



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

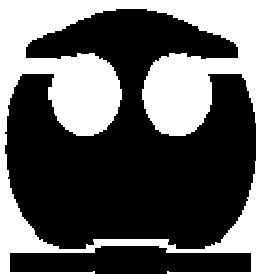
ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LOS EFECTOS  
DIURÉTICO Y DE TRÁNSITO INTESTINAL  
DE EXTRACTOS ACUOSOS DE  
*Selaginella nothohybrida* Valdespino y  
*Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev.) Spring

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ARTURO COLÍN RUÍZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente	<i>Dra. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i>
Vocal	<i>Dr. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i>
Secretario	<i>QFB. ABRAHAM MADARIAGA MAZON</i>
Primer Suplente	<i>Dra. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO</i>
Segundo Suplente	<i>M en C. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ</i>

**Sitio de realización de la tesis:** LABORATORIO 125 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E", DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA DE PRODUCTOS NATURALES, 2° PISO CORCE, UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA IMSS, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

**ASESOR:**

---

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

**ASESOR TÉCNICO**

---

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

**SUSTENTANTE:**

---

ARTURO COLÍN RUÍZ



**AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra. Isabel Aguilar Laurents por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y brindarme la confianza para lograr todos los resultados esperados durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo por el apoyo brindado para la realización de la parte experimental y la redacción de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de desarrollarme académica y personalmente.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por el apoyo económico a través del proyecto IN210709

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 del AAPAUNAM por la beca otorgada a través de la cátedra Ángela Sotelo López (2010-2).

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez del Departamento de Botánica, FES Zaragoza, UNAM por la colecta del material vegetal.

Al M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología de la UNAM, por la identificación botánica del material vegetal.



Al IMSS por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental en sus instalaciones.

Al bioterio del IMSS principalmente al M.V.Z. Jaime Herrera y al M.V.Z. Enrique García Formentir por las facilidades otorgadas para la realización de los bioensayos.

A mis sinodales: Doctor José Fausto Rivero y al QFB Abraham Madariaga por el tiempo destinado a la revisión de este trabajo.



## **DEDICATORIAS:**

A mis padres Arturo y María del Carmen, por todo el esfuerzo, dedicación, cariño y apoyo que me han brindado para lograr alcanzar todas mis metas, por ser mi ejemplo a seguir, mi inspiración, mi todo, por ser los mejores padres que la vida me pudo dar, es un orgullo ser su hijo, los amo papás.

A mi hermano Carlos por las innumerables e interminables peleas y discusiones que me hicieron creer que podía dar aun más de mí, por estar conmigo bajo cualquier circunstancia, por apoyarme, por creer en mí, por motivarme a ser mejor cada día, por ser el mejor regalo que la vida me ha dado.

A mi tocayo Arturo y mi amigo Sergio por todos estos años de amistad leal, sincera y desinteresada por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas.

A mis amigos Aldo e Ivan por todas las chocoaventuras que nos ha tocado compartir.

A mi amiga Carys por siempre creer en mí, por apoyarme y por ser una gran amiga.

A mis amigos Marco, Arely, Fibi, Isaac, Mauricio, Gerson, Christina, Ofe, Alin, Jazz y Maggy por todos los buenos momentos que hemos compartido

A todos los profesores que me ayudaron en mi formación, aportándome sus valiosos conocimientos.



## ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1. Planteamiento y justificación del problema.	1
1.2. Objetivos.	2
1.2.1. Objetivo general.	2
1.2.1. Objetivos particulares.	2
1.3. Hipótesis.	3
2. Marco teórico.	4
2.1. Medicina tradicional mexicana.	4
2.2. Diuréticos.	6
2.3. Generalidades de <i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook et Grev.) Spring y <i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino.	9
2.3.1 <i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook et Grev.) Spring.	9
2.3.2. <i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino.	11
3. Material y métodos.	13
3.1. Equipo y material de laboratorio.	13
3.2. Reactivos.	13
3.3. Material vegetal.	14
3.4. Preparación de los extractos.	14



---

3.5. Ensayo biológico.	15
3.5.1. Animales de laboratorio.	15
3.5.2. Modelo biológico.	16
3.5.2.1. Preparación de las muestras.	16
3.5.2.2. Determinación del aumento de tránsito intestinal y de la excreción urinaria.	16
4. Resultados.	18
4.1 Excreción urinaria de los extractos totales, fracciones y productos puros.	18
4.2 Excreción de heces de los extractos totales, fracciones y productos puros.	19
5. Análisis de resultados.	21
5.1. Excreción urinaria.	21
5.2. Excreción de heces.	29
6. Conclusiones.	34
7. Bibliografía.	36



**ÍNDICE DE TABLAS**

		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Algunas especies vegetales usadas como diuréticos en la medicina tradicional mexicana.	5
<b>Tabla 2</b>	Disolventes empleados en la extracción del material vegetal.	14
<b>Tabla 3</b>	Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los extractos totales.	18
<b>Tabla 4</b>	Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de las fracciones acuosas residuales y de AcOEt.	18
<b>Tabla 5</b>	Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los productos puros.	19
<b>Tabla 6</b>	Excreción de heces acumuladas de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los extractos totales.	19
<b>Tabla 7</b>	Excreción de heces acumuladas de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de las fracciones acuosa residual y AcOEt.	20
<b>Tabla 8</b>	Excreción de heces acumuladas de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los productos puros.	20



## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	<i>S. lepidophylla</i> planta seca (izquierda), planta en estado de humedad natural (derecha).	10
<b>Figura 2</b>	<i>S. nothohybrida</i> planta seca (izquierda), planta en estado de humedad natural (derecha).	11
<b>Figura 3</b>	Ratones CD-1 marcados para la administración de las diferentes muestras.	15

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

		Página
<b>Gráfica 1</b>	Excreción urinaria (E.U.) acumulada de los extractos totales	21
<b>Gráfica 2</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de <i>S. lepidophylla</i> a la dosis de 1 g/kg.	22
<b>Gráfica 3</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de <i>S. lepidophylla</i> a la dosis de 2 g/kg.	22
<b>Gráfica 4</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de <i>S. nothohybrida</i> a la dosis de 1 g/kg.	23
<b>Gráfica 5</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de <i>S. nothohybrida</i> a la	23



---

	dosis de 2 g/kg.	
<b>Gráfica 6</b>	Excreción urinaria acumulada por administración de las fracciones FAR y FAE.	24
<b>Gráfica 7</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración de la FAR de <i>S. nothohybrida</i>	25
<b>Gráfica 8</b>	Porcentaje de orina excretado a los diferentes tiempos por administración de la FAE de <i>S. nothohybrida</i>	25
<b>Gráfica 9</b>	Excreción urinaria acumulada de los compuestos puros comparados contra el control y la referencia.	26
<b>Gráfica 10</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro robustaflavona.	27
<b>Gráfica 11</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro amentoflavona.	27
<b>Gráfica 12</b>	Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona.	28
<b>Gráfica 13</b>	Tránsito intestinal de los extractos totales comparados con el control; las barras de error corresponden al error estándar relativo al promedio.	29
<b>Gráfica 14</b>	Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de los extractos totales considerando al control como cero.	30
<b>Gráfica 15</b>	Tránsito intestinal (heces excretadas) con las fracciones de los extractos, comparadas con el control, las barras de	31



	error corresponden al error estándar relativo al promedio.	
<b>Gráfica 16</b>	Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de las fracciones FAE y FAR comparadas con el control.	31
<b>Gráfica 17</b>	Tránsito intestinal de los compuestos puros comparados contra el control y contra la referencia, las barras de error corresponden al error estándar relativo al promedio.	32
<b>Gráfica 18</b>	Porcentaje de incremento de tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de los compuestos puros considerando al control como cero.	33

## INDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	Clasificación de fármacos diuréticos.	7
<b>Cuadro 2</b>	Compuestos aislados previamente de <i>Selaginella nothohybrida</i> .	12

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
BDMTM	Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana
E.U.	Excreción urinaria
FAR	Fracción acuosa residual
FAE	Fracción de acetato de etilo
g	Gramo
h	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Kg	Kilogramo
L	Litro
mL	Mililitro
5-met-2,3-DHRF	5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona
%	Por ciento
R.A.	Reactivo analítico
S.l.	<i>Selaginella lepidophylla</i>
S.n.	<i>Selaginella nothohybrida</i>
T.I.	Tránsito Intestinal
p.o.	Vía oral



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En nuestro país la doradilla es muy utilizada como diurético, nombre que se da a la especie vegetal *Selaginella lepidophylla* Spring (Selaginellaceae) la cual es una especie nativa de México, y que ha sido ampliamente estudiada química y biológicamente. Sin embargo, se ha identificado una nueva especie de *Selaginella* en el estado de Guerrero la cual es físicamente muy similar a la planta antes mencionada y es expandida en los mercados también bajo el nombre popular de doradilla, debido principalmente a que la diferencia entre ambas especies vegetales no es apreciable a simple vista (Mickel *et al.*, 1992); la especie nueva lleva por nombre *Selaginella nothohybrida* Valdespino (Selaginellaceae). Los usos medicinales recomendados para esta especie son los mismos que para *S. lepidophylla*. Al ser *S. nothohybrida* una especie de reciente clasificación, no se encuentra reportado ningún estudio sobre su composición química, ni de su actividad biológica, y al ser físicamente tan similar a *S. lepidophylla* se genera la pregunta de si existe una diferencia en la actividad biológica y en consecuencia en los usos reportados por la población de distintas regiones de la República Mexicana. Por lo anterior, es importante establecer la similitud o diferencia metabólica (metabolitos mayoritarios), así como farmacológica entre ambas especies, mediante un estudio farmacológico.

El propósito de este trabajo es estudiar el potencial diurético de *S. nothohybrida* y de *S. lepidophylla* mediante un ensayo biológico enfocado al uso medicinal más común de la “doradilla”.



## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo general:

- Determinar si existe diferencia en las actividades diurética y el incremento de tránsito intestinal entre las especies vegetales *Selaginella lepidophylla* Spring y *Selaginella nothohybrida* Valdespino (Selaginellaceae).

### 1.2.2 Objetivos particulares:

1. Obtener los extractos acuosos a partir de las dos especies de estudio (plantas completas) secas y fragmentadas.
2. Obtener los liofilizados de ambos extractos acuosos.
3. Determinar los efectos diurético y de tránsito intestinal de ambos extractos en ratones CD-1.
4. Determinar la  $CE_{m\acute{a}x}$  de ambos extractos.
5. Obtener por partición, las fracciones de acetato de etilo y acuosas residuales de ambos extractos para su administración en ratones CD-1.
6. Determinación del efecto sobre el tránsito intestinal y el efecto diurético de los metabolitos mayoritarios robustaflavona, 5-metoxi-2,3-dihidro-robustaflavona y amentoflavona comparados contra un fármaco de referencia (furosemida).



### 1.3 HIPÓTESIS.

Estudios previos reportados de los extractos acuosos liofilizados de la “doradilla” (*S. lepidophylla*), demuestran su actividad diurética en animales de laboratorio. Al ser *S. nothohybrida* muy similar en sus características físicas con *S. lepidophylla*, y al expendirse para el mismo fin medicinal, debería tener la capacidad de inducir un efecto diurético en animales de laboratorio, esperando observar el mismo o un efecto biológico similar de ambas especies. Adicionalmente, por estudios previos no reportados, en los cuales se observó que el extracto acuoso de *S. nothohybrida* promueve un incremento en el tránsito intestinal en ratones, se espera que ambas especies mantengan el mismo o un comportamiento similar al ser administrados en animales.





## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, así como un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta. La medicina tradicional mexicana, está asociada fuertemente a las plantas medicinales al ser el recurso más abundante, accesible y conocido (BDMTM, 2010).

Nuestro país se caracteriza por el uso de plantas medicinales desde la época prehispánica, para el tratamiento, prevención y control de diversos padecimientos, dicha tradición ha cobrado gran auge en los últimos años debido principalmente a las malas condiciones económicas que se viven en muchas regiones del territorio nacional, lo cual hace que los medicamentos alopáticos sean inaccesibles para un amplio sector de la población mexicana, quedando como principal alternativa el uso de plantas para el cuidado de la salud.

México es uno de los países a nivel mundial con mayor diversidad de especies vegetales, debido principalmente a su ubicación geográfica que permite tener una gran variedad de paisajes naturales, los cuales van desde bosques tropicales hasta áreas desérticas carentes casi en su totalidad de vegetación, lo cual brinda las condiciones necesarias para que exista la gran diversidad vegetal que se conoce hoy en día.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más del 80% de la población mundial se basa en la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria. El valor medicinal de las plantas se encuentra en algunos de sus productos químicos que son los responsables de inducir una acción fisiológica definida en el cuerpo humano. Los principales compuestos bioactivos de las plantas son alcaloides, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos (Duraipandiyan *et al.*, 2006).



Dentro de la gran diversidad vegetal que se tiene en México, un amplio número de especies son muy utilizadas como diuréticos en la medicina tradicional, algunas de las cuales se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Algunas especies vegetales usadas como diuréticos en la medicina tradicional mexicana.**

<b>Especie vegetal</b>	<b>Usos</b>	<b>Parte utilizada</b>
<b>Ajo</b> <i>Allium sativum</i> L. Liliaceae	Tratamiento del mal de orín, y diurético	Bulbo
<b>Cebolla</b> <i>Allium cepa</i> L. Liliaceae	Como diurético y para el tratamiento de la vesícula	Bulbo
<b>Chicozapote</b> <i>Manilkara zapota</i> L. van Royen Sapotaceae	Diurético.	Semillas
<b>Grama</b> <i>Cynodon dactylon</i> L. Pers. Gramineae	Para aliviar el dolor del riñón.y cuando hay piedras en los riñones.	Planta entera
<b>Jamaica</b> <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. Malvaceae	Diurético y tratamiento del mal de orín.	Flor



**Tabla 1 (Continuación).- Algunas especies vegetales usadas como diuréticos en la medicina tradicional mexicana.**

<b>Marrubio</b> <i>Marrubium vulgare</i> L. Labiatae	Febrífugo, diurético y astringente.	Ramas y hojas
<b>Pingüica</b> <i>Arctostaphylos pungens</i> Kunth Ericaceae	En afecciones renales, como el dolor de riñón, así como diurético.	Planta entera
<b>Sauco</b> <i>Sambucus mexicana</i> Presl Caprifoliaceae	Antiinflamatorio de riñones, desinfectante y diurético.	Flor
<b>Tejocote</b> <i>Crataegus pubescens</i> (Kunth) Steudel Rosaceae	Tratamiento de los riñones, y diurético.	Fruto
<b>Tepozán</b> <i>Buddleja cordata</i> Kunth Loganiaceae	Tratamiento de afecciones renales y diurético.	Corteza

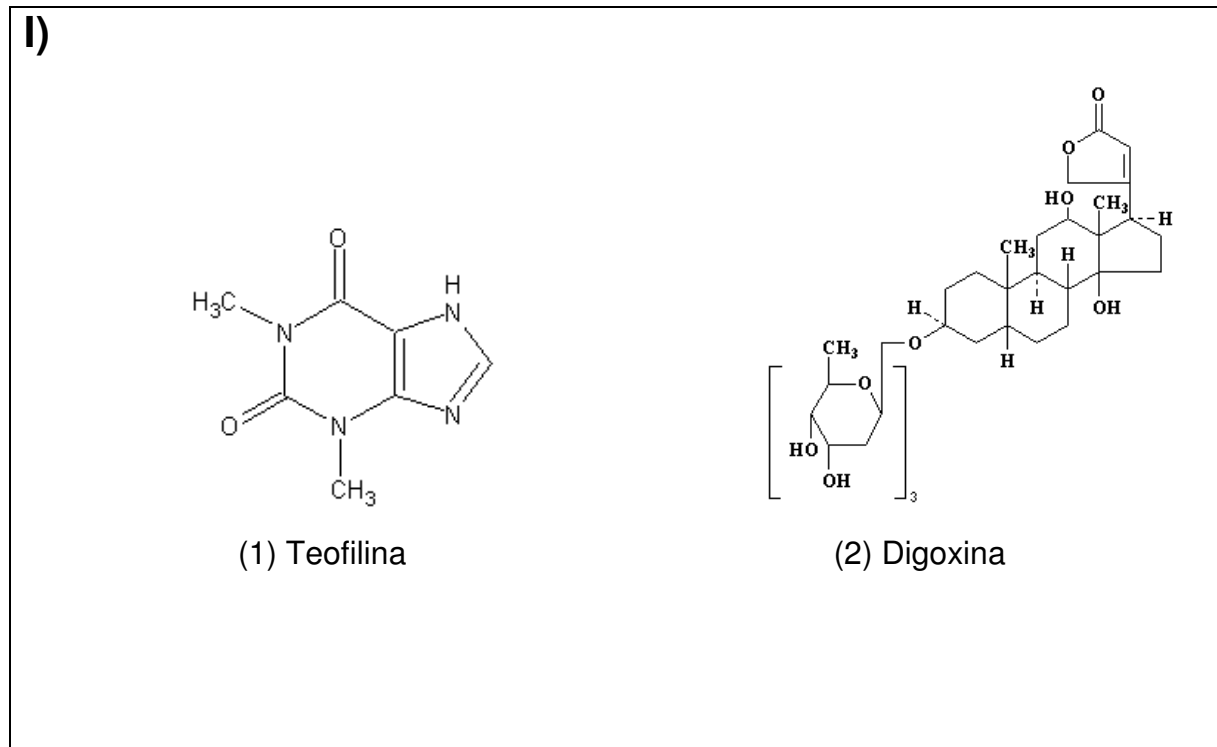
## 2.2. DIURÉTICOS

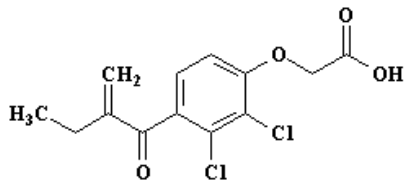
Los diuréticos son aquellas sustancias que incrementan la velocidad de formación de la orina y el volumen de excreción urinaria al aumentar la eliminación renal de sodio, por lo tanto se define como diuresis al incremento en el volumen de orina excretado (Katzung, 1999).



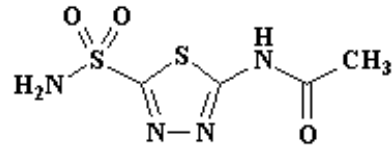
Los fármacos diuréticos se pueden clasificar en cinco tipos (I) fármacos que aumentan la filtración glomerular; metilxantinas (1) y fármacos que mejoran las condiciones circulatorias (2) cardiotónicos, (II) inhibidores de la reabsorción tubular de ciertos electrolitos; bloqueadores de grupos sulfhidrilo (3), inhibidores de la anhidrasa carbónica (4), saluréticos (5), furosemina y análogos (6) antagonistas competitivo de la aldosterona (7), inhibidores de la biosíntesis de la aldosterona (8), bloqueantes de los intercambios sodio-potasio en el túbulo distal (9), otros bloqueadores tubulares (10), (III) diuréticos que aumentan la presión osmótica intratubular; diuréticos osmóticos de tipo iónico (11) y diuréticos osmóticos no iónicos (12), (IV) diuréticos acidificantes; compuestos de amonio (13), cloruro de calcio (14), (V) inhibidores de la liberación de la hormona antidiurética (ADH) agua (15) y etanol (16) (Velasco, 2003).

### Cuadro 1. Clasificación de fármacos diuréticos

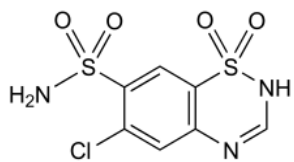


**Cuadro 1.- (continuación) Clasificación de fármacos diuréticos****II)**

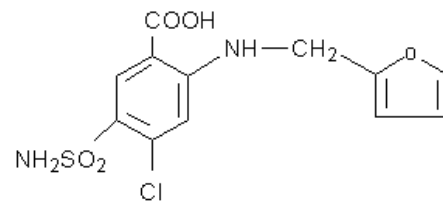
(3) Ácido etacrínico



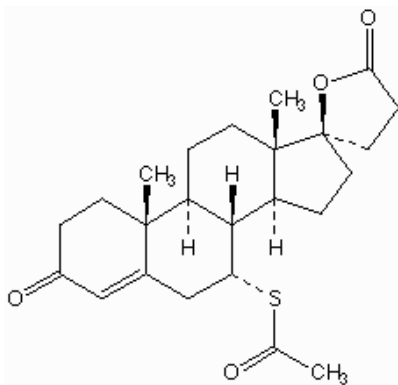
(4) Acetazolamida



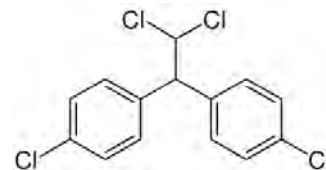
(5) Clorotiazida



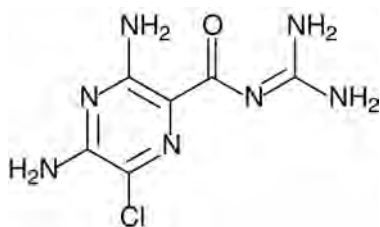
(6) Furoseמידa



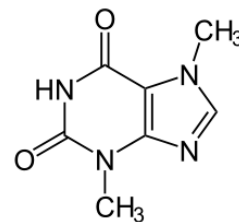
(7) Aldactona A (espirolactona)



(8) DDD (dicloro-difenil-dicloroetano)

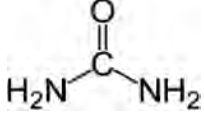
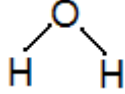
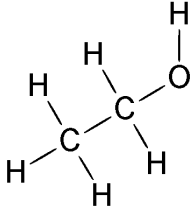


(9) Amilorida



(10) Teobromina

**Cuadro 1.- (continuación) Clasificación de fármacos**

<b>III)</b>	<b>KCl</b> (11) Cloruro de potasio	 (12) Urea
<b>IV)</b>	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b> (13) Cloruro de amonio	<b>Cl—Ca—Cl</b> (14) Cloruro de calcio
<b>V)</b>	 (15) Agua	 (16) Etanol

**2.3. Generalidades de *Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev.) Spring y *Selaginella nothohybrida* Valdespino****2.3.1. *Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev.) Spring**

*Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev.) Spring (Selaginellaceae) es una especie que es muy conocida por su capacidad de reanudar su crecimiento después de años



de deshidratación (Banks *et al.*, 2009). Esta especie vegetal se localiza en lugares cuyo clima sea cálido, semicálido, semiseco y templado (Argueta, 1994).

Entre los trabajos reportados de *S. lepidophylla*, se menciona que la planta es conocida popularmente como “doradilla”, contiene aceite esencial, ácidos orgánicos, disacáridos como la sacarosa y trehalosa (Adams *et al.*, 1990; Martínez, 1996).



**Figura 1.- *S. lepidophylla* planta seca (izquierda), planta en estado de humedad natural (derecha).**

En la medicina tradicional se indica que la infusión o la decocción de la planta entera se utilizan para el tratamiento de cálculos biliares, dolor de riñón y diurético (Aguilar *et al.*, 1999). Un estudio farmacológico realizado para detectar la actividad antibiótica del extracto etanólico de la planta sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mostró ausencia de actividad (Guevara, 2008). La evaluación del efecto diurético de *Selaginella lepidophylla* en rata, indica que el extracto acuoso y el liofilizado de la planta presentan efecto y que en las dosis probadas no presenta toxicidad (Vázquez *et al.*, 2005).



### 2.3.2. *Selaginella nothohybrida* Valdespino

*Selaginella nothohybrida* Valdespino (Selaginellaceae) es una especie que fue encontrada por primera vez en el Estado de Guerrero, se le describe como una planta terrestre de 9-15 cm de diámetro, cuando se encuentra extendida, y que toma forma de roseta cuando se encuentra deshidratada, sus hojas van de amarillo a verde cuando son jóvenes y de amarillo a café cuando envejecen; tienen márgenes serrados o con cilios cortos. Esta especie se caracteriza por su habilidad para resistir periodos de sequedad, al tomar forma de roseta, y reanuda su crecimiento normal cuando el grado de humedad en el ambiente se incrementa, esta planta es normalmente conocida como “planta de resurrección” o “doradilla” (Mickel *et al.*, 1992).



**Figura 2.- *S. nothohybrida* planta seca (izquierda), planta en estado de humedad natural (derecha).**

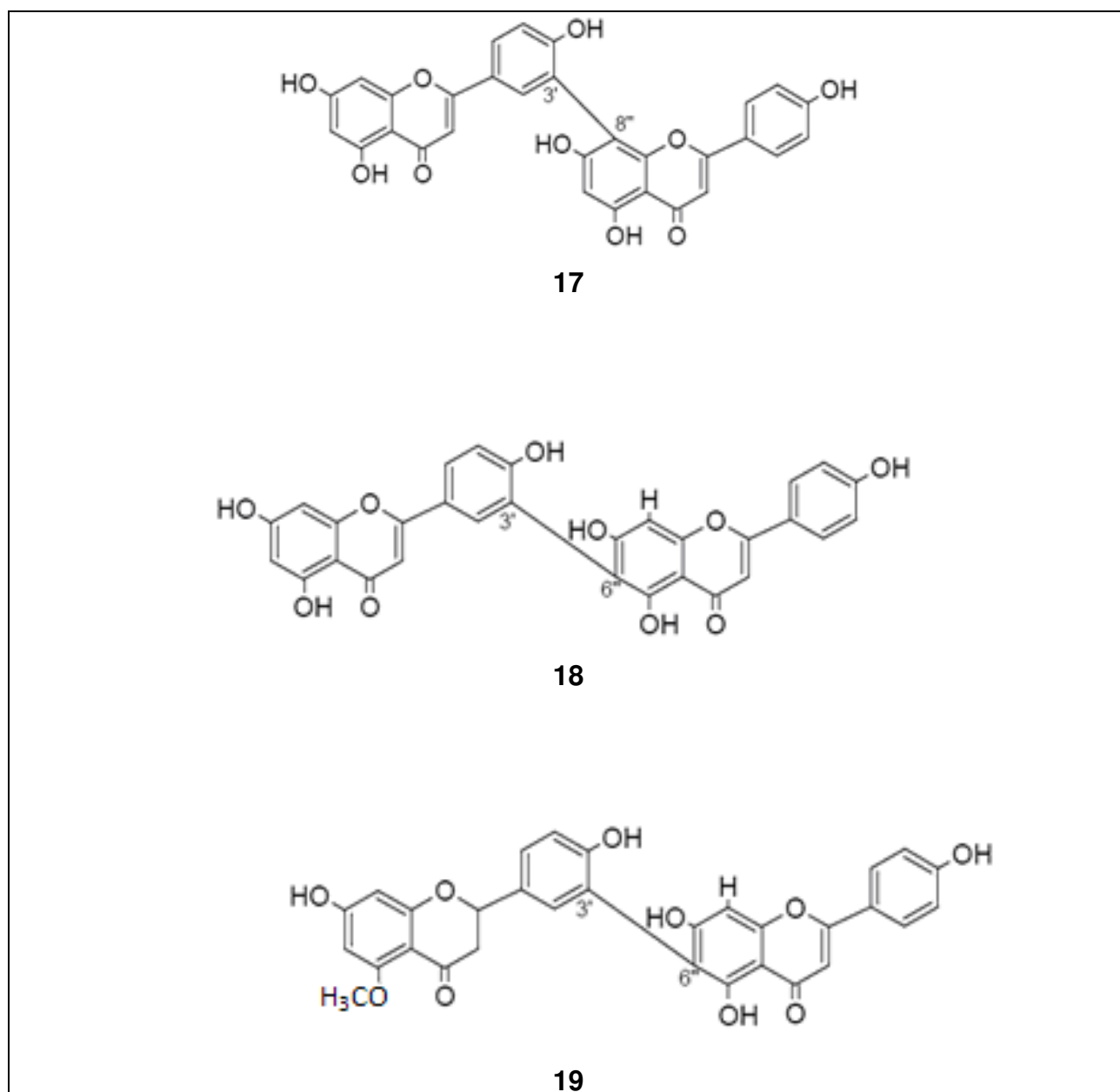
Estudios químicos preliminares sobre la especie *Selaginella nothohybrida* han mostrado la presencia de biflavonoides del tipo de amentoflavona (17), robustaflavona





(18) y 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona (19) (Guevara, 2008; Menchaca, 2009). los cuales también se encuentran presentes en la especie *Selaginella lepidophylla*. La estructura de estos compuestos se presenta en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.- Compuestos aislados de previamente de *Selaginella nothohybrida*.**





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 EQUIPO Y MATERIAL DE LABORATORIO

- Balanza analítica
- Balanza para el pesado de los animales
- Bolsas de residuos biológico-infecciosos
- Bomba de alto vacío
- Cajas metabólicas (Maryland plastics)
- Cronómetro
- Espátula
- Frascos viales
- Guantes de látex desechables
- Jeringas para insulina de 1mL
- Liofilizadora
- Matraz bola de 5L
- Matraz bola de 2L
- Matraces bola de 500mL
- Matraces bola de 50mL
- Pipeta graduada de 10mL
- Rotaevaporador
- Sonda esofágica
- Tapones esmerilados
- Tapones para matraces con salida para liofilizadora

#### 3.2 REACTIVOS

- Acetato de etilo R.A.
- Agua destilada
- Agua inyectable
- Furosemida (Merck)



### 3.3 MATERIAL VEGETAL

La identificación botánica de ambas especies fue realizada por el M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología de la UNAM.

El material vegetal *Selaginella nothohybrida* empleado se adquirió en el anexo del mercado de Sonora de la Ciudad de México, local 173 en agosto del 2005. Una muestra de referencia (SN-0805) se depositó en la colección botánica del Laboratorio 125 del Conjunto “E” de la Facultad de Química de la UNAM.

La especie vegetal *Selaginella lepidophylla* fue recolectada en el Cerro Pájaro, localizado en el km 122, carretera a Putla, por el M. en C. Ramiro Ríos del Departamento de Botánica, FES Zaragoza, UNAM. Una muestra de referencia (SL-0909-03) se depositó en la colección botánica del Herbario FEZA de la FES Zaragoza de la UNAM.

### 3.4 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

**Tabla 2.- Disolventes empleados para la extracción del material vegetal.**

<b>Especie vegetal</b>	<b>Porción vegetal</b>	<b>Disolvente</b>
<i>Selaginella lepidophylla</i> Spring	Planta completa	Agua
<i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino	Planta completa	Agua

Cada una de las especies vegetales (500g) fue sometida a un proceso de decocción con 8 L de agua, el extracto fue filtrado al vacío y concentrado a presión reducida; una vez que el volumen de agua se redujo al mínimo, el concentrado final fue sometido a un proceso de liofilización hasta obtener los extractos secos, los cuales se colocaron en frascos de vidrio sellados, y conservados a temperatura ambiente.



Se realizó una partición a 5 g de cada uno de los dos extractos vegetales, con 10 mL de agua y tres fracciones de 10 mL de acetato de etilo; las fracciones resultantes fracción acuosa residual (FAR) y fracción de acetato de etilo (FAE) se concentraron a sequedad con presión reducida.

### 3.5 ENSAYO BIOLÓGICO

#### 3.5.1 ANIMALES DE LABORATORIO

Se prepararon 9 grupos de 3 ratones macho CD-1 (25-35g de peso corporal) por cada experimento (experimento 1 extractos totales dosis 1 g/kg, experimento 2 extractos totales dosis 2 g/kg, experimento 3 fracciones acuosa residual y de AcOEt dosis 2 g/kg, experimento 4 productos puros dosis 10 mg/kg), mantenidos a temperatura ambiente (22°C) con ayuno de 24 hrs y agua *ad libitum*, como condiciones previas al experimento. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales; Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.



**Figura 3.- Ratones CD-1 marcados para la administración de las diferentes muestras.**



### 3.5.2 MODELO BIOLÓGICO

#### 3.5.2.1.-Preparación de las muestras

Para los extractos totales se prepararon 6 mL de cada una de las dosis administradas, para cada una de las cuales se pesó la cantidad de extracto necesaria para tener las dosis de 1 y 2 g/kg en cada caso ajustándolas a un volumen de 0.5 mL por animal.

#### 3.5.2.2. Determinación del aumento de tránsito intestinal y de la excreción urinaria

La determinación del porcentaje relativo de incremento en el tránsito intestinal se realizó mediante una modificación de los ensayos descritos por Venkatesan y colaboradores, así como por Vogel (Venkatesan *et al.*, 2005; Vogel & Vogel, 2002), con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ relativo de incremento en el tránsito intestinal} = \frac{\text{peso heces muestra} - \text{peso heces del control}}{\text{peso heces del control}} \times 100$$

El efecto diurético de los extractos fue comparado con el grupo de referencia al cual se le administró la furosemida (Mukherjee, 2002), mediante la siguiente ecuación.

$$\text{E.U.} = \frac{\text{orina total}}{\text{líquido total administrado}} \times 100$$

Se administraron por vía oral (p.o.) 0.5 mL de agua inyectable a cada uno de los animales de los grupos controles. Por otra parte, se administraron p.o. dos diferentes dosis de los extractos totales de ambas especies vegetales, una por cada experimento: 1 y 2 g/kg de peso. Dichas concentraciones se ajustaron a un volumen final de 0.5 mL por animal; el seguimiento posterior a la administración se realizó en intervalos de dos



horas cada uno, hasta un tiempo final de 6 horas. Para cada intervalo de tiempo se recolectaron las heces y orina excretada por los diferentes grupos de animales.

Las fracciones acuosas residuales y de acetato de etilo se administraron p.o. a la dosis de 2 g/kg, en los grupos en análisis y como control se administró p.o. agua.

Tres productos puros presentes en ambas especies vegetales (robustaflavona, amentoflavona y 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona) se administraron p.o. a una dosis de 10 mg/kg, y se compararon contra el fármaco de referencia el cual se administró p.o. a una dosis de 10 mg/kg.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Excreción urinaria (efecto diurético) inducida por los extractos totales, fracciones y productos puros.

**Tabla 3.- Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los extractos totales.**

Grupo	n	Volumen de orina (ml)			Excreción urinaria (E.U.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Agua(control)	12	0.47±0.15	1.11(0.64)±0.05	1.39(0.28)±0.05	31	74	93
<i>S. lepidophylla</i> 1 g/kg	3	1.01±0.14	1.61(0.60)±0.17	1.85(0.24)±0.22	67	107	123
<i>S. lepidophylla</i> 2 g/kg	3	0.69±0.06	1.40(0.71)±0.23	2.05(0.65)±0.03	46	93	137
<i>S. nothohybrida</i> 1 g/kg	3	1.10±0.05	1.52(0.42)±0.08	1.95(0.43)±0.11	73	101	130
<i>S. nothohybrida</i> 2 g/kg	3	0.22±0.19	1.43(1.21)±0.25	1.83(0.40)±0.32	15	95	122

Los datos se presentan con el promedio  $\pm$  el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.

**Tabla 4.- Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de las fracciones FAR y FAE.**

Grupo	n	Volumen de orina (ml)			Excreción urinaria (E.U.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Agua(control)	12	0.47±0.15	1.11(0.64)±0.05	1.39(0.28)±0.05	31	74	93
<i>S.l.</i> agua residual 2 g/kg	3	0.33±0.04	0.66(0.33)±0.24	0.86(0.2)±0.19	22	44	57
<i>S.l.</i> AcOEt 2 g/kg	3	0.41±0.11	0.58(0.17)±0.16	0.70(0.12)±0.14	27	39	47
<i>S.n.</i> agua residual 2 g/kg	3	1.39±0.23	1.87(0.48)±0.39	2.20(0.33)±0.33	93	125	147
<i>S.n.</i> AcOEt 2 g/kg	3	1.48±0.19	2.27(0.79)±0.19	2.60(0.33)±0.40	99	151	173

Los datos se presentan con el promedio  $\pm$  el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.



**Tabla 5.- Excreción de orina acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los productos puros.**

Grupo	n	Volumen de orina (ml)			Excreción urinaria (E.U.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Furosemida (referencia) 10 mg/kg	12	1.11±0.04	1.65(0.54)±0.10	2.01(0.36)±0.05	74	110	134
Robustaflavona 10 mg/kg	3	2.11±0.18	2.67(0.56)±0.22	3.02(0.35)±0.29	141	178	201
Amentoflavona 10 mg/kg	3	1.11±0.32	1.21(0.10)±0.31	1.67(0.46)±0.35	74	81	111
5-Metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona 10 mg/kg	3	1.27±0.22	2.30(1.03)±0.10	2.34(0.04)±0.10	85	153	156

Los datos se presentan con el promedio  $\pm$  el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.

#### 4.2 Excreción de heces (tránsito intestinal) de los extractos totales, fracciones y productos puros.

**Tabla 6.- Excreción de heces acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los extractos totales.**

Grupo	n	Peso de heces eliminados (g)			% de aumento de Tránsito Intestinal (% T.I.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Agua(control)	12	0.078±0.023	0.152(0.074)±0.034	0.229(0.077)±0.043	---	---	---
<i>S. lepidophylla</i> 1 g/kg	3	0.082±0.027	0.132(0.050)±0.050	0.199(0.067)±0.048	5	0	0
<i>S. lepidophylla</i> 2 g/kg	3	0.111±0.018	0.211(0.100)±0.031	0.276(0.065)±0.038	43	39	20
<i>S. nothohybrida</i> 1 g/kg	3	0.098±0.040	0.129(0.031)±0.050	0.207(0.078)±0.054	26	0	0
<i>S. nothohybrida</i> 2 g/kg	3	0.106±0.017	0.438(0.332)±0.120	0.604(0.166)±0.137	37	189	164

Los datos se presentan con el promedio  $\pm$  el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.





**Tabla 7.- Excreción de heces acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de las fracciones FAR y FAE.**

Grupo	n	Peso de heces eliminados (g)			% de aumento de Tránsito Intestinal (% T.I.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Agua(control)	12	0.078±0.023	0.152(0.074)±0.034	0.229(0.077)±0.043	---	---	---
S.l. agua residual 2 g/kg	3	0.370±0.095	0.566(0.196)±0.183	0.730(0.164)±0.164	377	273	218
S.l. AcOEt 2 g/kg	3	0.074±0.043	0.109(0.035)±0.040	0.159(0.050)±0.055	0	0	0
S.n. agua residual 2 g/kg	3	0.387±0.195	0.509(0.122)±0.217	0.612(0.103)±0.250	398	236	167
S.n. AcOEt 2 g/kg	3	0.345±0.019	0.525(0.180)±0.030	0.618(0.093)±0.025	345	246	170

Los datos se presentan con el promedio ± el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.

**Tabla 8.- Excreción de heces acumulada de los ratones a 2, 4 y 6 horas después de la administración oral de los productos puros.**

Grupo	n	Peso de heces eliminados (g)			% de aumento de Tránsito Intestinal (% T.I.)		
		2h	4h	6h	2h	4h	6h
Furosemida (referencia) 10 mg/kg	12	0.084±0.014	0.166(0.082)±0.018	0.247(0.081)±0.019	8	10	8
Robustaflavona 10 mg/kg	3	0.174±0.026	0.284(0.110)±0.069	0.326(0.042)±0.062	124	87	42
Amentoflavona 10 mg/kg	3	0.060±0.032	0.132(0.072)±0.068	0.179(0.047)±0.063	0	0	0
5-Metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona 10 mg/kg	3	0.041±0.020	0.134(0.093)±0.020	0.180(0.046)±0.008	0	0	0

Los datos se presentan con el promedio ± el error estándar relativo al promedio, el valor entre paréntesis corresponde al volumen excretado por cada periodo de muestreo.

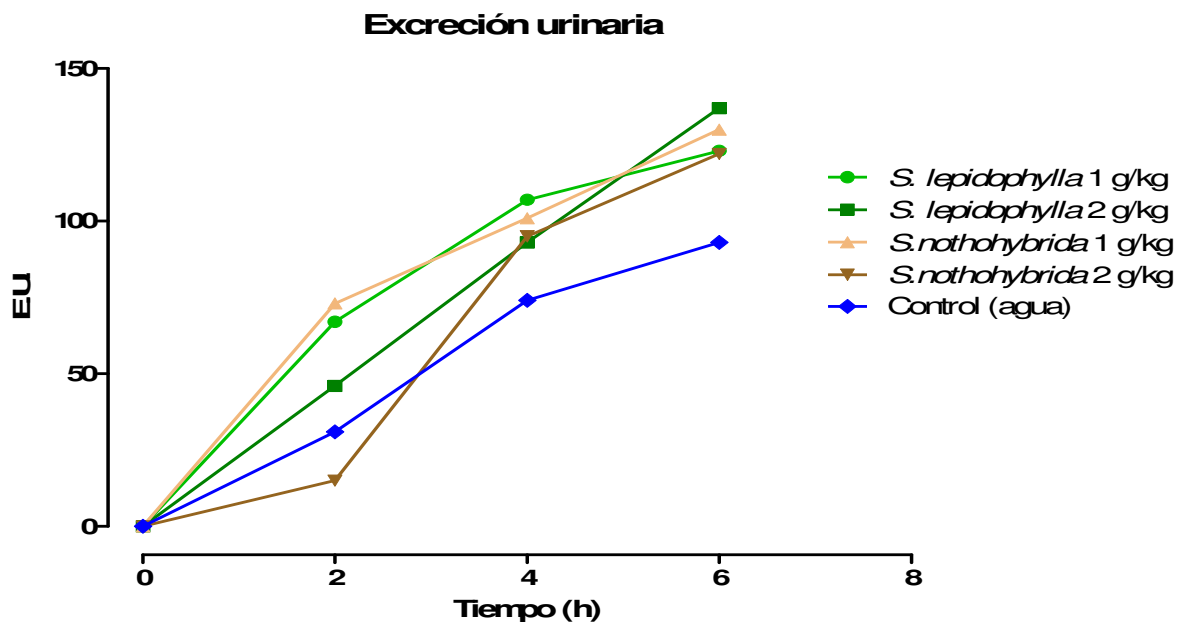


## 5.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

La presente investigación se llevó a cabo en dos etapas. La primera fue la determinación del aumento en la excreción urinaria como indicativo de la actividad diurética. La segunda fue determinar si las especies vegetales modifican la cantidad de heces excretadas.

En la medicina tradicional mexicana las especies vegetales *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida* son usadas indistintamente como agentes diuréticos por lo que con la finalidad de aportar evidencias que sustenten este uso indistinto, en la presente investigación, la determinación de ambos parámetros biológicos está enfocada a determinar si hay o no diferencias entre estas especies y que una sea sustituto de la otra.

### 5.1. Excreción urinaria.

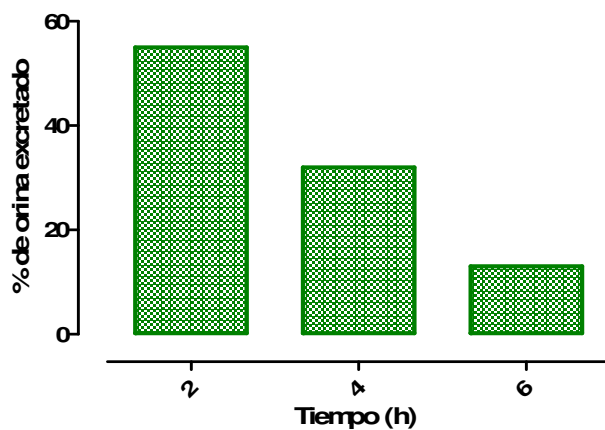


Gráfica 1.- Excreción urinaria (E.U.) acumulada de los extractos totales.



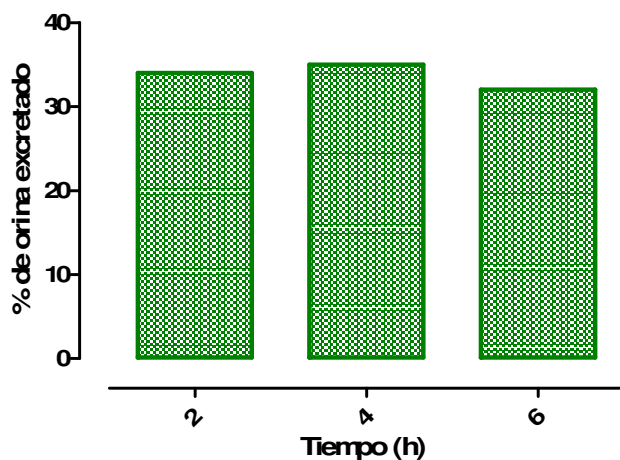
En la Gráfica 1 se observa que ambos extractos vegetales muestran un efecto diurético similar a la dosis de 1 g/kg comparados con el control (agua) y ligeramente diferente a la dosis de 2 g/kg en las cuales se observa un ligero decremento en los volúmenes de orina excretados (efecto diurético).

**Porciento de orina excretado *S. lepidophylla* 1 g/kg**



**Gráfica 2.- Porciento de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de *S. lepidophylla* a la dosis de 1 g/kg.**

**Porciento de orina excretado *S. lepidophylla* 2 g/kg**

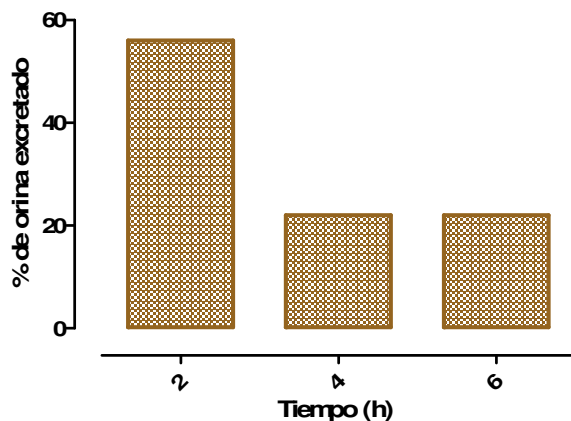


**Gráfica 3.- Porciento de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de *S. lepidophylla* a la dosis de 2 g/kg.**



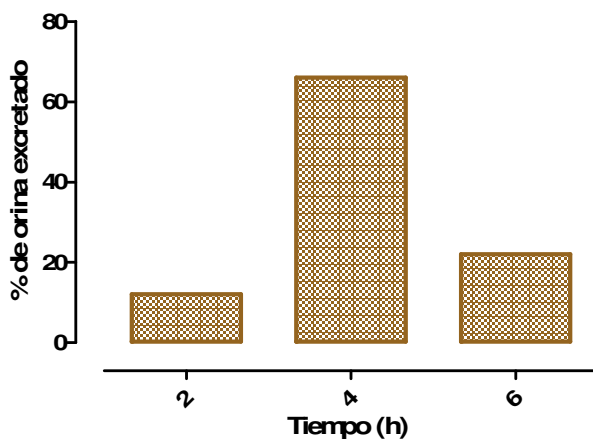
En las Gráficas 2 y 3 se puede ver que el extracto total de *S. lepidophylla* 1 g/kg muestra su mayor efecto a las 2 horas posteriores a la administración y este efecto va disminuyendo gradualmente con el paso del tiempo; mientras que en el caso de la dosis de 2 g/kg el efecto máximo se logra a las 2 horas y este se mantiene casi inalterado durante todo el experimento.

**Porcentaje de orina excretado *S. nothohybrida* 1 g/kg**



**Gráfica 4.- Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de *S. nothohybrida* a la dosis de 1 g/kg.**

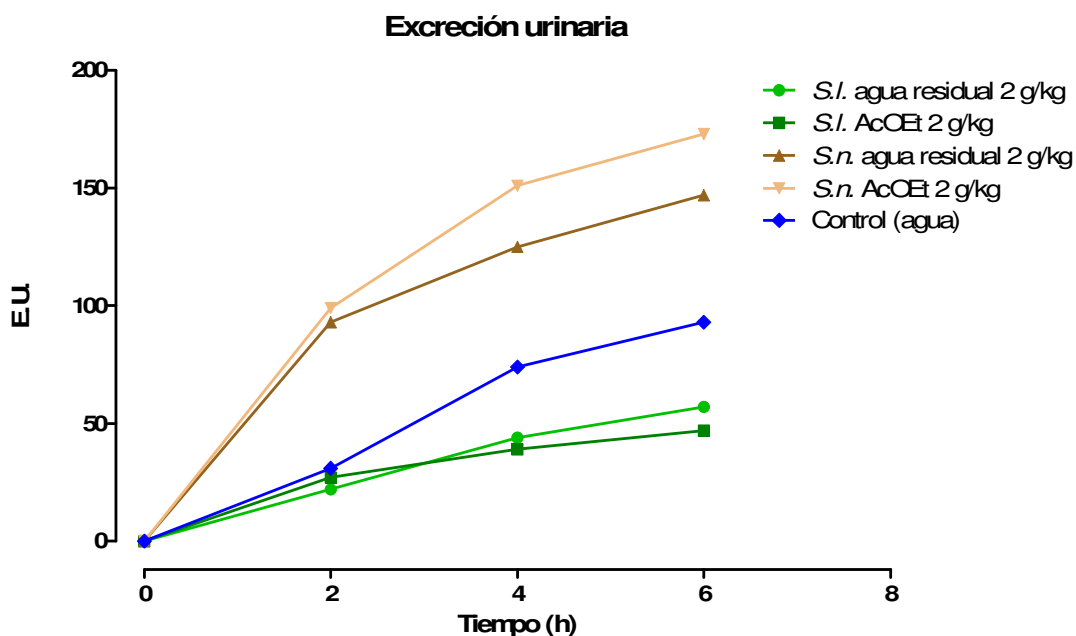
**Porcentaje de orina excretado *S. nothohybrida* 2 g/kg**



**Gráfica 5.- Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del extracto total de *S. nothohybrida* a la dosis de 2 g/kg.**

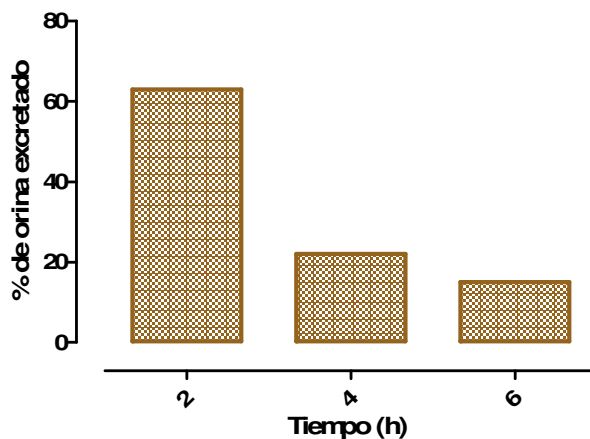
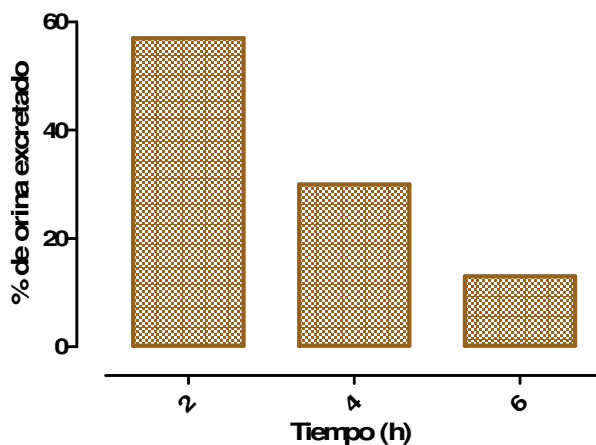


En las Gráficas 4 y 5 se puede ver que el extracto total de *S. nothoxybrida* muestra su mayor efecto en las primeras dos horas después de la administración a una dosis de 2 g/kg y disminuye considerablemente conforme avanza el tiempo; por otro lado podemos ver que a la dosis de 2 g/kg el efecto máximo se presenta a las cuatro horas posteriores a la administración y que este efecto disminuye de manera notable con el paso del tiempo.



**Gráfica 6.- Excreción urinaria acumulada por administración de las fracciones FAR y FAE.**

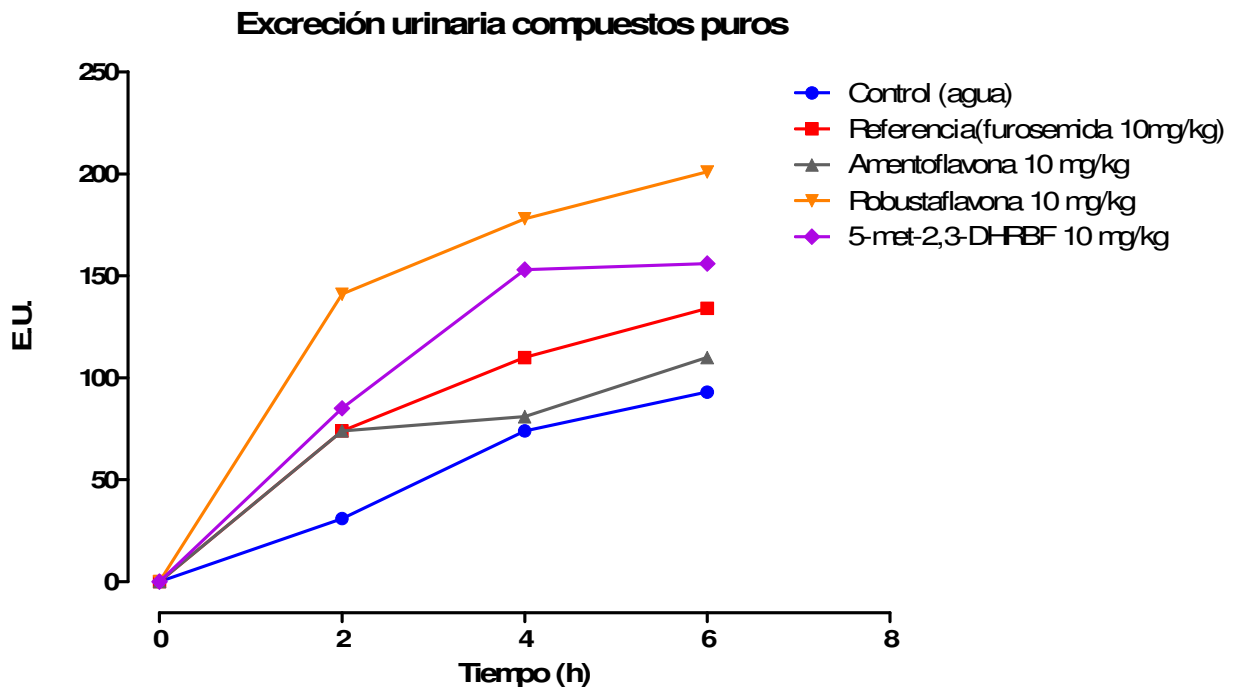
En la Gráfica 6 podemos observar que de las fracciones obtenidas de la partición de agua-AcOEt, las correspondientes a la especie *S. lepidophylla* no muestran ningún efecto; mientras que las FAR y FAE de la especie *S. nothoxybrida* muestran un efecto diurético considerable al compararlas con el control.

**Porcentaje de orina excretado *S. nothoxybrida* FAR****Gráfica 7.- Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración de la FAR de *S. nothoxybrida*.****Porcentaje de orina excretado *S. nothoxybrida* FAE****Gráfica 8.- Porcentaje de orina excretado a los diferentes tiempos por administración de la FAE de *S. nothoxybrida*.**

En las Gráficas 7 y 8 se puede ver que ambas fracciones tienen un efecto similar ya que en ambos casos el efecto máximo se presenta a las dos horas y que dicho efecto va disminuyendo conforme pasa el tiempo.

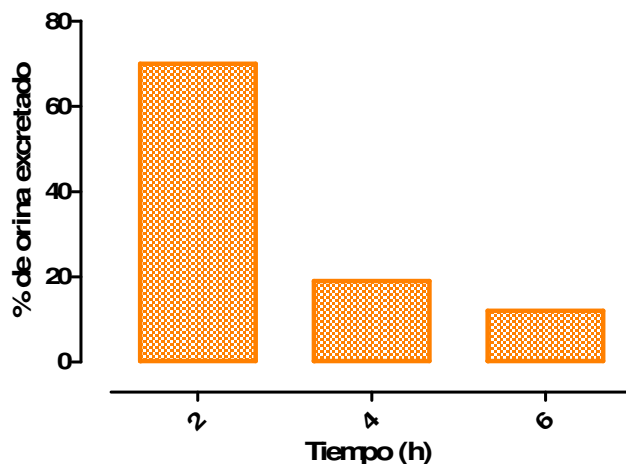


Los metabolitos mayoritarios puros de ambas especies (robustaflavona, amentoflavona y 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona) fueron aislados previamente, y fueron estudiados con el mismo tipo de bioensayos.



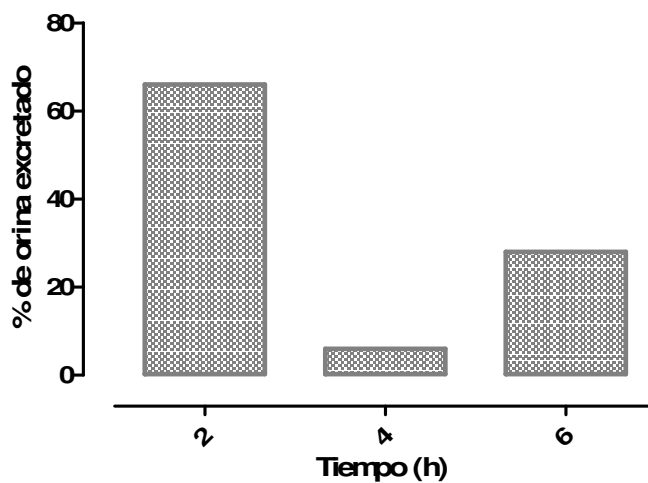
**Gráfica 9.- Excreción urinaria acumulada de los compuestos puros comparados con el control y la referencia.**

En la Gráfica 9 se observa que los tres compuestos puros estudiados producen efecto diurético, siendo la amentoflavona la que presenta la menor actividad, estando sólo en las primeras dos horas con los mismos niveles de excreción que la referencia (furosemida) y por debajo de esta conforme pasa el tiempo de muestreo, mientras que la robustaflavona y la 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona están en todo momento por encima de los valores de excreción de la referencia.

**Porciento de orina excretado robustaflavona**

**Gráfica 10.- Porciento de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro robustaflavona.**

En la Gráfica 10 se observa que la robustaflavona presenta su efecto máximo a las 2 horas y que este efecto disminuye notablemente con el paso del tiempo.

**Porciento de orina excretado amentoflavona**

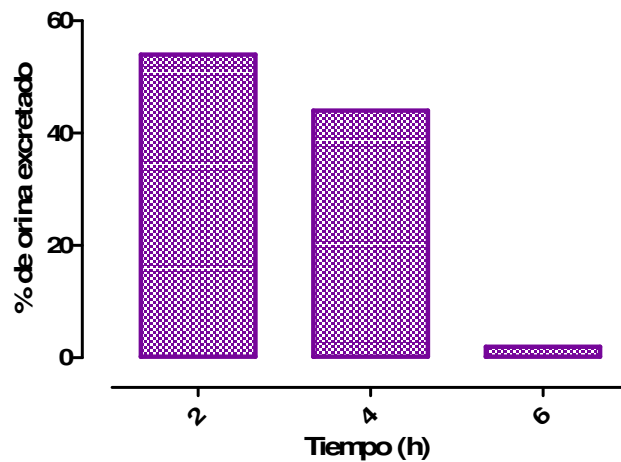
**Gráfica 11.- Porciento de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro amentoflavona.**





En la Gráfica 11 se observa que la amentoflavona tiene su efecto máximo a las dos primeras horas y que este efecto disminuye drásticamente a las cuatro horas y que se incrementa nuevamente a las seis horas.

**Porcentaje de orina excretado 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona**

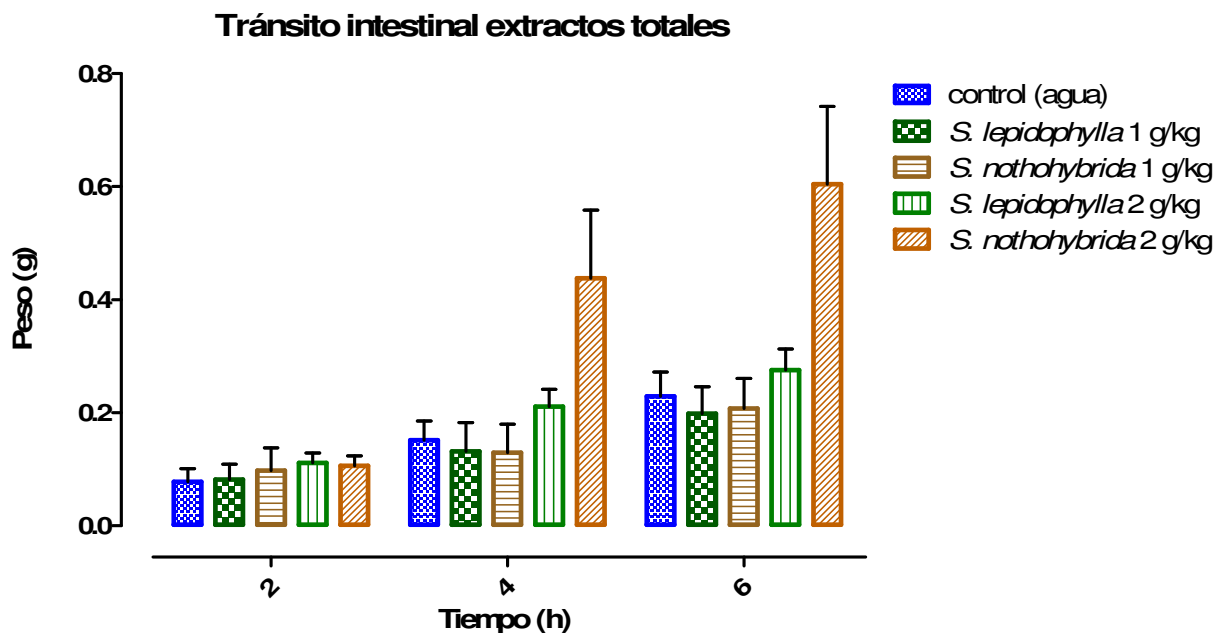


**Gráfica 12.- Porcentaje de orina excretado a diferentes tiempos por administración del producto puro 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona.**

En la Gráfica 12 podemos ver que la 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona tiene su efecto máximo a las 2 horas y que este efecto disminuye ligeramente a las cuatro horas para ser prácticamente ausente a las seis horas.



## 5.2 Excreción de heces.

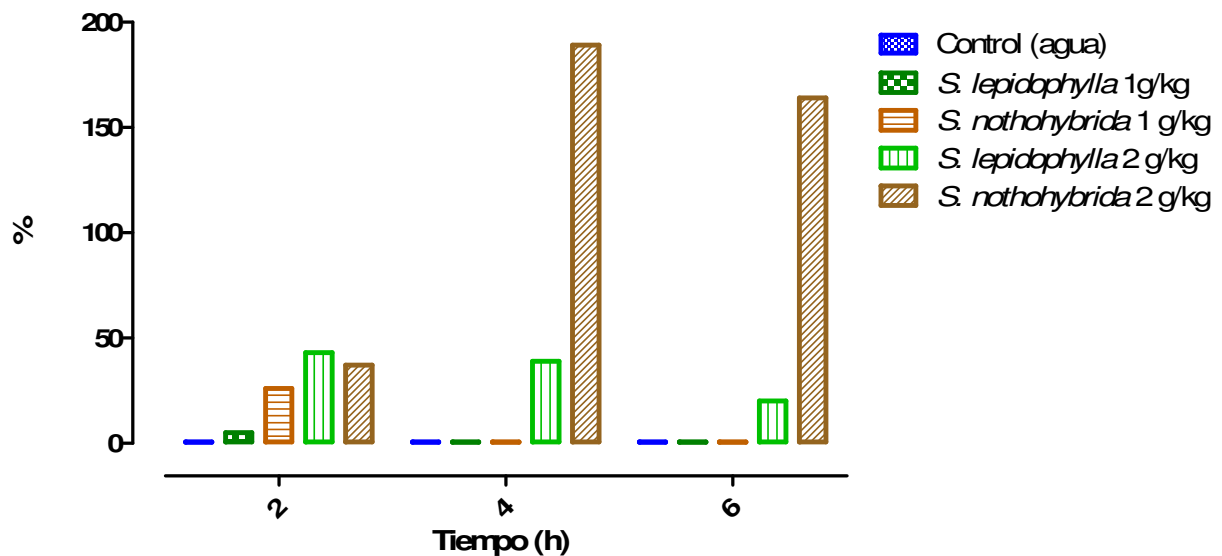


**Gráfica 13.- Tránsito intestinal de los extractos totales comparados con el control; las barras de error corresponden al error estándar relativo al promedio.**

En la Gráfica 13 se puede ver que se presenta un incremento similar en la excreción de heces a las 2 y 4 horas excepto *S. nothohybrida* 2 g/kg la cuál a partir de las 4 horas es su efecto es mayor.

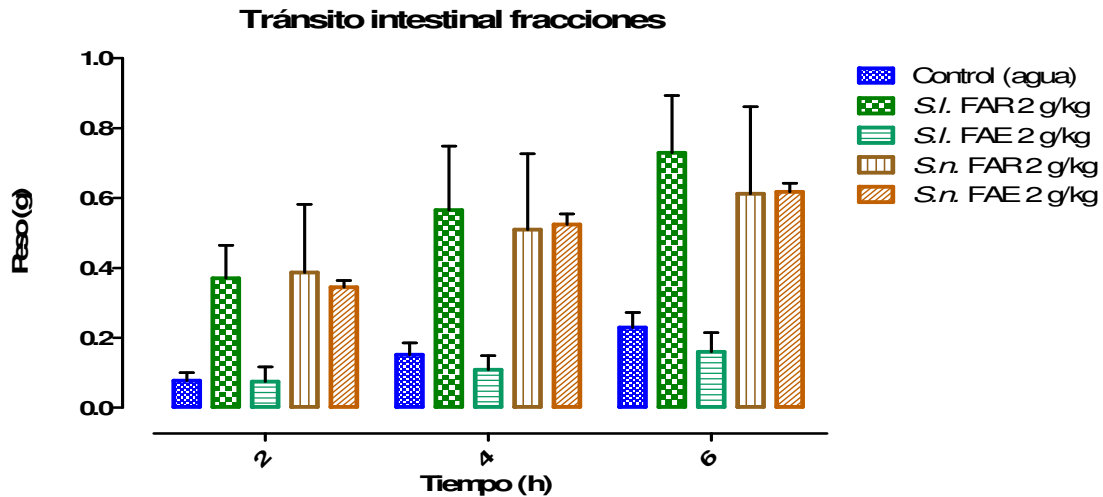


### Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal



**Gráfica 14.- Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de los extractos totales considerando al control como 0%.**

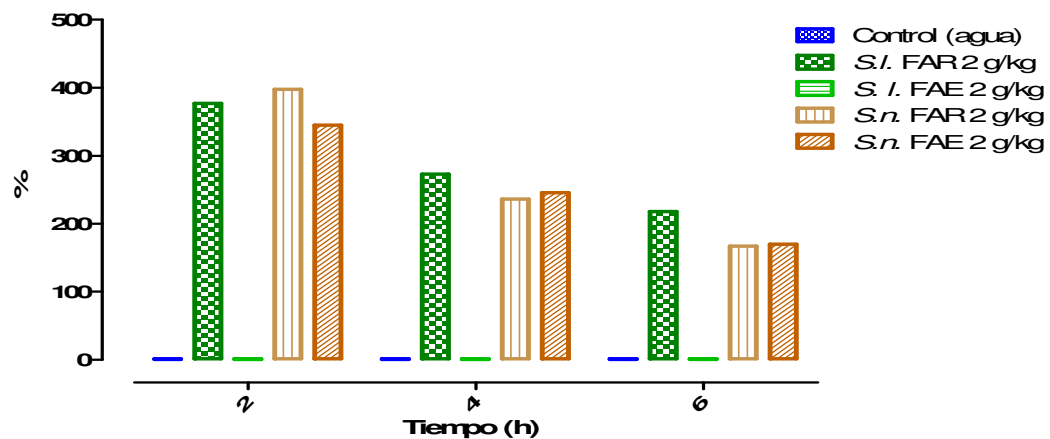
En la Gráfica 14 podemos ver que la especie *S. nothohybrida* a la dosis de 2 g/kg presenta el mayor incremento en las heces excretadas y que el mayor efecto se presenta a las cuatro horas posteriores a la administración del extracto y que dicho efecto disminuye a las seis horas, mientras que la especie *S. lepidophylla* tiene su mayor incremento en la excreción de heces a las 2 horas el cual se mantiene hasta las cuatro horas y disminuye a las seis horas; es de notar que en ambas especies el efecto es mínimo a la dosis de 1 g/kg ya que sólo se observa ligeramente a las dos horas y desaparece posteriormente.



**Gráfica 15.- Tránsito intestinal (heces excretadas) con las fracciones de los extractos, comparadas con el control, las barras de error corresponden al error estándar relativo al promedio.**

En la Gráfica 15 podemos observar que de las fracciones obtenidas de la partición agua-AcOEt de ambas especies todas presentan un incremento en la excreción de heces con excepción de la fracción de AcOEt de *S. lepidophylla* la cual no presentó ningún incremento.

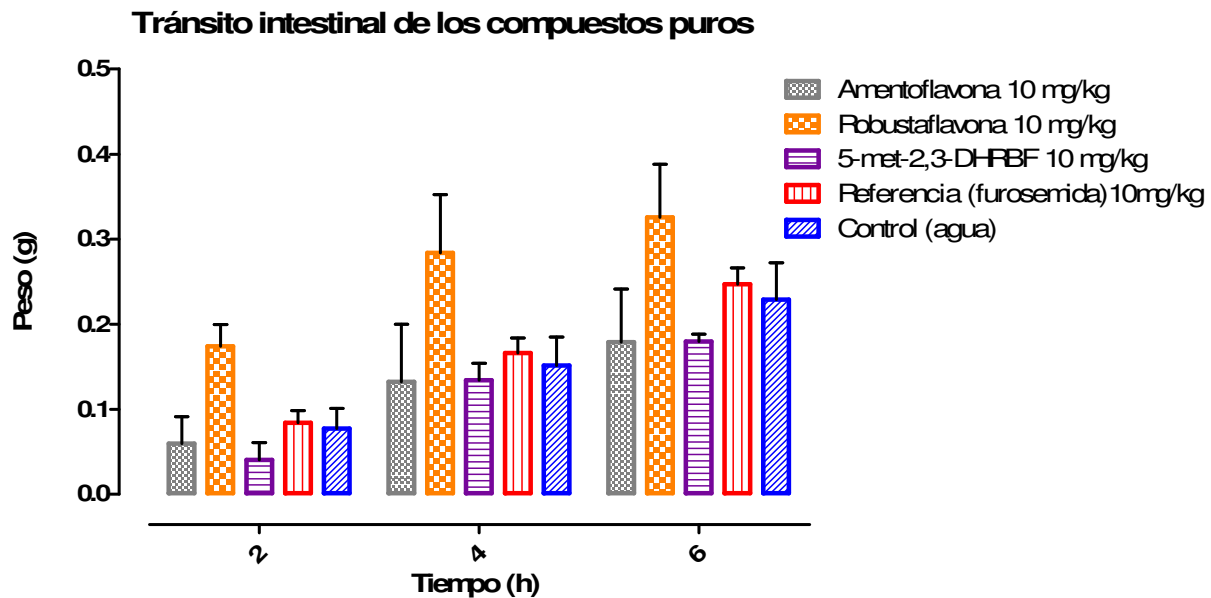
**Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal de las fracciones**



**Gráfica 16 Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de las fracciones FAR y FAE comparadas con el control.**



En la Gráfica 16 podemos ver que en el caso de las tres fracciones que presentaron actividad, el efecto máximo se presentó a las dos horas siendo el mayor el correspondiente a la fracción acuosa residual de *S. nothoxybrida* y que dicho efecto disminuyó gradualmente hasta la última determinación; es de notar que el efecto disminuye de manera más lenta en la fracción acuosa residual de *S. lepidophylla* en la cual, a pesar de que disminuye, se mantiene por encima de las fracciones de *S. nothoxybrida* a partir de las cuatro horas.

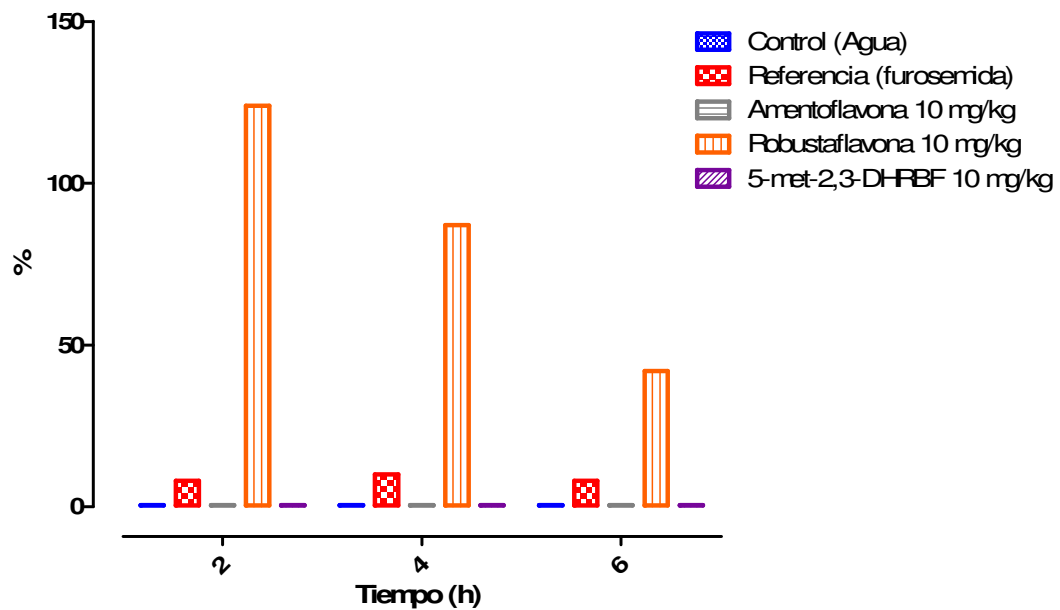


**Gráfica 17.- Tránsito intestinal de los compuestos puros comparados contra el control y contra la referencia, las barras de error corresponden al error estándar relativo al promedio.**

En la Gráfica 17 podemos ver que de los tres compuestos puros analizados solo la robustaflavona muestra un incremento en la cantidad de heces excretadas.



### Porcentaje de incremento en el tránsito intestinal de los compuestos puros



**Gráfica 18.- Porcentaje de incremento de tránsito intestinal (heces excretadas) por administración de los compuestos puros considerando al control como cero.**

En la Gráfica 18 se observa que la robustaflavona muestra su máximo efecto a las dos horas y que dicho efecto disminuye gradualmente conforme pasa el tiempo, es de notar que la referencia utilizada en diuresis muestra un ligero incremento en la cantidad de heces excretadas y que dicho efecto se mantiene casi constante en todo el experimento.



## 6.- CONCLUSIONES

- Los extractos de las especies vegetales *Selaginella lepidophylla* y *S. nothohybrida* estudiadas presentan un incremento en la excreción de orina y en la excreción de heces lo cual sustenta el que se expendan indistintamente.
- El mayor incremento de la excreción urinaria del extracto total de la especie vegetal *S. lepidophylla* se tiene a las dos horas a la dosis de 1 g/kg, mientras que el incremento máximo a la dosis de 2 g/kg se logra a partir de las dos horas y se mantiene hasta las seis horas; por otra parte el extracto total de *S. nothohybrida* alcanza el máximo incremento en la excreción de orina a las dos horas con la dosis de 1 g/kg y a las cuatro con la dosis de 2 g/kg.
- El efecto de incremento en la excreción de heces de los extractos totales se presenta a una dosis de 2 g/kg en ambas especies vegetales, siendo *S. nothohybrida* mucho más activa que *S. lepidophylla* a partir de las cuatro horas.
- Por los resultados observados en el experimento correspondiente a la evaluación de las fracciones acuosas residuales y de AcOEt, se puede suponer que existen diferencias en los componentes químicos responsables de las actividades biológicas evaluadas.
- Los compuestos mayoritarios robustaflavona y 5-metoxi-2,3-dihidrorobustaflavona aislados de la especie vegetal *S. nothohybrida* presentes en ambas especies son algunos de los compuestos responsables del efecto diurético del preparado tradicional medicinal (decocción).
- El metabolito mayoritario robustaflavona aislado de la especie vegetal *S. nothohybrida* presente también en la especie *S. lepidophylla* es uno de los



compuestos responsables del efecto de incremento en la excreción de heces del extracto total.





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R.P., Kartha, K., 1990. Comparison of free sugar in growing and dissected plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18:107-10.
- Aguilar, A., López M., Xolalpa, S., 1999. Herbolaria Mexicana Guías Prácticas: Centro de México. Ediciones México Desconocido, 5:14-19.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, 1:575-76.
- Banks, A., 2009. *Selaginella* and 400 Million Years of Separation, *Annual Review of Plant Biology*, 60:223-38.
- Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S., 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *Complementary and Alternative Medicine*, 6:35.
- Guevara, M. 2008. Caracterización química y biológica de biflavonoides de *Selaginella lepidophylla* Spring Tesis de licenciatura (QFB), Facultad de Química, UNAM.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Grama&id=7555> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Marrubio&id=7620> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ping%C3%BCica&id=7917> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Sauco&id=7491> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tejocote&id=7778> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tepoz%C3%A1n&id=7784> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.



- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hierba del sapo&id=7586](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Hierba del sapo&id=7586</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Doradilla&id=7393](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Doradilla&id=7393</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Gramma&id=7555](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Gramma&id=7555</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Marrubio&id=7620](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Marrubio&id=7620</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ping%C3%BCica&id=7917](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Ping%C3%BCica&id=7917</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Sauco&id=7491](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Sauco&id=7491</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tejocote&id=7778](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Tejocote&id=7778</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tepoz%C3%A1n&id=7784](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Tepoz%C3%A1n&id=7784</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hierba del sapo&id=7586](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Hierba del sapo&id=7586</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Doradilla&id=7393](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=<u>Doradilla&id=7393</u>) fecha de consulta 2 de mayo de 2010.
- Katzung, G., 1999. Farmacología Básica y Clínica. 7ª edición, edit. El Manual Moderno, México, pp 287.
- Menchaca, C. 2009. Aislamiento e identificación estructural de biflavonoides adicionales contenidos en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* Spring (Selaginellaceae) Tesis de licenciatura (QFB), Facultad de Química, UNAM.
- Mickel, J., Valdespino, I., 1992. Five new species of *Pteridophytes* from Oaxaca, México, Brittonia, 44: 312-321.



- Teshome, Nedi., Negussu, M., Kelbessa, U., 2004. Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 57-61.
- Vázquez, R., 2004. Estudio Etnobotánico de *Selaginella lepidophylla* (Hook. Et Grev.) Spring (Selaginellaceae-Pteridophyta) en una comunidad en el municipio de Huamantla, Tlaxcala y evaluación del efecto diurético en rata. Tesis profesional, Químico Farmacéutico Industrial. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Vázquez, R., Melendez, C., Arreguín, S., 2005. Estudio etnobotánico de *Selaginella lepidophylla* (Hook. Et Grev.) Spring (Selaginellaceae-pteridophyta) en San José Xicohténcatl municipio de Huamantla, Tlaxcala, México, *Polibotánica*, 19:105-15.
- Velasco, M. 2003, *Farmacología Fundamental*. 1ª edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana. España, pp 461, 462.
- Venkatesan, N., Thiyagarajan, V., Narayanan, S., Arul, A., Raja, S., Vijaya, S.G., Rajarajan, T., Britto J., 2005. Anti-diarrhoeal potencial of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 8 (1):39-45.
- Vogel, H.G., Vogel, W H. 2002. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 2nd Ed. Springer, Germany, pp 875, 876.