



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE
BIFLAVONOIDES ADICIONALES CONTENIDOS EN LA
PLANTA MEDICINAL *Selaginella lepidophylla* Spring
(Selaginellaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
CÉSAR MENCHACA MÁRQUEZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	<i>Prof. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i>
Vocal	<i>Prof. RACHEL MATA ESSAYAG</i>
Secretario	<i>Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i>
Primer Suplente	<i>Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ</i>
Segundo Suplente	<i>Prof. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR</i>

Sitio de realización de la tesis:

LABORATORIO 125, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E",
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM, CU.

ASESOR:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

CÉSAR MENCHACA MÁRQUEZ

A mis padres:

Por ser los seres más maravillosos de mi vida, por haberme dado todo su cariño y amor en todo momento y que han sacrificado gran parte de su vida para hacer de mi una persona de provecho. A ustedes les dedico este trabajo, gracias por todo su apoyo incondicional para que pudiera lograr mis metas, los amo con todo mi corazón.

A mi hermana:

Por ser una persona fundamental en mi vida y por ser mi linda y única hermana. Gracias por todo lo que hemos vivido juntos, peleas, tristezas, alegrías, etc. Solo puedo decirte que tú siempre serás mi hermanita.

A Marisol:

Por ser la mejor mujer que he conocido, por ser una parte muy importante en mi vida; gracias por todas las cosas maravillosas que hemos vivido juntos y por todo el amor que me has brindado. Mi mayor deseo es que todos nuestros sueños se conviertan en realidad. Te amo.

A mis abuelos:

A la memoria de mis abuelos Andrea, Celia, César y Cruz, que hubieran querido ver este momento de realización personal, siempre los recordaré con mucho cariño.

A mis amigos:

A mis amigos de la facultad de química Rafael, Marely, Ignacio, Diana, Ricardo, Brenda, Karina, Saúl, José Luis, Román, Mitzy, y a mis amigos de la prepa 5 y de toda la vida Diego, Rodolfo y Víctor, por ser parte importante de este logro, por haber compartido con ustedes alegrías y decepciones. Gracias por ofrecerme su amistad y brindarme su apoyo cuando más lo he necesitado.

A mi Familia:

A la familia Márquez por ser una familia excepcional y sobre todo muy unida, a mis primos: Cynthia, Christian, Jonathan, Oswaldo, Paola, Arturo, Ricardo, Ismael, Yola, Lizette, Chuchito, Geovany, Jenny, Mishell, Miguel, Jessica y Priscilla; a mis tíos: Armando, Yolanda, Marta, Jesús, Cruz, Elvia, José y Arturo

y a mis sobrinas los quiero mucho a todos. A Toda la familia Menchaca porque siempre me han dado todo su apoyo y cariño.

A mis compañeros del laboratorio 125:

Por ser primeramente grandes amigos antes que compañeros de trabajo: Agustín, Itzel, JC, Nancy, Iris e Iraís y que gracias a la calidad de seres humanos que son, se logró conjuntar un excelente ambiente de trabajo facilitando cualquier actividad realizada en este laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la cual le estoy muy agradecido porque me dio la oportunidad de pertenecer a “la máxima casa de estudios”, y me permitió forjarme como profesionista, y como ser humano para de esta manera lograr una de mis metas en la vida.

A la DGAPA (Dirección general de asuntos del Personal Académico) por el apoyo económico otorgado durante la realización de la tesis.

Al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), a la M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, Q.F.B. Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta y M. en C. Yolanda González Quezada por los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

A la Dra. María Isabel Chávez Uribe por la asesoría y apoyo en la parte de elucidación estructural de los compuestos aislados.

A la Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents por darme la oportunidad de trabajar a su cargo en la realización de mi tesis de licenciatura, por su paciencia, su gran carisma, además de sus excelentes consejos y preocuparse siempre por el bienestar de sus alumnos; pero sobre todo por ser una persona magnífica.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	x
Lista de Cromatogramas.....	xiv
Lista de Diagramas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tablas.....	xx
Lista de Espectros.....	xxi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Familia <i>Selaginellaceae</i>	3
2.1.1 Generalidades.....	3
2.1.2 Metabolitos secundarios del género <i>Selaginella</i>	4
2.2 <i>Selaginella lepidophylla</i>	12
2.2.1 Sinonimia.....	13
2.2.2 Nombres comunes.....	13
2.2.3 Clasificación taxonómica de <i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook & Grev.) Spring (<i>Selaginellaceae</i>).....	14
2.2.4 Características botánicas.....	14
2.2.5 Hábitat.....	15
2.2.6 Distribución.....	15
2.2.7 Usos.....	15
2.3 Flavonoides.....	16
2.3.1 Generalidades.....	16
2.3.2 Definición.....	16
2.3.3 Características químicas.....	17
2.3.4 Biosíntesis de flavonoides.....	19
2.3.5 Extracción.....	21
2.3.6 Aislamiento y purificación.....	21



2.3.6.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	22
2.3.6.2 Cromatografía en Columna (CC).....	22
a) Separación por columna en gel de sílice...	22
b) Separación por columna de Poliamida.....	23
c) Separación por columna de polidextransos.	23
2.3.6.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).....	23
2.3.7 Biflavonoides.....	24
2.3.7.1 Generalidades.....	24
2.3.7.2 Tipos de biflavonoides.....	26
2.3.7.3 Distribución en plantas.....	27
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	28
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
5.1 Material vegetal.....	31
5.2 Disolventes y reactivos.....	31
5.3 Equipo.....	31
5.4 Instrumental de laboratorio.....	32
5.5 Metodologías.....	33
5.5.1 Purificación de las fracciones 6d4c y F12.....	33
5.5.2 Obtención de los extractos preliminares.....	35
5.5.3 Extracción, aislamiento y purificación de robustaflavona (1), amentoflavona (2), y 2,3-dihidrorobustaflavona (3).....	35
5.5.3.1 Extracción.....	35
5.5.3.2 Fraccionamiento del extracto acetónico.....	36
5.5.3.3 Aislamiento y purificación.....	38
a) Condiciones de tipo analítico.....	38



b) Condiciones de tipo preparativo.....	39
5.5.4 Identificación preliminar de robustaflavona (1), amentoflavona (2), 2, 3-dihidro-robustaflavona (3) y 2, 3 dihidro-5-metoxi- robustaflavona (4).....	39
5.5.5 Elucidación estructural de robustaflavona (1) y amentoflavona (2).....	39
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41
6.1 Determinación de los tiempos de retención de 6d3 (2) y 5e (3).	41
6.2 Extractos preliminares.....	42
6.3 Identificación de los compuestos 6d3 (2) y 5e (3) por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).....	46
6.4 Identificación preliminar por CCF de los compuestos 1 (R4- Pam), 2 (6d3) y 3 (5e) aislados a partir del extracto acetónico.....	51
6.5 Determinación del tiempo de retención del compuesto obtenido de la fracción R4 (1).....	53
6.6 Identificación estructural de 1 (R4-Pam) y 2 (6d3).....	55
6.7 Elucidación estructural de robustaflavona (1) y corrección a la estructura propuesta previamente para 2 (6d3).....	62
6.8 Aislamiento del compuesto f_0 , a partir de la fracción F12.....	77
6.9 Determinación del tiempo de retención del compuesto 4 (f_0) por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).....	78
6.10 Identificación de biflavonoides en el extracto acetónico de <i>Selaginella lepidophylla</i> , mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).....	79
7. CONCLUSIONES.....	81
8. BIBLIOGRAFÍA.....	82

**ANEXOS**

1. Purificación de la Fracción 6d4c.....	92
2. Purificación de la Fracción R1+ R2 soluble en Metanol.....	94
3. Purificación de la Fracción F12.....	96
4. Espectros.....	98

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
CD ₃ COCD ₃	Acetona deuterada
AcCN	Acetonitrilo
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
H ₂ O	Agua
ABC	Área bajo la curva
FAB ⁺	Bombardeo rápido de átomos modalidad positiva
KBr	Bromuro de potasio
CHCl ₃	Cloroformo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CP	Cromatografía en papel
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CL	Cromatógrafo de líquidos
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)
COSY	Espectroscopia de Correlación



δ	Desplazamiento químico
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
dd	Doble de dobles
d	Doblete
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de carbono-hidrogeno
NOESY	Espectroscopía bidimensional incrementada por el efecto nuclear Overhauser
HETCOR	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear de múltiples ligaduras
R_f	Factor de retención
ν	Frecuencia
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz
OH	Hidroxilo
=	Igual a
IR	Infrarrojo
M^+	Ion molecular



λ	Longitud de onda
>	Mayor que
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
nm	Nanómetros
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato
ppm	Partes por millón
%	Por ciento (Porcentaje)
p.f.	Punto de fusión
P	Purificación
R.A.	Reactivo analítico
m/z	Relación masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear



RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
r.p.m.	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
s	Singulete
T	Temperatura
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
HSV-1	Virus de Herpes tipo 1
HSV-2	Virus de Herpes tipo 2
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

**LISTA DE CROMATOGRAMAS**

Cromatograma 1	Compuesto 2 (6d3).....	41
Cromatograma 2	Compuesto 3 (5e).....	42
Cromatograma 3	Extracto metanólico extraído primeramente con hexano.....	43
Cromatograma 4	Extracto de acetato de etilo.....	43
Cromatograma 5	Extracto acetónico (a).....	44
Cromatograma 6	Extracto Metanólico.....	45
Cromatograma 7	Fracción R1.....	46
Cromatograma 8	Fracción R2.....	47
Cromatograma 9	Fracción R3.....	49
Cromatograma 10	Fracción R4.....	50
Cromatograma 11	Fracción R5.....	51
Cromatograma 12	Extracto acetónico (b).....	53
Cromatograma 13	Compuesto 1 (R4-Pam).....	54
Cromatograma 14	Co-elución del extracto acetónico (b) + Compuesto 1 (R4-Pam).....	54
Cromatograma 15	Fracción F ₀	79
Cromatograma 16	Identificación por CLAE de los metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto acetónico de <i>S. lepidophylla</i>	80



LISTA DE DIAGRAMAS

- Diagrama 1** Flujo experimental para la obtención del compuesto **4** a partir de la fracción F12 y de los compuestos **2** (6d3) y **3** (5e) a partir de la fracción 6d4c..... 34
- Diagrama 2** Flujo experimental para la obtención de los compuestos **1** (R4-Pam), **2** (6d3) y **3** (5e) a partir del extracto acetónico de *S. lepidophylla*..... 40



LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Selaginella lepidophylla</i> Spring (Selaginellaceae).....	13
Figura 2	Estructura básica de un flavonoide.....	17
Figura 3	Tipos de flavonoides.....	18
Figura 4	Ruta biosintética de flavonoides.	20
Figura 5	Estructura básica de biflavonoides.....	24
Figura 6	Biosíntesis de biflavonoides.....	25
Figura 7	Tipos de biflavonoides de acuerdo a la unión con su monómero....	26
Figura 8	Columna de extracción de <i>S. lepidophylla</i>	36
Figura 9	Columna de Sephadex LH-20 para el fraccionamiento del extracto acetónico.....	37
Figura 10	Fraccionamiento en grueso a partir del extracto acetónico mediante cromatografía en columna de Sephadex LH-20.....	37
Figura 11	Cromatoplaça de las fracciones reunidas de R1 y R2.....	48
Figura 12	Cromatoplaça de los biflavonoides aislados y purificados.....	52
Figura 13	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	60
Figura 14	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	60
Figura 15	Estructura tipo de la serie de robustaflavona.....	61
Figura 16	Estructura tipo de la serie de amentoflavona.....	61



Figura 17	Espectro COSY del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX).....	63
Figura 18	Espectro COSY del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX).....	63
Figura 19	Espectro NOESY del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX).....	64
Figura 20	Espectro NOESY del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX).....	65
Figura 21	Correlaciones parciales en el espectro NOESY de 1 y 2 , correspondientes al sistema H-ABX.....	65
Figura 22	Espectro HMBC del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes al enlace inter-flavonoide).....	66
Figura 23	Espectro HMBC del compuesto 1 . Correlación OH-5'/C-6'' y OH-5/C-6.....	67
Figura 24	Espectro HMBC del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al enlace inter-flavonoide).....	67
Figura 25	Espectro HMBC del compuesto 2 . Correlación OH-5/C-4a y OH-5/C-5.....	68
Figura 26	Correlaciones parciales en el espectro HMBC de 1 , correspondientes al enlace inter-flavonoide.....	68
Figura 27	Correlaciones parciales en el espectro HMBC de 2 , correspondientes al enlace inter-flavonoide.....	68
Figura 28	Espectro HMBC del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes	



	al sistema acoplado de hidrógenos en posición <i>meta</i>).....	70
Figura 29	Espectro HMBC del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema de hidrógenos acoplados en posición <i>meta</i>).....	70
Figura 30	Correlaciones parciales en el espectro HMBC de 1 y 2 , correspondientes al sistema de hidrógenos acoplados en posición <i>meta</i>	71
Figura 31	Espectro NOESY del compuesto 1 (Correlaciones del sistema A_2X_2)	71
Figura 32	Espectro NOESY del compuesto 2 (Correlaciones del sistema A_2X_2)	72
Figura 33	Correlaciones parciales en el espectro NOESY del compuesto 1 y 2 correspondientes al sistema A_2X_2	72
Figura 34	Espectro NOESY del compuesto 2 . Correlación H-2''',6'''/H-2' (H_X)...	74
Figura 35	Estructura del compuesto 1 en su estado de mínima energía (a) ; Estructura tridimensional del compuesto 1 en su estado de mínima energía (b)	75
Figura 36	Estructura del compuesto 2 en su estado de mínima energía (a) ; Estructura tridimensional del compuesto 2 en su estado de mínima energía (b)	75
Figura 37	Estructura del compuesto 1 identificado como Robustaflavona (a) ; correlaciones más importantes observadas en los espectros de RMN de HMBC (\rightarrow) y NOESY (\rightarrow) para el compuesto 1 (b)	76
Figura 38	Estructura del compuesto 2 , identificado como Amentoflavona (a) . Correlaciones más importantes observadas en los espectros de RMN de HMBC (\rightarrow) y NOESY (\rightarrow) para el compuesto 2 (b)	77



Figura 39	Estructura química del compuesto 4 (f_0), identificado como 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	78
------------------	---	----



LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Metabolitos secundarios de algunas especies de <i>Selaginella</i> y sus actividades biológicas.....	5
Tabla 2	Estructura química de algunos metabolitos secundarios producidos por algunas especies del género <i>Selaginella</i>	9
Tabla 3	Clasificación taxonómica de <i>Selaginella. lepidophylla</i> (Hook. & Grev.) Spring (Selaginellaceae).....	14
Tabla 4	Disolventes utilizados para realizar los extractos preliminares.....	35
Tabla 5	Condiciones de tipo analítico para el análisis de los metabolitos secundarios mediante elución por gradiente de la fase móvil.....	38
Tabla 6	Condiciones para la purificación de los metabolitos secundarios mediante elución por gradiente de la fase móvil.....	39
Tabla 7	Factores de retención de los 3 compuestos aislados y purificados	52
Tabla 8	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 1 (R4-Pam).....	55
Tabla 9	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 2 (6d3).....	56
Tabla 10	Tabla comparativa de los desplazamientos químicos (δ) relativos a TMS en RMN ^1H del compuesto 1 (DMSO- d_6) y 2 (CD_3COCD_3).....	58
Tabla 11	Tabla comparativa de los desplazamientos químicos (δ) relativa a TMS de RMN ^{13}C del compuesto 1 (DMSO- d_6) y 2 (CD_3COCD_3), basadas en los espectros HSQC, COSY, NOESY y HMBC.....	59



LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro de IR de robustaflavona.....	99
Espectro 2	Espectro de RMN ^1H de robustaflavona (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).....	100
Espectro 3	RMN ^{13}C de robustaflavona (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).....	101
Espectro 4	Espectro de RMN ^1H modalidad HMBC de robustaflavona.....	102
Espectro 5	Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de robustaflavona.....	103
Espectro 6	Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de robustaflavona.....	104
Espectro 7	Espectro de RMN ^1H modalidad NOESY de robustaflavona.....	105
Espectro 8	Espectro de masas modalidad FAB^+ de robustaflavona.....	106
Espectro 9	Espectro de IR de amentoflavona.....	107
Espectro 10	Espectro de RMN ^1H de amentoflavona (500 MHz, CD_3COCD_3).....	108
Espectro 11	Espectro de RMN ^{13}C de amentoflavona (125 MHz, CD_3COCD_3).....	109
Espectro 12	Espectro de RMN ^1H modalidad HMBC de amentoflavona.....	110
Espectro 13	Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de amentoflavona.....	111
Espectro 14	Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de amentoflavona.....	112
Espectro 15	RMN ^1H modalidad NOESY de amentoflavona.....	113
Espectro 16	Espectro de masas modalidad FAB^+ de amentoflavona.....	114



1. INTRODUCCION

A través de los siglos, las plantas medicinales han sido usadas para el tratamiento y prevención de diversos padecimientos humanos. Actualmente la medicina tradicional está teniendo un gran auge debido principalmente a que las plantas medicinales son aplicadas con éxito en la vida diaria, en diferentes formas como infusión, tintura, extracto, entre otras o en medicina alopática, con base en determinadas sustancias contenidas en ellas. Los compuestos bioactivos obtenidos de estas, son conocidos como metabolitos secundarios y representan una enorme variedad de estructuras químicas con un amplio espectro de actividades farmacológicas. Sorpresivamente solo un pequeño porcentaje (<10 %) de todas las especies vegetales han sido hasta ahora químicamente caracterizadas. Más aún, las plantas ofrecen un enorme potencial para descubrir nuevos compuestos para aplicaciones terapéuticas, y estas han sido reconocidas en términos prácticos por un gran número de compañías farmacéuticas (Kirsi-Marja, *et al.*, 2008).

Uno de los aspectos más importantes en el área de productos naturales, es comprender la relación entre el conocimiento empírico adquirido a través del tiempo por diferentes grupos étnicos, en la utilización de diferentes especies de plantas para el tratamiento de enfermedades y su química. Este conocimiento sobre las virtudes curativas de las plantas, es en la actualidad un pilar fundamental en la búsqueda de nuevos compuestos activos, capaces de proporcionar a la humanidad herramientas que puedan ser utilizadas en la práctica médica (Balderas, 2006).

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico principal para muchos mexicanos. México es uno de los países del mundo más ricos, complejos e interesantes en especies vegetales. La principal razón de la riqueza florística de México reside en su amplia variedad de climas debida principalmente a la ubicación geográfica, aunado a las condiciones fisiográficas.



La flora medicinal del país es extensa y en las prácticas médicas populares se utilizan como remedio una amplia gama de variedades y especies botánicas. De esta manera, en la investigación de productos naturales, los especialistas se orientaron por años a temas de estudio de aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de las plantas. Ahora, buscan en las plantas medicinales sustancias con actividad biológica (Gabriel, 2000).

Por otra parte, si bien los avances en la tecnología han sido un factor necesario en el resurgimiento de interés en los productos naturales, no son suficientes en sí mismos para lograr ese objetivo, los avances en la química y la instrumentación que se han producido simultáneamente tienen la misma importancia. El advenimiento y el subsecuente desarrollo de técnicas como la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), la Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), la Resonancia Magnética Nuclear (NMR), la Cristalografía de rayos X, entre otras, han permitido a los investigadores aislar cantidades muy pequeñas de nuevos compuestos y ser capaces con gran confianza de caracterizarlos completamente e identificar sus estructuras (Borris, 1996).



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia *Selaginellaceae*

2.1.1 Generalidades

Selaginellaceae es una familia cosmopolita de plantas con especies capaces de crecer bajo un amplio rango de climas, suelo, y regímenes de luz (Korall, *et al.*, 2002). Esta familia consta de un solo género: *Selaginella*, siendo este el único dentro del orden de las Selaginelales que junto con las plantas *Lycopodiales*, *lipodendrales* y las *Isoetales* conforman la clase *Lycopodiopsida* (Nason, 1980). Korall y colaboradores describieron que el género cuenta con aproximadamente 700 especies y éste, está ampliamente distribuido en regiones subtropicales, templadas, montañosas y raramente en regiones subárticas (Korall, *et al.*, 1999), por lo cual, el género contiene especies que pueden ser tolerantes a la congelación como especies ártico-alpinas, especies terrestres de selva, y xerofitas fisiológicamente adaptadas a la sequía similar a la de matorrales y brezales del desierto (Korall, *et al.*, 2002). Además, algunas de estas especies son capaces de sobrevivir largos periodos de sequía y varias estrategias que poseen para tolerar dicha sequía (xerofitismo) las han ido evolucionando. Otras, como las “plantas de resurrección”, enrollan sus hojas y tallos para prevenir la pérdida excesiva de agua y para revertir este proceso de rehidratación (Korall, *et al.*, 1999).

Mickel describió las características botánicas del género *Selaginella*, sobre el cual menciona que son plantas vasculares terrestres o epipétricas, raramente epífiticas, postradas y rastreras a algunas ascendentes o por completo erectas, de poco a muy ramificadas. El sistema vascular de los tallos se constituye por una o varias ramificaciones con bifurcaciones desiguales y sin crecimiento en el espesor. Tiene tallos con hojas pequeñas muy abundantes, isófilas y fuertemente imbricadas, arregladas en espiral en muchas filas, o más comúnmente anisófilas en cuatro filas, dos laterales o ventrales con mayor esparcimiento y dos medianas o dorsales adpresas y ascendentes en el lado superior del tallo, y hojas axilares en las axilas de las ramas; rizóforos (raíces) ya sea basales o a partir de los nudos (ramificaciones), ramificados



dicotómicamente al tocar el suelo; hojas orbiculares a lineales con una sola vena y una lígula diminuta el cual es órgano que se encarga de captar el agua y facilita la rápida absorción de las gotas de lluvia; hojas frecuentemente terminadas en una punta a modo de pelo o cabello (seta), completas a ciliadas-denticuladas, glabras o raramente hispídas en la superficie superior de la hoja; esporangios sésiles, generalmente en estróbilos de cuatro caras en posición terminal en las ramas, las esporófilas en cuatro filas y débilmente modificadas con respecto de las hojas vegetativas, usualmente monomórficas, raramente dimórficas; heterospóricas, es decir, que son capaces de producir dos tipos de esporas: microsporas y megasporas en esporangios separados pero dentro del mismo estróbilo; microesporangios con cientos de microsporas (de 10 a 31 o 63 μm de diámetro) los cuales dan lugar a los gametofitos masculinos y megasporangios con cuatro grandes megasporas (150-1500 μm de diámetro), que dan lugar a los gametofitos femeninos, esporas tetraédricas-globosas (Mickel, *et al.*, 1988).

Se han reconocido dos grupos principales, uno que contiene a las especies isófilas, que están principalmente en regiones secas de México y el oeste de Estados Unidos y el otro que abarca a las especies anisófilas, que representan por mucho la porción más grande del género y son nativas de bosques tropicales.

Algunas de estas especies se cultivan en invernaderos como plantas ornamentales, pero la principal utilidad está en la medicina tradicional, en la cual se ha reportado su uso en varios países para el tratamiento de diversas enfermedades como cáncer, problemas cardiovasculares, diabetes, gastritis, hepatitis, enfermedades de la piel, infecciones del tracto urinario. Así mismo, como lo describe Silva y colaboradores, los extractos de algunas especies de *Selaginella* han mostrado actividad en algunos estudios como antiinflamatorio, anti-mutagénico, antiespasmódico, citotóxico y como inmunoestimulante e inhibidor de la transcriptasa reversa de ARN (Silva, *et al.*, 1995).

2.1.2 Metabolitos secundarios del género *Selaginella*

Las especies del género *Selaginella* contienen un gran número de compuestos biológicamente activos, los más importantes son los biflavonoides. Los biflavonoides son compuestos de origen natural que se encuentran presentes en todas las plantas vasculares los cuales tienen muchos efectos farmacológicos y biológicos favorables.



Algunos otros compuestos como alcaloides, glicósidos, fenilpropanonas y lignanos también se reportan en algunas especies (Birghigna, 2002).

A continuación se presentan algunos metabolitos secundarios producidos por el género *Selaginella* y sus actividades biológicas, si es que esta se encuentra reportada:

Tabla1. Metabolitos secundarios de algunas especies de *Selaginella* y sus actividades biológicas.

Lugar de Origen	Especie	Metabolitos secundarios	Actividad Biológica	Referencias
China	<i>Selaginella doederleinii</i>	Ácido siquímico, fenil alquil aminas, alcaloides glicosídicos de tipo hordenina (hordenina-O- α -L-ramnopiranosido, N-metiltiramina-O- α -ramnopiranosido y hordenina-O-[(6''-O-trans-cinamoil)-4'-O- β -D-glucopiranosil- α -L-ramnopiranosido, lignanos: (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B, (+)-wikstromol, (-)-nortraquelósido, (+)-matairesinol A, amentoflavona, heveaflavona y derivados metoxilados de amentoflavona.	Enfermedades cardiovasculares, bactericida, fuerte actividad citotóxica. Antimutagénico, antitumoral en ratones	Lin, et al., 1987, ibid 1994.
China	<i>Selaginella moellendorffii</i>	moellenósido A;(7R,8S)-7,8-dihidro-7-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1'-formil-3'-metoxi-8-hidroximetilbenzofuran-4-O- β -D-glucopiranosido	No reportada	Zheng, et al., 2008.
		Ginkgetina, 7,4',7'',4'''-tetrametoxi-amentoflavona, kayaflavona, podocarpusflavona A y amentoflavona.	Citotóxica en adenocarcinoma de ovario humano (OVCAR-3)	Sun, et al., 1997.
China	<i>Selaginella pulvinata</i>	Ácido 3 β ,16 α -dihidroxi-(5 α)-coleston-21-oico	No reportada	Zheng, et al., 2007.
		β - sitosterol, amentoflavona, pulvinatadiona; 2,4-etil-coleston-4-en-3,6-diona y pulvinatabiflavona; 5, 5'',4'''-trihidroxi-7,7''-dimetoxi- [4'-O-6'']-biflavona.	No reportada	Tan, et al., 2004.



China	<i>Selaginella sinensis</i>	β - sitosterol, acido vainílico, (7S, 8R)-4, 9, 9'-trihidroxi-3, 3'-dimetoxi-7, 8-dihidrobenzofuran-1'-propilneolignano, siringaresinol, (-)-pinoresinol, pinoresinol-4-O- β -D-glucopiranosido, siringaresinol-4,4'-O-di- β -D-glucopiranosido, β -metil-D-xilopiranosido, β -metil-D-arabinopiranosido, hinoquiflavona y amentoflavona.	No reportada	Feng, <i>et al.</i> , 2008.
		Sinesiol A (Isesquillignano)	No reportada	Wang, <i>et al.</i> , 2007.
		Amentoflavona	Antiviral (Virus sincitial respiratorio, Virus de Influenza A y B, HSV-1, HSV-2, VIH.	Ma, <i>et al.</i> , 2001.
		4', 7''-di-O-metilamentoflavona, 7''-O-metilrobustaflavona, robustaflavona.	No reportado	
		Selaginósido (1-octilenol-3-O-D-glucopiranosil-(1→6)- β -D-glucopiranosil-(1→4)- β -D-glucopiranosido), hinoquiflavona , 2,3-dihidroamentoflavona.	No reportado	Dai, <i>et al.</i> , 2005.
China	<i>Selaginella tamariscina</i>	Selaginelina A: (R,S)-4-[4'-hidroxi-3-((4-hidroxifenil)etnil)bifenil-2-il](4-hidroxifenil)metilen]-2,5-ciclohexadien-1-ona; Selaginelina B: (R,S)-4-[4'-metoxi-4-(metil)-3-((4-metoxifenil)etnil)bifenil-2-il](4-metoxifenil)metilen]-2,5-ciclohexadien-1-ona, amentoflavona, hinoquiflavona, heveaflavona y 7''-O-metilamentoflavona.	No reportado	Cheng, <i>et al.</i> , 2008.



		Ácido 3 β ,16 α -dihidroxi-5 α , 17 β -coleston- 21-carboxílico, ácido 3 β -acetoxi-16 α -hidroxi-5 α ,17 β - coleston-21-carboxílico y ácido 3 β -(3-hidroxi-5 α ,17 β -coleston-21-carboxílico).	Actividad antiproliferativa en células humanas con leucemia.	Gao, <i>et al.</i> , 2007.
		tamariscina ester A, siringaresinol, 1-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil) glicerol, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido vainílico, ácido siríngico y umbeliferona	No reportada	Bi, <i>et al.</i> , 2004.
		(7S,8R)-7,8-dihidro-7-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8-hidroximetil-[1'-(7'-hidroximetil) -5' metoxil] benzofuran-4-O- β -D-glucopiranosido (tamariscinósido C), D-manitol, tirosina y ácido siquímico.	No reportada	Zheng, <i>et al.</i> , 2004
		1-hidroxi-2-[2-hidroxi-3-metoxi-5-(1-hidroxietil)-fenil]-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi)-propan-1-O- β -D-glucopiranosido (tamariscinósido B), adenosina, guanosina, arbutina.	No reportada	Zheng, <i>et al.</i> , 2004.
China	<i>Selaginella uncinata</i>	5-hidroxi- 2,6,8,-trimetilcromon-7-O- β -D-glucopiranosido (uncinósido), 5-acetoxi-2,6,8,-trimetilcromon-7-O- β -D-glucopiranosido (uncinósido B), 5, 7-dihidroxi-2, 6, 8-trimetilcromona (8-metileugenitol).	No reportada	Ma, <i>et al.</i> , 2002.
España	<i>Selaginella denticulada</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona.	Epilepsia, narcótico, antihelmíntico, antiespasmódico	Lopez- Saez, <i>et al.</i> , 1995.
Estados Unidos y Panamá	<i>Selaginella wildenowii</i>	4',7''-di-O-metilamentoflavona, isocriptomerina, 7''-O-metilrobustaflavona, amentoflavona, bilobetina, robustaflavona, 2'',3''-dihidroisocriptomerina	Citotóxico	Silva G. <i>et al.</i> , 1995.

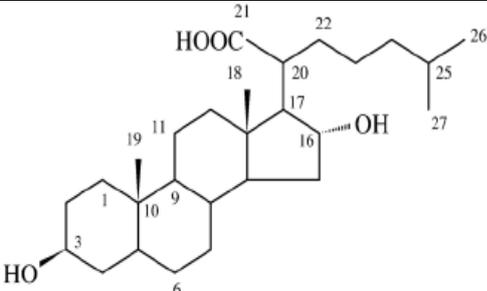
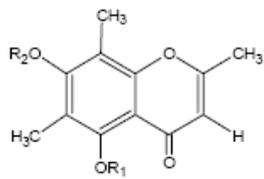


Korea	<i>Selaginella tamariscina</i>	Sumaflavona, amentoflavona.	Regulan la expresión de metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-2) en fibroblastos de piel humanos.	Lee, <i>et al.</i> , 2007.
		Amentoflavona	Antifúngico	Jung, <i>et al.</i> , 2006.
		2,8-biapigenina, taiwaniaflavona, robustaflavona.	No reportada	
India	<i>Selaginella chrysocaulos</i>	naringeninil-(4"-O-3)-kamferol, 8"-metilnaringeninil-(4"-O-3)-kamferol, 5",7"-dihidroxi-2"-fenoxi-cromonil-(3",4')-naringenina, 3', 3"-binaringenina,	Regeneración de energía y vitalidad	Swamy, <i>et al.</i> , 2006.
India	<i>Selaginella bryopteris</i>	Amentoflavona, (2S)-2,3-dihidroamentoflavona, (2"S)-2",3"-dihidroamentoflavona, (2S,2"S)-2,3,2",3"-tetrahidroamentoflavona, hinoquiflavona, (2S)-2,3-dihidrohinoquiflavona, (2"S)-2",3"-dihidrohinoquiflavona, (2S,2"S)-2,3,2",3"-tetrahidrohinoquiflavona, bilobetina, sequiaflavona, heveaflavona, neocriptomerina.	Regeneración de energía y vitalidad	Swamy, <i>et al.</i> , 2006.
		4',7"-tri-O-metilamentoflavona y 2,3-dihidrohinoquiflavona.	Antiprotozoaria contra <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Kunert, <i>et al.</i> , 2008.

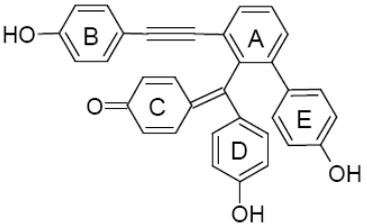
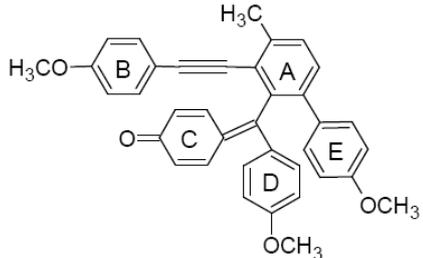
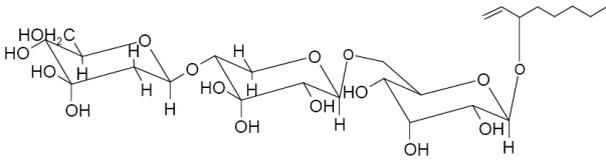
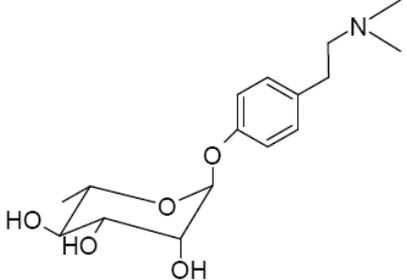
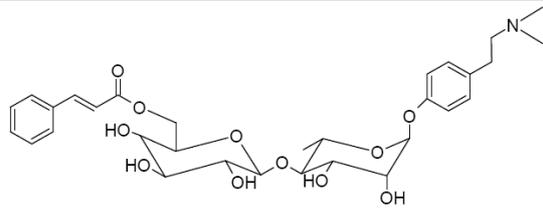
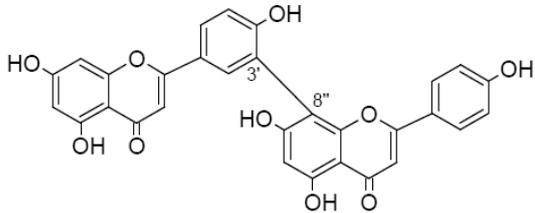
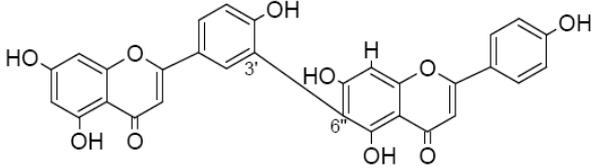
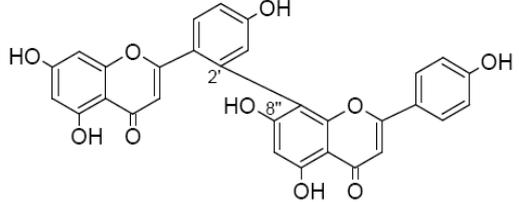


Islandia	<i>Selaginella selaginoides</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona.	Antiepiléptico y antiespasmódico	Lopez- Saez, <i>et al.</i> , 1995.
México	<i>Selaginella lepidophylla</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, hinoquiflavona trimetil éter, 5',5"-dihidroxi-7,7",4',4"-tetrametoxi-amentoflavona.	Enfermedades urinarias, diarrea, malestares hepáticos	Aguilar, <i>et al.</i> , 2008; Quasim, <i>et al.</i> , 1985.
Taiwan	<i>Selaginella delicatula</i>	Robustaflavona 4'-metil éter, robustaflavone 7,4'-dimetil éter, éter 7,4'-dimetílico de 2'',3''-dihidrorobustaflavona, éter 7,4',7''-trimetílico de 2'',3''-dihidrorobustaflavona, robustaflavona, amentoflavona, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico.	Citotóxica	Lin, <i>et al.</i> , 2000.

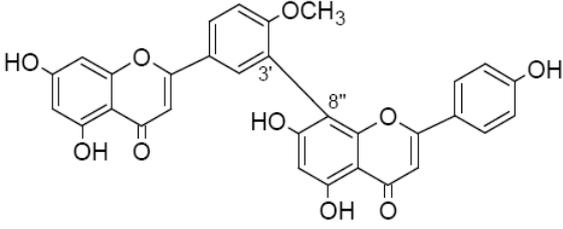
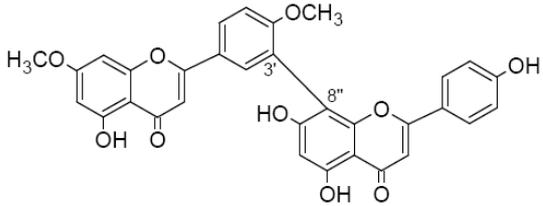
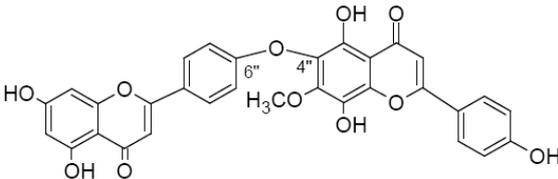
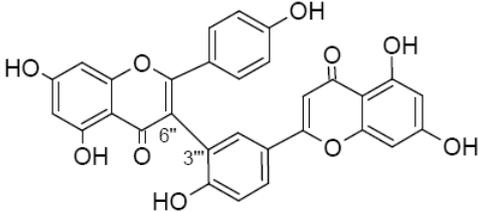
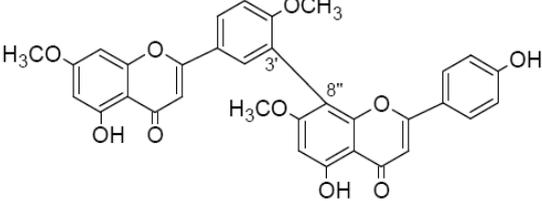
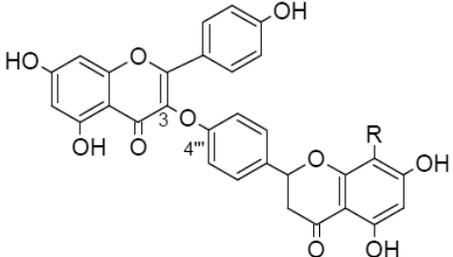
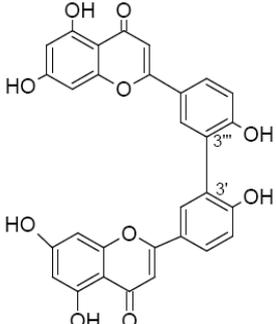
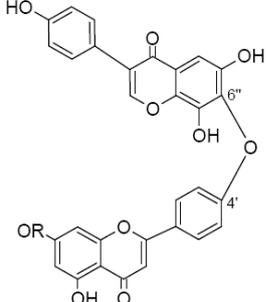
Tabla 2. Estructura química de algunos metabolitos secundarios producidos por algunas especies del género *Selaginella*.

 <p>Ácido 3β,16α-dihidroxi-(5α)-colestan-21-oico</p>	 <p>1 R₁=H R₃=Glc 2 R₁=Ac R₂=Glc 3 R₁=H R₂=H</p> <p>5-hidroxi-2,6,8,-trimetilcromon-7-O-β-D-glucopiranósido (uncinósido (1)), 5-acetoxi-2,6,8,-trimetilcromon-7-O-β-D-glucopiranósido (uncinósido B) (2), 5, 7-dihidroxi-2,6,8-trimetilcromona (8-metileugenitol) (3)</p>
---	--



 <p>Selaginelina A (<i>R,S</i>)-4-[4'-hidroxi-3-((4-hidroxifenil)etnil)bifenil-2-il](4-hidroxifenil)metilen]-2,5-ciclohexadien-1-ona</p>	 <p>Selaginelina B (<i>R,S</i>)-4-[4'-metoxi-4-(metil)-3-((4-metoxifenil)etnil)bifenil-2-il](4-metoxifenil)metilen]-2,5-ciclohexadien-1-ona</p>
 <p>Selaginósido (1-octilenol-3-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow4)-β-D-glucopiranosido)</p>	 <p>hordenina-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosido</p>
 <p>Hordenina-<i>O</i>-[6''-(<i>O</i>-<i>trans</i>-cinamoil)-4'-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-α-L-ramnopyranósido]</p>	 <p>Amentoflavona</p>
 <p>Robustaflavona</p>	 <p>2,8''-biapigenina</p>



 <p style="text-align: center;">Bilobetina</p>	 <p style="text-align: center;">Ginkgetina</p>
 <p style="text-align: center;">Isocriptomerina</p>	 <p style="text-align: center;">Taiwaniaflavona</p>
 <p style="text-align: center;">Heveaflavona</p>	 <p style="text-align: center;">1. R = H 2. R = Me</p> <p style="text-align: center;">naringeninil-(4'''-O-3)-kamferol (1), 8''-metilnaringeninil-(4'''-O-3)-kamferol (2).</p>
 <p style="text-align: center;">3',3''-binaringenina</p>	 <p style="text-align: center;">1. R = H 2. R = Me</p> <p style="text-align: center;">Hinoquiflavona (1), Neocriptomerina (2)</p>



2.2 *Selaginella lepidophylla*

Selaginella lepidophylla (Hook. & Grev.) Spring (Selaginellaceae) es una especie de xerófilos la cual es conocida por su capacidad para sobrevivir luego de desecarse, enrollándose durante largos períodos de sequía (Lin, *et al.*, 2000).

Esta planta presenta propiedades poiquilohídricas, es decir, que se encuentra en equilibrio con la humedad atmosférica. Es reconocida por su habilidad para secarse completamente y sobrevivir durante largos periodos en estado deshidratado (**Figura 1**). En los periodos de sequía, los tallos se enrollan para formar una roseta de alrededor de 10 cm. de diámetro, con apariencia dorada (de ahí el nombre de doradilla), y cuando nuevamente tiene contacto con la humedad, las ramas reverdecen y se vuelven a extender. Por esta razón, puede permanecer varios años en estado latente por desecación extrema y al disponer de agua, además de recobrar su apariencia herbácea, también reanuda sus funciones normales (Sánchez, 1958). Aunque no se tienen definidos todos los pasos involucrados en el mecanismo que permite a las plantas de resurrección reactivar exitosamente todos sus procesos bioquímicos y fisiológicos al entrar en contacto con el agua, se postula que las plantas como *Selaginella lepidophylla* pueden sobrevivir ciclos de hidratación-deshidratación-hidratación debido a que acumulan trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1-1)- α -D-glucopiranosido), como lo reporta Ciria y colaboradores (2004), el cual es un disacárido no común en el reino plantae que protege a las membranas celulares a través de la interacción de los grupos hidroxilo de las proteínas y de las cabezas polares de los lípidos que forman las membranas, de acuerdo con la teoría de reemplazamiento de agua por trehalosa (Ciria, *et al.*, 2004). Durante sequía extrema la trehalosa puede tener un efecto protector en membranas y enzimas de su desnaturalización (Velázquez-Ortíz, *et al.*, 2004).



Figura 1. *Selaginella lepidophylla* (Hook. y Grev.) Spring (Selaginellaceae). La planta de la izquierda se ha mantenido en condiciones de humedad y la de la derecha en ausencia de agua.

2.2.1 Sinonimia

Lycopodium lepidophyllum Hooker & Greville (<http://es.wikipedia.org/wiki/flavonoide>).

2.2.2 Nombres comunes

Argueta y Márquez describieron los nombres comunes de la planta los cuales son:

“Planta de la resurrección”, “Rosa de Jericó”, “Siempre viva”, “Flor de peña”, “Coralillo”, “Flor de Piedra”, “Doradilla”, “Flor del rock”. Y en las distintas lenguas: Magóra (tarahumara), yamanquitexóxhitl (náhuatl), tequequetzal, (Morelos), texochitl (Guerrero), much-k'ok (Michoacán y Yucatán), jodt'nborra y te'tesawaam (Sonora), ndoto kuu (Oaxaca) (Argueta, 1994; Márquez, *et al.* 1999).



2.2.3 Clasificación taxonómica de *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring (Selaginellaceae)

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring (Selaginellaceae). Base de datos: ITIS (Integrated taxonomic Information System); <http://www.itis.gov>.

	Adolf Engler	ITIS*
Reino	Plantae	Plantae
Subreino	Embryophyta asiphonogama	Tracheobionta
División	Pteridophyta	Lycopodiophyta
Clase	Lycopodiopsida	Lycopodiopsida
Orden	Selaginellales	Selaginellales
Familia	Selaginellaceae	Selaginellaceae
Género	<i>Selaginella</i>	<i>Selaginella</i> Beauv.
Especie	<i>Selaginella lepidophylla</i>	<i>Selaginella lepidophylla</i>

2.2.4 Características Botánicas

Tallos anisófilos, cespitosos, arrosetados, ramificados desde la base, cuando secos se enrollan hacia adentro, enraizados desde la base. Hojas coriáceas, pardo-claro a pardo-rojizo, no auriculadas, imbricadas; las hojas viejas pardo-oscuras. Hojas laterales de 1.2-2.0 mm de largo y 1.0-1.7 mm de ancho, ampliamente ovadas, ápice subagudo a obtuso, rojas en el envés; en el lado acroscópico, base redondeada; márgenes translúcidos, ciliados hacia la base, finamente serrulados en la porción distal. Hojas axilares de 1.1-1.9 mm de largo y 0.8-1.2 mm de ancho, ovado-oblongas, ápice agudo; base gradualmente redondeadas; márgenes finamente serrulados o ciliados. Hojas medias de 1.0-1.3 mm de largo y 0.7-1.0 mm de ancho, ovadas, base redondeada, ápice obtuso a subagudo; márgenes translúcidos, amplios, diminutamente serrulados. Esporofilas ampliamente ovadas, de 0.8-1.0 mm de largo y 0.5-0.6 mm de ancho; márgenes translúcidos; ápice agudo, ciliado. Estróbilo de 2-4 mm de largo, con megasporangios y microsporangios. Megasporas de 181-297 μm de largo y 170-290 μm de ancho, equinadas en la cara proximal, con espinas rectas; cara distal con espinas curvas, de 7-13 μm . Microsporas agrupadas en tétradas de 57-64 μm de largo y 55-66 μm de ancho, envueltas por una capa laxa, ondulada, con la superficie granular (<http://bio.uaq.mx/municipioQro/ptetidofitas/SelaginellaLepidophylla.html>).



2.2.5 Hábitat

Esta planta habita donde hay climas cálido, semicálido, seco, semiseco, y templado, desde los 600 y hasta 2800 metros sobre el nivel del mar. Habita en Matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio, pastizal, vegetación riparia; entre rocas y paredes, y sobre rocas ígneas (<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>).

2.2.6 Distribución

Es nativa del medio este, América del Norte y Central. Se encuentra en los países como Israel y Jordania en Asia y en Costa Rica, Nicaragua y El Salvador en América central. Además en los estados de Texas, Arizona y al sur de Nuevo México en los EUA.

En la República Mexicana se encuentra en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Distrito Federal, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas (Vázquez, *et al.*, 2005).

2.2.7 Usos

La infusión y la decocción se utilizan para el tratamiento de cálculos biliares, dolor de riñón y diuréticos. Sus usos principales son como antirenopático y diurético en caso de riñones inflamados, cistitis, cálculos renales, dolor de cintura, dolor de espalda, cuando hay obstrucción de orina e irritación de los riñones. Para aliviar trastornos digestivos como inflamación del estómago, úlcera, dispepsia, irritación del hígado, corajes, espanto, cálculos biliares. También se indica para tos, bronquitis, tosferina, para expulsar la placenta, reumas, corazón, purificación de la sangre, contra parasitosis y tiricia negra. La sociedad Farmacéutica mexicana indica el uso de la planta como deterativo, eupéptico, diurético, en padecimientos hepáticos y en caso de dolor de riñones (Argueta, 1994; Márquez, 1999; Martínez, 1989).



2.3 Flavonoides

2.3.1 Generalidades

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de los vegetales; los cuales fueron descubiertos por el científico Húngaro, el Dr. Albert Szent-Gyorgyi ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937 dándoles el nombre de “vitamina P” (por permeabilidad), ya que aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, que probó regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida. El Dr. Szent-Gyorgyi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación.

(<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>)

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal. Están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores, siendo las rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas las principales familias que los contienen.

Desde el punto de vista farmacológico se han descrito propiedades para estos compuestos tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadores, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Harborne, *et al.*, 2000).

Dentro de las funciones de los biflavonoides en las plantas encontramos la protección ante la luz UV-B (longitud de onda entre 280 y 315 nm incluyendo a las antocianinas, defensa contra insectos y animales herbívoros y protección en contra de la invasión microbiana, entre otras (Harborne, *et al.*, 1992).

2.3.2 Definición

Flavonoide, es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales (López, 2002). Estos son pigmentos hidrosolubles que se encuentran tanto en el citoplasma como en las vacuolas de las células vegetales, y que son los responsables de los colores intensos de las flores y frutas.



2.3.3 Características Químicas

Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona) con un fenilo en posición 2, así pues son 2-fenil- γ -cromonas (**Figura 2**). De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el B y la unidad C proceden de la ruta del ácido siquímico (López, 2002)

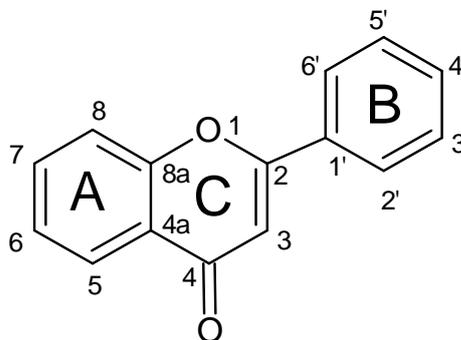


Figura 2. Estructura básica de un flavonoide. Los anillos son denominados A, B y C, los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Cartaya, *et. al.*, 2001).

Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático (polifenólicas). Poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B. Cuando el segundo anillo bencénico se halla en posición 1, se trata de neoflavonoides, si está en posición 3 se trata de isoflavonoides (Lopez, 2002)

Se pueden encontrar como agliconas libres o en forma de *O*-heterósidos o *C*-heterósidos, unidos generalmente a glucosa, aunque también pueden estar unidos a ramnosa y a veces a galactosa. La mayor parte de los flavonoides son *O*-heterósidos.

Los flavonoides se pueden dividir en varias clases de acuerdo a sus variaciones estructurales, por ejemplo antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, chalconas, auronas, flavanonas, flavanos y proantocianidinas, isoflavonoides, biflavonoides etc. (**Figura 3**). La diferencia entre los distintos grupos de



flavonoides se presenta en la estructura básica (tipo de compuesto, grado de hidroxilación, metilación y/o isopentilsustitución), el grado de polimerización (monómero, dímero y oligómero) y el tipo de conjugación (glucósidos, ésteres malónicos, ésteres sulfato) (Azcon, *et al.*, 1993). La mayoría de los flavonoides tienen hidroxiladas las posiciones 5, 7 y 4 variando únicamente en el nivel de oxidación de los anillos A y B. Los grupos hidroxilo sirven como puntos de unión para varios azúcares para incrementar la solubilidad de los flavonoides en agua. Más aún, numerosas fuentes de flavonoides en plantas contienen patrones de sustitución de grupos hidroxilo, metoxilo, metilo y/o glicosilo, y ocasionalmente, grupos aromáticos y ácidos alifáticos, sulfatos, prenilos, metilendioxilos e isoprenilos se presentan en el núcleo flavonoide y sus glicósidos. Cerca de 4000 tipos de flavonoides han sido reportados como compuestos de origen natural. En muchos de los casos los flavonoides están presentes como glicósidos en vacuolas de flores, hojas, semillas o raíces (Iwashina, 2000).

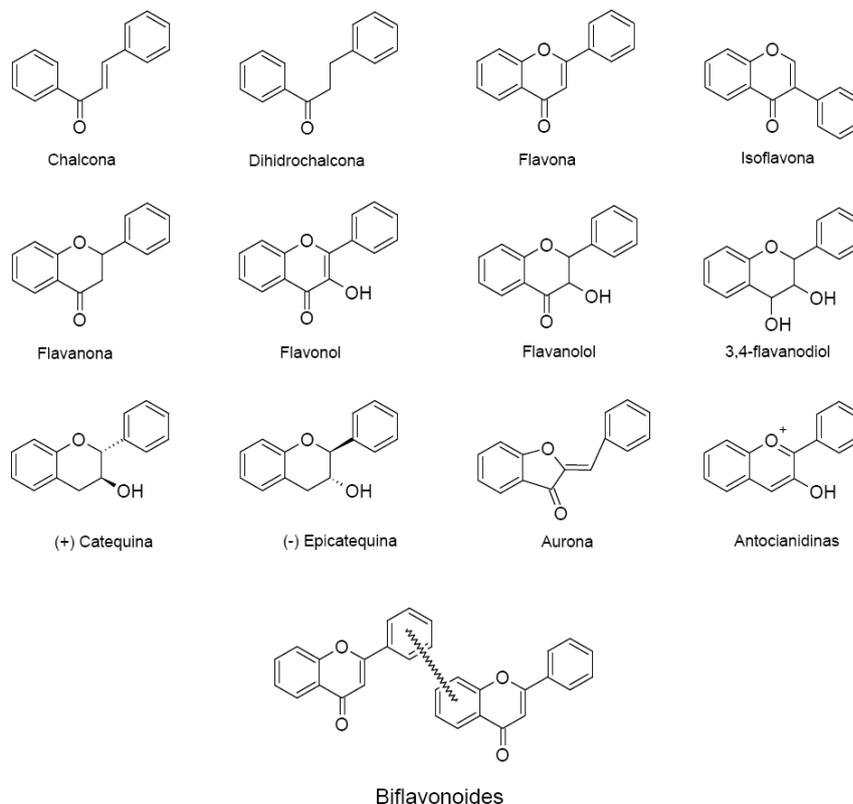


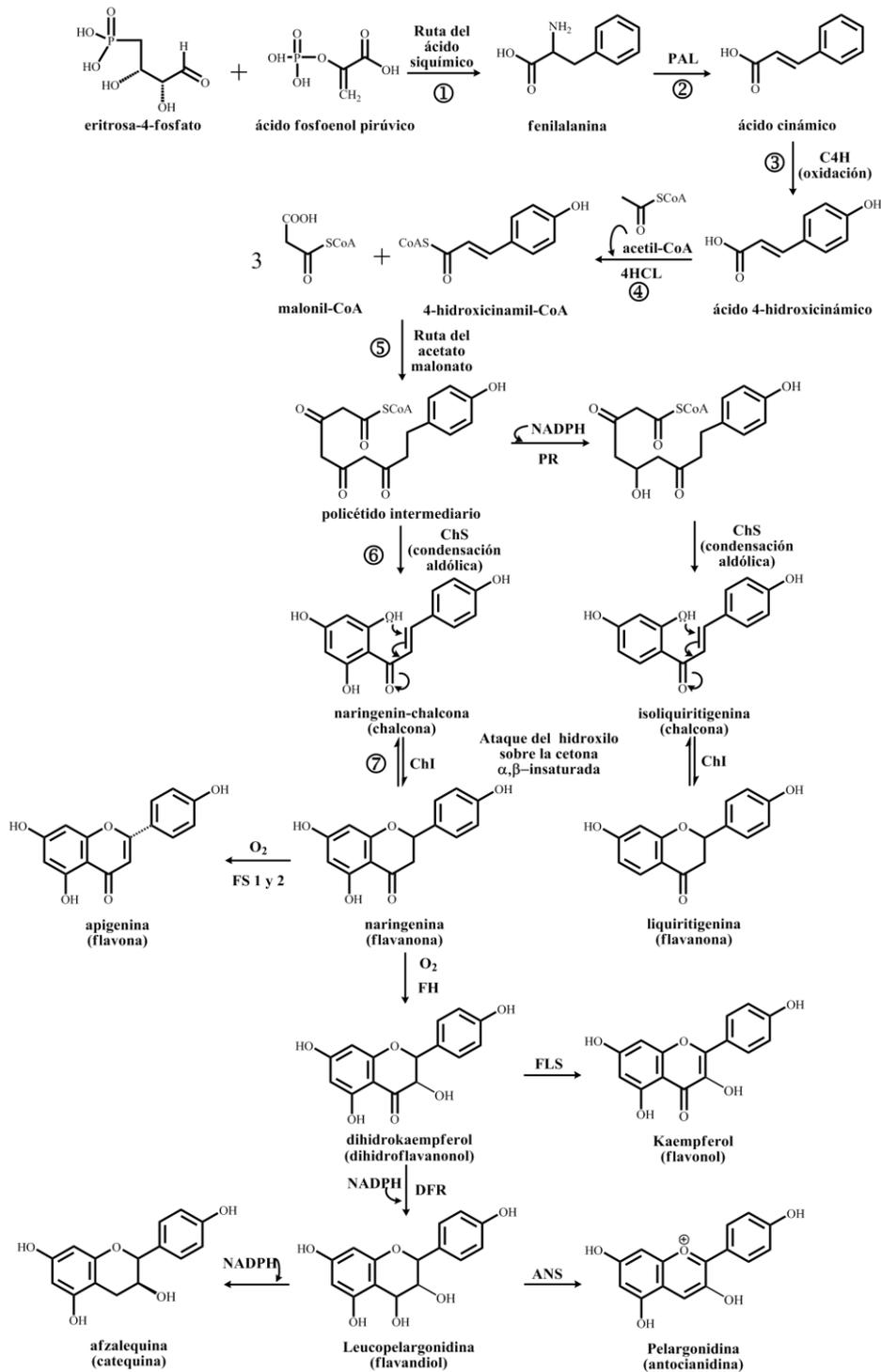
Figura 3. Tipos de flavonoides



2.3.4 Biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides se originan en la naturaleza por biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C₃ se originan de la ruta del ácido siquímico (Dewick, 2002). En la **Figura 4** se esquematizan los siguientes pasos:

- a) La biosíntesis inicia por condensación de los metabolitos primarios, eritrosa 4-fosfato y el fosfoenol piruvato (PEP), por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico; a partir del cual se forma el precursor de aminoácidos aromáticos, el ácido corísmico, y conduce a la formación del aminoácido fenilalanina.
- b) El siguiente paso es la eliminación del amonio de la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) para dar origen al ácido cinámico.
- c) El ácido cinámico es transformado en ácido 4-hidroxicinámico (o ácido *p*-cumárico) por acción de la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H), que se encarga de incorporar un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático
- d) Posteriormente, con la incorporación de una unidad de acetyl-CoA, la enzima 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa (4HCL) da origen al precursor 4-hidroxicinamoil-CoA.
- e) Por la ruta de los policétidos, se forma un policétido intermediario con la unión de 4-hidroxicinamoil-CoA, (unidad iniciadora), y 3 unidades de malonil-CoA, (unidad extendedora).
- f) Con la acción de la chalcona sintetasa, el policétido se cicliza por condensación aldólica, para dar origen al anillo A y formar una chalcona.
- g) Las flavanonas se forman con un ataque nucleofílico tipo Michael del hidroxilo sobre la cetona α , β -insaturada.



PAL: fenilalaninaamonioliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4HCL: 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa, PR: polícétido reductasa, ChS: chalcona sintetasa, ChI: Chalcona isomerasa, FS 1 y 2: flavona sintetasa, FH: flavona 3-hidroxilasa, FLS: flavonol sintetasa, DFR: Dihidroxiflavonol 4-reductasa, ANS: Antocianidina sintetasa.

Figura 4. Ruta biosintética de flavonoides (Dewick, 2002).



2.3.5 Extracción

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material vegetal fresco, aunque ésta también puede realizarse con el material vegetal seco siempre y cuando el proceso de secado no altere la composición de los mismos. El material vegetal debe molerse finamente para de esta forma facilitar la extracción de los flavonoides, los cuales pueden presentar diferente solubilidad en distintos disolventes orgánicos (Baran, 1996).

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilo libres o azúcares son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en disolventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua. Por otro lado los que son menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en disolventes tales como éteres y cloroformo (Swiader, *et al.*, 1996; Widyastuti, *et al.*, 1996).

La extracción de la mayoría de los flavonoides se puede realizar con metanol al 85% en agua, con posterior filtración. El filtrado se concentra y el metanol es eliminado. La capa acuosa es sucesivamente extraída por partición con una serie de disolventes orgánicos como n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad, los cuales están presentes en la superficie de las plantas.

El extracto hexánico generalmente contiene clorofilas y gomas y los extractos clorofórmico y de acetato de etilo son ricos en flavonoides (Baran, 1996; Harborne, 1982).

2.3.6 Aislamiento y Purificación.

Esta etapa es muy importante en la separación e identificación de los flavonoides presentes en un extracto. Con este objetivo se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas. Para la determinación de flavonoides en extractos crudos de plantas o fracciones, son especialmente utilizadas la cromatografía en papel (CP) y la cromatografía en capa fina (CCF). Por otro lado, son indispensables para la separación de flavonoides la cromatografía preparativa (CP), la cromatografía en capa fina (CCF),



la cromatografía en columna (CC), la cromatografía en papel bidimensional y especialmente la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) (Harborne, 1998).

2.3.6.1 Identificación por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La cromatografía de capa fina es un método de análisis rápido, el cual requiere de muy pequeñas cantidades de muestra. Se pueden utilizar como soportes celulosa, sílica gel y poliamida entre otros (Harborne, 1998).

El revelado de la placa cromatográfica se realiza a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm, donde muchos flavonoides se manifiestan como puntos coloreados, estos se intensifican o cambian de color cuando se somete a vapores de amoníaco, pudiéndose estimar de esta forma el tipo de flavonoide presente en el extracto (Cartaya, 2001).

2.3.6.2 Cromatografía en Columna (CC).

Esta técnica básicamente consiste en la aplicación de una mezcla de flavonoides a la columna, la cual cuenta con un poderoso adsorbente y la subsecuente elución secuencial de los compuestos individuales con disolventes apropiados. Se emplea para su separación a nivel preparativo y los adsorbentes más comúnmente utilizados en esta técnica son sílica gel, poliamida, celulosa y polidextranos (Swiader, *et al.*, 1996).

a) Separación por columna de gel de sílice

Esta técnica puede ser usada para la separación de flavonoides relativamente no polares derivados de agliconas como isoflavonas y flavonas metoxiladas, así como flavonoles; esta no es buena para la separación de flavonoides polares como polihidroxi flavonoles o glicósidos, pero es un método conveniente para la purificación de muchos flavonoides derivados de agliconas que son obtenidos por hidrólisis de glicósidos. Un incremento en el contenido de metanol, en el sistema de elución permitirá la remoción de muchos flavonoides de la sílica gel. Las isoflavonas pueden separarse usando cloroformo como eluyente y después ir incrementando la polaridad gradualmente mediante la adición de disolventes como éter o acetato de etilo (Mabry, *et al.*, 1970).



b) Separación por columna de poliamida

Es el mejor adsorbente para la separación de todos los tipos de flavonoides; el adsorbente de tipo poliamida se usa en conjunto con varias mezclas de eluyentes de H₂O/MeOH. Esta técnica es útil para la separación de flavonoides de mezclas complejas de glicósidos y agliconas de isoflavonas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, y flavanonas (Mabry, *et al.*, 1970).

c) Separación por columna de polidextrans

En esta técnica generalmente los flavonoides disueltos en metanol se agregan a la columna; en algunos casos una solución de dioxano-MeOH se puede utilizar para disolver los flavonoides. Los flavonoides tanto de agliconas como de glicósidos se separan en columna de sephadex LH-20 utilizando metanol como único eluyente. El grado de adsorción del flavonoide de aglicona en esta fase estacionaria depende generalmente del número de hidroxilos libres pero no de su acidez. Este método es eficiente y a su vez un medio de alta capacidad para trabajar con flavonoides tanto analítica como preparativamente (Mabry, *et al.*, 1970).

2.3.6.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

Esta técnica muestra niveles de resolución y sensibilidad mucho mayores que la Cromatografía en papel o la CCF, por lo que es usada para garantizar la homogeneidad de las muestras aisladas por otras técnicas. La cromatografía de fase inversa es comúnmente utilizada, con esta técnica los compuestos más polares eluyen primero. Las columnas C₁₈ son muy empleadas, aunque las C₈ y otros empaquetamientos pueden ser también utilizados. Se usan sucesivamente disolventes como H₂O/MeOH, H₂O/MeOH/HOAc y H₂O/Acetonitrilo en variadas proporciones para flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, catequinas, antocianidinas y glicósidos de flavonoides, utilizando sistemas de elución isocráticos o por gradientes. Los flavonoides eluidos por CLAE son normalmente captados por medio de un detector UV a 280 nm, debido a que muchos de ellos presentan un máximo de absorción al UV entre 270 y 290 nm (Harborne, *et al.*, 1998).



2.3.7 Biflavonoides

2.3.7.1 Generalidades

Estructuralmente, los biflavonoides son moléculas polifenólicas compuestas por dos unidades de flavonoide (**Figura 5**), las cuales pueden ser o no idénticas, unidas de manera simétrica o no, por medio de un conector C- u O- de longitud variable. Estos compuestos se encuentran en estado libre y algunas veces como O-glicósidos. Son encontrados frecuentemente en gimnospermas, y muchas veces en Briofitas y Pteridofitas (Iwashina, 2000).

La formación de los biflavonoides se debe al acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y a la modificación del carbono central C₃ de esta (Swiader, 1996) (**Figura 6**).

Las posibles variaciones en las parejas de unidades de flavonoides, aunado con el gran número de permutas posibles en la posición y naturaleza del enlace interflavonoidico, nos introduce a una gran diversidad estructural de estas moléculas. Esta diversidad se amplía por la posición variable de grupos funcionales por ejemplo -OH, MeO-, -C=O o uniones -C=C-, y centros estereogénicos en el andamiaje flavonoidico.

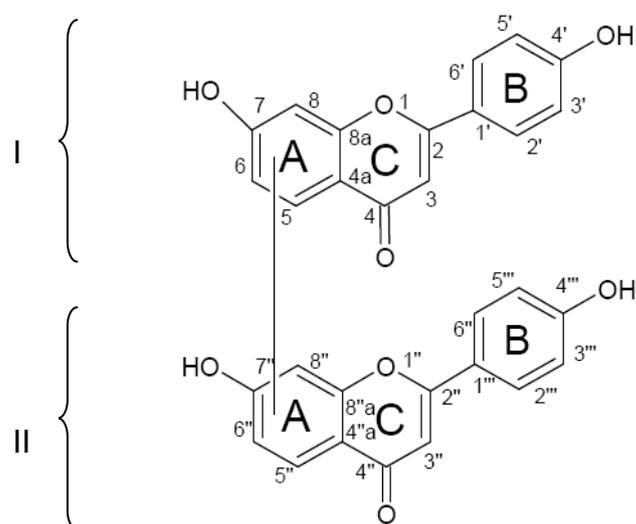


Figura 5. Estructura básica de biflavonoides. Las dos unidades monoméricas son identificadas usando números romanos I y II. El nombramiento de las posiciones en cada caso comienzan con el anillo que contiene el átomo de oxígeno y en el esqueleto II, los números de los anillos A y C se numeran con bi-primas, mientras que los del anillo C, con tri-primas.



Los biflavonoides se encuentran en muchas frutas, vegetales y plantas. Se ha encontrado estos compuestos poseen actividades biológicas interesantes, incluyendo la de antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, vasorelajante y anticoagulante. Otra propiedad con aplicación potencial es la de antioxidante, aunque su potencia parece ser menor que la de los monoflavonoides a pesar de la presencia de cerca del doble del número de grupos -OH en su estructura. Finalmente los biflavonoides pueden inhibir enzimas metabólicas como el citocromo P₄₅₀ en humanos (Rahman, *et al.*, 2007).

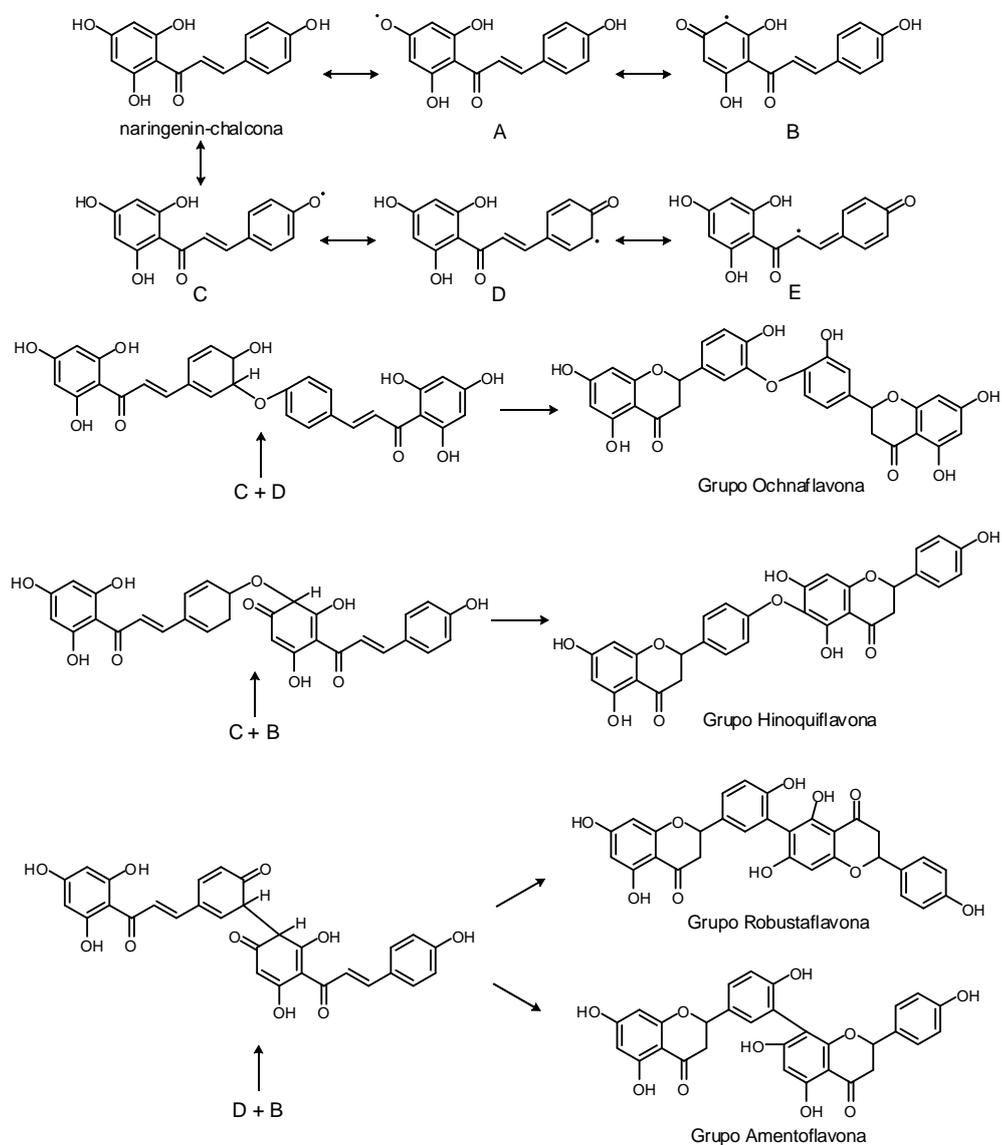


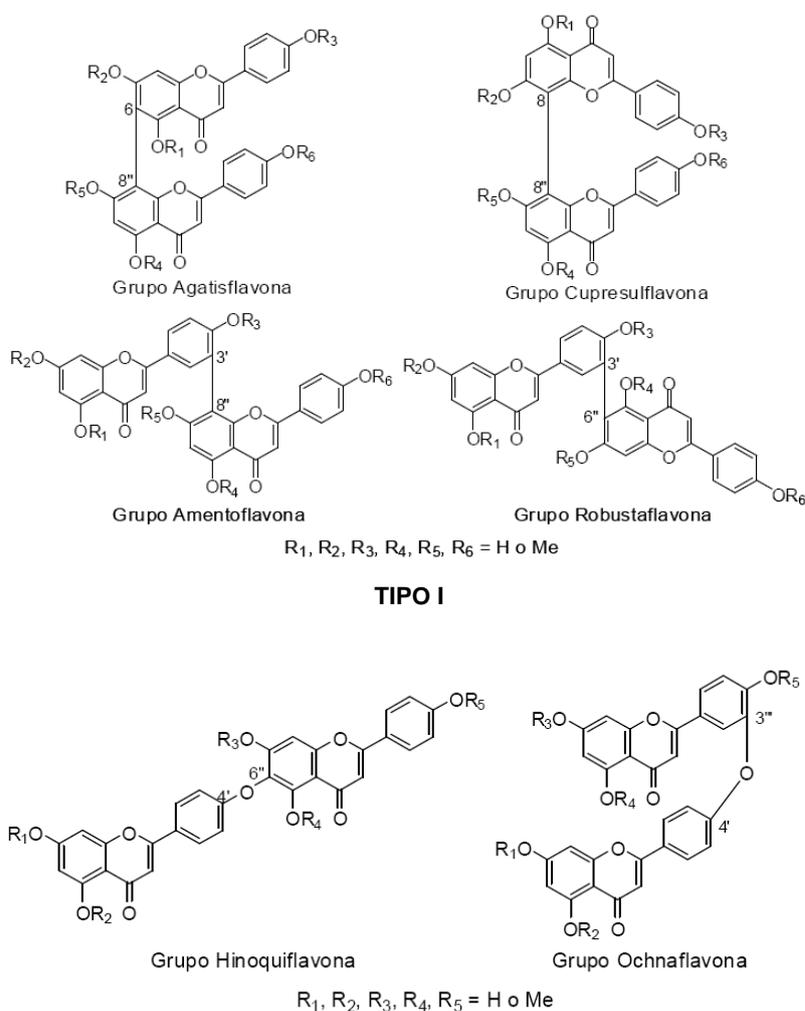
Figura 6. Biosíntesis de biflavonoides (Harborne, *et al.*, 1975).



2.3.7.2 Tipos de Biflavonoides

En los biflavonoides conocidos, la unión de los monómeros puede ser de dos tipos: bifenilo (I) o bifenil éter (II). El tipo I Incluye a los biflavonoides del grupo agatisflavona, cuya unión C-C se da entre C-6 y C-8'', el grupo cupresulflavona se une entre C-8 y C-8', el grupo amentoflavona en donde la unión se da entre C-3' y C-8'' y los biflavonoides del grupo robustaflavona los cuales se unen en C-3' y C-6'' (Harborne, *et al.*, 1975).

Entre los biflavonoides de tipo II se encuentra el grupo hinoquiflavona donde la unión C-O-C se da en C-4' y C-6'' y el grupo ochnaflavona se une entre C-4' y C-3'' (Harborne, *et al.*, 1975) (**Figura 7**).



TIPO I

TIPO II

Figura 7. Tipos de biflavonoides de acuerdo a la unión de su monómero (Harborne, *et al.*, 1975).



2.3.7.3 Distribución en plantas

En gimnospermas estos compuestos se han reportado en 19 familias frecuentemente encontrados en géneros de *Cupressaceae*, *Pinaceae*, *Cycadaceae*, *Ginkgoaceae*, y es común en Pteridophytas y Bryophytas. También se encuentran en Angiospermas, en géneros de *Anacardiaceae*, *Berberidaceae*, *Burseraceae*, *Caprifoliaceae*, *Gasuarinaceae*, *Euphorbiaceae*, *Guttiferae*, (especialmente *Garcinia*), *Piperaceae*, *Rhamnaceae*, *Rutaceae*, *Salicaceae*, *Thymelaeaceae*, *Velloziaceae* (Iwashina, 2000).



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El análisis de la composición química de una planta medicinal es muy importante, ya que es posible encontrar metabolitos secundarios responsables de las actividades terapéuticas de la misma, todo esto mediante estudios farmacológicos adecuados. Aunado a esto, el conocimiento generado a partir de estas drogas medicinales, se puede utilizar en la elaboración de monografías farmacopéicas, las cuales contienen la base para la aplicación de los procedimientos para determinar la calidad y seguridad de esas especies, y a futuro, para el desarrollo de productos medicinales herbolarios para el tratamiento de diversos padecimientos.

Debido a lo anterior, es de suma importancia investigar la naturaleza del contenido metabólico secundario, mediante su aislamiento a partir de drogas vegetales y sobre todo, en especies que tengamos en nuestro país, ya que los estudios de la flora mexicana son escasos y es de suma importancia el llevar a cabo proyectos en donde se aborde el mayor número de familias, géneros y especies botánicas de gran uso existentes dentro del territorio nacional.

Como se mencionó en la parte de antecedentes, *Selaginella lepidophylla* Spring (Selaginellaceae) es una especie nativa de nuestro país, la cual ha sido objeto de muchos estudios; por ejemplo los etnobotánicos, en los cuales documentan que en algunas regiones de la República Mexicana es utilizada para combatir ciertas enfermedades. Además se sabe que esta planta biosintetiza una gran cantidad de biflavonoides (Quasim, et al., 1985; Aguilar, et al., 2007), a los cuales se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades terapéuticas, y los efectos curativos de muchos remedios de la medicina natural tradicional pueden ser asociados a la presencia de estas moléculas.

Sin embargo, hasta la fecha de este estudio, en trabajos previos (Guevara, 2008; Mejía, 2008) no se había aislado el metabolito secundario mayoritario de este vegetal apreciado en el cromatograma de líquidos de su extracto metanólico bajo ciertas



condiciones analíticas como se muestra en la parte experimental; por esta razón, el principal objetivo de esta tesis es aislar y caracterizar dicho compuesto. La separación del mismo, ha mostrado grandes dificultades por la poca solubilidad en disolventes convencionales como MeOH, AcOEt y hexano. Además al momento de la purificación e identificación de dicho metabolito, sus datos espectroscópicos coincidían con uno de los metabolitos adicionales de la planta previamente aislado y caracterizado; por otra parte, a pesar de ser un compuesto conocido, sus datos reportados en la literatura mostraban discrepancias entre diferentes investigadores, por lo que fue necesario realizar un análisis muy detallado desde el punto de vista químico, espectroscópico y espectrométrico para caracterizar ambos metabolitos secundarios.



4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General:

Realizar el aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la planta *S. lepidophylla*, así como su elucidación estructural por medio de técnicas contemporáneas de análisis como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

4.2 Objetivos Particulares:

1. Obtener los extractos hexánico, de acetato de etilo, acetónico, y metanólico a partir de la planta completa seca y fragmentada.
2. Establecer el perfil cromatográfico por CLAE de los extractos obtenidos en el punto 1.
3. Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios contenidos en el extracto con mayor respuesta cromatográfica en CLAE mediante cromatografía en columna abierta utilizando condiciones en fase inversa.
4. Optimizar las condiciones cromatográficas en CLAE para la purificación de los metabolitos secundarios.
5. Identificar estructuralmente a los metabolitos secundarios obtenidos de *S. lepidophylla* (Selaginellaceae) mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
6. Identificar cada uno de los compuestos presentes en los perfiles cromatográficos establecidos mediante la técnica de co-elución.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

El material vegetal empleado se adquirió en el anexo del mercado de Sonora de la ciudad de México, local 173 en agosto del 2005. La identificación fue realizada por el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

5.2 Disolventes y reactivos

Disolventes

- Acetona grado R.A
- Cloroformo grado R.A.
- Hexano grado R.A.
- Metanol grado R.A.
- Acetonitrilo Grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC

Reactivos

- Ácido acético glacial R.A.
- Solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce} (\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico 2N.
- Sephadex lipofílico LH-20, tamaño de partícula 20-100 μ , Sigma Aldrich.

5.3 Equipo

La fragmentación en mayor escala del material vegetal se llevó a cabo en un molino de cuchillas modelo Thomas-Wiley No. 4 y en menor escala en un mortero de porcelana.

Para las extracciones preliminares se utilizó un sonicador marca Sonicor modelo SC200TH y para la separación de los sobrenadantes a partir de los extractos obtenidos de la planta, una centrífuga marca LABNET modelo 2200 A.



Para concentrar al vacío los extractos obtenidos se utilizaron los rotaevaporadores marca Büchi 460 y B-480.

Las pesadas de los reactivos y materia prima se hicieron mediante una balanza analítica marca Ohaus y otra granataria marca Ohaus Scout-pro.

Como revelador cromatográfico se empleó una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c con longitud de onda a 254 y 365 nm.

El aislamiento y la purificación de los biflavonoides se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Waters (Waters Corporation Milford MA, USA), con bombas isocráticas modelos 515 y 510 respectivamente, un inyector automatizado marca JASCO modelo AS-2055 plus, un controlador de temperatura marca Waters y un detector UV-VIS marca Waters modelo Millenium 32.

La desgasificación de los disolventes grado HPLC se realizó mediante un equipo Millipore de vidrio con juntas esmeriladas de dos piezas con membrana marca Pall Corporation, de 47 mm de diámetro, con tamaño de poro de 0.45 μm .

Los puntos de Fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns. Los espectros de Infrarrojo se obtuvieron es un espectrofotómetro FTIR, Perkin Elmer, Spectrum RX1, en Pastillas de KBr. Los espectros de masas, modalidad FAB⁺ de baja resolución, se determinaron en un espectrómetro Thermo-Electron, Modelo DFS (Double Focus Sector). La espectroscopía de RMN se determino a 300 y 500 MHz en ¹H y a 125 MHz en ¹³C, mediante espectrómetros analíticos Varian Unity Inova. Para la RMN de 500 MHz, en el caso del compuesto **1** se utilizo DMSO como disolvente y en el caso de **2** CD₃COCD₃. Los desplazamientos químicos se designaron en unidades de ppm, referidos a TMS como referencia interna.

5.4 Instrumental de laboratorio

- Columna analítica kromasil 100 C₁₈, tamaño de partícula: 3 μm , dimensiones: 150 x 4.6 mm, Higgings Analytical, Inc.
- Columna analítica Fortis C₁₈, Tamaño de partícula: 5 μm , dimensiones: 150 x 4.6 mm, Fortis Technologies.
- Columna preparativa PHALANX C₁₈, tamaño de partícula: 5 μm , dimensiones: 250 x 10 mm, Higgings Analytical Inc.



- Frascos viales de distintas capacidades.
- Jeringas de plástico tipo insulina
- Malla metálica de poro de 2 mm.
- Mortero con pistilo de porcelana
- Pipetas volumétricas de distintas capacidades
- Pipetas pasteur
- Prefiltros para CLAE (acrodiscos) marca Pall Corporation de 13 mm de diámetro, con tamaño de poro de 0.45 μm .
- Tubos para centrífuga de plástico marca NEPTUNE de 15 mL.
- Viales de vidrio para CLAE tipo ampolleta de capacidad para 500 μL .

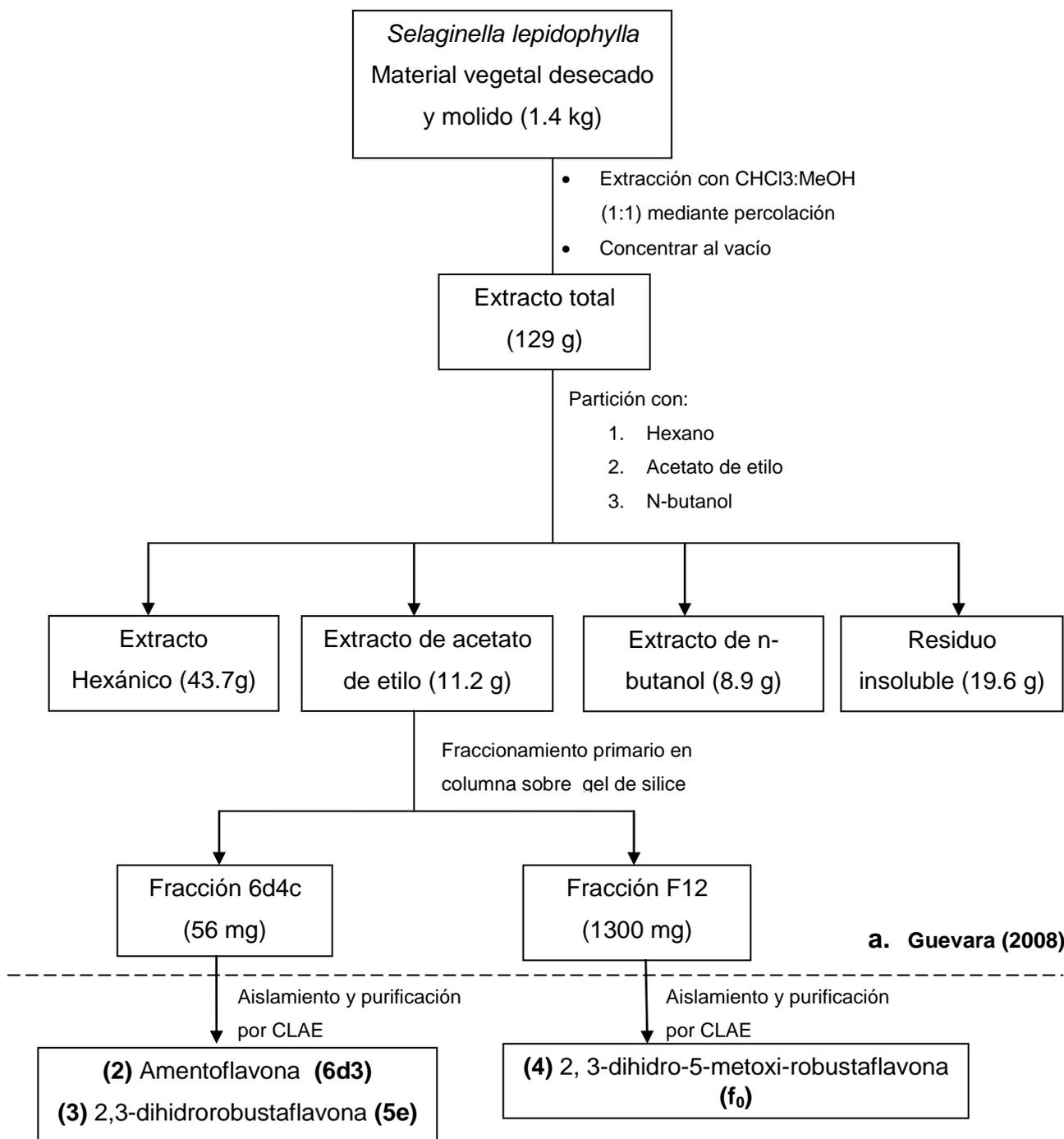
5.5 Metodologías

5.5.1 Purificación de las fracciones 6d4c y F12

El análisis cromatográfico de las fracciones F12 (primaria) y 6d4c (quinquenario) obtenidas con anterioridad (Guevara, 2008) (**Diagrama 1 parte a**) del extracto de acetato de etilo, reveló la presencia de biflavonoides. Estas se fraccionaron de manera independiente por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, empleando las condiciones de tipo preparativo descritas en el punto 5.5.3.3, para obtener los compuestos 5e y 6d3. Estos se identificaron como biflavonoides en estudios previos (Guevara, 2008), los cuales se utilizaron como referencias en CCF y en CLAE a lo largo de la experimentación posterior. Los cromatogramas de la purificación se muestran en el **Anexo 3**. Por otra parte, de la fracción F12, se obtuvo el compuesto f_0 (5 mg) inyectando una pequeña cantidad de la fracción F_0 al cromatógrafo de líquidos utilizando las condiciones de tipo preparativo del punto 5.5.3.3. Estos procedimientos se esquematizan en el **Diagrama 1 parte b**.



Diagrama 1. Flujo experimental para la obtención del compuesto **4** a partir de la fracción F12 y de los compuestos **2** (6d3) y **3** (5e) a partir de la fracción 6d4c.





5.5.2 Obtención de los extractos preliminares

La planta completa desecada a temperatura ambiente se trituró mediante el uso de un mortero. El pulverizado obtenido se tamizó en una malla metálica de 2 mm de diámetro. Posteriormente se pesaron aproximadamente 100 mg de este material vegetal (x4) y se colocaron en 4 tubos de centrifuga de 15 mL cada uno. Después se adicionaron de manera independiente, a cada uno, 10 mL de disolvente grado R.A de acuerdo a la **Tabla 4**.

Tabla 4. Disolventes utilizados para realizar los extractos preliminares

Tubo	Disolvente
1	Metanol
2	Acetato de etilo
3	Hexano
4	Acetona

Inmediatamente después, los tubos se sometieron a sonicación durante 15 minutos y terminado este tiempo se centrifugaron por 10 minutos a 3500 r.p.m. Esta metodología se realizó por triplicado, colectándose aproximadamente 30 mL del extracto de cada disolvente en un matraz volumétrico. Posteriormente los sobrenadantes fueron concentrados al vacío en rotaevaporador hasta sequedad.

Finalmente, cada extracto se disolvió en la mínima cantidad de MeOH grado HPLC y se filtró a través de prefiltros de 0.45 μm para su posterior inyección al cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones señaladas de tipo analítico en el punto 5.5.3.3.

5.5.3 Extracción, aislamiento y purificación de robustaflavona (1), amentoflavona (2), y 2, 3-dihidro-robustaflavona (3)

5.5.3.1 Extracción

El material vegetal (250 g de la planta completa), desecado mediante calor natural a temperatura ambiente se fragmentó mediante un molino de cuchillas. El



pulverizado obtenido se empacó en una columna de vidrio de 65 cm de longitud por 5 cm de diámetro. Posteriormente se realizó la extracción del material vegetal mediante el método de percolación con acetona como disolvente hasta sumergir completamente, y dejándose macerar durante 24 horas a temperatura ambiente. Esta operación se repitió hasta que el color verde de la solución obtenida resultó poco intenso (**Figura 8**). Después de este tiempo se colectó el extracto y se concentró al vacío mediante rotaevaporador.



Figura 8. Columna de extracción de *S. lepidophylla*.

5.5.3.2 Fraccionamiento del extracto acetónico

El fraccionamiento del extracto se realizó mediante cromatografía en columna abierta en Sephadex LH-20. Primeramente el extracto acetónico obtenido (4.1 g) se suspendió en MeOH grado R.A, inmediatamente después se aplicó en solución a una columna abierta de vidrio con Sephadex LH-20 en metanol. Posteriormente se eluyó la muestra con MeOH grado R.A. como único disolvente (**Figura 9**) obteniéndose primeramente 3 fracciones en grueso, que fueron separadas de acuerdo al color que presentaban en la columna conforme progresaba el proceso de elución; de esta manera, se recolectó la primer fracción de color amarillo, la segunda de color verde



intenso y la tercera de color café oscuro (**Figura 10**) Se siguió eluyendo la columna con MeOH 100% y se obtuvieron otras 5 fracciones en grueso R1, R2, R3, R4 y R5 de aproximadamente 500 mL cada una. De esta manera se obtuvieron 8 fracciones primarias: F-Am, F-Ve, F-Ca, R1, R2, R3, R4 y R5.



Figura 9. Columna de Sephadex LH-20 para el fraccionamiento del extracto acetónico

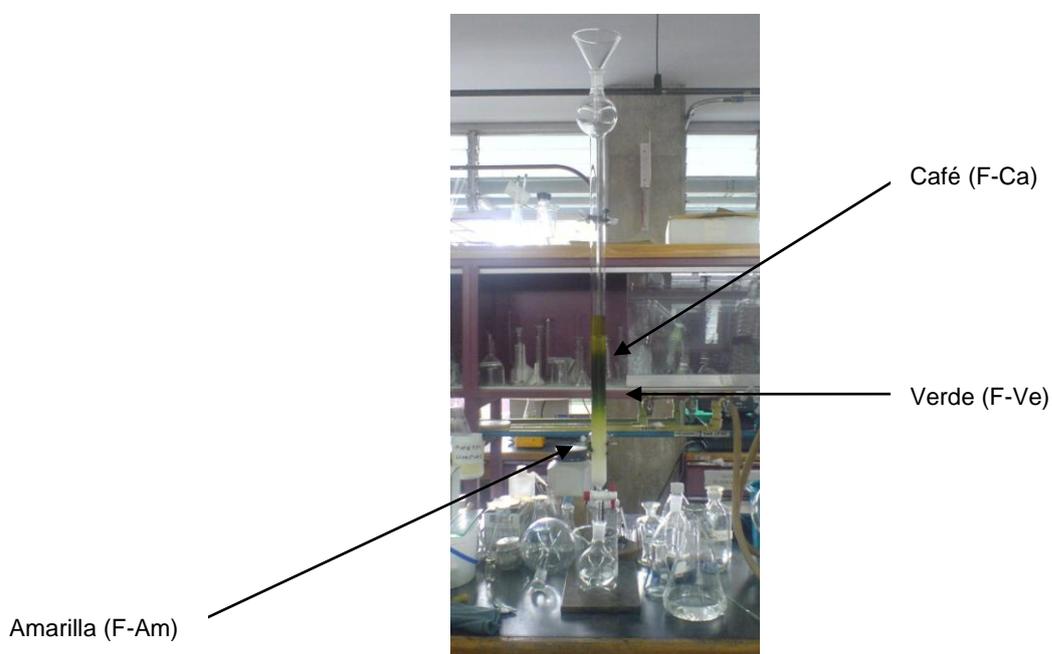


Figura 10. Fraccionamiento en grueso a partir del extracto acetónico mediante cromatografía en columna de Sephadex LH-20. Fracciones café (F-Ca), verde (F-Ve) y amarilla (F-Am).



5.5.3.3 Aislamiento y purificación

De la fracción cromatográfica R4 se aisló por precipitación espontánea el compuesto **1**. Por otro lado, la purificación de los metabolitos secundarios **2 y 3** se realizó tanto del fraccionamiento en grueso del extracto acetónico en columna de sephadex, y de la fracción 6d4c aislada por Guevara (2008), mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), bajo las condiciones de trabajo del inciso b de este apartado, de acuerdo a la metodología utilizada por Mejía (2008). El compuesto **4** se aisló y purificó también por HPLC de la fracción F12 obtenida preliminarmente de un extracto de acetato de etilo (Guevara, *op. cit.*, 2008).

Los procedimientos para la obtención de los biflavonoides **1, 2 y 3** se esquematizan en el **Diagrama 2**.

a) Condiciones de tipo analítico

- Columna analítica Kromasil 100 (únicamente para los extractos preliminares) y columna analítica Fortis C₁₈.
- Inyector automatizado JASCO
- Modo de separación: elución por gradiente de concentración de la fase móvil (**Tabla 5**).

Tabla 5. Condiciones de tipo analítico para el análisis de los metabolitos secundarios mediante elución por gradiente de la fase móvil.

Tiempo (min)	%A	%B
0-10	80	20
10-15	60	40
15-30	60	40
30-35	80	20

A = Acetonitrilo grado HPLC

B = Agua grado HPLC + ácido acético glacial, al 0.1 %

- $\lambda = 367 \text{ nm}$
- Temperatura $30 \pm 0.5 \text{ }^\circ \text{C}$



b) Condiciones de tipo preparativo

- Columna preparativa PHALANX
- Inyector manual marca Waters
- Jeringa analítica Halston de 100 y 500 μL
- Modo de Separación: elución por gradiente de concentración de la fase móvil de acuerdo a la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones para la purificación de los metabolitos secundarios mediante elución por gradiente de la fase móvil.

Tiempo (min)	%A	%B
0-8	80	20
8-15	60	40
15-28	60	40
28-37	80	20

A = Acetonitrilo grado HPLC

B = Agua grado HPLC + Ácido Acético glacial al 0.1 %

- $\lambda = 367 \text{ nm}$
- Temperatura $30 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$

5.5.4 Identificación preliminar de robustaflavona (1), amentoflavona (2), 2,3-dihidro-robustaflavona (3) y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (4).

La identificación preliminar de los compuestos **1**, **2**, y **3** se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención en CLAE en el extracto metanólico bajo las condiciones de tipo analítico del inciso *a* y cromatografía en capa fina (sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15) con los de los compuestos tomados como referencia aislados por Guevara (2008). El compuesto **4** se identificó por CLAE y RMN ^1H comparándolo con el compuesto 6b2c previamente aislado por Guevara (2008)

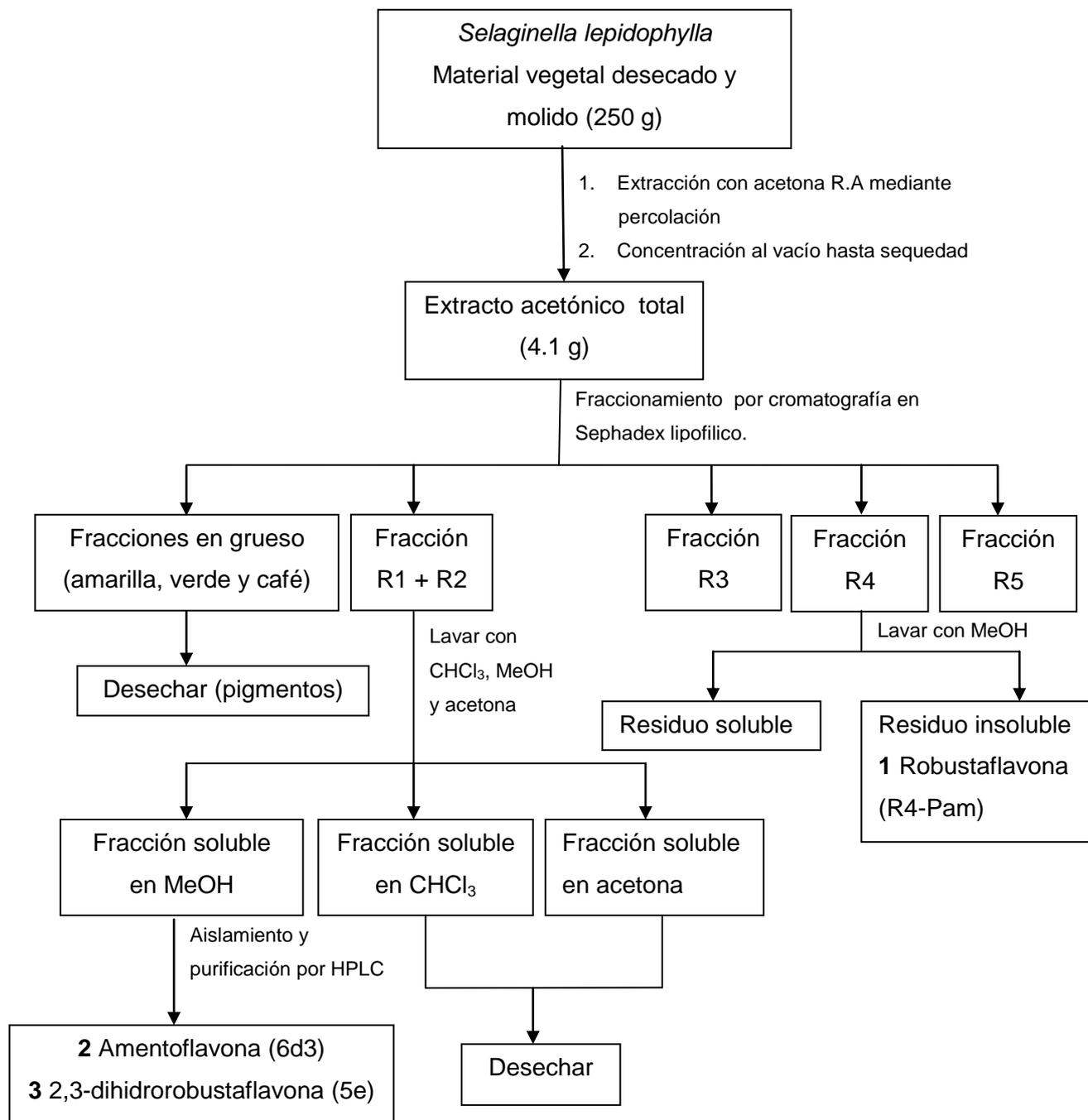
5.5.5 Elucidación estructural de robustaflavona (1) y amentoflavona (2)

La elucidación estructural de ambos compuestos se realizó mediante métodos espectroscópicos (IR, UV) y espectrométricos (Espectrometría de Masas y RMN).



Los espectros de IR de los compuestos **1** y **2** se realizaron en pastilla de KBr y los espectros de masas se realizaron por medio de la técnica de bombardeo rápido de átomos modalidad positiva (FAB⁺).

Diagrama 2. Flujo experimental para la obtención de los compuestos **1** (R4-Pam), **2** (6d3) y **3** (5e) a partir del extracto acetónico de *S. lepidophylla*.



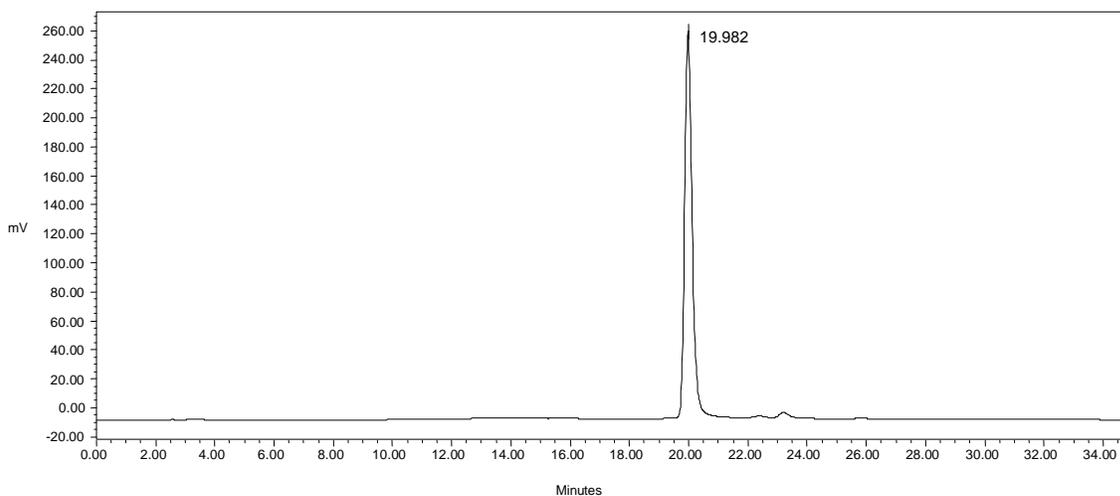


6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se mencionó en capítulos anteriores, el objetivo principal de este estudio fue aislar e identificar estructuralmente metabolitos secundarios adicionales a los ya encontrados en otros trabajos sobre *Selaginella lepidophylla*, principalmente el que aparece como mayoritario en cualquiera de los extractos obtenidos de la planta en estudio (hexánico, de acetato de etilo, acetónico y metanólico), el cual no se había aislado hasta la fecha de inicio de este trabajo. Adicionalmente, fue necesario aislar e identificar los compuestos ya obtenidos anteriormente, con el objetivo de establecer sus tiempos de retención en Cromatografía de Líquidos, dentro del perfil cromatográfico de los extractos y compararlos con los que se aislen adicionalmente.

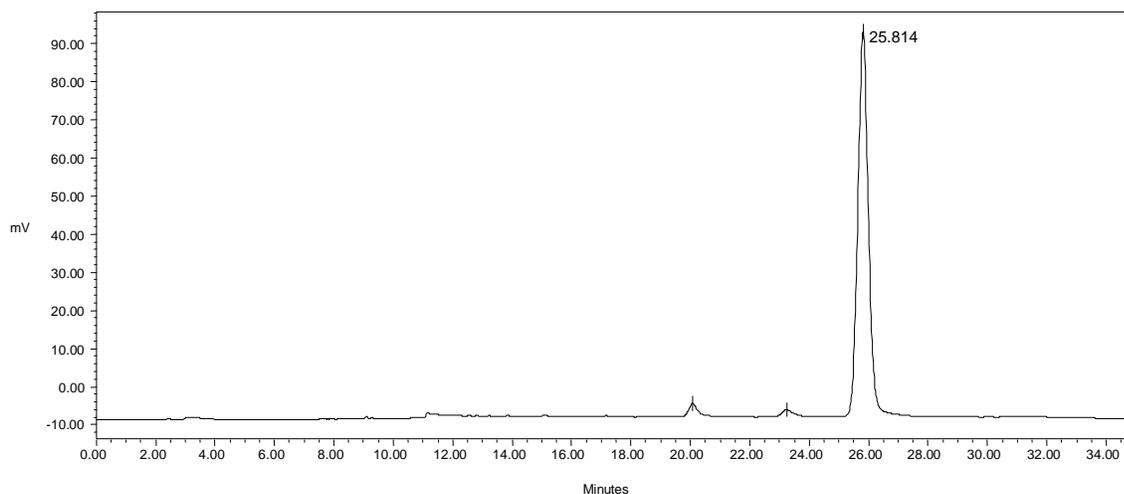
6.1 Determinación de los tiempos de retención de 6d3 (2) y 5e (3)

Se obtuvieron los cromatogramas por CLAE de los compuestos **2** y **3** bajo las condiciones de tipo analítico mostradas en el punto 5.5.3.3. De esta manera se determinó su tiempo de retención (**Cromatogramas 1 y 2**).



Pico	Nombre	t _R (min)
1	6d3	19.982

Cromatograma 1. Compuesto **2** (6d3)

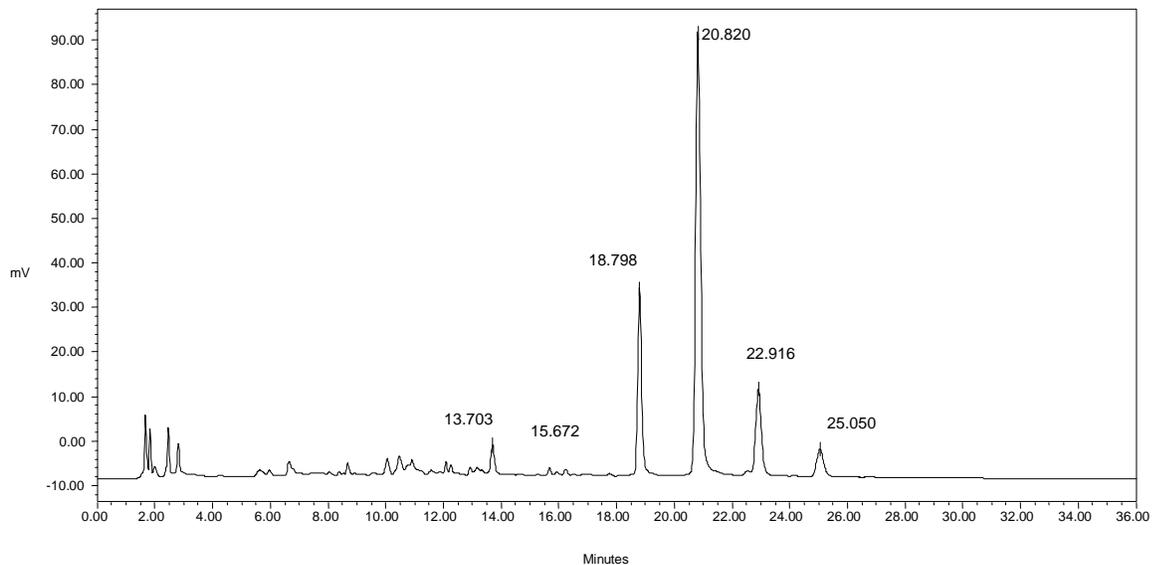


Pico	Nombre	t _R (min)
1	5e	25.814

Cromatograma 2. Compuesto 3 (5e)

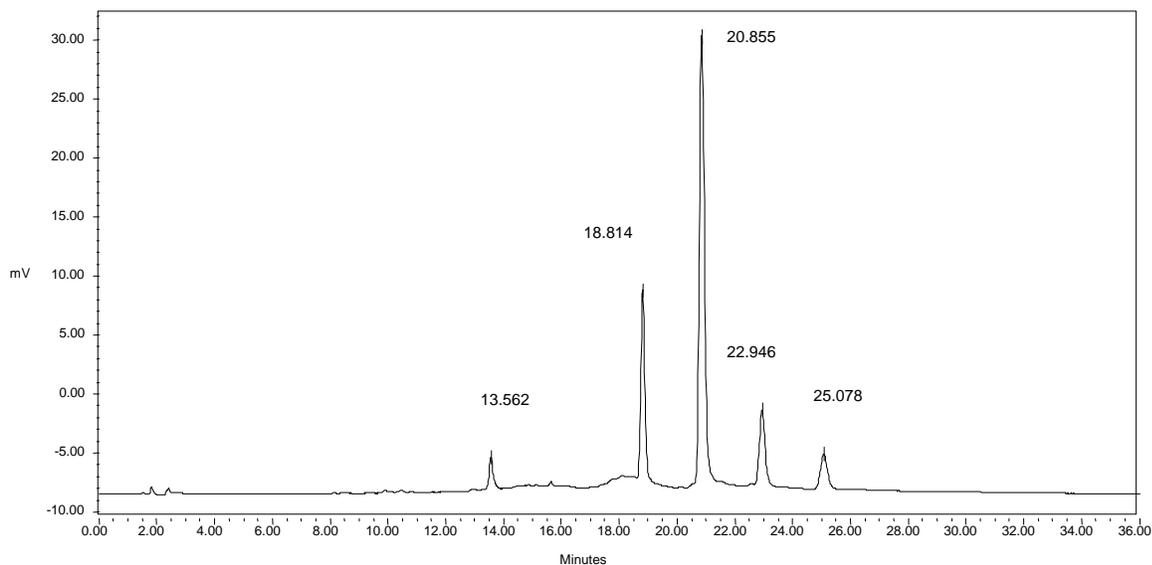
6.2 Extractos preliminares.

Una muestra de cada extracto preliminar (hexánico, de acetato de etilo, acetónico y metanólico) de *S. lepidophylla* se inyectó en el cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones del punto 5.5.3.3 (inciso *b*) utilizando la columna analítica kromasil 100. Los perfiles cromatográficos se muestran en los **Cromatogramas 3, 4, 5 y 6**.



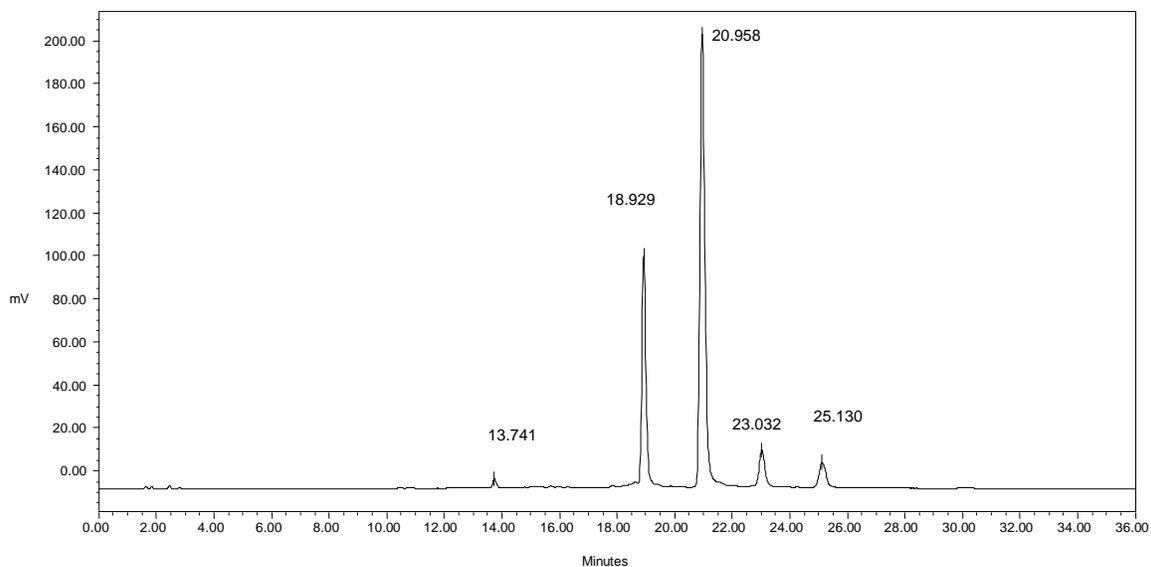
Pico	t _R (min)	ABC (mV/min)	% ABC	Altura (mV)
1	13.703	35.40	1.75	5.04
2	15.672	9.22	0.46	1.59
3	18.798	398.86	19.71	41.67
4	20.820	1201.20	59.37	98.99
5	22.916	277.38	13.71	19.26
6	25.050	101.09	5.00	6.09

Cromatograma 3. Extracto metanólico extraído primeramente con hexano



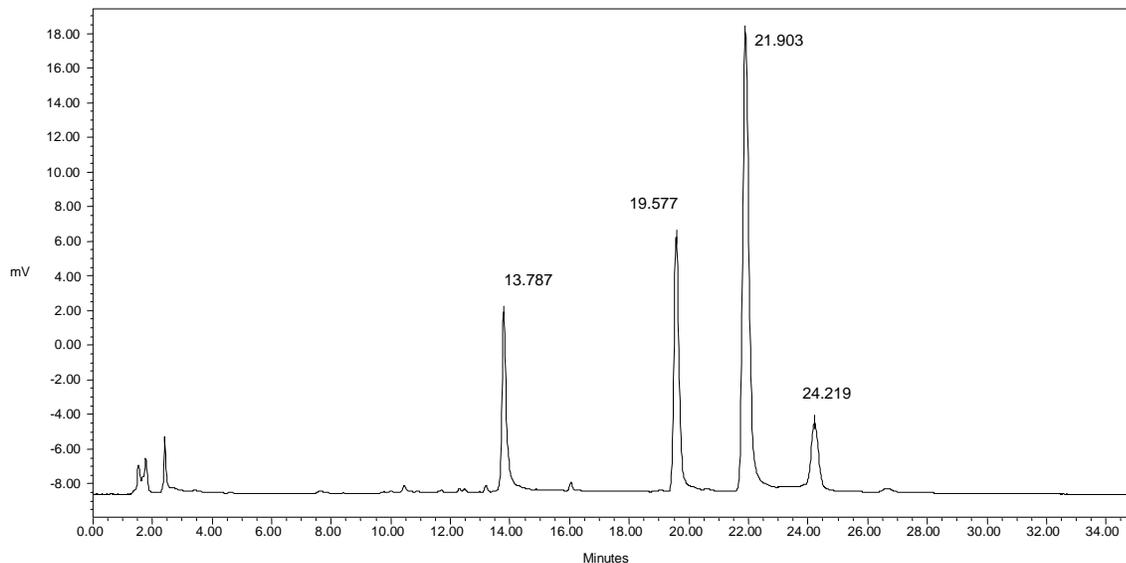


Pico	t _R (min)	ABC (mV/min)	% ABC	Altura (mV)
1	13.562	26.91	3.50	2.75
2	18.814	137.05	17.83	15.14
3	20.855	467.97	60.90	38.15
4	22.946	87.86	11.43	6.37
5	25.078	48.65	6.33	2.93

Cromatograma 4. Extracto de acetato de etilo

Pico	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	13.741	28.82	0.71	3.32
2	18.929	1013.83	25.10	106.19
3	20.958	2594.72	64.24	211.29
4	23.032	221.06	5.47	16.54
5	25.130	180.41	4.47	11.38

Cromatograma 5. Extracto acetónico (a)



Pico	t _R (min)	ABC (mV/min)	% ABC	Altura (mV)
1	13.787	97.30	13.07	9.86
2	19.577	181.86	24.42	14.70
3	21.903	395.73	53.14	26.39
4	24.219	67.18	9.02	3.85

Cromatograma 6. Extracto Metanólico

En los cromatogramas anteriores se observa que todos los extractos presentan prácticamente el mismo perfil cromatográfico, con la presencia de 5 compuestos que son mayoritarios con tiempos de retención promedio de 13.69, 18.84, 20.55, 22.69 y 24.86 minutos. El extracto hexánico estuvo constituido principalmente por pigmentos con ausencia de biflavonoides, como se constató por CCF.

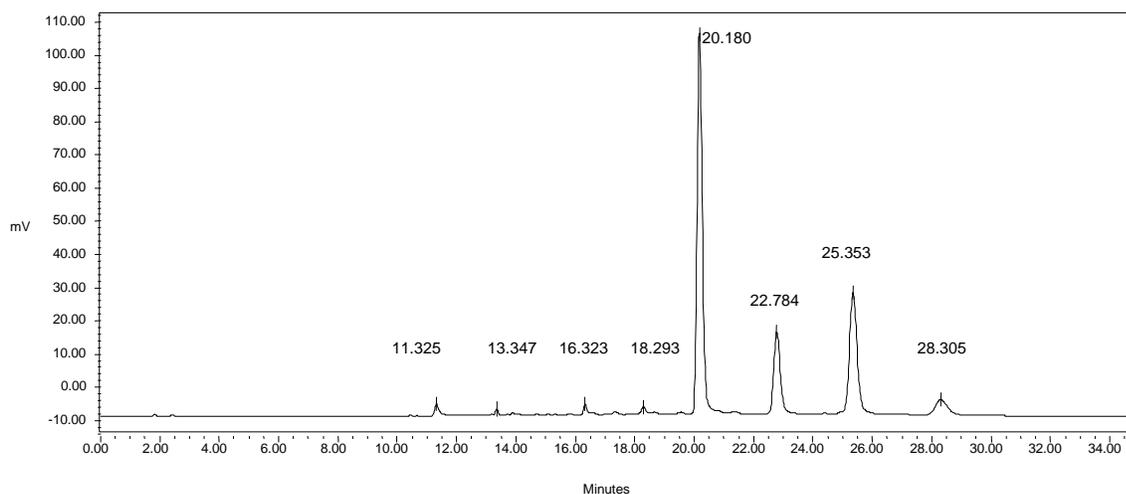
El compuesto que se encuentra en mayor proporción en los 4 extractos, es el correspondiente a aquel con un $t_R = 20.55$ minutos en promedio. Al comparar el área bajo la curva (ABC) de los picos correspondientes a este compuesto en los cromatogramas de los diferentes extractos y considerando que esta respuesta es directamente proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra, el ABC que resultó mayor fue la del extracto acetónico (2594.72 mV/seg); por lo tanto, se decidió escalar el proceso de extracción con este mismo disolvente para aislar el



compuesto que se encuentra mayoritariamente presente en la planta bajo estas condiciones analíticas.

6.3 Identificación de los compuestos 6d3 (2) y 5e (3) por Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

Para identificar la presencia de los biflavonoides de referencia, presentes en las fracciones obtenidas en grueso (R1, R2, R3, R4 y R5), se tomo una pequeña cantidad de las mismas y se disolvieron en la mínima cantidad de MeOH grado HPLC y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones de tipo analítico del punto 5.5.3.3, obteniéndose los **Cromatogramas 7, 8, 9, 10 y 11**:

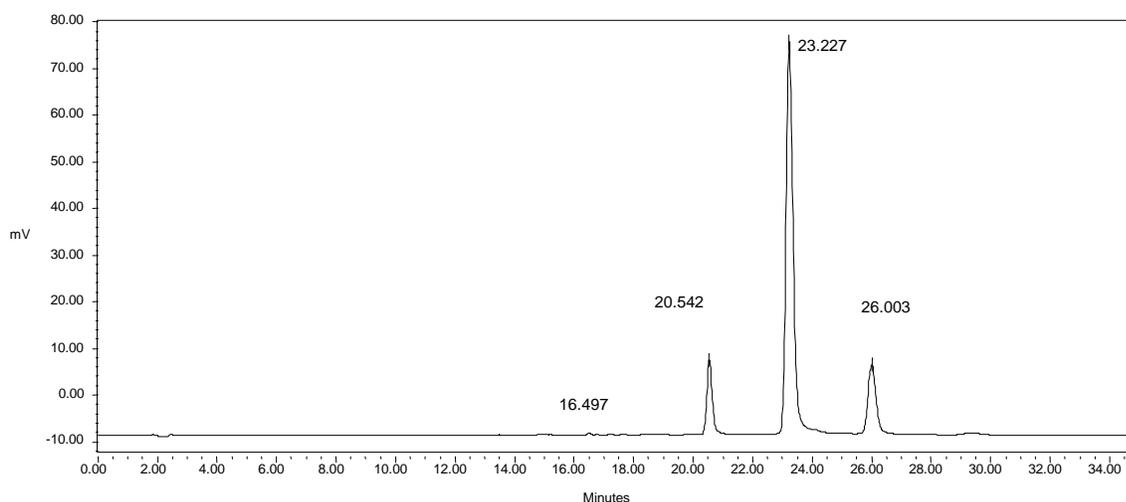


Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	-	11.325	33.30	1.28	3.36
2	-	13.347	10.28	0.39	1.71
3	-	16.323	28.42	1.09	3.22
4	-	18.293	19.01	0.73	1.90
5	6d3	20.180	1400.93	53.71	114.53
6	-	22.784	371.17	14.23	24.5
7	5e	25.353	617.81	23.69	35.75
8	-	28.305	127.22	4.88	4.53

Cromatograma 7. Fracción R1



En el **Cromatograma 7** se puede observar la presencia de 8 compuestos, 3 de ellos mayoritarios con tiempos de retención de 20.18, 22.784 y 25.353 minutos, que al compararse con los mostrados por las referencias de 5e y 6d3 (**Cromatogramas 1 y 2**), se deduce que el pico con tiempo de retención de 20.18 minutos corresponde al compuesto **2** (6d3) y el de 25.353 minutos al compuesto **3** (5e).



Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	-	16.497	3.72	0.20	0.424
2	6d3	20.542	205.11	11.10	15.95
3	-	23.227	1375.28	74.40	83.98
4	5e	26.003	264.49	14.31	14.70

Cromatograma 8. Fracción R2

En el cromatograma de R2 se puede observar la presencia de cuatro compuestos, 3 de ellos al igual que en R1 mayoritarios con tiempos de retención de 20.542 (**2**), 23.227 y 26.003 minutos (**3**).

Las fracciones R1 y R2 se juntaron por tener una composición semejante (**Cromatogramas 7 y 8**). Previo a esto, estas fracciones, por separado, se lavaron primeramente con CHCl₃ grado R.A. y posteriormente con acetona grado R.A. para de esta manera eliminar algunos otros compuestos presentes como clorofilas, pigmentos, etc. Posteriormente, en ambos casos, tanto para R1 como para R2 se separó el



sobrenadante de la parte insoluble en los dos disolventes y estos se juntaron en viales. El residuo resultante insoluble en acetona y cloroformo, se junto disolviéndolo en la mínima cantidad de metanol R.A. (R1+R2 sol. MeOH). Las 3 fracciones obtenidas se cromatografiaron mediante CCF como se muestra en la **Figura 11**.

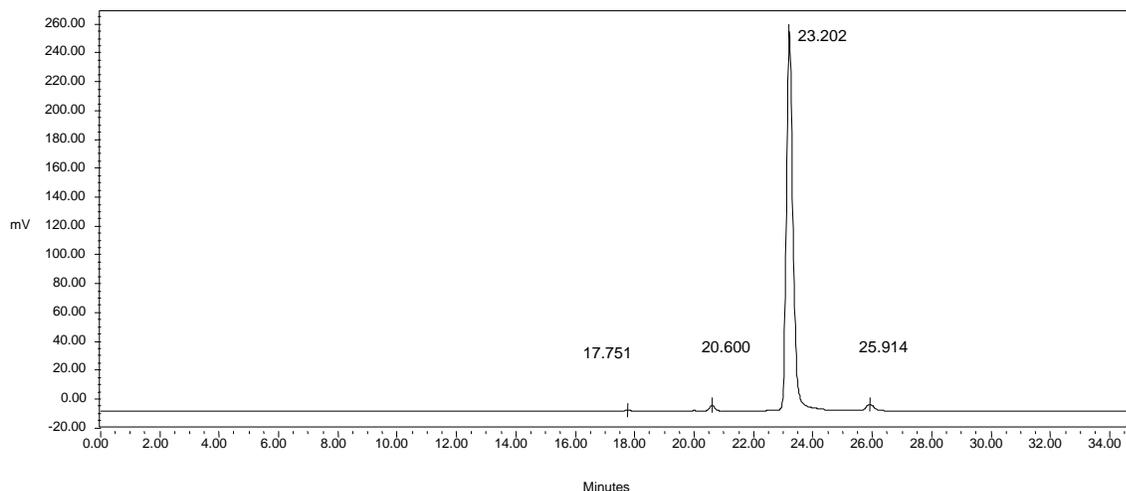


Figura 11. Cromatoplaqa de las fracciones reunidas de R1 y R2, (a) R1+R2 soluble en CHCl_3 , (b) R1+R2 soluble en MeOH, (c) R1+R2 soluble en acetona, (d) Referencia 5e = 2,3-dihidrorobustaflavona (**3**), y (e) Referencia 6d3 = Amentoflavona (**3**). Sistema de elución: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15). Revelador: Sulfato cérico amoniacal al 1% en ácido sulfúrico 2N

En la cromatoplaqa de la **Figura 11**, se observa que en la fracción de R1+R2 soluble en MeOH, se encuentran en gran cantidad los compuestos de referencia **2** (6d3) y **3** (5e), así como otros 2 compuestos que dan una coloración amarilla cuando se revelan con sulfato cérico amoniacal, a diferencia de la fracción soluble en CHCl_3 en la que sólo se observan manchas de color rojo a la luz UV, probablemente pertenecientes a clorofilas. En la fracción soluble en acetona se observa la presencia muy ligera del compuesto **3** (5e), pero la mayor parte de la muestra no se despegó del punto de aplicación en el sistema de elución empleado. El residuo de R1 y R2 soluble en metanol se filtró a través de prefiltros y se inyectó al CL, realizando la separación y



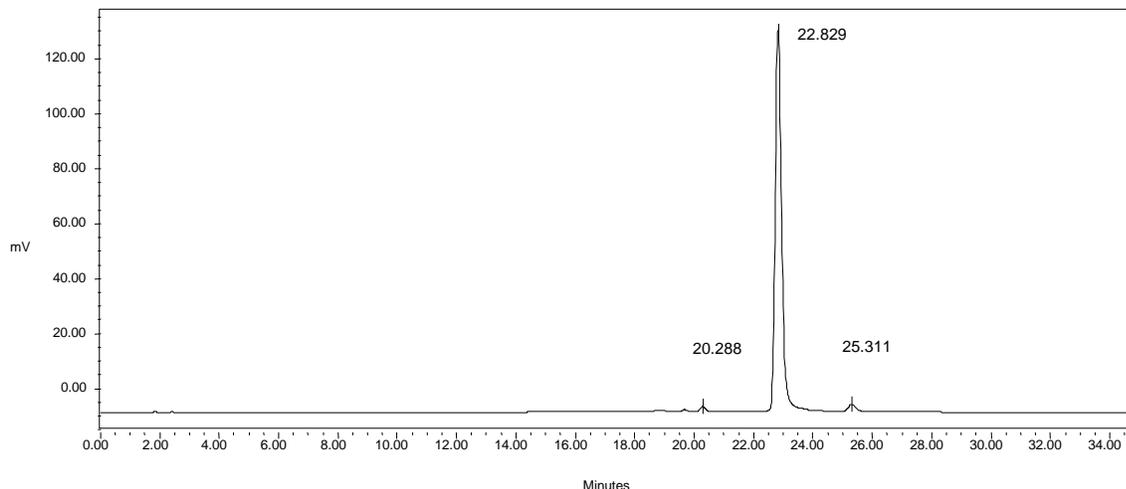
aislamiento de dos de los picos mayoritarios del cromatograma general del extracto, bajo las condiciones de tipo preparativo del punto 5.5.3.3, obteniéndose los compuestos **3** (4 mg) y **2** (5mg), cuyos cromatogramas de la purificación se muestran en el **Anexo 2**.



Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	-	17.751	6.35	0.15	0.741
2	6d3	20.600	47.68	1.14	4.01
3	-	23.202	4056.89	97.21	262.81
4	5e	25.914	62.38	1.49	4.01

Cromatograma 9. Fracción R3

En el cromatograma de la fracción R3 (**Cromatograma 9**), se observa la presencia de un pico mayoritario con tiempo de retención de 23.202 minutos, así como otros 3 en muy pequeña proporción (0.15%, 1.14% y 1.49%), con tiempos de retención de 17.751, 20.6 y 25.914 minutos respectivamente; los 2 últimos correspondientes a los compuestos **2** y **3**.



Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	6d3	20.288	22.50	1.05	1.93
2	-	22.829	2088.994	97.13	138.75
3	5e	25.311	39.25	1.82	2.47

Cromatograma 10. Fracción R4

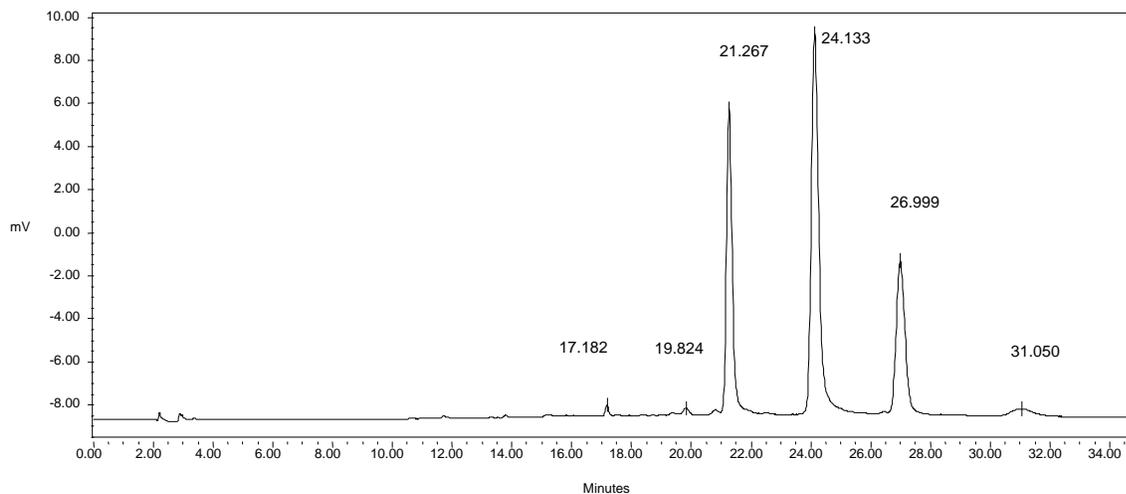
En el cromatograma de R4 (**Cromatograma 10**), al igual que en el de R3 (**Cromatograma 9**), se aprecian 3 compuestos, uno de ellos mayoritario (97.13 % de la fracción) con $t_R = 22.829$ minutos, y otros dos minoritarios (1.05 y 1.82 % de la fracción respectivamente), con tiempo de retención de 20.288 (**2**) y 25.311 minutos (**3**).

Como se puede observar, las fracciones R3 y R4 contienen en mayor proporción, al compuesto que aparece como mayoritario en el cromatograma del extracto acetónico (**Cromatograma 12**). Como se mencionó al inicio de este apartado, el aislamiento de este metabolito secundario es uno de los principales objetivos de este estudio.

En la fracción R4 se obtuvo por precipitación espontánea un sólido de color amarillo denominado R4-Pam (**1**), el cual fue separado del sobrenadante y lavado con el mismo disolvente. Se obtuvieron aproximadamente 30 mg de este compuesto.



En el **Cromatograma 11** correspondiente a la fracción R5, se observaron 6 compuestos, los cuales dieron muy poca respuesta en el CL, observándose los mismos picos que en R1, como se observa en el **Cromatograma 9**.



Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	-	17.182	3.71	0.55	0.491
2	-	19.824	3.09	0.46	0.283
3	6d3	21.267	190.17	28.31	14.08
4	-	24.133	317.51	47.26	17.62
5	5e	26.999	141.98	21.14	7.07
6	-	31.050	15.33	2.28	0.322

Cromatograma 11. Fracción R5

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta este momento, se decidió trabajar con la Fracción R4, que como se mencionó, contiene al producto mayoritario del extracto acetónico.

6.4 Identificación preliminar por CCF de los compuestos 1 (R4-Pam), 2 (6d3) y 3 (5e) aislados a partir del extracto acetónico

La identificación preliminar de los compuestos aislados se llevó a cabo por CCF. Primeramente se realizó una placa cromatográfica en capa fina de los 3 biflavonoides



aislados como prueba de identidad de los mismos (**Figura 12**). Los factores de retención se presentan en la **Tabla 7**.

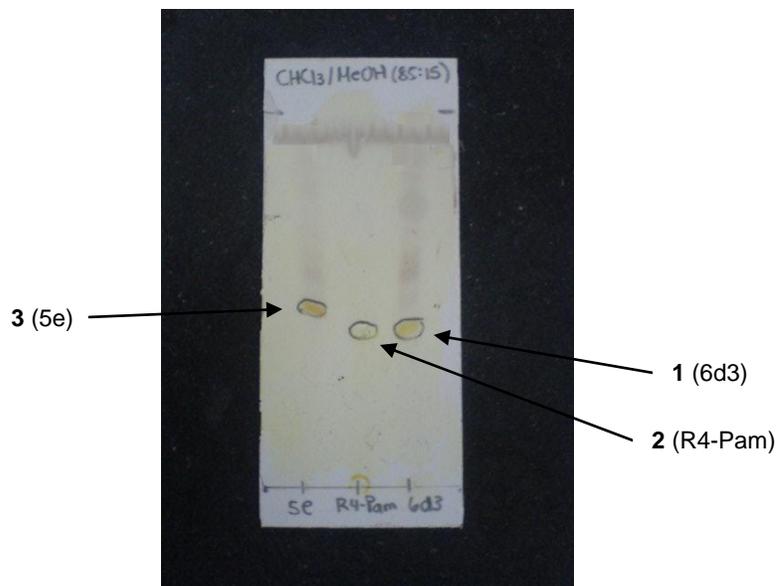


Figura 12. Cromatopla de los biflavonoides aislados y purificados. 5e = 2,3-dihidrorobustaflovona (**3**), R4-Pam= Robustaflovona (**2**) y 6d3 = Amentoflavona (**1**). Sistema de elución: CHCl₃/MeOH (85:15). Revelador: Sulfato cérico amoniacal al 1% en ácido sulfúrico 2N

Tabla 7. Factores de retención de los 3 compuestos aislados y purificados (Sistema de elución: CHCl₃/MeOH 85:15).

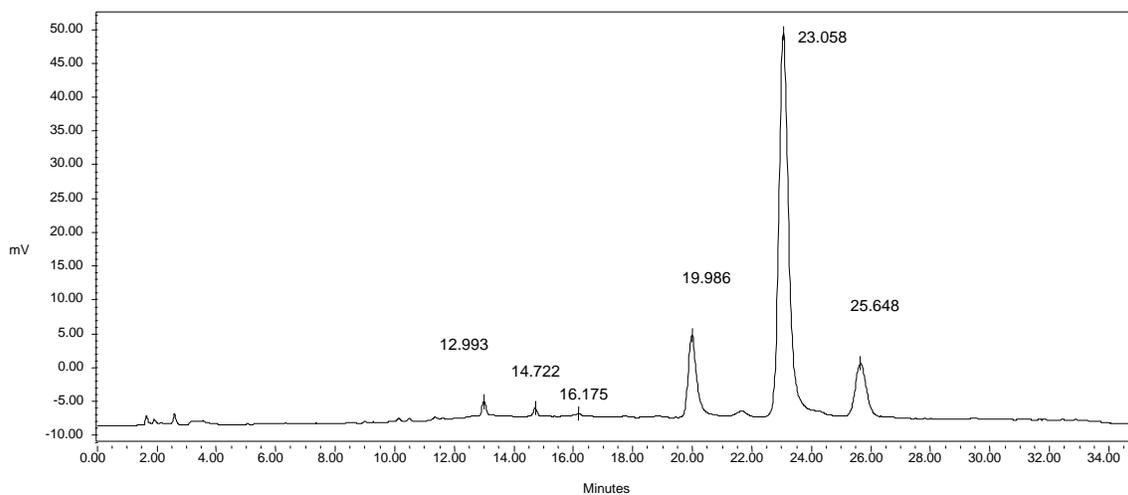
Compuesto	R _f
5e	0.46
R4-Pam	0.41
6d3	0.41

Como se puede observar en la placa cromatográfica (**Figura 12**), se visualiza la presencia de compuestos con grupos cromofóricos importantes en **1**, **2** y **3**, ya que dan señal de absorción en el espectro de ultravioleta correspondientes a dobles ligaduras conjugadas. Estos compuestos se aprecian como manchas de color amarillo cuando son reveladas con sulfato cérico amoniacal.



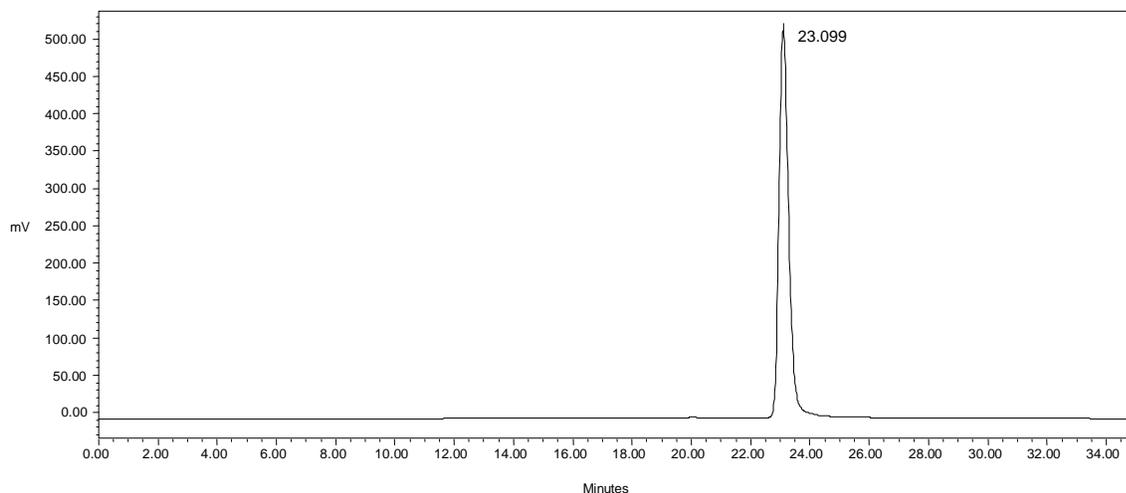
6.5 Determinación del tiempo de retención en cromatografía de líquidos del compuesto obtenido de la fracción R4 (1).

Una pequeña muestra de **1** (R4-Pam) se disolvió en acetona grado HPLC, se filtró por medio de acrodiscos e inyectó en el cromatógrafo de líquidos; independientemente, se inyectó una muestra del extracto acetónico, la cual fue preparada de la misma manera que los extractos preliminares mencionados en el punto 7.5.1; paralelamente, se realizó una coelución del compuesto **1** (R4-Pam) junto con el extracto acetónico. Las muestras se corrieron bajo las condiciones de tipo analítico del punto 5.5.3.3, cuyos cromatogramas se presentan a continuación:



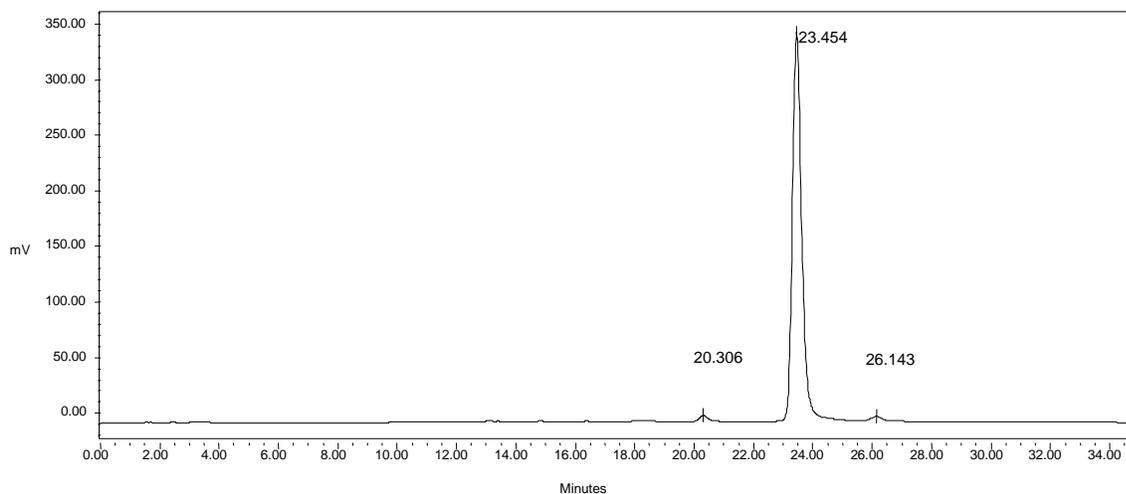
Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	-	12.993	22.68	1.26	2.10
2	-	14.722	11.18	0.62	1.20
3	-	16.175	4.68	0.26	0.342
4	6d3	19.986	233.47	12.99	12.06
5	R4-Pam	23.058	1328.02	73.90	56.72
6	5e	25.648	196.98	10.96	7.79

Cromatograma 12. Extracto acetónico (b)



Pico	Nombre	t _R (min)
1	R4-Pam	23.099

Cromatograma 13. Compuesto 1 (R4-Pam)



Pico	Nombre	t _R (min)	ABC (mV/seg)	% ABC	Altura (mV)
1	6d3	20.306	98.18	1.26	5.281
2	R4-Pam	23.454	7571.57	97.48	348.95
3	5e	26.143	97.70	1.26	3.93

Cromatograma 14. Co-elución del extracto acetónico (b) + Compuesto 1 (R4-Pam)

En el cromatograma del extracto acetónico (**Cromatograma 12**) se observa la presencia de 6 picos. Al comparar los últimos tres tiempos de retención 19.986, 23.058



y 25.648 minutos, con los de los compuestos purificados, se observa que estos picos pertenecen a los compuestos **2** (6d3), **1** R4-Pam y **3** (5e) respectivamente, los cuales son mayoritarios en todos los extractos preliminares de *S. lepidophylla*. En el **Cromatograma 14** de la coelución del compuesto **1** (R4-Pam) + extracto acetónico, el área del pico en porcentaje correspondiente a **1** aumenta de 73.90 a 97.48% (23.58%), lo cual demuestra que el compuesto **1** corresponde al pico que aparece como mayoritario en los extractos de la planta bajo las condiciones analíticas empleadas.

6.6 Identificación estructural de **1**(R4-Pam) y **2** (6d3).

El compuesto 6d3 (**2**) aislado en estudios previos (Guevara, 2008), fue identificado por métodos físicos y espectroscópicos y por comparación de los datos en la literatura como la robustaflavona ya que coincidía con las señales establecidas por algunos autores (Markham, *et al.*, 1987; Chari, *et al.*, 1977; Lin, *et al.*, 2000). En el trabajo que se presenta, se dio por hecho que el compuesto **2**, aislado nuevamente, correspondía a la robustaflavona, sin embargo, al realizar la elucidación estructural del biflavonoide **1**, compuesto correspondiente al mayoritario en el extracto, la estructura propuesta correspondía realmente a la robustaflavona, por lo que fue necesario hacer una revisión exhaustiva de los datos espectroscópicos obtenidos de ambos biflavonoides y descifrar la naturaleza estructural del compuesto 6d3 (**2**); para lo cual, se emplearon los datos físicos, cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos, mismos que se resumen en las **Tablas 8 y 9**.

Tabla 8. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **1** (R4-Pam).

p.f. descompone a >300 °C

Solubilidad: Acetona, DMSO

IR_{vmax} (KBr): 3382, 2926, 1649, 1609, 1574, 1500, 1439, 1356, 1290, 1244, 1166, 1110, 1031, 831 cm⁻¹.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) δ: 13.98 (s, -OH-5''), 13.2 (s, -OH-5), 10.8 (s, -OH), 10.36 (s, -OH), 7.95 (2H, d, *J* = 9, H-2''', 6'''), 7.89 (1H, dd. *J* = 8.5, H-6''),



7.76 (1H, d, $J = 3.5$, H-2''), 7.02 (d, $J = 8.5$, H-5'), 6.94 (2H, d, $J = 9$, H-3''',5'''), 6.8 (1H, s, H-3''), 6.76 (1H, s, H-3), 6.62 (1H, s, H-8''), 6.47 (1H, d, $J = 2$, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2$, H-6) ppm.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 181.8 (C-4), 181.7 (C-4''), 164.1 (C-7), 163.9 (C-2), 163.6 (C-2''), 162.2 (C-8''a), 161.4 (C-5), 161.19 (C-4'''), 159.6 (C-4'), 159.0 (C-5''), 157.3 (C-8a), 156.3, (C-7''), 130.8 (C-2'), 128.5 (C-2''',6'''), 127.5 (C-6'), 121.2 (C-1'''), 120.9 (C-1'), 120.8 (C-3'), 116.1 (C-5'), 116 (C-3''',5'''), 108.9 (C-6''), 103.7 (C-4a), 103.5 (C-4''a), 102.8 (C-3), 102.8 (C-3''), 98.8 (C-6), 94.0 (C-8), 93.4 (C-8'') ppm.

EM-FAB $^+$ baja resolución m/z (*rel int*) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 539 (9), 521 (2), 429 (6), 428 (11), 427 (6), 323 (6), 253 (6), 229 (10), 217 (14), 203 (23), 165 (52), 136 (28), 81 (46), 79 (100).

Tabla 9. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **2** (6d3).

p.f. descompone a 210 °C

Solubilidad: MeOH, Acetona, DMSO

IR $_{\text{vmax}}$ (KBr): 3422, 2924, 1958, 1651, 1583, 1494, 1428, 1366, 1279, 1236, 1173, 1113, 915, 833 cm^{-1} .

RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 13.12 (s, -OH-5'') 13.17 (s, -OH-5), 10.8 (s, -OH), 10.36 (s, -OH), 8.32 (1H, d, $J = 2.5$, H-2'), 7.77 (1H, dd, $J = 8.5$, H-6'), 7.70 (2H, d, $J = 9$, H-2''',6'''), 6.91 (1H, d, $J = 8.5$, H-5'), 6.64 (2H, d, $J = 9$, H-3''',5'''), 6.55 (s, H-3), 6.49 (s, H-6''), 6.28 (1H, d, $J = 2$, H-6), 6.14 (d, $J = 2$, H-8), 6.07 (s, H-6'') ppm.

RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ : 182.84 (C-4), 182.70 (C-4''), 173.99 (C-7''), 166.21 (C-2), 166.21, (C-7), 166.00 (C-4'), 163.75 (C-2''), 163.05 (C-8a), 162.3 (C-5), 161.57 (C-4'''), 158.81 (C-5''), 156.12 (C-8''a), 132.36 (C-2'), 128.87 (C-2''',6'''), 126.78 (C-6'), 125.54 (C-3'), 123.51 (C-1'''), 120.83 (C-5'), 119.22 (C-1'), 116.75 (C-3''',5'''), 108.78 (C-8''), 104.65 (C-4a) 103.40 (C-6''), 103.29 (C-3''), 102.88 (C-3), 102.87 (C-4''a), 99.90 (C-8), 94.94 (C-6) ppm.



EM-FAB⁺ baja resolución m/z (*int rel*) $[M+H]^+$: 539 (2), 506 (1), 460 (4), 444 (3), 413 (3), 391 (3), 386 (3), 329 (29), 307 (40), 289 (24), 240 (10), 192 (13), 176 (67), 154 (100), 137 (82), 136 (82), 89 (18), 65 (4).

Como se observa de los datos anteriores, las señales espectroscópicas obtenidas para el compuesto **2**, fueron similares a las mostradas por el compuesto **1** (R4-Pam), principalmente en los espectros en el IR y de RMN.

Tanto el compuesto **1** como el **2** se presentaron como sólidos no cristalinos de color amarillo. El primero resultó ser insoluble en MeOH, a diferencia del segundo y ambos resultaron ser solubles en acetona y DMSO e insolubles en cloroformo. El compuesto **1** funde a más de 300 °C y el **2** descompuso a 210 °C. Los dos compuestos (**1**) y (**2**) mostraron un ión molecular $[M+H]$ de 539 m/z por medio del espectro de masas, el cual es consistente para la fórmula molecular $C_{30}H_{18}O_{10}$.

Por otro lado, los compuestos **1** y **2** mostraron múltiples bandas de absorción coincidentes en el espectro de IR, presentando absorciones para grupos hidroxilo (3822 y 3422 cm^{-1} respectivamente) y para C-H aromáticos (2926 y 2924 cm^{-1} respectivamente). En ambos casos se observan también bandas de absorción correspondientes a un carbonilo de cetona en 1649 (**1**) y 1651 cm^{-1} (**2**). En 1574, 1500, 1439, 1356, 1290 cm^{-1} para **1** y en 1583, 1494, 1428, 1366, 1279 cm^{-1} para **2** consideradas como bandas de absorción de carbono-carbono y carbono-hidrógeno aromático. Por último, ambos presentaron bandas correspondientes a enlaces carbono-oxígeno cuyas señales se presentan en 1244, 1166, 1110 cm^{-1} para **1** y 1236, 1173, 1113 cm^{-1} para **2**.

En los espectros de RMN 1H se observan catorce señales que son características de biflavonoides al ser comparados con la literatura, las cuales se discuten con mayor detalle más adelante.

Ambos compuestos mostraron muchas similitudes en los espectros de RMN ^{13}C . Es clara la presencia de grupos carbonilo de cetona mostrando dos señales para ambos compuestos entre 181 y 183 ppm. De la misma manera entre 173 y 153 ppm se



observa la presencia de diez señales de carbono aromático cuaternario con base de oxígeno en ambos espectros; entre 131 y 116 ppm, cinco señales correspondientes a carbonos hidrogenados bencénicos que se observan en el espectro HSQC; entre 126 y 120 ppm tres señales correspondientes a carbonos cuaternarios aromáticos; en 108.7 (2) y 108.9 ppm (1) una señal correspondiente a carbono cuaternario bencénico; por último entre 105 y 94 ppm, tres señales de carbono cuaternario aromático y además, intercaladas entre ellas cuatro señales correspondientes a carbonos hidrogenados aromáticos.

Las señales mostradas por los espectros de ^1H y ^{13}C , para ambos compuestos, así como la multiplicidad de las mismas y constantes de acoplamiento (J) para el espectro de RMN protónica se resumen de manera comparativa en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 10. Tabla comparativa de los desplazamientos químicos (δ) relativos a TMS en RMN ^1H (500 MHz) del compuesto **1** ($\text{DMSO-}d_6$) y **2** (CD_3COCD_3); la multiplicidad y constantes de acoplamiento J (Hz) se encuentran entre paréntesis; Multiplicidad: (s) singulete, (d) doblete, (dd) doble de dobles.

RMN ^1H δ (ppm)			
Protón (H)	1	Protón (H)	2
3	6.76 (s)	3	6.55 (s)
6	6.18 (d, $J=2$)	6	6.28 (d, $J=2$)
8	6.47 (d, $J=2$)	8	6.14 (d, $J=2$)
2'	7.76 (d, $J=3.5$)	2'	8.32 (d, $J=2.5$)
5'	7.02 (d, $J=8.5$)	5'	6.91 (d, $J=8.5$)
6'	7.89 (dd, $J=8.5$)	6'	7.77 (dd, $J=8.5$)
3''	6.8 (s)	3''	6.49 (s)
6''	-	6''	6.07 (s)
8''	6.62 (s)	8''	-
2''', 6'''	7.95 (d, $J=9$)	2''', 6'''	7.70 (d, $J=9$)
3''', 5'''	6.94 (d, $J=9$)	3''', 5'''	6.64 (d, $J=9$)
-OH	10.36	-OH	10.36



-OH	10.8	-OH	10.8
-OH-5	13.2	-OH-5	13.17
-OH-5''	13.98	-OH-5''	13.12

Tabla 11. Tabla comparativa de los desplazamientos químicos (δ) relativa a TMS de RMN ^{13}C (125 MHz) del compuestos **1** (DMSO- d_6) y **2** (CD_3COCD_3), basadas en los espectros HSQC, COSY, NOESY y HMBC

RMN ^{13}C					
C	δ (ppm)		C	δ (ppm)	
	1	2		1	2
2	163.9	166.21	6'	127.5	126.78
3	102.8	102.88	2''	163.6	163.75
4	181.8	182.84	3''	102.8	103.29
5	161.4	162.3	4''	181.7	182.70
6	98.8	94.94	5''	159.0	158.81
7	164.1	166.21	6''	108.9	103.40
8	94.0	99.90	7''	156.3	173.99
8a	157.3	163.05	8''	93.4	108.78
4a	103.7	104.65	8''a	162.2	156.12
1'	120.9	119.22	4''a	103.5	102.87
2'	130.8	132.36	1'''	121.2	123.51
3'	120.8	125.54	2''',6'''	128.5	128.87
4'	159.6	166.00	3''',5'''	116	116.75
5'	116.1	120.83	4'''	161.1	161.57

En las **Figuras 13** y **14**, se muestran comparativamente los espectros de RMN- ^1H de los compuestos **1** y **2**, realizados en el mismo disolvente (DMSO- d_6). Como se aprecia, contienen los mismos sistemas de señales en tres anillos bencénicos: H-ABX, H-A $_2$ X $_2$, dos pares de dobletes para hidrógenos dispuestos en posición meta entre sí (H-*meta*) y 3 singuletes (s_1 , s_2 y s_3).

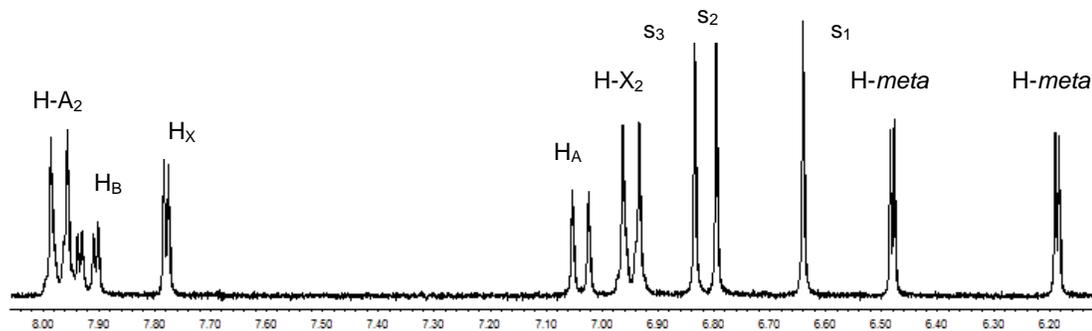


Figura 13. Espectro de RMN ^1H del compuesto 1 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

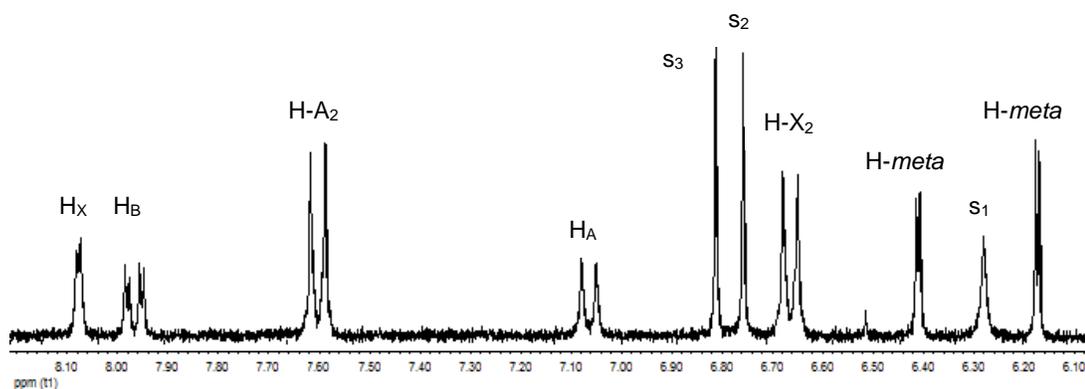


Figura 14. Espectro de RMN ^1H del compuesto 2 (DMSO- d_6 , 300 MHz)

El sistema ABX se aprecia invertido en ambos casos, así como el desplazamiento de los singuletes con respecto al par de dobletes y por otra parte, una de las ramas del sistema A_2X_2 , se encuentra a campo mucho más bajo (**Figura 13**) con respecto al del otro compuesto (**Figura 14**). El espectro de ^{13}C muestra en 108 ppm para cada compuesto una señal, que según algunos autores define específicamente la posición del enlace interflavonóidico entre C-3' (I)-C-6'' (II) para biflavonoides de la serie de la robustaflavona (Markham, *et al.*, 1987; Lin, *et al.*, 2000). Se ha reportado la estructura de la amentoflavona por algunos investigadores (Castañeda, 1991), recientemente, otros describieron espectroscópicamente a la molécula de manera diferente a las antes descritas, y con diferencias entre sí, en donde Svenningsen (2006) asienta el desplazamiento químico del carbono del enlace inter-flavonoide en 102.5



ppm y He (2008) en 106.27 ppm. Los datos espectroscópicos que más se parecían a los encontrados por nosotros para el compuesto **2**, correspondieron a lo reportado por He (2008).

De acuerdo a los datos mostrados hasta este momento, los dos compuestos debían ser isómeros de posición, sin embargo no cabía la posibilidad de contemplar ningún arreglo estructural que soportara las señales mostradas por algún isómero diferente a las serie de robusta (Figura 15) y amentoflavona (Figura 16).

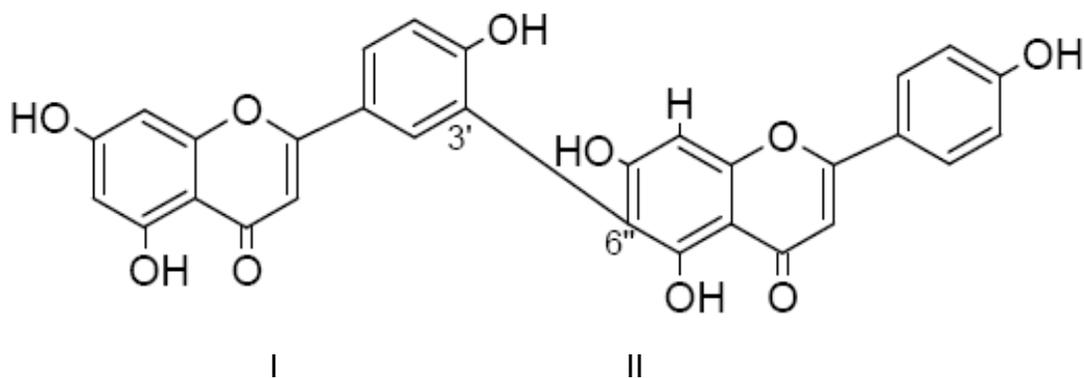


Figura 15. Estructura tipo, de la serie de robustaflavona

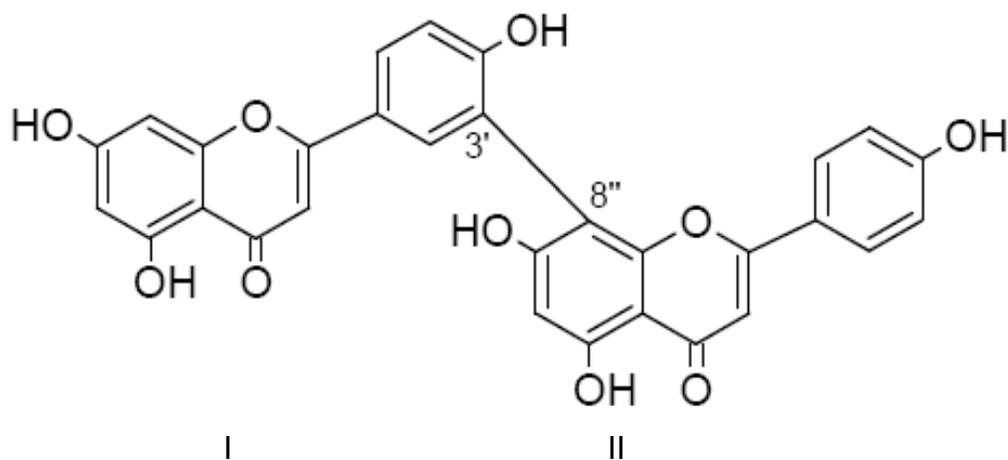


Figura 16. Estructura tipo, de la serie de amentoflavona



6.7 Elucidación estructural de Robustaflavona (1) y corrección a la estructura propuesta previamente para 2 (6d3)

Para hacer la elucidación estructural correcta de los compuestos **1** y **2** se analizaron los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C para ambos compuestos, en sus modalidades COSY, NOESY y HMBC.

En el espectro de RMN ^{13}C de (**1**) y (**2**) los dos grupos carbonilo a $\delta_{13\text{-C}}$ de 181.7 y 181.8 ppm para **1** (C-4 y C-4''), y en 182.84 y 184.70 ppm para el compuesto **2**, asignados a los carbonos cuaternarios C-4 y C4''.

En el espectro de RMN ^1H , el sistema acoplado ABX bencénico trisustituido, se asignó del siguiente modo, las señales a δ_{H} 7.89 (dd, $J= 8.5$ y 2.5 Hz) para **H_B**, 7.76 (d, $J= 2.5$ Hz) para **H_X** y 7.02 (d, $J= 8.5$ Hz) para **H_A**, (**1**), como se comprueba por las constantes de acoplamiento respectivas. En el compuesto **2**, el mismo sistema se asignó en δ_{H} 8.31 (d, $J= 2.5$ Hz) para **H_X**, acoplado con la señal doble de dobles a δ_{H} 6.91 (d, $J= 2.5$ y 8.5 Hz), para **H_A**, y esta a su vez acoplada al doblete perteneciente al **H_B** que se encuentra a δ_{H} 7.77 (d, $J= 8.5$). Asimismo, este sistema se corroboró por las correlaciones encontradas en el espectro COSY de ambos compuestos (**Figuras 17 y 18**).

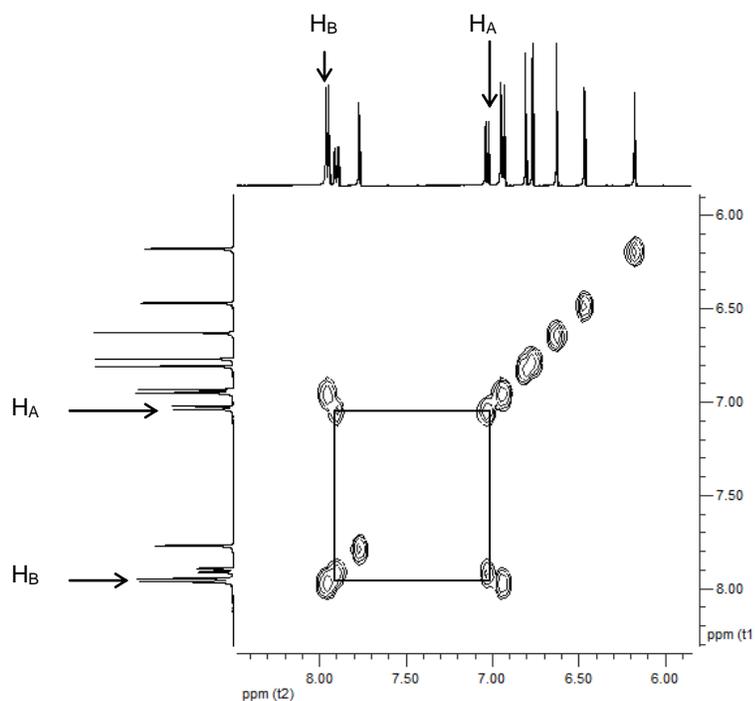


Figura 17. Espectro COSY del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX)

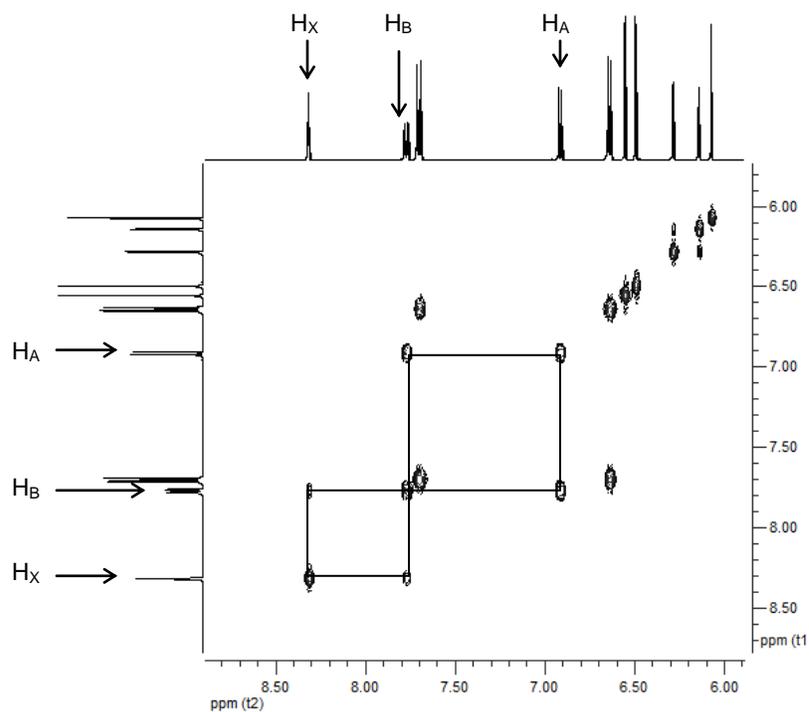


Figura 18. Espectro COSY del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX)



La diferencia espectral entre ambos compuestos (**1** y **2**), radica en que la señal perteneciente al H_x (H-2') en 8.31 ppm para **2**, se encuentra desplazada hacia campo más bajo y por lo tanto, colindando con grupos más congestionados electrónicamente. Por lo que respecta al experimento NOESY (**Figura 19**), se observa el mismo tipo de correlaciones en el espacio: en (**1**), el singulete en 6.76 ppm, asignado al H-3 del esqueleto I, tiene correlación con el doblete en 7.76 (d, $J= 2.5$) asignado al hidrógeno H_x (H-2') y con el doble de dobles en 7.89 (dd, $J= 8.5$ y $J= 2.5$) para H-6' (H_B). Para el compuesto (**2**), el experimento NOESY (**Figura 20**), muestra que el singulete asignado al H-3 en 6.55 ppm, tiene correlación con la señal en 6.55 ppm asignada a H-2' (H_x) y con el doble de dobles en 7.77 ppm a H-6' (H_B). Las correlaciones para ambos compuestos en el espectro NOESY se ilustran en la **Figura 21**.

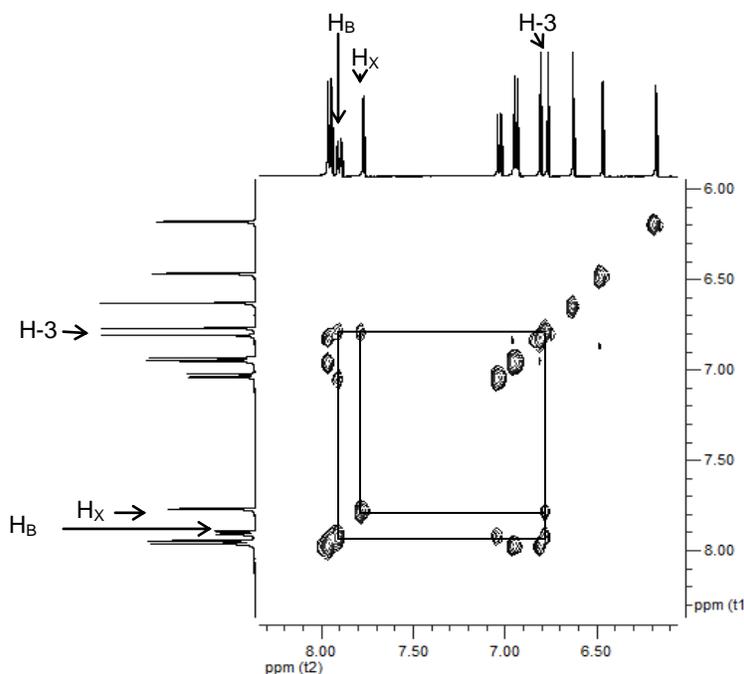


Figura 19. Espectro NOESY del compuesto **1** (Correlaciones correspondientes al sistema ABX)

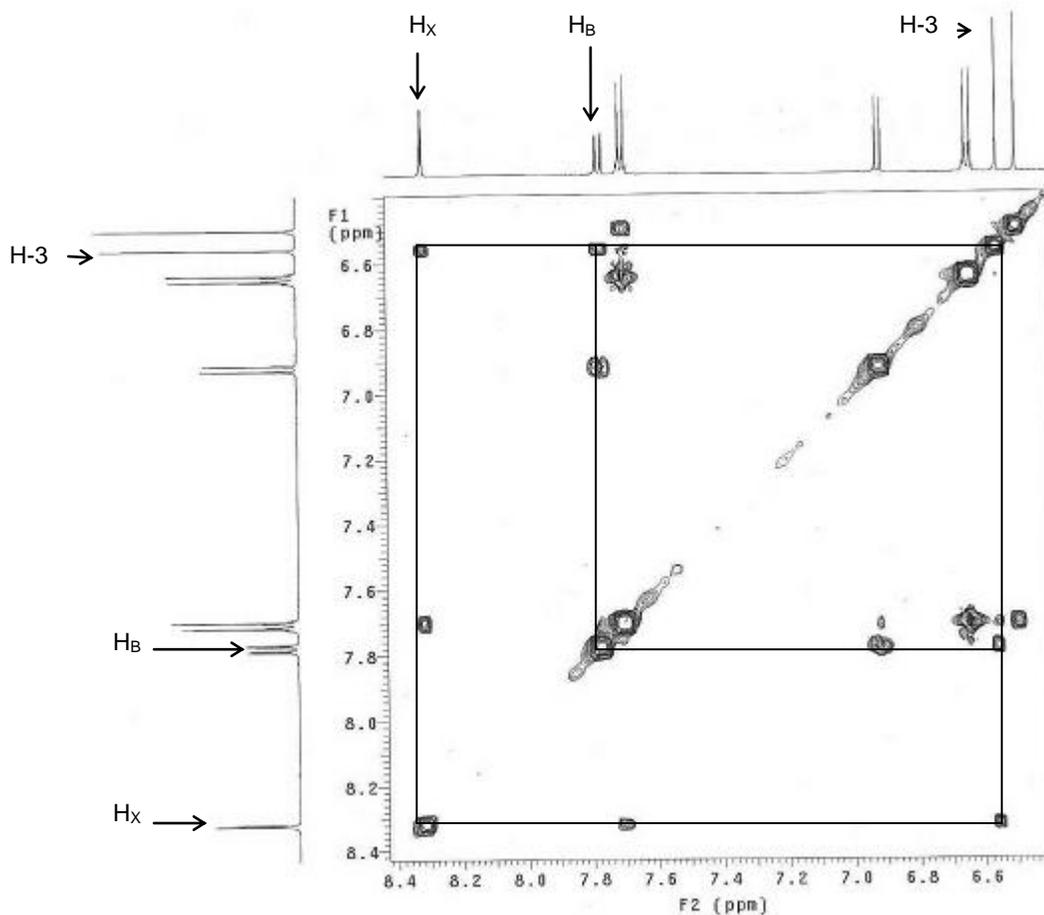


Figura 20. Espectro NOESY del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema ABX)

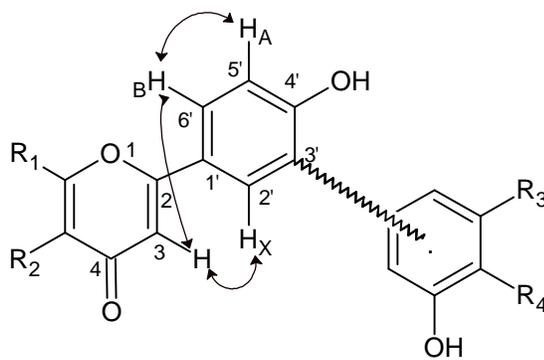


Figura 21. Correlaciones parciales en el espectro NOESY de 1 y 2, correspondientes al sistema H-ABX



Para discernir la posición del puente inter-flavonoide en ambos compuestos se recurrió al análisis de los espectros HMBC. Para el compuesto **1**, se observa una correlación del doblete en 7.02 ppm asignado al H-5' (H_A) con el C-3' (120.8 ppm) perteneciente al anillo B del esqueleto I; por su parte, el C-6'' (108.9 ppm) perteneciente al anillo A del esqueleto II correlaciona con el doblete en 7.76 asignado a H-2' (H_X) y el singulete en 6.62 ppm asignado a H-8'' (**Figura 22**) Además, la señal asignada al OH-5'' (δ_H 13.12) que se encuentra desplazada hacia campo más bajo, correlaciona con este mismo carbono (C-6'') (**Figura 23**), lo cual confirma que ocurre el enlace C3' (I)-C6'' (II) entre los flavonoides monoméricos. Para el compuesto **2**, la señal asignada al C-8'' del esqueleto II (108.78 ppm), mostró correlación con los hidrógenos correspondientes al sistema ABX H-2' (H_X) y H-5' (H_A) y con el singulete asignado a H-6'' en 6.07 ppm; por su parte, el C-3' del esqueleto I (125.4 ppm) correlaciona con el protón asignado a H-5' (H_A) (**Figura 24**), Además de la correlación entre el OH-5 y los carbonos cuaternarios asignados a C-5 y C-4a (**Figura 25**). Esto confirma que ocurre el enlace C3' (I)-C8'' (II) en la molécula. Las correlaciones en los espectros NOESY se ilustran en las **Figuras 26 y 27**.

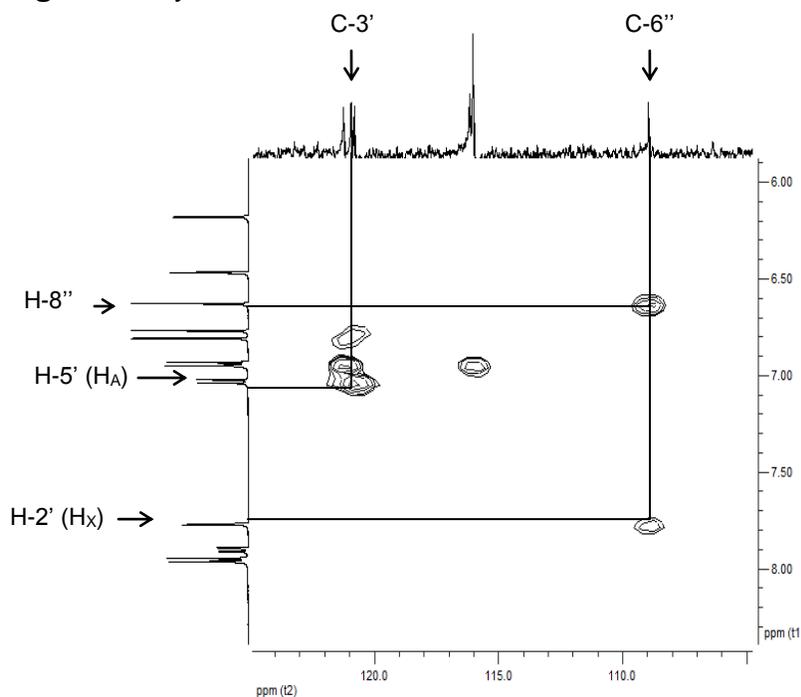


Figura 22. Espectro HMBC del compuesto **1** (Correlaciones correspondientes al enlace inter-flavonoide)

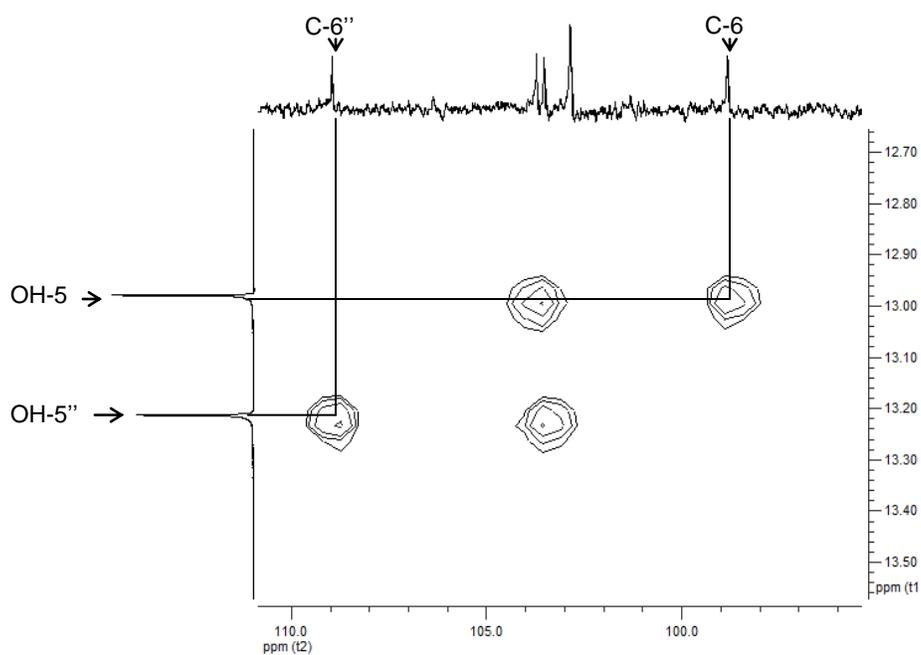


Figura 23. Espectro HMBC del compuesto 1. Correlación OH-5'/H-6'' y OH-5/H-6

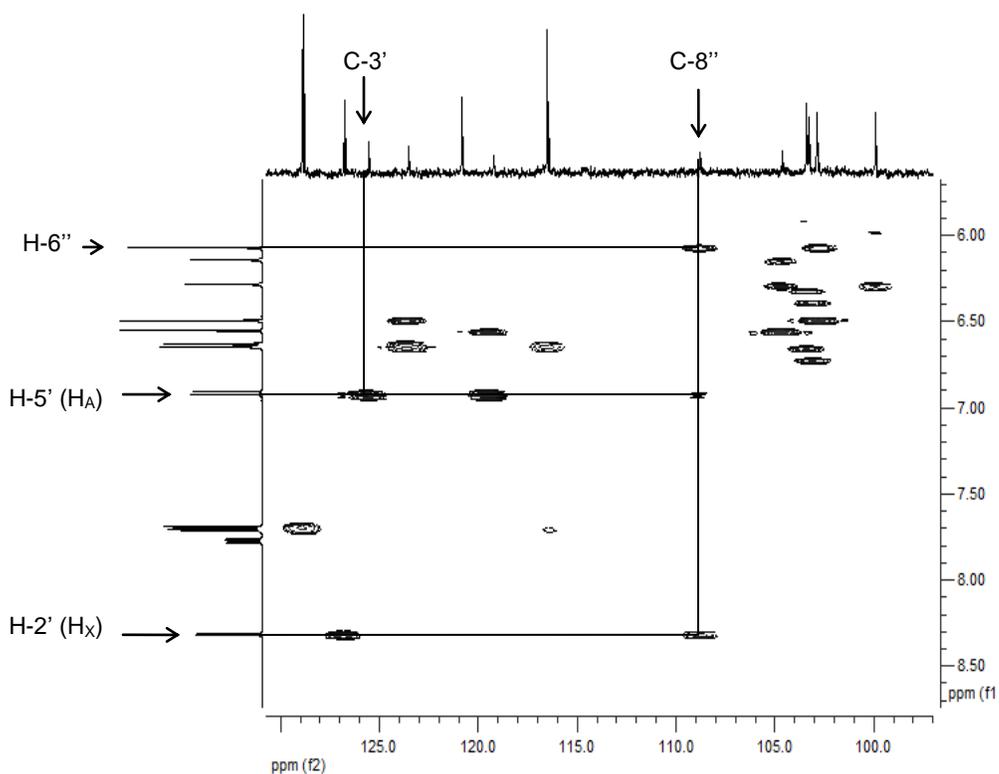


Figura 24. Espectro HMBC del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al enlace inter-flavonoide)

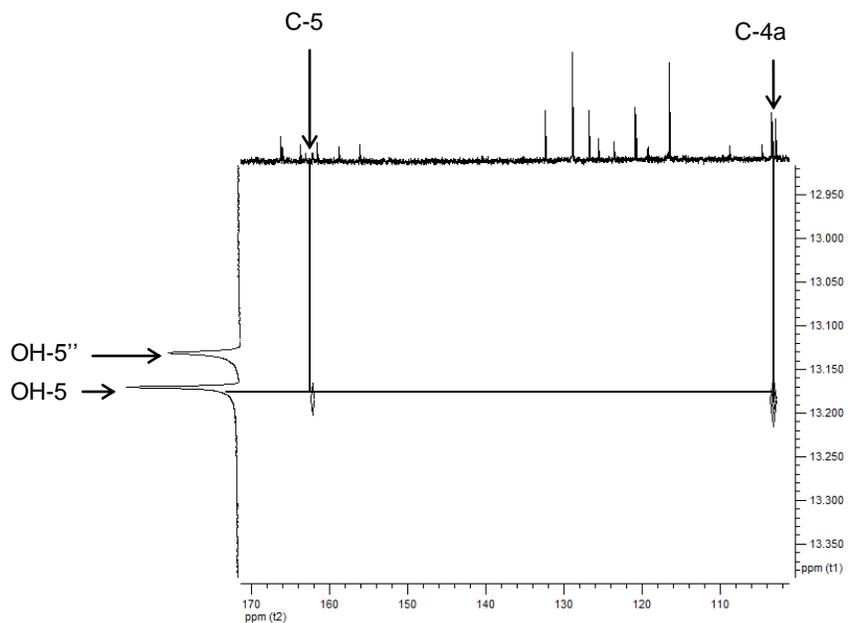


Figura 25. Espectro HMBC del compuesto 2. Correlación OH-5/C-4a y OH-5/C-5

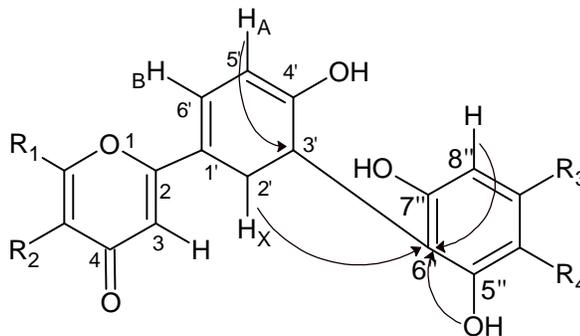


Figura 26. Correlaciones parciales en el espectro HMBC de 1, correspondientes al enlace inter-flavonoide

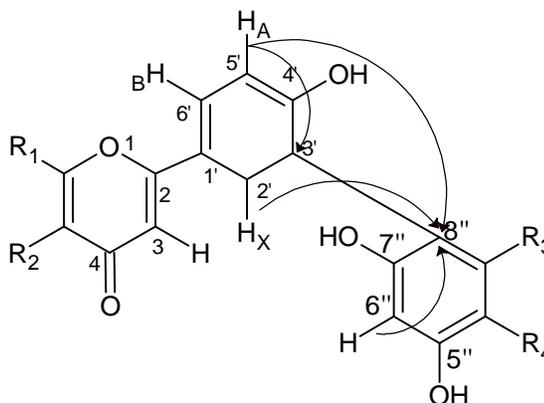


Figura 27. Correlaciones parciales en el espectro HMBC de 2, correspondientes al enlace inter-flavonoide.



Hasta este momento se puede asegurar que los dos biflavonoides (**1** y **2**) pertenecen a series diferentes siendo éstas la robustaflavona (**1**) y amentoflavona (**2**), por lo que la estructura originalmente propuesta en el trabajo de Guevara (2008) realmente corresponde a la amentoflavona.

Por otra parte, los dos pares de dobletes, los cuales se relacionaron a hidrógenos acoplados en posición *meta*, mostrada en los espectros de RMN ^1H de **1** y **2**, fueron asignados a los protones H-6 y H-8 presentes en el anillo A del esqueleto I. Para el compuesto **1** en δ_{H} 6.18 ppm (d, $J= 2\text{Hz}$) y 6.47 ppm (d, $J= 2\text{Hz}$) y para **2** en δ_{H} 6.28 (d, $J= 2\text{ Hz}$) y 6.14 (d, $J= 2\text{ Hz}$) respectivamente. El espectro HMBC, fue útil para la asignación de dichos hidrógenos; en el caso de **1** (**Figura 28**), se observa que el protón asignado como H-6 en δ_{H} 6.18 ppm (d, $J= 2\text{ Hz}$) correlaciona con el C-8 (94 ppm); por su parte, el asignado a H-8 en δ_{H} 6.47 ppm (d, $J= 2\text{Hz}$) correlaciona con el carbono C-6 (98.8 ppm); además, ambos hidrógenos (H-6 y H-8) correlacionan con el carbono cuaternario C-4a (103.7 ppm). En el caso de **2**, el H-6 (δ_{H} 6.28 ppm) correlaciona con el C-8 (99.90 ppm), y por su parte el H-8 (δ_{H} 6.14 ppm) correlaciona con el carbono C-6 (94.94 ppm), y ambos (H-6 y H-8), correlacionan con el carbono cuaternario asignado a C-4a (104.6 ppm) (**Figura 29**). Las correlaciones mostradas en el espectro HMBC para el sistema acoplado en posición *meta* de ambos compuestos se ilustran en la **Figura 30**.

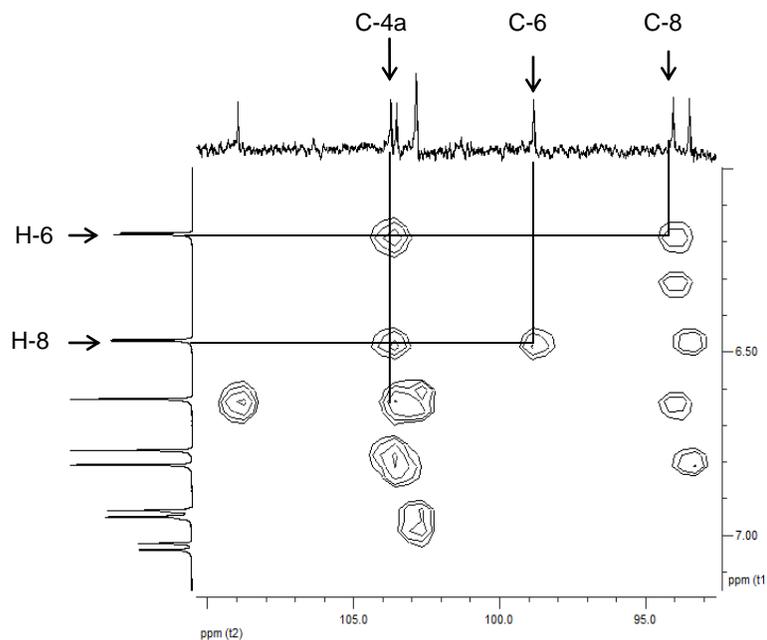


Figura 28. Espectro HMBC del compuesto 1 (Correlaciones correspondientes al sistema acoplado de hidrógenos en posición *meta*)

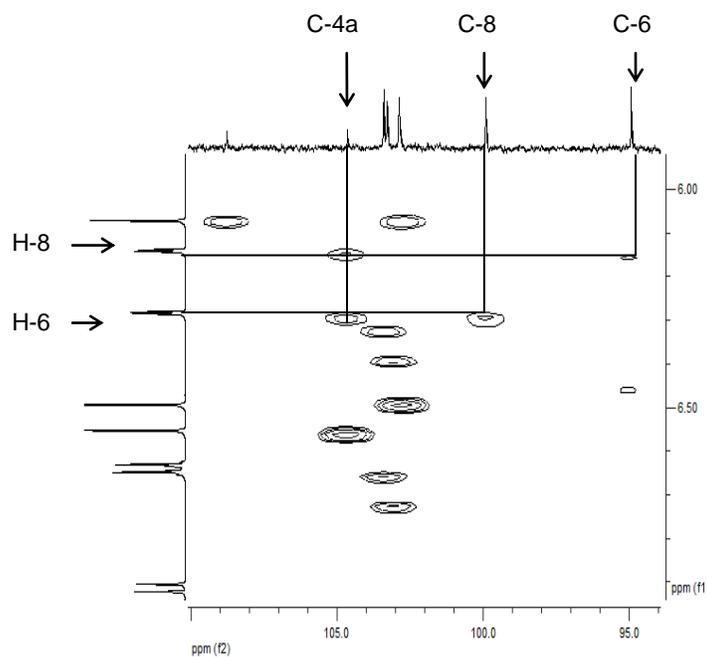


Figura 29. Espectro HMBC del compuesto 2 (Correlaciones correspondientes al sistema de hidrógenos acoplados en posición *meta*)

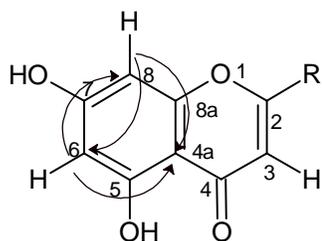


Figura 30. Correlaciones parciales en el espectro HMBC de **1** y **2**, correspondientes al sistema de hidrógenos acoplados en posición *meta*.

Por otra parte, resulta evidente la presencia de un sistema acoplado A_2X_2 en el anillo B del esqueleto II en **1** y **2**. Este sistema se confirmó mediante el experimento NOESY de ambos compuestos (**Figuras 31** y **32**). Las correlaciones de este sistema se ilustran en la **Figura 33**.

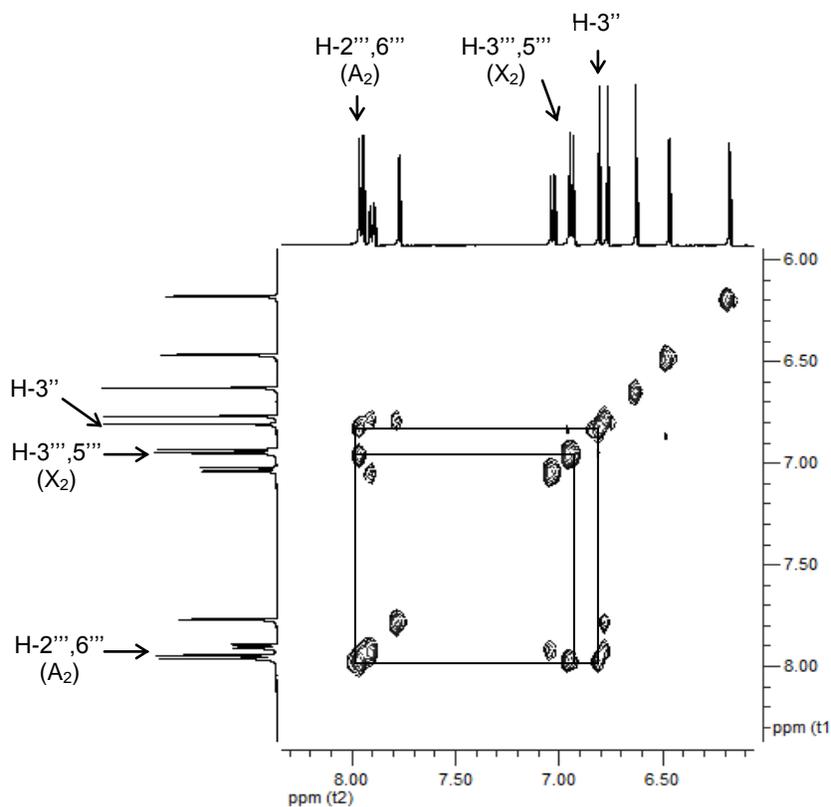


Figura 31. Espectro NOESY del compuesto **1** (Correlaciones del sistema A_2X_2)

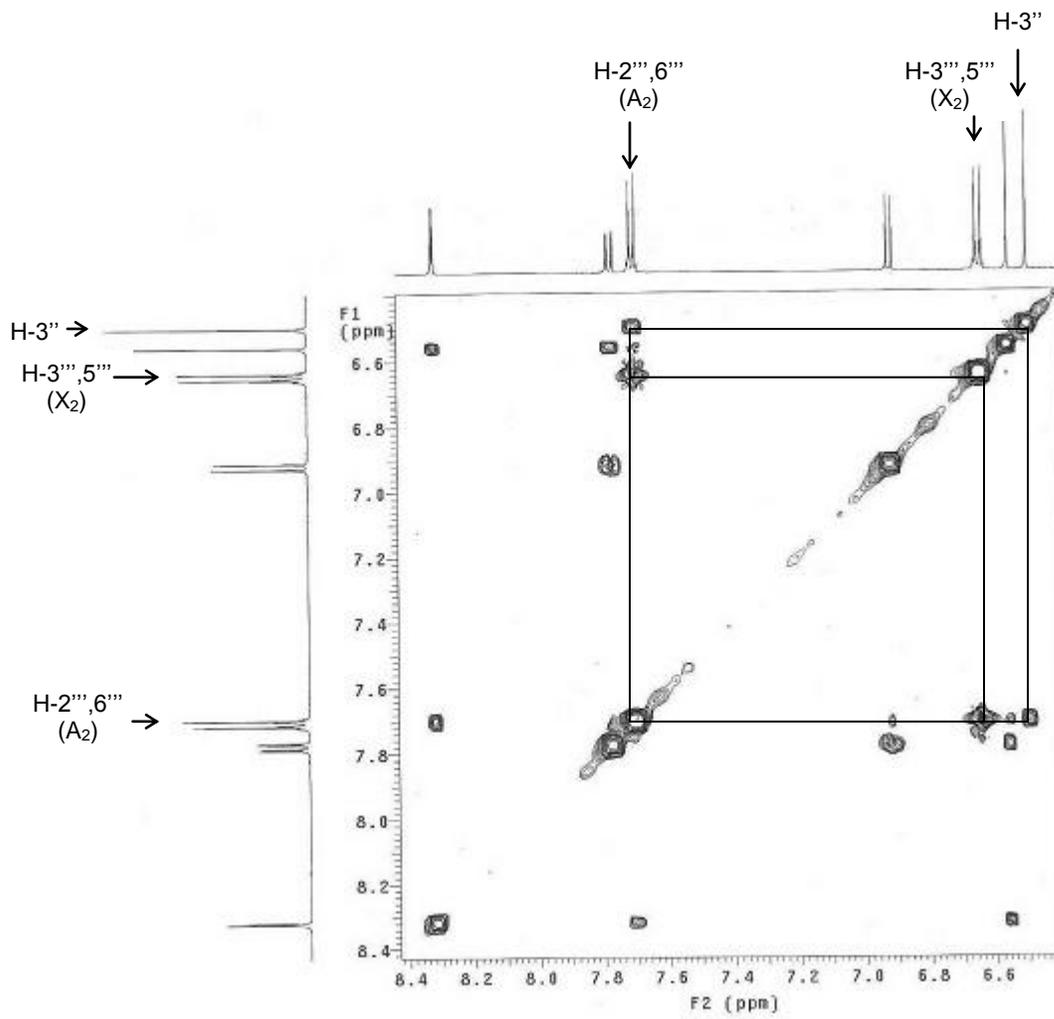


Figura 32. Espectro NOESY del compuesto 2 (Correlaciones del sistema A₂X₂)

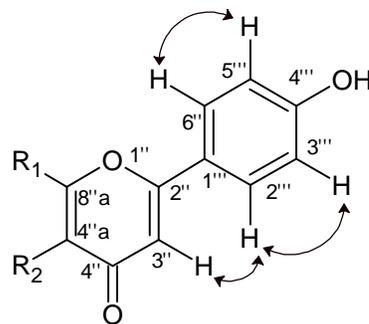


Figura 33. Correlaciones parciales en el espectro NOESY del compuesto 1 y 2 correspondientes al sistema A₂X₂



Se observan 3 singuletes en ambos espectros de RMN ^1H . Dos de estos se asignaron a los hidrógenos H-3 (**Figura 19 y 20**) y H-3'' en los dos compuestos, recurriéndose al espectro NOESY (**Figuras 31 y 32**). La posición del singulete restante se definió por la correlación espectral que existe entre dicha señal con el carbono respectivo perteneciente al puente inter-flavonoide determinada mediante sus espectros de HMBC en los compuestos **1 y 2**.

Por último, las señales en δ_{H} 13.2 y 13.98 ppm para el compuesto **1**, y en 13.17 y 13.12 ppm para el compuesto **2**, se asignaron a los protones OH-5 y OH-5'' correspondientemente. Estos se encuentran desplazados hacia campo más bajo, debido a que se encuentran quelatados por el oxígeno perteneciente a su grupo carbonilo vecino (C-4 y C-4''). La asignación de estas señales se realizó mediante el espectro HMBC (**Figuras 23 y 25**).

Es importante hacer notar que el espectro NOESY de **2** se observa una correlación entre los hidrógenos H-2''',6''' del sistema acoplado A_2X_2 con el hidrógeno asignado a H-2' (H_x) (**Figura 34**), la cual no se observa en el espectro NOESY del compuesto **1**. Esta correlación se puede explicar gracias al giro de la molécula, por medio del cual adopta una conformación tal en su estado de mínima energía, que en algún momento, dichos protones quedan vecinos en el espacio, por lo que ocurre una interacción de tipo NOESY, la cual se manifiesta en el espectro correspondiente del compuesto **1** y no en el de **2**. Las estructuras en su estado de energía más bajo se calcularon mediante el programa Chem Draw 3D, las cuales se presentan en las **Figuras 35 y 36**.

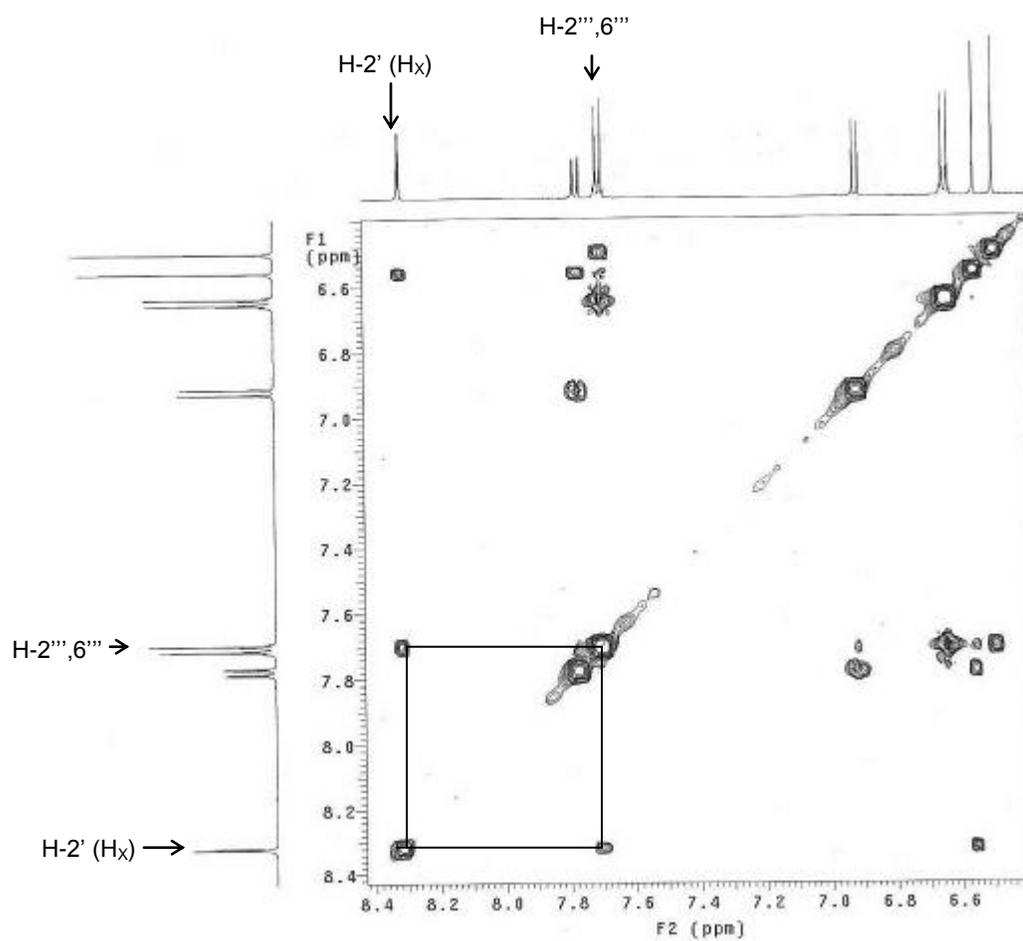


Figura 34. Espectro NOESY del compuesto 2. Correlación H-2''',6'''/H-2' (H_x)

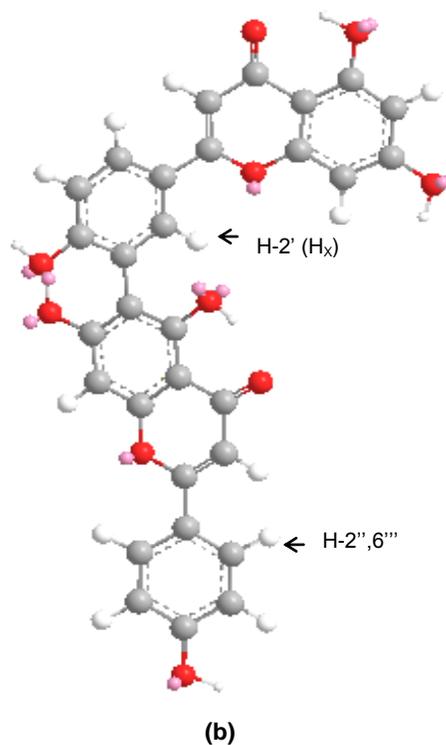


Figura 35. Estructura del compuesto 1 en su estado de mínima energía (a); Estructura tridimensional del compuesto 1 en su estado de mínima energía (b).

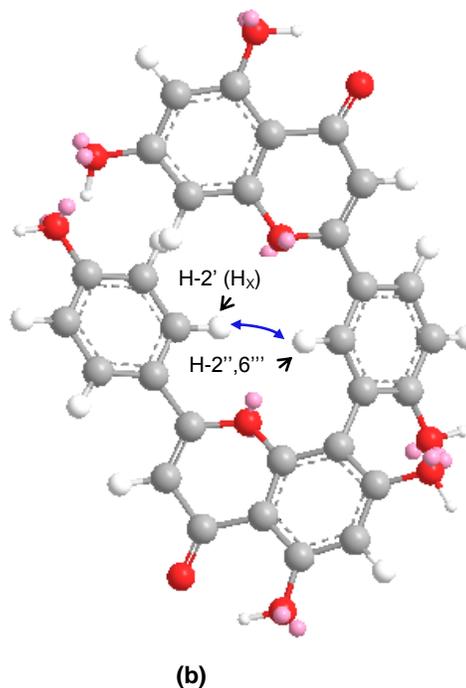


Figura 36. Estructura del compuesto 2 en su estado de mínima energía (a); Estructura tridimensional del compuesto 2 en su estado de mínima energía (b).



En suma, integrando todos los resultados espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para los compuestos **1** y **2**, se pudo identificar a **1** como robustaflavona, y a **2** como amentoflavona. Las estructuras químicas de ambos compuestos se presentan en las **Figuras 37** y **38**.

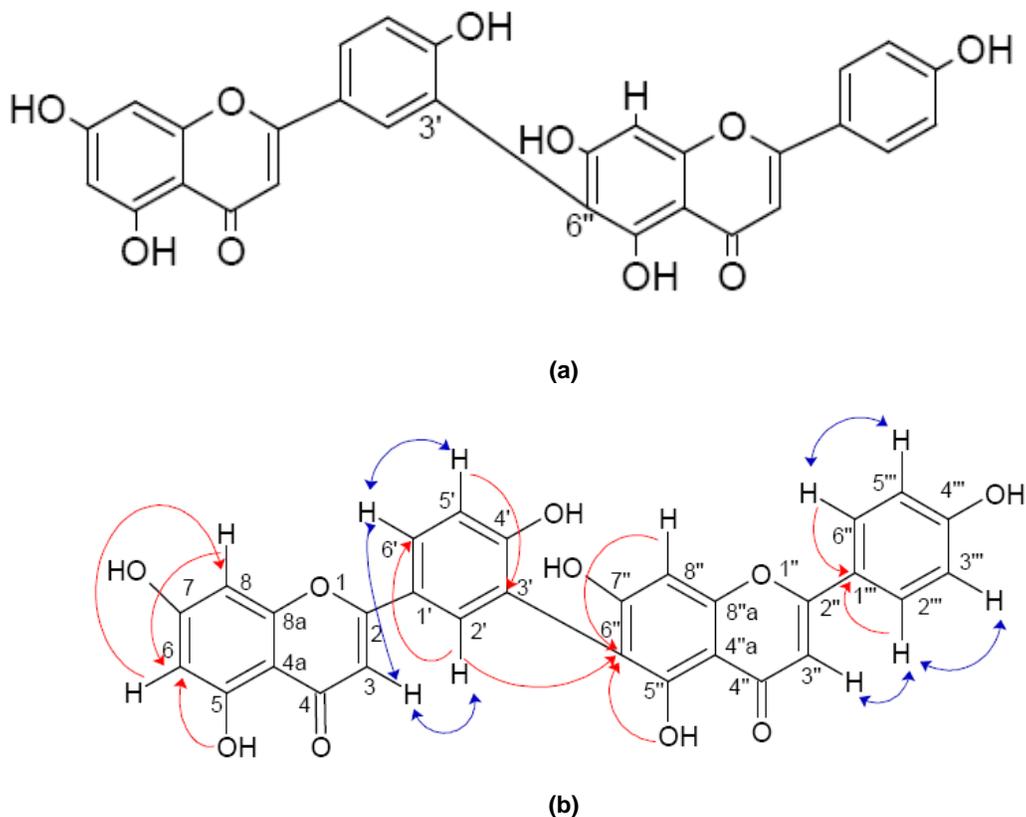


Figura 37. Estructura del compuesto **1** identificado como Robustaflavona(a); correlaciones más importantes observadas en los espectros de RMN de HMBC (→) y NOESY (↔) para el compuesto **1** (b).

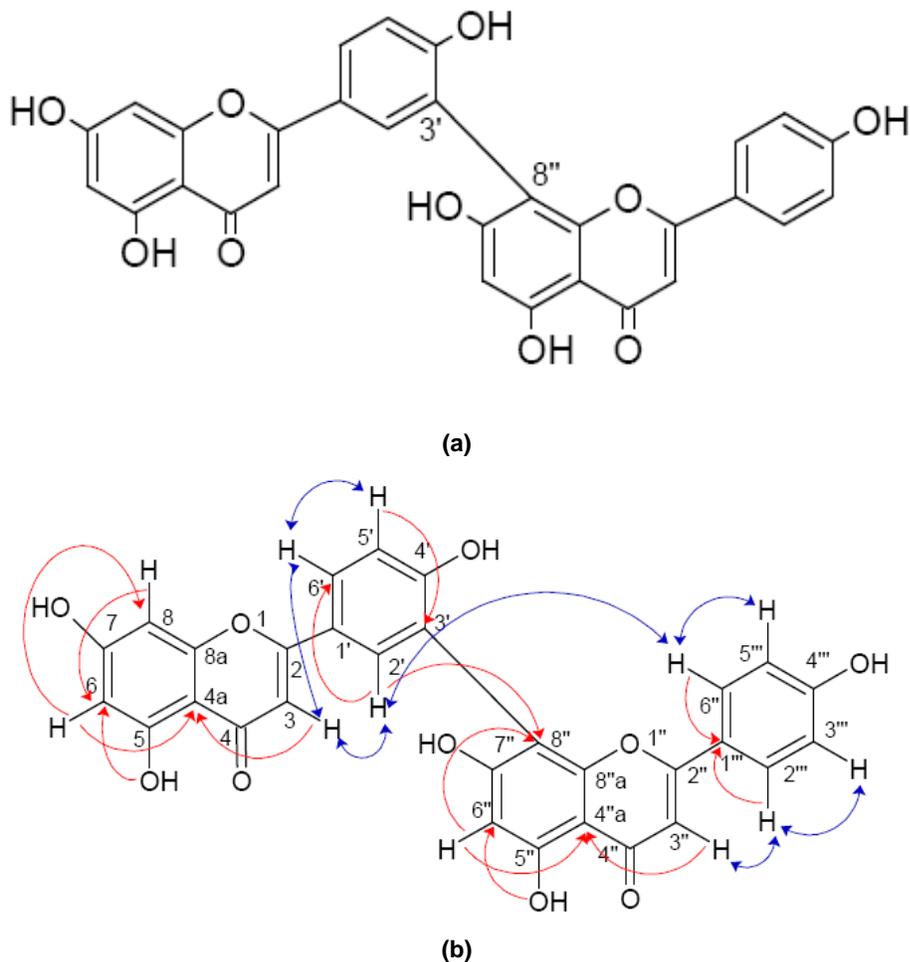


Figura 38. Estructura del compuesto **2**, identificado como Amentoflavona **(a)**. Correlaciones más importantes observadas en los espectros de RMN de HMBC (\rightarrow) y NOESY (\leftrightarrow) para el compuesto **2** **(b)**.

6.8 Aislamiento del compuesto f_0 , a partir de la Fracción F12

La fracción F12 (1.3 g) se disolvió en la cantidad mínima de MeOH grado HPLC. Después se inyectó la muestra en el cromatógrafo de líquidos, previamente filtrada, con el fin de aislar los picos mayoritarios presentes, utilizando las condiciones de tipo preparativo mostradas en el punto 5.5.3.3. Los cromatogramas de la purificación se presentan en el **Anexo 3**.

Las fracciones correspondientes a los picos con tiempos de retención promedio de 14.7, 16.4, 19.9, 23.5 y 25.4 minutos se colectaron independientemente, nombrándose respectivamente como F_0 , F_1 , F_2 , F_3 y F_4 . Posteriormente, cada una se



evaporó en rotaevaporador utilizando una bomba de alto vacío para eliminar la mezcla de agua + ácido acético- acetonitrilo concentrándose hasta sequedad.

De esta manera, se obtuvo el compuesto **4** (5mg), a partir de la fracción F_0 , el cual coincidió espectroscópicamente con el reportado (Aguilar, 2008) y aislado (6b2c) por Guevara (2008). Así, el compuesto **4**, fue identificado como 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona, cuya estructura se presenta en la (**Figura 39**).

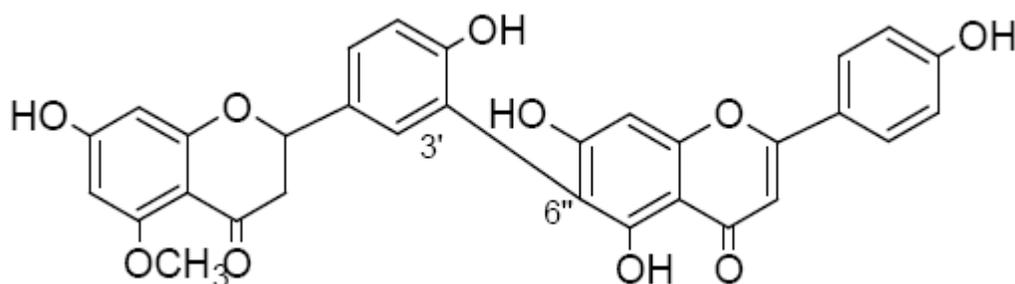
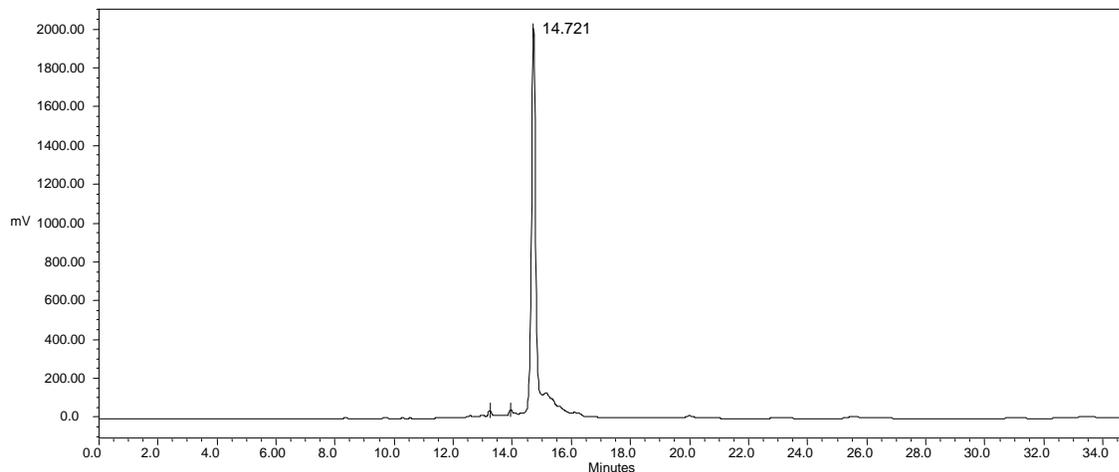


Figura 39. Estructura química del compuesto **4** (f_0), identificado como 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona

6.9 Determinación del tiempo de retención del compuesto **4** (f_0) por Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

Una pequeña cantidad de la fracción F_0 , se disolvió en acetona grado HPLC y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos utilizando las condiciones de tipo analítico (punto 5.5.3.3), obteniéndose el **Cromatograma 15**.



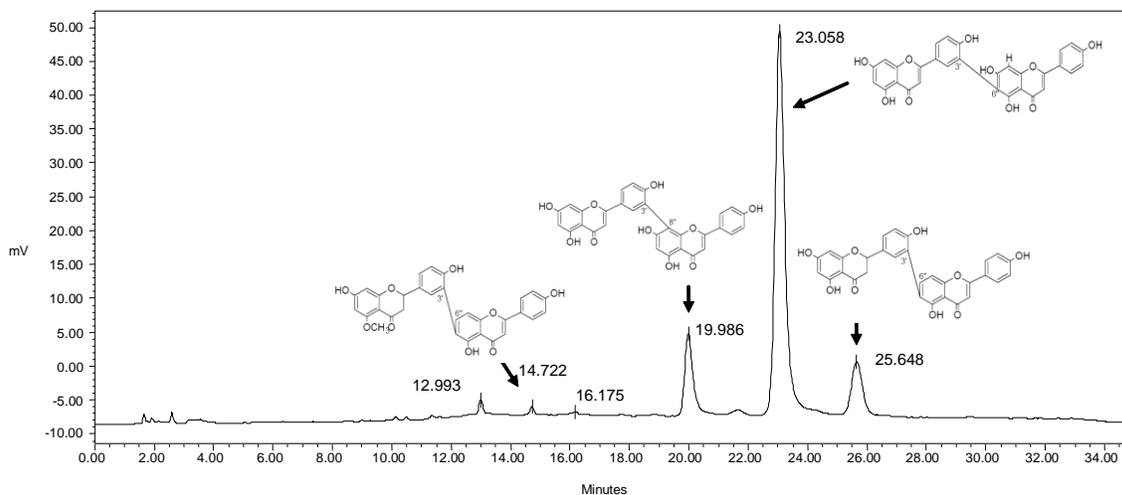
Pico	Nombre	t _R (min)
1	f ₀	14.721

Cromatograma 15. Fracción F₀

6.10 Identificación de biflavonoides en el extracto acetónico de *Selaginella lepidophylla*, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)

Integrando los resultados obtenidos, tomando en cuenta los tiempos de retención de cada uno de los biflavonoides aislados y caracterizados estructuralmente, se pueden ubicar los picos correspondientes a dichos compuestos en los cromatogramas obtenidos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia a partir de los extractos de la planta bajo las condiciones analíticas del punto 5.5.3.3.

En el **Cromatograma 16** se presenta el perfil cromatográfico por CLAE del extracto acetónico de la planta, ubicando en el tiempo los picos que corresponden a los 4 biflavonoides identificados en este estudio colocando su estructura química junto a su tiempo de retención.



Pico	Compuesto	t _R (min)
1	-	12.993
2	2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona	14.722
3	-	16.175
4	Amentoflavona	19.986
5	Robustaflavona	23.058
6	2,3-dihidro-robustaflavona	25.648

Cromatograma 16. Identificación por CLAE de los metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto acetónico de *S. lepidophylla*.



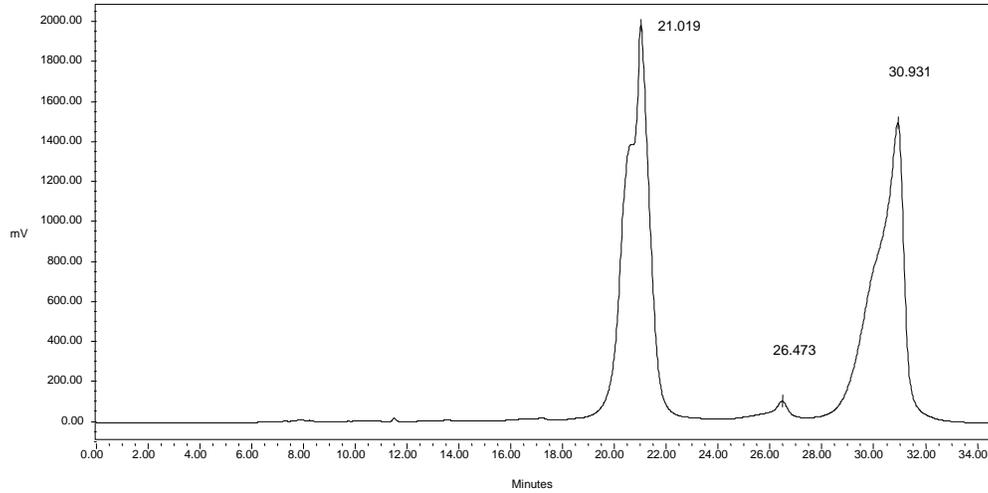
7. CONCLUSIONES

- Se logró obtener los extractos hexánico, de acetato de etilo, metanólico y acetónico a partir de la planta seca y fragmentada *Selaginella lepidophylla*, así como el perfil cromatográfico de los mismos.
- Se logro el objetivo principal del trabajo al aislar y caracterizar estructuralmente el biflavonoide mayoritario contenido en los diferentes extractos de *S. lepidophylla*.
- Asimismo se aislaron e identificaron estructuralmente otros metabolitos secundarios de *S. lepidophylla* mediante métodos físicos, espectroscópicos y espectrométricos, permitiendo esto hacer una corrección estructural al biflavonoide amentoflavona, obtenido en un trabajo previo a este, en el que se le había asignado la estructura de la robustaflavona.
- Se optimizaron las condiciones en Cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la purificación de los biflavonoides presentes en el extracto acetónico de *S. lepidophylla*.
- Se optimizaron las condiciones por CLAE para ubicar los picos correspondientes al tiempo de retención de los metabolitos secundarios mayoritarios de la planta, para que esto sirva como prueba de identidad de esta droga medicinal en un control de calidad.

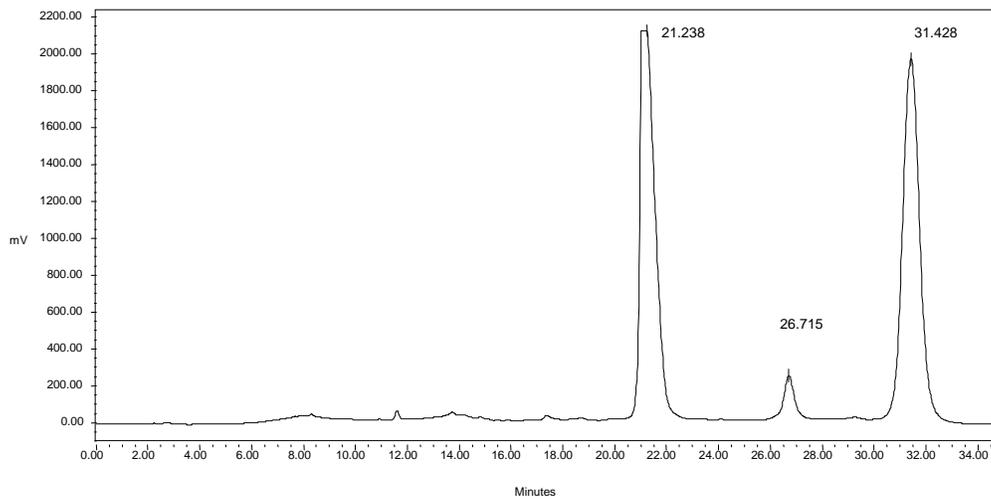


ANEXO 1

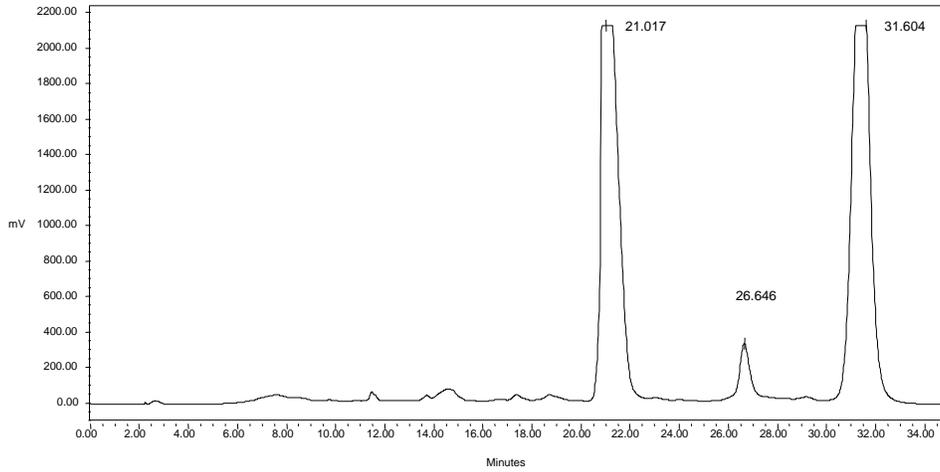
Purificación de la Fracción 6d4c



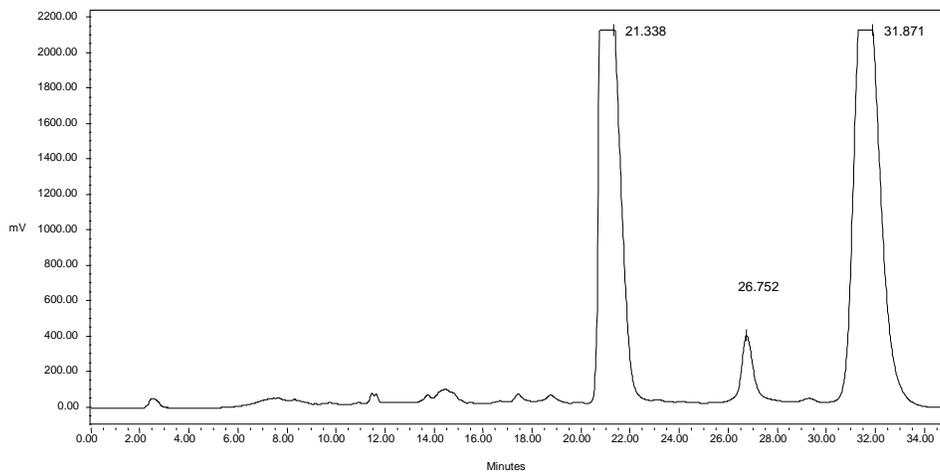
P1, vol. de inyección: 50 µL



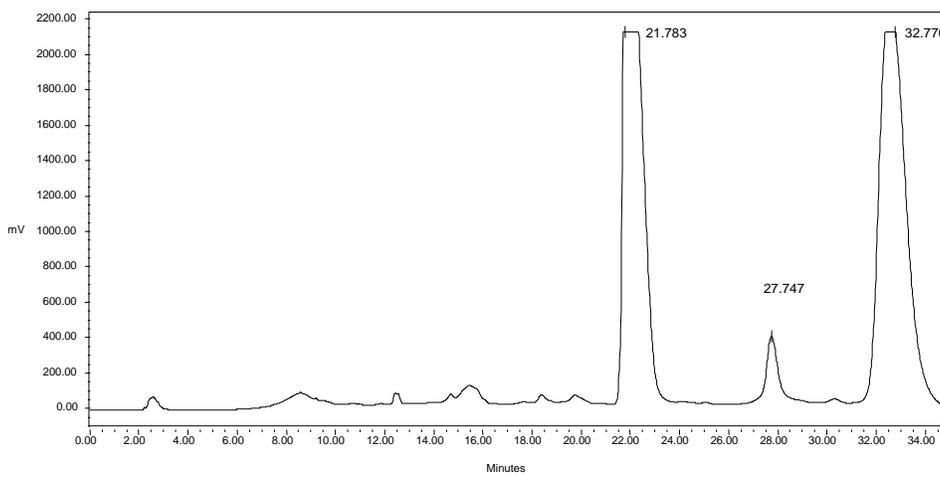
P2, vol. de inyección: 100 µL



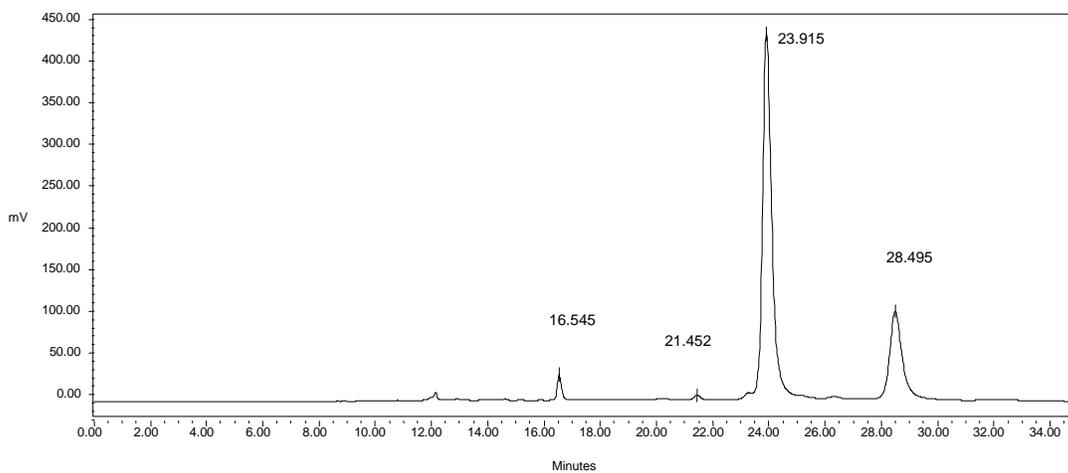
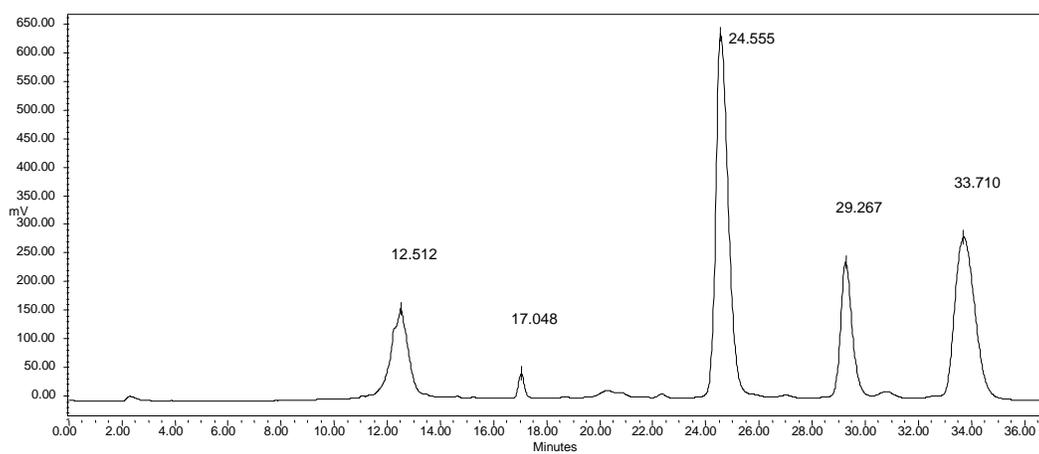
P3, Vol. de inyección: 200 μ L

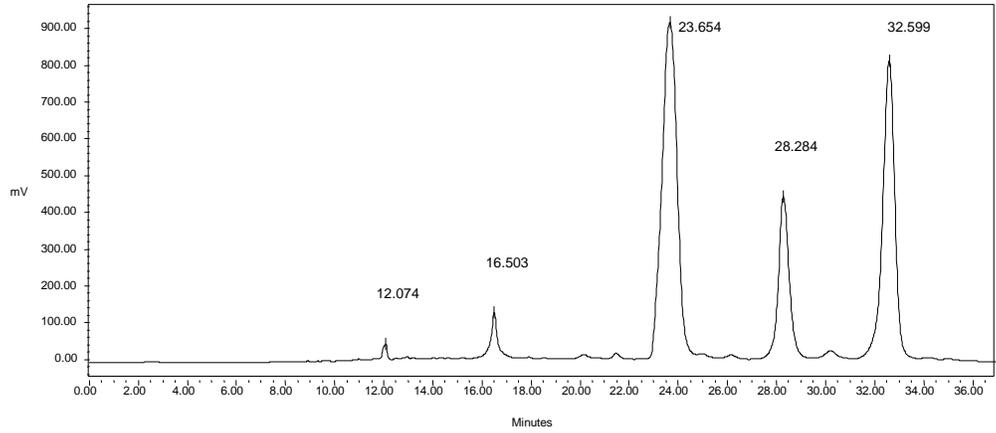


P4, vol. inyección: 200 μ L

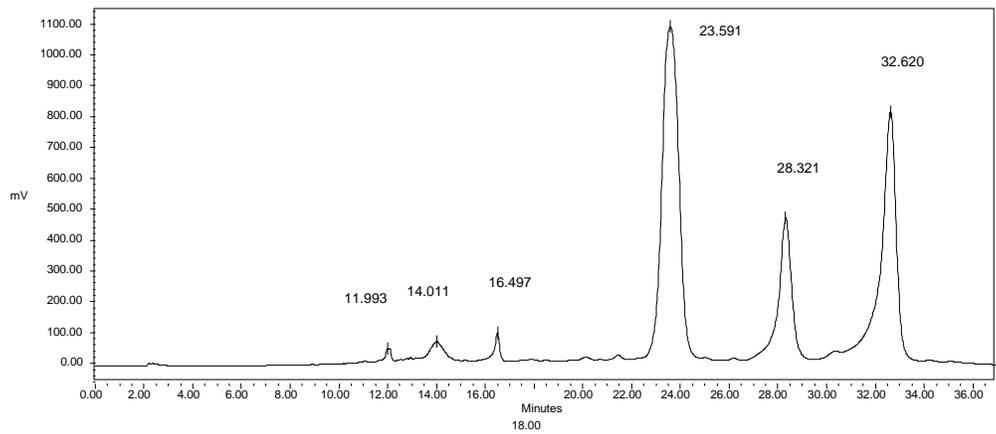


P5, vol. inyección: 200 μ L

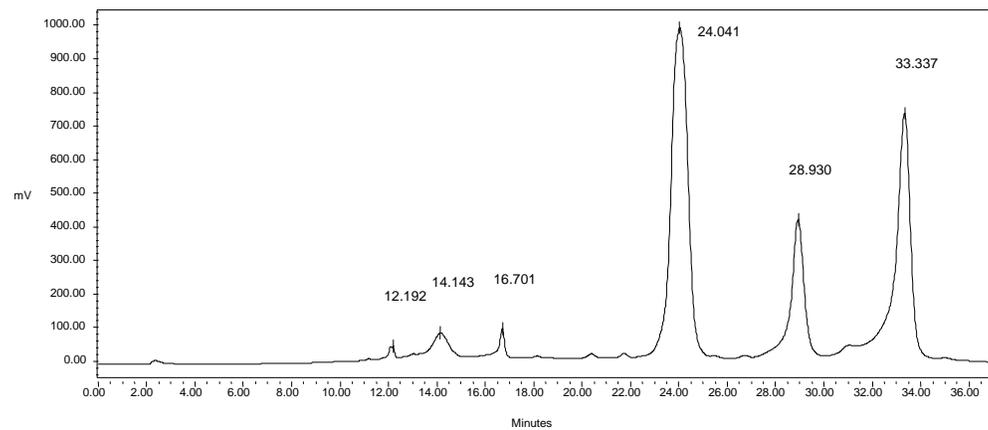
**ANEXO 2****Purificación de la fracción R1 + R2 soluble en MeOH****P1, vol. de inyección: 20 μ L****P2, vol. de inyección: 40 μ L**



P3, vol. de inyección: 80 μ L



P4. Vol. de inyección: 120 μ L

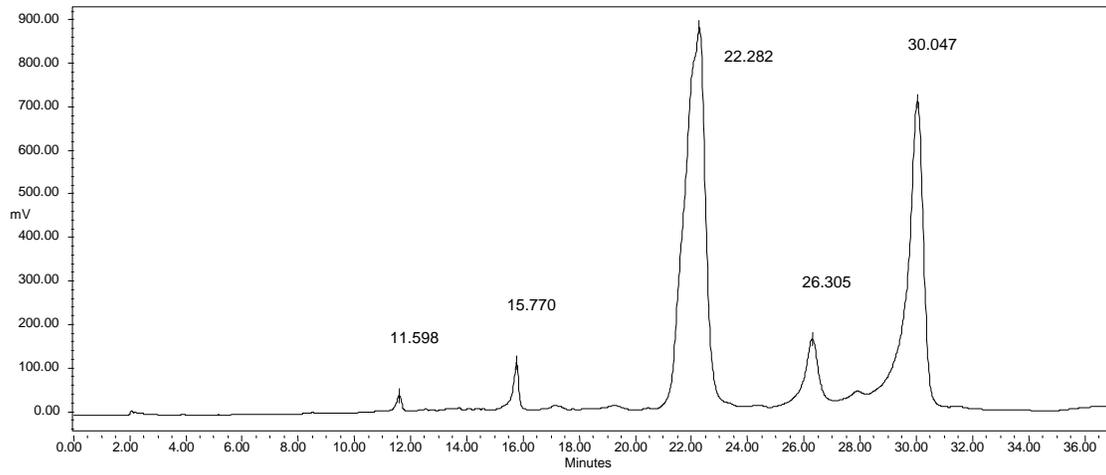


P5, vol. de inyección: 150 μ L

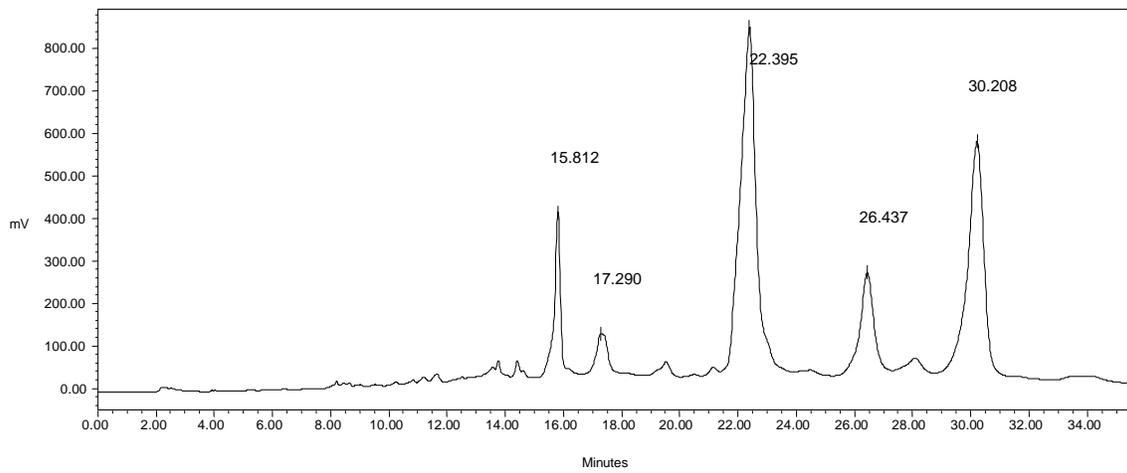


ANEXO 3

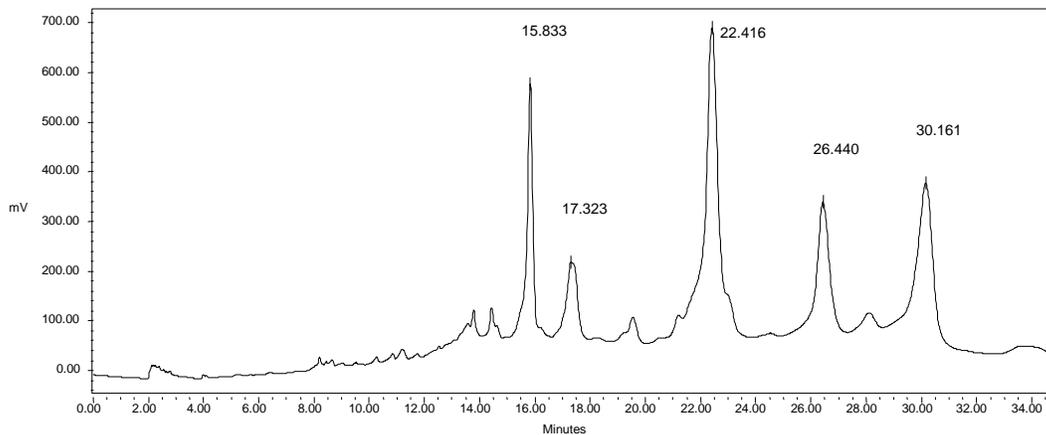
Purificación de la Fracción F12



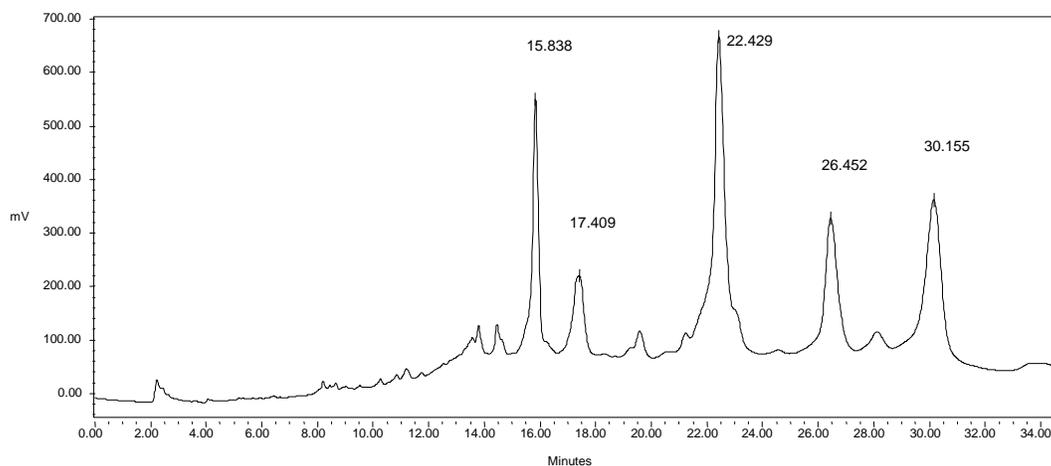
P1, vol. de inyección: 150 µL



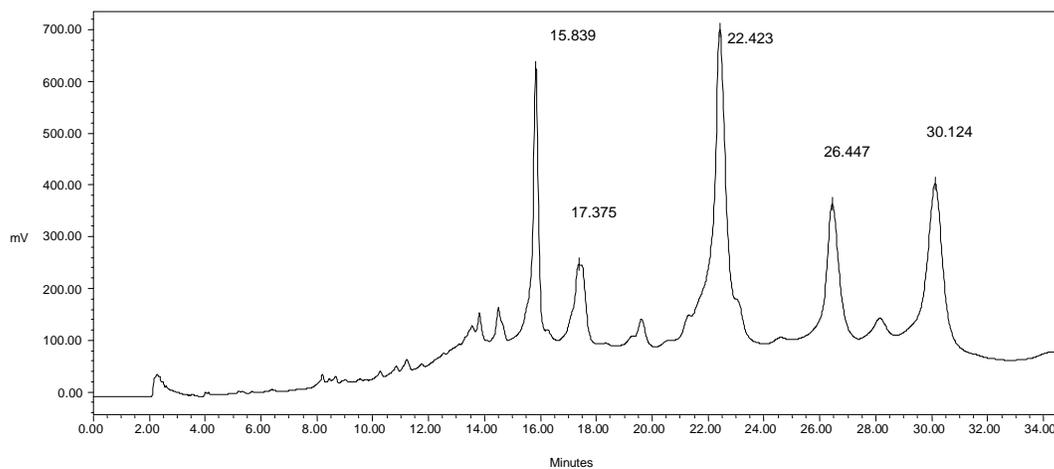
P2, vol. de inyección 200 µL



P3, vol. de inyección: 200 μ L



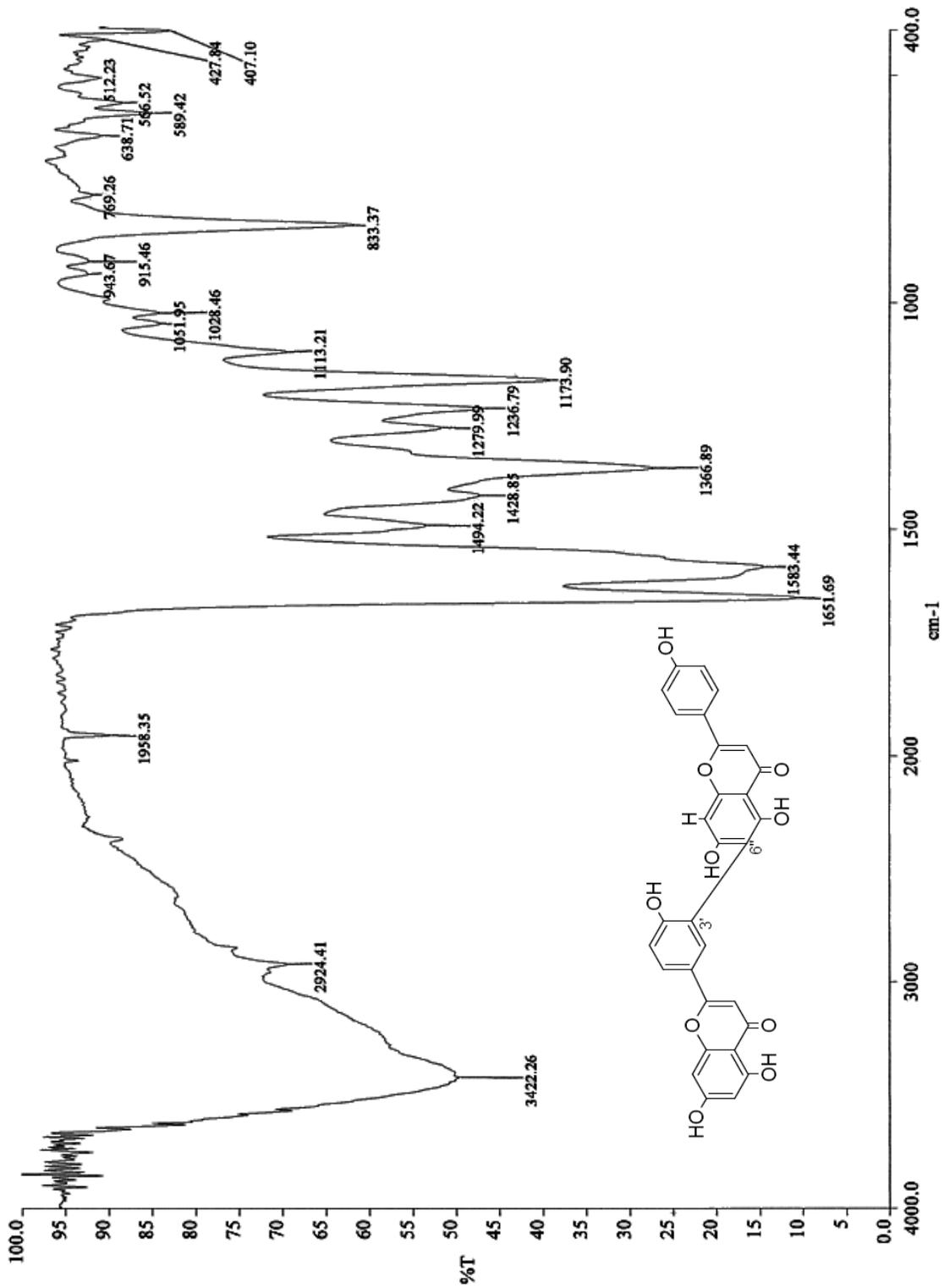
P4, vol. de inyección: 250 μ L



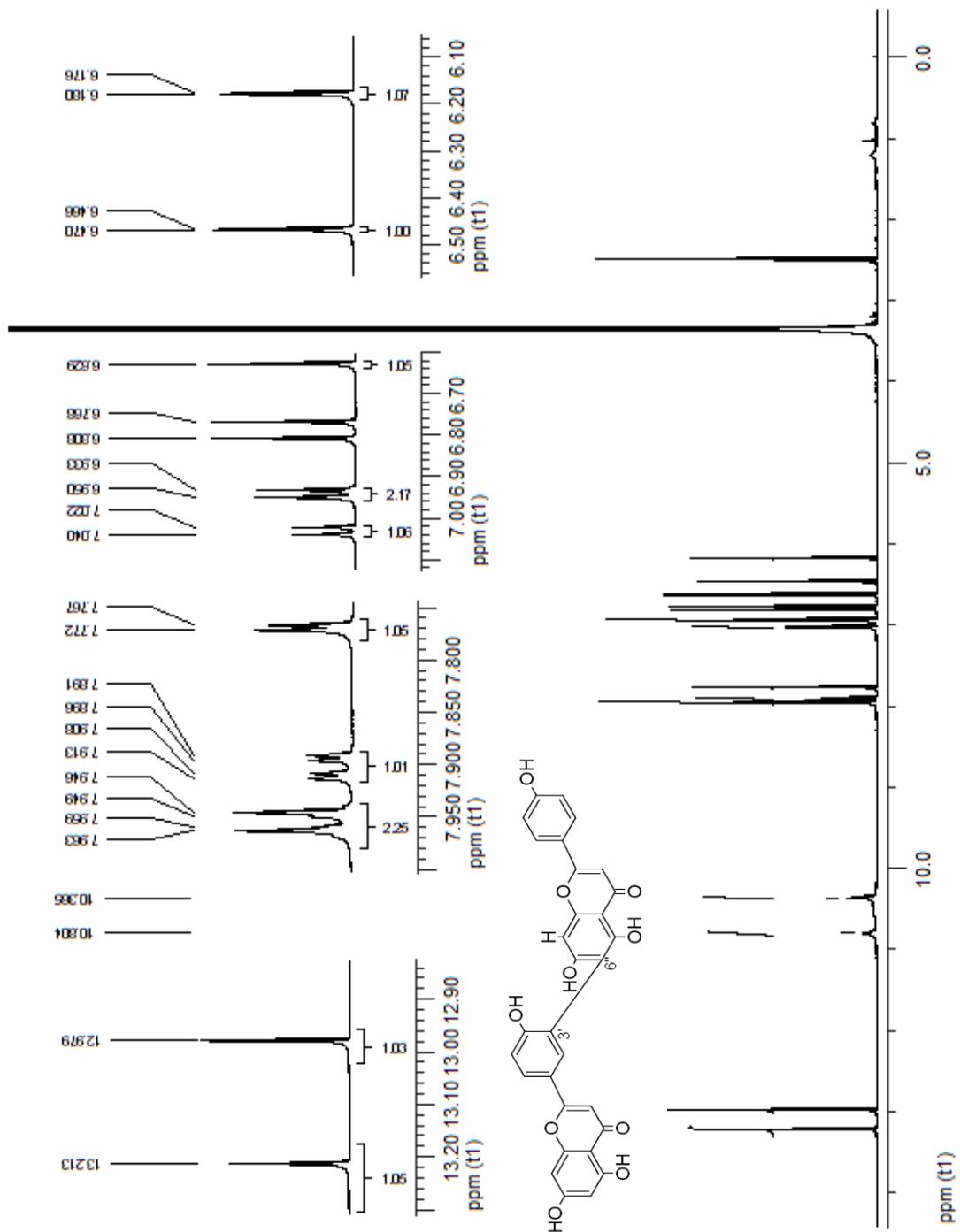
P2, vol. de inyección: 250 μ L



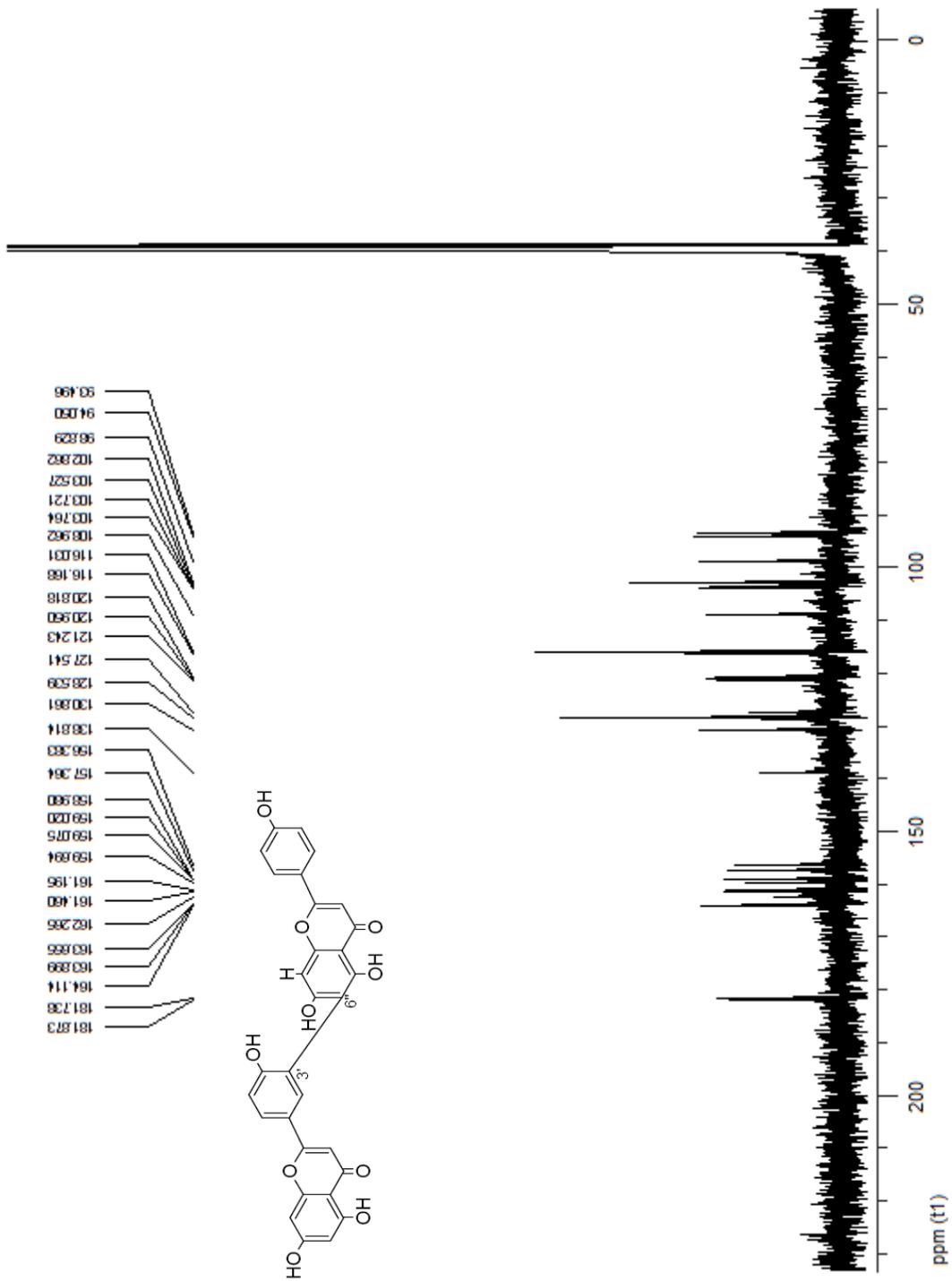
ANEXO 4 Espectros



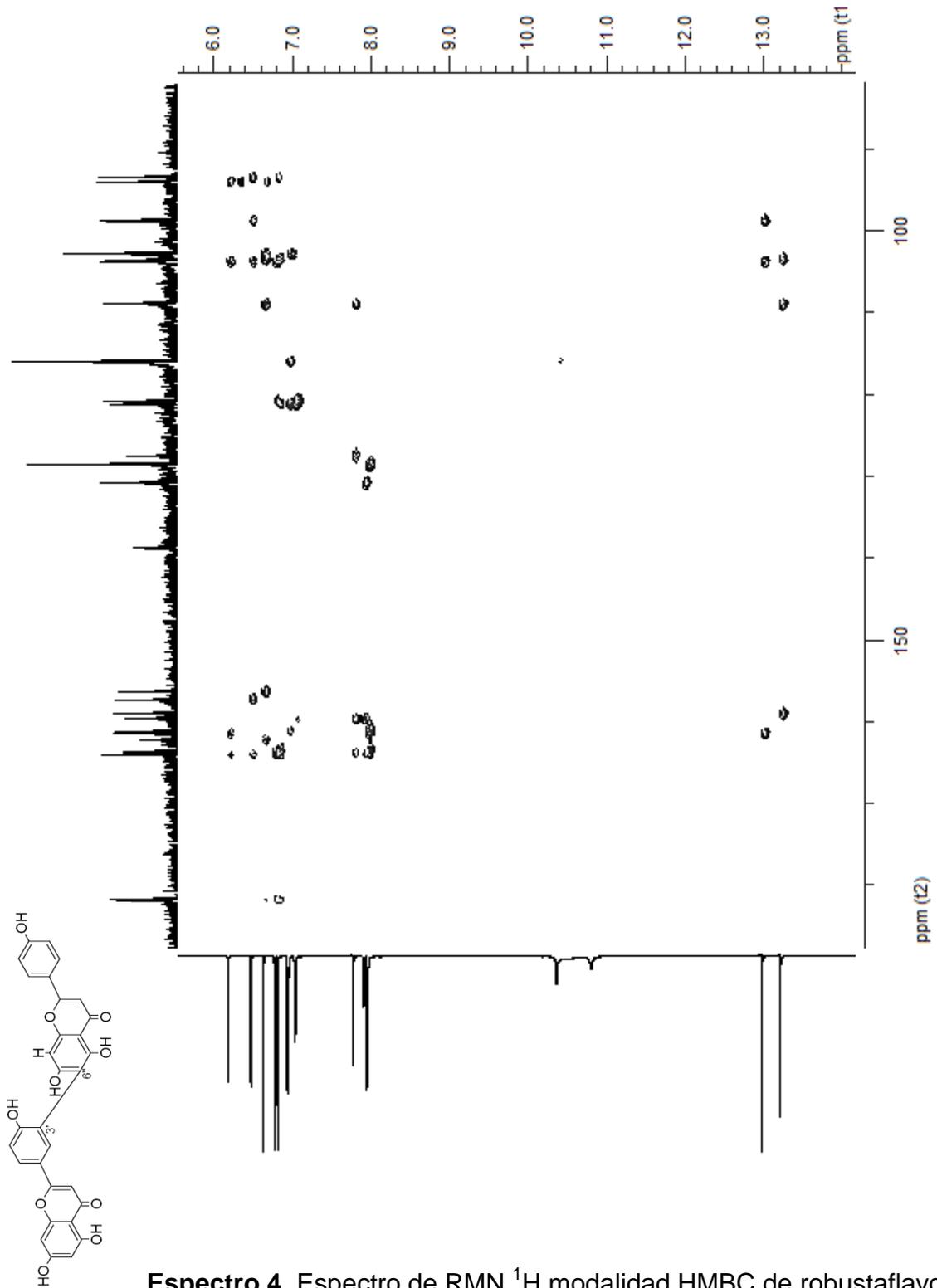
Espectro 1. Espectro de IR de robustaflavona

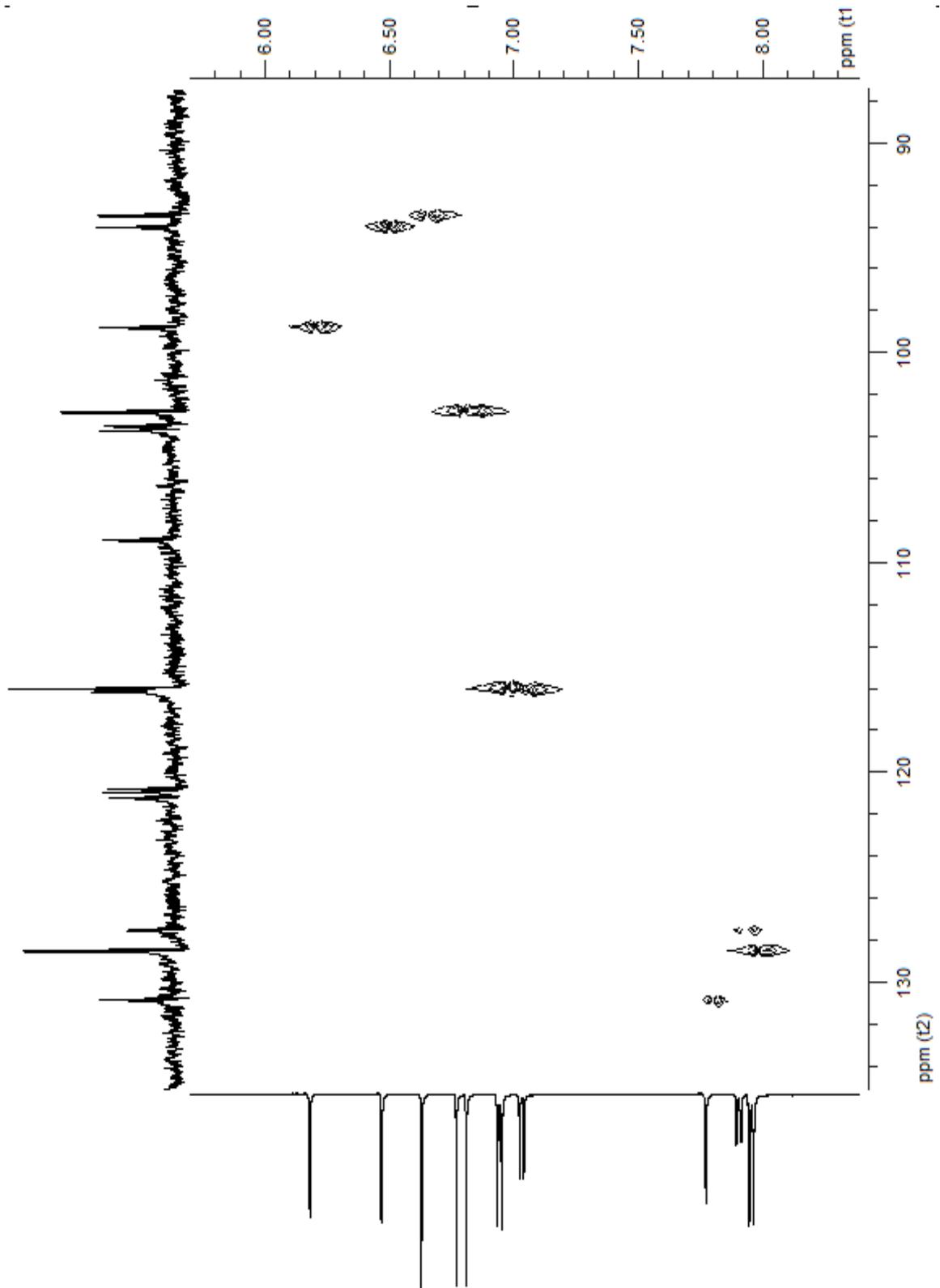


Espectro 2. Espectro de RMN ^1H de robustaflavona (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

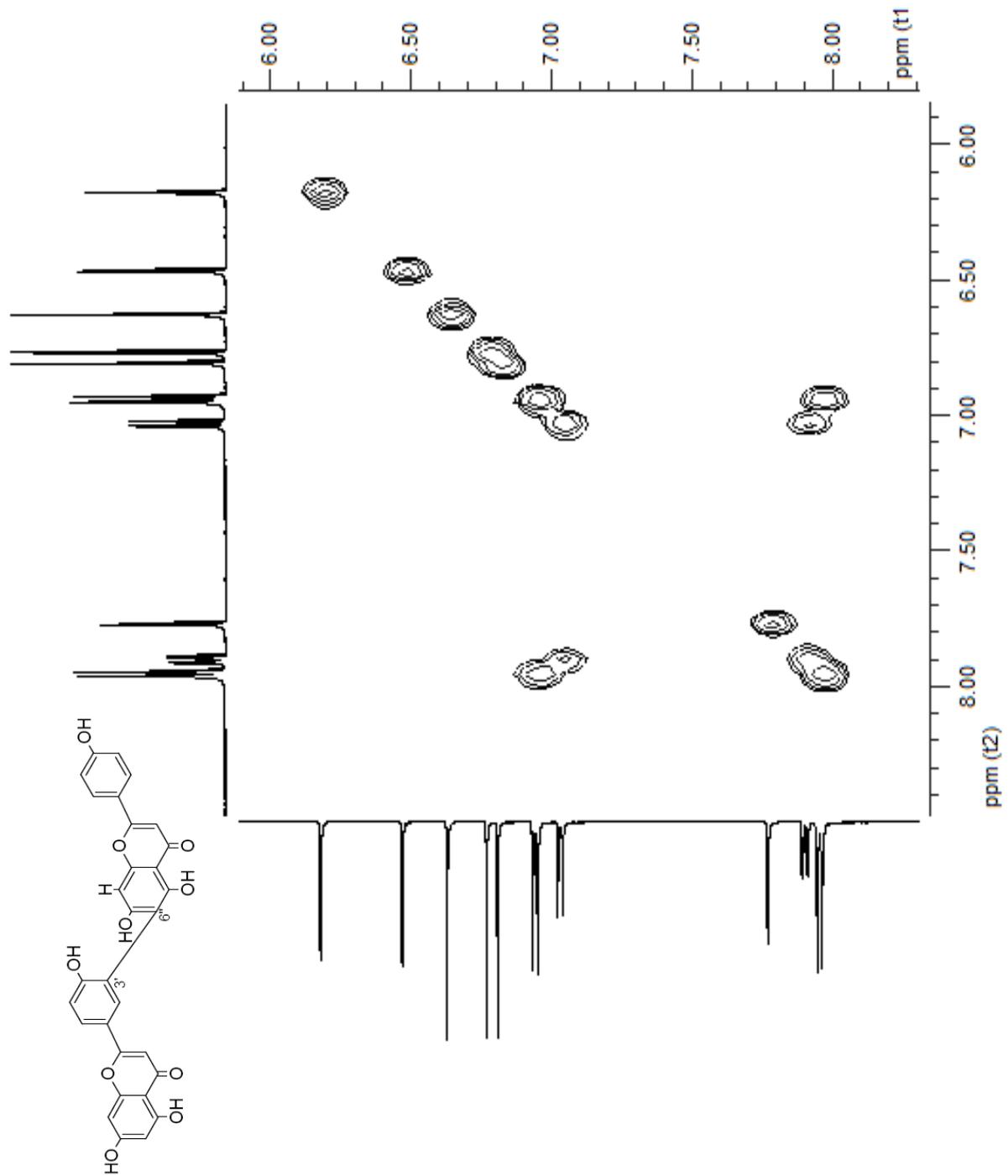


Espectro 3. RMN ¹³C de robustaflavona (125 MHz, DMSO-d₆)

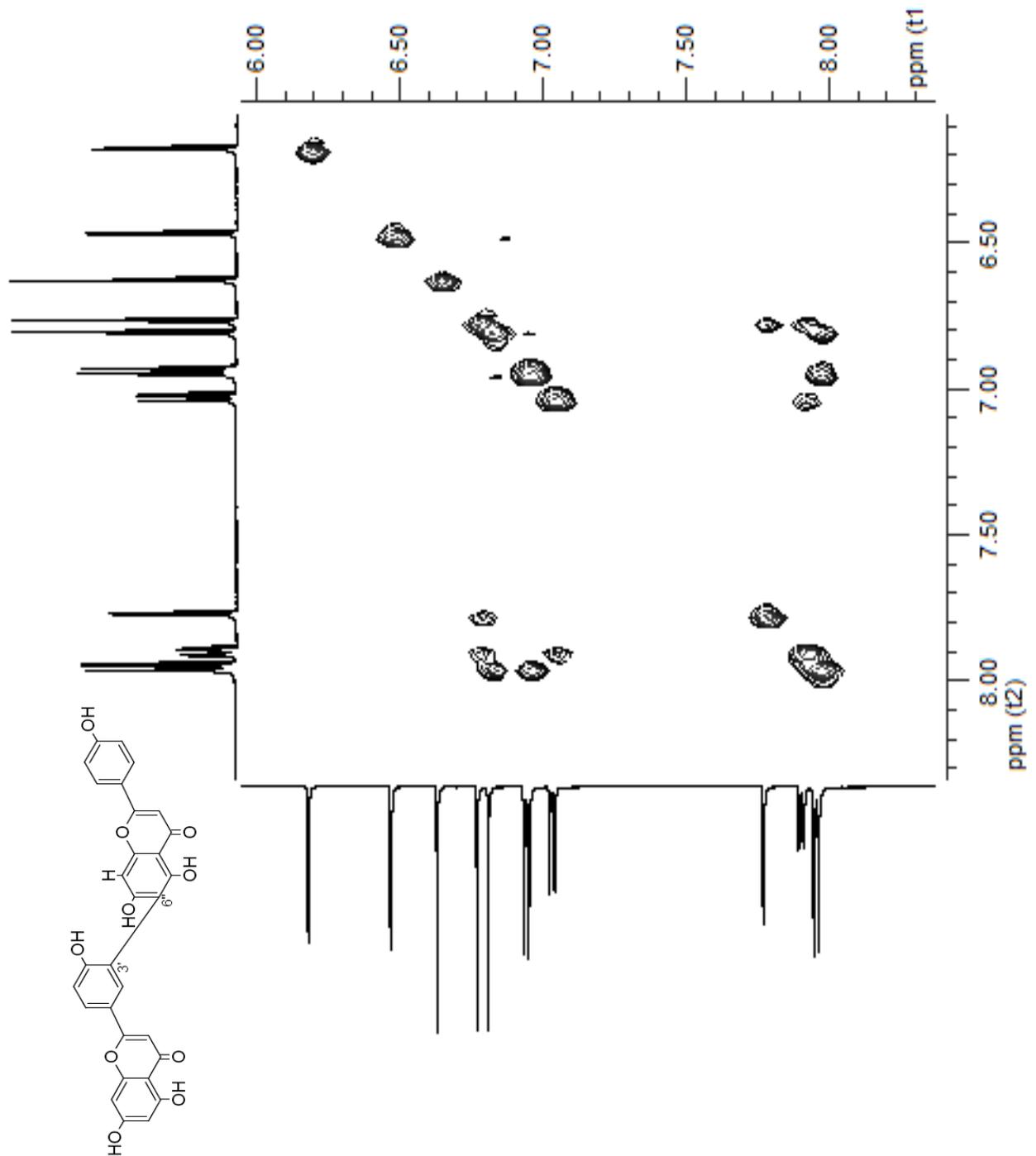




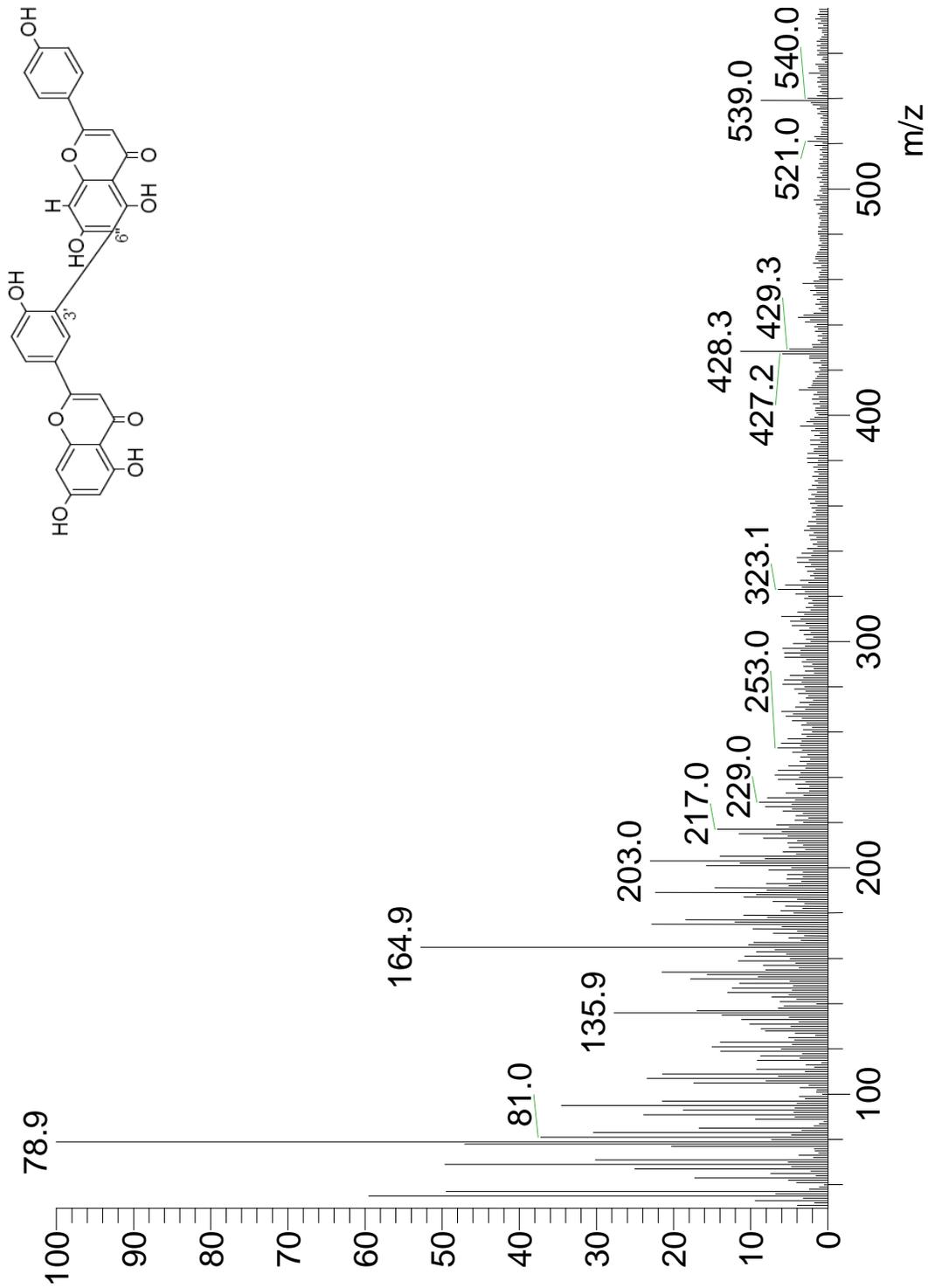
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de robustaflavona



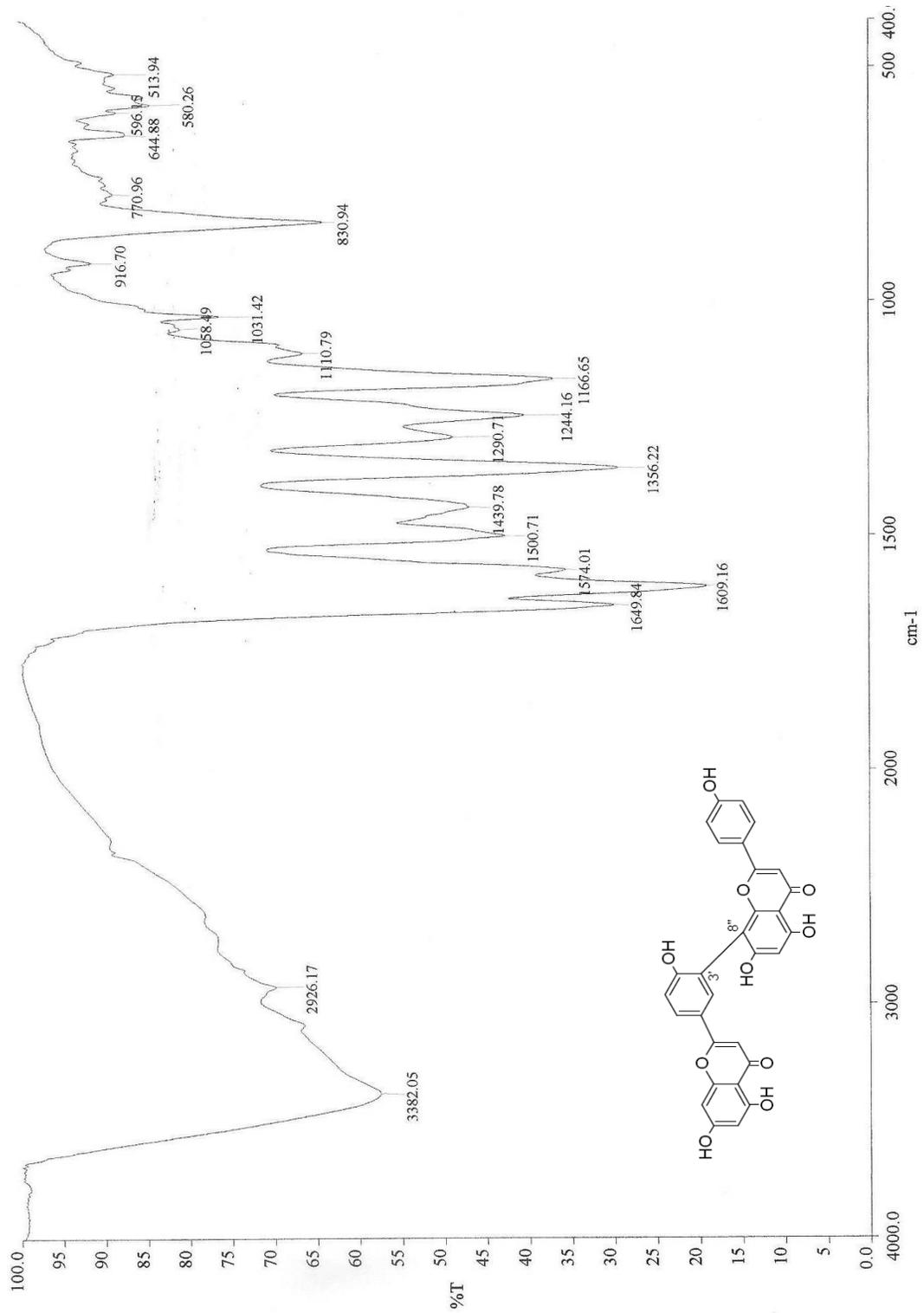
Espectro 6. Espectro de RMN ¹H modalidad COSY de robustaflavona



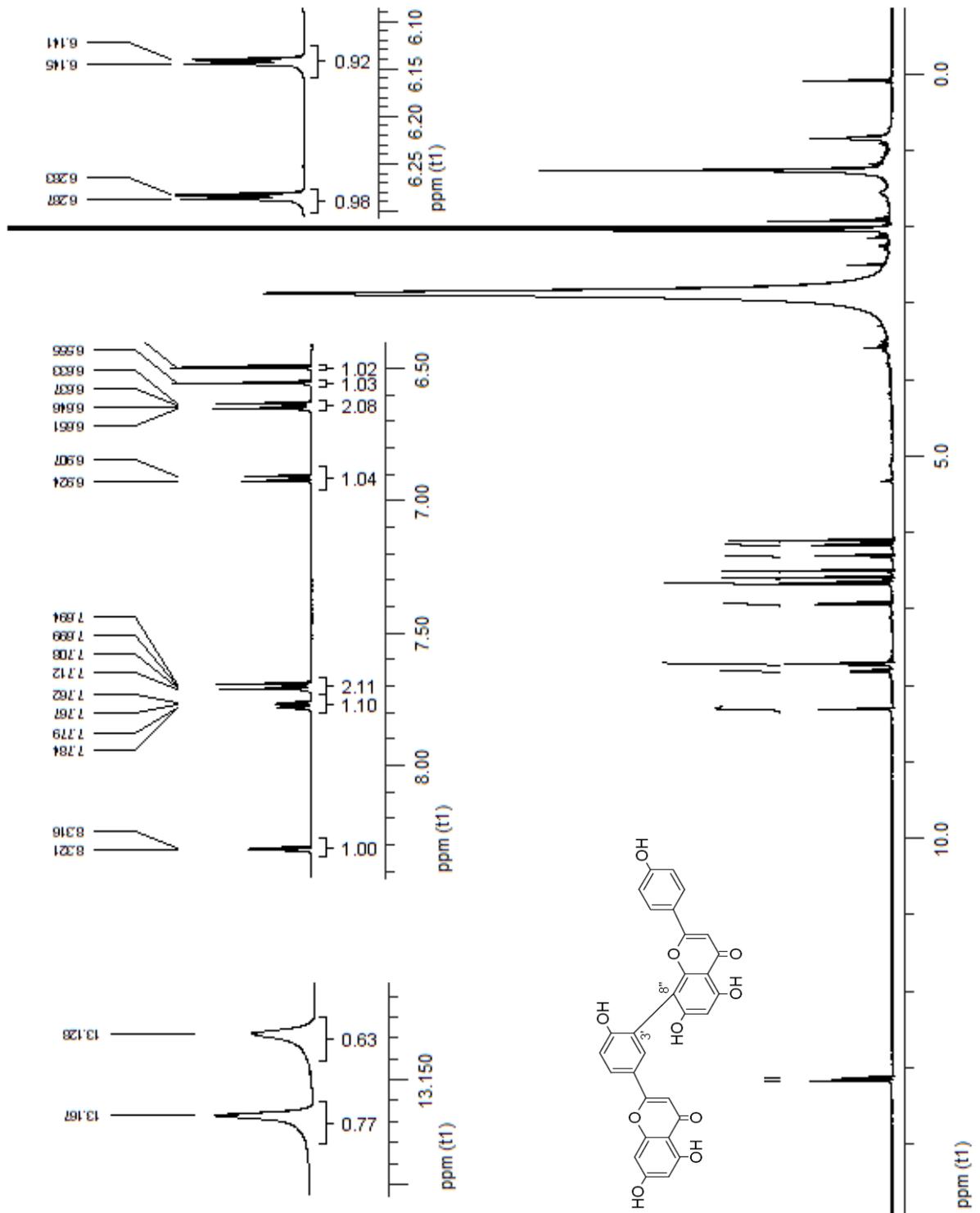
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H modalidad NOESY de robustaflavona



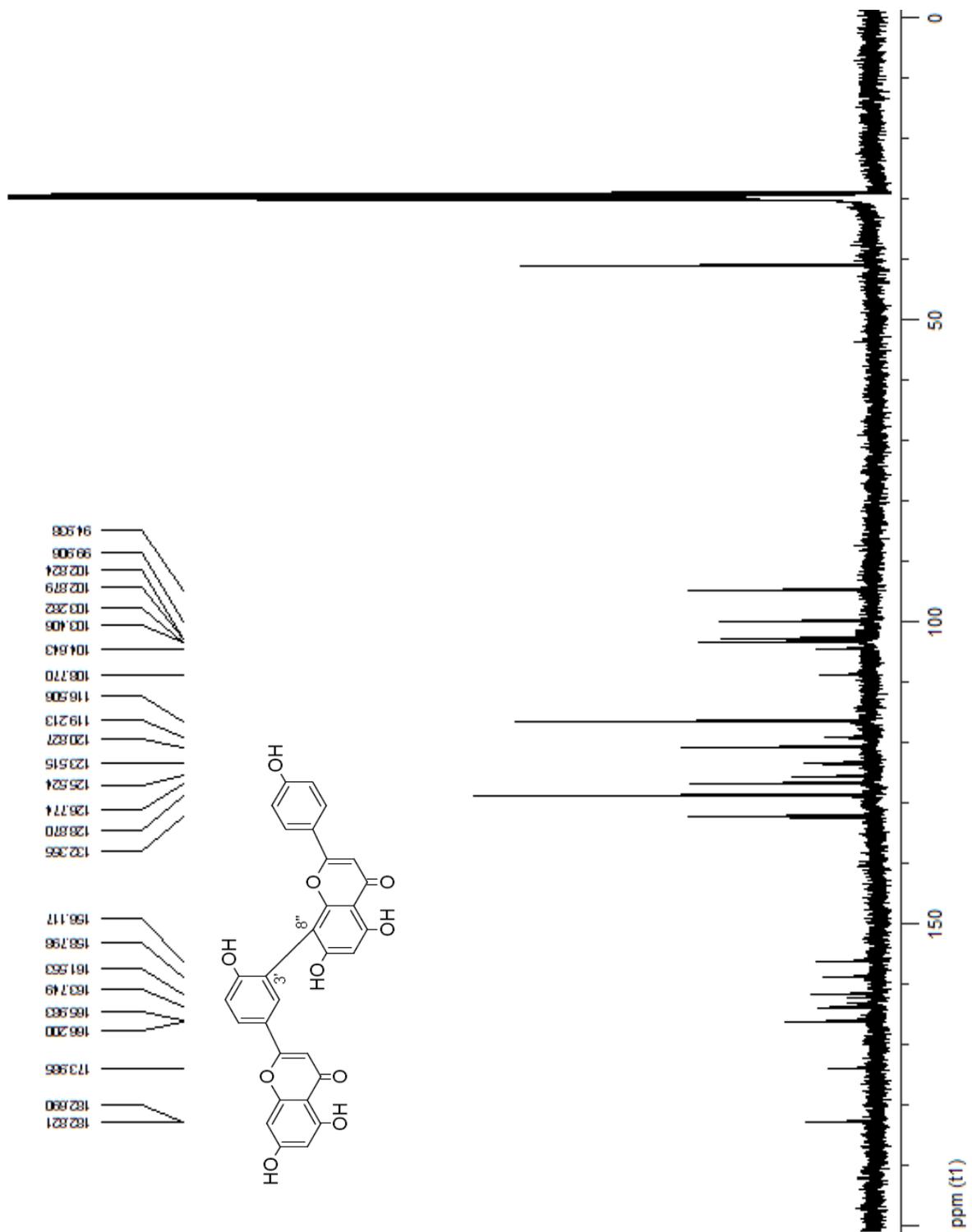
Espectro 8. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de robustaflavona



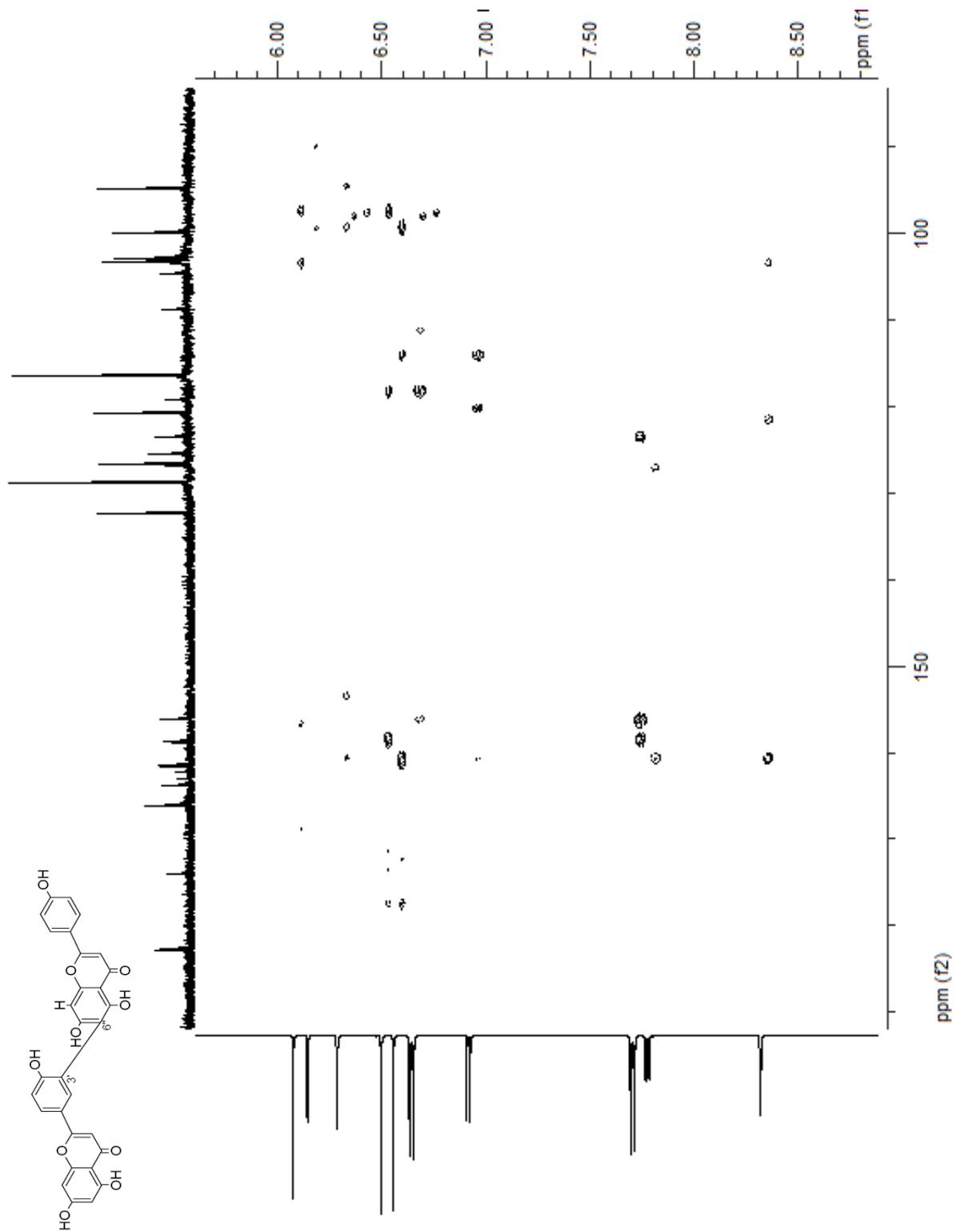
Espectro 9. Espectro de IR de amentoflavona



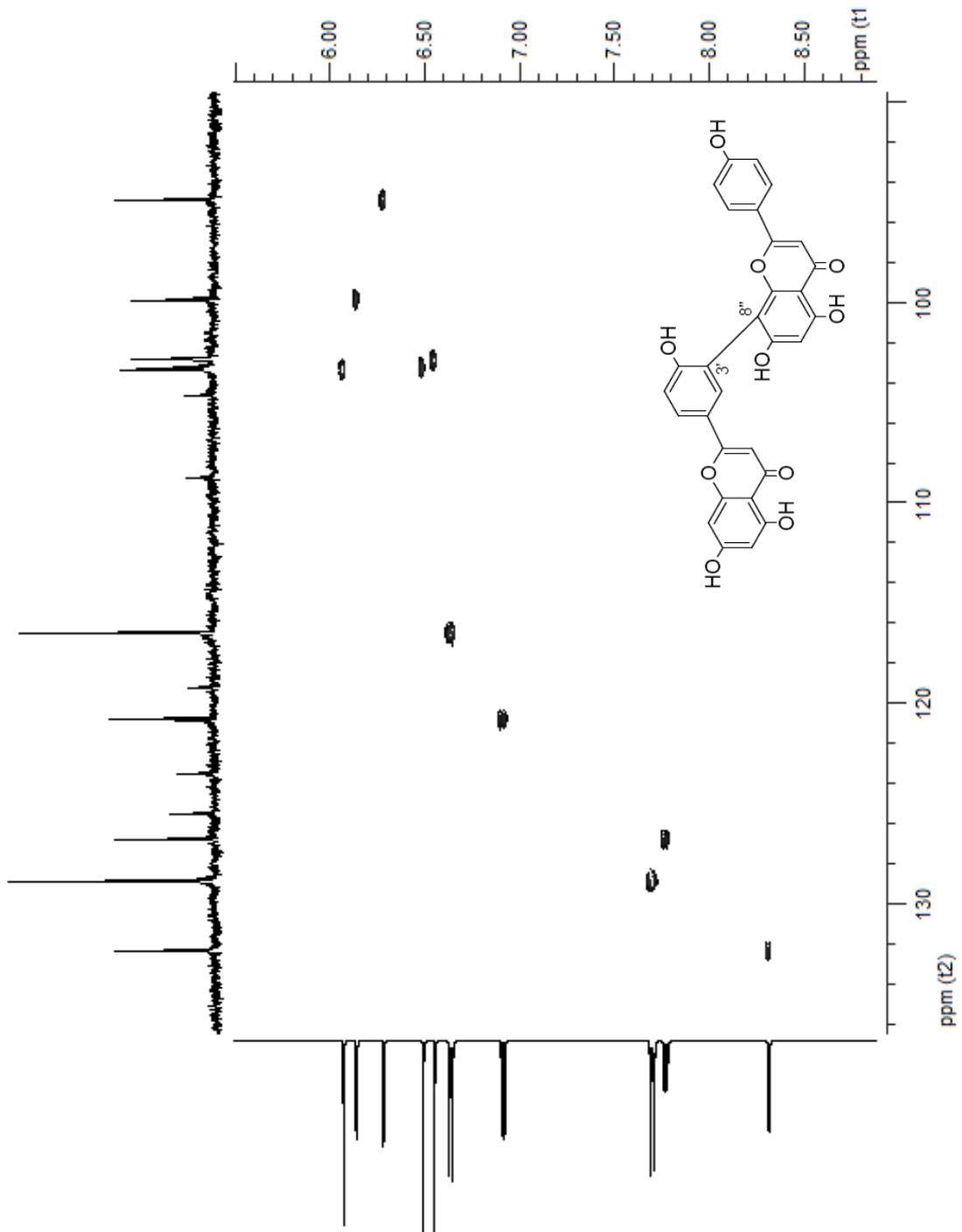
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H de amentoflavona (500 MHz, CD_3COCD_3)



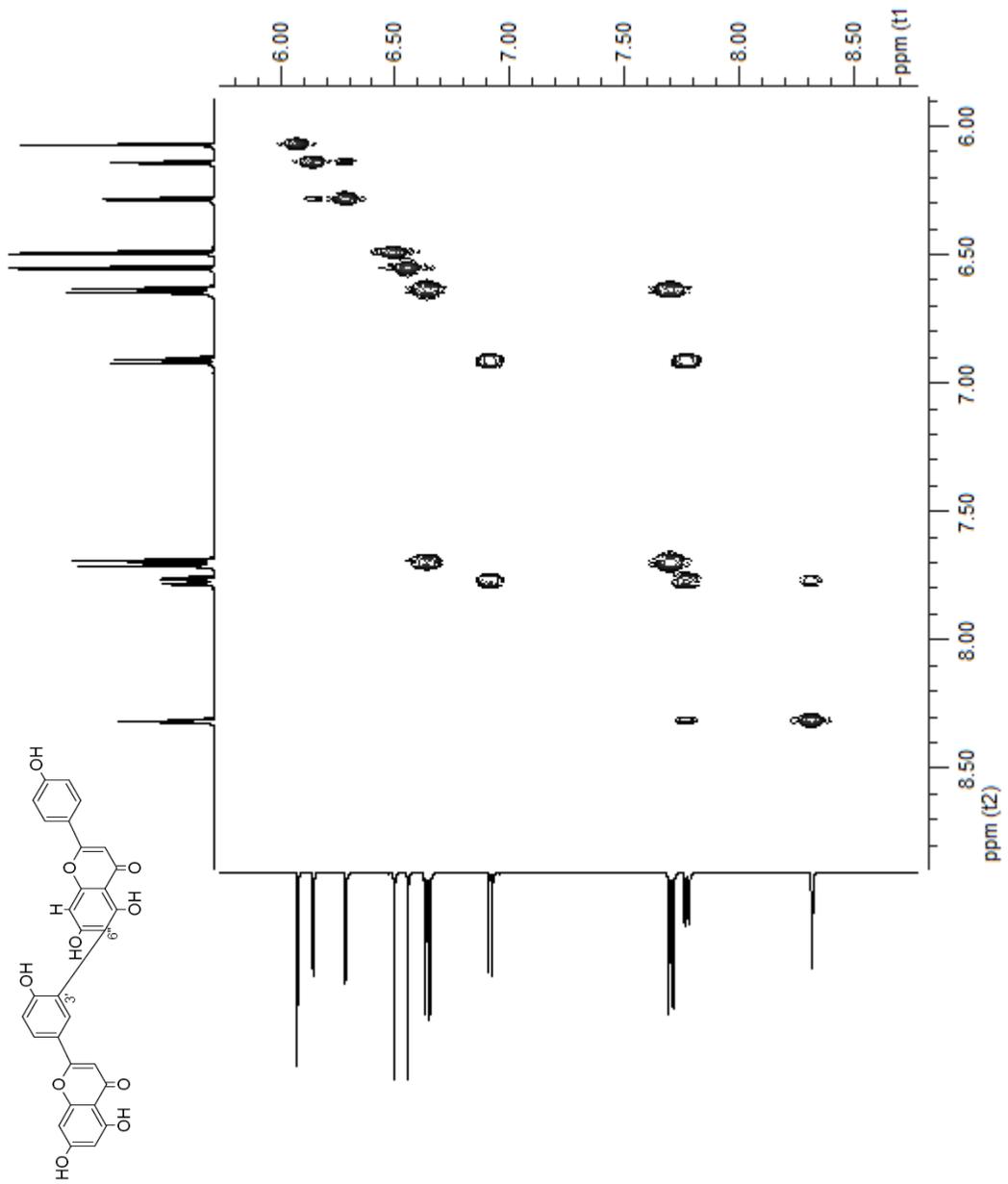
Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C de amentoflavona (125 MHz, CD_3COCD_3)



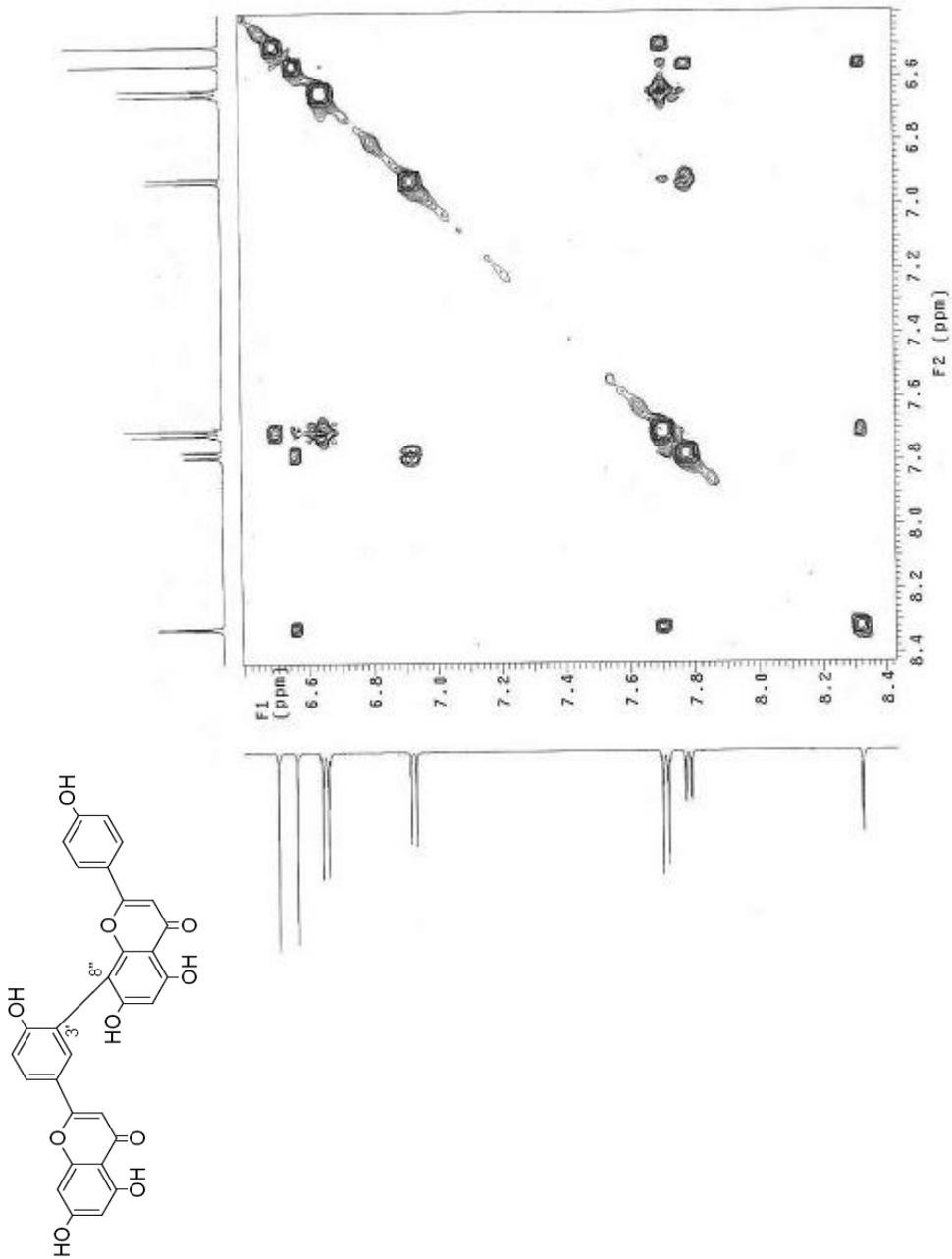
Espectro 12. Espectro de RMN ^1H modalidad HMBC de amentoflavona



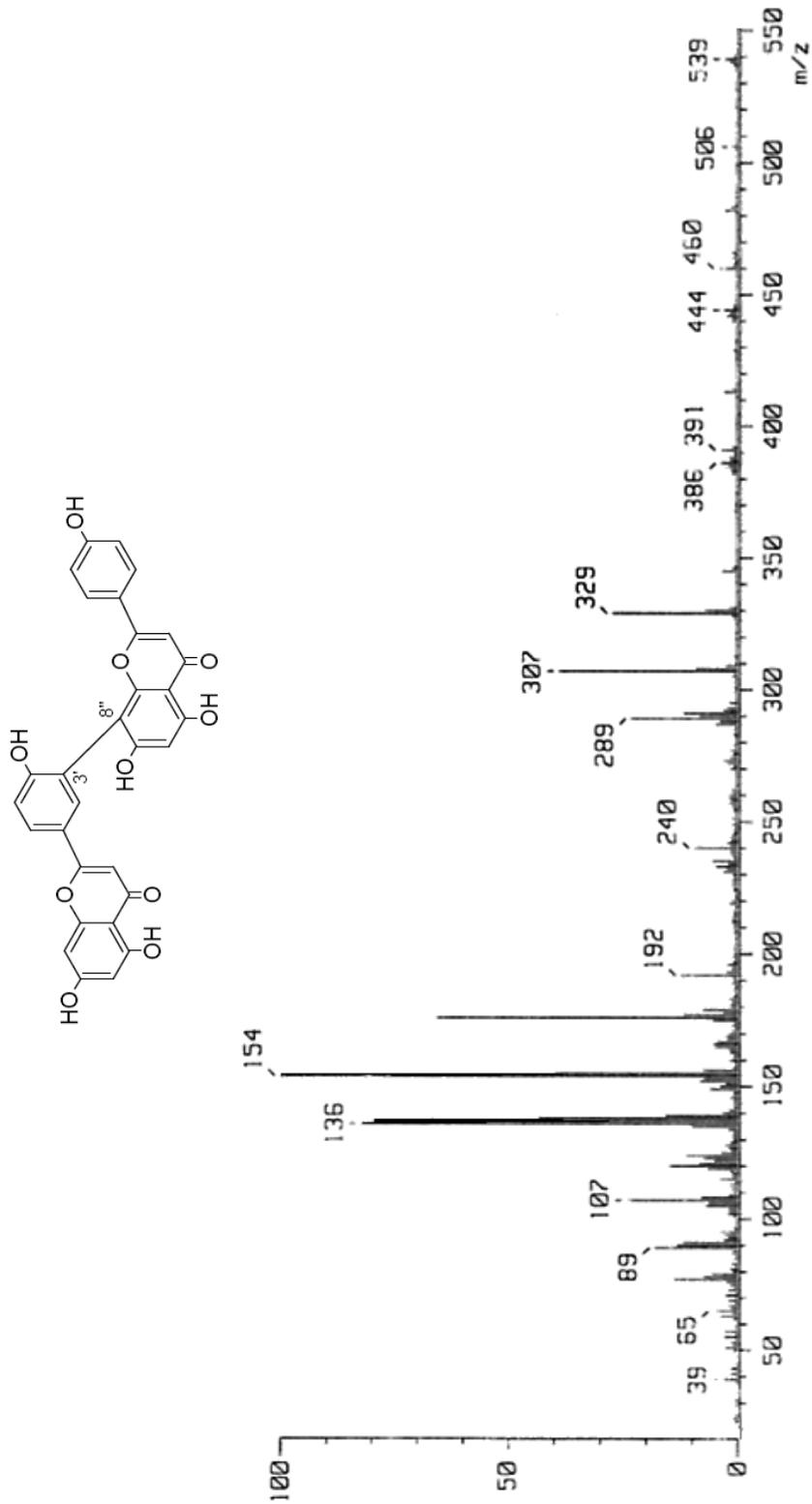
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de amentoflavona



Espectro 14. Espectro de RMN ¹H modalidad COSY de amentoflavona



Espectro 15. Espectro de RMN ¹H modalidad NOESY de amentoflavona



Espectro 16. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de amentoflavona



8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar M.I., Romero M.G., Chávez M.I., King-Díaz B., Lotina-Hennsen B. (2008). Biflavonoids Isolated From *Selaginella lepidophylla* Inhibit Photosynthesis in Spinach Chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Aug 27; 56 (16), pp. 6994-7000.
- Adams R.P., Kendall E., Kartha K. (1990). Comparison of Free Sugars in Growing and Desiccated Plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 18, No 2/3, pp. 107-110.
- Amador M.S., (2007). Metabolitos Secundarios de *Lippia graveolens* (Orégano Mexicano). Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Argueta A., Cano L.M., Rodarte E. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. pp. 575-576. México.
- Azcon J.B., Talon M. (1993). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Edit. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid. pp. 662.
- Balderas L.J. (2006). Fitoquímica Comparativa de *Artemisa ludoviciana* ssp. Mexicana y Evaluaciones Biológicas Preliminares. Tesis de Maestría. (Maestría en Ciencias Químicas), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Baran R. (1996). Changes in Phenolic Compounds and Color in Pole Cherry Wines Subjected to Fining Treatment. *Zleberin Unters Forsch A-Foo*. Vol. 205, No. 6, pp. 474-478.



- Bi Y.-F., Zheng X.-K., Feng W.-S., Shi S.-P. (2004). Isolation and Structural Identification of Chemical Constituents From *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yaoxue Xuebao* 39 (1), pp. 41-45.
- Borris R.P. (1996). Natural Products Research: Perspectives From a Major Pharmaceutical Company. *Journal of Ethnopharmacology*. 51, pp. 29-38.
- Brighigna L., Benicci A., Tani C., Tani G. (2002). Structural and Ultrastructural Characterization of *Selaginella lepidophylla*. *Flora*, 197 (2). pp. 81-91.
- Cartaya O., Reynaldo I. (2001). Reseña Bibliográfica; “Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones”. *Cultivos Tropicales*, Vol. 22, No. 2, pp. 5-14.
- Castañeda López P.C. (1991). Aislamiento e identificación de un nuevo ent-labdano de la *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq (Sapindaceae): estudio químico y biológico de *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae). Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Químicas), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ciria G., Soto F., Iturriaga G., Elisa M.V. (2004). Actividad de Trehalosa 6-Fosfato Sintasa en Plantas de *Selaginella lepidophylla* en Respuesta a Hidratación y Deseccación. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 27. No. 001, pp. 17-22.
- Colegate S.M., Molyneux R.J., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Strategies for Structural Determination en: Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination, editado por Lindsay T. Byrne (2008). Ed. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp. 77-112.



- Chari M.V., Ilyas M., Wagner H., Neszmelyi F.-Ch., Chen L.-K., Lin Y.-Ch., Lin Y.-M. (1977). ¹³C-NMR Spectroscopy of Biflavonoids. *Phytochemistry*. Vol. 16, pp. 1273-1278.

- Cheng X.-L., Ma S.-Ch., Yu J.-D., Yang S.-Y., Xiao X.-Y., Hu J.-Y., Shaw P.-Ch., But P., Lin R.-Ch. (2008). Selaginellin A and B, Two Novel Natural Pigments Isolated From *Selaginella tamariscina*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 56 (7), pp. 982-984.

- Dai Z., Ma S.-C., Wang G.-L., Wang F., Lin R.-C. (2006). A New Glucoside From *Selaginella sinensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. Vol 8, No.6, pp. 529-533.

- Dewick P.M. (2002). Medicinal Natural Products, Biosynthetic Approach, 2nd Ed. England, Edit. John Wiley & Sons Ltd.

- Dixon S.A., Paiva N.L. (1995). Stress Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant cell*. Vol. 7, pp. 1085-1087.

- Harborne J.B. (1982). Introduction to Ecological Biochemistry. Academia Press, London.

- Feng W.-S., Chen H., Zheng X.-K. (2008). Chemical Constituents of *Selaginella sinensis*. *Chinese Traditional and Herbal drugs*. 39 (5), pp. 654-656.

- Gabriel S.P., (2000). Validación del Efecto Antiinflamatorio de Flavonoides Presentes en la Hoja de Aguacate (*Persea americana* Mill) Utilizado en el Poblado de Santo Domingo Xagacia, Oaxaca. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.



- Gao L.-L., Yin S.-L., Li Z.-L., Sha Y., Pei Y., Shi G., Jing Y.-K., Hua H.-M. (2007). Three Novel Sterols Isolated From *Selaginella tamariscina* with Antiproliferative Activity in Leukemia Cells. *Planta Medica*. 73 (10), pp. 1112-1115.

- Guevara R.M. (2008). Caracterización Química y Biológica de Biflavonoides de *Selaginella lepidophylla* Spring. Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico-Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Harborne J.B. (1998). Flavonoids and Insects. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London. pp. 589-618.

- Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H. (1975). *The Flavonoids (2nd Part)*. Academic Press, New York, pp. 693-696, 159-161.

- Harborne J.B, Williams C.A. (2000). Advances in Flavonoid Research Since 1992 (Review). *Phytochemistry*, 55, pp. 481-504.

- He Z., Xia W., Chen J. (2008). Isolation and Structure Elucidation of Phenolics Compounds in Chinese Olive (*Canarium album* L.) Fruit. *Eur Food Res Technol*. 226, pp. 1991-1996.

- Iwashina T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*. 113, pp. 287-289.

- Jacobsen N.E. (2007). NMR Spectroscopy Explained: Simplified theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 685 p.



- Jung H.J., Sung W.S., Yeo S.-H., Kim H.S., Lee I.-S., Woo E.-R., Lee D.G. (2006). Antifungal Effect of Amentoflavone Derived From *Selaginella tamariscina*. *Arch. Pharm. Res.* Vol. 29, No. 9, pp 746-751.

- Kirsi-Marja, Oskman-Caldentey. (2008). Preface. *Phytochem Rev*, 7, pp. 385-386.

- Korall P., Kenrick P., Therrien J.P. (1999). Phylogeny of *Selaginellaceae*: Evaluation of Generic/Subgeneric Relationships Based on rbcL Gene Sequences. *International Journal of Plant Science*. Vol. 160 (3), pp. 585–594.

- Korall P., Kenrick P. (2002). Phylogenetic Relationships in *Selaginellaceae* Based on RBCL sequences. *American Journal of Botany*. 89, 3. pp. 506-517.

- Kunert O., Swamy R.C., Kaiser M., Presser A., Buzzi S., Appa Rao A.V.N., Schuhly W. (2008). Antiplasmodial and Leishmanicidal Activity of Biflavonoids From Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochemistry Letters*. 1 (4), pp. 171-174.

- Lee Ch.-W., Choi H.-J., Kim H.-S., Kim D.-H., Chang I.-S., Moon H.T., Lee S.-Y., Oh W.K., Woo E.-R. (2008). Biflavonoids Isolates From *Selaginella tamariscina* Regulate the Expression of Matrix Metalloproteinase in Human Skin Fibroblast. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Vol. 16. pp. 732-738.

- Lin R.C., Skaltsounis A.-L., Seguin E., Tillequin F., Koch M. (1994). Phenolic Constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Medica*. 60(2), pp. 168-170.



- Lin L.-Ch., Kuo Y.-Ch., Chou Ch.-J., (2000). Citotoxic Biflavonoids From *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products*, Vol. 63, No. 5, pp. 627-630.

- Lin L.R., Seguin E., Tillequin F., Koch M. (1987). New Glycosides From *Selaginella doederleinii*. *Journal of Natural Products*, 60. pp. 422-427.

- Lopez Ma. T.L. Flavonoides. (2002). *Offarm*, Vol. 21, No. 4, pp. 108-113.

- Lopez-Saez J.A., Pérez-Alonso M.J., Velasco-Negueruela A. (1995). Flavonoids of *Selaginella denticulate* and *S. selaginoides*. *Fitoterapia*, 66. pp. 188-189.

- Ma L.-Y., Wei F., Ma S.-Ch., Lin R.-Ch. (2002). Two New Chromone Glycosides From *Selaginella uncinata*. *Chinese Chemical Letters*. Vol. 13, No.8, pp. 748-751.

- Ma S.-Ch., Pui-Hay B.P., Eng-Choon O.V., He Y.-H., Hon-Sun L.S., Lee S.-F., Lin R.-Ch. (2001). Antiviral Amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 24(3). pp. 311-312.

- Mabry T.J., Markham K.R., Tomas M.B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag New York Inc. pp. 16-22.

- Markham K., Sheppard C., Geiger H. (1987). ¹³C NMR Studies of Some Naturally Occurring Amentoflavone and Hinoquiflavone Biflavonoids. *Phytochemistry*. Vol. 26, No. 12, pp. 3335-3337.

- Márquez A., Lara F., Esquivel B., Mata E.R. (1999). Plantas Medicinales de México II. Composición, Usos y Actividad Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 69.



- Martínez M. Las plantas Medicinales de México. (1989). 6ª ed., Edit. Botas, México. p. 125.
- Mejía O.I. (2008). Desarrollo y Validación de un Método Analítico Mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la Cuantificación de Biflavonoides Contenidos en *Selaginella lepidophylla* (Hook Grev.) Spring. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico-Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nason A., (1980). Biología. 1ª Ed. Edit. Trillas, 18^{ava} Reimpresión, México D.F.
- Neri P., Tringali C. Applications of Modern NMR Techniques in the Structural Elucidation of Bioactive Natural Products en: Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, characterization and biological properties, editado por C. Tringali. (2001). Ed. Taylor & Francis, London, pp. 71-117.
- Mickel J.T., Beitel J.M. (1988). Pteridophyte Flora of Oaxaca, Mexico. The New York Botanical Garden. EUA.
- Quasim M.A., Roy S.K., Kamil M., Llyas M. (1985). Phenolic Constituents of *Selaginellaceae*. *Indian Journal of Chemistry*. 24 B. pp. 220.
- Rahman M., Riaz M., Desai U. (2007). Synthesis of Biologically Relevant Biflavonoids- a review. *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 4, pp. 2495-2527.
- Sánchez S.O. (1958). Las Excursiones Botánicas en el Distrito Federal. Tesis. Escuela Normal Superior, Secretaría de Educación Pública (SEP), pp. 66, México.



- Silva G.L., Chai H., Gupta M.P., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Beecher C.W., Kinghorn A.D. (1995). Citotoxic Biflavonoids from *Selaginella Willdenowii*. *Phytochemistry*, Vol. 40, No.1, pp. 129-134.
- Sun C.M., Syu W.Jr., Huang Y.T., Chen C.C., Ou J.C. (2007). Selective Citotoxicity of Gingketin From *Selaginella moellendorfii*. *Journal of Natural Products*. 60, pp. 382-384.
- Svenningsen A.B., Madsen K.D., Liljefors T., Stafford G.I., Staden van J., Jäger A.K. (2006). Biflavones From *Rhus* Species with Affinity for the GABA_A/benzodiazepine Receptor. *Journal of Ethnopharmacology*. 103. pp. 276-280.
- Swamy R.C., Kunert O., Schuhly W., Bucar W., Ferreira D., Rani V.S., Kumar B.R., Narasimha Appa Rao A.V. (2006). Structurally Unique Biflavonoids From *Selaginella chrysocaulos* and *Selaginella bryopteris*. *Chemistry and Biodiversity*, 3, pp. 405-413.
- Swiader K., Lamer-Zarawska E. (1996). Flavonoids of Rose Artemisa Species and Their Antifungal Properties. *Fitoterapia*, Vol. 57, No. 1.
- Tan G.-S., Chen L.-Z., Xu K.-P., Zheng Q.C., Xu Z., Huang Z.-H., Shu J.-H., Deng T. (2004). Study on the Chemical Constituents of *Selaginella pulvinata* Maxim. *Chinese Journal of Organic Chemistry*. 24 (9), pp. 1082-1085.
- Vázquez M. A. R. (2006). Componentes Químicos de Baja Polaridad en Tallos y Hojas de *Physalis coztomatl*. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.



- Vázquez-Ortíz F.A., Valenzuela-Soto E.M., (2004). HPLC Determination of Trehalose in *Selaginella lepidophylla* Plants. *Journal of Chromatography and Related technologies*. Vol. 27, No. 12, pp. 1937-1946.
- Vázquez R.M., Meléndez M.E., Arreguín M.L. (2005). Estudio Etnobotánico de *Selaginella lepidophylla* (Hook. et Grev.) Spring (*Selaginellaceae*-Pteridophyta) en San José Xicohténcatl Municipio de Huamantla, Tlaxcala México. *Polibotánica*. Instituto Politécnico Nacional (IPN). No. 019, agosto. pp. 105-115.
- Wang Y.Z., Chen H., Zheng X.K., Feng W.S. (2007). A New Sesquillignan From *Selaginella sinensis* (Desv.) Spring. *Chinese Chemical Letters*. 18 (10), pp. 1224-1226.
- Widyastuti S.M., Nonaka F., Watanabe K. (1996). Isolation and Characterization of Two Aucuporinrelated Phytoalexins from *Phatima glabra* Maxim. *Ann Phytopath. Soc. Japan*. Vol. 58, pp. 228-233.
- Zheng X.-K., Bi Y.-F., Feng W.-S., Shi S.-P., Wang J.-F., Niu J.-Z. (2004). Study on the Chemical Constituents of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yaoxue Xuebao*. 39 (4), pp. 266-268.
- Zheng X.-K., Du J., Xu Y., Zhu B., Liao D., A New Steroid From *Selaginella pulvinata*. *Fitoterapia*, 78, pp. 598-599.
- Zheng, X.-K., Li K.K., Wang Y.Z., Feng W.S. (2008). A New Dihydrobenzofuran Lignanose from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Chinese Chemical letters*. 19 (1), pp. 79-81.



- Zheng X.-K., Shi S.-P., Bi Y.-F., Feng W.-S., Wang J.-F., Niu J.-Z. (2004). The Isolation and Identification of a New Lignanoid from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yaoxue Xuebao*. 39 (9), pp. 719-721.

Consultas Electrónicas:

- <http://es.wikipedia.org/wiki/flavonoide>
- <http://bio.uaq.mx/municipioQro/ptetidofitas/SelaginellaLepidophylla.html>
- <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
- <http://www.itis.gov>