

Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales

Juan A. Llorens Molina (*)
Vicente Castell Zeising (**)
Rafael Pascual Ramírez

RESUMEN. El ajeno común o *wormwood* (*Artemisia absinthium* L.) es una especie común en la Península Ibérica. En nuestra comarca es frecuente en terrenos baldíos y ruderales, fincas abandonadas, etc. Su uso más conocido está relacionado con el licor denominado absenta o con los principios amargos que justifican su peculiar contribución al sabor de bebidas como los *vermouth*. Además, sus bien documentados efectos alelopáticos, insecticidas, acaricidas, –particularmente del aceite esencial obtenido de sus partes aéreas– son prometedores en cuanto a su empleo en la preparación de productos fitosanitarios alternativos. No obstante, la existencia de diversos quimiotipos, definidos por la presencia de ciertos componentes mayoritarios, hace imprescindible su caracterización ya que puede afectar a compuestos con actividad biológica, tal como sucede con la tuyona, de propiedades neurotóxicas. El objetivo de este trabajo ha sido la identificación del quimiotipo de ajeno que se desarrolla espontáneamente en el término municipal de Calamocha, que ha resultado ser el que contiene como componentes mayoritarios *cis*-epoxiocimeno y acetato de *cis*-crisantenilo. Se ha estudiado también la variación en la composición de su aceite esencial a lo largo del ciclo anual, así como entre el obtenido a partir de flores y de hojas, respectivamente.

(*) E.T.S.M.R.E. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Química.

(**) E.T.S.M.R.E. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Producción Vegetal.

ABSTRACT. The *wormwood* (*Artemisia absinthium* L.) is a widespread species in the Iberian Peninsula. Around the town of Calamocha, it is frequent in wastelands, uncultivated fields, etc. Its more known use is related to absinthe liqueur or the bitter principles which justify its particular contribution to beverage flavours y lavours in beverages as vermouths. Besides, its well documented alelopatic, insecticide, acaricide, etc. effects –particularly, of the essential oil abstracted from aerial parts– are promising in order to prepare alternative phytosanitary products. However, the existence of several chemotypes, defined by the presence of certain majority compounds makes their characterization indispensable because it affects to biological active compounds, such as the neurotoxic thujone. The goal of this paper has been to identify the chemotype of wormwood which grows spontaneously around Calamocha, which has been that contains *cis*-epoxyocimene and *cis*-chrysanthenil acetate as a main component. The seasonal variations and the differences between flowers and leaves have also been studied.

1. Introducción y objetivos

1.1. Variabilidad química en los aceites esenciales de plantas aromáticas

Muchas de las aplicaciones de las plantas aromáticas y, particularmente, de sus aceites esenciales, están relacionadas con la presencia de determinadas sustancias biológicamente activas, por lo que la identificación y cuantificación de las mismas es un requisito fundamental para utilizarlas adecuadamente en sus diversas aplicaciones: terapéuticas, agroalimentarias, fitosanitarias, etc. Un problema importante, característico de productos naturales como los aceites esenciales, es su variabilidad química, tanto interespecífica como intraespecífica. Esta variabilidad obedece al hecho de que los aceites esenciales están constituidos por productos del metabolismo secundario, cuya naturaleza, distribución en la planta y concentración no es consecuencia únicamente de factores genéticos, sino de un amplio conjunto de factores ecológicos: altitud, tipo de suelo, humedad, etc. Por otra parte, los metabolitos secundarios pueden cumplir también una función semioquímica, ya que constituyen un mecanismo de interacción con el resto de seres vivos de su entorno que se manifiesta en formas diversas: efectos alelopáticos, efecto atrayente o repelente de insectos, etc., lo cuál constituye un factor más de heterogeneidad.

Desde el punto de vista interespecífico, la variabilidad química referida puede ser útil desde el punto de vista taxonómico en aquellos casos en los que las características morfológicas no constituyen un criterio suficiente, siendo especialmente útil en la formación espontánea de híbridos, como en el caso de las lavandas. Desde el punto de vista intraespecífico la variabilidad química se concreta, dentro de una misma especie, en la existencia de diferentes quimiotipos, entre los que existen diferencias cualitativas notorias en su composición. Entre los individuos de un mismo quimiotipo las diferencias son esencialmente cuantitativas y relacionadas con factores ecológicos, ambientales, etc. Aunque el quimiotipo no es una categoría con rango taxonómico reconocido, en los casos en los que su identidad viene definida por compuestos de interés aplicado, como ocurre cuando se trata de plantas aromáticas o medicinales, la caracterización de los quimiotipos tiene una importancia obvia.

En resumen, la identificación de estos quimiotipos es especialmente relevante en dos aspectos: el quimiotaxonómico y el de aquellas aplicaciones prácticas relacionadas con principios activos que son componentes característicos de un quimiotipo. Desde el punto de vista taxonómico, los estudios sobre aceites esenciales han sido fundamentalmente una ayuda para definir especies y subespecies, detectar hibridaciones en poblaciones naturales, así como para establecer algunos patrones de variación geográfica, frecuentemente asociados a la diversidad climática (Harborne y Turner, 1984). Este tipo de estudios posee una larga trayectoria cuyo origen puede situarse

en obras como: *Chemical Plant Taxonomy*, publicada en 1963 por Swain, o, en el mismo año: *Biochemical Systematics*, por Turner. Actualmente revistas como *Phytochemistry* o *Biochemical Systematics and Ecology* aportan una amplia y variada literatura acerca de la aplicación a la taxonomía vegetal de los datos cualitativos y cuantitativos procedentes del análisis químico del material vegetal.

En cuanto al segundo aspecto, este trabajo aborda un ejemplo particularmente representativo: el de *Artemisia absinthium* L. (ajenjo común) donde la presencia o ausencia de la tuyona, componente característico por su actividad neurotóxica, permite caracterizar algunos de sus quimiotipos más extendidos. Cabe centrarse pues en esta planta, comentando en primer lugar algunas de sus características botánicas y sus principales aplicaciones, así como algunos aspectos generales de su composición química.

1.2. Descripción de las características botánicas y distribución geográfica de *Artemisia absinthium* L.

Desde el punto de vista taxonómico, el ajenjo pertenece a la familia *Asteraceae*, género: *Artemisia*, especie: *Artemisia absinthium* L.

El ajenjo es una planta herbácea y vivaz, de tallos ramosos, caducos, vellosos, de matiz grisáceo, que alcanzan alturas que llegan a superar un metro. Sus hojas son pecioladas, alternas, pinnatisectas, vellosas, de matiz verde grisáceo por el haz y plateado por el envés. Sus flores son pedunculares, de color amarillo, reunidas en capítulos globulosos y formando racimos en las axilas florales. Están distribuidas a lo largo de los tallos, exhalando un olor característico.

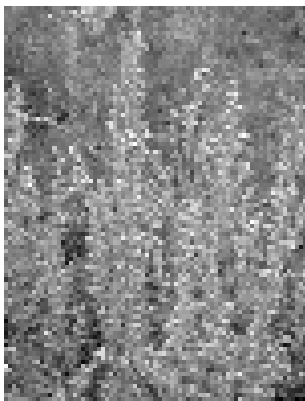


Figura 1. *Artemisia absinthium* L. al comienzo de la floración.

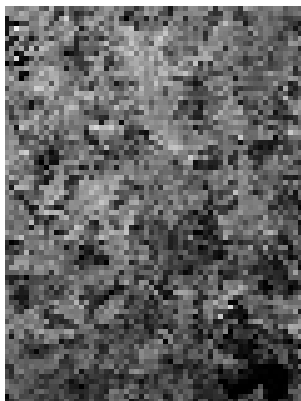


Figura 2. *Artemisia pontica* L.

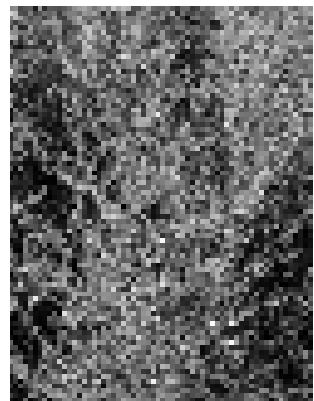


Figura 3. *Artemisia annua* L.

Florece entre verano y otoño, dando lugar a un fruto en aquenio unilocular monospermo. En condiciones silvestres la especie se desarrolla en medios secos y áridos, sin embargo, su posible cultivo se reduce a zonas de regadío ya que, si bien se la puede considerar como poco exigente en cuanto a recursos hídricos, situación típica durante el estío en condiciones de clima mediterráneo, los riegos durante el verano aumentan notablemente los rendimientos de la cosecha. En cualquier caso, precisa una pluviometría superior a los 400 mm/año. Por lo que respecta a la altitud, el ajenjo crece espontáneamente a partir de altitudes en torno a los 600 m, pudiendo hallarse hasta 2.300 metros sobre el nivel del mar.

En cuanto a suelos, aunque es una planta muy rústica que crece espontáneamente en yermos y ruderales, en condiciones de cultivo requiere unos suelos no excesivamente pesados y, por tanto, sin problemas de encharcamiento (Bruneton, 1991).

El área de distribución del ajenjo abarca desde Asia central hasta Europa Occidental, así como en algunos puntos del Norte de África. Dado que ha sido una planta muy cultivada por su carácter aromático, diversos autores plantean la posibilidad de que se trate de una especie naturalizada desde antiguo en una buena parte de su área de distribución actual, al menos en el continente europeo (Meusel y Jäger, 1992). De modo naturalizado se encuentra en Azores, el continente americano y Nueva Zelanda. En la Península Ibérica es relativamente frecuente en los Pirineos, Sistema Ibérico y Sistema Central, con algunas poblaciones dispersas fuera de esta área, la más meridional de las cuales se encuentra en Sierra Nevada. Es posible que su presencia en algunas localidades peninsulares se deba también a naturalizaciones a partir de antiguos cultivos.

1.3. Otras especies de interés del género *Artemisia*

Debido a que las especies del género *Artemisia* suelen ser plantas aromáticas o con compuestos amargos, muchas de ellas se utilizan localmente, tanto como plantas medicinales como en la preparación de licores o en perfumería. Cabe destacar la importancia de dos especies: *A. pontica* L. (figura 2) y *A. annua* L. (figura 3) algunas de cuyas aplicaciones se citan a continuación.

A la *A. pontica* se le ha denominado comúnmente ajenjo menor y entra a formar parte de la composición de los licores de la absenta. Se utiliza en herboristería como aromatizante y para la preparación de otras bebidas amargas. En farmacia se utiliza por sus propiedades estomacales, estimulantes (Chialva y Liddle, 1981) y sedantes (Todorova, 1996).

En su composición química cabe destacar la santonina, razón por la cual se ha utilizado durante más de 100 años como antihelmíntico. Su uso se ha visto desplazado

por nuevos compuestos más efectivos y con menores efectos secundarios (Arnold *et al.*, 1991). Su contenido en lactonas sesquiterpénicas ha sido estudiado recientemente por Trendafilova *et al.* (1996).

La *A. annua* está ampliamente distribuida por la región eurasiática, siendo tradicional su uso en la medicina china. Posee una lactona sesquiterpénica, la artemisina, a la que recientemente se ha atribuido propiedades antimaláricas muy efectivas (White, 1994; Brown, 1994; Green *et al.*, 1995), además de antibacterianas, antiinflamatorias y antitumorales (Tan *et al.*, 1998).

Se han desarrollado diversos métodos para extraer la artemisina de la planta (Elsholy *et al.*, 1990) y para sintetizarla químicamente (Avery *et al.*, 1992). También se han seleccionado variedades con elevado contenido en el citado compuesto (Pras *et al.*, 1991).

En la tabla siguiente (tabla 1) se muestran los principales usos de otras especies de interés del género *Artemisia*:

Tabla 1. Usos y aplicaciones de diferentes especies del género *Artemisia*

Especie	Usos	Referencias
<i>A.abrotanum</i>	Estomacal, colagoga, perfumería, licorería	Chiej, 1983; Volák <i>et al.</i> , 1988; Bruneton, 1993
<i>A.abyssinica</i>	Antidiabética	Qureshi <i>et al.</i> , 1990
<i>A.argentea</i>	Ornamental, emenagoga, tónica	Figueiredo <i>et al.</i> , 1994
<i>A.giraldii</i>	Antimicrobiana	Tan <i>et al.</i> , 1998
<i>A.capillaris</i>	Antitumoral, antihepatitis, tranquilizante, aromatizante alimentario	Duke y Ayensu, 1985; Tan <i>et al.</i> , 1998
<i>A.dracunculus</i>	Aperitiva, colagoga, digestiva	Volák <i>et al.</i> , 1998

1.4. Usos del ajenjo (*A. absinthium* L.)

Desde el punto de vista farmacológico, el ajenjo posee propiedades digestivas, actuando como tónico estomacal, carminativas, aperitivas, expectorantes, antibacterianas y vermífugas. También tiene propiedades diuréticas por la presencia de elevadas concentraciones de sales de potasio.

Se encuentra indicada en amorrea, dismenorrea, meteorismo, anorexia, disquinesia biliar, bronquitis y externamente como vulneraria.

La planta tiene también propiedades vermífugas y emenagogas. También es un buen repelente de abejas, cuando se manipulan colmenas o cuando se quiere evitar la formación de las mismas en lugares inadecuados.

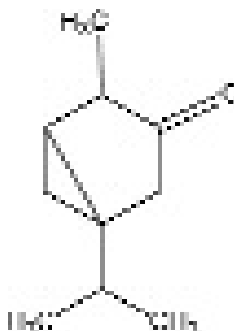


Figura 4. Estructura de la β -tuyona

Un campo de creciente interés de esta planta es el de sus posibles aplicaciones fitosanitarias. Además del uso popular del extracto acuoso fermentado (“purín de ajeno”), utilizado como vigorizante de la planta y repelente de insectos, cabe citar los estudios de Moreno (2005) sobre el efecto alelopático en estudios sobre malherbología. Asimismo, también se ha evaluado con éxito el empleo del aceite esencial de ajeno como acaricida (Chiasson *et al.*, 2001).

Otros usos del ajeno se refieren a su empleo como condimento o en licorería para la elaboración de bebidas amargas como los *vermouth* o el licor conocido como absenta. Precisamente, la elaboración de ese licor con plantas que contienen una cetona terpénica llamada tuyona dio lugar a una conocida problemática relacionada con su obtención y consumo. Es conveniente detenerse en este punto, ya que el origen de su neurotoxicidad se halla principalmente en dicho compuesto, que no está presente en todos los quimiotipos. Este hecho confiere interés a su identificación en las poblaciones o cultivares de ajeno, ya que existen quimiotipos sin tuyona con unas características organolépticas similares (De Ariño, 1999).

1.5. Composición química del ajeno. Aspectos generales

En el ajeno se han identificado numerosos compuestos de naturaleza química muy variada: poliacetilenos: (Greger, 1979); lignanos tetrahidrofuránicos (Greger y Hofer, 1980); flavonoides (Hoffman y Hermann, 1982); oligosacáridos (Kenedy *et al.*, 1988), entre otros. En las infusiones de ajeno se han identificado también dos cumarinas con actividad alelopática: scopoletin y umbelliferona, así como diferentes aminoácidos (Zhukov y Timofeev, 1987). También es muy evidente la presencia de saponinas por la formación de espuma permanente cuando se agitan sus extractos acuosos (métodos afrosimétricos) (Pascual, 2006). Se profundizará a continuación en dos tipos de sustancias particularmente importantes: lactonas sesquiterpénicas y los compuestos terpénicos que forman el aceite esencial.

Lactonas sesquiterpénicas

Forman un grupo muy numeroso de compuestos, con más de 1400 estructuras diferentes. Las lactonas sesquiterpénicas son muy características en la familia de las asteráceas, donde se encuentran cerca del 90% de las estructuras conocidas (Seaman, 1982). Fuera de ésta, se han aislado también en algunos géneros de apiáceas, magnoliáceas y lauráceas, e incluso en algunas hepáticas y hongos (Hegnauer, 1992).

A nivel genérico, las lactonas sesquiterpénicas han podido correlacionarse en algunos casos con patrones de distribución geográfica o con aspectos evolutivos de la biología floral dentro del género *Artemisia* (Greger, 1977). Además de su utilidad quimiotaxonomica, muchas lactonas sesquiterpénicas tienen actividad biológica que las hacen interesantes para otros fines (Rodríguez *et al.*, 1976; Tan *et al.*, 1998), concretamente, varias de las lactonas sesquiterpénicas que producen las plantas del género *Artemisia* tienen propiedades fungicidas, herbicidas, antimicrobianas o insecticidas, y podrían ser una buena fuente de nuevos productos fitosanitarios (Duke, 1988).

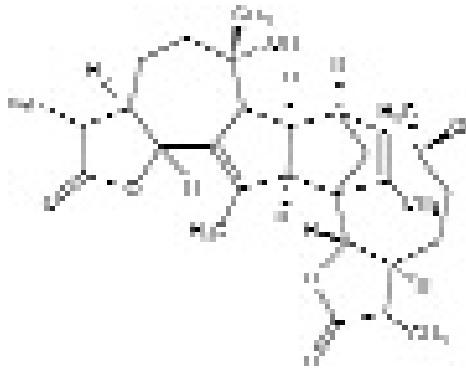


Figura 5. Estructura de la absintina. Una de las principales lactonas sesquiterpénicas presentes en *A. absinthium* L.

Compuestos terpénicos

Los terpenos son productos orgánicos naturales muy extendidos en plantas y animales. Están constituidos por la unión de dos o más unidades de isopreno. Son típicos constituyentes de los aceites esenciales de las plantas (esencias de naranjas, de menta, laurel, geranio, etc.).

Como compuestos terpénicos cuantitativamente importantes descritos por varios autores (Chialva *et al.*, 1976; Chialva *et al.*, 1983b; Carnat *et al.*, 1992; Kalemba *et al.*, 1993; Lamarti *et al.*, 1996; Pino *et al.*, 1997) en el aceite esencial de *A. absin-*

Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha [Teruel]. Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales

thium, podemos referirnos al cis-epoxiocimeno, acetato de sabinilo, acetato de cis-crisantenilo, el cis-crisantenol, el alcanfor, 1,8-cineol y el acetato de bornilo. Así como otros monoterpenos y sesquiterpenos (figura 6).

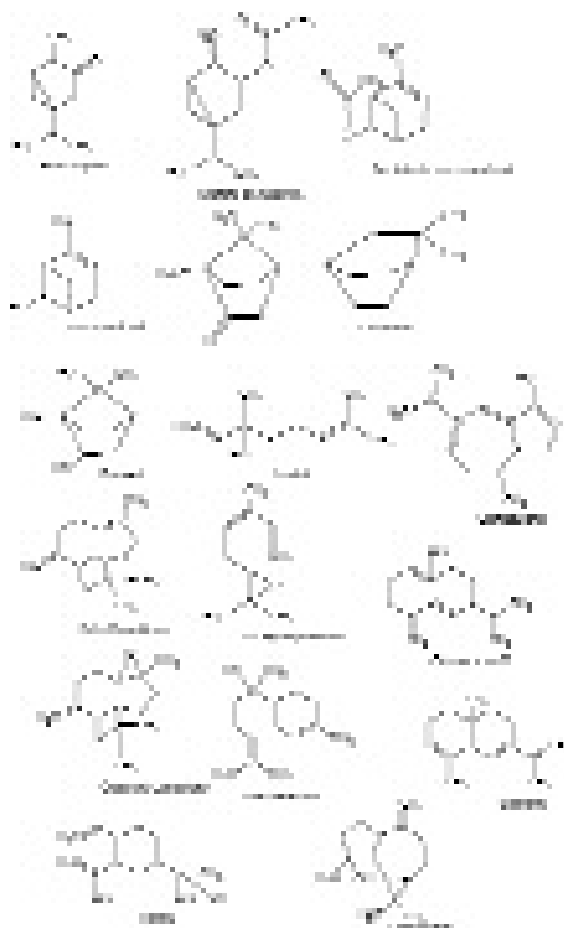


Figura 6: Principales terpenos y terpenoides presentes en *A. absinthium* L.

1.6. Variabilidad química de *A. absinthium*

La composición química del aceite esencial de *A. absinthium* ha dado lugar a la definición de varios quimiotipos (Chialva *et al.*, 1976; Vostrowsky *et al.*, 1981; Karp y Croteau, 1982; C; Carnat *et al.*, 1992; 1995; Esteban, 1995; Nin *et al.*, 1995; Lamar-ti *et al.*, 1996; Pino *et al.*, 1997; Lawrence, 1998).

En el trabajo desarrollado por Chialva *et al.*, (1983) se estudia la composición del aceite esencial de 19 plantas de diferentes orígenes geográficos y diferentes altitudes. Estos autores definen como quimiotipo puro a las plantas que tienen más del 40% de un único compuesto. Así, describen cuatro quimiotipos puros (b-tuyona, cis-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo y acetato de sabinilo) y al menos cinco quimiotipos mixtos (b-tuyona + cis-epoxiocimeno, b-tuyona + acetato de crisantenilo, b-tuyona + acetato de sabinilo, cis-epoxiocimeno + acetato de crisantenilo y cis-epoxiocimeno + acetato de sabinilo).

En un estudio más reciente es el realizado por Nin *et al.* (1995) en el que se analizan 49 plantas procedentes de semillas de diferentes orígenes geográficos y cultivadas en la misma localidad, entre las que se encuentran 11 plantas sin tuyona y 10 con un contenido inferior al 1%. Las 28 plantas restantes contienen hasta un 70% de este compuesto. En este trabajo se citan, por su actividad antibacteriana, otros compuestos como linalool, 1,8-cineol, terpinen-4-ol y nerol, aunque no se mencionan los contenidos de otros compuestos que serían de gran interés para definir estos quimiotipos. Sin embargo, se destacan las diferencias encontradas no sólo entre grupos de ejemplares de distintos orígenes, ya citadas por otros autores, sino dentro de cada grupo.

En el trabajo de Carnat (1992) los principales componentes identificados fueron (α + β) tuyona o cis-crisantenol, dependiendo del estado de desarrollo de la planta. En el ajeno cosechado después del periodo de floración (octubre o noviembre), la cantidad de cis-crisantenol puede alcanzar más del 60%. Este tipo de ajeno, recolectado en Auvergne (Francia) puede ser considerado un nuevo quimiotipo caracterizado por la presencia mayoritaria de cis-crisantenol.

En las investigaciones de Juteau *et al.* (2002) se han tomado partes aéreas de ajeno en Francia y Croacia, en junio (plantas en estado vegetativo), julio (después de la antesis), agosto (plena floración) y en octubre (siembra). Las plantas de Francia contiene principalmente cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo mientras que los aceites esenciales de Croacia contienen principalmente cis-epoxiocimeno y β -tuyona.

En el trabajo de Lamarti *et al.* (1996) se obtuvieron siete clones de ajeno a partir de semillas comerciales, y la composición de sus aceites esenciales confirma de nuevo la gran heterogeneidad de la población de origen. Uno de los clones es rico en tuyona, mientras que tres de ellos lo son de acetato de sabinilo y los tres restantes tienen cantidades importantes de ambos compuestos.

En el único estudio realizado con individuos aislados de *A. absinthium* L. de origen español se analizaron tres plantas recogidas en la Comunidad de Madrid con una

composición similar, exentas de tuyonas y con concentraciones elevadas de cis-epoxiocimeno y de acetato de cis-crisantenilo (Esteban, 1995).

Más lejos de nuestra geografía cabe citar el trabajo llevado a cabo por Juzpentienė y Mockutė (2004) quienes recolectaron ajeno de seis localidades de Lituania en el periodo comprendido entre 1999-2002. Los principales componentes que contiene su aceite esencial son:

- Tuyona (cis y trans)
- Acetato de trans-sabinol.

Y sus componentes secundarios:

- Acetato de trans-sabinilo
- Tuyona
- Hidrato de trans-sabineno.

Por último, cabe citar también el quimiotipo de *A. absinthium* identificado en Patagonia (Argentina) en el trabajo desarrollado por Saco y Chialva (1987). Los compuestos principales que se han encontrado son: β -tuyona 2,34%, β -tuyona 59,90% y acetato de sabinilo 18,11%.

Quimiotipos de ajeno presentes en la Península Ibérica

Dentro de la Península Ibérica, cabe destacar los trabajos de De Ariño (1999) realizado a partir de 300 muestras y en el que se han definido 7 quimiotipos; caracterizados por su contenido en:

- A. cis-epoxiocimeno.
- B. cis-epoxiocimeno y acetato de cis-crisantenilo.
- C. acetato de cis-crisantenilo.
- D. cis-epoxiocimeno y tuyona.
- E. cis-epoxiocimeno, acetato de cis-crisantenilo y tuyona.
- F. acetato de cis-crisantenilo y tuyona.
- G. tuyona.

A través de los datos obtenidos en esta investigación se observa que el mayor porcentaje de la variabilidad encontrada en la composición de los aceites esenciales de ajeno puede explicarse en función de los tres compuestos mayoritarios: cis-epoxiocimeno, acetato de cis-crisantenilo y β -tuyona. En base a ellos pueden definirse los siete quimiotipos ya indicados. En la Península Ibérica son claramente mayoritarios los tres primeros quimiotipos, constituyendo el 93 % de las muestras analizadas en dicho trabajo. Entre ellos predomina el B, que se halla

distribuido por toda la Península. También cabe señalar que las poblaciones de ajenjo son heterogéneas y contienen generalmente distintos quimiotipos, pero en la distribución general de éstos puede observarse un cierto gradiente desde el este (Pirineos, sur del Sistema Ibérico), donde el quimiotipo A es el que acompaña preferentemente al B, hacia el noroeste (Cordillera Cantábrica), donde es el quimiotipo C el que predomina junto al B. Los quimiotipos D, E, F y G (con tuyo-na) solo aparecen en una pequeña franja que va desde el Valle del Ebro (Tarazona y Tulebras) hacia la Meseta, (Toro, Navaleno y Medinaceli) atravesando el Sistema Ibérico.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es, principalmente, la caracterización del quimiotipo presente en la comarca del Jiloca, concretamente en el término municipal de Calamocha, a través del análisis de los aceites esenciales. Asimismo, también se pretende determinar las variaciones de composición más importantes a lo largo del ciclo vegetativo, así como las diferencias entre los capítulos florales y las hojas.

3. Material y métodos

3.1. Material vegetal. Procedencia y preparación de las muestras

El material vegetal fue recolectado en la localidad de Calamocha (Teruel), cuyas coordenadas U.T.M son: 30TXL437312, durante el año 2004 (análisis inicial), 2005 (diferencias entre flores y hojas) y 2006 (estudio de la variación estacional). Cada muestra fue obtenida a partir de 50 plantas uniformemente distribuidas en la zona y seleccionadas con el mayor grado posible de diversidad morfológica. En parte del material, se separaron manualmente las inflorescencias y las hojas; en otra parte, simplemente se eliminaban los tallos gruesos, obteniéndose una muestra correspondiente al conjunto de las partes aéreas de la planta. La zona de recolección corresponde a una extensión aproximada de 3 ha de fincas abandonadas, próximas a la población, cuya vegetación espontánea es de tipo ruderal.

Tras cada recolección, el material vegetal se secó al aire hasta peso constante, alcanzándose éste al cabo de 8-10 días. Una vez desmenuzado se extendió en una bandeja de polietileno y se homogeneizó manualmente durante un tiempo aproximado de 5 minutos previamente a la obtención de la muestra para el análisis. El material vegetal seco, antes de ser sometido a hidrodestilación, fue triturado para aumentar la superficie activa y poder incrementar así el rendimiento de aceite esencial.

Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales



Figuras 7 y 8. El ajeno crece espontáneamente en ruderales y fincas abandonadas en las proximidades del entorno urbano de Calamocha.

3.2. Obtención de las muestras de aceite esencial por hidrodestilación

La obtención del aceite esencial se realizó a partir de muestras de 20 g de material vegetal seco al aire hasta peso constante, mediante destilación por arrastre de vapor de agua con un equipo Clavenger (hidrodestilación), utilizando 500 mL de agua destilada y un tiempo de 1,5 h.

Una vez concluida la destilación, se separó el aceite esencial obtenido, recogiendo con diclorometano los restos adheridos a la pared interna del equipo Clavenger. La disolución de aceite esencial así obtenida fue separada de la fase acuosa por decantación y sometida a deshidratación con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida (rotavapor), determinando el rendimiento de aceite esencial en % en masa. Finalmente, el aceite esencial obtenido fue llevado a volumen con un matraz aforado de 5 mL, siendo introducido en un vial en el que se eliminó el aire aplicando una corriente de nitrógeno durante 1 minuto. Dicho vial fue sellado y almacenado a -18°C hasta el análisis cromatográfico.

3.3. Análisis cromatográfico

3.3.1. Métodos aplicados

El análisis de las muestras de aceite esencial se realizó por cromatografía gaseosa en dos equipos simultáneamente, uno con espectrómetro de masas como detector (GC-MS) y otro con detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando en ambos casos la misma columna capilar e idéntico programa de temperatura. Mediante GC-FID se llevó a cabo la cuantificación en términos relativos de los diferentes componentes a partir de las áreas de los picos calculadas por integración gráfica mediante la aplicación informática incorporada al equipo, sin considerar factores de respuesta.

3.3.2. Equipos utilizados y condiciones de trabajo

GC-FID

Se utilizó un equipo Hewlett-Packard HP3398GC Chemstation. Para llevar a cabo cada análisis se diluyeron 10 mL del extracto inicial de la muestra en 1 mL de diclorometano, inyectándose en el cromatógrafo 1 mL de la disolución final. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: se utilizó como fase móvil N_2 , la temperatura del inyector fue de 250°C y la de la columna fue programada con una variación de 50°C a 250°C a razón de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La inyección tuvo lugar con una relación de split 1:50.

GC-MS

El equipo empleado consta de un cromatógrafo de gases y un detector de masas Clarus 500 (Perkin-Elmer) con una columna capilar ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 m_μ), análoga a la empleada con detector FID. Su fase estacionaria es: 5 % fenil – 95% -dime-tilpolisiloxano. La fase móvil es helio con un caudal de 1,2 mL min⁻¹. La temperatura y relación de split del inyector y el programa de temperatura fueron los mismos que en GC-FID. El detector es un espectrómetro cuya cámara de ionización funciona con un voltaje de 70 eV. Los datos obtenidos consisten en el espectro de masas para cada una de las sustancias procedentes de la columna del cromatógrafo. Mediante el programa Turbo Mass 5.0. los espectros de masas correspondientes a cada pico del cromatograma fueron registrados y comparados con los de la base de datos NIST 2.0. Se pueden conocer así las sustancias cuyos espectros de masas son mas parecidos a los correspondientes a cada pico contribuyendo así a su identificación. Este proceso viene expuesto en la figura 9 y se basa en la consideración simultánea de:

- Análisis de los espectros de masas mediante la base de datos NIST 2.0
- Índices de retención de Kovats y su comparación con los publicados por Adams (1995)
- En algunos casos, empleo de patrones de componentes puros

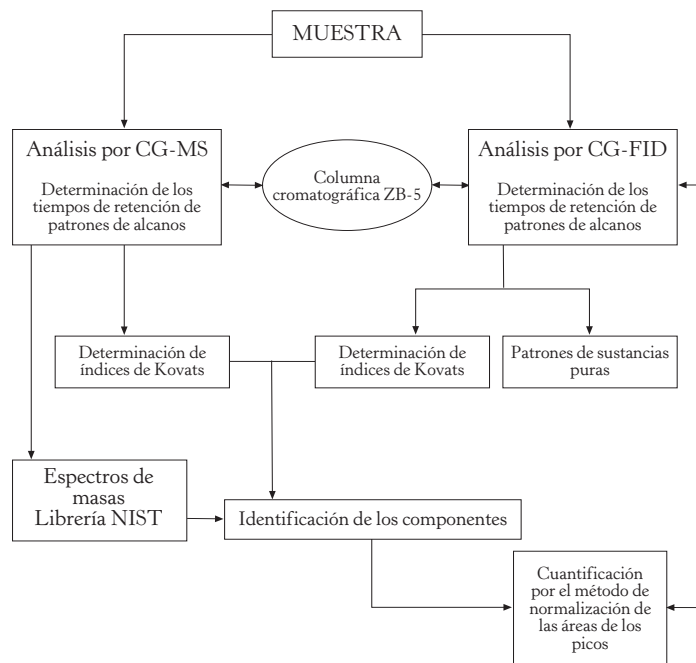


Figura 9. Esquema del método analítico

5. Resultados

5.1. Caracterización de los quimiotipos. Composición cualitativa y cuantitativa de la muestra

El análisis cualitativo y cuantitativo de referencia fue realizado con la muestra recolectada en agosto de 2004, en el periodo de floración. En la tabla 2 se muestran los resultados correspondientes, indicando los métodos empleados en la identificación y el porcentaje del área total de los picos.

Tabla 2. Composición cualitativa y cuantitativa de la muestra obtenida durante la floración

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
MONOTERPENOS				
α pineno	4,52	939	GC-MS, I.K., patrones	0,31
Sabineno	5,35	978	GC-MS, I.K.	0,11
β -mirceno	5,68	992	GC-MS, I.K., patrones	0,05
Limoneno	6,73	1033	GC-MS, I.K., patrones	0,02
Cis-Ocimeno	6,91	1039	GC-MS, I.K., patrones	0,08
Terpinoleno	8,48	1089	I.K.	0,01
			Total	0,58

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
SESQUITERPENOS				
a-copaeno	19,55	1378	GC-MS, I.K.	0,02
b-bourboneno	19,92	1387	GC-MS, I.K.	0,03
b-elemeneno	20,21	1393	GC-MS, I.K.	0,02
e-cariofileno	21,3	1421	GC-MS, I.K.	0,89
a-humuleno	22,64	1456	GC-MS, I.K.	0,06
Germacreno-D	23,73	1482	GC-MS, I.K.	0,29
Curcumeno-ar	23,8	1484	GC-MS, I.K.	0,17
β -selineno	23,93	1487	GC-MS, I.K.	0,28
Himachaleno (α -dehidro-ar)	25,02	1515	GC-MS, I.K.	0,39
Selina-3,7(11)-dieno	25,93	1540	GC-MS, I.K.	0,09
			Total	2,24

Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha [Teruel]. Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
ÓXIDOS				
Óxido de linalool furánico (trans)	8,02	1075	GC-MS, I.K.	0,12
Cis-epoxiocimeno	10,07	1137	GC-MS, I.K.	25,64
Trans-epoxiocimeno	10,34	1145	GC-MS, I.K.	0,89
Rosefuranepóxido	11,55	1177	GC-MS, I.K.	0,09
Óxido de cariofileno	27,54	1581	GC-MS, I.K.	0,06
			Total	26,8

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
ALCOHOLES				
Linalool	8,87	1099	GC-MS, I.K.	3,16
Cis-crisantenol	11,12	1166	GC-MS, I.K.	2,37
Terpinen-4-ol	11,68	1180	GC-MS, I.K.	0,08
α -terpineol	12,17	1192	GC-MS, I.K.	0,02
2-metil-6-metilen-7-octen-2-ol	16,64	1305	GC-MS, I.K.	0,05
Eugenol	18,75	1359	GC-MS, I.K.	0,05
Nerolidol	26,93	1566	GC-MS, I.K.	0,02
Spatulenol	27,44	1579	GC-MS, I.K.	0,09
Globulol	27,64	1584	GC-MS, I.K.	0,5
α -bisabolol	31,37	1684	GC-MS, I.K.	0,19
			Total	6,48

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
ALDEHIDOS Y CETONAS				
β -tuyona	9,37	1116	GC-MS, I.K., patrón	0,09

Nombre	tR	I.K.	Identificación	% (área total)
ÉSTERES				
Acetato de 1-octen-3-ilo	9,23	1112	GC-MS, I.K.	0,09
(Z)-3-butanoato de hexenilo	11,96	1187	GC-MS, I.K.	0,7
(Z)-metilbutanoato de 3-hexenilo	13,75	1235	GC-MS, I.K.	0,03
2-metilbutanoato de hexilo	13,93	1239	GC-MS, I.K.	0,02
Acetato de crisantenilo	15,11	1269	GC-MS, I.K., patrón	58,13
Acetato de 2,6,6-trimetil biciclo[3.1.1]-2-hepten-6-ol	18,69	1358	GC-MS	0,04
Acetato de nerilo	19,06	1367	GC-MS, I.K.	0,01
Isobutanoato de nerilo	24,11	1491	GC-MS, I.K.	0,09
Metilbutanoato de 2-geranilo	28,42	1603	GC-MS, I.K.	0,22
Isovalerato de geranilo	28,64	1610	GC-MS, I.K.	0,12
Metiljasmonato	30,06	1649	GC-MS, I.K.	0,02
			Total	59,47
Total de componentes identificados				95,66%

5.2. Estudio comparativo entre órganos de la planta

En la tabla 3 se muestran los resultados de un estudio con datos de las (hojas + tallos) en la muestra recolectada durante agosto de 2005. Se han comparado con datos procedentes de estudios anteriores, referidos al mismo quimiotipo, y se observa que no hay diferencias relevantes a excepción del acetato de crisantenilo que presenta una concentración mucho más elevada en el estudio de De Ariño (1999).

Tabla 3. Estudio comparativo. Hojas + tallos

	Composición % obtenida en este estudio	Ariño et al (1999) (hojas)	Juteau et al 2002 (hojas) Periodo vegetativo)*
Monoterpenos	1,57	2,8	0,8
Linalool	1,95	1,2	1,5
Cis-epoxiocimeno	49,82	44,7	46,9
Trans-epoxiocimeno	4,49	4	4,2
Acetato de crisantenilo	13,49	34,5	14,9

* El periodo vegetativo es el periodo en el cual la planta está creciendo y todavía no tiene flores.

En cuanto al aceite esencial procedente de los capítulos florales, las diferencias son más acusadas con respecto a la investigaciones de referencia, como también lo son entre ellas mismas.

Tabla 4. Estudio comparativo con otras investigaciones. Flor

	Composición % obtenida en este estudio	Ariño et al (1998) (flores)	Juteau et al (2002) (flores)
Monoterpenos	2,1	1,3	0,6
Linalool	3,65	1,8	2,7
Cis-epoxiocimeno	50,35	37,3	24,2
Trans-epoxiocimeno	3,44	1,3	2,6
Acetato de crisantenilo	15,85	43	33,6

Cuando realizamos el estudio comparativo entre las hojas y tallos respecto de la flor se observa que las concentraciones de los principales componentes son muy similares en el ajeno de la Calamocha, así como en los referidos por De Ariño (1999). Por el contrario, en el trabajo de Juteau et al, se observa un acusado aumento del acetato de crisantenilo en las flores en detrimento de la de cis-epoxiocimeno.

5.3. Estudios sobre variación estacional

En el estudio de las variaciones estacionales se ha realizado la determinación de la composición química del aceite esencial del ajeno en cuatro momentos del ciclo

Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha [Teruel]. Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales

vegetativo. Los resultados, referidos a los componentes principales, se exponen en la tabla 5.

Tabla 5. Variación de los principales componentes a lo largo del ciclo vegetativo

Fechas de recolección	Componentes							
	monoterpenos	linalool	cis-epoxiocimeno	trans-epoxiocimeno	acetato de crisantenilo	β -cariofileno	metiljasmonato	chamazuleno
14/06/06	0,50	0,51	61,22	2,12	19,49	1,98	0,77	1,65
30/08/06 (floración)	0,47	1,38	59,47	3,54	22,1	1,35	0,46	1,93
2/09/06	1,49	0,92	70,85	2,13	8,45	0,68	0,22	0,68
20/10/06	2,86	3,43	44,55	9,40	6,88	2,36	0,22	1,05

Los resultados más significativos corresponden a la disminución del epoxiocimeno hacia el final del ciclo vegetativo (octubre) y durante la floración, así como la notable disminución de acetato de crisantenilo tras la misma.

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Mediante el método analítico utilizado se ha identificado con claridad el quimiotipo correspondiente a las muestras procedentes de Calamocha (Teruel), caracterizado por la presencia mayoritaria de cis-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo, siendo coincidentes con trabajos anteriores para su zona geográfica (Nordeste de la Península Ibérica). Es importante indicar que este quimiotipo carece prácticamente del componente tóxico β -tuyona, con la importancia que ello puede tener en cuanto a la utilización de su aceite esencial.
2. Se ha conseguido identificar un elevado porcentaje (en torno al 95%) de la composición de los aceites esenciales procedentes de las partes aéreas de las plantas, obteniendo un perfil muy similar al determinado en trabajos anteriores sobre el mismo quimiotipo. Su composición incluye además productos característicos de reacciones que son consecuencia de las condiciones del proceso de extracción (degradaciones térmicas, hidrólisis, actividad enzimática, etc.) tales como el chamazuleno y el metil jasmonato.
3. Las variaciones estacionales observadas muestran cierta similitud con datos procedentes de estudios anteriores (disminución del epoxiocimeno durante la floración), lo mismo puede decirse en cuanto a la comparación de la composición del aceite esencial procedente de los capítulos florales y de las hojas. No obstante, estudios posteriores (Pascual, 2006) han mostrado una elevada

variabilidad entre individuos, superior a la observada entre las diferentes fechas de recolección o entre partes de la planta, lo cuál parece indicar que la composición del aceite esencial viene más condicionada por las condiciones individuales de su crecimiento y su estadio vegetativo particular. Por lo tanto, el momento de la recolección y la mayor o menor presencia de capítulos florales en las muestras no parecen muy decisivas en cuanto a las proporciones relativas de los componentes principales del aceite esencial. En cualquier caso, el factor que deberá considerarse a la hora de escoger el momento óptimo de la recolección es el rendimiento obtenido de aceite esencial, que generalmente es mayor cuando la planta se halla en floración (Pascual, 2006).

7. Bibliografía

- ADAMS, R. P. (1995): *Identification of Essential Oils by Gas-Chromatography-Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation. Illinois.
- ARNOLD, W. M.; DALTON, T. P.; LOFTUS, L. S. y CANAN, P. A. (1991): A Search for Santonin in *Artemisia pontica*, the other Wormwood of Old Absinthe. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 46 (5), pp. 365-377.
- AVERY, M. A.; CHONG, W. K. M. y JENNINGS-WHITE, C. (1992): Stereoselective Total Synthesis of (+)-Artemisinin, the Antimalarial Constituent of *Artemisia annua* L. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 114, pp. 974-979.
- BROWN, G. D. (1994): Secondary Metabolism in Tissue Culture of *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*, Vol. 57, pp. 975-977.
- BRUNETON, J. (1991): *Plantas Tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- BRUNETON, J. (1993): *Pharmacognosie. Phitochimie. Plantes Medicinales*. Technique et Documentation, Lavosier, Paris.
- CARNAT, A-P.; MADESCLAIRE, M.; CHAVIGNON, O. y LAMAISON, J. L. (1992): Cis-Crysanthenol, A Main Component in Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. Growing in Auvergne (Massif Central), France. *Journal Of Essential Oils Research*, Vol. 4, pp. 487-490.
- CHIALVA, F.; DOGLIA, G.; GABRI, G.; AIME, S. Y MILONE, L. (1976): Isolamento ed identificazione del cis-e trans-epossi-ocimene nell'Olio Essenziale de *Artemisia absinthium* L. Italia. *Rivista Italiana delle Essenze dei Profumi e delle Piante Officinali Aromi Saponi Cosmetici*, Vol. 58 (10), pp. 522-526.
- CHIALVA, F. y LIDDLE, P. A. P. (1981): Sur la Composition de L'Huile Essentielle de *Artemisia pontica* Linnaeus Cultivée en Piénot. *Rivista Italiana delle Essenze dei Profumi e delle piante Officinali Aromi Saponi Cosmetici*, Vol. 57(7), pp. 350-352.
- CHIALVA, F.; LIDDLE, P. A. P. y DOGLIA, G. (1983): Chemotaxonomy of Wormwood. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, Vol. 176, pp. 363-366.

- CHIASSON, H. ; BELANGER, A. ; BOSTANIAN, N. ; VINCENT, CH. y POLIQUIN, A. (2001): Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tamacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods Of Extraction. *Journal of Economical Entomology*. Vol. 94 (1), pp. 167-171.
- CHIEJ, R. (1983): Ajenjo. En: *Guía de Plantas Medicinales*, página 42. Editorial Grijalbo, Barcelona.
- CROTEAU, R. (1987): Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenes. *Chemical Reviews*, Vol. 87, pp. 929-954.
- CROTEAU, R. y SHASKUS, J. (1985): Biosynthesis of Monoterpenes: Demonstration of a Geranyl Pyrophosphate: (-)-Bornyl Pyrophosphate Cyclase in Soluble Enzyme Preparations from Tansy (*Tamacetum vulgare*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 236 (2), pp. 535-543.
- DE ARIÑO, A.; ARBERAS, I.; RENOBALLES, G.; ARRIAGA, S. y DOMÍNGUEZ, J. B. (1999): Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. From Spanish Pyrenees. *Journal of Essential Oils Research*, Vol. 11, p. 182.
- DE ARIÑO, A. (1999): Variabilidad Química de los Aceites Esenciales de *Artemisia absinthium* de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- DUKE, J.A. y AYENSU, E.A. (1985): *Medicinal Plants of China*. Reference Publishing Inc., Michigan.
- DUKE, S.O.; PAUL, J.R. Y LEE, S. M. (1988): Terpenoids from the Genus *Artemisia* as Potencial Pesticides. American Chemical Society Symposium Series, Vol. 380, pp. 318-334.
- ESTEBAN, J. L. (1995): *Análisis de Plantas por Desorción Térmica Automática y Cromatografía de Gases*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; FONTINHA, SS.; LOOMAN, A. y SCHEFFER, J. J. C. (1994): Composition of the essential Oil of *Artemisia argentea* L'Her., An endemic Species of the Madeira Archipelago. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 9, pp. 229-232.
- GREEN, M. D.; MOUNT, D. L.; TODD, G. D. y CAPOMACCHIA, A. C. (1995): Chemiluminescent Detection of Artemisinin Novel Endoperoxide Analysis Using Luminol without Hydrogen Peroxide *Journal of Chromatography A*, Vol. 695, pp.: 237-242.
- GREGGER, H. (1977): Anthemidae-Chemical Review. En: "The Biology and Chemistry of the Compositae" (V.H.Heywood, J.B. Harborne y B.L. Turner, eds), Vol. II. Academic Press, London.
- GREGGER, H. (1979): Polyacetylene und Sesamine als chemische Merkmale in der *Artemisia absinthium*- Gruppe. *Planta Medica*, Vol. 35, pp. 84-91.
- GREGGER, H., HOFER, O. (1980): New Unsymmetrically Substituted Tetrahydrofuran Lignans from *Artemisia absinthium*. *Tetrahedron Letters*, Vol. 36, pp. 3551-3558.

- HARBORNE, J.B. y TURNER, B.L. (1984): *Plant Chemosystematics*. Academic Press, London.
- HARBORNE, J.B. (1984): *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall. London.
- HEGNAUER, R. (1986): Phytochemistry and Plant Taxonomy. An Essay on the Chemotaxonomy of higher Plants. *Phytochemistry*, Vol. 25, pp. 1519-1535.
- HOFFMANN, B. y HERRMANN, K. (1982): Flanonolglykoside des Beifuss (*Artemisia vulgaris*), Estragon (*Artemisia dranculus* L) und Wermut (*Artemisia absinthium* L). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, Vol.174, pp. 211-215.
- JUZPENTIENĖ, A. y MOCKUTĖ, D. (2004): Chemical Composition of Essential Oils of *Artemisia absinthium* L. Growing Wild in Vilnius (Lituania). *Chemija*, Vol.15(4), pp. 64-68.
- JUTEAU, F.; JERKOVIC, I.; MASTELIC, J.; MILOS, M.; MASOTTI, V. y VIANO, J. (2002): *Chemical Variability of Artemisia Vulgaris L. Essential Oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia*. Departament of Organic Chemistry. Faculty of Chemical Technology. University of Spilt Teslina.
- KALEMBA, D.; GORA, J.; KUROWSKA, A.; MAJDA, T. y MIELNICZUK, Z. (1993): Badanie Olejknow Eterycznych Aspekcie Ich Dzialania na Owady. Czesci. Olejek ziela Piolunu (Herba asinthii). *Zeszyty Naukowe Politechniki Lodzkiej*, Vol. 589, pp. 5-14.
- KARP, F. y CROTEAU, R. (1982): Evidence that Sabinene is an Essential Precursor of C(3)-Oxygenated Thujane Monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 216 (2), pp. 616-624.
- KENNEDY, J.F.; STEVENSON, D.L.; WHITE, C.A.; LOMBARD, A. y BUFFA, M. (1988): Analysis of the Oligosaccharides from the Roots of Arnica Montana L., *Artemisia absinthium* L and *Artemisia dracunculus* L. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 9, pp. 277-285.
- LAMARTI, A. ; SADKI, I. ; BADO, A.; DEFFIEUX, G. y CARDE, J. P. (1996): Obtention par Culture in vitro de Clones d'absinthe, *Artemisia absinthium* L., Dénués de Thuyone. *Bulletin Société de Pharmacie de Bordeaux*, Vol 135, pp. 25-43.
- MEUSEL, H. y JÄGER, E. J. (1992): *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Vol III*. Editorial Gustav Fischer, Germany.
- MORENO, F. E. (2005): *Estudio Sobre el Efecto Alelopático del Ajenjo (Artemisia absinthium L)*. Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia (campus de Alcoy).
- MUSTAKEROVA, E.; TODOROVA, M. y TSANNKOVA, E. (2002): *Sesquiterpene Lactones from Achillea collina Becker*. Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry. Bulgarian Academi.

- NIN, S.; ARFAIOLI, P. y BOSSETTO, M. (1995): Quantitative determination of Some Essential Oil Components of Selected *Artemisia absinthium* Plants. *Journal of Essential Oil Research*, Vol.7, pp. 271-277.
- PASCUAL, R. (2006): *Aproximación a la caracterización de los quimiotipos a partir del análisis de aceites esenciales. Aplicación a Artemisia absinthium* L. Trabajo Fin de Carrera, Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Universidad Politécnica de Valencia.
- PINO, J. A., ROSADO, A. y FUENTES, V. (1997): Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 9, pp. 87-89.
- PRAS, N.; VISSER, J. F.; BATTERMAN, S.; WOERDENBAG, H. J. y MALINDRE, T. M. (1991): Laboratory Selection of *Artemisia annua* L. for High Artemisinin Yielding Types. *Phytochemical Analysis*, Vol. 2, pp. 80-83.
- QURESHI, S.; AGEEL, A.M.; AL-YAHYA, M.A.; TARIQ, M.; MOSSA, J.S. y SHAH, A.H. (1990): Preliminary Toxicity Studies on Ethanol Extracts of the Aerial Parts of *Artemisia abyssinica* and *Artemisia inculta* in Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 28, pp. 157-162.
- RODRÍGUEZ, E.; TOWERS, G. H. M. y MITCHELL, J. C. (1976): Biological activities of Sesquiterpenes Lactones. *Phytochemistry*, Vol. 15, pp. 1573-158.
- SEAMAN, F. C. (1982): Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *The botanical Review*, Vol. 48 (2), pp. 123-595.
- TAN, R. X.; ZHENG, W. F. y TANG, H. Q. (1998): Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*. *Planta Medica*, Vol. 64, pp. 295-302.
- TODOROVA, M. N.; TSANKOVA, E. T.; TRENDAFILOVA, A. B. y GUSSEV, C.V. (1996): Sesquiterpenes Lactones with the Uncommon Rotundane Skeleton from *Artemisia pontica* L. *Phytochemistry*, Vol. 41, pp. 553-556.
- TRENDAFILOVA, A.B.; TODOROVA, M.N. y GUSSEV, C. V. (1996): Eudesmanolides from *Artemisia pontica*. *Phytochemistry*, Vol. 42, pp. 469-471.
- VOKÁČ, K.; SAMEK, Z.; HEROUT, V. y SORM, F. (1969): The Structure of Artabsin and the Origin and Structure of the Coloured Hydrocarbon Chamazulenogen from Wormwood Oil. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, Vol. 34, pp. 2288-2293.
- VOLÁK, J.; STOLODA, J. y SEVERA, F. (1988): *El Gran Libro de las Plantas Medicinales*. Editorial Susaeta, S.A., Praga.
- WHITE, N. J. (1994): Artemisinin: Current Status. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 88, pp. 3-4.
- ZHUKOV, G. A. y TIMOFEEV, V. V. (1987): A Study of The Chemical Composition of a Wormwood Infusion. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. 23(3), pp. 371-372.

