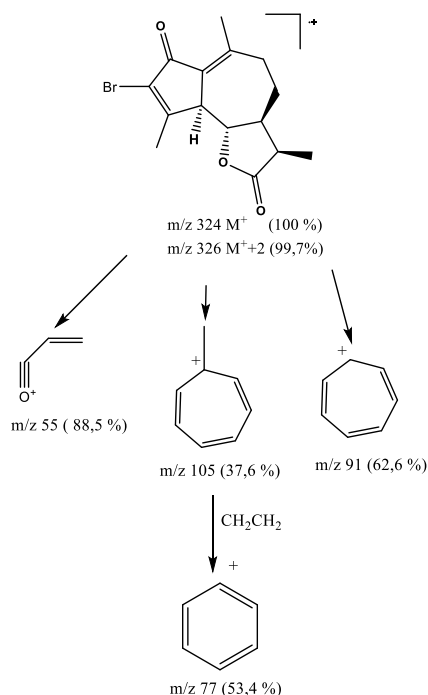


**Fig. 75.** Esquema de la reacción de bromación con obtención de los derivados **14** y **15**.

En las tablas 39 y 40 se describe la identificación de **14** y **15** por  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN, respectivamente. La introducción del Bromo en el C3 en el compuesto **14**, se observa por la ausencia del singulete en el C3, y también se percibe por el desplazamiento del metilo 15 hacia campo más bajo. En la tabla 39, se muestra como el C3 ha pasado a ser un carbono cuaternario con un desplazamiento de 178.1 $\delta$ . En el compuesto **15**, se han adicionado 2 Bromos, uno en el C3 por lo que la señal del protón H3 se ve desplazada hacia campo alto y el otro en el C4, pasando a tener un desplazamiento de 69.3 $\delta$ . El metilo en posición 15 también se ve afectado por la presencia del Bromo desplazándose su señal hacia campo más bajo.

**EMAR (14):**  $m/z$   $[M]^+$  324.0388. Calculado para  $C_{15}H_{17}O_3Br$ , 324.0361.

En el espectro de EI-EM del compuesto **14** se confirma que solo tiene uno átomo de bromo en la molécula ya que se observan dos picos muy intensos y a iguales intensidades, el pico del ion molecular a  $m/z$  a 324 y a  $m/z$  326 referente a las relaciones isotópicas del bromo (isótopos  $^{35}Br$  y  $^{37}Br$ ). También se detectan picos característicos de las lactonas sesquiterpénicas, a  $m/z$  55, 77, 91 y 105 u.m.a. (Fig. 76).

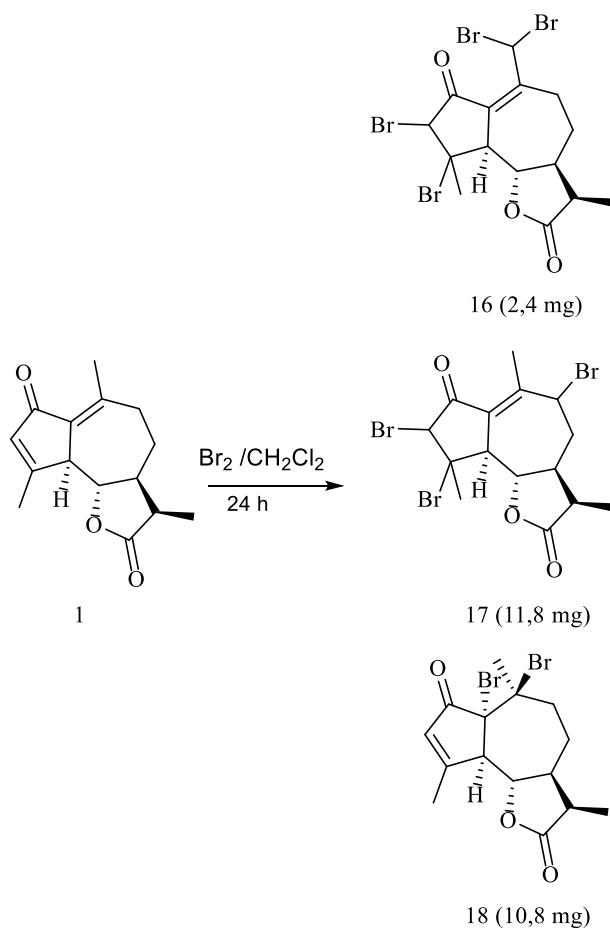


**Fig. 76.** Esquema de fragmentación de **14** por EI-MS.

**EMAR (15):**  $m/z$   $[M]^+$  403.9206. En el espectro de EI-EM del derivado **15**, se detecta la existencia de picos a  $m/z$  404, 406 y 408, característicos de la existencia de dos átomos de bromo en la molécula, debido a los isótopos del átomo de bromo.

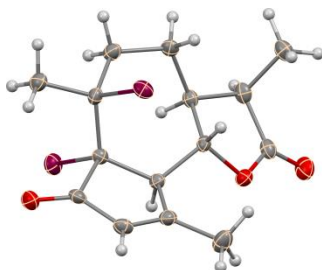


La reacción se repitió, con adición de exceso de bromo en DCM, sin base (piridina), a 0°C con un aumento del tiempo de reacción y se mantuvo a temperatura ambiente durante 24h. El análisis de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en placa preparativa demostró que en esta reacción no hubo selectividad. Conjuntamente con el achillín (**1**) de partida que no reaccionó, se obtuvieron tres fracciones (Fig. 77). El análisis de los espectros de RMN y EI-EM de las tres fracciones permitió la identificación de dos compuestos (**16**, 2,1%), (**17**; 11,3%) y un compuesto puro que se sintetizó con mayor rendimiento (**18**, 13%) resultante de la *trans*-adición en el doble enlace en C1-C10.



**Fig. 77.** Esquema de la reacción con Bromo en exceso.

La estructura de Rayos-X, del compuesto **18** permitió definir la estereoquímica, 1 $\alpha$ ,10 $\beta$ -dibromoachillín (**18**), como se puede observar en la figura 78. Todos los compuestos fueron caracterizados por RMN (Tabla 39 y 40) y EI-EM.



**Fig. 78.** Estructura molecular del compuesto (**18**) por rayos-X. En color gris los C, en blanco los H, en rojo los O y en burdeos los Br.

**EMAR (16):**  $m/z$   $[M]^+$  559.7607. Calculado para  $C_{15}H_{15}O_3Br_4$ , 562.7718 y para  $C_{15}H_{15}O_3Br_4$ , 564.7725 que corresponden a la razones isotópicas.

**EMAR (17):**  $m/z$   $[M]^+$ . La masa de estos compuestos es difícil de definir por EMAR-IE ya que contienen varios bromos. Su masa se verificó por RMN donde se comprobó que es una mezcla de dos compuestos; uno con 3 átomos de Bromo ( $m/z = 482$ ) y el otro con 1 átomo de Bromo ( $m/z = 324$ ).

La masa de estos compuestos es difícil de definir por EMAR si están impurificados ya que contienen varios bromos. En el espectro de RMN se comprobó que la muestra era una mezcla (3:1) con un compuesto mayoritario con tres átomos de Bromo ( $m/z = 482$ ).

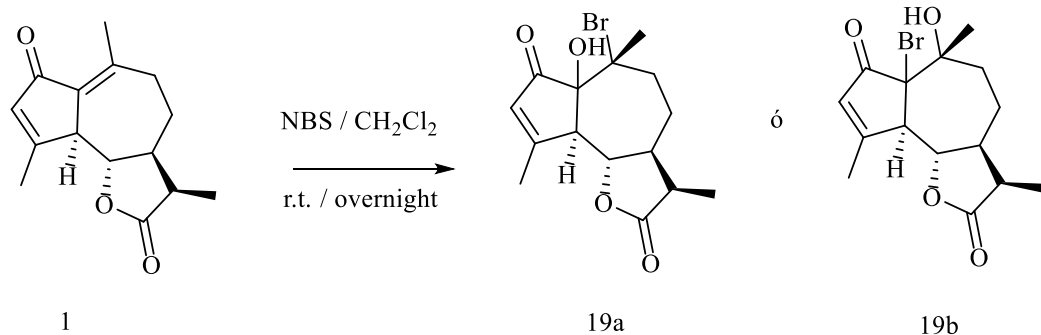
**EMAR (18):**  $m/z$   $[M]^+$  403.9611. Calculado para  $C_{15}H_{18}O_3Br_2$ , 403.9623.

En las reacciones de bromación referidas, se utilizó bromo molecular, no obstante este reactivo no es muy conveniente debido a su elevada reactividad, volatilidad (difícil de controlar la cantidad de bromo adicionado) y toxicidad.

Para evitar estos inconvenientes se experimentó con *N*-bromosuccinimida (NBS), que es seguro y de fácil manipulación (es un sólido cristalino fácil de pesar) (Tan y Yeung, 2013). También, con el objetivo de conocer la reactividad del achillín (1) en comparación con el 1 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxiachillín (2) en las reacciones de bromación se utilizó una mezcla de achillín (1) con un porcentaje de *ca.* de 10% de 1 $\beta$ -10 $\beta$ -epoxiachillín (2).

En este contexto, se adicionó 2,5 eq. de NBS a una mezcla de (1) y (2) (0,2 mmol) en DCM seco (6 mL) a 0°C y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se lavó con agua y se extrajo con DCM. Mediante CCF preparativa se purificó el producto de partida junto con un nuevo derivado puro que fue caracterizado por RMN e IE-EM.

El análisis del espectro de EI-EM de alta resolución mostró el pico del ion molecular a  $m/z$  342 que corresponde a una fórmula molecular  $C_{15}H_{19}O_4Br$ , concluyéndose que este compuesto tiene un átomo de Br. En el espectro de  $^1H$  RMN se observa un singulete a  $\delta$  6.11 ppm de H-3 referente al doble enlace y un desvío a campo más bajo de los protones, como el triplete H6 a  $\delta$  4.66 ppm, doblete H5 a  $\delta$  3.57 ppm y los metilos (a  $\delta$  1.21 y 2.29 ppm). Todos los datos sugieren que el achillín (1) por reacción con NBS pasa por un intermediario, el ion bromonio cíclico que en presencia de agua forma una bromohidrina (19a) o (19b) (Fig. 79). La abertura del ion bromonio es *trans*, no siendo posible saber cuál es la posición de los átomos de bromo y del hidroxilo ni la estereoquímica. En el espectro de  $^1H$  y  $^{13}C$  RMN se detecta a formación de un producto puro. Finalmente, concluimos que en estas condiciones el 1 $\beta$ ,10 $\beta$ -epoxiachillín (2) no es reactivo.



**Fig. 79.** Esquema de la reacción con NBS.

Por comparación con el derivado  $1\alpha,10\beta$ -dibromoachillín (**18**), los datos de protón y carbono sugieren que estamos en presencia de un compuesto obtenido cinéticamente con la estereoquímica  $1\alpha$ -bromo, $10\beta$ -hidroxiachillín (**19b**). **EMAR (19):**  $m/z$   $[\text{M}]^+$  342.0260. Calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{Br}$ , 342.0290.

Además, se intentaron obtener derivados bromados usando condiciones fuertemente básicas, mediante tratamiento del achillín (**1**) (0,2 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (THF) con 1,1 eq. de diisopropilamida de litio (LDA) y 2,3 eq. de NBS a  $-78^\circ\text{C}$  hasta llegar a temperatura ambiente, de acuerdo con la metodología descrita por Iikawa et al., 2013 pero la reacción no tuvo lugar.

**Tabla 39.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos 1, 14-19.

Protón	1	14	15	16	17	18	19
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	6.14 (quin, $J=1.3$ Hz)	-	4.67 (s)	4.75 (s)	4.68 (s)	6.18 (d, $J=2.4$ Hz)	6.11 (s)
4	-	-	-	-	-	-	-
5	3.40(d, $J=10.4$ Hz)	3.50 (d, $J=10.1$ Hz)	3.06 (d, $J=9.4$ Hz)	5.03 (dd, $J=4.9, 2.3$ Hz)	3.26 (m)	3.75 (m)	3.58 (d, $J=9.7$ Hz)
6	3.79(t, $J=10.2$ Hz)	3.80 (t, $J=10.2$ Hz)	4.33 (t, $J=9.9$ Hz)	4.40 (t, $J=10.0$ Hz)	4.38 (t, $J=10.0$ Hz)	5.04 (t, $J=10.0$ Hz)	4.66 (t, $J=9.7$ Hz)
7	2.45 (m)	2.49 (m)	2.45 (d, $J=11.4$ Hz)	3.32 (d, $J=9.2$ Hz)	3.26 (m)	2.83 (m)	2.73 (m)
8	1.84(m); 1.41(dtd, $J=13.7, 12.3, 12.3, 1.7$ Hz)	1.87 (m);1.43 (m)	1.87 (ddd, $J=16.3, 5.4, 2.7$ Hz); 1.45 (m)	2.31 (ddd, $J=13.9, 5.3, 2.2$ Hz);1.97 (ddd, $J=14.6, 11.8, 2.5$ Hz)	1.98 (ddd, $J=14.8, 11.8, 2.5$ Hz) 2.17 (dd, $J=4.9, 2.2$ Hz)	1.94 (m, 0H), 1.87 (tt, $J=10.0, 4.9$ Hz)	1.86 (d, $J=13.0$ Hz);1.66 (m)
9	2.42(m); 2.30(m)	2.42 (d, $J=1.2$ Hz); 2.39 (dd, $J=6.0, 1.7$ Hz)	2.45 (d, $J=11.4$ Hz);2.50 (m)	5.55 (d, $J=9.3$ Hz); 3.89 (dd, $J=9.3, 1.6$ Hz)	4.78 (dd, $J=4.9, 2.4$ Hz)	2.05 (dt, $J=15.4, 3.7$ Hz); 2.66 (m)	2.46 (m);1.83 (m)
10	-	-	-	-	-	-	-
11	2.68 (quin, $J=7.7$ Hz)	2.72 (quin, $J=7.7$ Hz)	2.74 (quin, $J=7.7$ Hz)	2.83 (quin, $J=7.7$ Hz)	2.78 (m)	2.73 (m)	2.66(m)
12	-	-	-	-	-	-	-
13	1.12 (d, $J=7.9$ Hz)	1.13 (m)	1.21 (d, $J=7.8$ Hz)	1.26 (d, $J=7.6$ Hz)	1.23 (d, $J=7.8$ Hz)	1.24 (d, $J=7.8$ Hz)	1.21 (d, $J=7.2$ Hz)
14	2.41(s)	2.47 (s)	2.39 (d, $J=2.2$ Hz)	3.27 (m)	2.45 (d, $J=2.4$ Hz)	2.15 (s)	1.71 (s)
15	2.27(m)	2.33 (s)	2.22 (s)	2.24 (s)	2.22 (d, $J=7.1$ Hz)	2.23 (s)	2.29 (s)

**Tabla 40.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 1, 14-19.

<b>Carbono</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
1	131.7	128.3	127.3	131.2	128.7	69.2	68.7
2	195.9	193.9	194.5	193.6	194.8	198.4	201.4
3	135.5	178.1	58.9	57.9	58.2	129.8	129.3
4	170.1	164.8	69.3	67.6	68.7	175.5	178.2
5	52.9	52.7	54.8	52.5	54.2	66.6	66.1
6	83.5	83.1	83.6	82.1	82.4	80.5	82.4
7	51.9	51.7	48.8	54.0	42.3	42.3	44.3
8	23.6	23.4	23.3	32.5	31.5	25.1	21.2
9	37.6	37.5	39.1	30.0	55.6	41.9	37.6
10	152.1	155.0	160.9	152.3	155.7	70.7	53.4
11	39.3	39.2	39.2	38.4	38.5	39.2	39.1
12	178.4	188.1	178.4	177.5	178.8	178.8	179.1
13	9.9	9.9	10.3	10.5	10.5	10.6	10.9
14	21.5	22.2	24.5	42.4	28.2	33.1	30.2
15	19.8	19.4	28.5	28.1	22.3	19.2	20.3

Por tanto, podemos concluir que la obtención de los derivados 8 $\alpha$ -hidroxi-achillín (**5**) y 8 $\beta$ -hidroxi-achillín (**11**) en la biotransformación del achillín (**1**) con el hongo endófito *Loratospora* sp. (**H 16**) muestra que el sistema enzimático de las reacciones de hidroxilación en este hongo, actúa con la misma regio y estero-especificidad que en las plantas.

Las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la biotransformación del achillín con el hongo *Xilaria* sp. (**LnA8**) son oxidaciones de carbonos no funcionalizados. En ellas se introduce en primer lugar un grupo hidroxilo para formar el derivado 14-hidroxi-achillín (**12**), que al sufrir la oxidación por las enzimas conduce a un nuevo derivado estructural del achillín, el compuesto (**13**), con un metilo oxidado a un aldehído afectando al doble enlace.

En la preparación de derivados semisintéticos, el achillín (**1**) presentó buena reactividad en la epoxidación del doble enlace entre C-1 y C-10 y en las reacciones de bromación con la introducción de átomos de bromo de forma regioselectiva en los dobles enlaces exocíclicos de su estructura.

## 5.6 Perfiles químicos de los extractos etanólicos

Los perfiles químicos de los extractos etanólicos se han estudiado para comparar la producción de los compuestos identificados según las distintas metodologías de producción de plantas. Los métodos de análisis se han elegido en función del tipo de compuestos aislados de cada extracto. Los compuestos de los extractos de parte aérea se han cuantificado mediante cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS). Los compuestos de los extractos de raíces se han analizado mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

### 5.6.1 Perfiles químicos de los extractos de *A. assoana*

El estudio de los extractos de la parte aérea (planta silvestre y cultivo aeropónico) de *A. assoana* se muestra en la tabla 41 y la figura 80. La composición del extracto silvestre fue la más compleja. El compuesto mayoritario (**1**, achillín) se encuentra en ambos extractos, las lactonas sesquiterpénicas  $1\beta,10\beta$ -epoxiachillín (**2**) y  $5\alpha$ -hidroxiachillín (**3**) sólo se detectan en el extracto de planta silvestre y las flavonas artemetina **6** y 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona **7** también se detectan en ambos extractos. Las principales diferencias se observan para compuestos no identificados de tiempos de retención 19.94, 20.96, 24.91, 30.74, 3.47 y 38.61 min, con mayor presencia en AasAS; y 24.33, 38.15, 44.55, 50.12 y 64.08 min, en mayor proporción en AasAA. Por tanto las diferencias de composición entre los extractos de planta silvestre y cultivo aeropónico son cuantitativas y relativas a compuestos minoritarios no identificados.

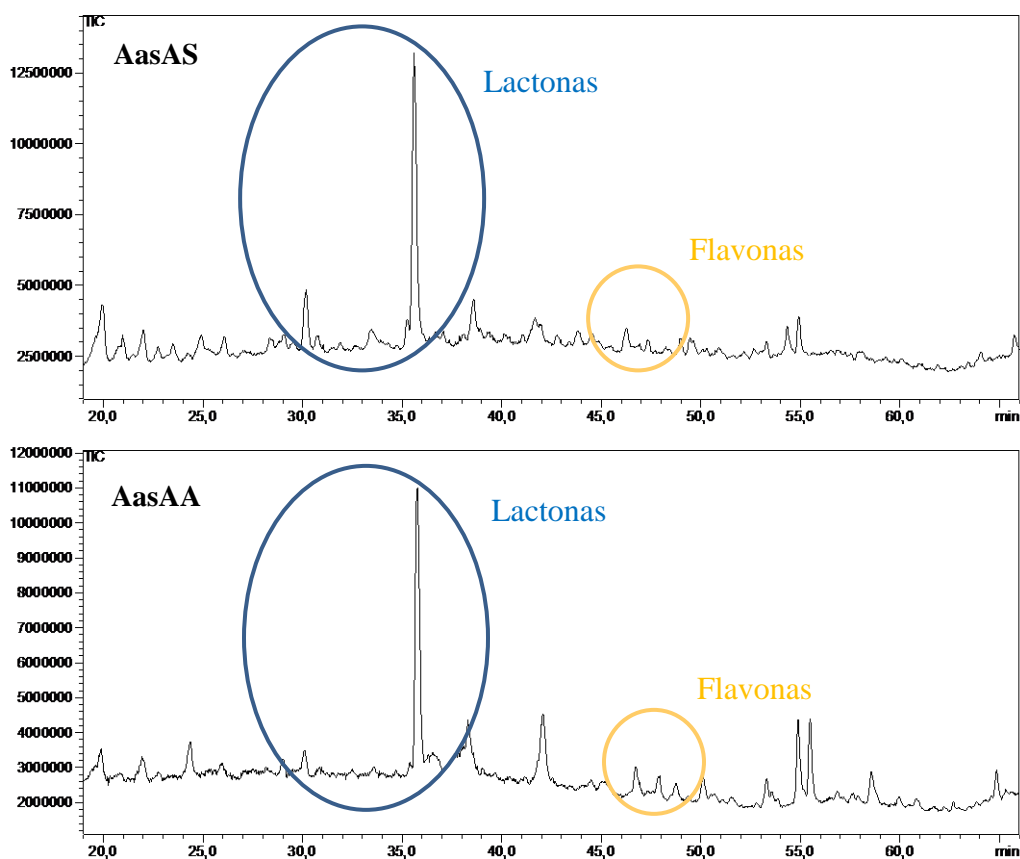


**Tabla 41.** Composición química (%relativo) de los extractos etanólicos de la parte aérea de *A. assoana* analizado por HPLC-MS.

Ion parental (m/z)	Ion Molecular (m/z)	IR (min)	Cultivo		Compuestos identificados
			% Silvestre	% Aeropónico	
296 [M+H <sub>2</sub> O]	278	19.94	11.41	7.24	n.i
296 [M+H <sub>2</sub> O]	278	20.96	3.27	---	n.i
296 [M+H <sub>2</sub> O]	278	22.01	2.81	3.70	n.i
319		24.33	---	3.99	n.i
349		24.91	2.35	---	n.i
263 [M+H]	262	29.05	0.81	1.01	Compuesto (5)
329 [M+Na]	306	30.18	6.14	2.14	n.i
263 [M+H]	262	30.74	1.23	t	Compuesto (3)
263 [M+H]	262	33.47	2.58	t	Compuesto (2)
247 [M+H]	246	35.68	30.08	30.73	Compuesto (1)
249 [M+H]	248	38.15	---	3.08	n.i
227 [M+Na]	204	38.61	2.60	---	n.i
345 [M+H]	344	43.85	1.85	2.75	n.i
375 [M+H]	374	44.55	0.99	3.07	n.i
359 [M+H]	358	46.26	2.19	2.72	Compuesto(7)
389 [M+H]	388	47.31	0.85	1.83	Compuesto(6)
317 [M+H]	316	48.29	1.86	2.08	n.i
329 [M+H]	328	50.12	---	1.99	n.i
304		64.08	---	2.26	n.i

n.i: no identificado;

**Fig. 80.** Cromatogramas (HPLC-MS) de los extractos AasAS (silvestre) y AasAA (aeropónico) de *A. assoana*.



El análisis de los extractos de raíz (raíz transformada y aeropónica) de *A. assoana* muestra una composición más compleja para los de raíz aeropónica (obtenidos del cultivo de una planta completa) en comparación con los de raíz transformada (Tabla 42 y Figura 81). En el de raíz aeropónica se han identificado los dos estereoisómeros del tipo espiroacetal **20** y **21**. Los compuestos mayoritarios de la raíz transformada no se detectan en el extracto aeropónico.

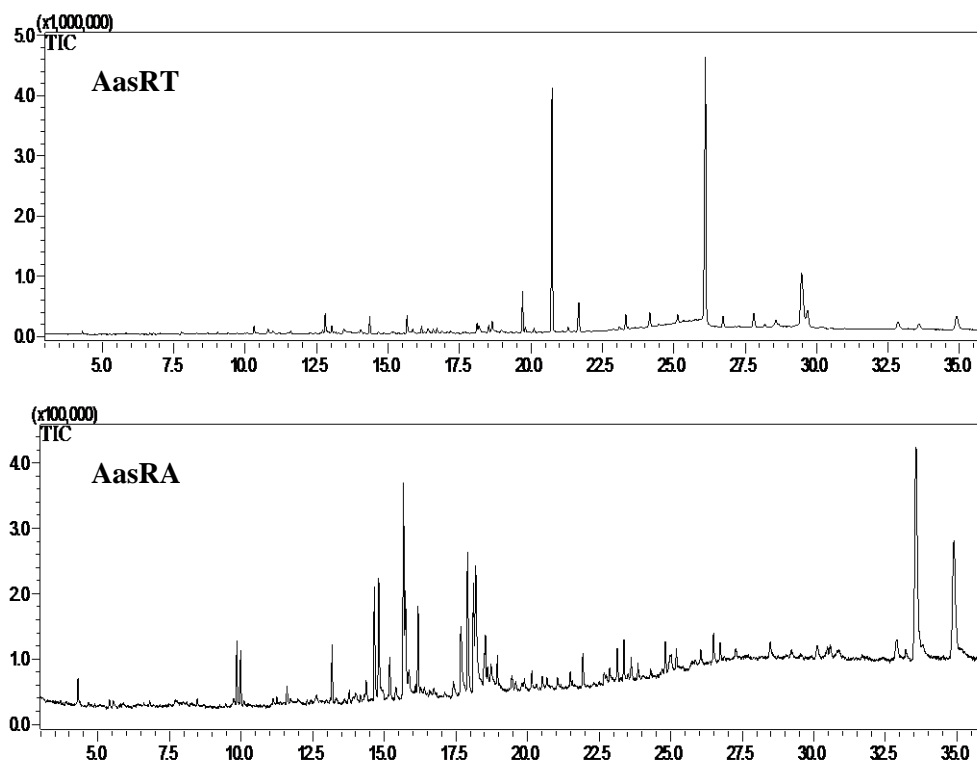
El estudio de los perfiles químicos demuestra que el cultivo idóneo para una mayor producción de metabolitos de *A. assoana* es el aeropónico (Fig. 82).

Sin embargo, el cultivo de raíz transformada dio el mejor rendimiento de biomasa. El cultivo aeropónico de plantas transformadas podría aumentar la producción de biomasa sin alterar la producción de metabolitos secundarios.

**Tabla 42.** Composición química (% relativo) de los extractos de raíz de *A. assoana* analizados por GC-MS.

IR	Cultivo		Compuestos
	%RT	%Aeropónico	
14,65	---	4.19	Compuesto ( <b>20</b> )
14,81	---	4.34	Compuesto ( <b>20</b> )
15,19	---	1.54	Compuesto ( <b>21</b> )
15,66	1.50	7.66	Ácido palmítico
15,73	---	4.72	214/156/115/158/76/128/185/55/102/77
16,18	0.46	2.76	88/43/55/57/101/83/41/97/69/70/
17,67	---	3.33	222/207/179/194/123/223/95/79/151/51
17,91	---	5.60	57/131/85/264/180/103/179/91/119/163
18,11	0.82	3.88	67/81/95/82/68/55/41/96/54/79
18,18	0.73	6.64	Heptadeceno-(8)-ácido carbónico-(1)
19,71	3.52	---	83/55/232/208/43/84/41/290/44/121
20,74	21.75	---	83/55/43/136/167/154/69/41/151/93
21,67	3.03	---	105/177/159/43/77/134/121/119/83/122
26,11	31.12	---	121/177/159/93/134/122/43/119/132/105
29,48	11.65	---	175/69/121/41/81/109/107/123/187/93
29,68	2.91	---	83/55/290/192/179/84/279/43/135/262
33,58	1.13	18.20	55/83/81/69/412/159/133/255/95/145
34,90	3.14	11.00	43/414/81/329/107/95/55/57/105/213

**Fig. 81.** Cromatogramas (GC-MS) de los extractos AasRT (raíz transformada) y AasRA (raíz aeropónica) de *A. assoana*.



**Fig. 82.** Imagen de una planta de *A. assoana* en cultivo aeropónico.

## 5.6.2 Perfiles químicos de los extractos de *A. armeniaca*

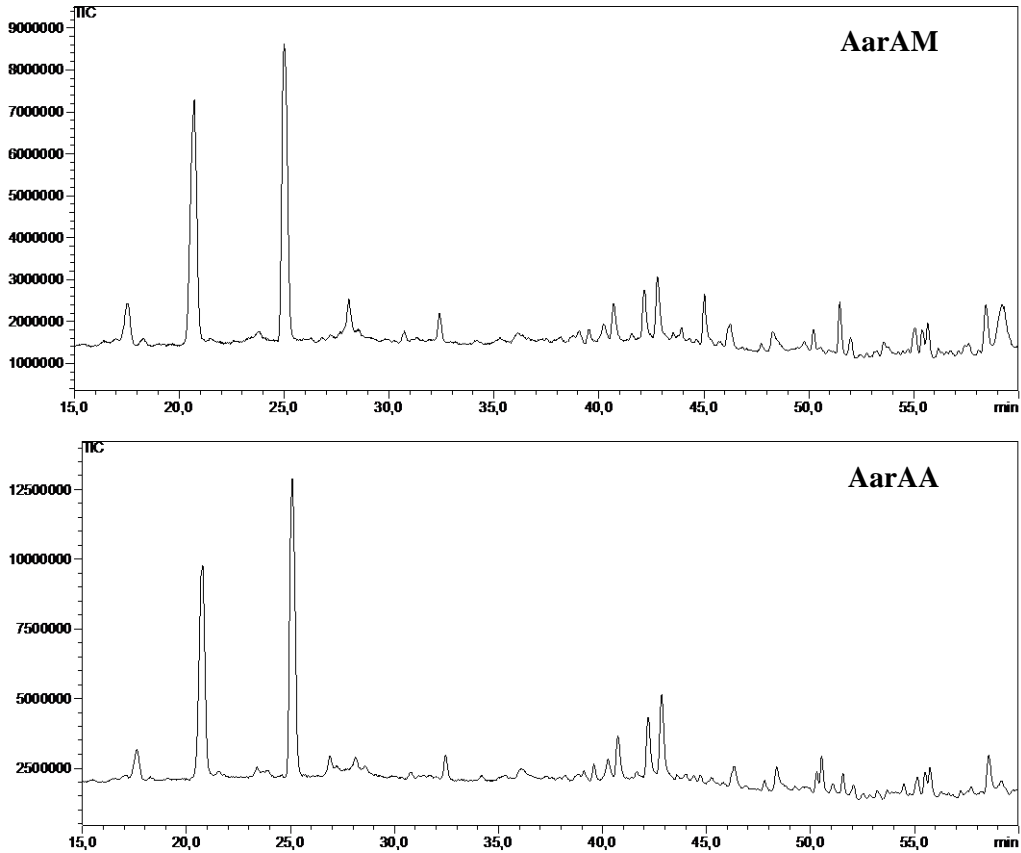
Los perfiles químicos de *A. armeniaca* parte aérea se muestran en la tabla 43 y figura 83. El porcentaje relativo de desoxilacarol (**26**) y el metil-lacarol (**27**), compuestos mayoritarios en esta planta, es similar en ambos extractos que, en general, son muy parecidos, diferenciándose en 3 compuestos, no identificados. Por tanto, el cultivo aeropónico de esta planta es una buena opción para la obtención de biomasa y compuestos de interés (figura 86). Gracias a este método de cultivo se ha podido estudiar por primera vez la composición química de esta especie de *Artemisia* procedente de poblaciones españolas en peligro de extinción.

**Tabla 43.** Composición química (%relativo) de los extractos etanólicos de la parte aérea de *A. armeniaca* analizado por HPLC-MS.

Ion Parental (m/z)	Ion Molecular (m/z)	IR (min)	Cultivo		Compuesto identificado
			% Cámara	% Aeropónico	
265 [M+H]	264	17.53	4.07	3.41	n.i
279 [M+H]	278	20.72	28.22	28.5	Compuesto ( <b>26</b> )
309 [M+H]	308	25,00	30.88	36.09	Compuesto ( <b>27</b> )
409 [M+Na]	386	32.40	1.76	2.04	n.i
361		45.03	2.92	---	n.i
313		46.25	2.02	2.36	n.i
385 [M+Na]	384	48.37	---	1.91	n.i
281		50.23	1.02	1.19	n.i
311		50.53	---	2.16	n.i
337		51.47	2.83	1.15	n.i
329		55.67	1.32	1.10	n.i
569		59.15	---	1.28	n.i
537		59.21	6.04	---	n.i

n.i: no identificado

**Fig. 83.** Cromatogramas (HPLC-MS) de los extractos AarAM (cámara de cultivo) y AarAA (aeropónico) de *A. armeniaca*.



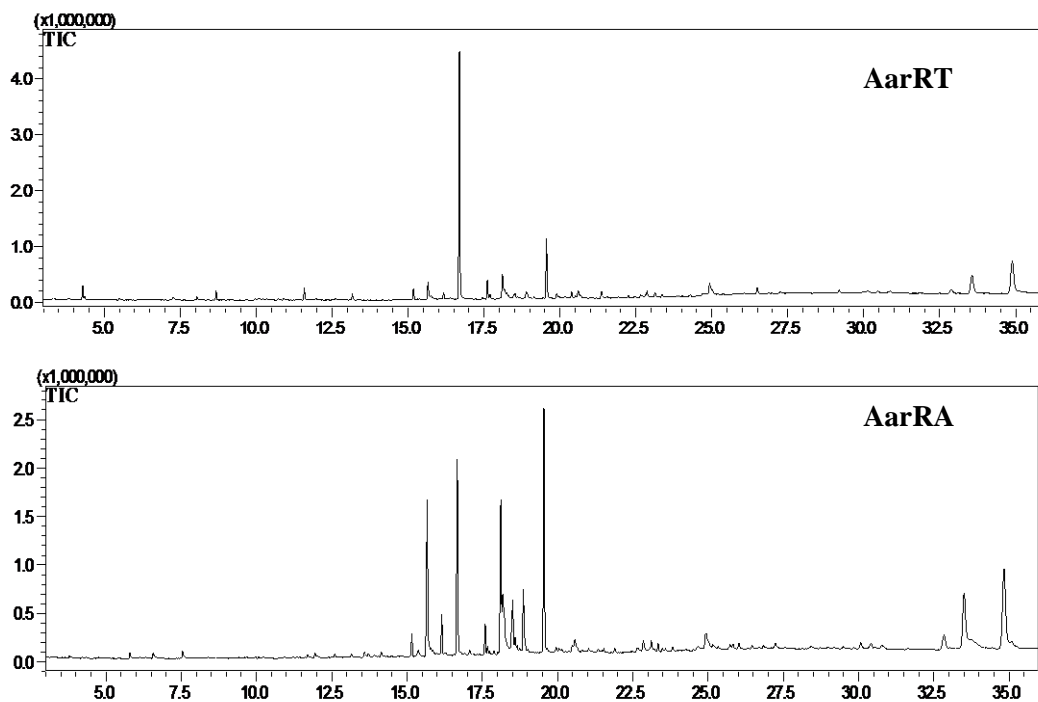
El análisis de los extractos de raíz (raíz transformada y aeropónica) de *A. armeniaca* muestra de nuevo una composición más compleja para los de raíz aeropónica (obtenidos del cultivo de una planta completa) en comparación con los de raíz transformada (tabla 44 y figura 84).

*A. armeniaca* mostró una mejor adaptación al cultivo aeropónico que al de raíces transformadas y además este sistema de cultivo produce una mayor diversidad de metabolitos secundarios. Por tanto, proponemos el cultivo aeropónico para la obtención de biomasa y metabolitos de interés de esta especie (Fig. 85).

**Tabla 44.** Composición química (% relativo) de los extractos etanólicos de raíz de *A. armeniaca* analizados por GC-MS.

IR	Cultivo		Compuestos
	%RT	%Aeropónico	
4,30	1,82	1,21	l- $\alpha$ -Terpineol
15,18	1,73	---	<b>AG 1</b>
15,66	2,61	11,19	<b>AG 2</b>
16,17	---	2,21	Palmitato de etilo
16,69	45,46	12,41	55/97/115/129/79/117/41/77/128/67
17,61	2,98	1,87	Linoleato de metilo
18,11	3,52	11,62	81/67/82/95/55/68/96/41/54/79
18,40	---	8,22	55/79/41/69/83/43/97/67/93/80
18,53	---	4,62	Linoleato de etilo
18,62	---	1,05	79/55/67/81/95/41/43/93/69/80
18,89	1,49	4,51	Compuesto ( <b>31</b> )
19,56	10,42	15,23	43/55/157/128/115/129/41/77/79
24,93	3,98	1,37	44/81/67/55/95/79/207/82/41/57
32,83	1,09	2,03	44/207/281/73/208/133/81/253/43/55
33,56	7,77	8,15	44/207/55/83/81/69/133/412/159/281
34,89	13,25	13,45	44/414/329/207/81/95/107/43/145/213

**Fig. 84** Cromatogramas (GC-MS) de los extractos AarRT (raíz transformada) y AarRA (raíz aeropónica) de *A. armeniaca*.



**Fig. 85.** Imagen de plantas de *A. armeniaca* cultivadas en un sistema aeropónico.



## 6. ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS

Como se ha mencionado en la introducción, las especies del género *Artemisia* se caracterizan por su contenido en lactonas sesquiterpénicas, flavonas, cumarinas, compuestos fenólicos y poliacetilenos, compuestos involucrados en la defensa de estas plantas. En este capítulo se discutirá sobre la actividad de los compuestos puros obtenidos de las plantas (parte aérea y raíz) y, de las lactonas sesquiterpénicas derivadas del achillín (1).

Del estudio fitoquímico de la parte aérea de *A. assoana* se aislaron un total de 5 lactonas sesquiterpénicas, 4 guaianolidas (compuestos **1**, **2**, **3** y **5**) y 1 eudesmanolida (**4**), además se aislaron 3 flavonas (**6**, **7** y **8**), y 2 monoterpenos (**9** y **10**). Del estudio de la raíz transformada de esta especie se aislaron mayoritariamente compuestos de tipo espiroacetales (**20**, **21** y **22**) y fenilpropanoides (**23**, **24** y **25**).

Con el objetivo de obtener nuevos derivados del compuesto mayoritario de *A. assoana*, achillín (1), y poder establecer sus relaciones estructura-actividad, se realizaron dos biotransformaciones y diversas reacciones químicas. Como producto de esas biotransformaciones se aislaron 4 derivados (**5**, **11**, **12** y **13**) de los cuales el compuesto **5** había sido previamente aislado de la planta. Como producto de la reacción de epoxidación se obtuvo el epóxido (**2**), también aislado en la planta, y mediante reacciones de bromación se obtuvieron 6 derivados bromados, los compuestos **14**, **15**, **16**, **17**, **18** y **19** (a ó b).

En el estudio fitoquímico de *A. armeniaca* se aislaron de la parte aérea dos cumarinas preniladas (**26** y **27**) y de la raíz numerosos poliacetilenos (**28**, **29**, **30** y **31**), el ácido-9-decenoico (**32**) y dos ácidos grasos (AG1 y AG2).

## 6.1 Lactonas sesquiterpénicas

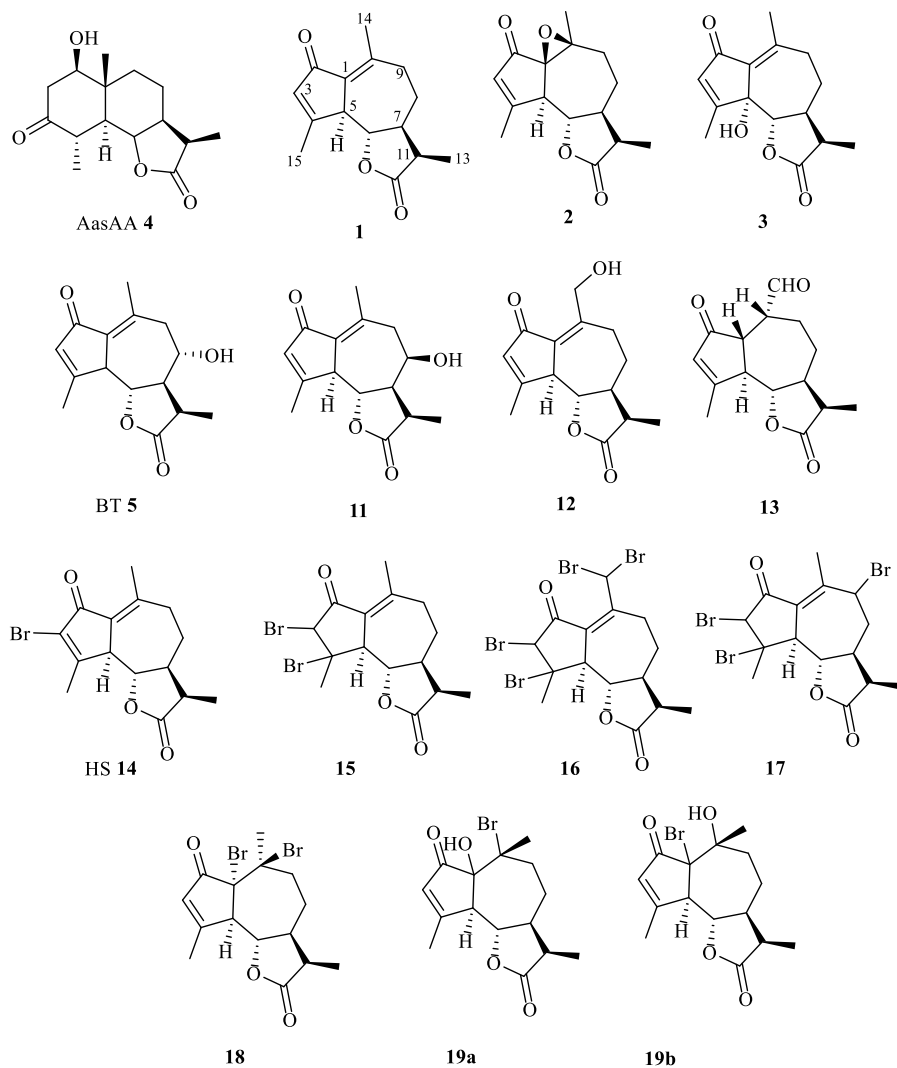
A partir de las fracciones activas 5, 6 y 7 de la parte aérea de *A. assoana* se aislaron un total de 5 lactonas sesquiterpénicas: 4 guaianolidas (achillín **1**, 1,10βepoxiachillín **2**, 5-hidroxiachillín **3** y 8-α-hidroxiachillín **5**) y 1 eudesmanolida arsanina (**4**).

Con el objetivo de obtener nuevos derivados del compuesto mayoritario de *A. assoana*, achillín **1** y poder establecer sus relaciones estructura-actividad, se realizaron dos biotransformaciones y diversas reacciones químicas. Como producto de esas biotransformaciones se aislaron 4 derivados (**5** 8-β-hidroxiachillín, **11**, **12** y **13**) de los cuales el compuesto **5** había sido previamente aislado de la planta. Como producto de la reacción de epoxidación se obtuvo el epóxido **2**, también aislado en la planta, y mediante reacciones de bromación se obtuvieron 6 derivados bromados, los compuestos **14**, **15**, **16**, **17**, **18** y **19** (a ó b) (Fig. 86).

Las lactonas sesquiterpénicas (LSQ) son un grupo muy diverso de compuestos de origen botánico, casi exclusivos de la familia Asteraceae. En el género *Artemisia*, las más comunes son las de tipo guaianolida seguidas de las germacranolidas y eudesmanolidas (Abad et al., 2012). Achillín (**1**) se ha aislado de numerosas plantas, incluyendo *A. assoana* (Zapata-Martínez et al., 2016; Zaghoul et al., 2014; Marco et al., 1987), lo mismo que el epóxido **2** (Marco et al., 1987; Martínez et al., 1987). El resto de LSQ se describen por primera vez en esta especie de *Artemisia*.

Los compuestos halogenados juegan un papel importante en el desarrollo de pesticidas innovadores. Alrededor del 96% de productos sintetizados desde 2010 como herbicidas, fungicidas, insecticidas/acaricidas y nematicidas contienen átomos de halógenos. A nivel farmacológico el 50% de los tratamientos que se

encuentran en el mercado son halogenados (Jeschke, 2017). Por todo ello y para comprender mejor la relación estructura-actividad de este tipo de guaianólidas aisladas se llevaron a cabo reacciones hemisintéticas con el fin de introducir átomos de bromo en el achillín (**1**).



**Fig. 86.** Lactonas sesquiterpénicas ensayadas

## Actividad insecticida

El extracto de la parte aérea de *A. assoana* fue activo frente a *S. littoralis*, por tanto se han ensayado frente a estas dianas las lactonas sesquiterpénicas aisladas de la planta, y los derivados estructurales de **1** (Fig. 86).

La LSQ que mostró mayor actividad antialimentaria en ensayos de elección frente a *S. littoralis* fue achillín (**1**) con una  $DL_{50}$  de  $1,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , pero no presentó toxicidad postingestiva ( $\Delta B = 96\%$ ,  $\Delta I = 95\%$ ) en larvas de *S. littoralis* inyectadas oralmente, lo que sugiere una acción antialimentaria a nivel de receptores gustativos sin efectos tóxicos. En cuanto a los derivados de **1**, los únicos que presentaron actividad moderada frente a *S. littoralis* fueron el compuesto de biotransformación **13** y el derivado **14**. Este es el primer estudio de su actividad antialimentaria (Tabla 45).

Numerosas lactonas sesquiterpénicas, sobre todo del tipo guaianolida, tienen actividad antialimentaria (Cis et al., 2006; Data y Saxena, 2001). Un estudio que incluía 2 guaianolidas, 2 germacranolidas y 1 eudesmanolida, demostró que todas poseían actividad antialimentaria frente a larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera) y que eran tóxicas por contacto frente a larvas de *Bradysia odoriphaga* (Diptera). De todas ellas, una de las guaianolidas fue la que mostró mayor actividad (Wu et al., 2016).

**Tabla 45.** Actividad insecticida de LSQ aisladas de *A. assoana* y los derivados del achillín (**1**) obtenidos de las biotransformaciones y las reacciones químicas.

Origen	Compuesto	<i>S. littoralis</i> (%FI <sup>a</sup> )	DE <sub>50</sub> <sup>*</sup> (µg/cm <sup>2</sup> )
AasAS	<b>4</b>	51,3±12,8	1,74 (1,00-3,02)*
	<b>1</b>	92,5±3,4	
	<b>2</b>	9,4±9,4	
	<b>3</b>	28,1±12,3	
	<b>5</b>	37,8±15,9	
	<b>11</b>	49,9±11,5	
BT ( <b>1</b> )	<b>12</b>	45,7±12,6	
	<b>13</b>	77,7±10,1	
HS ( <b>1</b> )	<b>14</b>	51,2±13,8	
	<b>15</b>	79,0±12,2	
	<b>16</b>	43,8±9,2	
	<b>17</b>	58,5±11,4	
	<b>18</b>	48,9±10,6	
	<b>19</b>	53,3±13,7	

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. <sup>\*</sup>DE<sub>50</sub> dosis capaz de producir un 50% de actividad. Ensayados a 50µg/cm<sup>2</sup>. AasAS, *A. assoana* parte aérea silvestre, BT, biotransformación de **1**. HS, hemisíntesis a partir de **1**.

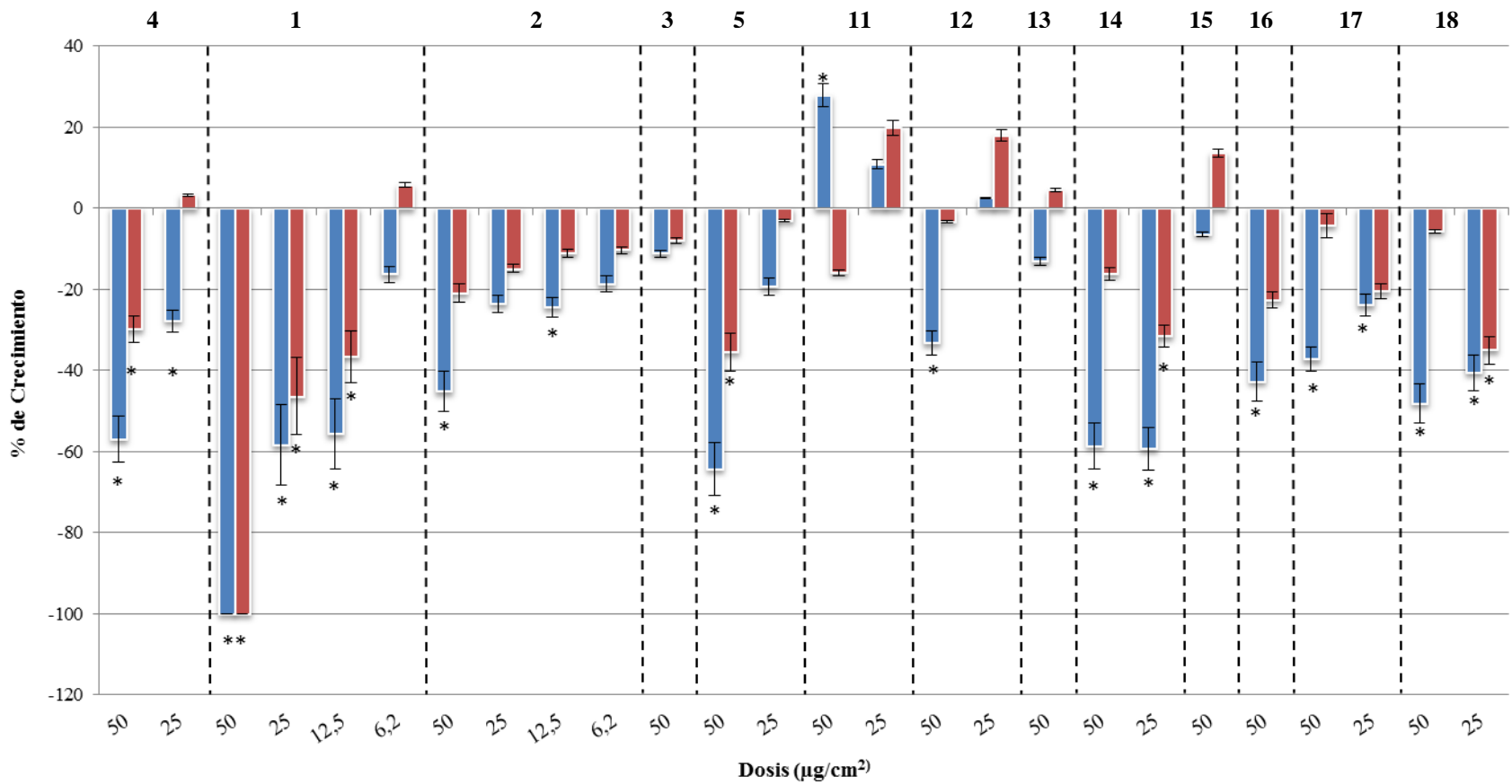
Se ha propuesto que las lactonas sesquiterpénicas ejercen su actividad biológica por la presencia de grupos carbonilo α,β-insaturados, los aldehídos libres, los epóxidos y los peróxidos (Schmidt 2006). En general, los compuestos con actividad antialimentaria se caracterizan por estar en su forma oxidada, o como alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres o lactonas. A su vez la solubilidad de los compuestos es un factor importante, donde los compuestos con mayor actividad generalmente son aquellos con escasos grupos polares (Nawrot y Harmath, 2012). En este estudio, la presencia de grupos hidroxilo y del epóxido, presentes en todos los compuestos menos en el achillín (**1**), causan la pérdida de actividad frente a *S. littoralis*. Entre los derivados activos podemos observar que la presencia del grupo aldehído en C14 (**13**) incrementa la actividad hasta un 77%

(Fig. 87). Entre los derivados halogenados se puede observar que la actividad no se correlaciona con el número de átomos de Bromo adicionados ya que el compuesto (**16**), con 4 átomos de Bromo es el que menos actividad mostró (Fig. 87).

### Fitotoxicidad

Dada la actividad fitotóxica del extracto y fracciones 5 y 6 de la parte aérea de *A. assoana*, las lactonas sesquiterpénicas se ensayaron frente a *L. perenne* y *L. sativa* (Fig. 87).

La figura 87 muestra el porcentaje de crecimiento de raíz y hoja de *Lolium perenne* en presencia de las LSQ. Los resultados muestran el alto poder fitotóxico de achillín (**1**) frente a *L. perenne*. A la dosis más alta **1** inhibió en un 90% la germinación, dicho efecto perduró a lo largo de todo el ensayo, con un porcentaje de inhibición del 84% al final del mismo (día 5) (datos no mostrados). Después del achillín (**1**) el compuesto que mostró mayor actividad fue el 8 $\alpha$ -hidroxiachillín (**5**), seguido del eudesmanolido arsanina (**4**) y del epóxido (**2**). El único compuesto natural que no mostró actividad fitotóxica frente a *L. perenne* fue el 5 $\alpha$ -hidroxiachillín (**3**). Los productos de la biotransformación (**5**, **11-13**) fueron menos activos que el producto de partida **1**, siendo el **5** el más efectivo. Esta actividad es estereo-dependiente ya el producto (**11**) que sólo se diferencia del (**5**) en la estereoquímica del grupo hidroxilo unido al C8 mostró una actividad mucho menor.

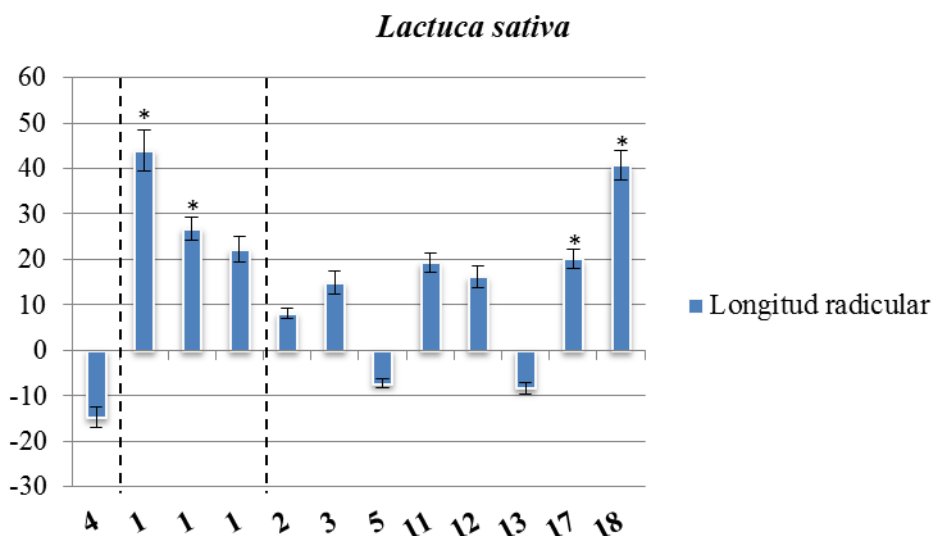


**Fig 87.** Actividad fitotóxica de las LSQ frente a *Lolium perenne*. Porcentaje del crecimiento de la raíz (azul) y la hoja (granate) con respecto al control (n=25). Ensayadas a distintas concentraciones (50, 25, 12,5 y 6,2 µg/cm<sup>2</sup>). \* diferencia significativa respecto al control, p>0,05, Test LSD.

Entre los productos hemisintéticos, el que mostró un mayor efecto fue el **14** seguido de **18**, **16**, **17** y **15** (el compuesto 19 no pudo ser ensayado por no disponer de suficiente cantidad). Al bajar la dosis, en el caso de los derivados bromados se observó un aumento de la actividad. Los compuestos se pueden clasificar en dos grupos; aquellos que muestran una dosis-respuesta, siendo más activos a mayores dosis y perdiendo dicha actividad a medida que se van diluyendo o compuestos que no son muy potentes y que no muestran actividad a altas concentraciones pero al diluirlas dicha actividad se ve incrementada, esto podría ser debido a la solubilidad de la muestra en agua (Macías et al., 2000). Algo así podría estar sucediendo en el caso de los derivados bromados donde observamos que los compuestos de los que se ha podido ensayar dosis más bajas mantienen dicha actividad de inhibición del crecimiento radicular pero en el caso del crecimiento foliar su actividad es mayor a la menor dosis ensayada.

En la figura 88 se muestran los resultados de la actividad fitotóxica de las LSQ frente a *Lactuca sativa*. Esta es la primera vez que se estudia la actividad fitotóxica de estos compuestos. Ninguna de las LSQ ensayadas mostró un efecto negativo significativo sobre la germinación al final del experimento (datos no mostrados), lo que sí se observó por parte de los compuestos **1**, **17** y **18** es un moderado efecto estimulador del crecimiento radicular. Se han descrito efectos similares de otras lactonas sesquiterpénicas frente a *L. sativa* y otras plantas dicotiledóneas (Macías et al., 2000).





**Fig. 88.** Actividad fitotóxica de las LSQ frente a *Lactuca sativa*. Porcentaje de crecimiento de la raíz con respecto al control (n=25). Ensayadas a 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a excepción de 1 (50, 25 y 12,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). \* diferencia significativa respecto al control,  $p > 0.05$ , Test LSD.

Las lactonas sesquiterpénicas además de haber sido descritas como compuestos citotóxicos, insecticidas y antifúngicas, entre otras actividades, también son compuestos conocidos por su elevado poder alelopático (Pandey, 1994; Galindo et al., 1999; Macías et al., 2000). A su vez, dentro de la familia Asteraceae las lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianolidas han mostrado distintos efectos, como el aumento del crecimiento de *L. sativa* o la disminución en la germinación (Macías et al., 2000).

La actividad fitotóxica, depende de la presencia de grupos funcionales, de la conformación de cada compuesto, de la solubilidad en agua y lípidos (Macías et al., 2000). Se ha demostrado que la  $\gamma$ -lactona insaturada así como los grupos carbonilo son capaces de reaccionar con grupos sulfhidrilo de importantes biomoléculas, como el glutatión (GSH) (Galindo et al., 1999; Schmidt, 1997). Se ha propuesto la necesidad de la lactona para esta actividad mientras que la insaturación no es necesaria. La presencia de dos  $\alpha,\beta$ -carbonilos insaturados aumentan la actividad. El aumento de sustituyentes de tipo hidroxilo conlleva a la

pérdida de actividad dependiendo de la polaridad alcanzada que podría dificultar el transporte a través de las membranas. Recientemente se ha demostrado que de las LSQ aisladas de *A. gorgonum*, un seco-guaianolido fue el más activo, seguido de lactonas con un epóxido, tres metilos (como el achillín **1**) y dos grupos hidroxilo (Macias et al., 2012).

Por tanto, entre las LSQ ensayadas, achillin (**1**) fue la más fitotóxica frente a *L. perenne*, mientras que la presencia de hidroxilos o epóxidos disminuyó la actividad. Ninguno de los derivados del achillín (**1**) fue más activo que el compuesto de partida. Los efectos fitotóxicos de achillín (**1**) y todas las LSQ activas fueron selectivos para la planta monocotiledónea *L. perenne*.

### **Antiparasitaria**

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos con un gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, sobre todo para el tratamiento contra el cáncer y en el área de la parasitología (Ivanescu et al., 2015). Tras el descubrimiento de la artemisinina en los años 70 el estudio de las lactonas sesquiterpénicas en la búsqueda de antiparasitarios ha aumentado exponencialmente. Las lactonas sesquiterpénicas dehidroleucodina y helenalina inducen una apoptosis programada en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, que se incrementa en combinación con el benznidazol o el nifurtimox (Jimenez et al., 2014). Se ha observado que compuestos muy parecidos actúan sobre distintas dianas, como la síntesis del ergosterol o la inhibición del sistema de detoxificación de la hemina (Sülsen et al., 2016).

La tabla 46 muestra la actividad de las LSQ de la parte aérea de *A. assoana* y derivados frente a *T. cruzi* y *P. davidi*.

**Tabla 46.** Actividad antiparasitaria de las LSQ frente a *T. cruzi* y *P. davidi*. Resultados expresados como % de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estandar. (DL<sub>50</sub> = dosis necesaria para producir un 50% de inhibición).

Producto	<i>T. cruzi</i>		<i>P. davidi</i>	
	100µg/ml	DL <sub>50</sub>	100µg/ml	DL <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>4</b>	n.e	-	n.e	-
<b>1</b>	12,9±2,8	-	0±0	-
<b>2</b>	0±0	-	0±0	-
<b>3</b>	10,6±2,7	-	0±0	-
<b>5</b>	29,8±4,7	-	n.e	-
<b>11</b>	29,8±4,7	-	n.e	-
<b>12</b>	22,7±4,7	-	n.e	-
<b>13</b>	35,6±2,2	-	n.e	-
<b>14</b>	46,31±1,22	>100	35,65±0,73	>100
<b>15</b>	57,03±7,93	>50	7,92±4,99	>100
<b>16</b>	<b>96,57±0,30</b>	<b>10,71 (7,2-15,8)</b>	<b>92,07±2,92</b>	<b>44,53 (38,5-51,7)</b>
<b>17</b>	79,34±0,70	>50	21,76±1,42	>100
<b>18</b>	83,47±4,79	>50	12,13±4,12	>100
<b>19</b>	<b>92,46±2,74</b>	<b>35,73 (30,9-41,3)</b>	24,62±1,46	>100

n.e: no ensayado

Ninguno de los compuestos obtenidos de la parte aérea de la planta (**1-4**) o de la biotransformación del achillín (**5-13**) fueron activos frente a las dianas ensayadas. Tampoco presentaron citotoxicidad frente a la línea celular de *Ixodes ricinus* IRE/CTVM20 (datos no mostrados).

Los únicos compuestos activos fueron los derivados bromados de **1**. El más activo sobre los dos parásitos fue el derivado **16** con 4 átomos de bromo. El compuesto **19**, una bromohidrina, fue el segundo en mostrar mayor actividad frente a *T. cruzi*, en cambio frente a *P. davidi* a la máxima concentración no mostró ningún efecto. *T. cruzi* es más sensible a los efectos de estos compuestos que *P. davidi*.

Dada la actividad antiparasitaria de los compuestos se evaluó su actividad citotóxica frente a la línea celular de fibroblastos LC5 (Tabla 47). Ninguno de los

compuestos mostró actividad citotóxica frente a esta línea celular, tan solo la bromohidrina **19** redujo en un 10-14% el crecimiento del cultivo celular.

**Tabla 47.** Actividad citotóxica de los derivados bromados sobre la línea celular LC5. Resultados expresados como % de crecimiento de las células con respecto al control  $\pm$  error estándar.

Producto	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
<b>16</b>	100,7 $\pm$ 11,8	131,9 $\pm$ 4,9	131,9 $\pm$ 6,2
<b>17</b>	145,6 $\pm$ 5,6	128,0 $\pm$ 12,2	102,4 $\pm$ 2,3
<b>18</b>	115,3 $\pm$ 7,6	134,1 $\pm$ 8,7	119,3 $\pm$ 12,1
<b>19</b>	89,9 $\pm$ 6,1	88,9 $\pm$ 7,9	86,2 $\pm$ 1,7
Nifurtimox	100	100	100

Los compuestos halogenados tienen una gran diversidad de actividades biológicas. Han mostrado actividad antiviral, antituberculosis, antimalárica y antifúngica (De Clercq, 2013; Beena y Rawat, 2013; Biamonte et al., 2013; Kaur et al., 2010; Hector, 2005). Un estudio de la actividad antimalárica de derivados halogenados de quinolonas mostró que a mayor número de átomos de bromo incorporados mayor actividad de los compuestos que mostraron baja citotoxicidad (Vandekerckhove et al., 2014). También se han descrito alcaloides halogenados activos *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma brucei brucei*, sin citotoxicidad frente a una línea celular humana (Cretton et al., 2014).

Existen pocos trabajos relativos a efectos de productos naturales o sintéticos sobre *P. davidi*. Luque et al. (2000<sub>a</sub>; 2000<sub>b</sub>) estudiaron las alteraciones causadas por derivados de triazol-pirimidina sobre promastigotes de *P. staheli*. Seis de los compuestos inhibieron la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y produjeron alteraciones citoplasmáticas, mientras que presentaron una baja toxicidad en cultivos de células, del mosquito *Aedes albopictus* y del tomate *Solanum lycopersicum*. Los alcaloides tomatina y tomatidina afectaron la membrana celular de *P. serpens* (tomatina) e indujeron cambios morfológicos y la formación de vacuolas en cultivos axénicos (tomatidina) (Medina et al., 2015).

Esta es la primera descripción de los efectos antiparasitarios de derivados bromados de achillín sobre *T. cruzi* y *P. davidi*.

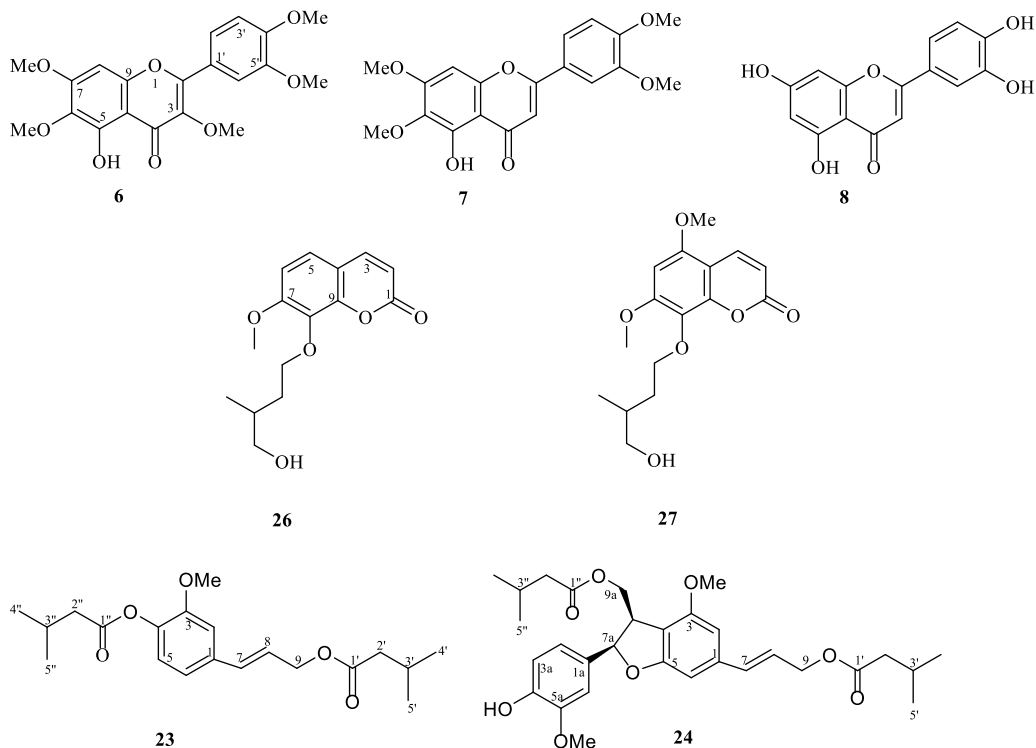
Los resultados mostrados son prometedores en la búsqueda de antiparasitarios específicos frente a *T. cruzi*. Las modificaciones realizadas sobre achillín (**1**), compuesto inactivo, han resultado en compuestos activos frente a *T. cruzi* y *P. davidi* (**16** con 4 átomos de bromo) o *T. cruzi* (bromohidrina **19**), sin efectos citotóxicos frente a células de mamífero.

## **6.2 Compuestos fenólicos: flavonas, cumarinas y fenilpropanoides**

De la parte aérea de *A. assoana* se aislaron 3 flavonas (artemetina **6**, 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona **7** y luteolina **8**) y de la raíz transformada se aislaron fenilpropanoides (**23**, **24** y **25**). De la parte aérea de *A. armeniaca* se aislaron dos cumarinas preniladas (desoxilacarol **26** y metil-lacarol **27**) (Fig. 89).

Las tres flavonas descritas en este trabajo ya habían sido previamente aisladas de *A. assoana*, junto con otras flavonas como circsilineol y jaceosidina (Martínez et al., 1987). La artemetina (**6**) se ha aislado de los géneros *Artemisia* y *Vites* (*A. annua* (Baeva et al., 1988; Zheng, 1994) y *A. absinthium* (Gonzalez-Coloma et al., 2012), entre otras especies.

Las cumarinas desoxilacarol (**26**) y metil-lacarol (**27**) han sido aislados de *A. armeniaca*, *A. laciniata* y *A. tanacetifolia* (Szabó et al., 1985) y de *Skimmia laureola* (Razdan et al., 1987).



**Fig. 89.** Estructura de los compuestos fenólicos ensayados. Los compuestos 23 y 24 no se han ensayado pero sí fracciones enriquecidas.

Los flavonoides son una clase diversa de compuestos fenólicos. En las plantas los flavonoides juegan un papel en la señalización intra e interespecífica (Brown et al., 2001; Steinkellner et al., 2007, incluyendo la simbiosis con *Rhizobium* (Zhang et al., 2009; Buer y Djordjevic, 2009), captación de radicales libres (Agati et al., 2012) y modulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos (Taylor y Grotewold, 2005; Agati et al., 2012) regulación de transporte y degradación de auxina (Brown et al., 2001; Wasson et al., 2006), coloración de tejidos incluyendo las flores (Davies et al., 2012) y la defensa contra patógenos (Weston y Mathesius, 2013; Poiatti et al., 2009). Además juegan un papel alelopático (Weston and Mathesius, 2013) y fitotóxico ligado a su presencia en la rizosfera (Razavi et al., 2009; Pedersen et al., 2014;

Shajib et al., 2012; Furbo et al., 2011; Hassan y Mathesius, 2012; Weston y Mathesius, 2013).

Las cumarinas son un grupo muy amplio de compuestos fenólicos que se caracterizan porque tienen una estructura química de 2H-1-benzopirán-2-ona. Es frecuente que en el anillo básico en los carbonos 6 u 8 se sitúen radicales isoprenílicos, a este tipo de cumarinas se les conoce con el nombre de cumarinas isopreniladas. Se han identificado más de 1300 cumarinas en plantas, hongos y bacterias. Recientemente, el uso de cumarinas naturales y sintéticas ha ganado mucha atención por sus actividades anti-inflamatoria (Revankar et al., 2017) antilipídica (Tejada et al., 2017), anticoagulante (Dang et al., 2017, antioxidante (Matos et al., 2017), inhibidora de la actividad colinesterasa y contra el Alzheimer (de Souza et al., 2016; Anand et al., 2012), anticancer (Harada et al., 2010), y antimicrobiana (Al-Amiery et al., 2012; Guan et al., 2011). Las cumarinas también son defensas fotosensibles de las plantas (Downum, 1992) que afectan a insectos (Pavela y Vrchotová, 2013; Cantrell et al., 2016) y plantas (Yao et al., 2017; Yan et al., 2016; Nebo et al., 2014; Razavi, 2011) entre otros organismos.

Los fenilpropanoides son otro tipo de compuestos fenólicos de origen botánico que se caracterizan por poseer un esqueleto básico formado por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos. Son compuestos que se han aislado de numerosas plantas, tanto en la parte aérea como en la raíz (Tang et al., 2017; Wu et al., 2017; Mohamed et al., 2017) así como de aceites esenciales (Abdollahi Mandoulakani et al., 2017) a los que se les han atribuido numerosas actividades. Recientemente una revisión sobre las propiedades de *Leontopodium nivale* ssp. *Alpinum*, conocida como Edelweiss atribuye sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y sus efectos sobre las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares a su alto contenido en fenilpropanoides (Tauchen y Kokoska, 2017) y para prevención del cáncer (Zhou et al., 2017).

Además de dichas actividades farmacológicas también se han descrito actividades insecticidas. Los fenilpropanoides son capaces de silenciar los genes encargados de la detoxificación del picudo rojo, *Rhynchophorus ferrugineus* (Aljabr et al., 2017), también han mostrado tener actividad larvicida frente a larvas de mosquitos de interés sanitario como *Aedes aegypti* (Kim et al., 2008) por lo que son compuestos con un gran potencial en la búsqueda de insecticidas naturales (Liu et al., 2013; Moreira et al., 2007; Sharma et al., 2006). También se les ha atribuido actividad fitotóxica (Bravetti et al., 2017).

### **Actividad insecticida**

Se han ensayado los compuestos aislados de los extractos que presentaron actividad antialimentaria (AasAS, AarAA). Los compuestos aislados de la RT de *A. assoana* no fueron ensayados frente a estas dianas porque el extracto de partida no mostró actividad.

Los resultados de actividad antialimentaria de los compuestos fenólicos se muestra en la tabla 48. La flavona artemetina (**6**) y las cumarinas preniladas desoxilacarol (**26**) y metil-lacarol (**27**) presentaron actividad antialimentaria baja (**6**) y moderada (**26, 27**) frente a *S. littoralis*. Ninguno de los compuestos ensayados resultó activo sobre los pulgones (datos no mostrados). Las cumarinas desoxilacarol (**26**) y metil-lacarol (**27**), compuestos mayoritarios de *A. armeniaca*, mostraron una actividad moderada frente a *S. littoralis* y no fueron activos frente a los áfidos (datos no mostrados). Debido a que estos compuestos están en proporciones parecidas en el extracto activo (ver sección 5.6.2), se ensayaron mezclas en busca de sinergismos (1:1, 2:1 y 1:2, tablastax), resultando en un aumento de la actividad antialimentaria (81%, 1:1; 72%, 2:1 y 1:2) (Tabla 48).



**Tabla 48.** Actividad antialimentaria ( $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y tóxica (canulación oral,  $50\mu\text{g}/\text{larva}$ ) sobre larvas (L6) de *S. littoralis* de las flavonas y cumarinas.

Productos	Origen	<i>S. littoralis</i>		
		%FI <sup>a</sup>	$\Delta\text{B}^b$	$\Delta\text{I}^c$
<b>6</b>	AasAS	65,2±13,5	111	86*
<b>7</b>		31,7±8,0		
<b>8</b>		24,9±12,7		
<b>26</b>	AarAA	68,1±8,2		
<b>27</b>		60,3±9,3		
<b>26+27 (1:1)</b>		81,1±5,6	106	67*
<b>(2:1)</b>		17,5 (11,9-25,6)*		
<b>(1:2)</b>		72,7±9,1		
		72,1±9,6		

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. <sup>b</sup>Porcentaje de inhibición del asentamiento. AasAS, *A. assoana* aérea silvestre; AarAA, *A. armeniaca* aeropónica aérea. <sup>b</sup> $\Delta\text{B}$ = variación del peso del insecto en mg expresado como % del control. <sup>c</sup> $\Delta\text{I}$ = mg de alimento consumido expresado como % del control. \*Indica diferencias significativas respecto a control (pANCOVA <0,05).

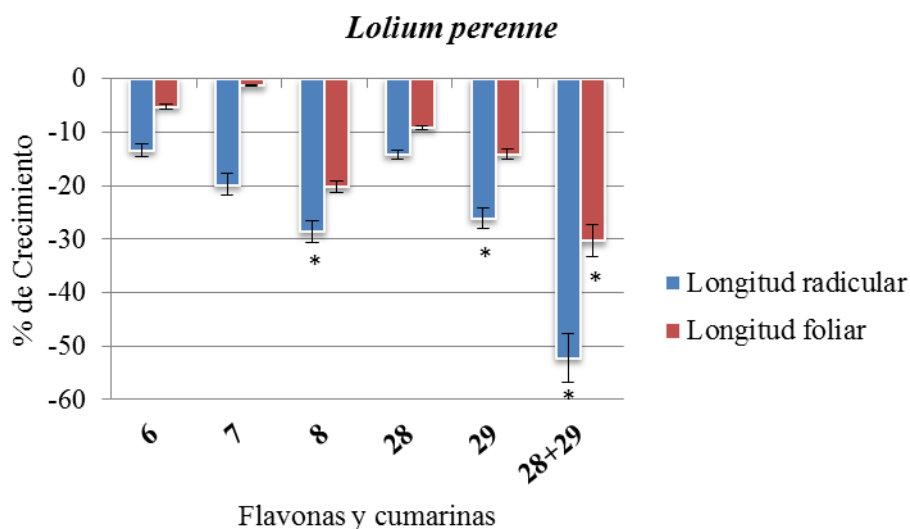
El estudio de la toxicidad postingestiva sobre larvas de *S. littoralis* demostró que tanto **6** como la mezcla **26:27** reducen el consumo sin disminuir el incremento del peso de las larvas, lo que sugiere efectos antialimentarios postingestivos moderados (**26:27** > **6**) (Tabla 48).

Estudios previos ya han demostrado que artemetina (**6**) no es antialimentaria frente a estos insectos (Gonzalez-Coloma et al., 2012). Otros flavonoides si tienen actividad, por ejemplo kaempferol frente a *S. littoralis* (Ruíz-Vásquez et al., 2015), mientras que quercitina, relacionado estructuralmente con kaempferol, fue inactivo frente a *S. litura* (Morimoto et al., 2000). La actividad antialimentaria de flavonoides se ha atribuido a efectos post-ingestivos (Simmonds, 2003). Por ejemplo, el flavonoide rutina inhibió el crecimiento y la alimentación de larvas de *Helicoverpa armígera* (Jadhav et al., 2012). En este estudio se ha demostrado un efecto antialimentario postingestivo moderado de la flavona **6** sobre larvas de *S. littoralis*.

El desoxilacarol (**26**) se ha descrito como un antioxidante por DPPH (Mojarrab et al., 2011), pero esta es la primera descripción de los efectos antialimentarios de estos compuestos.

### Actividad fitotóxica

La actividad fitotóxica de los compuestos fenólicos se muestra en la figura 90. Las flavonas aisladas de *A. assoana* y cumarinas aisladas de *A. armeniaca* se ensayaron frente a *L. perenne*.



**Fig. 90.** Actividad fitotóxica de las flavonas y cumarinas frente a *Lolium perenne*. Porcentaje de crecimiento de la raíz y la hoja con respecto al control (n=25). Ensayadas a 50. \* diferencia significativa respecto al control,  $p > 0.05$ , Test LSD.

Los compuestos luteolina (**8**) y metil-lacarol (**27**) tuvieron un efecto moderado (<30% en raíz y <20% en hoja) sobre *L. perenne*, afectando a su crecimiento radicular y foliar (Fig. 91). La mezcla **26:27** (1:1) resultó en un efecto sinergista (>50% en raíz y 30% en hoja) que se pierde al bajar la dosis (datos no mostrados).

El metil-lacarol (**27**) fue la cumarina que tuvo mayor efecto sobre la germinación. Dicho efecto duró hasta el último día del experimento inhibiendo de manera moderada la germinación (25%) cuando se ensayaron las dos juntas. Esta diferencia en la actividad podría ser debido a que cada una actúa sobre distintas dianas de manera moderada, pero cuando se ensayan juntas esos efectos se suman, incrementando la actividad. No hay estudios alelopáticos realizados con este tipo de cumarinas preniladas.

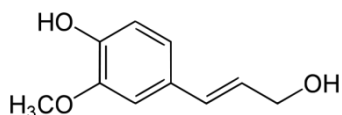
Tanto las flavonas como las cumarinas son compuestos fenólicos capaces de interferir en la actividad de enzimas implicadas en el desarrollo de las plantas, y en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la permeabilidad de la membrana, la actividad hormonal y la síntesis de compuestos orgánicos (Latif et al., 2017). Nuestros resultados han demostrado que el parámetro menos afectado fue la germinación y que la presencia de grupos hidroxilo en las flavonas favorece la actividad fitotóxica (**8**). Esto concuerda con otros estudios relativos a la actividad fitotóxica de cumarinas y flavonas (Nebo et al., 2014). Cumarinas como la umbeliferona, han mostrado tener fuertes efectos alelopáticos ya que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), reduciendo así la viabilidad celular y provocando la senescencia de la planta (Yan et al., 2016). Las cumarinas son capaces de inhibir la función del endospermo, haciendo que no haya nutrientes suficientes para la germinación de las semillas y provocando una pérdida de agua en las células (Yao et al., 2017).

### **Actividad nematocida**

El extracto de la parte aérea de *A. armeniaca* (AarAA) mostró actividad moderada frente al nematodo *Meloidogyne javanica*. Sin embargo, ninguna de las cumarinas preniladas (desoxilacarol **26** y metil-lacarol **27**) fueron activas frente a esta diana.

## Actividad antiparasitaria

La actividad antiparasitaria de *A. assoana* se localizó previamente en las fracciones de la parte aérea de las que se aislaron las 3 flavonas (artemetina **6**, 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona **7** y luteolina **8**) y en las fracciones de la raíz transformada de las que se aislaron los fenilpropanoides **23** y **24**. Estos compuestos son muy inestables por tanto se ensayaron fracciones enriquecidas (>80%) en **23** y **24** (**Fr 23** y **Fr 24**) y una fracción adicional (**Fr 25**) enriquecida en un derivado del alcohol coniferílico (figura 91) con varios grupos hidroxilo en su cadena lateral (datos de RMN) que no se ha podido purificar.



**Fig. 91.** Alcohol coniferílico

En la tabla 49 se muestran los resultados de actividad antiparasitaria de flavonas y fracciones enriquecidas en fenilpropanoides. Los compuestos activos fueron la flavona **8** y las fracciones **Fr 24** y **Fr 25**.

**Tabla 49.** Actividad antiparasitaria e ixodidica (*in vitro*) de los compuestos fenólicos. Resultados expresados como % de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar (DL<sub>50</sub> = $\mu$ g/ml)

Productos y Fracciones	<i>T. cruzi</i>		<i>P. davidi</i>	IRE/CTVM20
	100 $\mu$ g/ml	DL <sub>50</sub>	100 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml
<b>6</b>	12,2 $\pm$ 4,6	-	0 $\pm$ 0	34,7 $\pm$ 8,8
<b>7</b>	0 $\pm$ 0	-	35,6 $\pm$ 2,8	7,5 $\pm$ 7,4
<b>8</b>	<b>97,3<math>\pm</math>0,7</b>	<b>45,9 (41,0-51,4)</b>	3,0 $\pm$ 4,3	57,5 $\pm$ 7,8
<b>Fr23</b>	51,4 $\pm$ 2,6	-	10,9 $\pm$ 6,8	-
<b>Fr24</b>	<b>92,2<math>\pm</math>1,4</b>	<b>51,1(45,3-57,5)</b>	-	-
<b>Fr25</b>	<b>98,2<math>\pm</math>0,2</b>	<b>33,8 (32,6-35,1)</b>	-	-
<b>Nifurtimox</b>	<b>99,9<math>\pm</math>0,2</b>	<b>1,9 (1,5-2,3)</b>	-	-

De estos compuestos activos se ha evaluado la citotoxicidad de luteolina (**8**) frente a la línea celular de mamífero (LC5) (Tabla 50). A la máxima concentración ensayada (100  $\mu$ g/ml), el compuesto **8** es más citotóxico que el Nifurtimox, desapareciendo este efecto a partir de 10  $\mu$ g/ml.

**Tabla 50.** Actividad citotóxica de los derivados bromados sobre la línea celular LC5. Resultados expresados como % de crecimiento de las células con respecto al control.

Compuesto	LC5		
	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
<b>8</b>	31,0 $\pm$ 3,6	100	100
<b>Nifurtimox</b>	100	100	100

De las flavonas ensayadas, la única que mostró actividad antiparasitaria fue la flavona más hidroxilada, luteolina (**8**). Estudios de relaciones de estructura-actividad frente a *T. cruzi* de flavonas sugieren que las más activas son las hidroxiladas en comparación con las metoxiladas (Izumi et al., 2011).

Se han publicado numerosas revisiones sobre la aplicación de flavonoides en el control de enfermedades parasitarias, y concretamente en la enfermedad de Chagas (Kerboeuf et al., 2008; Schmidt et al., 2012; Scotti et al., 2016; Nabavi et

al., 2017). Las flavonas 5,6,7-trimetoxi-4'-metoxiflavona y sakuranetin (5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona) de *Bacharis retusa* tuvieron actividad *in vitro* frente a tripomastigotes pero no sobre amastigotes (Grecco et al. 2010). La luteolina (**8**) es un compuesto al que se le atribuye actividad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria y antialérgica, y de la cual recientemente se han descrito los parámetros farmacocinéticos en ratas (Lin et al., 2015). También se ha descrito su actividad antiparasitaria frente a tripomastigotes de *T. cruzi* ( $IC_{50}=21,4\mu\text{g}/\text{m}$ ) (Tasdemir et al., 2006). Artemetina (**6**) ya se había ensayado sobre el crecimiento de *T. cruzi* y *Leishmania infantum* sin efectos positivos (González-Coloma et al., 2012), aunque se han descrito sinergismos entre flavonas (Hoet et al., 2004), incluyendo la artemetina o la casticina con artemisinina frente a *Plasmodium falciparum* (Ferreira et al., 2010; de Monbrison et al., 2006; Liu et al., 1992). 5-Hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**7**) se ha descrito como activa sobre epimastigotes y tripomastigotes (Beer et al., 2016). En este caso los autores emplearon otra metodología que podría explicar esta discrepancia de resultados.

Las fracciones ricas en fenilpropanoides (**Fr24**, **Fr25**) mostraron una actividad antiparasitaria destacable. Compuestos de este tipo se han ensayado frente a distintos parásitos obteniendo resultados prometedores. Fenilpropanoides glicosilados fueron ensayados frente a *Leishmania donovani* mostrando  $DL_{50}$  de 30,08, 15,07 y 6,71  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a su vez mostraron tener actividad antioxidante (Abdel-Mageed et al., 2012). El ácido cafeico e hidrocafeico mostraron una mayor actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, seguido de *L. donovani* y por último *Trypanosoma cruzi* ( $DL_{50} >30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Tasdemir et al., 2006). Otro trabajo sobre *L. donovani*, mostró el potencial de este tipo de compuestos como antiparasitarios, y su baja toxicidad frente a líneas celulares de mamífero. Los autores también describieron la capacidad inmunomoduladora de estos compuestos (da Costa-Silva et al, 2015). Este tipo de compuestos tienen distintos modos de acción, por ejemplo el dehidrodieugenol, activo frente a

tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* actúa alterando la permeabilidad de la membrana y provoca la muerte del parásito (Grecco et al., 2017). Algunos son activos frente a los tripomastigotes pero no ejercen ningún efecto sobre las formas amastigotes (Bastos et al., 1999).

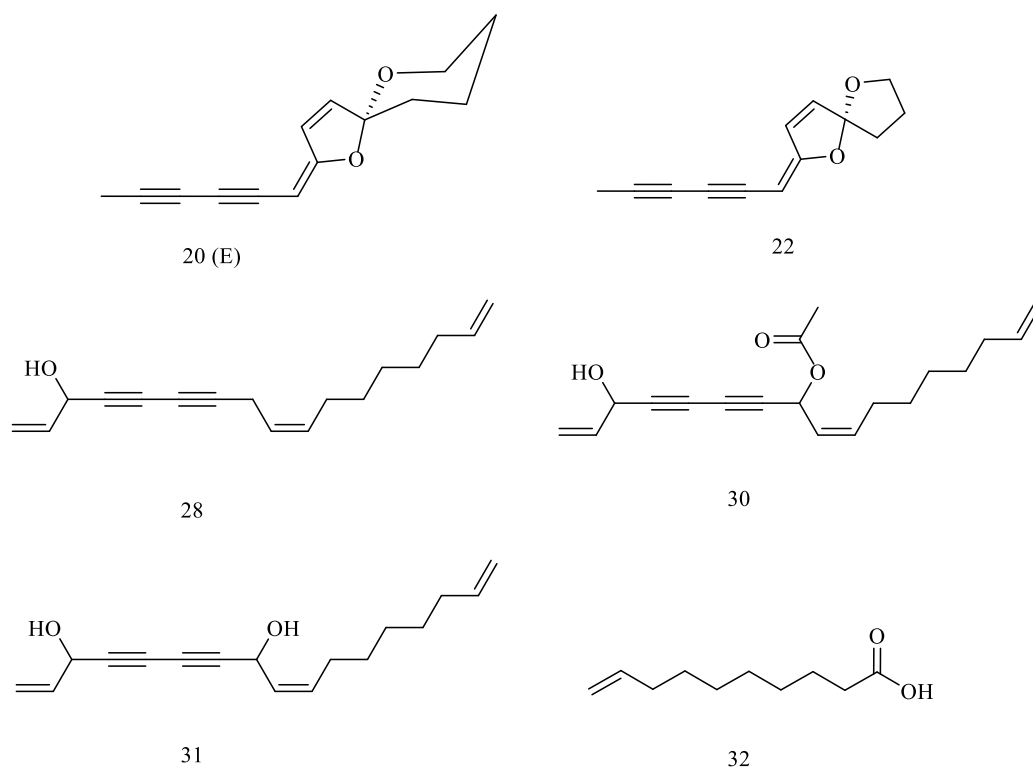
Por tanto, de los compuestos ensayados la flavona hidroxilada luteolina (**8**) y las fracciones (**Fr24** y **Fr25**) ricas en fenilpropanoides tiene actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi*.

### 6.3 Poliacetilenos, espiroacetales y ácidos grasos

Del estudio de la raíz transformada de *A. assoana* se aislaron mayoritariamente compuestos de tipo espiroacetal (**20**, **21** y **22**). En el estudio de la raíz *A. armeniaca* se aislaron los poliacetilenos 3-dehidrofalcarinol (**28**), 8-dehidrofalcarinol (**29**), 8-acetatofalcarindiol (**30**) y el 3,8-dehidrofalcarindiol (**31**) y el ácido-9-decanoico (**32**). En la figura 92 se muestran los compuestos que fueron ensayados.

Los poliacetilenos son compuestos naturales derivados de ácidos grasos formados por largas cadenas de carbonos (Baek et al., 1995) que han mostrado tener actividad insecticida, fungicida, nematocida y fitotóxica (Stevens et al., 1990). Se caracterizan por poseer al menos dos enlaces triples (C-C) generalmente conjugados. Son compuestos típicos en plantas de la familia Asteraceae (Christensen, 2010; 2011) y se ha visto que numerosas plantas comestibles como las zanahorias (*Daucus carota*), la lechuga (*Lactuca sativa*) o el perejil (*Petroselinum crispum*) son productoras de este tipo de compuestos, a los que se les atribuyen beneficios para la salud (Dawid et al., 2015; Negri, 2015). A su vez, se ha observado que muchos de ellos son fototóxicos y requieren de luz UV de 300-300 nm de longitud de onda para ser tóxicos o mostrar su actividad biológica (Christensen y Lam, 1990). Dentro de estos compuestos, los poliacetilenos del tipo falcarinol (C17) son los más comunes. La producción de

este tipo de compuestos por parte de las plantas depende del tipo de cultivo, su localización geográfica, el estrés hídrico, y de factores como su almacenaje, del proceso de extracción, etc (Kidmose et al., 2004; Kjellenberg et al., 2010).



**Fig. 92.** Estructura química de los espiroacetales, poliacetilenos y el ácido graso ensayados.

Los compuestos espiroacetales se caracterizan por tener 14 carbonos. Estos compuestos son poliacetilenos unidos a un grupo espiro formado por dos anillos unidos por un solo carbono y son exclusivos del género *Artemisia* (Robertson y Naud, 2008; Miyakoshi y Mukai, 2003; Tan et al., 1992). Los acetilenos espiroacetales se conocen por su actividad citotóxica (Kuklev et al., 2013). Compuestos de este tipo aislados de *Artemisia lactiflora* mostraron actividad sobre líneas tumorales, de cáncer de mama y colon (Nakamura et al.,



1999). Otros compuestos aislados de hojas de *Plagius flosculosus* mostraron actividad frente a una línea celular de leucemia (Casu et al., 2006).

Los poliacetilenos espiroacetales **20** y **22** fueron mayoritarios en el estudio fitoquímico de la raíz y ya habían sido descritos como parte de la composición química de *A. assoana* (Martínez et al., 1987). El poliacetileno **28** ha sido aislado de otras especies de *Artemisia* como *A. borealis*, *A. capillaris* y, de un árbol nicaragüense, *Dendropanax arboreus* (Wang et al., 1990; Harada e Iwasaki, 1982; Bernart et al., 1996). Esta es la primera vez que se documenta su aislamiento de la raíz de *A. armeniaca*. Desde nuestro conocimiento, el ácido ácido-9-decanoico (**32**) no se había aislado previamente como compuesto natural.

### Actividad insecticida

**Tabla 51.** Actividad antialimentaria de **28**

Productos	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
	%SI <sup>a</sup>	%SI <sup>a</sup>
<b>28</b>	<b>79,9±5,7</b>	<b>85,9±4,0</b>

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la alimentación. Ensayado a 50µg/cm<sup>2</sup>.

Como el extracto de la raíz de *A. armeniaca* no fue activo frente a *S. littoralis*, el 3-dehidrofalcarinol (**28**) sólo se ensayó frente a los áfidos, donde mostró una inhibición del asentamiento considerable, siendo más activo frente a *R. padi* que frente a *M. persicae* (Tabla 51).

El compuesto (**28**) está involucrado en la defensa de la planta ante daños físicos como el ataque de un animal o insecto, el ataque de patógenos o el estrés (Howe y Schillmiller, 2002). Además se ha descrito la actividad larvicida de poliacetilenos frente *Aedes aegypti* (Arnason et al., 1981). Se ha descrito también su actividad repelente frente a adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera) siendo el ester *cis*-dehidromatricaria el más potente (DL<sub>50</sub>=4,06 mg/l de aire). Los

autores propusieron que dicha actividad provenía de la presencia de un enlace acetilénico en la molécula (Zhang et al., 2017).

### Actividad nematocida

De la raíz *A. armeniaca* se aisló el ácido 9-decanoico (**32**), que mostró una fuerte actividad nematocida con una DL<sub>90</sub> de 0,13 mg/ml (Tabla 52).

**Tabla 52.** Actividad nematocida de los dos productos obtenidos tras el fraccionamiento biodirigido de *A. armeniaca*

Producto	% Mortalidad <i>M. javanica</i> J2	
	DL <sub>50</sub> <sup>a</sup>	DL <sub>90</sub> <sup>b</sup>
Ácido 9-decanoico ( <b>32</b> )	0,070 (0,06-0,08)	0,14 (0,12-0,16)

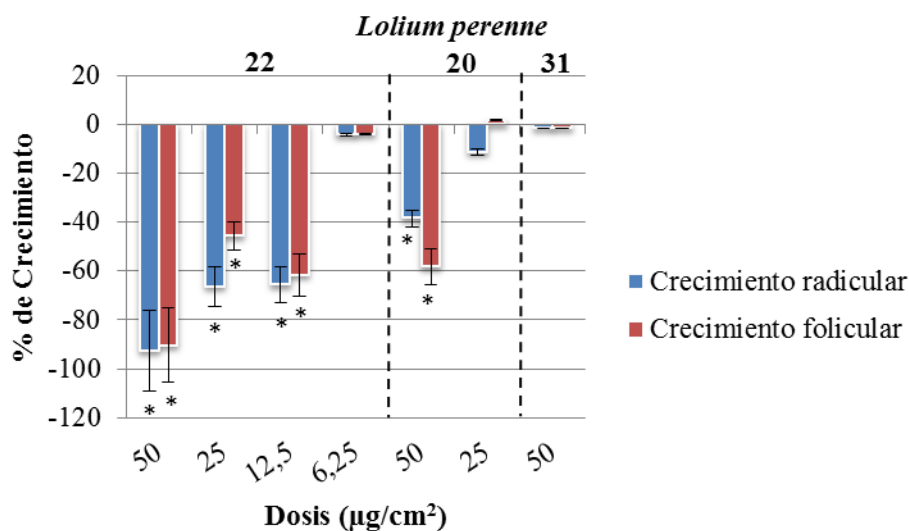
<sup>a</sup>DL<sub>50</sub> <sup>b</sup>DL<sub>90</sub>

Hidrocarburos alifáticos como el ácido palmítico, el oleico, y el linoleico, entre otros, aislados de raíces de *Iris japonica* mostraron tener actividad nematocida frente a *Aphelenchoides besseyi* (Munakata 1983). Se ha visto que este tipo de compuestos tienen diferentes modos de acción. Unos previenen la infección de las raíces de tomate con *M. incognita*, reducen el daño en la raíz tras la infección o inhiben la eclosión de los huevos (Zhou et al., 2012). Estudios sobre la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos mostraron que los alcoholes alifáticos, seguidos de los aldehídos y ácidos son más activos que los hidrocarburos y acetatos (Seo et al., 2010).

### Actividad fitotóxica

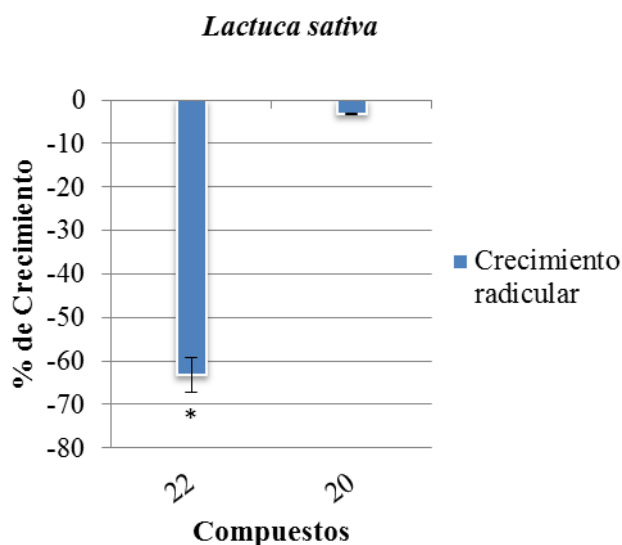
El extracto de raíz transformada de *A. assoana* y raíz aeropónica de *A. armeniaca* mostraron actividad fitotóxica sobre *L. perenne*. La figura 93 muestra los resultados de los espiroacetales **20** y **22** y el poliacetileno **31**.

El compuesto **22** mostró una fuerte actividad fitotóxica sobre la germinación (hasta el final del experimento) y el crecimiento. La única diferencia que hay entre estos dos compuestos, sin tener en cuenta la estereoquímica, está en el anillo B con un grupo furano (**22**), o pirano (**20**) (Fig. 92). Otros trabajos han demostrado que en ensayos de actividad antialimentaria frente a *S. littoralis*, los compuestos con el anillo furano fueron más activos que dos isómeros con el anillo de pirano (Barrero et al., 2013). Por tanto, la existencia de esa diferencia en el tamaño de los anillos B parece la responsable de la actividad.



**Fig. 93.** Actividad fitotóxica de los espiroacetales (**22** y **20**) y el poliacetileno **31** frente a *Lolium perenne*. Porcentaje de crecimiento de la raíz y la hoja con respecto al control (n=25). Compuesto **22** a (50, 25, 12,5 y 6,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); **20** (50 y 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y **31** (50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). \* diferencia significativa respecto al control p>0.05, Test LSD.

Frente a *L. sativa* (Fig. 94) el compuesto (**20**) con el anillo pirano no fue activo mientras que el espiroacetal (**22**) inhibió en un 60 % el crecimiento radicular. Ninguno de los dos mostraron un efecto negativo frente a la germinación de esta especie dicotiledónea.



**Fig. 94.** Actividad fitotóxica de los espiroacetales (**22** y **20**) frente a *Lactuca perenne*. Porcentaje de crecimiento de la raíz con respecto al control (n=25). Ensayados a 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . \* diferencia significativa respecto al control  $p > 0.05$ , Test LSD.

### Actividad antiparasitaria.

Tanto la parte aérea como la raíz de *A. assoana* mostraron actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi*. Sobre *P. davidi* sólo fue activo el extracto de la raíz transformada de *A. assoana*. Los extractos de la raíz de *A. armeniaca* fueron activos frente a los dos parásitos objeto de estudio.

Los resultados frente a los dos tripanosomátidos se muestran en la tabla 53. El compuesto 3,8-didehidrofalcarindiol (**31**) mostró una fuerte actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* ( $\text{DL}_{50}$  de 8,34  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), seguido de **28**, y **22**. Frente a *P. davidi*, el **28** y **31** fueron los más activos ( $\text{DL}_{50}$  de 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), seguidos de **20** y **22**, que presentaron dosis efectivas similares frente a los dos parásitos. El compuesto **30** fue el menos activo frente a las dos dianas.

**Tabla 53.** Actividad antiparasitaria de los poliacetilenos frente a *T. cruzi* y *P. davidi*. Resultados expresados como % de inhibición del crecimiento  $\pm$  error estándar. (DL<sub>50</sub> =  $\mu\text{g/ml}$ )

Producto	Origen	<i>T. cruzi</i>		<i>P. davidi</i>	
		100 $\mu\text{g/ml}$	DL <sub>50</sub>	100 $\mu\text{g/ml}$	DL <sub>50</sub>
20	AasRT	92,9 $\pm$ 4,4	42,2 (37,5-47,4)	88,9 $\pm$ 0,6	27,4 (25,3-29,6)
22		97,3 $\pm$ 0,2	23,6 (20,0-27,9)	86,2 $\pm$ 1,2	37,6 (33,4-42,4)
28	AarR	97,7 $\pm$ 0,3	9,9(8,1-12,2)	98,0 $\pm$ 0,1	14,3(9,8-20,9)
30		75,8 $\pm$ 1,1	59,2(56,4-62,2)	15,59 $\pm$ 7,0	-
31		97,2 $\pm$ 0,4	8,3(6,6-10,6)	98,4 $\pm$ 0,1	14,8(11,1-19,7)

Los productos puros se ensayaron sobre la línea celular LC5 (Tabla 54).

El compuesto **28** mostró citotoxicidad a la máxima concentración seguido del **22**.

**Tabla 54.** Actividad citotóxica de los productos puros aislados de *A. assoana* sobre la línea celular LC5. Resultados expresados como % de crecimiento de las células con respecto al control.

Producto	LC5		
	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
20	92,6 $\pm$ 1,0	93,0 $\pm$ 4,6	96,9 $\pm$ 5,6
22	71,4 $\pm$ 6,9	77,6 $\pm$ 5,9	83,1 $\pm$ 7,7
28	22,8 $\pm$ 0,4	92,0 $\pm$ 3,2	97,8 $\pm$ 6,5
30	95,1 $\pm$ 7,1	92,4 $\pm$ 1,4	97,7 $\pm$ 2,2
31	84,6 $\pm$ 5,1	91,9 $\pm$ 2,0	94,3 $\pm$ 2,3

Se ha descrito la actividad del compuesto **28** frente a promastigotes (IC<sub>50</sub>= 0,55  $\mu\text{M}$ ) y amastigotes (IC<sub>50</sub>= 0,45  $\mu\text{M}$ ) de *Leishmania mexicana* LV4A y una dosis de 3  $\mu\text{M}$  inhibió en un 60% el número de macrófagos infectados sin citotoxicidad (Martín-Quintal et al., 2010). El estudio de la actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani* de poliacetilenos aislados de la raíz de *Cussonia zimmermannii* ha demostrado que la posición de los sustituyentes (acetato e hidroxilos) es determinante en la pérdida o ganancia de actividad, así como el número de dobles enlaces (Senn et al., 2007). En este estudio, la presencia del grupo acetato

conlleva a una pérdida de actividad y los grupos hidroxilo confieren actividad, siendo mayor en el compuesto que posee mayor número de grupos hidroxilo (**31**).

El falcarinol, panaxydol y panaxitriol así como otros poliacetilenos relacionados han mostrado una fuerte actividad citotóxica sobre distintas líneas tumorales (leucemia, melanoma, cáncer de mama. etc) (Matsunaga et al., 1990; Matsunaga et al., 1989; Tan et al., 2014). Además un estudio sobre su actividad citotóxica con una línea de fibroblastos humanos resultó en un DL<sub>50</sub> 20 veces mayor que la obtenida frente a una línea celular tumoral (Matsunaga et al., 1990). El 3,8-dehidrofalcarindiol (**31**), aislado de *Artemisia monosperma*, es un compuesto citotóxico muy activo frente a líneas celulares de cáncer de colon y mama (Stavri et al., 2005).

## CONCLUSIONES

1. Se han puesto a punto y validado los siguientes métodos de ensayo *in vitro* de extractos y productos naturales: (1) antiparasitario sobre *Phytomonas davidi* y (2) ixodicida sobre líneas celulares de garrapata.

2. En base a la producción de biomasa se demuestra que el cultivo aeróbico es el cultivo más adecuado para la producción de *A. armeniaca* y el cultivo de raíz transformada para *A. assoana*.

3. En base a los perfiles químicos de los extractos se determina que el cultivo aeróbico es el más adecuado para obtener un mayor rendimiento de los metabolitos de interés en ambas especies.

4. El aceite esencial de *A. assoana* (con actividad ixodicida *in vitro* e *in vivo*, nematocida, antifúngica y antiparasitaria) se caracteriza por la presencia de 1,8-cineol y alcanfor y el de *A. armeniaca* (con actividad ixodicida *in vitro*) se caracteriza por la presencia de 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

5. El hidrolato de *A. assoana* mostró un potente efecto nematocida y nematostático. Los extractos de parte aérea de *A. assoana* fueron antialimentarios frente a insectos, fitotóxicos frente a *L. perenne* y antiparasitarios (*T. cruzi*). Los extractos de raíz tuvieron efecto antiparasitario. Los extractos de la parte aérea de *A. armeniaca* fueron antialimentarios frente a insectos y los de raíz nematocidas y antiparasitarios (*T. cruzi*, *P.davidi*).

6. El estudio fitoquímico de *A. assoana* resultó en el aislamiento de cinco lactonas sesquiterpénicas (**1**, **2**, **3**, **4** y **5**), tres flavonas (**6**, **7** y **8**) y dos monoterpenos (**9** y **10**) de la parte aérea, y tres espiroacetales (**20**, **21** y **22**) y dos fenilpropanoides (**23** y **24**) de la raíz transformada.

7. El estudio fitoquímico de *A. armeniaca* resultó en el aislamiento de dos cumarinas (**26** y **27**) de la parte aérea y cuatro poliacetilenos (**28**, **29**, **30** y **31**) y un ácido graso (**32**) de la raíz.

8. La biotransformación fúngica de achillín (**1**) dio como resultado los derivados 8 $\alpha$ -hidroxi-achillín (**5**), 8 $\beta$ -hidroxi-achillín (**11**), 14-hidroxi-achillín (**12**) y el compuesto (**13**).

9. Mediante reacciones semisintéticas con achillín (**1**) como sustrato se obtuvieron 6 derivados bromados (**14**, **15**, **16**, **17**, **18** y **19**).

10. El compuesto achillín (**1**) fue la lactona sesquiterpénica más activa (insecticida frente a *S. littoralis* y fitotóxica frente a *L. perenne*). La presencia de hidroxilos, epóxidos o átomos de Bromo disminuye esta actividad. Las lactonas sesquiterpénicas fitotóxicas (**1**, **4**, **5**, **14**, **16**, **18**, **2**) tuvieron acción selectiva frente a la especie monocotiledónea *L. perenne*. Los compuestos bromados **16** y **19** fueron antiparasitarios.

11. Las cumarinas **26** y **27** tienen efectos antialimentarios y fitotóxicos sinergistas en mezclas binarias. La flavona luteolina (**8**), es antiparasitaria frente a *T. cruzi*. Los fenilpropanoides (**23** y **24**) son los compuestos antiparasitarios más potentes.

12. Los espiroacetales fueron fitotóxicos, siendo el **22** el más potente, además mostraron efectos antiparasitarios. Los poliacetilenos fueron antiparasitarios. El ácido 9-decanoico (**32**) es un nuevo agente nematicida.



## CONCLUSIONS

1. Two *in vitro* protocols to test natural products and extracts have been developed and validated (1) an antiparasitic test against *Phytomonas davidi* and (2) an ixodicidal test against tick cell lines.

2. Based on biomass production yields we concluded that aeroponic cultivation is the best tool for the production of *A. armeniaca* and *in vitro* culture of transformed root for the production of *A. assoana*.

3. Based on the results of HPLC-MS and GC-MS analysis of the extracts, the aeroponic cultivation gave the best metabolite production for both *Artemisia* species.

4. *A. assoana* essential oil (with *in vitro* and *in vivo* ixodicidal, nematicidal, antifungal and antiparasitic effects), had 1,8-cineol and camphor as mayor compounds. *A. armeniaca* essential oil (with *in vitro* ixodicidal activity) had 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone as the major compound.

5. *A. assoana* hydrolate showed potent nematicidal and nematostatic effects. The extracts of aerial parts of *A. assoana* were insect antifeedants, phytotoxic against *L. perenne* and antiparasitic (*T. cruzi*). Root extracts had an antiparasitic effect. Extracts from the aerial part of *A. armeniaca* were insect antifeedants and the root extracts were nematicidal and antiparasitic (*T. cruzi*, *P. davidi*).

6. The phytochemical study of the aerial part of *A. assoana* resulted in the isolation of 5 sesquiterpene lactones (1, 2, 3, 4 and 5), 3 flavones (6, 7 and 8) and 2 monoterpenes (9 and 10), while the study of the transformed root gave 3 spiroacetals (20, 21 and 22) and 2 phenylpropanoids (23 and 24).

7. The phytochemical study of the aerial part of *A. armeniaca* resulted in the isolation of 2 coumarins (**26** and **27**), while the root gave 4 polyacetylenes (**28**, **29**, **30** and **31**) and 1 fatty acid (**32**).

8. The fungal biotransformation of achillín (**1**) yielded 4 compounds, 8 $\alpha$ -hydroxyachillin (**5**), 8 $\beta$ -hydroxyachillin (**11**), 14-hydroxyachillin (**12**) and 3,9-dimethyl-2,7-dioxo-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,9 $\beta$ -decahydroazulene[4,5- $\beta$ ]furan-6-carbaldehyde (**13**).

9. Semisynthetic reactions of achillin (**1**) gave 6 brominated derivatives (**14**, **15**, **16**, **17**, **18** and **19**).

10. The most active sesquiterpene lactone was achillín (**1**) (antifeedant against *S. littoralis* and phytotoxic to *L. perenne*). The presence of hydroxyl or epoxide groups or bromine atoms decreased this activity. The phytotoxic sesquiterpene lactones (**1**, **4**, **5**, **14**, **16**, **18**, **2**) had selective action against the monocotyledoneous species *L. perenne*. Brominated compounds **16** and **19** were antiparasitic.

11. Coumarins **26** and **27** have synergistic antifeedant and phytotoxic effects in binary mixtures. Luteoline (**8**) is antiparasitic against *T. cruzi*. Phenylpropanoids (**23** and **24**) are the most potent antiparasitic compounds.

12. The spiroacetals were phytotoxic, with **22** being the most potent, and antiparasitic. The polyacetylenes were antiparasitic. 9-Decanoic acid (**32**) is a novel nematocidal agent.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad Martínez, M.J., Bedoya del Olmo, L.M., Apaza Ticona, L., Bermejo Benito, P., 2012. Chapter 2 – The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Sesquiterpene Lactones. *Studies in Natural Products Chemistry* 37, 43-65.
- Abbate, S. 2002. An overview of the therapeutic application of moxibustion. *The Journal of Chinese Medicine* 69, 5-12.
- Abdel-Mageed, W.M., Backheet, E.Y., Khalifa, A.A., Ibraheim, Z.Z., Ross, S.A. 2012. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and irioid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia* 83, 500-507.
- Abdollahi Mandoulakani, B., Eyvazpour, E., Ghadimzadeh, M. 2017. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 139, pp. 1-7.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: locations and functional significance. *Plant Science* 196, 67-76.
- Ahuja, N., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. 2015. Eugenol-inhibited root growth in *Avena fatua* involves ROD-mediated oxidative damage. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 118, 64-70.
- Al-Amiery, A.A., Kadhun, A.A.H., Mohamad, A.B., 2012. Antifungal activities of new coumarins. *Molecules* 17, 5713–5723.
- Alegre-Gómez, S., Sainz, P., Simões, M.F., Rijo, P., Moiteiro, C., González-Coloma, A., Martínez-Díaz, R.A. 2017. Antiparasitic activity of diterpenoids against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica* 83, 306-311.
- Aljbar, A.M., Hussain, A., Rizwan-ul-Haq, M., Al-Ayedh, H. 2017. Toxicity of plant secondary metabolites modulating detoxification genes expression for natural red palm weevil pesticide development. *Molecules* 22, 169.
- Ammann, N., Pieterse, P. J. (2005). Effects of artemisia afra leaf extracts on seed germination of selected crop and weed species. *South African Journal of Plant and Soil*, 22(4), 263-265. Retrieved from [www.scopus.com](http://www.scopus.com)
- Anand, P., Singh, B., Singh, N., 2012. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 1175–1180.
- Andrés, M.F., González-Coloma, A., Muñoz, R., De la Peña, F., Julio, L.F., Burillo, J. 2017. Nematicidal potential of hydrolates from the semi industrial vapor-pressure extraction of Spanish aromatic plants. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-017-9429-z

- Andrés, M.F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., Sainz, P. 2012. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochemistry Reviews* 11, 371-390.
- Antonious, G.F., Dahlman, D.L., Hawkins, L.M. 2003. Insecticidal and acaricidal performance of methyl ketones in wild tomato leaves. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 400-407.
- Antonious, G.F., Kochhar, T.S., Simmons, A.V. 2005. Natural products: seasonal variation in trichome counts and contents in *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 40, 619-631.
- Antonious, G.F.; Snyder, J.C. 2006. Natural products: repellency and toxicity of wild tomato leaf extract to the two-spotted spider mite. *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41, 43-55.
- Antonious, G.F., Snyder, J.C., Dahlman, D.L. 1999. Tomato cultivar susceptibility to cotton leafworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Entomological Science* 34, 171-182.
- Araniti, F., Gullì, T., Marrelli, M., Statti, G., Gelsomino, A., Abenavoli, M. R. 2016. *Artemisia arborescens* L. leaf litter: Phytotoxic activity and phytochemical characterization. *Acta Physiologiae Plantarum* 38(5), doi:10.1007/s11738-016-2141-7.
- Araniti, F., Lupini, A., Sorgonà, A., Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G. A., Menichini, F., Abenavoli, M. R. 2013. Allelopathic potential of *Artemisia arborescens*: Isolation, identification and quantification of phytotoxic compounds through fractionation-guided bioassays. *Natural Product Research* 27, 880-887.
- Araniti, F., Sorgonà, A., Lupini, A., Abenavoli, M. R. 2012. Screening of mediterranean wild plant species for allelopathic activity and their use as bio-herbicides. *Allelopathy Journal* 29, 107-124.
- Asili, J., Emami, S.A., Eynolghozat, R., Noghab, Z.S., Bazzaz, B.S.F., Sahebkar, A. 2015. Chemical composition and in vitro efficacy of essential oil of seven *Artemisia* species against ESBL producing multidrug-resistant. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18, 124-145.
- Baeva, R.T., Nabizade, L-I., Zapesochnaya, G.G., Karryev, M.O. 1988. Flavonoids of *Artemisia annua*. *Chemistry of Natural Compounds* 24: 256-267.
- Bailén, M., Julio, L.F., Díaz, C.E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R.A., Cabrera, R., Burillo, J., González-Coloma, A. 2013. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 49, 102-107.
- Baker, S.E. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology* 44, S17-S21.

- Balachowsky, A. S., 1972. Entomologie Appliquee a L'Agriculture. Traité Tome II Lèpidoptèrès. Ed. Masson et Cie 1050-1627.
- Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., Ortiz, S., eds. 2011. Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España. Adenda 2010. Dirección General para de Medio Natural Política Forestal, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, 154pp.
- Barandika Iza, J.F. 2010. Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. Tesis Doctoral. Universidad de León, España.
- Barrero, A.F., Herrador del Pino, M.M., González Portero, A., Arteaga Burón, P., Arteaga J.F., Burillo Alquézar, J., Díaz C.E., González-Coloma, A., 2013. Terpenes and polyacetylenes from cultivated *Artemisia granatensis* boiss (Royal chamomile) and their defensive properties. *Phytochemistry* 94, 192-197.
- Beena, Rawat, D. 2013. Antituberculosis drug research: a critical overview. *Medicinal Research Reviews* 33, 693-764.
- Beer, M.F., Frank, F.M., Elso, O.G., Bivona, A.E., Cerny, N., Giberti, G., Malchiodi, E.L., Martino, V.S., Alonso, M.R., Sülsen, V.P., Cazorla, S.I. 2016. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satueiifolia*. *Pharmaceutical Biology* 54, 2188-2195.
- Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., Jongejan, F. 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology* 23, 450-457.
- Bellomaria, B., Valentini, G., Biondi, E. 1993. Essential oil composition of *Artemisia thuscula* Cav. From the Canary Island. *Journal of Essential Oil Research* 5, 391-396.
- Bentley, M.D., Stoddard, W.F., Zalkow, L.H. 1984. Purrolizidinealkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferama* (Lepidoptera:Tortricidae). *Annals of the Entomological Society of America* 77, 393.
- Bernart, M.W., Cardellina, J.H., Balaschak, M.S., Alexander, M.R., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. 1996. Cytotoxic Falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *Journal of Natural Products* 59, 748-753.
- Bézanger-Beauquesne, L., Pinkas, M., Torck, M., Trotin, F. 1990. Les plantes médicinales des régions tempérées. Maloine, Paris.
- Biamonte, M.A., Wanner, J., Le Roch, K.G. 2013. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 2829-2843.
- Bilia, A.R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M.C., Donato, R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial

properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 1–7, doi:10.1155/2014/159819

- Bilz, M., Kell, S.P., Maxted, N., Lansdown, R.V. 2011. European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Biondi, E., Valentini, G., Bellomaria, B. 2000. Essential oil of some halophyte and subhalophyte taxa *Artemisia* L. from the central European Mediterranean. Journal of Essential Oil Research 12, 365–371.
- Bird, D.McK., Williamson, V.M., Abad, P., McCarter, J., Dnachin, E.G.J. 2009. The genome of root-knot nematodes. Annual Review of Phytopathology 47, 333-351.
- Bissinger, B.W., Roe, M.R. 2010. Tick repellents: past, present, and future. Pesticide Biochemistry and Physiology 96, 63-79.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 1984. Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide. Wiley, New York.
- Bleve-Zacheo, T., Melillo, M.T., Castagnone-Sereno, P. 2007. The contribution of biotechnology to root-knot nematode control in tomato plants. Pest Technology 1, 1-16.
- Bohlmann, F., Borthakur, N., Jakupovic, J., Pickard, J. 1982. Four guaianolides, a eudesmanolide and a germacranolide from *Ursinia saxatilis*. Phytochemistry 21, 1357-1360.
- Bohlmann, F., Fritz, U. 1978. Neue diterpene und acetylenverbindungen aus nidorella-arten. Phytochemistry 17, 1769-1772.
- Bohlmann, F., Jakupovic, J., Warning, V., Grenz, M., Chau-Thi, R.M., Robinson, H. 1986. Sesquiterpenes with new carbon skeletons, furoeremophilanes, seco-eremophilanes and other constituents from Argentinian Senecio species. Bulletin des Sociétés Chimiques Belges 95, 707-736.
- Bora, K.S., Sharma, A., 2011. The genus *Artemisia*: A comprehensive review. Pharmaceutical Biology 49, 101-109.
- Borsutzki, L.H. 1955. Chemistry of *Artemisia maritima*. Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 288, 336-340.
- Bravetti, M.M.D.M., Vico, R.V., Carpinella, M.C., Ferrayoli, C.C., Palacios, S.M. 2017. Phytotoxic phenylpropanoids isolated from *Ophryosporus charua* (Griseb.) Hieron. Phytochemistry 138, 145-151.
- Breganó, J.W., Picao, R.C., Krominski, G., Andrade Menolli, R., Itow Jankevicius, S., Pingue Filho, P., Jankevicius, J.V. 2003. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. FEMS Immunology and Medical Microbiology 39, 257-264.

- Bretón, J.L., Camps, F., Coll, J., Eguren, L., Gavín, J.A., González, A.G., Martorell, X., Miratvilles, C., Molins, E., Torramilans, J. 1985. Isolation and structural elucidation of heliangolidin, a new sesquiterpene lactone from *Artemisia canariensis*. *Tetrahedron* 41, 3141–3146.
- Bringmann, G., Hertlein-Amslinger, B., Kajahn, I., Dreyer, M., Brun, R., Moll, H., Stich, A., Ioset, K.N., Schmitz, W., Ngoc, L.H. 2011. Phenolic analogs of the N,C-coupled naphthylisoquinoline alkaloid ancistrocladinium A, from *Ancistrocladus cochinchinensis* (Ancistrocladaceae), with improved antiprotozoal activities. *Phytochemistry* 72, 89-93.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126, 524-535
- Buer, C.S., Djordjevic, M.A. 2009. Architectural phenotypes in the transparent *testa* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 60, 751-763.
- Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Khodakovskaya, M.V., Glazunov, V.P., Radchenko, S.V., Zvereva, E.V., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *Journal of Biotechnology* 15, 1-14.
- Bustamante, J. M., Tarleton, R. L. 2011. Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. *Expert Opinion Drug Discovery* 6, 653-661.
- Caboni, P., Aissani, N., Cabras, T., Falqui, A., Marota, R., Liori, B., Ntalli, N., Sarais, G., Sasanelli, N., Tocco, G. 2013. Potent nematocidal activity of phthalaldehyde salicylaldehyde, and cinnamic aldehyde against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 1794-1803.
- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 6, 93-100.
- Camargo, E.P., Wallace, F.G. 1994. Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida) In: *Advances in disease vector research*. New York: Springer-Verlag Inc. Vol X, pp. 333-359.
- Cantrell, C.L., Jones, A.M.P., Ali, A. 2016. Isolation and Identification of Mosquito (*Aedes aegypti*) Biting-Deterrent Compounds from the Native American Ethnobotanical Remedy Plant *Hierochloë odorata* (Sweetgrass). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 8352-8358.
- Carnat, a., Heitz, A., Fraisse, A., Carnat, A.P., LAmaison, J.L. 2000. Major decaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. *Fitoterapia* 71, 587-589.

- Casu, L., Bonsignore, L., Pinna, M., Casu, M., Floris, C., Gertsch, J., Cottiglia, F. 2006. Cytotoxic diacetylenic spiroketal enol ethers from *Plagius flosculosus*. *Journal of Natural Products* 69, 295-298.
- Chandra, S., 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolis. *Biotechnology Letters* 34, 407-415.
- Chandra, S., Chandra, R., 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews* 10, 371-395.
- Chaturvedi, D. 2011. Chaper 10: "Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities". En: Tiwari, V.K., Mishra, B.B., eds. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. Research Signpost, Keral, India, pp. 313-334.
- Chatzivasileiadis, E.A., Sabelis, M.W. 1997. Toxicity of methyl ketones from tomato trichomes to *Tetranychus urticae* Koch. *Experimental and Applied Acarology* 21, 473-484.
- Chaumont, F., Schanck, A.N., Blum, J.J., Opperdoes, F.R. 1994. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 321-331.
- Christensen, L.P. 2010. Bioactivity of polyacetylenes in food plants. En: *Bioactive Foods in Promoting Health*; Watson, R.R., Preedy, V.R., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 285-306.
- Christensen, L.P. 2011. Aliphatic C17-Polyacetylenes of the Falcarinol Type as Potential Health Promoting Compounds in Food Plants of the Apiaceae Family. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3, 64-77.
- Cis, J., Nowak, G., Kisiel, W. 2006. Antifeedant properties and chemotaxonomic implications of sesquiterpene lactones and syringing from *Rhaponticum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 862-867
- Corbu, S., Cachița-Cosma, D. 2009. Study on the alelopathic action of the watery extract of *Artemisia absinthium* L. upon the germination of the caryopses and of the growth of the plantlets of *Triticum aestivum* L., *Lolium perenne* L. and of *Bromus inermis* L. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 19(2), 295-301.
- Costa, R., Ragusa, S., Russo, M., Certo, G., Franchina, F.A., Zanotto, A., Grasso, E., Mondello, L., Germano, M.P. 2016. Phytochemical screening of *Artemisia arborescens* L. by means of advanced chromatographic techniques for identification of health-promoting compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 117,499-509.
- Creed, C., Mollhagen, A., Mollhagen, N., Pszczolkowski, M. A. 2015. *Artemisia arborescens* "powis castle" extracts and  $\alpha$ -thujone prevent fruit infestation by codling moth neonates. *Pharmaceutical Biology*, 53, 1458-1464.



- Cretton, S., Bartholomeusz, T.A., Mehl, F., Allenbach, Y., Matheerssen, A., Cos, P., Maes, L., Christen, P. 2014. Synthesis and In vitro evaluation of tropane halogenated-derivatives against malaria, sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis. *Medicinal Chemistry* 10, 753-758.
- Cruz, E.M., Costa, L.M., Jr., Pinto, J.A., Santos Dde, A., de Araujo, S.A., Arrigoni-Blank Mde, F., Bacci, L., Alves, P.B., Cavalcanti, S.C., Blank, A.F. 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology* 195, 198-202.
- Curini, M., Cravotto, G., Epifano, F., Giannone, G. 2006. Chemistry and biological activity of natural and synthetic prenyloxycoumarins. *Current Medicinal Chemistry* 13, 199-222.
- Da Costa-silva, T.A., Grecco, S.S., de Sousa, F.S., Lago, J.H.G., Martins, E.G.A., Terrazas, C.A., Varikuti, S., Owens, K.L., Berverly, S.M., Sato, A.R., Tempone, A.G. 2015. Immunomodulatory and antileishmanial activity of phenylpropanoid dimers isolated from *Nectandra leucantha*. *Journal of Natural Products* 78, 653-657.
- Dane, Y., Mouhouche, F., Canela-Garayoa, R., Delpino-Rius, A. 2016. Phytochemical analysis of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arabian Journal for Science and Engineering* 41, 2147-2158.
- Dang, Q.L., Kim, W.K., Nguye, C.M., Chijoi, Y.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Park, M.S., Lim, C.H., Luu, N.H., Kim, J.C. 2011. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 11160-11167.
- Dang, Y.-P., Chen, Y.-F., Li, Y.-Q., Zhao, L. 2017. Developments of anticoagulants and new agents with anti-coagulant effects in deep vein thrombosis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 17, 338-350.
- Datta, S., Saxena, D.B. 2001. Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds. *Pest Management Science* 57, 95-101.
- Davies, K.M., Albert, N.W., Schwinn, K.E. 2012. From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology* 39, 619-638.
- Dawid, C., Dunemann, F., Schwab, W., Nothnagel, T., Hofmann, T. 2015. Bioactive C<sub>17</sub>-Polyacetylenes in Carrots (*Daucus carota* L.): current knowledge and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 9211-9222.
- De Clercq, E. 2013. Antivirals: Past, present and future. *Biochemical Pharmacology* 85, 727-744.
- De Monbrison, F., Maitrejean, M., Latour, C., Bugnazet, F., Peyron, F., Barron, D., Picot, S. 2006. In vitro antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilybin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Tropica* 97, 102-107.

- De Souza, L.G., Rennã, M.N., Figueroa-Villar, J.D. 2016. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chemico-Biological Interactions* 254, 11-23.
- De Souza, W., Attias, M. 1991. Cell biology of *Phytomonas*, Trypanosomatids parasites of plants. *Memorias del Instituto de Oswaldo Cruz* 86, 275-284.
- Delort, E., Jaquier, A., Decorzant, E., Chapuis, C., Casilli, A., Frérot, E. 2015. Comparative analysis of three Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars: Identification of unique citrus chemotypes and new volatile molecules. *Phytochemistry* 109, 111-124.
- Dib, I., Angenot, L., Mihamou, A., Ziyat, A., Tits, M. 2016. *Artemisia campestris* L.: ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *Journal Herbal Medicine*, doi:10.1016/j.hermed.2016.10.005.
- Ding, H-Y., Lin, H-C., Teng, C-M., Wu, Y-C. 2000. Phytochemical and pharmacological studies on Chinese *Paeonia* species. *Journal of the Chinese Chemical Society* 47, 381-388.
- Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. *Mensaje bioquímico* 32, 11-24.
- Dollet, M., Sturm, N.R., Campbell, D.A. 2001. The spliced leader RNA gene array in phloem-restricted plant trypanosomatids (*Phytomonas*) partitions into two major groupings: epidemiological implications. *Parasitology* 122, 289-297.
- Donovan, C. 1909. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Chonorrhinus*). *The Lancet* 177, 1195-1196.
- Downum, K.R. 1992. Light-activated plant defence. *New Phytologist* 122, 401-420.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W., Gershenzon, J. 2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceeding of the National Academy of Sciences U S A* 102, 933-8.
- Eblaghi, M., Khajehie, N., Golmakani, M.T., Eskandari, M.H. 2016. Investigating the effects of microwave-assisted hydrodistillation on antioxidant and antifungal activities of *Tanacetum polycephalum* and *Artemisia chamaemelifolia* essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 28, 528-539.
- El Dahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Sarg, T.M. 1985. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron* 41, 309-316.
- Epifano, F., Genovese, S., Menguini, L., Curtini, M. 2007. Chemistry and pharmacology of xyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68, 939-953.
- Escoubas, P., Lajide, L., Mizutani, J. 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66, 99-108.

- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R., Walker, A.R. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology* 38, 219-235.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species. Universidad de Zaragoza.
- Fernandes, M. C., da Silva Jr., E. N., Pinto, A. V., de Castro, S. L., Menna-Barreto, R. F. S. 2012. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 139, 26-36.
- Ferreira, J.F.S., Luthria, D.L., Sasaki, T., Heyerick, A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules* 15, 3135-3170.
- Feuerstein, I., Danin, A., Segal, R. 1988. Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain. *Phytochemistry* 27, 433-434.
- Finlay, K.J., Luck, J.E. 2011. Response of the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) to climate change, in relation to its pest status, vectoring potential and function in a crop-vector-virus pathosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 405-421.
- Fiorini, J.E., Márcio de Faria e Silva, P., Brazil, R.P., Attias, M., Gil Esteves, M.J., Angluster, J. 1993. Axenic cultivation of a pathogenic *Phytomonas* species isolated from tomato fruit, and from its phytophagous insect vector, *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). *Cytobios* 75, 163-170.
- Franca, C. 1920. Flagellose des Euphorbes II. *Ann l'institut Pasteur* 34, 432-465.
- Furbo, S., Mortensen, A.G., Laursen, B., Christophersen, C., Fomsgaard, I.S. 2011. Degradation of biochanin A in soil. *Chemoecology* 21, 59-66.
- Galindo, J.C.G., Hernández, A., Dayan, F.E., Téllez, M.R., Macías, F.A., Paul, R.N., Duke, S. O. 1999. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. *Phytochemistry* 52, 805-813.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158.
- García-Rodríguez, J.J., Andrés, M.F., Ibañez-Escribano, A., Julio, L.F., Burillo, J., Bolás-Fernández, F., González-Coloma, A. 2015. Selective nematocidal effects of essential oils from two cultivated *Artemisia absinthium* populations. *Z Naturforsch C Bio Sci* 70:275-280
- Garn, H., Krause, H., Enzmann, V., Brößler, K. 1994. An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *Journal of Immunological Methods* 10, 253-256.

- Gemada, N., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., Debella, A. 2014. Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, 373-381.
- George, D.R., Finn, R.D., Graham, K.M., Sparagano, O. 2014. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites & Vectors* 7, 28.
- Georgiev, M.I., Ludwig-Muller, J., Bley, T. 2010. Hairy root culture: copying nature in new bioprocesses in: *Medicinal Plant Biotechnology*, CAB International, Oxon, United Kingdom, pp. 156-175.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Firoznezhad, M., Craker, L., Akbarzadeh, M. 2013. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 861-869.
- González, A., Estévez Reyes, R., Herrera Velázquez, J. 1975. Sesquiterpene lactones and coumarins of *Artemisia ramosa*. *An Quim* 71:437.
- González, A.G., Bermejo, J., Zaragoza, T. 1983. Eudesmanolides from *Artemisia canariensis*. *Phytochemistry* 22, 1509–1510.
- González-Coloma, A., Bailén, M., Díaz, C.E., Fraga, B.M., Martínez-Díaz, R.A., Zuñiga, G.E., Contreras, R.A., Cabrera, R., Burillo, J. 2012. Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: antifeedant, antiparasitic and antioxidant effects. *Industrial Crops and Products* 37, 401-407.
- González-Coloma, A., Cabrera, R., Castañera, P., Gutiérrez, C. 1995. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* 21, 1255-1270.
- González-Coloma, A., Guadaño, A., Gutiérrez, A., Cabrera, R., De la Peña, E., De la Fuente, G., Reina, M. 1998. Antifeedant Delphinium diterpene alkaloids structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 286-290.
- González-Coloma, A., Martín-Benito, D., García-Vallejo, M.C., Soria, A.C. 2006. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L., *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 609-616.
- González-Coloma, A., Reina, M., Díaz, C.E., Fraga, B.M., Santa-Meridas, O. 2013. Natural product-based biopesticides for insect control. En Reedijk, J. (Ed.) Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Walltham, M.A; Elsevier. 01-Nov-13 doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.02770-0.
- Gonzalez-Coloma, A., Sainz, P., Olmeda, S., Burillo, J., Sanz, J. Umpierrez, M. L., Rossini, C. 2013. Desarrollo de métodos de bioensayos con garrapatas aplicados a la detección de potenciales bioplaguicidas botánicos. En: F. Echeverri, C. Rossini (Eds.), *Productos Naturales contra parásitos externos del ganado bovino y ovino, tales como mosca de los*

- cuernos y garrapatas, Ediciones de la Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile, Pp. 56-69.
- González-Coloma, A., Terrero, D., Perales, A., Escobas, P., Fraga, B.M. 1996. Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 296-300.
- Goodman, C.L., Ringbauer, J.A., Li, Y-F., Lincoln, T.R., Stanley, D. 2017. Cell lines derived from the squash bug, *Anasa tristis* (Coreidae:Hemiptera). *In Vitro Cellular & Development Biology-Animal*. DOI: 10.1007/S11626-017-0134-5.
- Govindaraj, S., RanjithaKumar, B. 2013. Composition and Larvicidal activity of *Artemisia vulgaris* L. stem essential oil against *Aedes aegypti*. *Jordan Journal of Biological Sciences* 6,11–16.
- Grecco, S.S., Costa-Silva, T.A., Jerz, G., de Sousa, F.S., Conserva, S.A.A., Mesquita, J.T., Galuppo, M.K., Tempone, A.G., Neves, B.J., Andrade, C.H., Cunha, R.L.O.R., Uemi, M., Sartorelli, P., Lago, J.H.G. 2017. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine* 24, 62–67.
- Grecco, S.S., Reimão, J.Q., Tempone, A.G., Sartorelli, P., Romoff, P., Ferreira, M.J.P., Fávero, O.A., Lago, J.H.G. 2010. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Parasitology Research* 106, 1245-1248.
- Guan, A., Liu, C., Li, M., Zhang, H., Li, A., Li, Z. 2011. Design, synthesis and structureactivity relationship of novel coumarin derivatives. *Pest Management Science* 67, 647–655.
- Guardo, N.I., Sainz, P., González-Coloma, A., Burillo, J., Martínez-Díaz, R.A. 2016. Trypanocidal effects of essential oils from selected medicinal plantas. Synergy among the main components. *Natural Product Communications* (in press).
- Gutiérrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R., González-Coloma, A. 1997. Behavioral and sub-lethal effects of structurally- related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1641-1650.
- Haider, F., Naqvi, A.A., Bagchi, G.D. 2006. Chemical constituents of *Artemisia verlotiorum* essential oil on cultivation at the subtropical conditions of North India. *Journal of Essential Oil Research* 18, 551–552.
- Harada, K., Kubo, H., Tomigahara, Y., Nishioka, K., Takahashi, J., Momose, M., Inoue, S., Kojima, A., 2010. Coumarins as novel 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitors for potential treatment of prostate cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 272–275.
- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P. 2009. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylos and Francis.

- Hassan, S., Mathesius, U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* 63, 3429-3444.
- Hassler M. (2017). World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Feb 2017). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2017). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th April 2017. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858
- Hector, R.F. 2005. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 20, 240-249.
- Hernández-Bermejo, E., Contreras, P., Clemente, M., Prados, J. 2004. *Artemisia granatensis*. En: Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., Ortiz, S (eds) Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España, pp. 124-125. Dirección General de la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Hernández-Bermejo, E., Contreras, P., Clemente, M., Prados, J. 2011. *Artemisia granatensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T162057A5526184.en>.
- Hoet,S., Opperdoes, F., Brun, F., Quetin-Leclercq, J. 2004. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *Natural Product Reports* 21, 353-364.
- Horton, R.D., Redak, R.A. 1993. Further comments on analysis of covariance in insect dietary studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 69, 263-275.
- Hough-Goldstein, J., Keil, C.B. 1991. Prospects for integrated control of the Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) using *Perillus bioculatus* (Hemiptera:Pentatomidae) and various pesticides. *Journal of Economic Entomology* 23, 1505-1515.
- Howe, G.A., Schillmiller, A.L. 2002. Ocyllipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236.
- Hsu, E. 2006. The history of *qing hao* in the Chinese materia medica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 505-508.
- Isman, M. B., 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51,45-66.
- Isman, M.B., 2008. Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science* 64, 8-11.
- Ivanescu, B., Miron, A., Corciova, A., 2015. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 247685, 21 pages.

- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Prado Dias Filho, B., Florencio Veiga, Jr. V., Nakamura, C.V. 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Products Report* 28, 809-823.
- Jadhav, D.R., Mallikarjuna, N., Rathore, A., Pokle, D. 2012. Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hüner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera:Noctuidae). *Asian Journal of Agricultural Sciences* 4, 298-307.
- Janačković, P., Novaković, J., Soković, M., Vujisić, L., Giweli, A.A., Stevanović, Z.D., Marin, P.D. 2015. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. herba-alba* and *A. arborescens* from Libya. *Archives of Biological Science* 67,455-466.
- Jankevicius, J.V., Itow-Jankevicius, S., Maeda, L.A., Campaner, M., Conchon, I., do Carmo, J.B., Dutra-Menezes, M.C., Camargo, E.P., Roitman, I., Traub-Csekö, Y.M., Borges, M.B., Moreira, N. 1988. Biological cycle of *Phytomonas*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, Suppl 1, 601-10.
- Jaskowska, E., Butler, C., Preston, G., Kelly, S. 2015. *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. *PLOS Pathogens* 11, 1-17.
- Jeschke, P. 2017. Latest generation of halogen-containing pesticides. *Pest Management Science* 73, 1053-1066.
- Jimenez, V., Kemmerling, U., Paredes, R., Maya, J.D., Sosa, M.A., Galanti, N. 2014. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: a new therapeutic target? *Phytomedicine* 21, 1411-1418.
- Julio, L.F., Barrero, A.F., Herrador del Pino, M.M., Arteaga, J.F., Burillo, J., Andrés, M.F., Díaz, C.E., González-Coloma, A. 2016. Phytotoxic and Nematicidal components of *Lavandula luisieri*. *Journal of Natural Products* 79, 261-266.
- Julio, L.F., González-Coloma, A., Burillo, J., Díaz, C.E., Andrés, M.F. 2017. Nematicidal activity of the hydrolate byproduct from the semi industrial vapor pressure extraction of domesticated *Artemisia absinthium*, against *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 94, 33-37.
- Julio, L.F., Martín, L., Muñoz, R., Mainar, A.M., Urieta, J.S., Sanz, J., Burillo, J., González-Coloma, A. 2014. Comparative chemistry and insect antifeedant effects of conventional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two *Lavandula luisieri* populations. *Industrial Crops and Products* 58, 25-30.
- Julio, L.F., Burillo, J., Giménez, C., Cabrera, R., Díaz, C.E., Sanz, J., González-Coloma, A. 2015. Chemical and biocidal characterization of two cultivated *Artemisia absinthium* populations with different domestication levels. *Industrial Crop and Products* 76,787-792.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessière, J-M., Viano, J. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica* 69, 158-161.

- Kaneko, H., Naruto, S. 1971. Sesquiterpenes of *Achillea sibirica*. *Phytochemistry* 10, 3305-3306.
- Kaur, K., Jain, M., Reddy, R.P., Jain, R. 2010. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 3245-3264.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F., Croft, S.L. 2003. "Natural products as antiparasitic drugs." *Parasitology Research* 90, S55-S62.
- Kazemi, M., Akhavani, S. 2013. Chemical composition, antimicrobial activity of *Artemisia tournefortiana* rchb. Essential oil. *Asian Journal of Chemistry* 25, 2985–2988.
- Kazemi, M., Raza Zand, M., Roshanaei, K., Mehrzad, M., Rustaiyan A. 2010. Composition of the volatile oils of *Artemisia armeniaca* Lan. and *Artemisia splendens* Willd. From Iran. *Journal of Essential Oil Research* 22, 126-128.
- Kennedy, J.S., Day, M.F., Eastop, V.F. 1962. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London. 114 pp.
- Kerboeuf, D., Riou, M., Guégnard, F. 2008. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8, 116-128.
- Kidmose, U., Hansen, S.L., Christensen, L.P., Edelenbos, M., Larsen, E., Norbaek, R. 2004. Effect of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Science* 69, 388-394.
- Kim, N-J., Byun, S-G., Cho, J-E., Chung, K., Ahn, Y-J. 2008. Larvicidal activity of *Kaempferia galangal* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. *Pest Management Science* 64, 857-862.
- Kiss, T., Cadar, D., Spinu, M. 2012. Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions. *Veterinary Parasitology* 187,357-366.
- Kjellenberg, L., Johansson, E., Gustavsson, K.E., Olsson, M.E. 2010. Effects of harvesting date and storage on the amounts of polyacetylenes in carrots, *Daucus carota*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 11703-11708.
- Kordali, S., Aslan, I., Çalmaşur, O., Cakir, A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products* 23, 162–170.
- Kröber, T., Bourquin, M., Guerin, P.M., 2013. A standardised in vivo and in vitro test method for evaluating tick repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107, 160-168.
- Kubo, I. 1991. Screening Techniques for plant- insect interactions. En: Hostettman, K., ed. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6, Assays for Bioactivity, Academic Press, New York. Pp. 179-193.



- Kuklev, D.V., Comg, A.J., Dembitsky, V.M. 2013. Bioactive acetylenic metabolites. *Phytomedicine* 20, 1145-1159.
- Lafont, A. 1909. Sur la presence d'un Leptomonas, parasite de la classe des Flagelles dans le latex de *Euphorbia pilulifera*. *Comptes Rendus des Seances la Soc Biol* 66, 1011-1013.
- Lallinger, G., Zweygarth, E., Bell-Sakyi, L., Passos, L.M.F. 2010. Cold storage and cryopreservation of tick cell lines. *Parasites & Vectors* 3, 37.
- Latif, S., Chiapusio, G., Weston, L.A. 2017. Chapter 2: Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. En: *Advances in Botanical Research, Volume 83. Phytoremediation*. Edited by Ann Cuypers and Jaco Vangronsveld.
- Li, S., Pan, S-H., Lai, C-S., Lo, C-Y., Dushenkov, S., Ho, C-T. 2007. Isolation and synthesis of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3381-3389.
- Li, Y., Xu, Z., Shi, L., Shen, G., He, Lin., 2016. Insecticide resistance monitoring and metabolic mechanism study of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Pemphigidae), in Chongqing, China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 132, 21-28.
- Lin, L-C., Pai, Y-F., Tsai, T-H. 2015. Isolation of Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from *Dendrotheca morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 7700-7706.
- Liu, K.C.S.C., Yang, S.L., Roberts, M.F., Elford, B.C., Phillipson, J.D. 1992. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports* 11, 637-640.
- Liu, X., Zhou, L., Liu, Z., Du, S. 2013. Identification of insecticidal constituents of the essential oil of *Acorus calamus* rhizomes against *Liposcelis bostrychophyla* Badonnel. *Molecules* 18, 5684-5696.
- Lopes, A.H., Souto-Pradón, T., Dias, F.A., Gomes, M.T., Rodrigues, G.C., Zimmermann, L.T., Alves e Silva, T.L., Vermelho, A.B. 2010. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal* 4, 30-59.
- Luque, F., Fernández-Ramos, C., Entrala, E., Rosales, M.J., Navarro, J.A., Romero, M.A., Salas, J.M., Sánchez-Moreno, M. 2000. In vitro evaluation of newly synthesised [1,2,4] triazole [1,5a] pyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* and *Phytomonas staheli*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 26, 39-44.
- Luque, F., Fernández-Ramos, C., Entrala, E., Rosales, M.J., Salas, C.M., Navarro, J.A., Sánchez-Moreno, M. 2000. Biochemical and ultrastructural alterations caused by newly synthesized 1,2,4-triazole[1,5a] pyrimidine derivatives against *Phytomonas staheli* (Trypanosomatidae). *Toxicology in Vitro* 14, 487-495.

- Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Castellano, D., Velasco, R.F. 2000. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5288-5296.
- Macias, F.A., Santana, A., Yamahata, A., Varela, R.M., Fronczek, F.R., Molinillo, J.M. 2012. Facile preparation of bioactive seco-guaianolides and guaianolides from *Artemisia gorgonum* and evaluation of their phytotoxicity. *Journal of Natural Products* 75, 1967-1973.
- Magán, R., Marín, C., Salas, J.M., Barrera-Pérez, M., Rosales, M.J., Sánchez-Moreno, M. 2004. Cytotoxicity of three new triaxolo-pyrimidine derivatives against the plant trypanosomatid: *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 651-656.
- Magiero, E. C., Assmann, J. M., Marchese, J. A., Capelin, D., Paladini, M. V., Trezzi, M. M. 2009. Allelopathic effect of *Artemisia annua* L. on the germination and initial development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) seedlings. *Revista Brasileira De Plantas Mediciniais* 11, 317-324.
- Maggi, M. E., Mangeaud, A., Carpinella, M. C., Ferrayoli, C. G., Valladares, G. R., Palacios, S. M. 2005. Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania*. *Journal of Chemical Ecology* 31, 1527-1536.
- Mansilla, H., Palenzuela, J.A. 1999. Minor eudesmanolides from *Artemisia canariensis*. *Phytochemistry* 51, 995-997.
- Marco, J.A., Barbera, O., Martinez, V., Strack, D., Meurer, B. 1987. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia assoana*. *Planta Medica Letters*, pag. 460.
- Marco, J.A., Barberá, O., Rodríguez, S., Domingo, C., Adell, J. 1988. Flavonoids and
- Marco, J.A., Sanz, J.F., del Hierro, P. 1991a. Two eudesmane acids from *Artemisia vulgaris*. *Phytochemistry* 30, 2403-2404.
- Marco JA, Sanz JF, Yuste A, Carda M, Jakupovic J (1991b) other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry* 27, 3155-3159.
- Marco, J.A., Sanz, J.F., Yuste, A., Carda, M., Jakupovic, J. 1991b. Sesquiterpene lactones from *Artemisia barrelieri*. *Phytochemistry* 30, 3661-3668.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., García-Lliso, V., Vallès-Xirau, J. 1997. Sesquiterpene lactones and lignans from *Artemisia arborescens*. *Phytochemistry* 44, 1133-1137.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J., Morante, M.D., García-Lliso, V., Vallès-Xirau, J., Jakupovic, J. 1996. Tricyclic sesquiterpenes from *Artemisia chamaemelifolia*. *Phytochemistry* 41, 837-844.

- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Sancenón, F., Arnó, M., Vallès-Xirau, J. 1994. Sesquiterpene lactones and acetylenes from *Artemisia reptans*. *Phytochemistry* 37, 1095-1099.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Garcia-Lliso V., Batlle, N. 1997a. Sesquiterpene lactones from *Artemisia lucentica*. *Phytochemistry* 45, 755–763.
- Marco, J.A., Sanz, J.F., Sancenon, F., Rustaiyan, A., Saberi, M. 1993. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* species. *Phytochemistry* 32, 460–462.
- Martín, L., Julio, L. F., Burillo, J., Sanz, J., Mainar, A. M., Gonzalez-Coloma, A. 2011. Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (cleverger and soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. *Industrial Crops and Products* 34, 1615-1621.
- Martín-Quintal, Z., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M., Matus-Moo, A., Torres-Tapia, L.W., Peraza-Sánchez, S.R. 2010. The Leishmanicidal effect of (3S)-16,17-didehydrofalcarinol, an Oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytotherapy* 24, 1004-1008.
- Martínez, V., Barbera, O., Sánchez-Parareda, J., Marco, J.A. 1987. Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisia assoana*. *Phytochemistry* 26, 2619-2624.
- Martínez-Díaz, R.A., Ibáñez-Escribano, A., Burillo, J., de las Heras, L., del Prado, G., Agulló-Ortuño, M.T., Julio, L.F., González-Coloma, A. 2015. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Memorias do Oswaldo Cruz* 110, 693-699.
- Massuh, Y., Cruz.Estrada, A., González-Coloma, A., Ojeda, M.S., Zygadlo, J.A., Andrés, M.F. 2017. Nematicidal activity of the essential oil of three varieties of *Tagetes minuta* from Argentina. *Natural Products Communications* 12, 705-707.
- Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Mori, M., Takata, K. 1990. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 3480-3482.
- Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K. 1989. Studies on the panaxytriol of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Isolation, determination and antitumor activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 1279-1281.
- Masotti, V., De Jong, L., Moreau, X., Rabier, J., Laffont-Schwob, I., Thiéry, A. 2012. Larvicidal activity of extracts from *Artemisia* species against *Culex pipiens* L. mosquito: Comparing endemic versus ubiquitous species for effectiveness. *Comptes Rendus - Biologies* 335, 19-25.
- Matos, M.J., Vazquez-Rodriguez, S., Fonseca, A., Uriarte, E., Santana, L., Borges, F. 2017. Heterocyclic antioxidants in nature: Coumarins. *Current Organic Chemistry* 21, 311-324.

- Mazuelas, F., Fernández, A., Puente, E. 2013. *Artemisia chamaemelifolia* sbsp. *Cantabrica*. Fichas con recopilación de información silvestre sobre las especies incluidas en el Decreto 63/2007. Junta de Castilla y León.
- Mazzanti, G., Battinelli, L., Salvatore, G. 1998. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 13, 289-294.
- Medina, J.M., Fernandes, J.C., Moreira, O.C., Atella, G., de Souza, W., Barrabin, H. 2015. Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 48-55.
- Milhau, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallié, M., Bastide, J-M., Péliissier, Y., Bessièrè, J-M. 1997. *In vitro* antimalarial activity of eight essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 9, 329–333.
- Miyakoshi, N., Mukai, C. 2003. First total synthesis of (-)-AL-2. *Organic Letters* 5, 2335-2338.
- Młochowski, J., Wójtowicz-Młochowska, H. 2015. Development in synthetic application of selenium (IV) oxide and organoselenium compounds as oxygen donors and oxygen-transfer agents. *Molecules* 20, 10205-10243.
- Mohamed, N.M., Makboul, M.A., Farag, S.F., Wang, Y.-H., Ross, S.A. 2017. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from the roots of *Lantana montevidensis*. *Medicinal Chemistry Research* 26, 1117-1126.
- Mojarrab, M., Delazar, A., Bamdad Moghadam S., Nazemiyeh, H., Nahar, L., Kumarasamy., Asnaashari, S., Hadjiakhoondi, A., Dey Sarker, S. 2011. Armenin and Isoarmenin – Two prenylated coumarins from the aerial parts of *Artemisia armeniaca*. *Chemistry & Biodiversity* 8, 2097-2103.
- Mojarrab, M., Delazar, A., Esnaashari, F., Afshar, H. 2013. Chemical composition and general toxicity of essential oils extracted from the aerial parts of *Artemisia armeniaca* Lam. and *A. incana* (L.) Druce growing in Iran. *Research in Pharmaceutical Sciences* 8, 65-69.
- Mojarrab, M., Delazar, A., Hamburher, M., Potterat, O. 2010. New Coumarin-Hemiterpene Ether Glucosides and a Structurally Related Phenylpropanoic Acid Derivate from *Artemisia armeniaca*. *Natural Product Communications* 5, 1619-1622.
- Mojarrab, M., Lagzian, M-S., Emami, S.A., Asili, J., Tayarina-Najaran, Z. 2013. *In vitro* anti-proliferative and apoptotic activity of different fractions of *Artemisia armeniaca*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 783-788.
- Mojarrab, M., Emami, S.A., Delazar, A., Tayarini-Najaran, Z. 2017. Cytotoxic properties of three isolated coumarin-hemiterpene ether derivatives from *Artemisia armeniaca* Lam. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 16, 221-229.

- Mojarrab, M., Shiravand, A., Delazarm A., Afshar, F.H. 2014. Evaluation of In vitro antimalarial activity of different extracts of *Artemisia aucheri* Boiss. and *A. armeniaca* Lam. and fractions of the most potent extracts. Hindawi Publishing Corporation vol 2014, ID 825370, 6 páginas.
- Morán, A., Montero, M.J., Martín, M.L., San Romñan, L. 1989. Pharmacological screening and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens* subsp. *gallica*. Journal of Ethnopharmacology 26, 197–203.
- Moreira, M.D., Picançom M.C., de Barbosa, L.C.A., Guedes, R.N.C., de Campos, M.R., Silva, G.A., Martins, J.C. 2007. Plant compounds insecticide activity against coleóptera pests of stored products. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42, 909-915.
- Moreno, J.C., coord. 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid, 86 pp
- Morimoto, M., Kumeda, S., Komai, K. 2000. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. Journal of Agricultural Food and Chemistry 48, 1888-1891.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63.
- Msaada, K., Salem, N., Bachrouch, O., Bousselmi, S., Tammar, S., Alfaify, A., Marzouk, B. 2015. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. Journal of Chemistry. doi:[10.1155/2015/804658](https://doi.org/10.1155/2015/804658)
- Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J.J., Gómez-Barrio, A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitology Research 86, 999-1002.
- Munakata, K. 1983. En: Whitehead, D.L., Bowers, W. (Eds.), Natural Products for innovative Pest management. Current Themes in Tropical Science 2, Pergamon Press, Oxford 299-309.
- Murashige, T., Skoog, T., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.
- Muro, B., Reviriego, F., Navarro, P., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Rosales, M. J., Sánchez-Moreno, M., Arán, V. J. 2014. New perspectives on the synthesis and antichagasic activity of 3-alkoxy-1-alkyl-5-nitroindazoles. European Journal of Medicinal Chemistry 74, 124-134.
- Nabavi, S.F., Sureda, A., Daglia, M., Izadi, M., Rastrelli, L., Nabadi, S.M. 2017. Flavonoids and Chagas' Disease: The story so far! Current Topics in Medicinal Chemistry 17, 460-466.

- Nakamura, Y., Kawamoto, N., Ohto, Y., Torikai, K., Murakami, A., Ohigashi, H. 1999. A diacetylenic spiroketal enol ether epoxide, AL-1, from *Artemisia lactiflora* inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion possibly by suppression of oxidative stress. *Cancer Letters* 140, 37-45.
- Narrow, J., Harmatha, J. 2012. Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pest. *Phytochemical Reviews* 11, 543-566.
- Nebo, L., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Sampaio, O.M., Severino, V.G.P., Casal, C.M., Fernandes, M.F.D.G., Fernandes, J.B., Macías, F.A. 2014. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. *Phytochemistry Letters* 8, 226-232.
- Negri, R. 2015. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia* 106, 92-109.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1982 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311-335.
- Olmo, F., Gómez-Contreras, F., Navarro, P., Marín, C., Yunta, M. J., Cano, C., Campayo, L., Martín-Oliva, D., Rosales, M. J. R., Sánchez-Moreno, M. 2015. Synthesis and evaluation of in vitro and in vivo trypanocidal properties of a new imidazole-containing nitroththalazine derivative. *European Journal of Medicinal Chemistry* 106, 106-119.
- OMS. 2017. Nota descriptiva: La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). [www.who.int](http://www.who.int).
- OMS. 2002. Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del Comité de Expertos de la OMS.
- Ostfeld, R.S., Price, A., Hornbostel, V.L., Benjamin, M.A., Keesing, F., 2006. Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *Bioscience* 56, 383-394.
- Ouhelli, H., Pandey, V.S., 1984. Development of *Hyalomma lusitanicum* under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* 15, 57-66.
- Pandey, D. K. 1994. Inhibition of salvinia (*Salvinia molesta* Mitchell) by parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.). 1. Effect of leaf residue and allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 20, 3111-3122.
- Pannacci, E., Pettorossi, D., Regni, L., Tei, F. (2015). Allelopathic potential of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) to control the italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) in winter wheat. *Allelopathy Journal* 36, 257-272.
- Parada, M., Carrió, E., Bonet, M.A., Vallés, J. 2009. Ethnobotany of the Alt Empordá región (Catalonia, Iberian Peninsula). Plants used in human traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 609-618.

- Pastor, J., García, M., Steinbauer, S., Setzer, W.N., Scull, R., Gille, L., Monzote, L. 2015. Combinations of ascaridole, carvacrol and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta Tropica* 145, 31-38.
- Pavela, R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) larvae. *Industrial Crop and Product* 60, 247-258.
- Pavela, R., Vrchotová, N., 2013. Insecticidal effect of furanocoumarins from fruits of *Angelica archangelica* L. against larvae *Spodoptera littoralis* Bois. *Industrial Crops and Products* 43, 33–39.
- Pedersen, H.A., Kudsk, P., Fomsgaard, I.S. 2014. Metabolic profiling of *Arabidopsis Thaiana* reveals herbicide- and allelochemical- dependent alterations before they become apparent in plant growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, DOI 10.1007/s00344-014-9446-9.
- Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúl, J., Sanz, J. 2003. Variations in the essential oil composition of *Artemisia pedemontana* gathered in Sapin: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. *Biochemical Systemics and Ecology* 31, 77-84.
- Perfumi, M., Paparelli, F., Cingolani, M.L. 1995. Spasmolytic activity of essential oil of *Artemisia thuscula* Cav from the Canary Islands. *Journal of Essential Oil Research* 7, 387–392.
- Perón, G., Baldan, V., Sut, S., Faggian, M., Roccabruna, L., Zanini, D., Manzini, P., Maggi, F., Dall'Acqua, S. 2016. Phytochemical investigations on *Artemisia alba* Turra growing in the north-east of Italy. *Natural Product Research*. doi:10.1080/14786419.2016.1263845
- Pichersky, E., Gang, D.R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 205, 439-445.
- Pineda, S., Scheneider, M.I., Smagghe, G., Martínez, A.M., Estal, P., Viñuela, E., Valle, J., Budia, F. 2007. Lethal and Sublethal Effects of Methoxyfenozide and Spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 100, 773-780.
- Pizzo, C., Saiz, C., Talevi, A., Gavernet, L., Palestro, P., Bellera, C., Blanch, L. B., Benítez, D., Cazzulo, J. J., Chidichimo, A., Wipf, P., Mahler, S. G. 2011. Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Chemical Biology Drug Design* 77, 166-172.
- Poiatti, V.A.D., Dalmas, F.R., Astarita, L.V. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biological Research* 42, 205-215.
- Poitout, S., Bues, R., 1970. Élevage de plusieurs espèces de lépidoptères noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Annales de Zoologie Écologie Animale* 2, 79-91.

- Popp, J., Peto, K., Nagy, J., 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33, 243-255.
- Qiu, J.C., Pradhan, P.P., Blanck, N.B., Bobbitt, J.M., Bailey, W.F. 2012. Selective oxoammonium salt oxidations of alcohols to aldehydes and aldehydes to carboxylic acids. *Organic Letters* 14, 350-353.
- Radulovic, N., Blagojevic, P. 2010. Volatile profiles of *Artemisia alba* from contrasting serpentine and calcareous habitats. *Natural Products Communication* 4, 1117–1122.
- Rassi, Jr A., Rassi, A., Marin-Neto, A. 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 152-158.
- Rassi, Jr A., Rassi, A., Marin-Neto, A. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
- Raubenheimer, D., Simpson, S.J. 1992. Analysis of covariance; an alternative to nutritional indices. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 62, 221-231.
- Razavi, S.M. 2011. Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry* 5, 86-90.
- Razavi, S.M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H., Mohammadi, S. 2009. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 35, 376-378.
- Razdan, T.K., Qdri, B., Harkar, S., Waight, E.S. 1987. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry* 26, 2063-2069.
- Reale, S., Pace, L., D'Archivio, A., De Angelis, F., Marcozzi, G. 2014. Volatiles fingerprints of *Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha* by headspace-solid phase microextraction GC-MS. *Natural Products Research* 28, 61–66.
- Reina, M., Ruiz-Mesia, W., Ruiz-Mesia, L., Martínez-Díaz, R., González-Coloma, A. 2011. Indole Alkaloids from *Aspidosperma rigidum* and *A. schultesii* and their antiparasitic effects. *Z. Naturforsch* 66c, 225-234.
- Revankar, H.M., Bukhari, S.N.A., Kumar, G.B., Qin, H.-L. 2017. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 71, 146-159.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., Barat, J.M. Ferrari, G., Donsi F. 2017. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. *Food Control* 73, 784-795.
- Robertson, J., Naud, S. 2008. Synthesis of spiroacetal enol ethers by oxidative activation of furan derivatives. *Organic Letters*, 10 5445-5448.
- Ruiz-Vásquez, L., Reina, M., López-Rodríguez, M., Giménez, M., Cabrera, R., Cuadra, P., Fajardo, V., González-Coloma, A. 2015. Eremophilanolides, Flavonoids, Shikimic



- Acid Derivatives and Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio kingii* Hook. *Phytochemistry* 117, 245–253.
- Rustaiyan, A., Bamonieri, A., Raffatrad, M., Jakupovic, J., Bohlmann, F. 1987. Eudesmane derivatives and highly oxygenated monoterpenes from Iranian *Artemisia* species. *Phytochemistry* 26, 2307–2310.
- Rybalko, K.S., Konovalova, O.A., Sheichenko, V.I., Zakharov, P.I. 1975. Armin-a new coumarin from *Artemisia armeniaca*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 3, 294-298.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R. 2012. Chapter 6: Trypanocidal Monoterpenes: Lead compounds to design future trypanocidal drugs. En: *Studies in Natural Products Chemistry: Vol 37 Bioactive Natural Products*. Eds Rahman, Atta-ur.
- Sainz, P. 2012. Evaluación de la actividad de aceites esenciales y sus componentes para el control de vectores hematófagos. Trabajo de Fin de Máster. Máster en Microbiología. UAM- Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC, Madrid.
- Sainz, P., Sanz, J., Burillo, J., González-Coloma, A., Bailén, M., Martínez-Díaz, R.A. 2012. Essential oils for the control of Reduviid Insects. *Phytochemistry Reviews* 11, 361-369.
- Salas, M.J., Quirós, M., Abul Haj, M., Magán, R., Marín, C., Sánchez-Moreno, M., Faure, R. 2001. Activity of Pt(II) and Ru(III) Triazolopyrimidine complexes against parasites of the genus *Leishmania*, *Trypanosoma* and *Phytomonas*. *Metal Based Drugs* 8, 119-124.
- Salomão, K., de Santana, N. A., Molina, M. T., de Castro, S. L., Menna-Barreto. R. F. S. 2013. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. *BMC Microbiology* 13,196, doi: 10.1186/1471-2180-13-196.
- Samaniego, H., Ramsey, J.S., Figueroa, C.C., 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey. *Plos One* 7(6), e36366.
- Samson, A.R., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 2000. *Introduction to Food and Aisborne Fungi*, Sixth Edition. CBS-Utrecht, The Netherlands pp. 64-97.
- San Feliciano, A., del Corral, M.J.M. Caballero, E., Álvarez, A., Medarde, M. 1986. Cantabric acids. Triquinane sesquiterpenoids from *Artemisia cantábrica*. *Journal of Natural Products* 49, 845-853.
- San Feliciano, A., Medarde, M., Poza, M.T., Miguel del Corral, J.M. 1986a. Artegallin, a sesquiterpene lactone from *Artemisia Caerulescens* subsp. *gallica*. *Phytochemistry* 25:1757–1759
- Santos, A.L.S., d'Avila-Levy, C.M., Dias, F.A., Ribeiro, R.O., Pereira, F.M., Elias, C.G.R., Souto-Padrón, T., Lopes, A.H.C.S., Alviano, C.S., Branquinha, M.H, Soares, R.M.A. 2006. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *International Journal for Parasitology* 36, 47-56.

- Santos, A.L.S., d'Avila-Levy, C.M., Elias, C.G.R., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H. 2007. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes and Infection* 9, 915-921.
- Sanz, G.M., Fabregat Lluca, C., López Udias, S. 1994. Una planta encontrada en Fortanete, novedad para la flora de la Península Ibérica: "La *Artemisia Armeniaca* Lam.". *Anales Jardín Botánico de Madrid* 52, (1).
- Sanz, J.F., Barbera, O., Marco, J.A. 1989. Sesquiterpene lactones from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry* 28, 2163–2167.
- Sanz, J.F., Marco, A. 1990a. Two eudesmanolides from *Artemisia caerulescens* subsp. *gargantae*. *Planta Medica* 56, 236–237.
- Sanz, J.F., Marco, A. 1990b. Sesquiterpene lactones from *Artemisia caerulescens* subsp. *gargantae*. *Phytochemistry* 29, 2913–2917.
- Sanz, J.F., Marco, J.A. 1990c. New eudesmane derivatives from *Artemisia tournefortiana*. *Liebigs Annalen der Chemie* 6, 541–545.
- Satyral, P., Paudel, P., Kafle, A., Pokharel, S.K., Lamichhane, B., Dosoky, N.S., Setzer, W.N. 2012. Bioactivities of volatile components from nepalese artemisia species. *Natural Products Communication* 7, 1651–1658.
- Schmidt, T. J. 1997. Helenanolide-type sesquiterpene lactones-III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenanin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5, 645-653.
- Schmidt, T. J. 2006. Structure-activity relationships of Sesquiterpene Lactones. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, vol 33.
- Schmidt, T.J., Khalid, S.A., Romanha, A.J., Alves, T.M., Biavatti, M.W., Brun, R., Da Costa, F.B., de Castro, S.L., Ferreira, V.F., de Lacerda, M.V., et al. 2012. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases- Part II. *Current Medicinal Chemistry* 19, 2176-2228.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., van Dijck, P.W.M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*- a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 426-435.
- Scotti, M.T., Scotti, L., Ishiki, H., Ribeiro, F.F., Marques, R., Pedrosa de Oliveira, M., Bezerra, F.J. 2016. Natural products as a source for antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 19, 1-17.
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R., Séquin, U. 2007. Antiprotozoal polyacetylenes from the Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. *Journal of Natural Products* 70, 1565-1569.
- Seo, S.M., Kim, J., Kim, E., Park, H-M., Kim, Y-J., Park, I-K. 2010. Structure-activity relationship of aliphatic compounds for nematicidal activity against pine wood

- nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 1823-1827.
- Serkerov, S.V., Ibragimova, S.I. 2014. New steroidal compound *Artemisa abrotanum*. Chemistry of Natural Compounds 50, 478-479.
- Shah, S.A.A., Tan, H.L., Sultan, S., Faridz, A.B.M., Shah, M.A.B.M., Nurfazilah, S., Hussain, M. 2014. Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. International Journal of Molecular Science 15, 12027-12060.
- Shajib, M., Pedersen, H., Mortensen, A., Kudsk, P., Fomsgaard, I. 2012. Phytotoxic effect, uptake, and transformation of biochanin A in selected weed species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 10715-10722.
- Sharma, N., Tripathi, A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil in growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.). Microbiological Research 163, 337-344.
- Sharma, R., Negi, D.S., Shiu, W.K.P., Gibbons, S. 2006. Characterization of an insecticidal coumarin from *Boenninghausenia albiflora*. Phytotherapy Research 20, 607-609.
- Sieuwerts, A.M., Klijn, J.G., Peters, H.A., Foekens, J.A. 1995. The MTT Tetrazolium-Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. Clinical and Laboratory Medicine 33, 813-824.
- Silva, L.H., Nussenzweig, V., 1953. Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. Folia Clinica et Biologica 20, 191-207.
- Simmonds, M.S.J. 2003. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. Phytochemistry 64, 21-30.
- Solarte, R.Y., Moreno, E.A., Scorza, J.V. 1995. Flageliasis de plantas: comentarios sobre una revisión bibliográfica. Revista de Ecología Latinoamericana 3, 57-68.
- Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson, W.L. 2002. Ticks (Ixodida). En: Mullen, G., Durden, L., (eds) Medical and veterinary entomology. Academic, San Diego, pag 517-558.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology 27, 29-43.
- Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatkovic, B., Matejic, J., Jovanovic, V.S., Kocic, B., Comic, L. 2016. Comparative study of composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oils of selected aromatic plants from Balkan Peninsula. Planta Medica 82, 650-661.

- Stavri, M., Ford, C.H.J., Bucar, F., Streit, B., Hall, M.L., Williamson, T., Mathew, K.T., Gibbons, S. 2005. Bioactive constituents of *Artemisia monosperma*. *Phytochemistry* 66, 233-239.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J.P., Vierheilig, H. 2007. Flavonoids and strigolactons in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12, 1290-1306.
- Sturm, N.R., Dollet, M., Lukes, J., Campbell, D.A. 2007. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) based on minicircle conserved regions analysis. *Infection Genetics and Evolution* 7, 570-576.
- Sugiyama, S., Umehara, K., Kuroyanagi, M., Ueno, A., Taki, T. 1993. Studies on the differentiation inducers of myeloid leukemic cells from *Citrus* species. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41, 714-719.
- Sülsen, V.A., Frank, F.M., Cazorla, S.I., Anesini, C.A., Malchiodi, E.L., Freiza, B., Vila, R., Muschietti, L.V., Martino, V.S. Trypanocidal and Leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 2415-2419.
- Sylvester, P.W. 2011. Optimization of the tetrazolium ye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in Molecular Biology* 716, 157-168.
- Szabó, G., Greger, H., Hofer, O. 1985. Coumarin-hemiterpene ethers form *Artemisia* species. *Phytochemistry* 24, 537-541.
- Tabanca, N., Demirci, B., Blythe, E.K., Bernier, U.R., Ali, A., Wedge, D.E., Baser, K.H.C. 2011. Composition of *Artemisia abrotanum* and *A. pontica* essential oils and their repellent activity against *Aedes aegypti*. *Planta Medica* 77, 52.
- Talzhhanov, N.A., Rodichev, M.A., Raldugin, V.A., Gatilov, Y.V., Shakirov, M.M., Ivansenko, S.A., Turdybekov, K.M., Adekenov, S.M. 2007. Tournefortin, a novel eudesmanolide from *Artemisia tournefortiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 43, 555-557.
- Tan, K.W., Killen, D.P., Li, Y., Paxton, J.W., Birch, N.P., Scheepens, A. 2014. Dietary polyacetylenes of the falcarinol type are inhibitors of breast cancer resistance protein (BRCP/ABCG2). *European Journal of Pharmacology* 723, 346-352.
- Tan, R.X., Jia, Z.J., Zhao, Y., Feng, S.L. 1992. Sesquiterpenes and acetylenes from *Artemisia feddei*. *Phytochemistry* 31, 3135-3138.
- Tan, C.K., Yeung, Y-Y. 2013. Recent advances in stereoselective bromofunctionalization of alkenes using *N*-bromoamide reagents. *Chemical Communication* 49, 7985-7996.
- Tang, S., Shi, J., Liu, C., Liu, Z., Yang, G. 2017. *Three new phenylpropanoids from Lavandula angustifolia* and their bioactivities. *Natural Product Research* 31, 1351-1357.

- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P. 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *In vivo*, Structure-Activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1352-1364.
- Tauchen, Jan., Kokoska, L. 2017. The chemistry and pharmacology of Edelweiss: a review. *Phytochemistry Reviews* 16, 295–308.
- Taxonomicon. Sistema Natura, 2000. 30.04.2016. <http://taxonomicon.taxonomy.nl>.
- Taylor, L.P., Grotewold, E. 2005. Flavonoids as development regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 317-323.
- Teixeira, M.M.G., Takata, C.S.A., Conchon, I., Campaner, M., Camargo, E.P. 1997. Ribosomal and kDNA Markers Distinguish Two Subgroups of *Herpetomonas* among Old Species and New Trypanosomatids Isolated from Flies. *Journal of Parasitology* 83, 58.
- Tejada, S., Martorell, M., Capó, X., Tur, J.A., Pons, A., Sureda, A. 2017. Coumarin and derivatives as lipid lowering agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17, 7.
- Todorova, M., Trendafilova, A., Danova, K., Simmons, L., Wolfram, E., Meier, B., Riedl, R., Evstatieva, L. 2015. Highly oxygenated sesquiterpenes in *Artemisia alba* Turra. *Phytochemistry* 110, 140-149.
- Toledo, A. 2007. Dinámica de la infección de garrapatas por agentes zoonóticos en la zona centro de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Toledo, A., Olmeda, S., Escudero R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M.A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P. 2009. Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Ticks Collected from Central Spain. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 67-74.
- Uddin, M.R., Park, S.U., Dayan, F.E., Pyon, J.Y. 2014. Herbicidal activity of formulated sogocone, a natural product of sorghum root exudate. *Pest Management Science* 70, 252-257.
- Ulubelen, A., Öksüz, S., Tuzlai, E. 1988. New sesquiterpenoids from *Achillea schishkinii*. *Planta Medica*, 473-474.
- Uttaro, A.D., Mirkin, N., Rider, M.H., Michels, M., Opperdoes, F.R. 1999. *Phytomonas* sp. a model of trypanosomatid metabolism and drug. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, C19.
- Vainstein, M.H., Da Silva, J.B.T., De Lima, V.M.Q.G., Roitman, I., De Souza, W., Dollet, M., Plessmann Camargo, E. 1987. Electrophoretic Analysis of Isoenzymes in the Identification of Trypanosomatids of the Genus *Phytomonas* 1. *The Journal of Protozoology* 34, 442-444.

- Vainstein, M.H., Roitman, I. 1986. Cultivation of *Phytomonas françai* Associated with Poor Development of Root System of Cassava. *Journal of Protozoology* 33, 511-513.
- Vallés, J., García, S., Hidalgo, O., Martín, J., Pellicer, J., Sanz, M., Garnatje, T. 2011. Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). En: Kader, J.C., Delseny, M., editors: *Advances in Botanical Research*, Vol60, Burlington Academic Press, pp. 349-419.
- Vandekerckhove, S., Desmet, T., Giang Tran, H., de Kock, C., Smith, P.J., Chibale, K., D'hooghe, M. 2014. Synthesis of halogenated 4-quinolones and evaluation of their antiplasmodial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 1214-1217.
- Vega, C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A. R., Escario, J. A., Gómez-Barrio, A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing  $\beta$ galactosidase. *Parasitology Research* 95, 296-298.
- Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Palá-Paúl, J., García Jiménez, N., García Jiménez, R. 2001. Volatile constituents from the aerial parts of *Artemisia barrelieri* Besser grown in Spain. *Journal of Essential Oil Research* 13, 401-402.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., van Montagu, M., Schell, J. 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* 26, 33.
- Villar, A., Caldach, M.L., Zafra-Polo, M.C. 1983a. Aceites esenciales de diversas especies de *Artemisia*. *Ars Pharmaceutica* 24, 149.
- Villar, A., Zafra-Polo, M.C., Nicoletti, M., Galeffi, C. 1983b. Eudesmanolides of *Artemisia barrelieri*. *Phytochemistry* 22, 777-778.
- Voillamoz, J.F., Carlen, C., Tagliatalata-Scafati, O., Pollastro, F., Appendino, G. 2015. The génépi *Artemisia* species. *Ethnopharmacology, cultivation, phytochemistry and bioactivity*. *Fitoterapia* 106, 231-241.
- Wahby, I., Caba, J.M., Ligeró, F. 2013. *Agrobacterium* infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): establishment of hairy root cultures. *Journal of Plant Interactions* 8, 312-320.
- Wang, Y., Toyota, M., Krause, F., Hamburger, M., Hostettmann, K. 1990. Polyacetylenes from *Artemisia borealis* and their biological activities. *Phytochemistry* 29, 3101-3105.
- Wasson, A.P., Pellerone, F.I., Mathesius, U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* 18, 1617-1629.
- Waterfield, G., Zilberman, D., 2012. Pest Management in Food Systems: An economic Perspective. *Annual Review of Environment and Resources* 37, 223-245.
- Weathers, P.J., Zobel, R.W. 1992. Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells. *Biotechnology Advances* 10, 93-115.

- Weisz, R., Saunders, M., Smilowitz, Z., Huang, H., Christ, B. 1994. Knowledge-base reasoning in integrated resistance management: The Colorado Potato Beetle (Coleoptera:Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 87, 1348-1399.
- Weston, L.A., Mathesius, U. 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 39, 283-297.
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351-352.
- Wong-Baeza, C., Noguera-Torres, B., Serna, M., Meza-Toledo, S., Baeza, I., Wong, C. 2015. Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. *BMC Pharmacology and Toxicology* 16,10. doi: 10.1186/s40360-015-0010-4.
- Wright, C.W. (ed) 2002. *Artemisia*. Taylor & Francis, London (Series Medicinal and aromatic Plants-Industrial Profiles).
- Wu, H-b., Wu, H-b., Wang, W-s., Liu, T-t., Qi, M-g., Feng, J-c. 2016. Insecticidal activity of sesquiterpene lactones and monoterpene from the fruits of *Caspeium abrotanoides*. *Industrial Crops and Products* 92, 77-83.
- Wu, H.-Y., Kan, X.-Q., Sheng, Y., (...), Hu, Q.-F., Li, G.-P. 2017. Two new phenylpropanoids from *Swertia atrovioleacea* and their anti-5 $\alpha$ -reductase activity. *Natural Product Research* 31, 1431-1436.
- Yan, Z., Wang, D., Cui, H., Zhang, D., Sun, Y., Jin, H., Li, X., Yang, X., Guo, H., He, X., Pan, L., Ren, X., Guo, K., Qin, B. 2016. Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 38, art. N°. 248.
- Yao, D.-D., Wang, J.-Y., Zhou, Q., Tang, Q., Zhao, G.-Q., Wu, C.-X. 2017. Effect of coumarin on Italian ryegrass seed germination and seedling growth. *Acta Prataculturae Sinica* 26, 136-145.
- Zapata-Martínez, J., Sánchez-Toranzo, G., Chaín, F., Catalán, C.A.N., Bühler, M.I. 2016. Effect of guaianolides in the meiosis reinitiation of amphibian oocyte. *Zygote* 25, 10-16
- Zaghloul, A.M., Yusufoglu, H.S., Salkini, M. A., Alam, A. 2014. New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Anthemis scrobicularis*, *Journal of Asian Natural Products Research* 16, 922-929
- Zeng, H. Y., Alan, A. R., Saxena, P. K. 2009. Evaluation of in vitro shoots of *Artemisia judaica* for allelopathic potential. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1237-1248.
- Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., Yu, Oliver. 2009. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal* 57, 171-183.

- Zheng, G.Q. 1994. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica* 60:54-57.
- Zhou, D., Chen, G., Wang, J., Li, N. 2017. Natural cancer chemopreventive reagents from food and herbals. *Current Pharmacology Reports* 3, 138-149.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T., Luo, C. 2012. Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants. In: *Bioactive Natural Products (Part Q)*, Vol 37. Eds: Elsevier B.V.
- Zhou, M.L., Hou, H.L., Zhu, X.M., Shao, J.R., Wu, Y.M., Tang, Y.X., 2011. GmMYBZ2 acts as a repressor of catharanthine biosynthesis pathway in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Applied Microbiology Biotechnology* 91, 1095–1105.



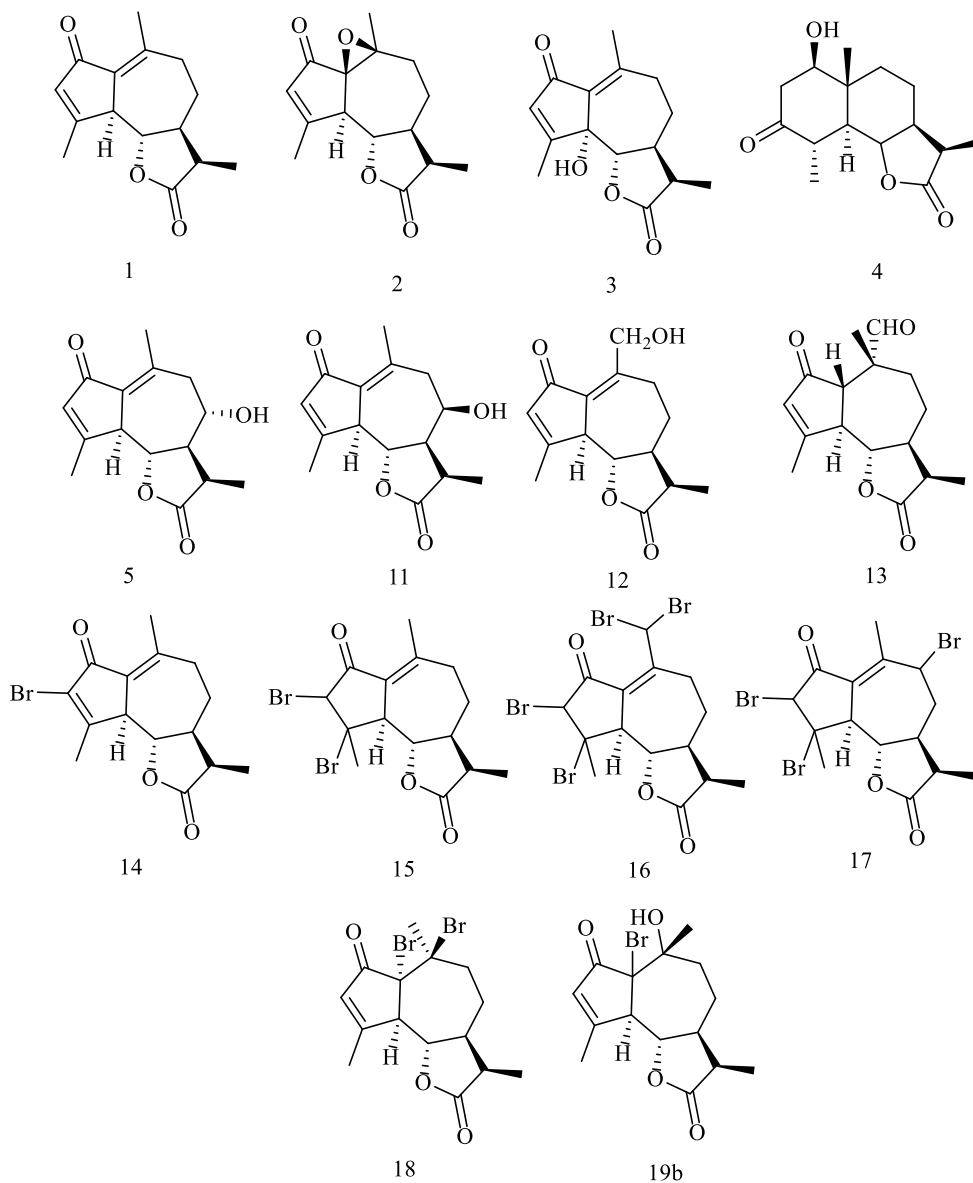
## **ANEXO I: Listado de productos identificados**

1. Achillín
2. 1,10 $\beta$ -epoxiachillín
3. 5 $\alpha$ -hidroxiachillín
4. Arsanina
5. 8 $\alpha$ -hidroxiachillín
6. Artemetina (5-hidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona)
7. 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona
8. Luteolina (3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona)
9. (4R,3R)-3-hidroxi piperitona
10. 4-hidroxiacetofenona
11. 8 $\beta$ -hidroxiachillín
12. 14-hidroxiachillín
13. 3,9-dimetil-2,7-dioxo-3  $\alpha$ ,6  $\alpha$ ,9  $\alpha$ ,9  $\beta$ -decahidroazuleno[4,5-  $\beta$ ]furan-6-carbaldehido
14. 3-bromoachillín
15. 3,4-dibromoachillín
16. 3,4,14,14-tetrabromoachillín
17. 3,4,9-tribromoachillín
18. 1 $\alpha$ ,10 $\beta$ -dibromoachillín
- 19b. 1-bromo-10-hidroxi achillín
20. (E)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.5]dec-3-eno
21. (Z)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.5]dec-3-eno
22. (E)-2-(hexa-2,4-diin-1-iniliden)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-eno
23. (E)-3-(3-metoxi-4-(3-metilbutanoil)-fenil)-alil 3-metilbutanoato
24. (E)-3-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-metoxi-3-(((3-metilbutanoil)oxi)metil)-2,3-dihidrobenzofuran-6-il)alil 3-metilbutanoato
25. Descompuesto
26. Desoxilacarol
27. Metil-lacarol

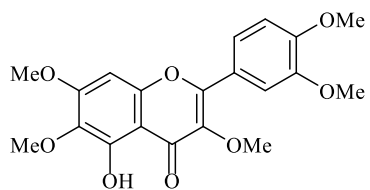
- 28. (Z)-heptadeca-1,9,16-trien-4,6-diin-8-ol
- 29. (Z)-8-hidroxiheptadeca-1,9,16-trien-4,6-diin-3-ona
- 30. 8-acetato-dehidrofalcarindiol
- 31. 3,8-dehidrofalcarindiol
- 32. Ácido-9-decenoico

## ANEXO II: Estructuras

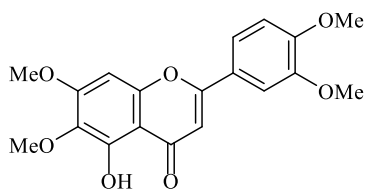
### LACTONAS SESQUITERPÉNICAS



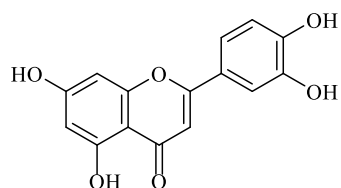
## FLAVONAS, CUMARINAS Y FENILPROPANOIDES



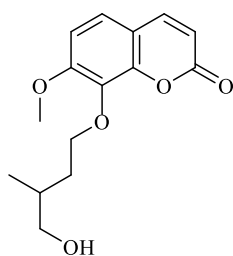
6



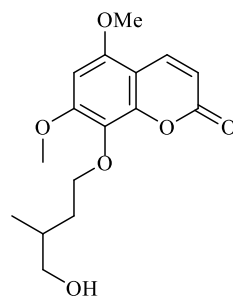
7



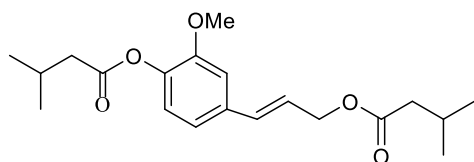
8



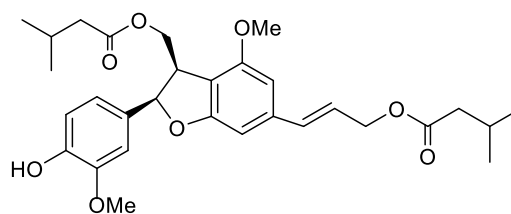
26



27

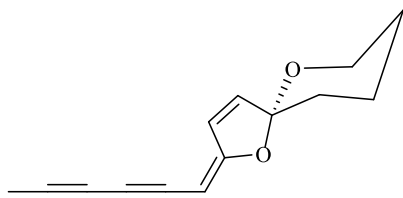


23

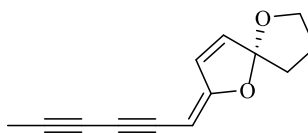


24

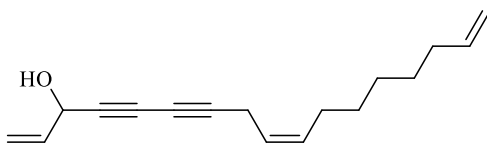
## ÁCIDOS GRASOS POLIACETILENOS Y ESPIROACETALES



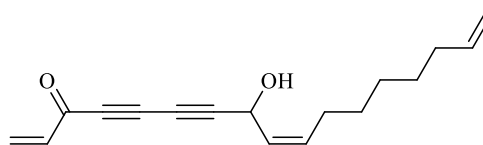
20 (E) Y 21 (Z)



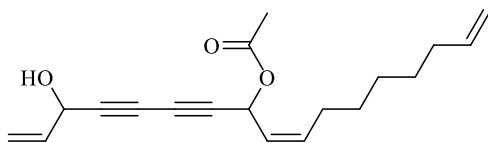
22



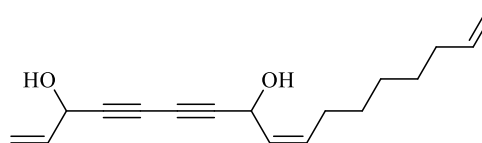
28



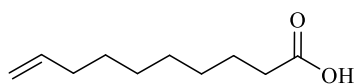
29



30

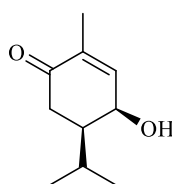


31

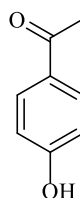


32

## OTROS COMPUESTOS



9

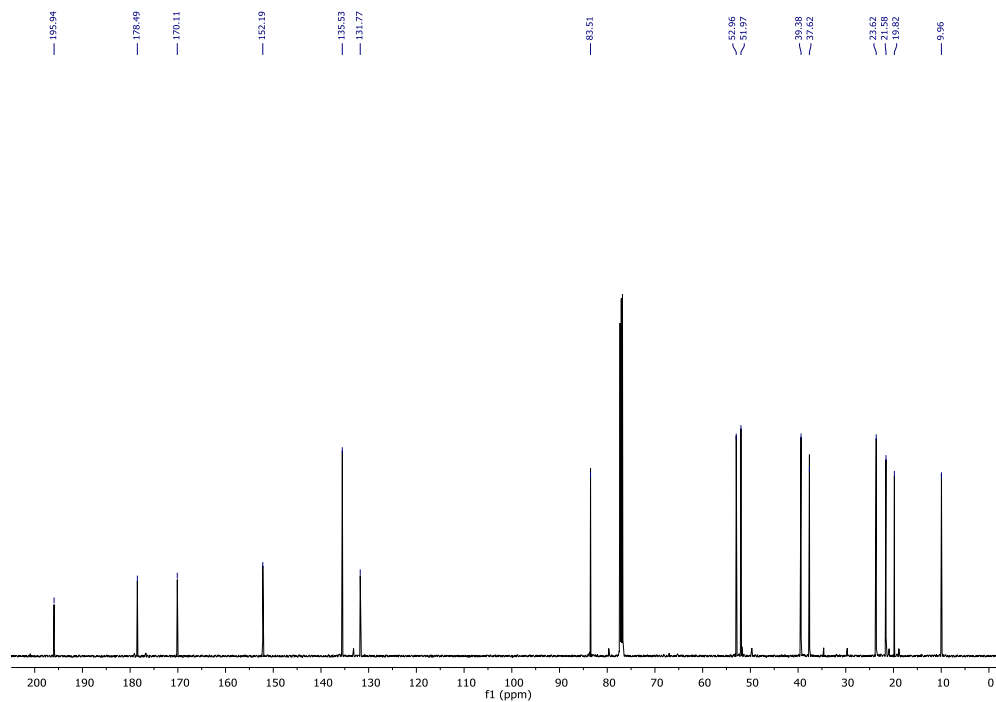
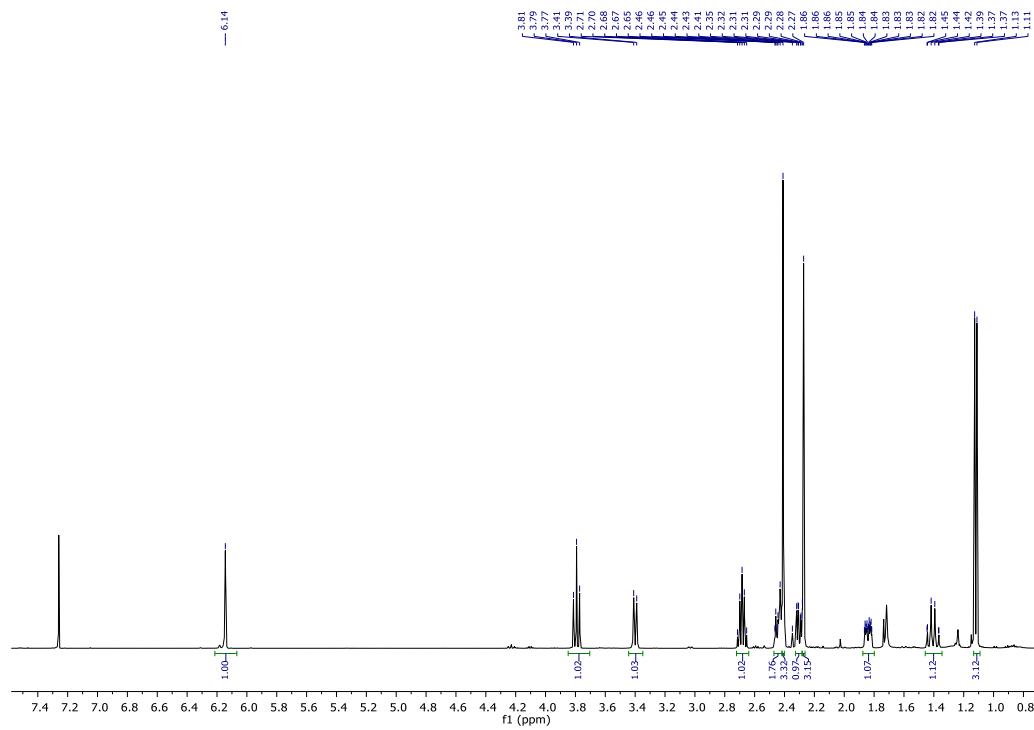


10

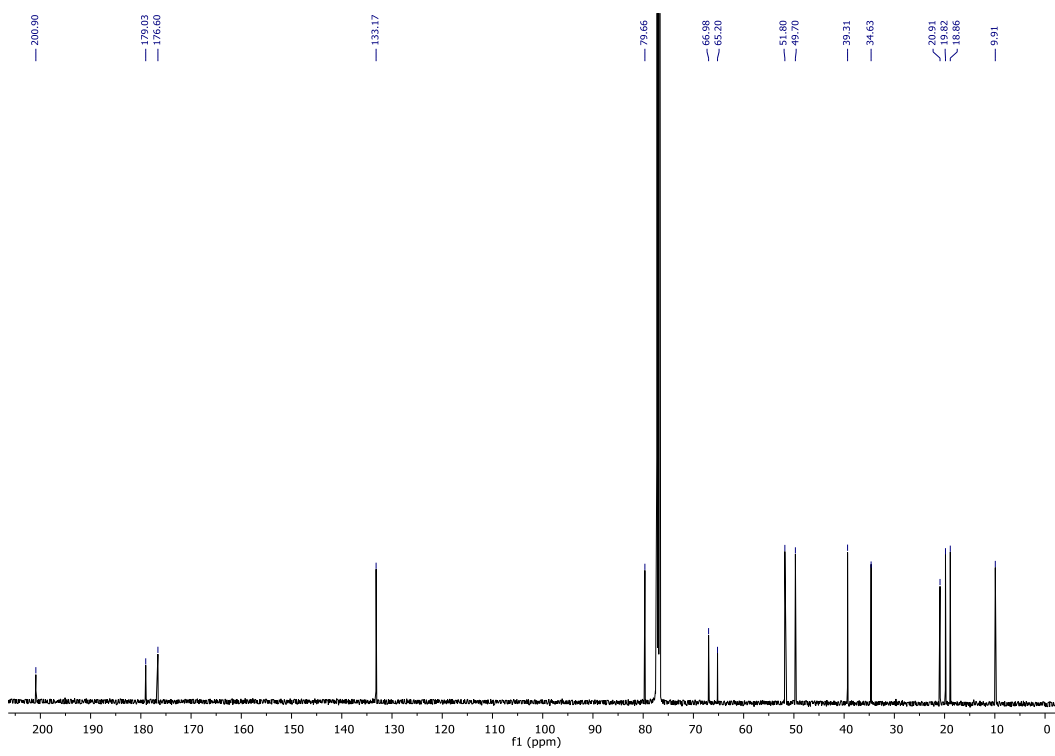
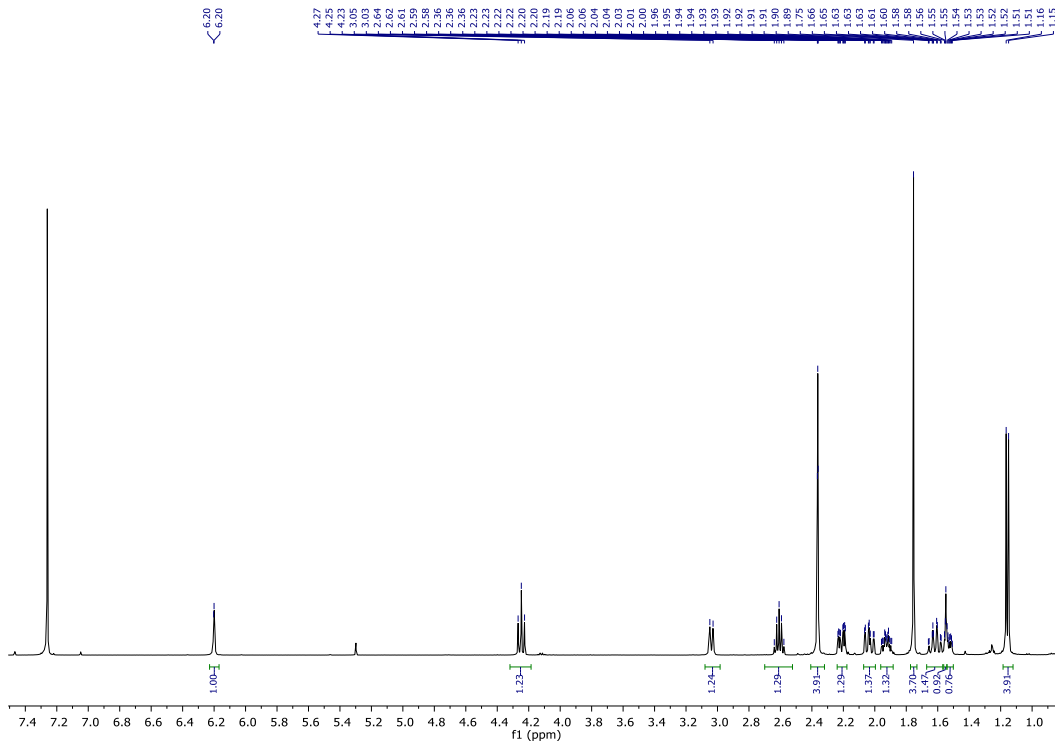


# ANEXO III: COLECCIÓN DE ESPECTROS

## Achillín (1)

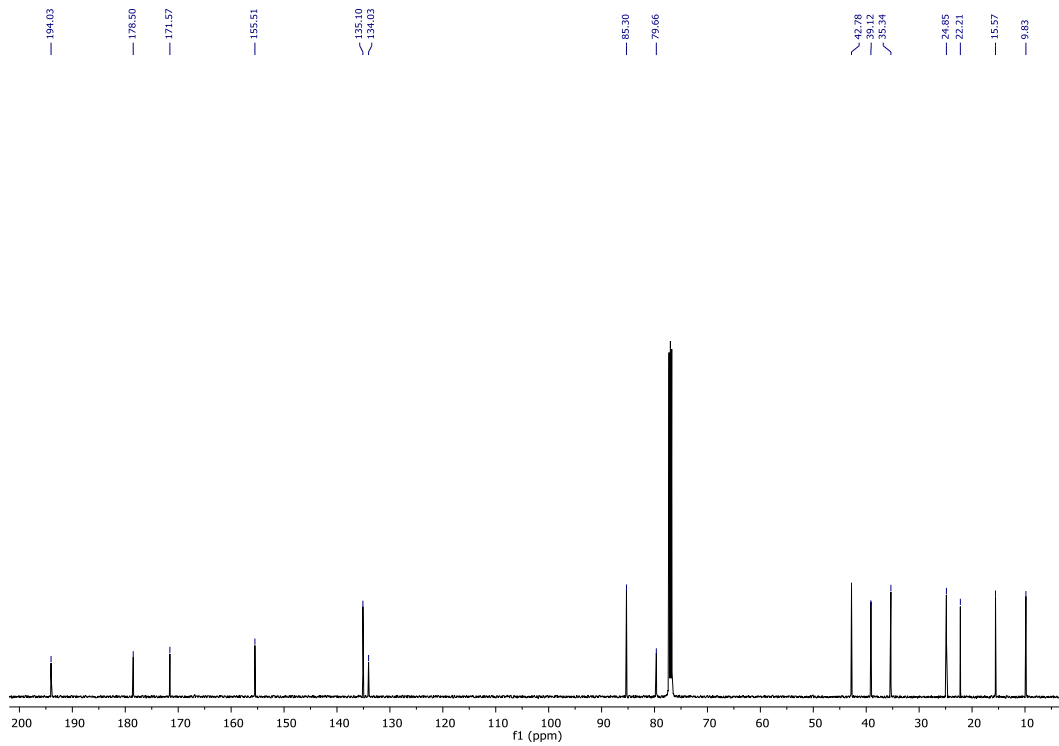
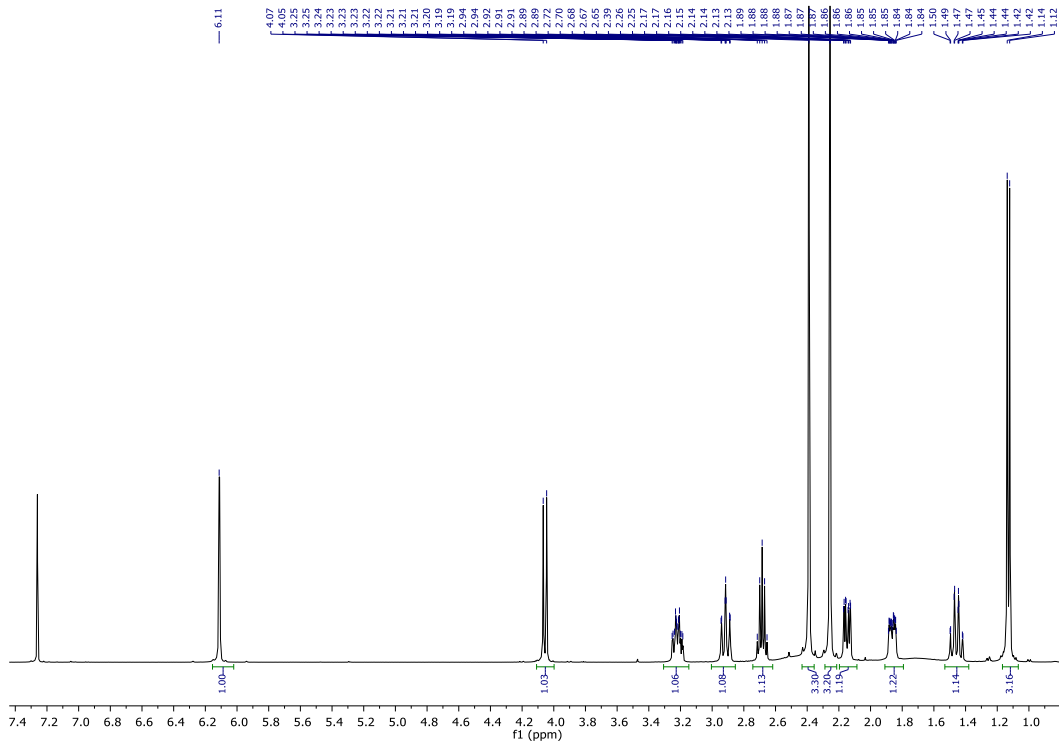


# Epóxido (2)

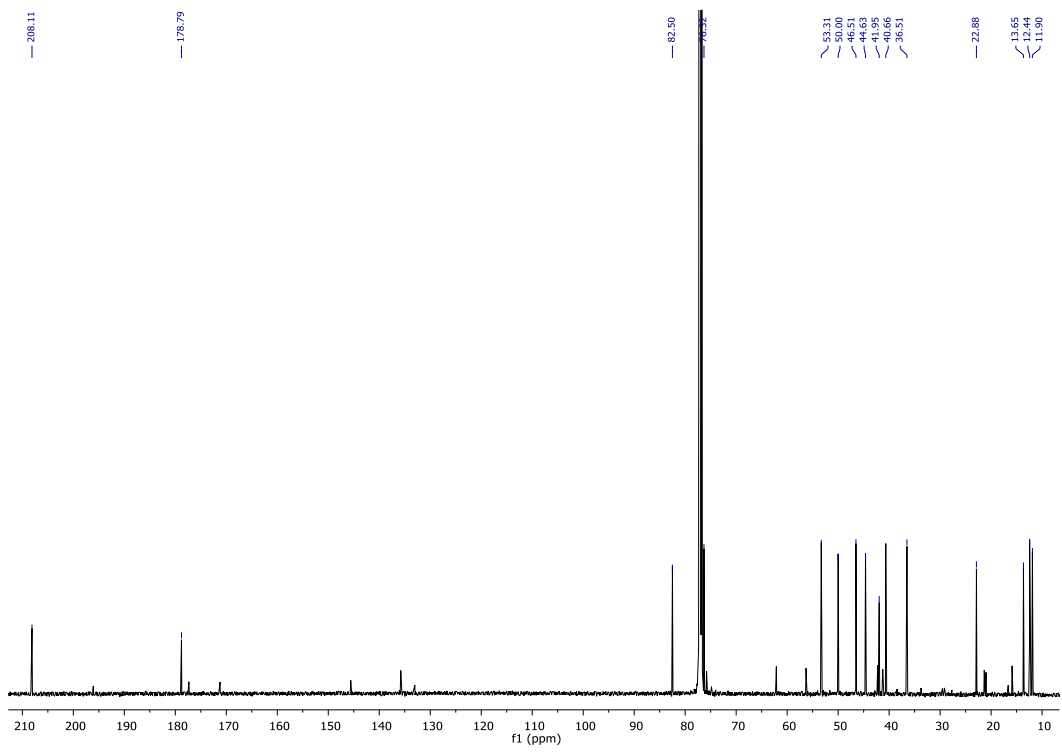
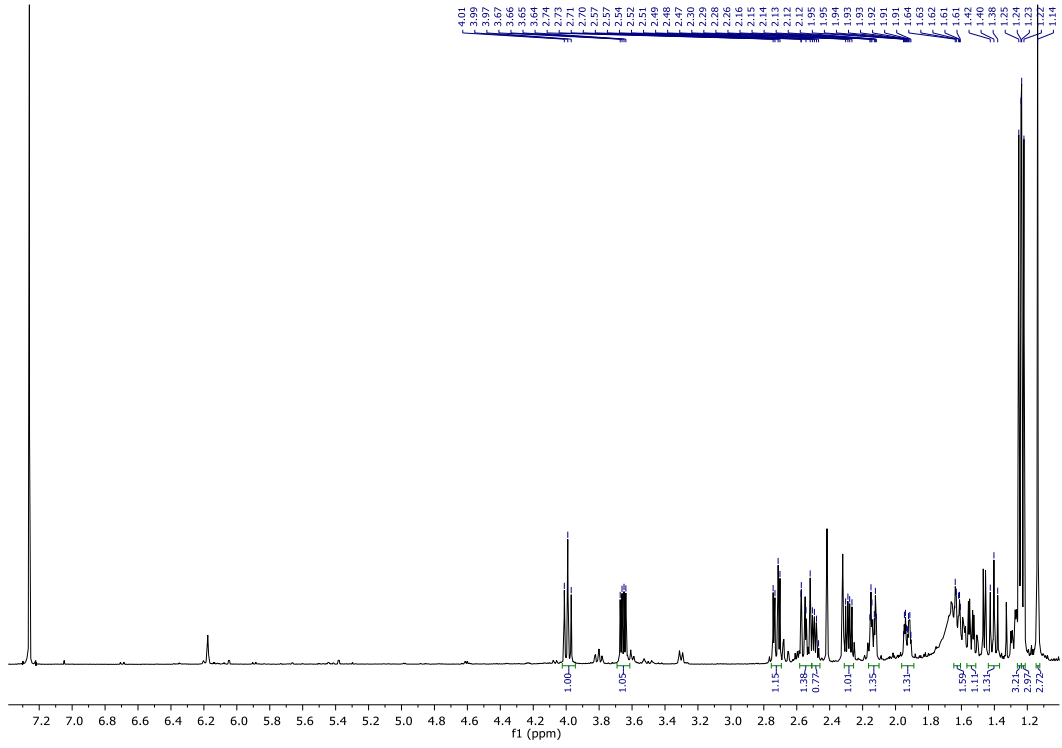




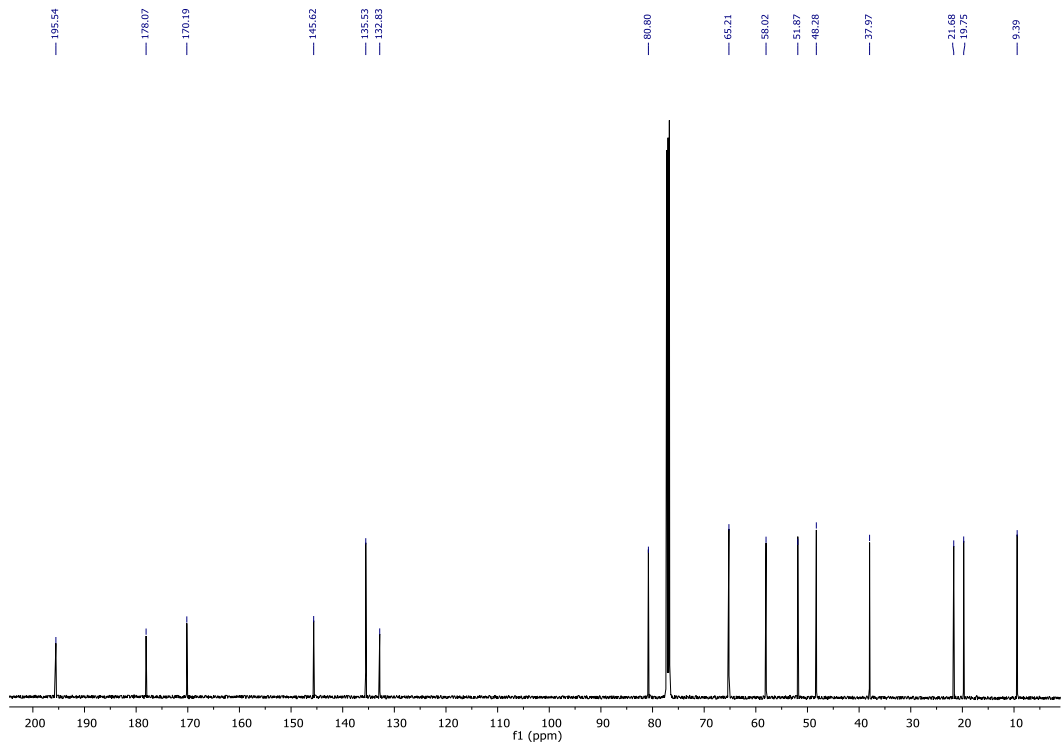
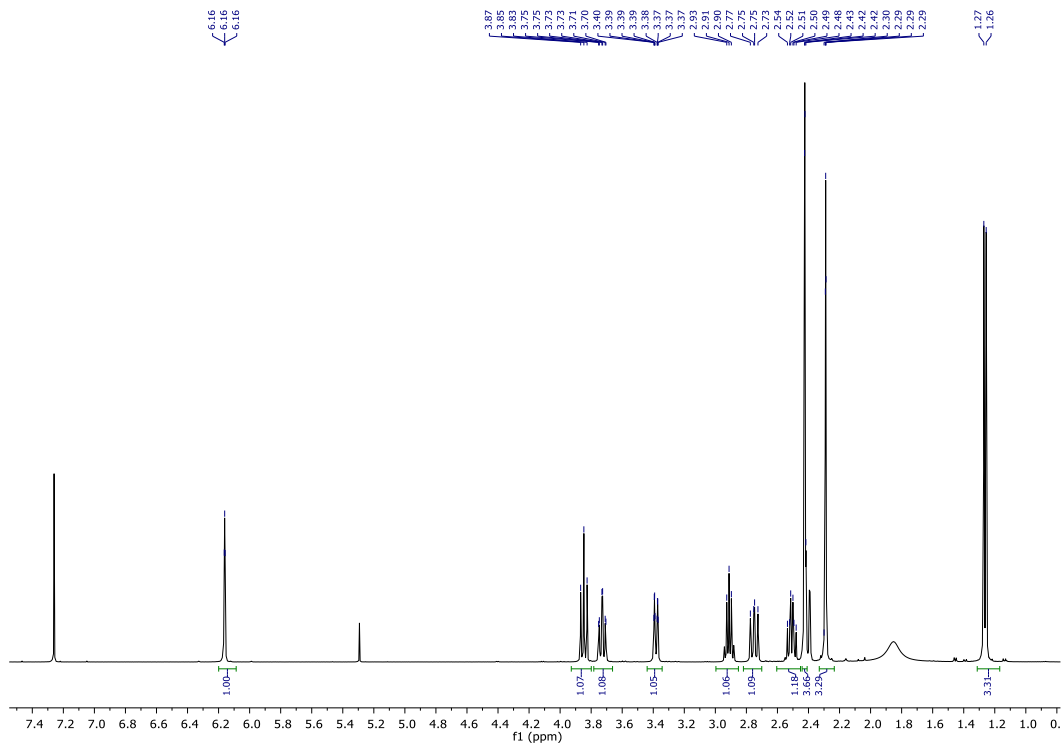
### 5- $\alpha$ -hidroxiachillín (3)



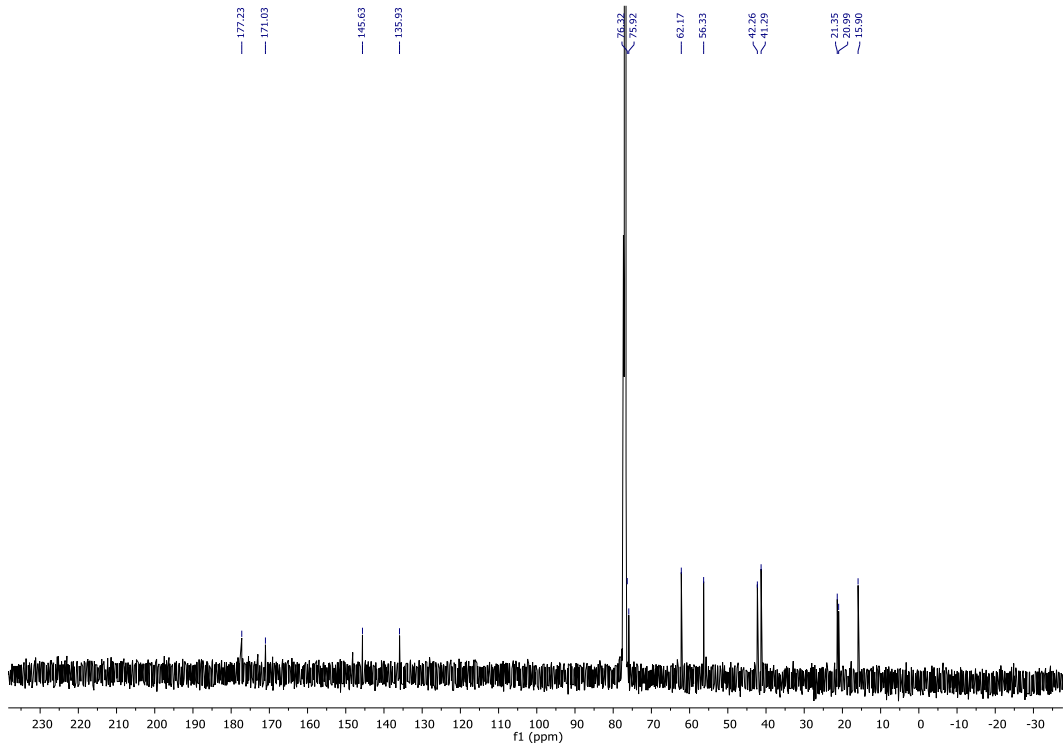
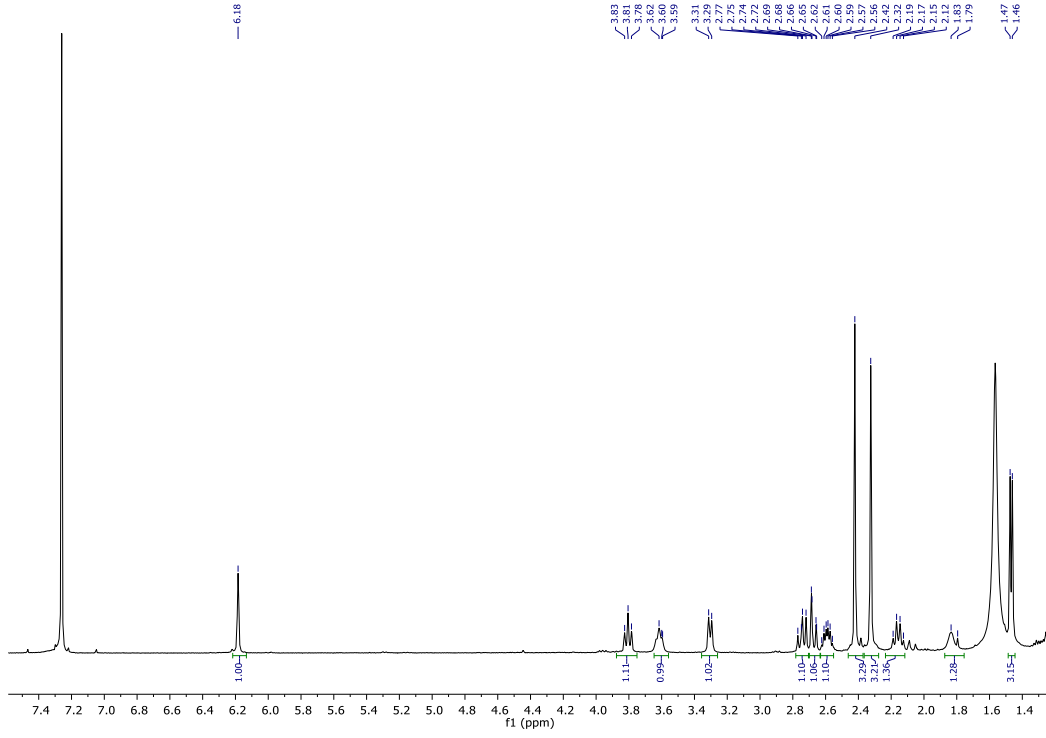
# Arsanina(4)



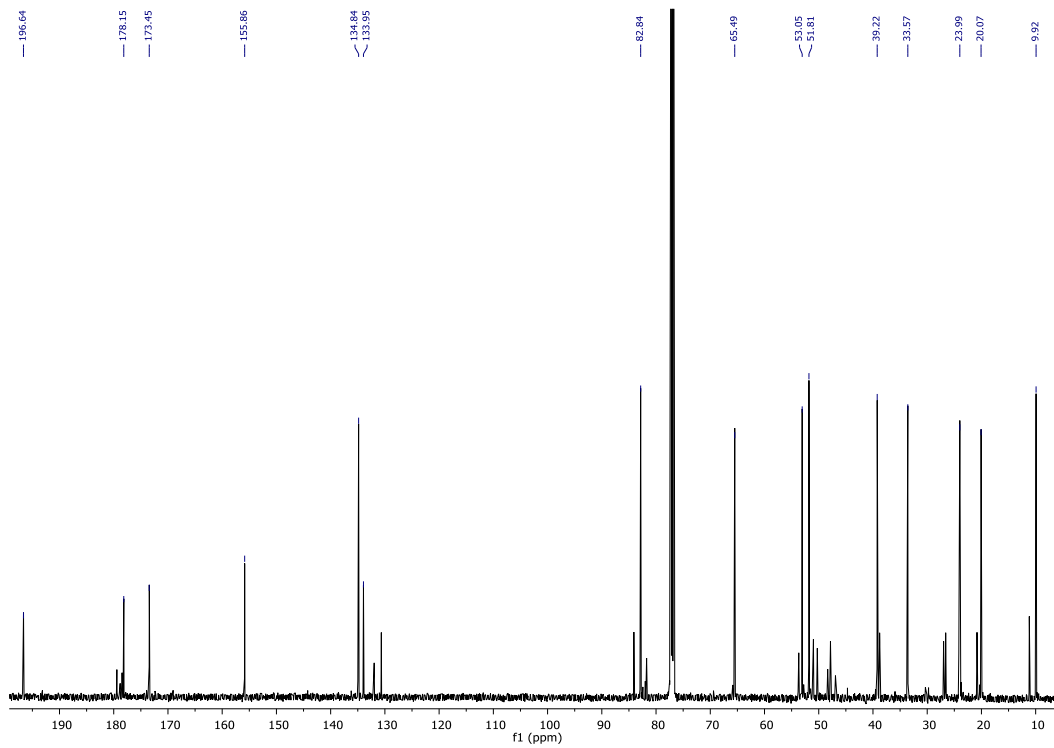
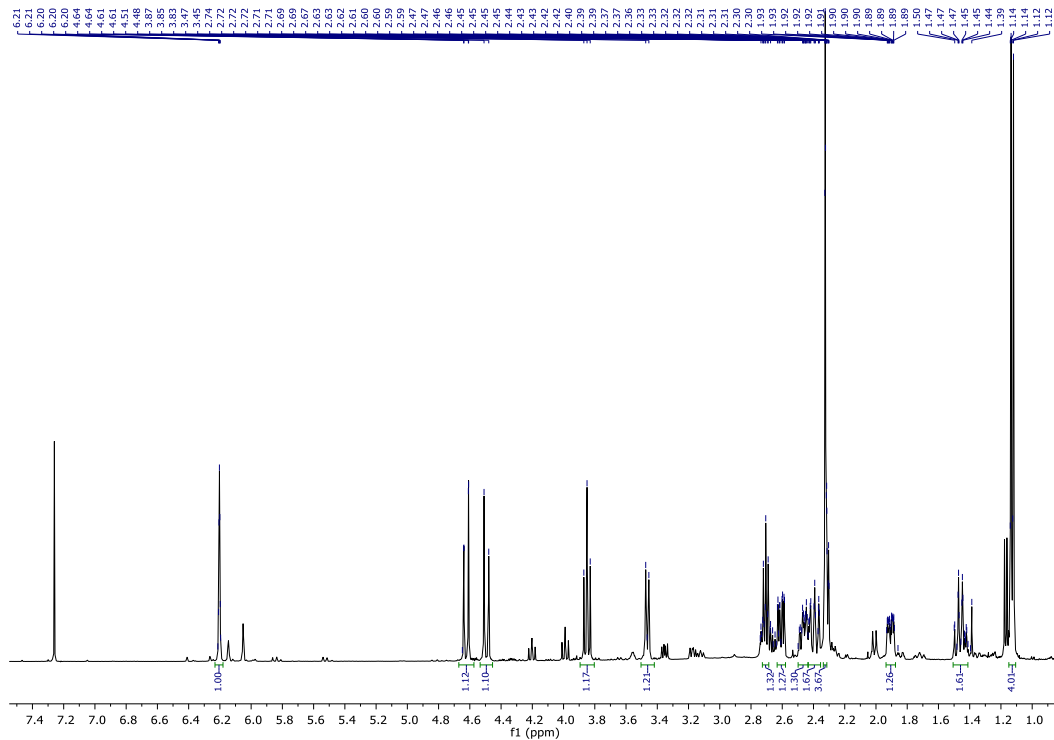
# 8 $\alpha$ -hidroxi-achillín(5)



# 8β-hidroxi-achillin(11)



# Compuesto 12



# Compuesto 13

