



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“Estudio fitoquímico y analítico comparativo por UPLC/MS de cuatro especies medicinales del género
Selaginella”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. NANCY LARA ALMAZÁN



TUTOR: Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents

México 2014

Facultad de Química



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

Presidente	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	M. en C. Emma Maldonado Jiménez
Vocal	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez
Vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

PARTE DE ESTE TRABAJO SE PRESENTÓ EN LOS SIGUIENTES EVENTOS CIENTÍFICOS:

- Sociedad Química de México, 48° Congreso Mexicano de Química, celebrado en Guanajuato, Gto., 31 de agosto al 4 de septiembre, 2013. “PERFIL FITOQUÍMICO DE *SELAGINELLA wrightii*. ANÁLISIS DE BIFLAVONOIDES EN CUATRO ESPECIES MEXICANAS DE *SELAGINELLA* POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-MASAS (UPLC/MS)”.
- QUIMIUNAM 2013, en la modalidad cartel con el título “PHYTOCHEMICAL PROFILE OF *SELAGINELLA wrightii*. ANALYSIS OF BIOFLAVONOIDS IN FOUR MEXICAN SPECIES OF *SELAGINELLA* BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS (UPLC / MS).

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.
- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios (271123).
- Principalmente a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por permitirme trabajar en su grupo, brindarme su apoyo incondicional y guiarme en el desarrollo del proyecto. Gracias sobre todo por su tiempo y paciencia.
- A los miembros del jurado de examen de grado, Dra. Rachel Mata Essayag, M. en C. Emma Maldonado Jiménez, M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, Dr. José Fausto Rivero Cruz por sus valiosas aportaciones para la corrección del trabajo de tesis.
- Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros IR y RMN, Q. Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta y M. en C. Rosa Isela del Villar.
- A la QFB Margarita Guzmán por la realización de los análisis de UPLC/MS.
- Al M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional de México por la identificación botánica del material vegetal.
- Al M. en C. Alberto Cedillo Cruz por su apoyo durante el desarrollo de la tesis y su valiosa asesoría académica.
- Al M. en C. Gerardo David Anaya Eugenio, por la valiosa orientación durante el desarrollo de las pruebas de toxicidad.
- A la Dra. María Isabel Chávez Uribe del Instituto de Química por la asesoría para el procesamiento experimental por RMN-¹H de la isocriptomerina.
- A la Q.F.B. Jessica Granados Pineda y al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por la valiosa orientación en el desarrollo de las pruebas antioxidantes.
- A los profesores participantes en el programa de posgrado, por los conocimientos adquiridos en sus excelentes cátedras.
- La DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM), Proyecto IN223411.
- Al PAIP (Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado) por el proyecto 4390-01.

DEDICATORIAS

Quiero dedicarle este proyecto, así como cada cosa que hago en la vida a mi mami, que aunque físicamente no está conmigo, ella es mi mayor motivación para seguir a adelante **TE AMO**.

A mi papa, mi abuelita y a mis hermanas: Haydee, Jessica y Nayeli, por estar siempre conmigo y apoyarme en todo momento.

A José Alfredo, Leo, Uli, y Renata por que en cada sonrisa me recuerdan por qué vale la pena vivir.

A Alvaro por todo el apoyo y motivación que siempre me ha brindado.

A mis amig@s Alma, Dulce, Tati, Chino, Gonzalo, Wendy, Hugo, Julio, Cristian y Elba por todo el apoyo que me han brindado y sobre todo por ser excelentes personas y amigos.

NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO COMO UNA OBLIGACIÓN, SINO COMO UNA OPORTUNIDAD PARA PENETRAR EN EL BELLO Y MARAVILLOSO MUNDO DEL SABER (Albert Einstein).



Índice

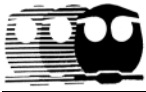
Lista de Esquemas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tablas	iv
Lista de Abreviaturas	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Familia Selaginellaceae	5
1.2 Género <i>Selaginella</i>	5
1.3 Características de cuatro especies del género <i>Selaginella</i> : <i>S. lepidophylla</i> , <i>S. nothohybrida</i> , <i>S. pallescens</i> y <i>S. wrightii</i>	7
1.4 Usos medicinales de las selaginelas	9
1.5 Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos de las selaginelas.	11
1.6 Biflavonoides	16
1.6.1 Estructura química	16
1.6.2 Clasificación	16
1.6.3 Biosíntesis	18
1.6.4 Función en las plantas	21
1.6.5 Aplicaciones.....	21
1.7 Actividad antioxidante de flavonoides	21
1.7.1 Actividad antioxidante: ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPP)	22
1.8 Toxicidad de extractos de plantas.	23
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1 Hipótesis	27
3.2 Objetivo general.....	27
3.3 Objetivos particulares	27



4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
4.1 Procedimientos generales de análisis.	28
4.1.1 Análisis cromatográficos por CCD y CCA.....	28
4.1.2 Análisis cromatográficos por CLAE	28
4.1.3 Análisis cromatográficos por el método de UPLC/MS	29
4.1.4 Prueba cualitativa de Folin-Ciocalteu para determinación de fenoles. 30	
4.1.5 Caracterización de los productos naturales.....	30
4.2 Obtención de metabolitos secundarios de las especies <i>S. pallescens</i> y <i>S. wrightii</i>	30
4.2.1. Material vegetal	30
4.2.2 Preparación de extractos (orgánicos y acuosos).	31
4.2.3 Fraccionamiento por reparto de extractos orgánicos.	31
4.2.4 Estudio fitoquímico de <i>S. pallescens</i>	32
4.2.4.1 Obtención de ácido eucómico (1) por hidrólisis del extracto acuoso total de <i>S. pallescens</i>	32
4.2.4.2 Fraccionamiento del extracto orgánico total de <i>S. pallescens</i>	34
4.2.5 Estudio fitoquímico de <i>S. wrightii</i>	36
4.2.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico total de <i>S. wrightii</i>	36
4.2.5.2 Fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo obtenida por reparto del extracto total de <i>S. wrightii</i>	37
4.2.5.3 Fraccionamiento de la fracción de cloroformo obtenida por reparto del extracto total de <i>S. wrightii</i>	38
4.3 Análisis comparativo del perfil fitoquímico de extractos acuosos de cuatro especies de <i>Selaginella</i> por CCD, CLAE y UPLC/MS.	40
4.3.1 Procesamiento de los extractos acuosos totales para su análisis cromatográfico de líquidos.	42
4.4 Análisis de estabilidad de biflavonoides en extractos acuosos procesados de cuatro especies de <i>Selaginella</i> por CLAE.	41
4.5 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos orgánicos de cuatro especies de <i>Selaginella</i> por el método de UPLC/MS.	41



4.6 Capacidad antioxidante de extractos acuosos totales de cuatro especies de <i>Selaginella</i> y de compuestos puros: ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).	42
4.7 Evaluación de la toxicidad aguda en ratones, del extracto acuoso total de <i>Selaginella nothohybrida</i>	43
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
5.1 Estudio fitoquímico del extracto orgánico y acuoso de <i>S. pallescens</i>	44
5.1.1 Aislamiento y elucidación estructural de ácido eucómico (1)	44
5.1.2 Aislamiento de amentoflavona (2) y bilobetina (3).	47
5.2 Estudio fitoquímico del extracto orgánico de <i>S. wrightii</i>	47
5.2.1 Aislamiento de amentoflavona (2), robustaflavona (4), e isocriptomerina (5).	47
5.3 Determinación de las estructuras de los biflavonoides obtenidos de las especies <i>S. pallescens</i> y <i>S. wrightii</i>	48
5.3.1 Elucidación estructural de amentoflavona (2).	49
5.3.2 Elucidación estructural de bilobetina (3).....	53
5.3.3 Elucidación estructural de robustaflavona (4).....	57
5.3.4 Elucidación estructural de isocriptomerina (5).....	61
5.4 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos acuosos de cuatro especies de <i>Selaginella</i> por CCD, CLAE y UPLC/MS	65
5.5 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos orgánicos de cuatro especies de <i>Selaginella</i> por el método de UPLC/MS.	73
5.6 Pruebas antioxidantes: ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).	77
5.7 Evaluación de toxicidad aguda del extracto acuoso total de <i>Selaginella nothohybrida</i>	81
6. CONCLUSIONES	83
7. BIBLIOGRAFÍA	85
8. ANEXOS	96



Lista de Esquemas

Esquema 1	Procesamiento de plantas completas de selaginela	32
Esquema 2	Fraccionamiento del extracto acuoso total de <i>S. pallescens</i>	33
Esquema 3	Procesamiento del material vegetal completo de <i>S. pallescens</i>	34
Esquema 4	Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>S. wrightii</i>	37
Esquema 5	Procesamiento del material vegetal completo de <i>S. wrightii</i>	39
Esquema 6	Diagrama de obtención del perfil cromatográfico por el método de UPLC/MS de las especies de <i>Selaginella</i>	42



Lista de Figuras

Fig. 1	Especies del género <i>Selaginella</i> : <i>S. lepidophylla</i> (A), <i>S. nothohybrida</i> (B), <i>S. pallescens</i> (C) y <i>S. wrightii</i> (D).....	7
Fig. 2	Descripción del uso medicinal tradicional de “doradilla” en el código Badiano (Martínez, 1989).....	11
Fig. 3	Estructura general de biflavonoides. Monómeros de flavonoides con conexión C-C ó C-O-C.....	16
Fig. 4	Biflavonoides tipo I.....	17
Fig. 5	Biflavonoides tipo II.....	18
Fig. 6	Biosíntesis de biflavonoides (Harborne, 1975).	19
Fig. 7	Reacción entre el radical DPPH' y un antioxidante. Modificado de Dornelles <i>et al.</i> , 2006.....	23
Fig. 8	A) Espectro de RMN- ¹ H de amentoflavona (2) (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆). B) Espectro de RMN- ¹ H de robustaflavona (4) (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆)	49
Fig. 9	Análisis por el método de UPLC/MS de amentoflavona (2).....	52
Fig. 10	Patrón de fragmentación para la amentoflavona (2) por la técnica ESI ⁺	52
Fig. 11	Espectro de RMN- ¹ H de bilobetina (3) (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆)	55
Fig. 12	Correlaciones significativas en los espectros HMBC (A) y NOESY (B) de bilobetina (3).....	55
Fig. 13	Análisis por el método de UPLC/MS de bilobetina (3).....	56
Fig. 14	Patrón de fragmentación para la bilobetina (3) por la técnica ESI ⁺	56
Fig. 15	Análisis por el método de UPLC/MS de robustaflavona (4).....	59
Fig. 16	Patrón de fragmentación para robustaflavona (4) por la técnica ESI ⁺	59
Fig. 17	Estructura tridimensional de amentoflavona (2) [A] y robustaflavona (4) [B] en su estado de mínima energía.....	60
Fig. 18	Espectro de RMN- ¹ H de la isocriptomerina (5) (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	63
Fig. 19	Análisis por el método de UPLC/MS de la isocriptomerina (5).....	64
Fig. 20	Patrón de fragmentación de la isocriptomerina (5) por la técnica ESI ⁺	64
Fig. 21	Perfil fitoquímico de especies de <i>Selaginella</i> en CCD para extractos acuosos totales.....	66



Fig. 22 Cromatogramas de líquidos de los compuestos **2** y **4** y de su coelución.....67

Fig. 23 Cromatogramas: extracto acuoso procesado de *S. nothohybrida* [**A**] y de extracto acuoso procesado de *S. nothohybrida* adicionados con los compuestos **2** y **4** [**B**]. 68

Fig. 24 Cromatogramas por CLAE: extractos acuosos procesados de *S. wrightii*, *S. pallescens* y *S. lepidophylla*. * Asignación correcta. 69

Fig. 25 Cromatogramas por el método de UPLC/MS: perfil fitoquímico de extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii*..... 71

Fig. 26 Cromatogramas de CLAE de extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida*, preparados en 2009 (prueba de estabilidad)..... 72

Fig. 27 Cromatogramas por el método de UPLC/MS: perfil fitoquímico de extractos orgánicos de *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii* (preparados de acuerdo al Esquema 6)..... 75

Fig. 28 Estructura del compuesto (2*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona (**7**). 76

Fig. 29 Cromatograma por el método de UPLC de la (2*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona [**A**], espectro de masas de la (2*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona [**B**], espectro de masas del compuesto (**7**) [**C**]. 76

Fig. 30 Curso temporal de la neutralización del radical DPPH' 78

Fig. 31 Curva de Calibración de Trolox. 79



Lista de Tablas

Tabla 1	Características de cuatro especies de <i>Selaginella</i>	8
Tabla 2	Especies de <i>Selaginella</i> : metabolitos secundarios y actividad biológica.	12
Tabla 3	Tabla de las dosis recomendadas para la segunda etapa en la prueba de toxicidad, de acuerdo a los resultados de la primera etapa.	25
Tabla 4	Condiciones cromatográficas analíticas y preparativas por CLAE para identificación y purificación de compuestos.	29
Tabla 5	Estructura y datos espectroscópicos del ácido eucómico (1).	46
Tabla 6	Estructura y datos espectroscópicos de amentoflavona (2).	50
Tabla 7	Estructura y datos espectroscópicos de bilobetina (3).	54
Tabla 8	Estructura y datos espectroscópicos de la robustaflavona (4).	58
Tabla 9	Estructura y datos espectroscópicos más sobresalientes de la isocriptomerina (5).....	62
Tabla 10	Iones moleculares y fragmentos característicos de biflavonoides por la técnica ESI ⁺	77
Tabla 11	Parámetros de actividad antioxidante para extractos acuosos totales y Trolox como estándar del ensayo de DPPH	80



Lista de Abreviaturas.

Abreviatura	Significado
δ	Desplazamiento químico
ATR	Reflexión total atenuada
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CL	Cromatógrafo de Líquidos
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (¹ H- ¹ H)
D	Doblete
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
HMBC	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de múltiples enlaces.
HSQC	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de correlación simple cuántica.
ICR	Índice relativo de crecimiento
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
kV	Kilovoltio
λ	Longitud de onda
DL₅₀	Dosis letal 50
[M+H]⁺	Pseudo ion molecular
MHz	Mega Hertz
M	Molaridad
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NOESY	Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser
Ppm	Partes por millón



R.A.	Reactivo analítico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno 1
s	Singulete
T	Temperatura
TMS	Tetrametilsilano
t_r	Tiempo de retención
UPLC/MS	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución-espectrometría de masas.
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta- Visible



RESUMEN

La presente investigación se desarrolló como un proyecto enfocado al estudio fitoquímico de las especies vegetales: *Selaginella wrightii* Hieron y *S. pallescens* (Presl.) Spring con amplio uso en la medicina popular de México. Las especies antes mencionadas junto con *S. lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring y *S. nothohybrida* Valdespino forman parte de un complejo de plantas medicinales comúnmente designadas como “doradillas”; sin embargo, no existe información en la literatura especializada que permita justificar el uso y comercialización indistinta de éstas. Se estableció el contenido metabólico de *Selaginella wrightii* y *S. pallescens* mediante un estudio químico y espectroscópico. Se determinaron características espectrométricas distintivas para biflavonoides con enlace tipo C-C y C-O-C. Los metabolitos aislados de *S. pallescens* fueron: ácido eucómico (**1**) amentoflavona (**2**) y bilobetina (**3**); mientras que amentoflavona (**2**), robustaflavona (**4**) e isocriptomerina (**5**) se obtuvieron de *S. wrightii*. La estructura de los compuestos **1** – **5** fue determinada por el análisis de sus espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, por los experimentos adicionales COSY, HSQC, HMBC y NOESY y por sus espectros de masas.

Se establecieron y compararon los perfiles químicos de *Selaginella wrightii* Hieron, *S. pallescens* (Presl.) Spring, *S. lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring y *S. nothohybrida* Valdespino por el método de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución-espectrometría de masas (UPLC/MS). Se concluyó que todas las especies comparten a la amentoflavona (**2**) como compuesto mayoritario. Por primera vez se obtuvo el perfil fitoquímico de la especie *S. wrightii*. Se realizó un estudio sobre la estabilidad de los metabolitos secundarios mayoritarios en los extractos acuosos totales de las especies *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla*, encontrándose que después de cuatro años a temperatura ambiente y sellados con atmósfera de nitrógeno, no tuvieron alteración como fue comprobado por la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Se realizó la prueba de actividad antioxidante DPPH a los extractos acuosos totales de las cuatro especies de *Selaginella* empleadas a lo largo del proyecto, resultando que *S. nothohybrida* generó un mayor porcentaje de neutralización de radicales DPPH[•] (95 %) y *S. wrightii* el menor (37 %). Como compuestos puros mayoritarios, amentoflavona tuvo



mayor capacidad antioxidante (40 %) con respecto a robustaflavona (22 %). Ningún extracto superó la capacidad de neutralización del radical libre DPPH· con respecto al compuesto de referencia (TROLOX). La toxicidad aguda practicada a *S. nothohybrida* como prueba de seguridad, indicó que la planta no tiene efectos tóxicos. Resultando una $DL_{50} > 5000$ mg/kg.



ABSTRACT

This dissertation was focused on the phytochemical study of two widely employed vegetal species in Mexican traditional medicine: *Selaginella wrightii*, and *Selaginella pallescens*. These species together with *Selaginella lepidophylla* and *Selaginella nothohybrida* are part of a medicinal plant complex known as “doradillas”. However, up to date there is no scientific evidence that justify the common medicinal or commercial use of these species. The metabolic contents of *S. wrightii* and *S. pallescens* were established by a chemical and spectroscopic study. Distinctive spectrometric characteristics were also determined for biflavonoids with C-C and C-O-C bond type. Metabolites isolated from *S. pallescens* were eucomic acid (**1**) amentoflavone (**2**) and bilobetin (**3**); and amentoflavone (**2**), robustaflavone (**4**) and isocryptomerin (**5**) from *S. wrightii*. The structure of compounds **1-5** were confirmed by spectroscopic analysis of ^1H and ^{13}C NMR with additional experiments as COSY, HSQC, HMBC and NOESY and by their mass spectra.

The phytochemical profiles of *S. wrightii* Hieron, *S. pallescens* (Presl.) Spring, *S. lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring and *S. nothohybrida* Valdespino were established and compared by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC/MS) method. It was concluded that all species share the amentoflavone (**2**) as the major compound. For the first time it was established the phytochemical profile of the species *S. wrightii*. The stability of the major secondary metabolites in the aqueous extracts of *S. nothohybrida* and *S. lepidophylla* was evaluated after four years of staying at room temperature and sealed with nitrogen, no changes were observed after this time by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The antioxidant activity DPPH test on the aqueous extracts of the four species of *Selaginella* used throughout the project was performed, resulting that *S. nothohybrida* generated a larger percentage of DPPH radical scavenging (95 %) and *S. wrightii* the lowest (37 %). The major pure compound amentoflavone had the higher antioxidant capacity (40 %) and robustaflavone the less (22 %). None of the extracts reached the activity of the reference compound TROLOX. Acute toxicity test as well as chronic toxicity practiced to *S. nothohybrida* as safety tests indicated that the plant has no toxic effects ($\text{LD}_{50} > 5000 \text{ mg / kg}$).



INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se han empleado como alternativa terapéutica, a través de los siglos por diversos grupos étnicos en el mundo. Aunque no existen datos que garanticen la seguridad y eficacia de las plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud ha calculado que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso en alguna medida de éstas para resolver sus necesidades de atención primaria de salud, ya sea como único medio de curación o como medio alternativo. Las plantas contienen compuestos bioactivos conocidos como metabolitos secundarios, que se presentan como una gran variedad de estructuras químicas y un amplio espectro de actividades farmacológicas. Por lo tanto, el estudio químico y biológico de los recursos vegetales permite el descubrimiento de principios activos con acción terapéutica que validan el uso definido de una planta en la medicina tradicional. Estos principios también pueden constituir nuevas fuentes de materias primas que contribuyan al desarrollo de la medicina actual.

A la fecha el número de plantas medicinales que han sido estudiadas químicamente no rebasa el diez por ciento y las evaluadas farmacológicamente no son más de cinco por ciento (Fierro, 2012), por ello en los últimos años se ha intentado tener un mejor aprovechamiento de los productos naturales. Particularmente en México, en 1997, el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 plantas con usos medicinales; entre ellas las doradillas que tienen un uso popular importante para tratar infecciones urinarias y como agentes antimicrobianos (Argueta, 1994). Sin embargo, existen diferentes especies del mismo género que físicamente son similares, de manera que bajo ese nombre se expenden y comercializan indistintamente, sin la garantía de que tengan la misma composición y por tanto el mismo efecto terapéutico, por lo anterior se consideró llevar a cabo un estudio que englobe análisis químicos, farmacológicos, botánicos y analíticos, entre otros, que permitan conocer la composición química y las propiedades terapéuticas de estas especies.



1. ANTECEDENTES

1.1 Familia Selaginellaceae

En esta familia sólo existe un género: *Selaginella*, el cual se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y cuenta con cerca de 700-750 especies (Korall *et al.*, 1999), aproximadamente 40 de las cuales se registraron en México (Lira & Riba, 1996); es uno de los grupos de plantas más primitivos que existen, su registro fósil data del periodo Carbonífero (Korall *et al.*, 1999).

La mayoría de plantas de esta familia crece en un amplio rango de climas, suelo, y regímenes de luz (Korall & Kenrick, 2002). Son plantas primitivas que han sobrevivido a la selección natural sin modificación morfológica significativa, se denominan “plantas de resurrección” ya que enrollan sus hojas y tallos para prevenir la pérdida de agua (Setyawan, 2011). Algunas de estas especies son xerófilas, ya que son capaces de sobrevivir largos periodos de sequía (Korall *et al.*, 1999), otras son ártico-alpinas tolerantes a la congelación (Korall & Kenrick, 2002).

A esta familia pertenecen plantas que no presentan flores o semillas, todas ellas son de porte herbáceo, algunas reciben el nombre común de "doradilla", "flor de piedra", "rosa de Jericó", “siempre viva” y "planta de resurrección" entre otros; algunos de estos nombres son comunes a otras especies de diferentes familias de plantas, lo que puede generar confusión (Velazco, 2009; Martínez, 1978) .

1.2 Género *Selaginella*

Las especies de *Selaginella* junto con las plantas Lycopodiales, Lipodendrales y las Isoetales conforman la clase Lycopodiopsida (Nason, 1980). Esta relación está quimiotaxonómicamente indicada por sus patrones de flavonoides (Voirin & Jay, 1978). Se han reconocido dos grupos principales, uno que contiene a las especies isófilas, que están principalmente en regiones áridas 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 (Korall & Kenrick, 2002).

Son hierbas terrestres, epipétricas, raro epifíticas, generalmente perennes. Tallos delgados, erectos o postrados, a veces arrosados, radiados o dorsiventrales (Martínez, 1997). Es el género más grande que tiene ciclo de vida heterospórico (con megasporas y microsporas), el esporangio se modifica a partir de hojas reproductivas que forman grupos sueltos, libres y abiertos llamados estróbilos. Como todas las licofitas, posee raíces adventicias (originadas en el vástago), las hojas son generalmente de dos tamaños, medianas y pequeñas, estas últimas presentes en sus laterales (Setyawan, 2011)

Las selaginelas tienen diferentes pigmentaciones, como el azul cromático, rojo carmesí, amarillo oro y plata. La diversidad morfológica y la pigmentación son importantes características en su taxonomía (Czeladzinski, 2003). La forma de estrella y estructura del esporangio también se utilizan como características distintivas en cada especie (Quansah, 1988). Sin embargo es difícil determinar cada especie de *Selaginella* debido a la plasticidad que presentan, ya que los factores climáticos, la edad, genotipos, así como la intensidad del sol, causan diferencias en su morfología y contenido químico. La fertilidad del suelo y la humedad pueden influir en la formación de raíces y rizófogos (Setyawan, 2011)

En ciertas especies, hay diferencias por individuo, los de mayor edad pueden tener el color más oscuro que el de los jóvenes o los húmedos, tales como *S. plana* (Lu & Jernstedt, 1996). En otras especies, a veces hay diversas formas y matices de las hojas, por ejemplo, *S. ornata*, que en el pasado se dividió en varias especies (Setyawan, 2009). Esta variación morfológica causa dificultades en la clasificación de selaginelas, y un reto en la investigación.



1.3 Características de cuatro especies del género *Selaginella*: *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii*.

En la Tabla 1 se describen a detalle, los aspectos botánicos, distribución geográfica así como los nombres con los cuales se reconocen las especies: *S. lepidophylla* (A), *S. nothohybrida* (B), *S. pallescens* (C) y *S. wrightii* (D) (Fig. 1).

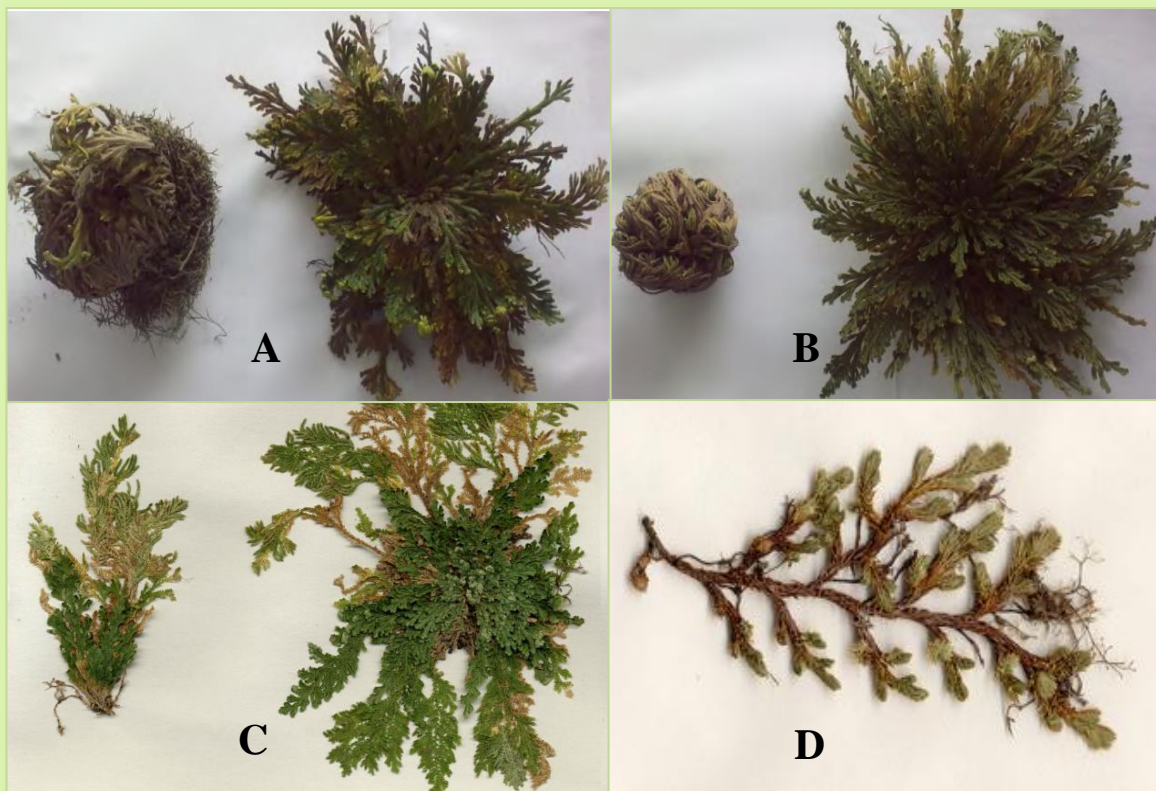


Fig.1 Especies del género *Selaginella*: *S. lepidophylla* (A), *S. nothohybrida* (B), *S. pallescens* (C) y *S. wrightii* (D).



Tabla 1. Características de cuatro especies de *Selaginella*.

Especie	Aspectos Botánicos	Distribución Geográfica	Nombres comunes
<p><i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook.& Grev.) Spring</p>	<p>Son plantas criptógamas que forman rosetas, miden de 10 a 12 cm de largo y de 0.5 a 1 cm de ancho, aparentemente se encuentran sin tallo, sin ápices flageliformes, con raíces sólo en la base, sin rizóforos.</p> <p>Tienen las hojas dimorfas sobrepuestas, cuando se secan se enrollan como bolitas y se extienden cuando húmedas, son verdes heteromorfas de 8.0-10.0 cm largo; hojas laterales oblicuas, de 1.4 a 1.8 mm de ancho y 1.7 a 2.1 mm de largo, ápice obtuso a agudo, base no auriculada, borde denticulado a ciliado; a menudo rojas oscuro a rojo pardusco; hojas viejas rojizas en el envés; hojas medias oblicuamente elípticas a ovadas de 1.1 a 1.5 mm de ancho y 1.2 a 2 mm de largo, ápice obtuso, base con cilios, borde entero a serrulado; hojas axilares oblongas a ovadas de 1.2 a 1.5 mm de ancho y 1.5 a 2 mm de largo, ápice agudo, base no auriculada, borde denticulado; estróbilos de tamaño variable; esporófilas semejantes, ovadas, ápice acuminado, denticulados en el margen; megaesporas amarillentas, generalmente en paquete de 3; microesporas globosas, de color amarillo a anaranjado (Lira & Riba, 1996) (Abundiz & Tejero, 1990).</p>	<p>Sur de Estados Unidos y México. En México distribuida en las zonas secas del norte y centro del país. (Lira & Riba, 1996)</p>	<p>“Planta de la resurrección”, “Rosa de Jericó”, “Siempre viva”, “Flor de peña”, “Coralillo”, “Flor de Piedra”, “Doradilla”, “Flor del roca”. (Argueta, 1994) (Martínez, 1989)</p>
<p><i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino</p>	<p>Planta terrestre o epipétrica, cuando se extiende alcanza un diámetro de 9-15 cm. Tallos de 0.5-1 mm diámetro. Forman rosetas en espiral compactas de la que surgen las ramas laterales con centro en el tallo, enroscadas hacia adentro en seco. Rizóforos ventrales, ramas, de 0,2-0,3 mm diámetro, superficie inferior verdosa sin brillo (de nuevo crecimiento), amarillo-marrón o marrón (cuando viejas), sin manchas rojizas. Hojas laterales (en las ramas primarias), imbricadas, ovadas, ampliamente ovadas-lanceoladas, u ovadas-deltadas, 1.4 a 2.3 x 0.8 -1,4 mm; estróbilos terminales, cuadrangulares de 0.4-1.0 cm de largo. Esporófilos mono mórficos, ovados a ovado-lanceolado, de 1-1,6 x 0,6-0,9 mm, base pubescente, redondeados, con dos curvas; ápice abruptamente largo con fines de cúspide a corto aristado. Se distinguen por sus hojas medianas que tienen márgenes cortos a ciliados (Mickel & Valdespino, 1992).</p>	<p>México: Guerrero (Mickel & Valdespino, 1992)</p>	<p>“Planta de la resurrección”, “Doradilla” (Mickel & Valdespino, 1992)</p>



<p><i>Selaginella pallescens</i> (Presl.) Spring</p>	<p>Planta terrestre de pequeño tamaño, su altura, apenas alcanza entre 5 y 20 centímetros; tallo no articulado, sin rizófogos y ápices flageliformes, enraizada sólo en la base; hojas verdes dismorfas aunque hay variedades doradas e incluso marrones, cuando envejecen se tornan café pálido; hojas laterales oblicuamente ovadas, de 0.5 a 2 mm de ancho y de 1 a 3.5 mm de largo, ápice acuminado con seta denticulada de transparente a blanquecina, margen serrulado a cortamente ciliado; hojas medias oblicuamente elípticas a ovadas, de 0.5 a 1.7 mm de ancho y 1 a 3.3 mm de largo, ápice largamente atenuado, agudo a aristado con seta denticulada blanquecina, borde serrulado a cortamente ciliado; hojas axiliares ovado-lanceoladas, de 0.4 a 1.5 mm de ancho y 1 a 3 mm de largo, ápice acuminado a aristado con seta denticulada blanquecina, base auriculada o no, margen serrulado a cortamente ciliado; estróbilos de tamaño variable; esporófilas similares entre sí, ovadas, de borde denticulado; megasporas en paquete de 4, de color blanco amarillento, equinadas; micróspora globosa, de color castaño oscuro (Plantas Villor, 2013) (Abundiz & Tejero, 1990).</p>	<p>Es nativa de América del Norte y del Sur; desde México hasta Colombia y Venezuela (UNIBIO, 2010)</p>	<p>“Doradilla”, “mousse rampante”, “meadow spikemoss”, “siempre viva” y “moosfarn”. (UNAM, B. D. 2009)</p>
<p><i>Selaginella wrightii</i> Hieron</p>	<p>Planta postrada; tallo 1 a 2 veces ramificado, sus puntas ascendentes; rizóforos a todo lo largo de los tallos y algunas ramas principales; hojas isomorfas, de 0.4 a 0.6 mm de ancho y 2.4 a 3.2 mm de largo, dispuestas en forma de espiral, de forma linear-lanceolada. Se diferencia por tener las hojas inferiores muy desarrolladas, con el borde cortamente ciliado y ápice acuminado sin seta; megasporas rugosas, de color naranja pálido o brillante (Abundiz & Tejero, 1990).</p>	<p>Sur y centro de de Estados Unidos, México (Abundiz & Tejero, 1990).</p>	<p>“Spikemoss de Wright” (Hassler & Swale, 2013)</p>

1.4 Usos medicinales de selaginelas.

En México Martín de la Cruz describió el uso medicinal tradicional de las “doradillas” para tratar problemas de contracción de la rodilla (**Fig. 2**), en su libro sobre las hierbas medicinales de los indios (“*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”, 1552), conocido como códice Badiano. En el siglo XX Martínez (1978) reportó un uso popular muy importante para tratar cálculos biliares y como diurético. En la actualidad estas plantas siguen siendo empleadas a lo largo de la República Mexicana para tratar diversas



enfermedades, por ejemplo: en Baja California para el “mal de orín”, en Oaxaca, para la “enfermedad del nahual”, descrita como “dolor de rayo” o “espanto de lluvia”, en la cual el enfermo presenta dolor del cuerpo, cansancio y dolor de cabeza, en Veracruz, se usa para la “quemazón”, referida como enfermedad en los niños, que se caracteriza por diarreas que pueden durar un mes, el niño se hincha y aparecen manchas moradas. Finalmente la Sociedad Farmacéutica de México indica su uso como detergente, eupéptico, diurético, en padecimientos hepáticos y dolor de los riñones (Argueta, 1994).

Alrededor del mundo las especies de *Selaginella* son ampliamente usadas en la medicina tradicional para curar enfermedades del tracto urinario (Winkelman, 1986), también se ha reportado su uso para tratar: heridas, en el posparto, dolor de cabeza, fiebre, infección de la uretra, cirrosis, reumatismo, fractura de huesos (Setyawan, 2009; Silva, 1995), cáncer, problemas cardiovasculares (Lin *et al.*, 1994), diabetes (Darias *et al.*, 1989), gastritis, hepatitis (Silva *et al.*, 2013), para neutralizar el veneno, fiebre, purificar la sangre, trastornos menstruales y para el tratamiento de dolor de muelas (Setyawan, 2011).

Los extractos de algunas de las especies de *Selaginella spp.* han mostrado actividad antinociceptiva (Sá *et al.*, 2012), anti-inflamatoria, anti-mutagénica, antiespasmódica (Silva *et al.*, 2013), citotóxica e inmunoestimulante (Silva *et al.*, 1995).

La planta se come directamente o hervida, sola o combinada, fresca o seca, tiene sabor dulce y genera una sensación caliente en el cuerpo (Setyawan, 2011). El uso más amplio se ha dado en China, especialmente para *S. tamariscina*, *S. doederleinii*, *S. moellendorffii* y *S. uncinata* (Chang *et al.*, 2000; Setyawan, 2011).

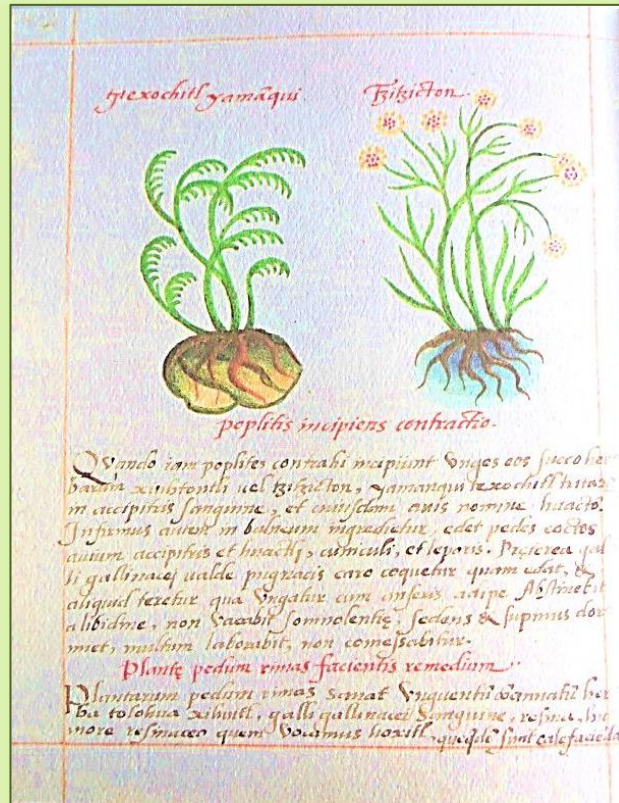


Fig. 2. Descripción del uso medicinal tradicional de “doradilla” en el códice Badiano (Martínez, 1989).

1.5 Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos de selaginelas.

Se han aislado diferentes clases de productos naturales de estas especies, los cuales contribuyen a su efecto farmacológico, estos incluyen flavonoides, lignanos, compuestos fenólicos (taninos), terpenoides (triterpenos) y esteroides (Feng, 2011). Sin embargo los biflavonoides (forma dimérica de flavonoide), son los principales compuestos bioactivos de *Selaginella*; de estas especies se han aislado principalmente: amentoflavona, 2',8''-biapigenina, delicatulaflavona, ginkgetina, heveaflavona, ochnaflavona, podocarpusflavona A, robustaflavona, sumaflavona y taiwaniaflavona (Setyawan, 2011). Amentoflavona es el biflavonoide que se ha identificado en la mayoría de selaginelas en un alto porcentaje (Yang et al., 2006).



Las diferentes especies de *Selaginella* muestran diferentes huellas características en HPLC. Las muestras de especies similares, pero recolectadas de diferente medio ambiente o lugares tienen cierta diferencia en sus huellas dactilares. Sin embargo, también generan "picos principales-huella digital", que pueden ser utilizados para evaluar y distinguir diferentes especies o especies de infraestructura (Li, 2007).

En la Tabla 2, se presentan algunos metabolitos secundarios que se han aislado e identificado en especies de *Selaginella*, así como sus actividades biológicas.

Tabla 2. Especies de *Selaginella*: metabolitos secundarios y actividad biológica.

Especie	Metabolitos Secundarios	Actividad Biológica	Referencias
<i>Selaginella bryopteris</i>	Flavonoides: amentoflavona, (2 <i>S</i>)-2,3-dihidro-amentoflavona, (2'' <i>S</i>)-2'',3''-dihidro-amentoflavona, (2 <i>S</i> ,2'' <i>S</i>)-2,3,2'',3''-tetrahidro-amentoflavona, hinoquiflavona, (2 <i>S</i>)-2,3-dihidro-hinoquiflavona, (2'' <i>S</i>)-2'',3''-dihidro-hinoquiflavona, (2 <i>S</i> ,2'' <i>S</i>)-2,3,2'',3''-tetrahidro-hinoquiflavona, tetra- <i>O</i> -metil-hinoquiflavona, lanaroflavona, siadopitisisina, secoiaflavona, bilobetina, heveaflavona, 4',7''-tri- <i>O</i> -metilamentoflavona.	Antiprotozoaria contra <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> (Kunert et al, 2008), regeneración de energía y vitalidad (Swamy et al., 2006)	Kunert et al., 2008; Swamy et al., 2006
<i>Selaginella chrysocaulos</i>	Flavonoides: naringeninil-(4'''- <i>O</i> -3)-canferol, 8''-metilnaringeninil-(4'''- <i>O</i> -3)-canferol, 5'',7''-dihidroxi-2''-fenoxi-cromonil-(3''',4')-naringenina, 3''', 3''''-binaringenina.	Regeneración de energía y vitalidad.	Swamy et al., 2006
<i>Selaginella delicatula</i>	Flavonoides: amentoflavona, delicaflavona, 2,3-dihidro-isocriptomerina, robustaflavona, 2'',3''-dihidro-4 ² -7,7''-trimetiléter-robustaflavona, 2,3-dihidro-4 ² -7,7''-trimetiléter-robustaflavona, 2'',3''-dihidro-4 ² -7 dimetiléter-robustaflavona, 4 ² -7 dimetiléter-robustaflavona, 4'-metiléter-robustaflavona. Fenilpropanoides: ácido isoclorogénico A, ácido isoclorogenico B, ácido isoclorogénico C.	Inhibe el crecimiento de las líneas celulares tumorales Raji y Calu-1 (Lin et al., 2000)	Lin & Chou, 2000; Lin et al., 2000



<p><i>Selaginella denticulata</i></p>	<p>Flavonoides: amentoflavona, criptomarina B, hinoquiflavona, robustaflavona, isocriptomerina, sotetsuflavona.</p>	<p>Epilepsia, narcótico, antihelmíntico, antiespasmódico (Lopez-Saez <i>et al.</i>, 1995)</p>	<p>Lopez-Saez <i>et al.</i>, 1994a; Lopez-Saez <i>et al.</i>, 1995</p>
<p><i>Selaginella doederleinii</i></p>	<p>Alcaloides: hordenina, hordenina-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosido, N-metiltiramina-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosido y hordenina-<i>O</i>-[(6''-<i>O</i>-trans-cinamoil)4''-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-α-L-ramnopiranosido. Cumarinas: isopimpinina Esteroides: β-sitosterol Flavonoides: apigenina, amentoflavona, heveaflavona, 4-metiléter-robustaflavona, 4,7,7''-trimetiléter-robustaflavona y derivados metoxilados de amentoflavona. Lignanos: (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B, (+)-matairesinol A, (+)wilkstromol, (-)-nortraquelósido, (-)-nortraquelósido.</p>	<p>Enfermedades cardiovasculares, bactericida, fuerte actividad citotóxica. Antimutagénico, antitumoral en ratones. (Chao <i>et al.</i>, 1987; Lin <i>et al.</i>, 1994)</p>	<p>Chao <i>et al.</i>, 1987; Chen <i>et al.</i>, 1995; Lin <i>et al.</i>, 1994; Lee <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><i>Selaginella labordei</i></p>	<p>Flavonoides: 2,3-dihidro-5,5'', 7,7'', 4'-pentahidroxi-6,6''-dimethyl-[3'-<i>O</i>-4''']-biflavona, 2'',3''dihidroocnaflavona y 2'',3''-dihidro-3',3'''-biapigenina.</p>	<p>Inhibe la proliferación de cáncer de colon.</p>	<p>Xu <i>et al.</i>, 2009</p>
<p><i>Selaginella lepidophylla</i></p>	<p>Flavonoides: robustaflavona, amentoflavona, 2,3-dihidro-robustaflavona, 5-metiléter de 2,3-dihidro-robustaflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, trimetil éter-hinoquiflavona, 5',5''-dihidroxi-7,7'',4',4'''-tetrametoxi-amentoflavona.</p>	<p>Enfermedades urinarias diarrea, malestares hepáticos.</p>	<p>Aguilar <i>et al.</i>, 2008; Qasim <i>et al.</i>, 1985</p>



<p><i>Selaginella moellendorffii</i></p>	<p>Alcaloides: ácido selaginélico, ácido 5-hidroxiselaginélico, 5-hidroxi-N₈, N₈-dimetilseudoprinaminol, N-selagineloil-L-fenilalanina, N-(5-hidroxiselagineloil)-L-fenilalanina, ácido neoselaginélico. Flavonoides: amentoflavona, 7',4,7'',4''-tetrametileter-amentoflavona, 7,4'',7''',4''''-tetrametoxi-amentoflavona, apigenin-7-O-β-neosperidósido, apigenina-8-C-β-D-glucopiranosido, 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosil apigenina, 6-8-di-C-β-D-glucopiranosil-apigenina, 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-β-D-glucopiranosil-apigenina, kayaflavona, podocarpusflavona A, ginkgetina. Lignanos: moellenósido A, moellenósido B.</p>	<p>Actividad inhibidora in vitro sobre el virus de la hepatitis B (VHB) (Cao <i>et al.</i>, 2010a)</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009; Sun <i>et al.</i>, 1997; Cao <i>et al.</i>, 2010a; Feng <i>et al.</i>, 2011; Zhu <i>et al.</i>, 2008; Zheng <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><i>Selaginella pulvinata</i></p>	<p>Esteroides: ácido 3β,-16α-dihidroxi-(5α)-colestano-21-oico, β-sitosterol. Flavonoides: amentoflavona, pulvinatabiflavona, pulvinatadiona, 5,5'',4''''-trihidroxi-7,7''-dimetoxi-[4'-O-6'']-biflavona Pigmentos: selaginelina C, selaginelina D, selaginelina E, selaginelina F, selaginelina G, selaginelina H</p>	<p>Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i>, y <i>Staphylococcus aureus</i> (Cao <i>et al.</i>, 2010c).</p>	<p>Ma <i>et al.</i>, 2001; Cao <i>et al.</i>, 2010c; Zheng <i>et al.</i>, 2007; Tan <i>et al.</i>, 2004</p>
<p><i>Selaginella selaginoides</i></p>	<p>Flavonoides: robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona.</p>	<p>Antiepiléptico y antiespasmódico</p>	<p>Lopez-Saez <i>et al.</i>, 1995</p>
<p><i>Selaginella sinensis</i></p>	<p>Flavonoides: amentoflavona, 4',7''-di-O-metil-amentoflavona, 7''-O-metil-robustaflavona, ginkgetina, robustaflavona, genistina, quercetina, apigenina, hinoquiflavona, 2,3-dihidro-amentoflavona, 4-O-metil-robustaflavona. Lignanos: sinesiol A, pinosinol diglucosido, (7S, 8R)-4,9,9'-trihidroxi-3,3'-dimetoxi-7,8-dihidrobencofuran-1'-propilneolignano, pinosinol-4-O-β-D-glucopiranosido, siringaresinol-4,4'-O-di-β-D-glucopiranosido, sesquilignano, siringaresinol, (-)-pinosinol Pigmento: selaginelina</p>	<p>Antioxidantes (Zhang <i>et al.</i>, 2011), Antiviral (Virus sincitial respiratorio, Virus de Influenza A y B, HSV-1, HSV-2, VIH) (Ma <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Ma <i>et al.</i>, 2001; Dai <i>et al.</i>, 2001; Wang <i>et al.</i>, 2007; Zhang <i>et al.</i>, 2011; Dai <i>et al.</i>, 2006; Feng <i>et al.</i>, 2008</p>



<p><i>Selaginella stautoniana</i></p>	<p>Cumarinas: umbeliferona. Bencenoides: ácido isovanillico, ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico; 3,4,5-trimetoxifenol, ácido vanillico; 2-metoxihidroquinona, <i>p</i>-hidroxifenol; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, ácido hidroferúlico, ácido hidrocafeico, <i>p</i>-hidroxifeniletanol. Flavonoides: amentoflavona, apigenina-6, 8-di-C-β-D-glucopiranosido, 2,3-dihidro-amentoflavona, quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosido, bilobetina, canferol-3-O-α-L-ramnopiranosido.</p>	<p>No reportado</p>	<p>Ma <i>et al.</i>, 2001; Feng, 2011</p>
<p><i>Selaginella tamariscina</i></p>	<p>Ácidos: ácido 3β, 16α-dihidroxi-5α, 17β-colestan-21-carboxílico, ácido 3β-acetoxi-16α-hidroxi-5α,17β-colestan-21-carboxílico y ácido 3β-(3-hidroxibutiroxi)-16α-hidroxi-5α,17β-colestan-21-carboxílico. Alcaloides: adenosina, guanosina. Bencenoides: arbutina, ácido vanillico, ácido siringico. Cumarinas: 3-(4-hidroxifenil)-6,7-dihidroxi cumarina, umbeliferona. Fenilpropanoides: ácido cafeico, ácido ferúlico, tamariscina éster A. Flavonoides: amentoflavona, robustaflavona, 6-(2-hidroxi-5-acetilfenil)-apigenina, 2',8''-biapigenina, taiwaniaflavona, sumaflavona, hinoqui flavona, heveaflavona. Lignanos: 5-acetil-dihidro-2-(3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-fenil)-7-metoxibenzofurano, siringaresinol, tamariscinósido B, tamariscinósido C. Pigmentos: selaginelina A, selaginelina B. Quinoides: 1-metoxi-3-metilanttraquinona.</p>	<p>Actividad antiproliferativa en células humanas con leucemia (Gao <i>et al.</i>, 2007), regulan la expresión de metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-2) en fibroblastos de piel humanos (Lee <i>et al.</i>, 2008), antifúngico (Jung <i>et al.</i>, 2006), actividad antidiabética (Zheng <i>et al.</i>, 2013).</p>	<p>Liu <i>et al.</i>, 2010; Lee <i>et al.</i>, 2008; Yang <i>et al.</i>, 2006; Bi <i>et al.</i>, 2004; Zheng <i>et al.</i>, 2004b; Cheng <i>et al.</i>, 2008.</p>
<p><i>Selaginella uncinata</i></p>	<p>Cromonas: 8-metileugenitol, uncinósido A, uncinósido B. Flavonoides: amentoflavona, hinoqui flavona, 6-(5-carboxil-2-metoxifenil)-apigenina.</p>	<p>No reportado</p>	<p>Ma <i>et al.</i>, 2002; Ma <i>et al.</i>, 2003; Zheng <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><i>Selaginella wildenowii</i></p>	<p>Flavonoides: amentoflavona, 4',7''-di-O-metilamentoflavona, bilobetina, isocriptomerina, 2'',3''-dihidro-isocriptomerina, robustaflavona, 7''-O-metil-robustaflavona,</p>	<p>Citotóxico</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 1995</p>



1.6 Biflavonoides

1.6.1 Estructura química

Los biflavonoides se definen de manera general como dímeros de flavonoide (**Fig. 3**). Se pueden generar una gran variedad de estructuras de estos compuestos por combinación de flavonoides, normalmente están constituidos por monómeros del mismo tipo, pero pueden ser diferentes. Por ejemplo: flavanona-flavona, flavona-flavona, flavona-flavonol, por mencionar algunos (Kim *et al.*, 2008).

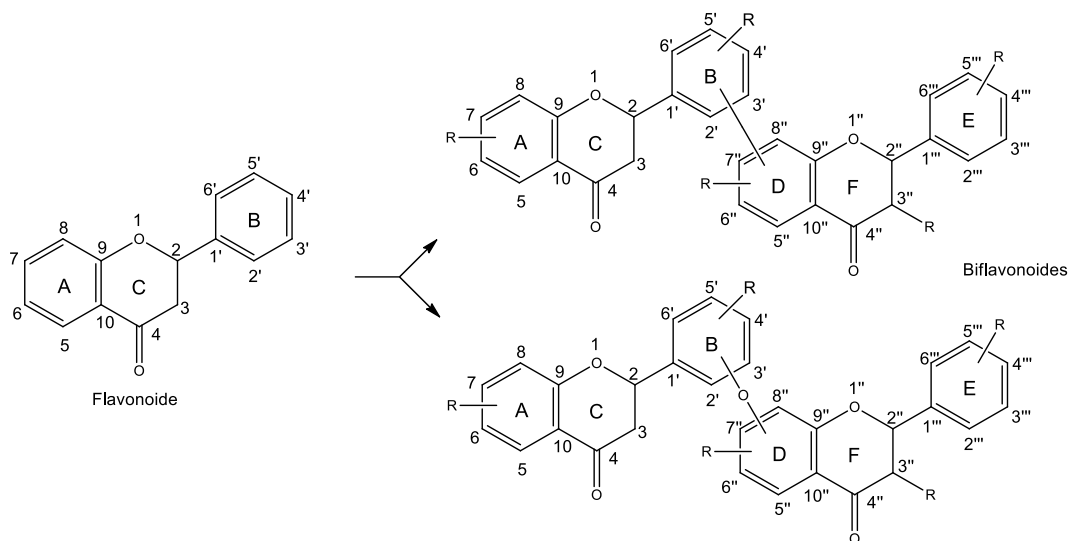


Fig. 3. Estructura general de biflavonoides. Monómeros de flavonoides con conexión C-C ó C-O-C.

1.6.2. Clasificación

Los biflavonoides se clasifican en siete tipos principales de acuerdo a su enlace interflavonoide: agatisflavona, cupresuflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, robustaflavona, garcinia y biflavonoides sintéticos (Iwu & Igboko, 1990). En el caso de los biflavonoides naturales, los enlaces que conectan a los flavonoides son principalmente de dos tipos: bifenilo (I) en los que se forman enlaces C-C y bifenil etér (II) donde se generan enlaces C-O-C. Ambos tipos de biflavonoides pueden tener varios grupos hidroxilo y metoxilo en diferentes posiciones.



Los compuestos del tipo I incluyen a los biflavonoides del grupo amentoflavona, cuya unión C-C se da entre C-3' y C-8'', el grupo cupresuflavona con un enlace C-C entre C-8 y C-8'', el grupo agatisflavona se une entre C-6-C8'', los biflavonoides del grupo robustaflavona se unen en C-3' y C-6'' (Seigler, 1998), y los del tipo garcinia se unen entre C-3 y C-8'' (Osorio, 2009) (**Fig. 4**).

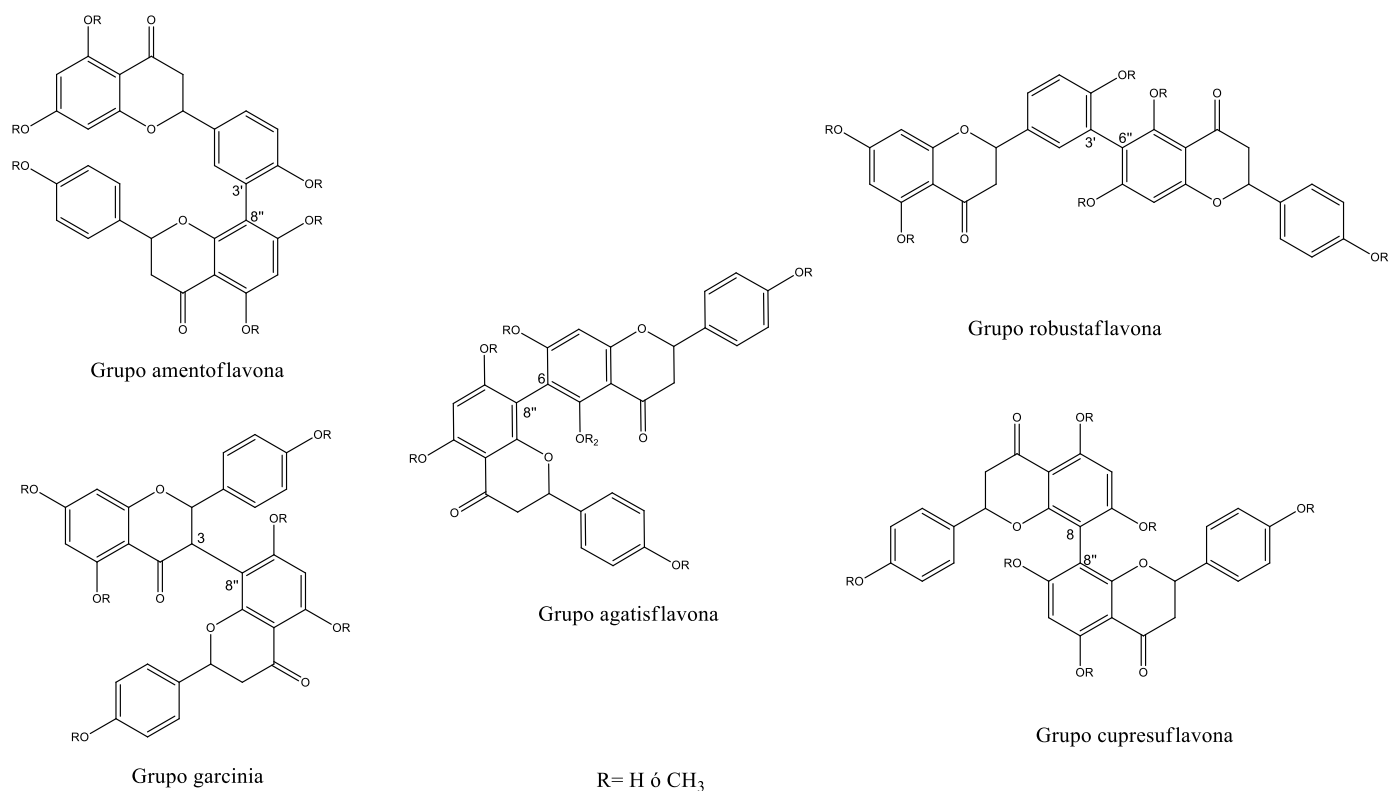
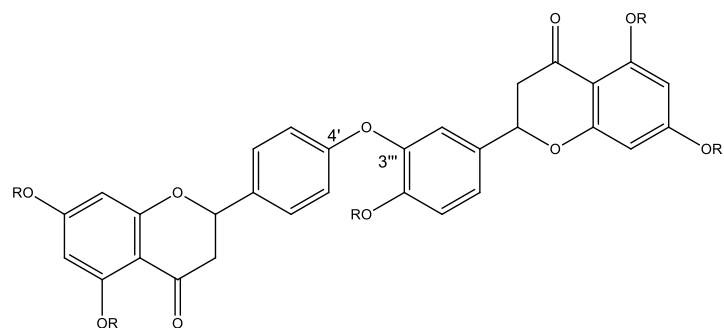
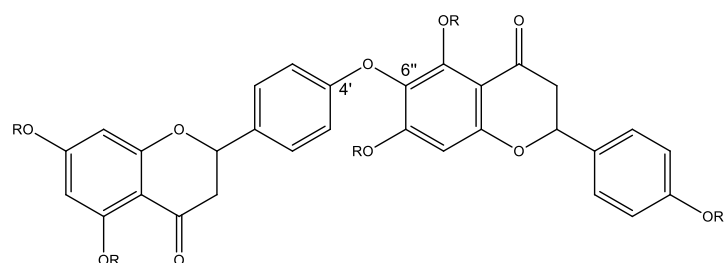


Fig. 4. Biflavonoides tipo I

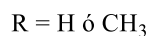
En los biflavonoides del tipo II se encuentran el grupo hinoquiflavona, donde la unión C-O-C se da en C-4' y C-6'', y el grupo ocnaflavona que se une entre C-4' y C-3'' (Seigler, 1998) (**Fig. 5**).



Grupo ocnaflavona



Grupo hinoquiflavona

**Fig. 5.** Biflavonoides tipo II

1.6.3. Biosíntesis

Los biflavonoides se forman a través del acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y modificaciones subsecuentes del carbono central C₃. Si un electrón es abstraído del anión C-4 de naringeninochalcona, se forma un radical que puede ser representado con las fórmulas canónicas A y B. Si el electrón es abstraído del anión C-4' de la misma chalcona se genera el radical representado por C, D y E. Por la unión de dos de los radicales antes mencionados, se obtienen los precursores de los biflavonoides naturales (**Fig. 6**) (Harborne, 1975).



ANTECEDENTES

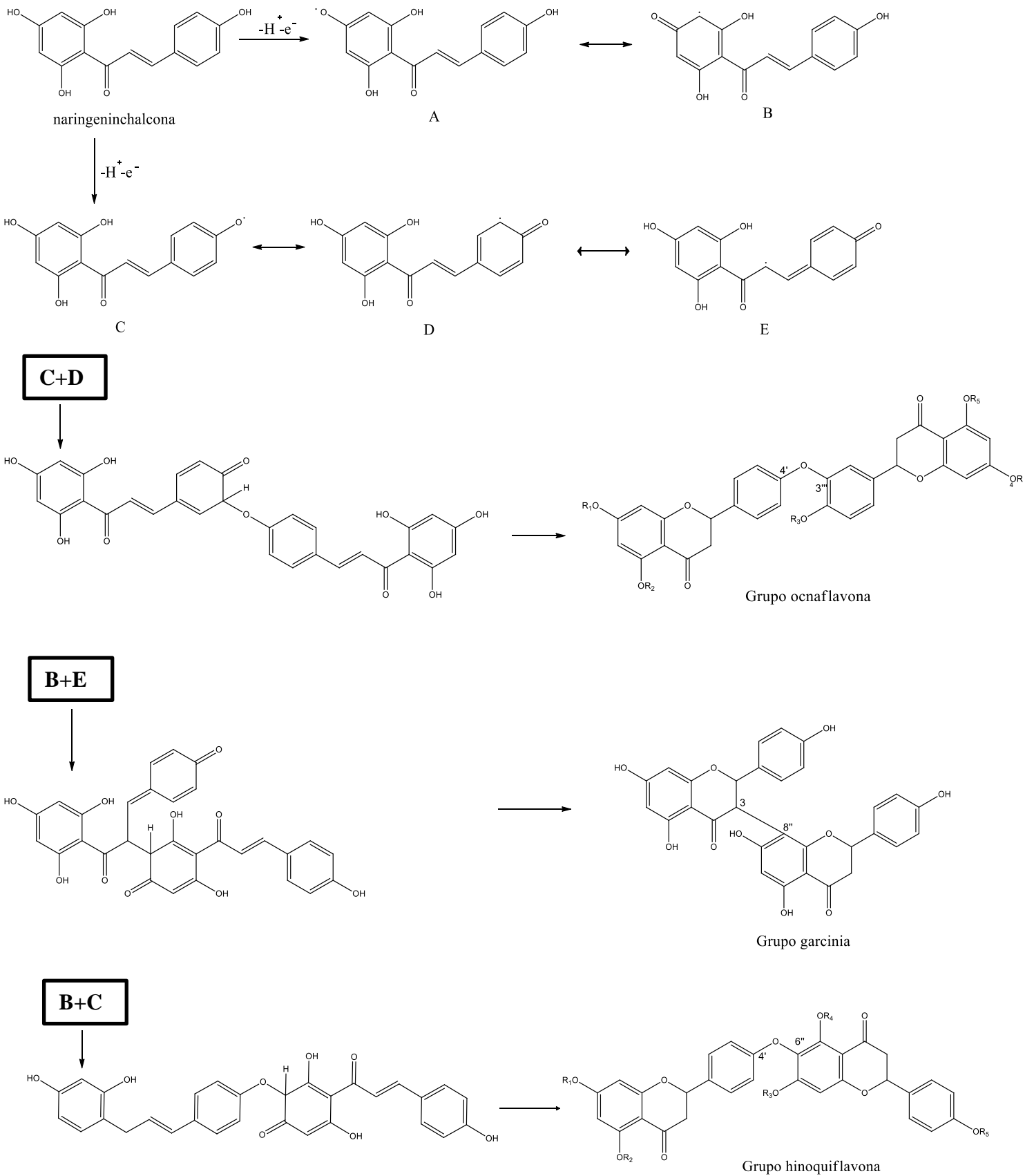


Fig. 6. Biosíntesis de biflavonoides (Harborne, 1975).



1.6.4 Función en las plantas.

Son pocas las especies de plantas que contienen biflavonoides como principales constituyentes (Harborne, 1975). Los ejemplos son *Ginkgo biloba*, especies de *Selaginella* y *Garcinia kola*. Los biflavonoides más comunes que se han reportado son amentoflavona y ginkgetina (Kim, 2008).

Las plantas utilizan estos biflavonoides principalmente como respuesta a las diversas condiciones ambientales, defensa contra las plagas, enfermedades, herbivoría, y competencia entre plantas (Setyawan & Darusman, 2008).

1.6.5 Aplicaciones

El interés por los biflavonoides se ha incrementado debido a que se ha observado que presentan diversas propiedades farmacológicas, especialmente antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatoria, antiviral, antibacteriana, anti-fúngica, antiprotozoaria, neuroprotectora, vaso dilatadora, anti-hemorreica, anti-radiación UV, antiespasmódica, antinociceptiva, etc. (Setyawan, 2011). Los grupos hidroxilo, metoxilo, metilo y glicosilo pueden influir en la bioactividad (Setyawan & Darusman 2008).

1.7 Actividad antioxidante de flavonoides

Los antioxidantes son sustancias capaces de prevenir, detener o retardar determinadas reacciones de oxidación, protegiendo a las moléculas biológicas de las agresiones oxidativas. En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos entre los que destacan: enfermedades neurodegenerativas, mutagénesis, cáncer, diabetes, trastornos del sistema nervioso central, etc. Por tanto, es de vital importancia el consumo de productos que contengan antioxidantes naturales tales como los compuestos fenólicos, para contrarrestar el desequilibrio (Cao, 1998a).



En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles, y en especial la evaluación de su capacidad antioxidante. Los polifenoles actúan a menudo de forma sinérgica con las vitaminas C y E, aumentando y prolongando los beneficios de las mismas. Se ha comprobado su capacidad para actuar como captadores de radicales libres, donadores de electrones, quelantes de cationes metálicos como el hierro y el cobre que intervienen en las reacciones de formación de especies reactivas de oxígeno, moduladores de la expresión de genes responsables de la síntesis de enzimas antioxidantes, activadores o inhibidores de enzimas. El poder antioxidante de los biflavonoides está asociado con la habilidad de suprimir especies reactivas de oxígeno y de inhibir enzimas como la fosfolipasa A2 y la ciclooxigenasa (Yamaguchi, 2005; Chen, 2006).

El mecanismo más estudiado de actividad antioxidante de los polifenoles ha sido la captación de radicales. Esta propiedad depende de la estructura química de la molécula; ya que los principales determinantes son el número y la posición de los grupos hidroxilo donadores de electrones. Al ceder un electrón al radical libre, la molécula queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización electrónica (característica importante para la actividad antirradicalaria) (Siquet *et al.*, 2006).

El estudio de la relación estructura-actividad en el caso de los flavonoides es complicado, debido a la relativa complejidad de las moléculas. Algunas de las características estructurales que determinan la actividad antioxidante son: a) la presencia en el anillo B de la estructura catecol u *O*-dihidroxi; b) la presencia de un doble enlace entre las posiciones 2,3 y c) la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

1.7.1 Actividad antioxidante: ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

El DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos estables de nitrógeno que se comercializan en el mercado, en virtud de la deslocalización del electrón libre de la molécula en conjunto, de modo que otras moléculas no lo hacen dimerizarse, como ocurriría con la mayoría de otros radicales libres (Molyneux, 2004).



El método se basa en la teoría de que un antioxidante es un donador de hidrógenos y el efecto antioxidante es proporcional a la desaparición de DPPH en la muestra. Se mide la desaparición del radical DPPH por UV (Moon & Shibamoto, 2009). La deslocalización del electrón libre de la molécula da lugar a un color violeta oscuro. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, a continuación, esto da lugar a la forma reducida (hidracina) cambiando el color violeta a amarillo pálido (**Fig. 7**) (la reducción del DPPH se mide a 517 nm) (Molyneux, 2004).

Se considera que es un método colorimétrico válido y sencillo para la evaluación de la propiedad antioxidante. Este ensayo ha sido utilizado con éxito para investigación de las propiedades antioxidantes de los granos de trigo y salvado, vegetales, diversas hierbas, aceites de semillas comestibles y harinas en diferentes sistemas de disolventes, incluyendo: etanol, acetona acuosa, metanol, alcohol acuoso, y benceno.

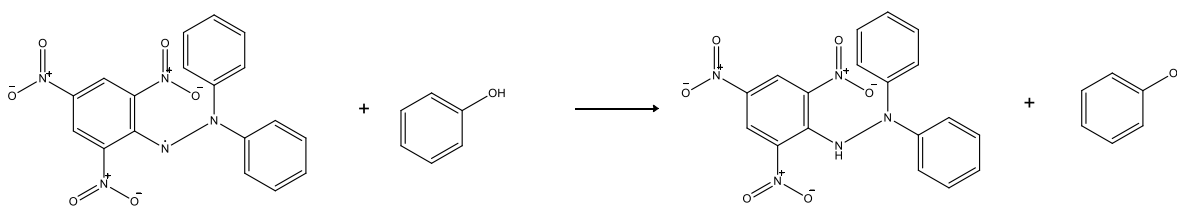


Fig. 7. Reacción entre el radical DPPH y un antioxidante. Modificado de Dornelles *et al.*, 2006.

1.8 Toxicidad de extractos de plantas.

Desde tiempos antiguos la humanidad ha utilizado las plantas como medicamentos. Este uso tiene gran importancia, sin embargo se sabe que muchas plantas son tóxicas. Por esta razón, es importante determinar la acción toxicológica de las plantas medicinales.

La toxicidad aguda se refiere a la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos posterior a la administración de una dosis única, estos efectos pueden variar de acuerdo al grado de daño que se provoca, desde una irritación cutánea hasta la muerte; el parámetro indicativo de la toxicidad de una sustancia es la DL_{50} (Repetto, 2009). Sin



embargo, la DL_{50} no debe considerarse como una constante biológica, debido a que se pueden obtener diferentes resultados en cada repetición o cuando las determinaciones se llevan a cabo en diferentes laboratorios (Lorke, 1983).

Lorke (1983) con el fin de establecer una prueba con la cual determinar si una sustancia química es altamente tóxica, tóxica, poco tóxica, o muy ligeramente tóxica, desarrolló un método que indica la cantidad de sustancia que es perjudicial después de un modo específico de administración y empleando pequeñas cantidades de animales, para lo cual propuso que la toxicidad aguda debe probarse en dos pasos.

Inicialmente es necesario determinar el intervalo aproximado de la toxicidad aguda. Esto se consigue dando ampliamente diferentes dosis a los animales, por ejemplo: 10, 100, y 1000 mg/kg de peso corporal. Los resultados muestran el grado de toxicidad de una sustancia. Se recomienda el uso preferentemente de tres animales por nivel de dosis. El resultado de esta prueba se utiliza como una base para la selección de las dosis posteriores (**Tabla 3**).

Una dosis de 1 mg/kg o menor es considerada para definir a una sustancia muy tóxica, por lo que en este caso no es muy importante calcular la DL_{50} exacta. Los valores de DL_{50} superiores a 5000 mg/kg no son de interés práctico porque denotan ausencia de toxicidad. Una cifra aproximada de la DL_{50} suele ser adecuada para estimar el riesgo de intoxicación aguda.

La evaluación toxicológica preclínica, se lleva a cabo de forma rutinaria en ratones. Los animales se tratan con sustancias después de al menos 5 días de adaptación. La observación de los animales se realiza con frecuencia el mismo día del tratamiento durante horas normales de trabajo y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados. Cuando los animales mueren en el transcurso de la evaluación se someten a una autopsia y un examen microscópico para observar cualquier cambio patológico. Los animales que sobreviven son pesados. Si los animales se recuperan y ganan peso, se toma como un signo de haber sobrevivido a la intoxicación aguda. Todos los animales



supervivientes se sacrifican al final de cada prueba y se les practica una autopsia para examinar macroscópicamente algún cambio patológico.

Esta prueba ha sido utilizada para determinar la toxicidad aguda en extractos de plantas que se emplean en la medicina tradicional tal como reporta Déciga-Campos *et al.*, 2007.

Dosis	10 mg / kg	100 mg / kg	1000 mg / kg	Dosis en mg / kg para la segunda etapa			
					1600	2900	5000
Resultados de la etapa inicial	0/3*	0/3	0/3		1600	2900	5000
	0/3	0/3	1/3	600	1000*	1600	2900
	0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
	0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
	0/3	1/3	3/3	50	100**	200	400
	0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
	0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
	1/3	3/3	3/3	5	10**	20	40
	2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
	3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

*Número de animales que murieron / número de animales usados
** El resultado de la etapa inicial se asume para el control de esta dosis.

Tabla 3. Tabla de las dosis recomendadas para la segunda etapa en la prueba de toxicidad, de acuerdo a los resultados en la primera etapa.



2. JUSTIFICACIÓN

Estudios farmacológicos sobre el modelo de diuresis y antiviral realizados con amentoflavona (2) y robustaflavona (4) como los dos principales biflavonoides de las especies mexicanas de *Selaginella* han mostrado actividades biológicas importantes y diferentes (Colín, 2010; Lin *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2001). Por otra parte, estudios químicos previos realizados a diversas especies de *Selaginella* mostraron la gran complejidad de contenido metabólico de estos vegetales (Aguilar *et al.*, 2013), que involucra una gran gama de estructuras flavonoides: oxidadas y reducidas y con diferentes conexiones interflavonoide. El amplio uso dentro de la medicina tradicional mexicana de las especies denominadas “doradillas” requiere del establecimiento de una metodología apropiada para analizar profundamente su contenido metabólico particular. En este trabajo se plantea el uso del método de UPLC/MS para el análisis de extractos y fracciones provenientes de cuatro especies de *Selaginella* (*S. wrightii* y *S. pallescens*, *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla*) para que de manera contundente se pueda determinar la presencia de determinado tipo de biflavonoides. Los resultados que se obtengan tendrán un impacto directo sobre el uso medicinal racional y sobre la estandarización de los eventuales preparados herbolarios de algunas de estas especies. Por otra parte, las pruebas de toxicidad aguda se requieren para garantizar la seguridad en el consumo de los preparados.

Las especies eje del presente trabajo, *S. wrightii*, *S. pallescens*, *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida* forman parte entre otras, de un complejo de plantas medicinales comúnmente designadas como “doradillas”; sin embargo no existe información en la literatura especializada que permita justificar el uso y comercialización indistinta de éstas. La identificación botánica por un especialista en pteridofitas fue de suma importancia debido a que a simple vista no es posible distinguir una especie de otra, lo cual puede prestarse a hacer clasificaciones erróneas.

Con el desarrollo del presente proyecto se pretende establecer la información que permita racionalizar o justificar científicamente el uso medicina de estas especies y en su caso la sustitución de una especie por otra. Para ello, es necesario establecer su contenido metabólico ya que la mayoría de las pruebas para control de calidad de las plantas depende del conocimiento químico de las mismas y a la fecha no hay estudios que documenten el perfil metabólico secundario de estas especies por el método de UPLC/MS.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS:

Si las diferentes especies mexicanas de *Selaginella* comparten características morfológicas, nombres comunes y usos medicinales, entonces estas especies deberán tener un contenido metabólico secundario similar que se puede determinar por procedimientos químicos y analíticos.

3.2 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo consiste en aislar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios de las especies vegetales medicinales *S. wrightii* y *S. pallescens* y determinar el perfil químico de estas especies y de *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla* mediante el método de UPLC/MS.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la estructura molecular de los componentes mayoritarios de los diferentes extractos de *S. wrightii* y *S. pallescens*.
- Determinar preliminarmente la eficacia antioxidante de *S. wrightii* y *S. pallescens*, *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla*.
- Determinar preliminarmente la inocuidad de *S. nothohybrida* como especie vegetal relacionada con *S. wrightii*, *S. pallescens* y *S. lepidophylla*.
- Determinar el perfil cromatográfico de las cuatro especies vegetales por cromatografía de ultra alta resolución-Espectrometría de masas.



4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales de análisis.

4.1.1 Análisis cromatográficos por CCD y CCA

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa delgada (CCD) se efectuaron siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de 0.2 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Macherey-Nagel), de diferentes dimensiones y empleando como sistema de elución CHCl₃:MeOH (9:1). Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal [(NH₄)₄Ce (SO₄)₄ 2H₂O] al 1% en ácido sulfúrico 2 N. Para la cromatografía en capa delgada de tipo preparativo (CCDP) se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm) de 1 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck). La cromatografía en columna abierta (CCA) se efectuó utilizando como adsorbentes gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm) y Sephadex lipofílico LH-20 (tamaño de partícula 20-100 μm, Sigma Aldrich), empleando diversas fases móviles.

4.1.2 Análisis cromatográficos por CLAE

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corporation Milford MA, USA) modelo 515 equipado con un detector UV-VIS marca Waters modelo 2487 con 2 canales, dos bombas isocráticas marca Waters modelo 515 y 510 respectivamente; un controlador de temperatura marca Waters, un controlador automático de gradiente marca Waters modelo 680 y un equipo de cómputo que contiene el software Waters Millennium.

Las purificaciones de biflavonoides se realizaron en condiciones de tipo preparativo y los análisis de identificación en condiciones de tipo analítico los cuales se muestran en la Tabla 4.



Tabla 4. Condiciones cromatográficas analíticas y preparativas por CLAE para identificación y purificación de compuestos.

Condiciones de tipo analítico para identificación de compuestos.	Condiciones de tipo preparativo para purificación de compuestos.
<ul style="list-style-type: none">➤ Columna analítica XBridge™, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 5 μm, dimensiones: 4.6 X 50 mm.➤ Inyector automatizado JASCO➤ Modo de elución: Gradiente➤ 0-5 min (20% A: 80%B), 5-17 min (40% A: 60%B), 17-20 (20% A: 80%B) flujo de 0.6 mL/min.➤ Fase móvil: [Agua Mill Q (0.1% Ac. acético)] (B)/ [Acetonitrilo] (A)➤ λ=367 nm; T= 30°C➤ Vol. Inyección: 20 μL	<ul style="list-style-type: none">➤ Columna preparativa XBridge™, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 5 μm, dimensiones: 19 x 50 mm.➤ Inyector manual marca Waters➤ Jeringa analítica Halston de 100 mL.➤ Modo de elución: Gradiente➤ t₀ 40A:60B → t₁₅ 80A:20B flujo de 2 mL/min.➤ Fase móvil: [Agua Mill Q (0.1% Ac. acético)] (B)/ [Acetonitrilo] (A)➤ λ=367 nm; Temperatura ambiente➤ Vol. Inyección: 100 μL

4.1.3 Análisis cromatográficos por el método de UPLC/MS

El análisis de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución-espectrometría de masas (UPLC/MS), se realizó en un Espectrómetro de Masas Modelo Synapt GS-2, Marca WATERS, con tiempo de vuelo, acoplado con un Cromatógrafo de Líquidos Modelo ACQUITY, Marca WATERS. Los análisis para obtención del perfil fitoquímico se realizaron en una columna ACQUITY UPLC BEH, fase reversa C₁₈, tamaño de partícula 1.7 μm, dimensiones: 2.1X100 mm. El volumen de inyección en todos los casos fue de 3 μL previamente filtrados con un prefiltro de 0.45 micras. La elución se realizó utilizando un sistema isocrático 60 A:40 B a un flujo de 0.3 mL/min; la fase móvil consistió de una mezcla binaria de Agua Mill Q (0.1% HCOOH; A) y CH₃CN (0.1% HCOOH; B). El método de ionización fue por electrospray por el mecanismo de protonación empleando las siguientes condiciones: temperatura de la cámara de ionización 100 °C, voltaje del capilar 3.00 kV, analizador tiempo de vuelo, detección de iones positivos y resolución: 20,000.).

Los análisis se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.



4.1.4 Prueba cualitativa de Folin-Ciocalteu para determinación de fenoles.

Se tomaron 3 mg de muestra y se les agregaron 0.5 mL de agua desionizada y 3 gotas de reactivo de Folin con 1 mg de bicarbonato de sodio.

4.1.5 Caracterización de los productos naturales.

La determinación de la estructura molecular de los productos naturales, se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos de IR, UV y RMN. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , y en sus modalidades HSQC, HMBC, COSY y NOESY se realizaron en un equipo Varian Innova a 400 MHz. Se utilizaron acetona- d_6 , CD_3OD y $\text{DMSO}-d_6$ como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno.

4.2 Obtención de metabolitos secundarios de las especies *S. pallescens* y *S. wrightii*.

4.2.1. Material Vegetal

Se utilizaron cuatro especies de *Selaginella*: *S. lepidophylla* (Hook. & Grev.) Spring, *Selaginella nothohybrida* Valdespino, *S. pallescens* (Presl) Spring y *S. wrightii* Hieron, la identificación botánica de las especies fue realizada por el experto en pteridofitas M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional de México en el Instituto de Biología de la UNAM.

Las especies vegetales *Selaginella lepidophylla*, *S. pallescens* y *S. wrightii* fueron recolectadas en septiembre del 2009 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 de *Selaginella lepidophylla* (SL-0909-03) se depositó en la colección botánica del Herbario FEZA de la FES Zaragoza de la UNAM.



La especie vegetal *Selaginella nothohybrida*, 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 111 del Conjunto “E” de la Facultad de Química de la UNAM.

Para su limpieza, fue necesario eliminar restos de otras plantas, pastos y polvo contenidos en la planta, posteriormente se fragmentó haciendo uso de una licuadora de tipo industrial.

4.2.2 Preparación de extractos totales (orgánicos y acuosos).

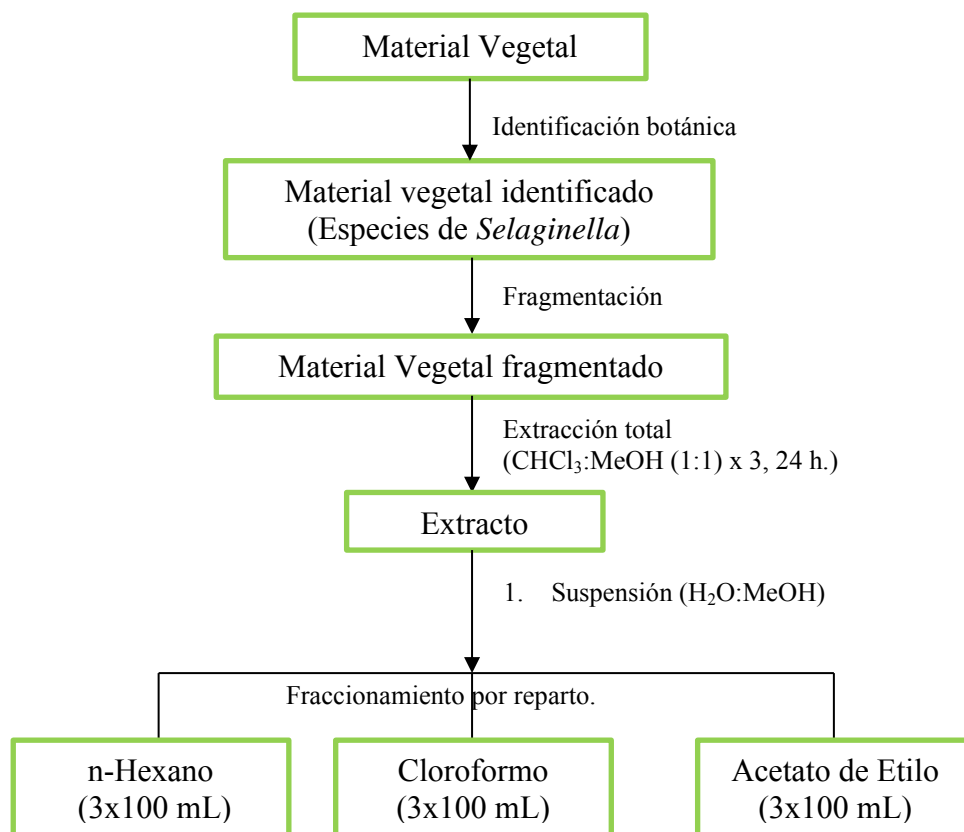
Se preparó el extracto total de cada una de las especies de estudio con el material completo, desecado y molido (50 g de *S. pallescens*, *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida* y 550 g de *S. wrightii*) por el método de maceración por períodos de 24 h, empleando una mezcla de CHCl₃:MeOH (1:1).

El producto de extracción una vez llevado a sequedad, en cada caso, se obtuvo como un residuo verde oscuro. Esta operación se repitió hasta que el color verde de la solución obtenida de la extracción resultó poco intenso.

Los extractos acuosos totales se prepararon mediante un proceso de decocción utilizando 250 g de las plantas desecadas y molidas y 300 mL de agua destilada en ebullición; se dejó hervir por 10 minutos. Los extractos acuosos totales resultantes se concentraron a presión reducida empleando una bomba de alto vacío, hasta sequedad.

4.2.3 Fraccionamiento por reparto de extractos orgánicos.

El extracto orgánico total obtenido de las especies *S. wrightii* y *S. pallescens*, se suspendió en una mezcla de H₂O:MeOH (8:2) y se sometió a un fraccionamiento por reparto líquido-líquido (**Esquema 1**), por separado con: hexano, cloroformo y acetato de etilo.



Esquema 1. Procesamiento de plantas completas de selaginela.

4.2.4 Estudio fitoquímico de *S. pallescens*

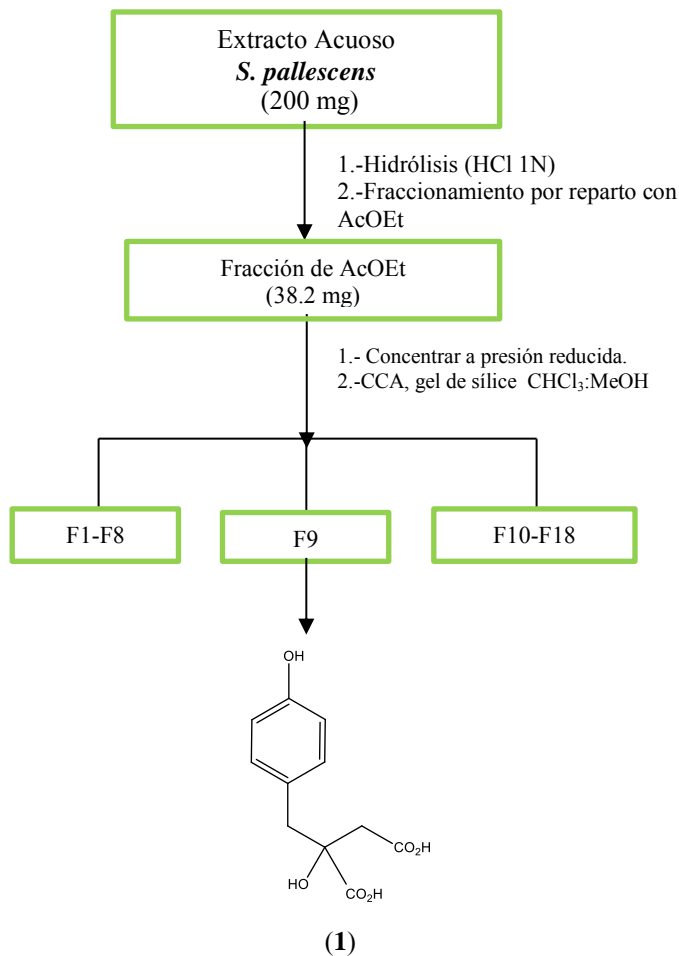
Se realizó una prueba presuntiva de Folin a los extractos orgánico y acuoso como describe en el inciso 4.1.4.

4.2.4.1 Obtención de ácido eucómico (1) por hidrólisis del extracto acuoso total de *S. pallescens*

200 mg de extracto acuoso total seco se sometieron a hidrólisis con 10 mL de solución 1M de HCl, a 80°C y con agitación constante por una hora. Se dejó enfriar y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se lavó con agua y concentró a presión reducida. El residuo sólido seco (38.2 mg) se sometió a un fraccionamiento utilizando CCA



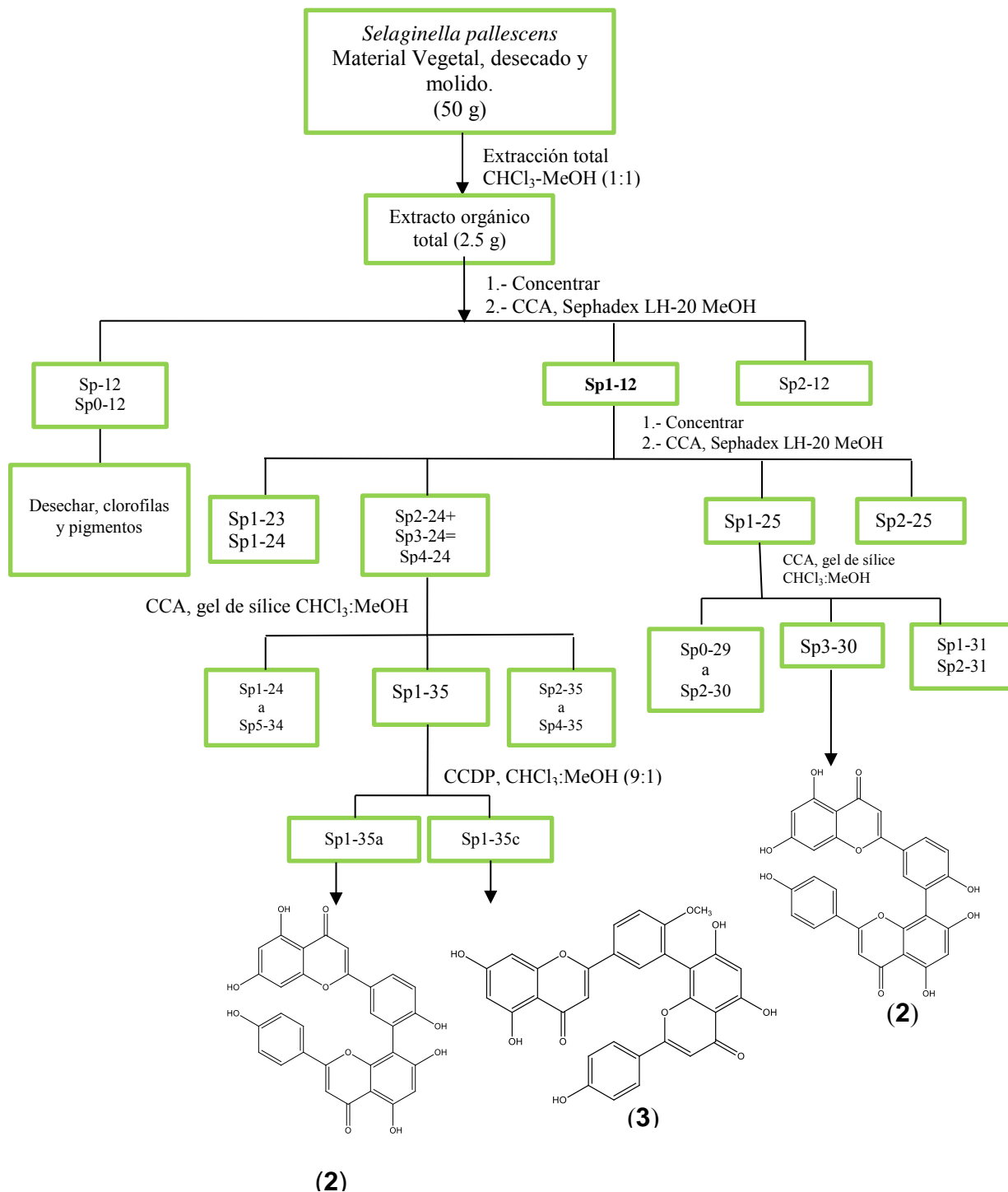
de gel de sílice (2 g), empleando como columna una pipeta Pasteur y mezclas de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ con incrementos de polaridad (1:0 \rightarrow 0:1) (**Esquema 2**). De la fracción F9 obtenida con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) se obtuvo el compuesto **1** identificado como ácido eucómico y caracterizado por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) con las descritas en la literatura (Simmler *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2009).



Esquema 2. Fraccionamiento del extracto acuoso total de *S. pallescens*.



4.2.4.2 Fraccionamiento del extracto orgánico total de *S. pallescens*.



Esquema 3. Procesamiento del material vegetal completo de *S. pallescens*.



El extracto orgánico íntegro (2.5 g) obtenido como se describe en el inciso **4.2.2**, se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 (53 g) y como fase móvil MeOH grado R.A. como único disolvente. Este proceso generó un conjunto de 4 fracciones primarias de aproximadamente 500 mL cada una, separadas de acuerdo al color que presentaban conforme progresaba la elución: café (**Sp-12**), verde intenso (**Sp0-12**), amarillo intenso (**Sp1-12**) y amarillo claro (**Sp2-12**). De acuerdo a su perfil en CCD, se determinó que la fracción **Sp1-12** (280.7 mg) contenía los metabolitos de tipo biflavonoide de interés, por ello se sometió a un segundo fraccionamiento con la misma técnica recién descrita para el fraccionamiento del extracto orgánico. Se obtuvieron 63 eluatos de 5 mL, los cuales se reunieron en un conjunto de 5 subfracciones por su similitud en CCD.

La resolución de la fracción **Sp4-24**, se hizo mediante CCA sobre gel de sílice y mezclas de CHCl₃:MeOH con incrementos de polaridad (1:0→0:1); la fracción **Sp1-35** [CHCl₃:MeOH (9:1)] (**Esquema 3**), se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa de gel de sílice [CHCl₃:MeOH (95:5) x 6], lo que condujo al aislamiento de amentoflavona (**2**) y de bilobetina (**3**) **Sp1-35c**. El biflavonoide amentoflavona (**2**) también se aisló de la fracción **Sp1-25**, bajo las mismas condiciones empleadas para resolver **Sp4-24** (**Esquema 3**).

Los biflavonoides **2** y **3** aislados en esta especie de *Selaginella*, se analizaron por el método de UPLC/MS, como se describe en el inciso **4.1.3**.

La estructura del compuesto **2** se determinó mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas (RMN-¹H y RMN-¹³C) con las reportadas en la literatura. La estructura del compuesto **3** se determinó por el análisis espectroscópico (RMN-¹H, RMN-¹³C y sus modalidades HSQC, HMBC, COSY y NOESY).



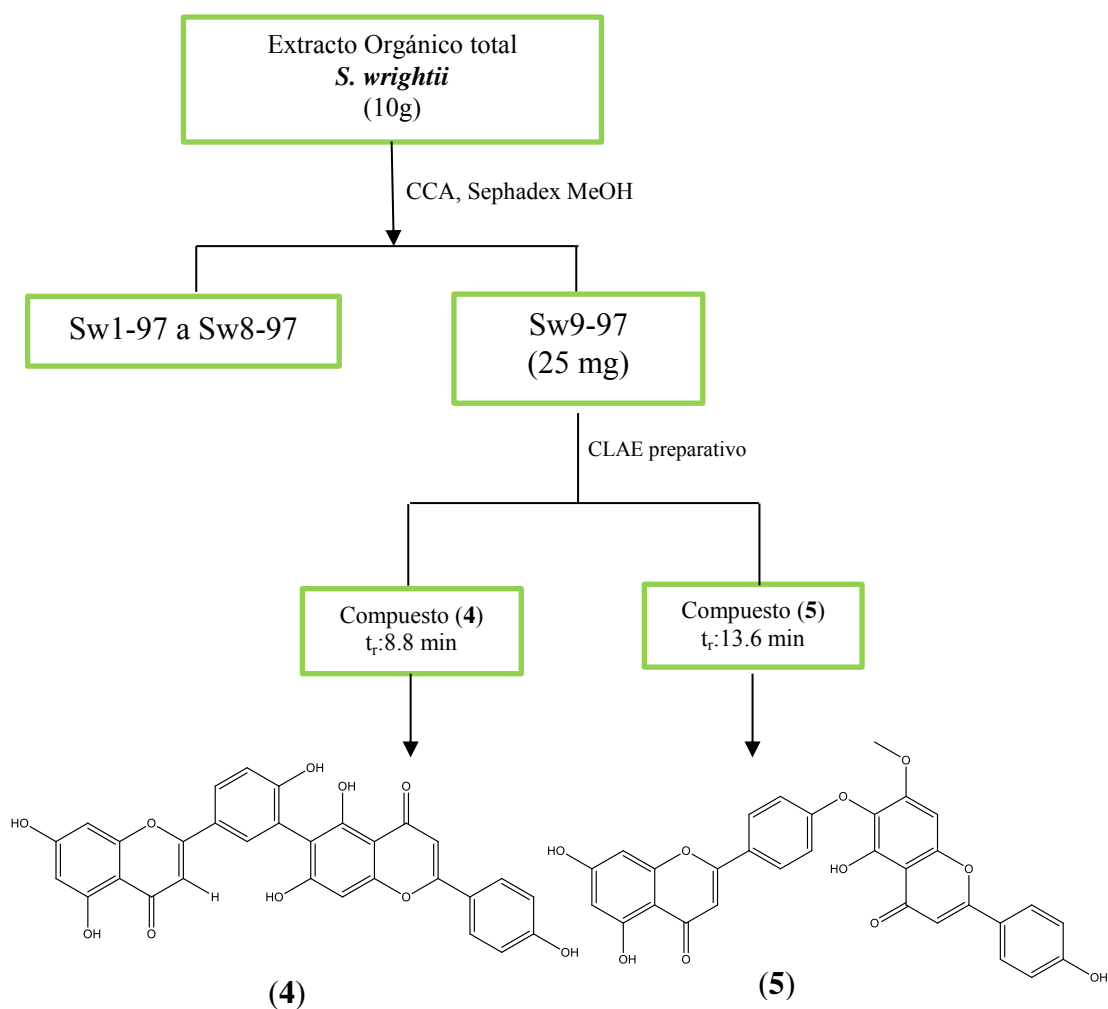
4.2.5 Estudio fitoquímico de *S. wrightii*

Se realizó una prueba de Folin para determinar la presencia de biflavonoides en el extracto total (53 g), así como a los extractos obtenidos por el fraccionamiento por reparto con hexano, cloroformo y acetato de etilo.

4.2.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico total de *S. wrightii*.

De los 53 gramos obtenidos en el extracto total, 43 g se emplearon para el fraccionamiento por reparto tal y como se describe en el inciso **4.2.3** y los 10 g restantes se sometieron a un fraccionamiento en Sephadex LH-20 (40 g) (**Esquema 4**), empleando MeOH R.A como eluyente, resultando 9 fracciones primarias. La resolución de la fracción **Sw9-97** (25 mg) se realizó por CLAE en condiciones de tipo preparativo como se indica en la Tabla 4. La muestra fue disuelta en 3 mL de MeOH grado HPLC y filtrada a través de un prefiltro de 0.45 micras en un vial de 4 mL de capacidad. 100 μ L de la solución anterior se inyectaron en el cromatografo de líquidos (CL), colectándose los eluatos correspondientes a los picos mayoritarios en el cromatograma a 8.8 (compuesto **4**) y 13.6 min (compuesto **5**). Las fracciones con tiempos de retención idénticos, fueron colectadas por separado en matraces Erlenmeyer de 125 mL y evaporadas en rotaevaporador, con ayuda de una bomba de alto vacío. El metabolito **4** se identificó como robustaflavona (**4**, 5 mg) y el compuesto **5** como isocriptomerina (2.5 mg).

La caracterización del compuesto **4** se realizó mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas (NMR-¹H y NMR-¹³C) reportadas por Markam (1987) y con aquellas de muestras auténticas previamente aisladas en nuestro laboratorio y descritas por Menchaca (2009) y la del compuesto **5**, por comparación con los datos espectroscópicos y espectrométricos reportados por Silva (1994) y Zhang (2011) respectivamente.



Esquema 4. Fraccionamiento del extracto orgánico de *S. wrightii*

4.2.5.2 Fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo obtenida por reparto del extracto total en *S. wrightii*

La fracción de acetato de etilo de *S. wrightii*, obtenida como se señala en el inciso **4.2.3** fue llevada a sequedad y pesó 1.103 g. Ésta se sometió a fraccionamiento empleando CCA de gel de sílice (35 g) y como fase móvil mezclas de CHCl_3 -MeOH con incrementos de polaridad (1:0 \rightarrow 0:1). De este tratamiento se obtuvieron 226 eluatos que fueron agrupados por similitud en 10 fracciones de acuerdo a su contenido visualizado por CCD. La fracción **Sw6-49** (63 mg) [CHCl_3 -MeOH (92:8)] se sometió a un segundo

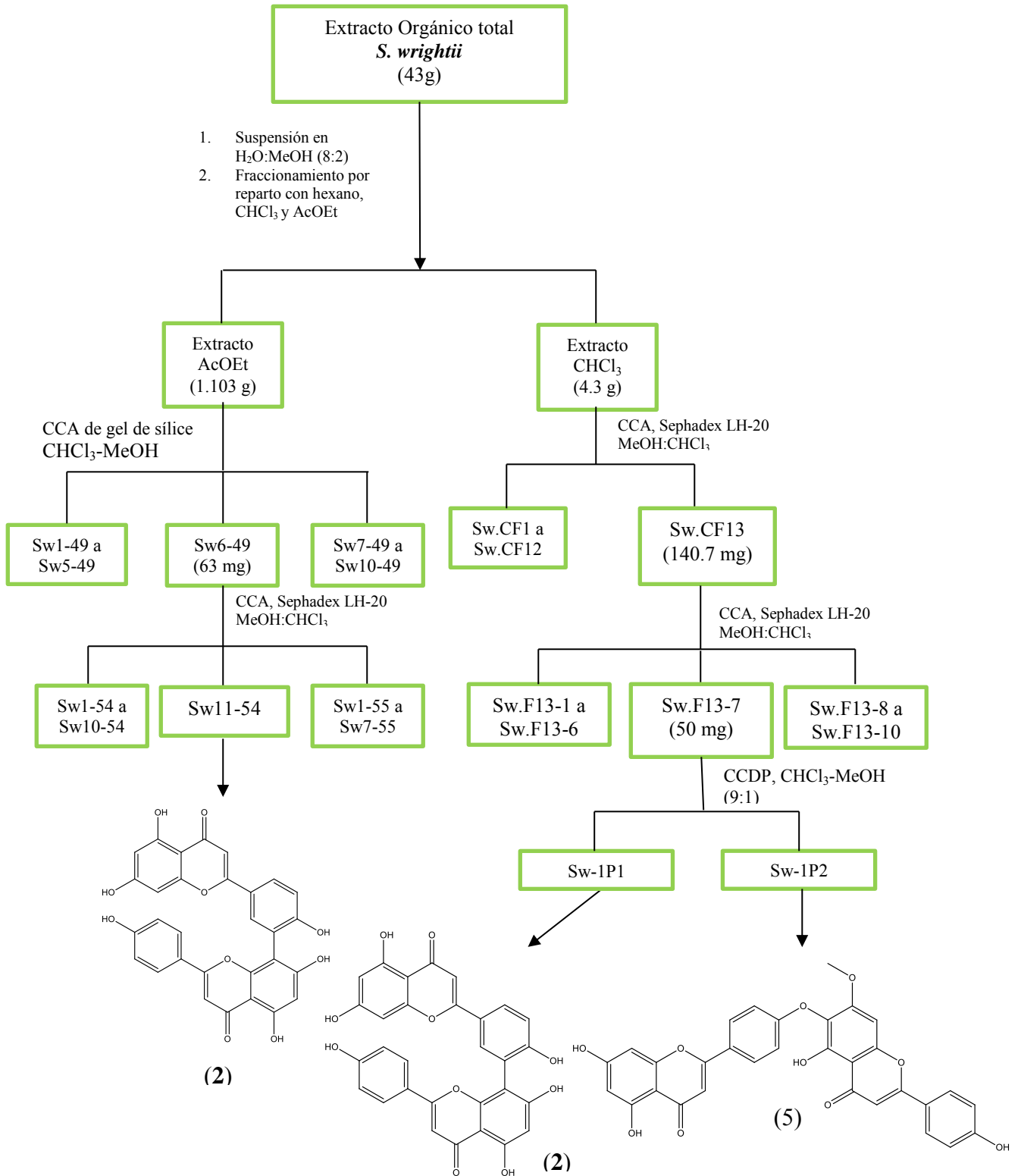


fraccionamiento sobre Sephadex LH-20 empleando MeOH R.A. como fase móvil, resultando 159 eluatos agrupados en 18 fracciones. La fracción **Sw11-54** contenía mayoritariamente al biflavonoide amentoflavona (**2**) (**Esquema 5**).

4.2.5.3 Fraccionamiento de la fracción de cloroformo obtenida por reparto del extracto total de *S. wrightii*.

El extracto seco de cloroformo (4.9 g), se fraccionó por CCA de Sephadex LH-20 empleando MeOH R.A. como único disolvente, obteniéndose 13 fracciones, de las cuales la última (**Sw-CF13**, 140.7 mg) se sometió a un segundo fraccionamiento por CCA en Sephadex LH-20 empleando una mezcla de MeOH:CHCl₃ (8:2); se recolectaron 10 fracciones. La fracción **Sw-F13-7** (50 mg) se purificó por CCDP (CHCl₃-MeOH 9:1), de donde se aislaron e identificaron los compuestos amentoflavona (**2**) e isocriptomerina (**5**) (**Sw-1P2**) (**Esquema 5**).

Los biflavonoides aislados de *S. wrightii* también se analizaron por el método de UPLC/MS, bajo las condiciones descritas de acuerdo al inciso **4.1.3**.



Esquema 5. Procesamiento del material vegetal completo de *S. wrightii*.



4.3 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos acuosos de cuatro especies de *Selaginella* por CCD, CLAE y UPLC/MS.

Se realizó una CCD a los cuatro extractos acuosos totales de las especies de *Selaginella* en un sistema CHCl₃-MeOH (9:1) y los biflavonoides se visualizaron al UV (λ_{254} y λ_{365}) y por desarrollo de coloración (sulfato cérico amoniacal). Los biflavonoides desarrollan un color amarillo intenso.

Se establecieron las condiciones analíticas (señaladas en el punto 4.1.2) para la obtención de los cromatogramas de los compuestos 2 y 4 para ser empleados como referencias en el análisis de los extractos de las materias vegetales motivo de estudio. Se inyectaron independientemente al CL, 20 μ L de soluciones stock de cada biflavonoide preparadas a una concentración de 300 μ g/mL. También se hizo una coelución de los biflavonoides (10 μ L de cada solución stock).

Posteriormente se analizó el perfil fitoquímico de los extractos acuosos de las cuatro especies de *Selaginella*: *S. nothohybrida*, *S. pallescens*, *S. wrightii* y *S. lepidophylla* en los equipos de CLAE y UPLC/MS.

4.3.1 Procesamiento de los extractos acuosos totales para su análisis cromatográfico de líquidos.

Se suspendieron 200 mg de extracto acuoso total seco de *S. nothohybrida* en 10 mL de agua destilada y se hicieron fraccionamientos por reparto con acetato de etilo y posteriormente con cloroformo; ambos extractos orgánicos (extracto acuoso procesado) se juntaron y se concentraron a presión reducida. El residuo sólido orgánico se disolvió en 0.5 mL de MeOH grado HPLC y 20 μ L de esta solución se inyectó en el CL empleando las mismas condiciones analíticas. Se coinyectó la solución stock de los compuestos de referencia (10 μ L) junto con la solución del extracto acuoso procesado (30 μ L). Se siguió el mismo procedimiento para el análisis de los extractos acuosos totales de *S. pallescens*, *S. wrightii* y *S. lepidophylla*.



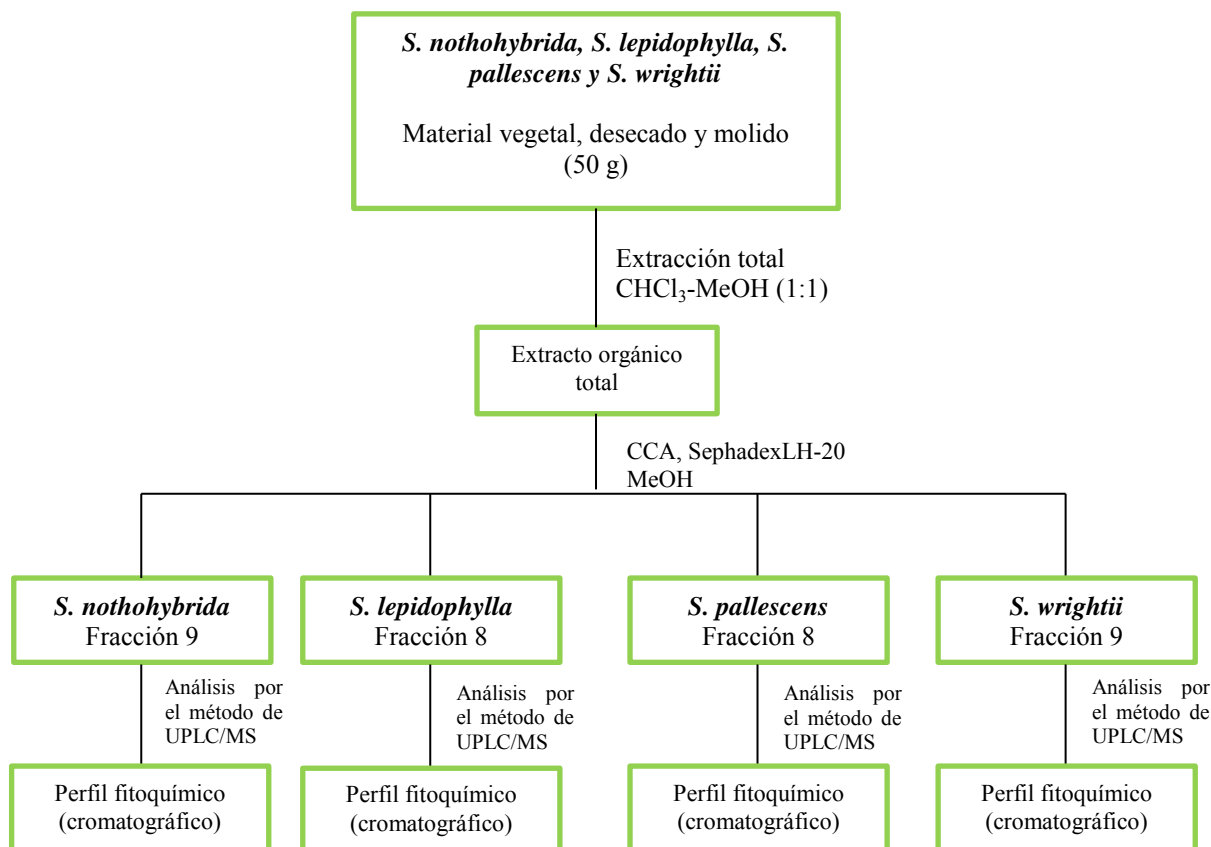
Finalmente las mismas muestras (extractos acuosos procesados) analizadas en el equipo de CLAE se analizaron por el método de UPLC/MS, siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.1.3**.

4.4 Análisis de estabilidad de biflavonoides en extractos acuosos procesados de cuatro especies de *Selaginella* por CLAE.

A fin de corroborar que los metabolitos mayoritarios, permanecen estables por largos periodos, se evaluaron muestras de extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida* obtenidas en el 2009, que fueron conservados liofilizados, sellados con atmósfera de nitrógeno y mantenidos a temperatura ambiente. El análisis se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el inciso anterior.

4.5 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos orgánicos de cuatro especies de *Selaginella* por UPLC/MS.

Se prepararon extractos orgánicos totales con 50 g de material vegetal en muestras auténticas por separado de *S. nothohybrida*, *S. lepidophylla*, *S. pallescens* y *S. wrightii* tal y como se describe en el inciso **4.2.2**. Los extractos orgánicos secos de cada especie, se sometieron a un proceso de fraccionamiento (**Esquema 6**) utilizando una cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 (25 g) y como fase móvil MeOH grado R.A. como único disolvente. Las fracciones con el contenido biflavonoide fueron visualizadas por cromatografía en capa fina al UV de onda corta: *S. nothohybrida* (**F9**), *S. lepidophylla* (**F8**), *S. pallescens* (**F8**) y *S. wrightii* (**F6**), se analizaron por el método de UPLC/MS, para la obtención del perfil fitoquímico.



Esquema 6. Diagrama de obtención del perfil cromatográfico por el método de UPLC/MS de las especies de *Selaginella*.

4.6 Capacidad antioxidante de extractos acuosos totales de cuatro especies de *Selaginella* y de compuestos puros: Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

La evaluación de la actividad antioxidante, se realizó por medio de la capacidad de neutralización del radical DPPH, mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Cheng y colaboradores (2006), con algunas modificaciones. En el análisis se calculó, el Área Bajo la Curva (ABC) y la Capacidad Equivalente a Trolox® (TEAC), según lo describen Silva y colaboradores (2007).

La mezcla de reacción consistió en 100 µL de una disolución 0.208 mM de DPPH y 100 µL de una disolución metanólica (1 mg/mL) del extracto acuoso total, de cada especie de *Selaginella*, de los compuestos puros **2** y **4** y de los estándares de referencia quercetina, y Trolox®; cada muestra se analizó por triplicado. Se construyó una curva de calibración



de Trolox® a las concentraciones 0.4, 0.32, 0.24, 0.16 y 0.08 mM. La reacción se monitoreó por medio de un espectrofotómetro de UV/VIS a 540 nm por 30 minutos.

4.7 Evaluación de la toxicidad aguda en ratones, del extracto acuoso total de *Selaginella nothohybrida*.

El ensayo biológico se realizó utilizando ratones macho adquiridos en Harlan, México de la cepa ICR con un peso promedio de 26 g adaptados a las condiciones del bioterio con una temperatura ambiental de 21°C, humedad relativa entre 70-80%, ciclos de 12 h luz/oscuridad, y alimento/agua libre. Previo a la realización de los experimentos los animales tuvieron un periodo de adaptación de dos días y permanecieron con 4 horas de ayuno antes del ensayo farmacológico.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y a las recomendaciones realizadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para Pruebas Farmacológicas y Toxicológicas de la Facultad de Química, UNAM, coordinado por el Comité de ética para el Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio, UNAM.

El extracto acuoso de *S. nothohybrida* a evaluar, se suspendió en una solución salina isotónica (NaCl, 0.9% p/v).

La evaluación del extracto acuoso total de *S. nothohybrida*, se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Lorke (1983). El experimento se desarrolló en dos fases independientes. En la primera, doce animales divididos en grupos de tres (n=3) se administraron por vía oral con una dosis única de 10, 100 y 1000 mg/kg del extracto a evaluar y del vehículo, independientemente. En la segunda fase, las dosis administradas fueron 1600, 2900 y 5000 mg/kg.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presente investigación se desarrolló como un proyecto enfocado al estudio fitoquímico de especies de *Selaginella* con amplio uso en la medicina popular de México, dentro de la cual se estudió principalmente el contenido químico de los extractos acuosos y orgánicos de *S. pallescens* y *S. wrightii*. Los resultados que se generaron en la investigación se resumen a continuación: en primer lugar se realizó el estudio químico de las especies *S. wrightii* y *S. pallescens* aplicando distintas técnicas cromatográficas, que permitieron el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios, así como el establecimiento y comparación de perfiles cromatográficos de extractos orgánicos y acuosos útiles para pruebas de identidad química de las doradillas. A continuación se realizó un estudio sobre la estabilidad de los metabolitos secundarios mayoritarios en los extractos acuosos de las especies *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla*. Se realizaron pruebas de actividad antioxidante a los extractos acuosos totales de las cuatro especies de *Selaginella* empleadas a lo largo del proyecto, a fin de determinar si existen diferencias en las respuestas farmacológicas. Finalmente se realizó la prueba de toxicidad aguda en *S. nothohybrida* por ser una de las especies mayormente comercializadas, la prueba se realizó a pesar de que la especie se haya utilizado por siglos sin que se hayan documentado efectos tóxicos o reacciones adversas. En este trabajo, por primera vez se obtuvo el perfil fitoquímico de la especie *S. wrightii*.

5.1 Estudio fitoquímico del extracto orgánico y acuoso de *S. pallescens*.

5.1.1 Aislamiento y elucidación estructural de ácido eucómico (1)

El extracto acuoso obtenido de *S. pallescens* se sometió a tratamiento ácido, con finalidad de hidrolizar posibles biflavonoides glicosilados, sin embargo se obtuvo un compuesto fenólico no flavonoide identificado como ácido eucómico (**1**, 5 mg). La elucidación estructural de este compuesto se realizó como se detalla a continuación.



El espectro IR mostró bandas características para grupos hidroxilo en 3177 cm^{-1} , ácido carboxílico (1715 cm^{-1}) e hidrógenos aromáticos (3028 cm^{-1}). El espectro de RMN- ^{13}C presenta 11 señales: seis carbonos aromáticos entre 115.0 y 155.9 ppm, dos pares de carbonos equivalentes en δ 115.0 y 131.3, dos carbonos cuaternarios (126.0 y 155.9 ppm), tres carbonos alifáticos y dos grupos carboxilo. El espectro de RMN- ^1H mostró en la región aromática un sistema del tipo AA'XX', con constante de acoplamiento para hidrógenos en posición *orto* entre sí (8.5 Hz), asignados a H-8 y H-10 (6.69 ppm) y a H-7 y H-11 (7.03 ppm). De acuerdo a lo anterior el sistema aromático debe contener dos sustituyentes diferentes en posición *para*. Por la integración de sus señales en RMN- ^1H , el sistema alifático consistió de dos metilenos aislados, los dos como sistemas AB; su desplazamiento químico y correlaciones con los átomos C-H bencénicos en posiciones 7 y 11 en el espectro HMBC indicaron que en un caso, el grupo metileno se encontraba vecino a un anillo aromático (44.1 ppm, δ_{H} 2.92, H_a y δ_{H} 2.82, H_b); la constante de acoplamiento entre H_a y H_b evidenció que se trataba de hidrógenos geminales ($J=13.7\text{ Hz}$) y el grupo metileno se asignó en la posición 4 del compuesto. El otro grupo metileno presentó también constantes de acoplamiento de tipo geminal ($\delta_{\text{C}} 2.92\text{ } J=16.3\text{ Hz}$) en 2.91 y 2.58 ppm, y se le asignó la posición 2. El experimento HMBC determinó que ambos metilenos se encontraban separados entre sí por un carbono cuaternario el cual por su desplazamiento químico en RMN- ^{13}C , debe estar unido a sustituyentes polares (75.2 ppm, C-3). El resto de señales observadas se asignaron como sigue: un grupo carboxilo (δ_{C} 176.3, C-5) como sustituyente del carbono cuaternario C-3, como se comprobó por las correlaciones C-H de C-3 y CH_2 -4 en el espectro HMBC (**Anexo 5**); y el otro carboxilo, como sustituyente del metileno C-2 (δ_{C} 172.95, C-1), como se determinó por las correlaciones C-H de C-1 y CH_2 -2 en el espectro HMBC. Como no se encontraron otras señales en todos los espectros hasta aquí mencionados, el sustituyente en la posición 9 del núcleo bencénico debe ser un hidroxilo, así como el cuarto sustituyente del carbono cuaternario en posición 3.

Los datos espectroscópicos y la estructura de este compuesto se muestran en la Tabla 5 y en los **Anexos 1-5**,

**Tabla 5.** Estructura y datos espectroscópicos del ácido eucómico (1).

Ácido eucómico (1) C ₁₁ H ₁₂ O ₆																									
IR (ATR) 3177, 3028, 2932, 2604, 1715, 1514, 1440, 1190, 1069 cm ⁻¹ (Anexo 1).																									
RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) (Anexo 2)																									
<table border="1"><thead><tr><th>Asignación</th><th>δ (ppm)</th><th>J (Hz)</th></tr></thead><tbody><tr><td>H_{2a}</td><td>2.58</td><td>d, J = 16.3 Hz</td></tr><tr><td>H_{2b}</td><td>2.91</td><td>d, J = 16.3 Hz</td></tr><tr><td>H_{4a}</td><td>2.82</td><td>d, J = 13.7 Hz</td></tr><tr><td>H_{4b}</td><td>2.92</td><td>d, J = 13.7 Hz</td></tr><tr><td>H-7/ H-11</td><td>7.03</td><td>d, J = 8.5 Hz</td></tr><tr><td>H-8/H-10</td><td>6.69</td><td>d, J = 8.5 Hz</td></tr><tr><td>OH-3</td><td>3.44</td><td>s</td></tr></tbody></table>		Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	H _{2a}	2.58	d, J = 16.3 Hz	H _{2b}	2.91	d, J = 16.3 Hz	H _{4a}	2.82	d, J = 13.7 Hz	H _{4b}	2.92	d, J = 13.7 Hz	H-7/ H-11	7.03	d, J = 8.5 Hz	H-8/H-10	6.69	d, J = 8.5 Hz	OH-3	3.44	s
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)																							
H _{2a}	2.58	d, J = 16.3 Hz																							
H _{2b}	2.91	d, J = 16.3 Hz																							
H _{4a}	2.82	d, J = 13.7 Hz																							
H _{4b}	2.92	d, J = 13.7 Hz																							
H-7/ H-11	7.03	d, J = 8.5 Hz																							
H-8/H-10	6.69	d, J = 8.5 Hz																							
OH-3	3.44	s																							
RMN- ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) (Anexo 3)																									
<table border="1"><thead><tr><th># C</th><th>δ (ppm)</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>173.0</td></tr><tr><td>2</td><td>42.3</td></tr><tr><td>3</td><td>75.2</td></tr><tr><td>4</td><td>44.1</td></tr><tr><td>5</td><td>176.3</td></tr><tr><td>6</td><td>126.0</td></tr><tr><td>7/11</td><td>131.3</td></tr><tr><td>8/10</td><td>115.0</td></tr><tr><td>9</td><td>155.9</td></tr></tbody></table>		# C	δ (ppm)	1	173.0	2	42.3	3	75.2	4	44.1	5	176.3	6	126.0	7/11	131.3	8/10	115.0	9	155.9				
# C	δ (ppm)																								
1	173.0																								
2	42.3																								
3	75.2																								
4	44.1																								
5	176.3																								
6	126.0																								
7/11	131.3																								
8/10	115.0																								
9	155.9																								

La configuración de la molécula se determinó como (R)-(-)-ácido eucómico, por medio del análisis de rotación óptica $[\alpha]_D^{20}$ -15 (c 0.0048, MeOH) el cual fue comparado con el reportado por Okada *et al.*, 2009.



En 1979 Ishii en Japón, reportó el aislamiento del ácido eucómico (**1**) de la especie *Cattleya trianaei*, a pesar de que este compuesto ya había sido aislado años anteriores de las especies vegetales *Petalostemon gattingeri*, *Eucomis punctata* y *Licoris radiata* (Ishii *et al*, 1979). En 2011 se aisló el compuesto en forma glicosilada de la especie vegetal *Vanda teres*, como Vandaterósido I (monoglicósido), Vandaterósido II (biglicosilado) y Vandaterósido III (triglicosilado) (Simmler *et al*, 2011), lo cual sugiere que en esta especie de *Selaginella* también podría presentarse en alguna de estas formas, puesto que el compuesto se obtuvo de la hidrólisis del extracto acuoso en donde pudo haberse perdido la parte glicosilada. Hasta el momento no se han encontrado reportes en donde se mencione el aislamiento de este metabolito en las especies de *Selaginella*.

5.1.2 Aislamiento de amentoflavona (2) y bilobetina (3).

El extracto orgánico total obtenido por percolación de *S. pallescens* se seleccionó para su análisis considerando que dió resultado positivo en la prueba de Folin (coloración azul), lo cual aseguró la presencia de fenoles. El contenido del extracto resultó ser bastante complejo por lo que se tuvo que practicar una secuencia de cromatografías en columna abierta (Sephadex-LH 20 y sílica gel) y capa delgada preparativa, para el aislamiento de amentoflavona (**2**, 11mg) y de bilobetina (**3**, 3 mg).

5.2 Estudio fitoquímico del extracto orgánico de *S. wrightii*.

5.2.1 Aislamiento de amentoflavona (2), robustaflavona (4) e isocriptomerina (5).

La prueba de Folin para determinar la presencia de fenoles en el extracto orgánico de *S. wrightii*, resultó positiva, por lo cual se procedió a separar los compuestos presentes para determinar su estructura. A fin de simplificar la mezcla de componentes presentes en este extracto total, se realizó un fraccionamiento por reparto con hexano, cloroformo y acetato de etilo; sólo la fracción de hexano dio negativo en la prueba de Folin.



El extracto de acetato de etilo se sometió a varios fraccionamientos en columna abierta de sílica gel y Sephadex LH-20 logrando obtener amentoflavona (**2**) como compuesto mayoritario, este compuesto también se aisló junto con isocriptomerina (**5**) del extracto de cloroformo después de un fraccionamiento en Sephadex LH-20 y CCDP.

Una parte del extracto total íntegro, se sometió a fraccionamiento en Sephadex LH-20. La fracción (**Sw9-97**) mostró en CCD la presencia de biflavonoides, los cuales no pudieron separarse por cromatografía en columna abierta ni por CCDP; como alternativa se utilizó el equipo de CLAE. En el cromatograma correspondiente se observaron dos picos mayoritarios con tiempos de retención (t_r) de 8.8 y 13.6 min. Ambos se purificaron en condiciones preparativas. Los análisis espectroscópicos y espectrométricos determinaron que el primer pico correspondía al compuesto robustaflavona (**4**) y el segundo a la isocriptomerina (**5**).

5.3 Determinación de las estructuras de los biflavonoides obtenidos de las especies *S. pallescens* y *S. wrightii*.

La asignación estructural de biflavonoides por análisis espectroscópicos debe ser muy minuciosa por presentar señales muy parecidas en los espectros de RMN. De las especies estudiadas se aislaron los biflavonoides: amentoflavona (**2**), bilobetina (**3**), robustaflavona (**4**) e isocriptomerina (**5**). Estos se caracterizan como se describió en el apartado de antecedentes, por tener dos unidades flavonoides, unidas entre sí por: a) enlaces C-C aromáticos en las posiciones 3'-6'' o 3'-8'', o, b) por enlaces C-O-C interflavonoides en alguna posición del anillo "B" de la primera unidad con el anillo "A" de la segunda unidad. En el caso "a", el espectro de RMN-¹H del biflavonoide contiene siempre un sistema de señales ABX, un sistema AB, un sistema A₂X₂ y tres señales singulete. En el caso del biflavonoide **2**, el enlace interflavonoide se encuentra entre los carbonos 3'-8'' y en biflavonoide **4**, entre los carbonos 3'-6''. A pesar de que ambos biflavonoides son isómeros de posición, es característica de cada uno de ellos, las posiciones del sistema ABX en el espectro de RMN-¹H. Mientras que en la amentoflavona (**2**) "H_X" se encuentra con el



desplazamiento a campo más bajo (8.1 ppm) y en orden “ABX” de mayor a menor campo, en la robustaflavona (**4**), la rama “A₂” del sistema “A₂X₂” se localiza a campo más bajo que el sistema “ABX” y éste se ordena como “AXB” (**Figura 8**)

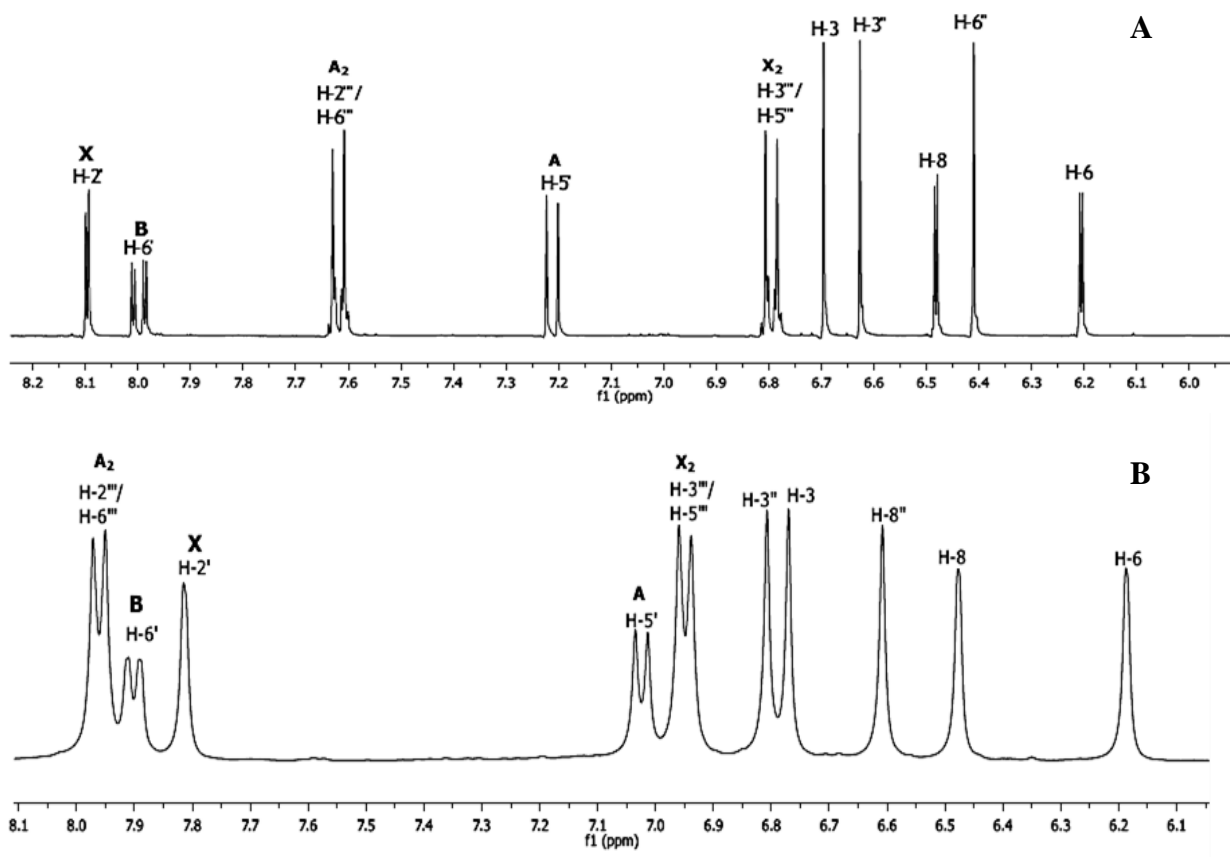


Fig. 8. A) Espectro de RMN-¹H de amentoflavona (**2**) (400 MHz, acetona-*d*₆).
B) Espectro de RMN-¹H de robustaflavona (**4**) (400 MHz, acetona-*d*₆)

5.3.1 Elucidación estructural de amentoflavona (**2**).

La determinación estructural de este compuesto se hizo principalmente por la comparación de resultados espectroscópicos de RMN reportados por Zhang (2011) y Menchaca (2009).

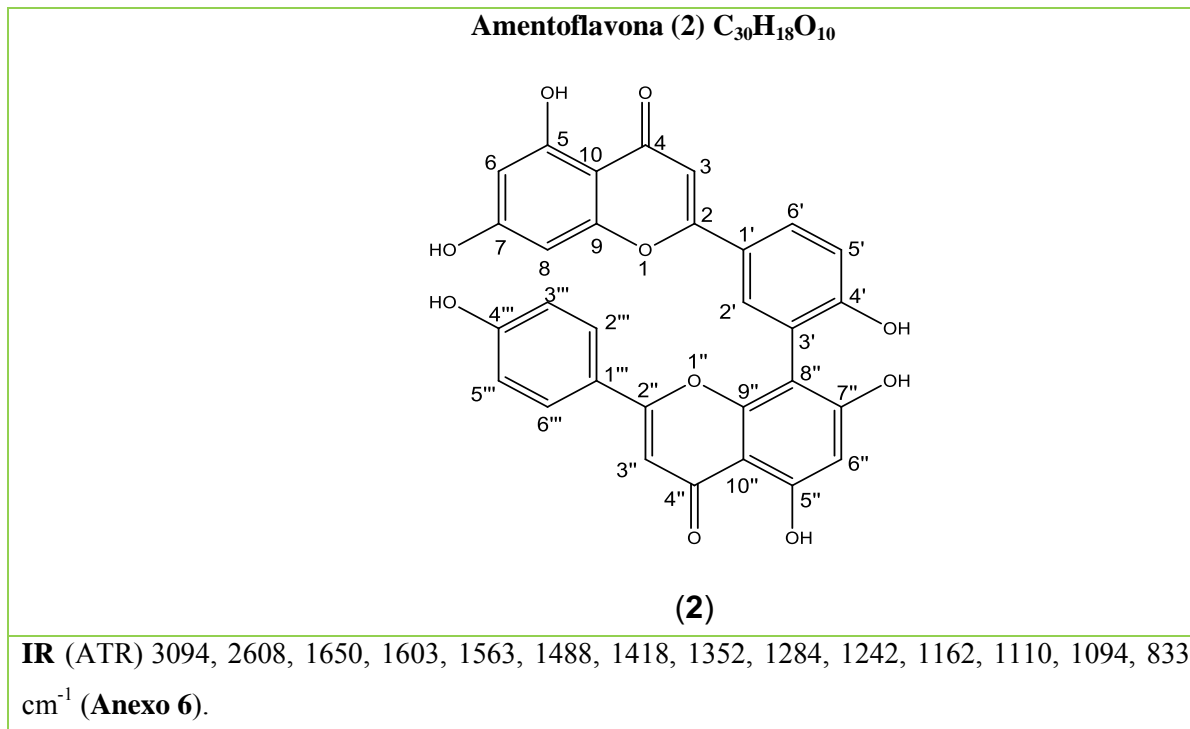
En el espectro de RMN-¹H, se observa el sistema ABX de un benceno 1, 3, 4 trisustituido, con señales en δ_H : 8.10 (d, $J=2$ Hz, H-2'), 7.21 (d, $J=8.7$ Hz, H-5') y 8.00 (dd,



$J=8.7, 2 \text{ Hz}$, =H-6'). Se observaron también las señales de un sistema A_2X_2 asignadas a los cuatro protones aromáticos: H-2''', H-6''', y H-3''', H-5''', como dos dobletes en $\delta_H 7.62$ ($J=8.8 \text{ Hz}$) y $\delta_H 6.80$ ($J=8.8 \text{ Hz}$), las señales doblete en $\delta_H 6.21$ y $\delta_H 6.48$ ($J=2 \text{ Hz}$) que se encuentran en disposición *meta* corresponden respectivamente a los hidrógenos H-6 y H-8. Lo anterior se confirmó con el espectro de COSY (**Anexo 9**). Además, la presencia de tres singuletes en $\delta_H 6.70$, $\delta_H 6.63$ y $\delta_H 6.41$ asignados a H-3, H-3'' y H-6''. La posición de unión de las dos unidades de flavona como C-3'-C-8'' se estableció con base en la correlación en el experimento HMBC (**Anexo 11**) entre H-2' y C-8''. La señal del carbono C-8'' de enlace interflavonoide se localizó en 104.4 ppm. El espectro de RMN- ^{13}C confirmó la presencia de 30 átomos de carbono en esta molécula y la localización de sus correspondientes hidrógenos se determinó mediante el espectro HSQC (**Anexo 10**).

En la Tabla 6 se presentan las características espectroscópicas de la amentoflavona (**2**). Los datos espectroscópicos de amentoflavona (**2**) concuerdan con los reportados por Zhang (2011). Además este compuesto ha sido previamente aislado de otras especies de *Selaginella* como compuesto mayoritario.

Tabla 6. Estructura y datos espectroscópicos de amentoflavona (**2**).



RMN-¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) (Anexo 7)

Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	6.70	s
H-6	6.21	d, J= 2 Hz
H-8	6.48	d, J= 2 Hz
H-2'	8.10	d, J= 2 Hz
H-5'	7.21	d, J= 8.7 Hz
H-6'	8.00	dd, J= 8.7, 2 Hz
H-3''	6.63	s
H-6''	6.41	s
H-2'''/H-6'''	7.62	d, J= 8.8 Hz
H-3'''/H-5'''	6.80	d, J= 8.8 Hz
OH-5	12.97	s
OH-5''	13.13	s

RMN-¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) (Anexo 8)

# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)
		1'	123.4			1'''	123.3
2	164.9	2'	132.6	2''	165.1	2'''	129.2
3	104.3	3'	120.8	3''	103.8	3'''	116.7
4	183.5	4'	160.3	4''	183.1	4'''	161.8
5	162.8	5'	117.5	5''	162.6	5'''	116.7
6	99.7	6'	128.8	6''	99.8	6'''	129.2
7	163.3			7''	163.3		
8	94.8			8''	104.4		
9	158.8			9''	156.1		
10	105.5			10''	105.4		

El análisis por el método de UPLC/MS (**Fig. 9**) mostró para el compuesto **2** un t_r de 1.99 min, el pseudo ión molecular $[M+H]^+$ m/z 539, los iones provenientes de la fragmentación tipo retro Diels-Alder (RDA) m/z 153 y m/z 403, este último tuvo una pérdida previa de una molécula de agua (formación de un anillo de 5 miembros tipo furano) y pérdidas subsecuentes de CO para dar los fragmentos m/z 375 y m/z 347, además se observó el fragmento con m/z 377 proveniente de una retrociclación, con los fragmentos subsecuentes m/z 335 y m/z 307. (**Fig. 10**)

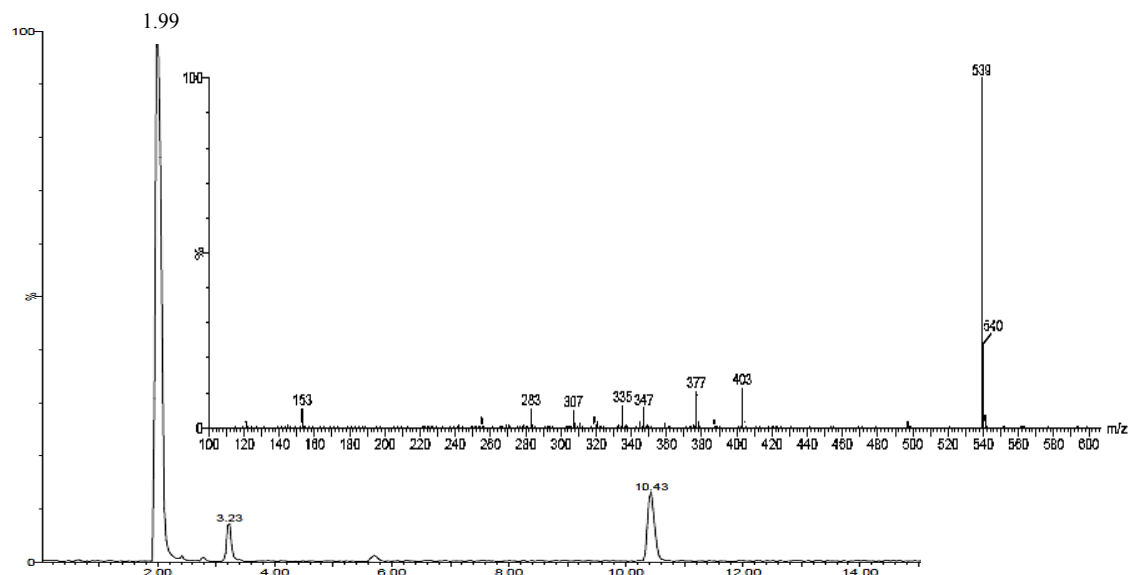


Fig. 9. Análisis por el método de UPLC/MS de amentoflavona (2).

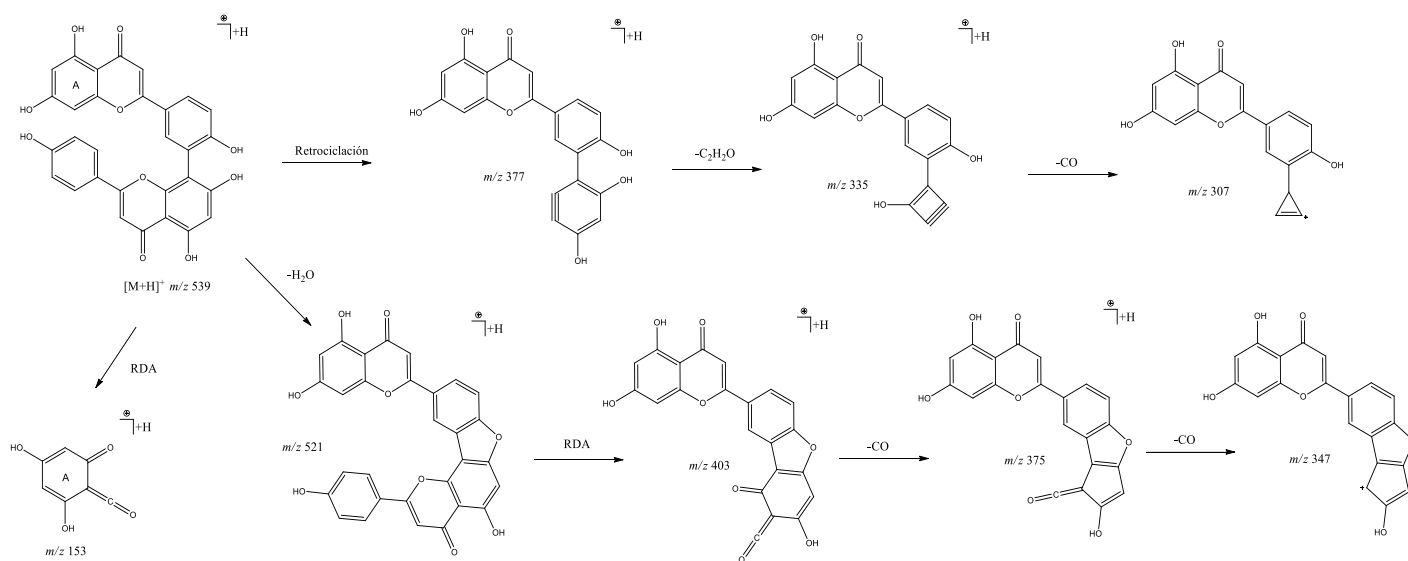


Fig. 10. Patrón de fragmentación para la amentoflavona (2) por la técnica ESI⁺.



5.3.2 Elucidación estructural de bilobetina (3)

En el espectro de RMN-¹H (**Fig. 11**) para este compuesto también se observan las señales correspondientes a un sistema ABX en δ_H 7.38 (d, $J=8$ Hz, H-5'), δ_H 8.19 (d, $J=8$ Hz, H-6'), δ_H 8.15 (s, H-2'); el sistema A₂X₂ en δ_H 7.59 (d, $J=8.6$ Hz, H-2''' y H-6'''), δ_H 6.84 (d, $J=8.6$ Hz, H-3''' y H-5''') cuya correlación de hidrógenos se puede observar en el espectro COSY (**Anexo 16**). La diferencia principal de este compuesto con amentoflavona (**2**) y robustaflavona (**4**) se observa en la zona alifática donde hay una señal característica de un grupo metoxilo en δ_H 3.86 ppm. La posición de este último se determinó principalmente por el acoplamiento que mostró el metilo en el espectro NOESY (**Anexo 19**) con el hidrógeno H-5', además la correlación que mostró en el espectro HMBC con C-4' y éste con H-6' (**Fig. 12**). Por las señales de C-6'' (99.5 ppm) y C-8'' (103.9) se determinó que el tipo de biflavonoide al que corresponde es del tipo amentoflavona, puesto que las señales de estos carbonos en los biflavonoides del tipo robustaflavona aparecen alrededor de 109.0 y 94.0 ppm respectivamente y las del tipo amentoflavona alrededor de 99.0 y 104.0 ppm (Markham *et al.*, 1987). Los resultados obtenidos en el método de UPLC/MS corroboraron la estructura de este compuesto, con base en su peso molecular y fragmentos sobresalientes.

En la Tabla 7 se describen los datos espectroscópicos de este compuesto, los cuales tuvieron concordancia con los reportados por Markham y colaboradores (1987).



Tabla 7. Estructura y datos espectroscópicos de bilobetina (3).

Bilobetina (3) C₃₁H₂₀O₁₀																																																																																																							
<p style="text-align: center;">(3)</p>																																																																																																							
IR (ATR) 3161,2922, 2851, 2612, 1729, 1648, 1604, 1573, 1496, 1422, 1354, 1240, 1167, 1110, 1052, 1028, 833 cm ⁻¹ (Anexo 13).																																																																																																							
RMN -¹H (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) (Anexo 14)																																																																																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Asignación</th> <th style="text-align: center;">δ (ppm)</th> <th style="text-align: center;">J (Hz)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>H-3</td><td style="text-align: center;">6.77</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-6</td><td style="text-align: center;">6.25</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-8</td><td style="text-align: center;">6.54</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-2'</td><td style="text-align: center;">8.15</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-5'</td><td style="text-align: center;">7.38</td><td style="text-align: center;">d, J=8 Hz</td></tr> <tr><td>H-6'</td><td style="text-align: center;">8.19</td><td style="text-align: center;">d, J=8 Hz</td></tr> <tr><td>H-3''</td><td style="text-align: center;">6.66</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-6''</td><td style="text-align: center;">6.46</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>H-2'''/ H-6'''</td><td style="text-align: center;">7.59</td><td style="text-align: center;">d, J=8.6 Hz</td></tr> <tr><td>H-3'''/ H-5'''</td><td style="text-align: center;">6.84</td><td style="text-align: center;">d, J=8.6 Hz</td></tr> <tr><td>O-CH₃</td><td style="text-align: center;">3.86</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>OH-5</td><td style="text-align: center;">12.98</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> <tr><td>OH-5''</td><td style="text-align: center;">13.16</td><td style="text-align: center;">s</td></tr> </tbody> </table>								Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	H-3	6.77	s	H-6	6.25	s	H-8	6.54	s	H-2'	8.15	s	H-5'	7.38	d, J=8 Hz	H-6'	8.19	d, J=8 Hz	H-3''	6.66	s	H-6''	6.46	s	H-2'''/ H-6'''	7.59	d, J=8.6 Hz	H-3'''/ H-5'''	6.84	d, J=8.6 Hz	O-CH ₃	3.86	s	OH-5	12.98	s	OH-5''	13.16	s																																																						
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)																																																																																																					
H-3	6.77	s																																																																																																					
H-6	6.25	s																																																																																																					
H-8	6.54	s																																																																																																					
H-2'	8.15	s																																																																																																					
H-5'	7.38	d, J=8 Hz																																																																																																					
H-6'	8.19	d, J=8 Hz																																																																																																					
H-3''	6.66	s																																																																																																					
H-6''	6.46	s																																																																																																					
H-2'''/ H-6'''	7.59	d, J=8.6 Hz																																																																																																					
H-3'''/ H-5'''	6.84	d, J=8.6 Hz																																																																																																					
O-CH ₃	3.86	s																																																																																																					
OH-5	12.98	s																																																																																																					
OH-5''	13.16	s																																																																																																					
RMN -¹³C (100 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) (Anexo 15)																																																																																																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"># C</th> <th style="text-align: center;">δ (ppm)</th> <th style="text-align: center;"># C</th> <th style="text-align: center;">δ (ppm)</th> <th style="text-align: center;"># C</th> <th style="text-align: center;">δ (ppm)</th> <th style="text-align: center;"># C</th> <th style="text-align: center;">δ (ppm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td>1'</td> <td style="text-align: center;">124.1</td> <td></td> <td></td> <td>1'''</td> <td style="text-align: center;">123.5</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td style="text-align: center;">164.8</td> <td>2'</td> <td style="text-align: center;">132.1</td> <td>2''</td> <td style="text-align: center;">164.9</td> <td>2'''</td> <td style="text-align: center;">128.9</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td style="text-align: center;">104.7</td> <td>3'</td> <td style="text-align: center;">122.7</td> <td>3''</td> <td style="text-align: center;">103.7</td> <td>3'''</td> <td style="text-align: center;">116.7</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td style="text-align: center;">183.6</td> <td>4'</td> <td style="text-align: center;">161.8</td> <td>4''</td> <td style="text-align: center;">184.0</td> <td>4'''</td> <td style="text-align: center;">161.9</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td style="text-align: center;">162.2</td> <td>5'</td> <td style="text-align: center;">112.4</td> <td>5''</td> <td style="text-align: center;">161.4</td> <td>5'''</td> <td style="text-align: center;">116.7</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td style="text-align: center;">99.7</td> <td>6'</td> <td style="text-align: center;">128.8</td> <td>6''</td> <td style="text-align: center;">99.5</td> <td>6'''</td> <td style="text-align: center;">128.9</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td style="text-align: center;">163.3</td> <td></td> <td></td> <td>7''</td> <td style="text-align: center;">162.4</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>8</td> <td style="text-align: center;">94.8</td> <td></td> <td></td> <td>8''</td> <td style="text-align: center;">103.9</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>9</td> <td style="text-align: center;">158.8</td> <td></td> <td></td> <td>9''</td> <td style="text-align: center;">155.7</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>10</td> <td style="text-align: center;">104.7</td> <td></td> <td></td> <td>10''</td> <td style="text-align: center;">103.6</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>O-CH₃</td> <td style="text-align: center;">57.0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>								# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)			1'	124.1			1'''	123.5	2	164.8	2'	132.1	2''	164.9	2'''	128.9	3	104.7	3'	122.7	3''	103.7	3'''	116.7	4	183.6	4'	161.8	4''	184.0	4'''	161.9	5	162.2	5'	112.4	5''	161.4	5'''	116.7	6	99.7	6'	128.8	6''	99.5	6'''	128.9	7	163.3			7''	162.4			8	94.8			8''	103.9			9	158.8			9''	155.7			10	104.7			10''	103.6			O-CH ₃	57.0						
# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)																																																																																																
		1'	124.1			1'''	123.5																																																																																																
2	164.8	2'	132.1	2''	164.9	2'''	128.9																																																																																																
3	104.7	3'	122.7	3''	103.7	3'''	116.7																																																																																																
4	183.6	4'	161.8	4''	184.0	4'''	161.9																																																																																																
5	162.2	5'	112.4	5''	161.4	5'''	116.7																																																																																																
6	99.7	6'	128.8	6''	99.5	6'''	128.9																																																																																																
7	163.3			7''	162.4																																																																																																		
8	94.8			8''	103.9																																																																																																		
9	158.8			9''	155.7																																																																																																		
10	104.7			10''	103.6																																																																																																		
O-CH ₃	57.0																																																																																																						

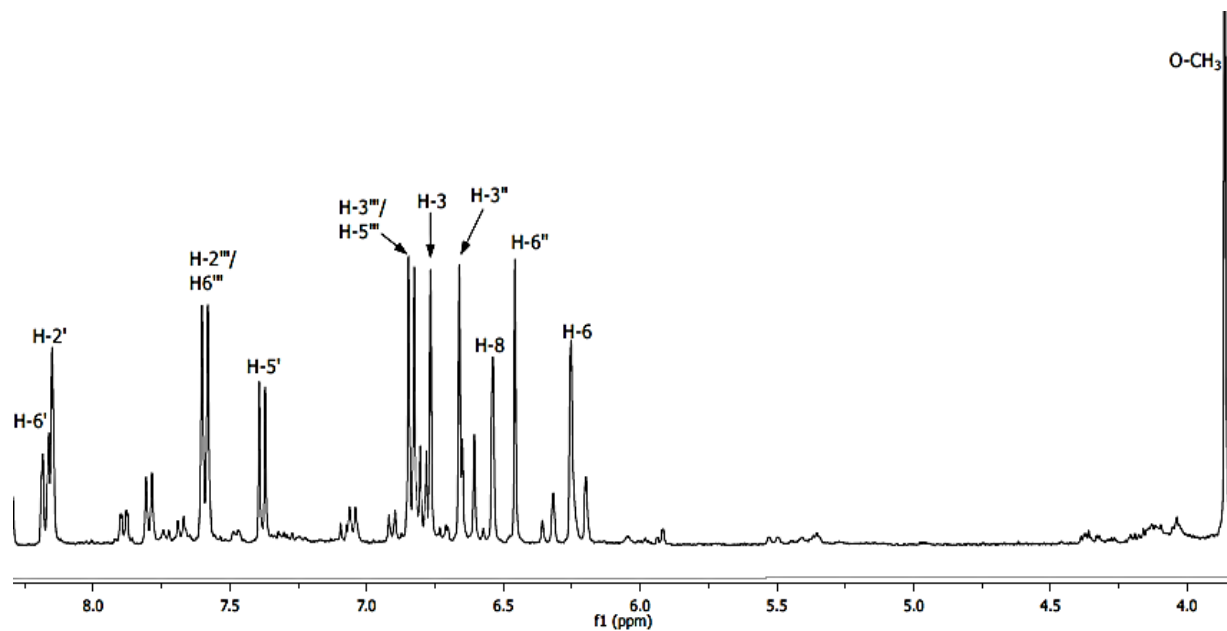


Fig. 11. Espectro de RMN-¹H de bilobetina (3) (400 MHz, acetona-*d*₆).

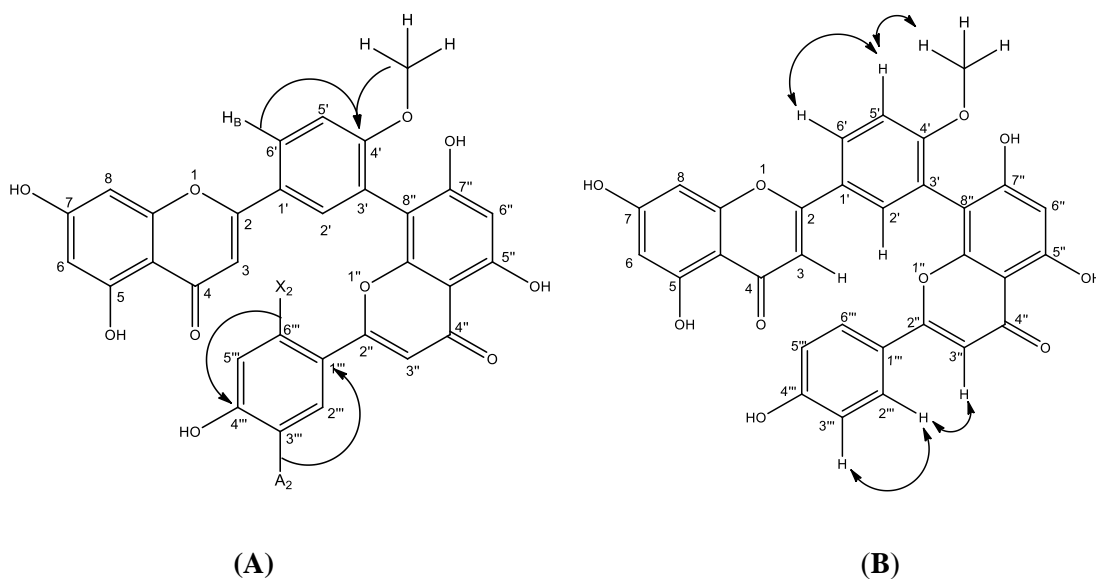


Fig. 12. Correlaciones significativas en los espectros HMBC (A) y NOESY (B) de bilobetina (3).



El compuesto se detectó en un t_r de 3.16 min con un pseudo ión molecular de $[M+H]^+$ m/z 553 en el análisis por el método de UPLC/MS (**Fig. 13**); en el espectro de masas también se observa el fragmento m/z 521 al igual que en el compuesto **2**, en este caso indica la pérdida de una molécula de metanol y se evidencian los fragmentos provenientes del rompimiento tipo retro Diels- Alder m/z 153 y m/z 417 (**Fig. 14**).

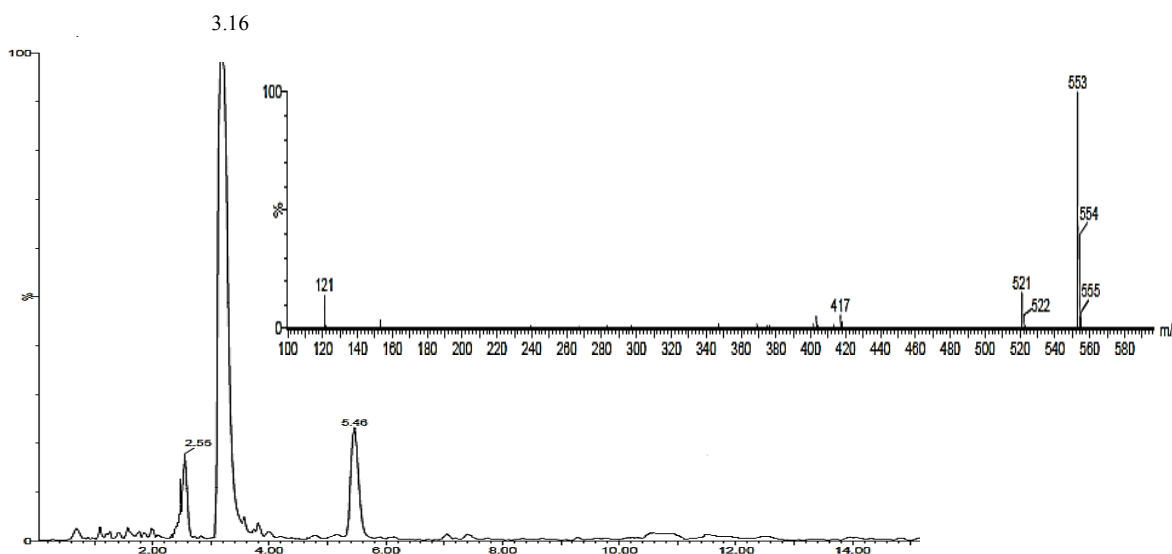


Fig. 13. Análisis por el método de UPLC/MS de bilobetina (**3**).

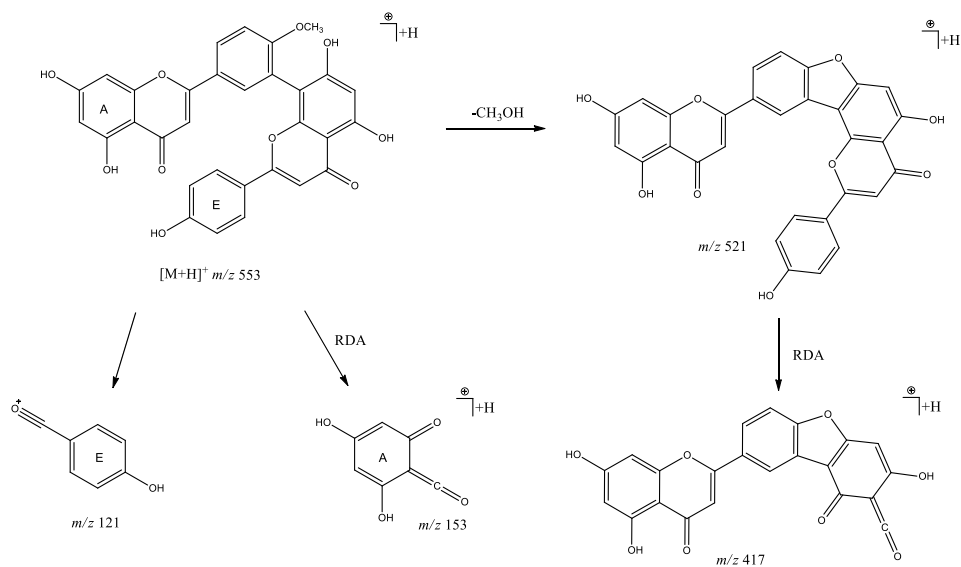


Fig. 14. Patrón de fragmentación para bilobetina (**3**) por la técnica ESI⁺.



5.3.3 Elucidación estructural de robustaflavona (4)

La estructura de esta molécula se determinó, por el análisis comparativo de las propiedades físicas y espectroscópicas reportadas por Markham *et al.*, 1987 y Zang *et al.*, 2011.

Se obtuvo como un sólido amarillo soluble en acetona e insoluble en metanol. Al igual que amentoflavona (**2**) y bilobetina (**3**) muestra en su espectro de RMN-¹H las señales características de un sistema ABX del anillo B, con desplazamientos en δ_H 7.02 (d, $J=8.0$ Hz, H-5'), δ_H 7.90 (d, $J=8$ Hz, H-6'), δ_H 7.81 (s, H-2') y del sistema A₂X₂ pertenecientes al anillo E con desplazamientos en δ_H 7.96 (d, $J=8.5$ Hz, H-2''' y H-6'''), δ_H 6.95 (d, $J=8.5$ Hz, H-3''' y H-5'''). La señal de H-2' (7.81 ppm) se encuentra desplazada a un campo mayor en comparación al H-2' (8.10 ppm) de la amentoflavona (**2**). En este compuesto también se observó la presencia de tres singuletes en δ_H 6.77, δ_H 6.81 y δ_H 6.61 ppm asignables a H-3, H-3'' y H-8'' .

El espectro de RMN-¹³C indicó la presencia de 30 átomos de carbono en esta molécula y la localización de sus correspondientes hidrógenos mediante el espectro HSQC (**Anexo 24**). La posición de unión de las dos unidades de flavona se determinó por los desplazamientos de C-3' (121.2 ppm) y C-6'' (109.1 ppm), ya que el desplazamiento de este último es distintivo para esta unión como lo reportó Markham y colaboradores (1987). En la Tabla 8 se presenta la estructura y las características espectroscópicas de la robustaflavona (**4**).



Tabla 8. Estructura y datos espectroscópicos de la robustaflavona (4).

Robustaflavona (4) C₃₀H₁₈O₁₀																																																																																															
<p style="text-align: center;">(4)</p>																																																																																															
<p>IR (ATR) 3197, 3095, 2921, 1651, 1604, 1567, 1507, 1487, 1428, 1357, 1297, 1237, 1162, 115°, 1112, 1030, 829 cm⁻¹ (Anexo 20).</p>																																																																																															
<p>RMN-¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) (Anexo 21)</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Asignación</th> <th>δ (ppm)</th> <th>J (Hz)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>H-3</td><td>6.77</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-6</td><td>6.19</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-8</td><td>6.48</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-2'</td><td>7.81</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-5'</td><td>7.02</td><td>d, J = 8.0 Hz</td></tr> <tr><td>H-6'</td><td>7.90</td><td>d, J = 8.0 Hz</td></tr> <tr><td>H-3''</td><td>6.81</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-8''</td><td>6.61</td><td>s</td></tr> <tr><td>H-2'''/H-6'''</td><td>7.96</td><td>d, J = 8.5 Hz</td></tr> <tr><td>H-3'''/H-5'''</td><td>6.95</td><td>d, J = 8.5 Hz</td></tr> <tr><td>OH-5</td><td>13.00</td><td>s</td></tr> <tr><td>OH-5''</td><td>13.27</td><td>s</td></tr> </tbody> </table>								Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	H-3	6.77	s	H-6	6.19	s	H-8	6.48	s	H-2'	7.81	s	H-5'	7.02	d, J = 8.0 Hz	H-6'	7.90	d, J = 8.0 Hz	H-3''	6.81	s	H-8''	6.61	s	H-2'''/H-6'''	7.96	d, J = 8.5 Hz	H-3'''/H-5'''	6.95	d, J = 8.5 Hz	OH-5	13.00	s	OH-5''	13.27	s																																																	
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)																																																																																													
H-3	6.77	s																																																																																													
H-6	6.19	s																																																																																													
H-8	6.48	s																																																																																													
H-2'	7.81	s																																																																																													
H-5'	7.02	d, J = 8.0 Hz																																																																																													
H-6'	7.90	d, J = 8.0 Hz																																																																																													
H-3''	6.81	s																																																																																													
H-8''	6.61	s																																																																																													
H-2'''/H-6'''	7.96	d, J = 8.5 Hz																																																																																													
H-3'''/H-5'''	6.95	d, J = 8.5 Hz																																																																																													
OH-5	13.00	s																																																																																													
OH-5''	13.27	s																																																																																													
<p>RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) (Anexo 22)</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th># C</th> <th>δ (ppm)</th> <th># C</th> <th>δ (ppm)</th> <th># C</th> <th>δ (ppm)</th> <th># C</th> <th>δ (ppm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td>1'</td><td>120.6</td><td></td><td></td><td>1'''</td><td>121.3</td></tr> <tr><td>2</td><td>164.1</td><td>2'</td><td>130.8</td><td>2''</td><td>164.1</td><td>2'''</td><td>128.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>102.8</td><td>3'</td><td>121.2</td><td>3''</td><td>102.8</td><td>3'''</td><td>116.0</td></tr> <tr><td>4</td><td>181.7</td><td>4'</td><td>159.0</td><td>4''</td><td>181.7</td><td>4'''</td><td>161.5</td></tr> <tr><td>5</td><td>161.2</td><td>5'</td><td>116.4</td><td>5''</td><td>160.1</td><td>5'''</td><td>116.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>98.7</td><td>6'</td><td>127.5</td><td>6''</td><td>109.1</td><td>6'''</td><td>128.5</td></tr> <tr><td>7</td><td>164.0</td><td></td><td></td><td>7''</td><td>163.6</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td>94.1</td><td></td><td></td><td>8''</td><td>93.7</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td>157.4</td><td></td><td></td><td>9''</td><td>156.4</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td>103.7</td><td></td><td></td><td>10''</td><td>103.3</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>								# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)			1'	120.6			1'''	121.3	2	164.1	2'	130.8	2''	164.1	2'''	128.5	3	102.8	3'	121.2	3''	102.8	3'''	116.0	4	181.7	4'	159.0	4''	181.7	4'''	161.5	5	161.2	5'	116.4	5''	160.1	5'''	116.0	6	98.7	6'	127.5	6''	109.1	6'''	128.5	7	164.0			7''	163.6			8	94.1			8''	93.7			9	157.4			9''	156.4			10	103.7			10''	103.3		
# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)																																																																																								
		1'	120.6			1'''	121.3																																																																																								
2	164.1	2'	130.8	2''	164.1	2'''	128.5																																																																																								
3	102.8	3'	121.2	3''	102.8	3'''	116.0																																																																																								
4	181.7	4'	159.0	4''	181.7	4'''	161.5																																																																																								
5	161.2	5'	116.4	5''	160.1	5'''	116.0																																																																																								
6	98.7	6'	127.5	6''	109.1	6'''	128.5																																																																																								
7	164.0			7''	163.6																																																																																										
8	94.1			8''	93.7																																																																																										
9	157.4			9''	156.4																																																																																										
10	103.7			10''	103.3																																																																																										

El análisis UPLC/MS (**Fig.15**), mostró el pseudo ión molecular [M+H]⁺ *m/z* 539 obtenido en el espectro de masas donde además se observan el fragmento *m/z* 521 que indica la pérdida de una molécula de H₂O, lo cual no es evidente en el espectro de masas de



amentoflavona (**2**), esto se puede justificar debido a que los hidroxilos 4' y 7' en la distribución espacial de esta molécula se encuentran cercanos y al perder agua se forma el anillo de 5 miembros tipo furano, al igual que en el compuesto **3**; también se observan los fragmentos obtenidos del rompimiento tipo retro Diels- Alder con m/z 153, m/z 387 y m/z 269 y un fragmento más con m/z 413 (**Fig.16**). El t_r registrado en el cromatograma de líquidos es de 2.38 min.

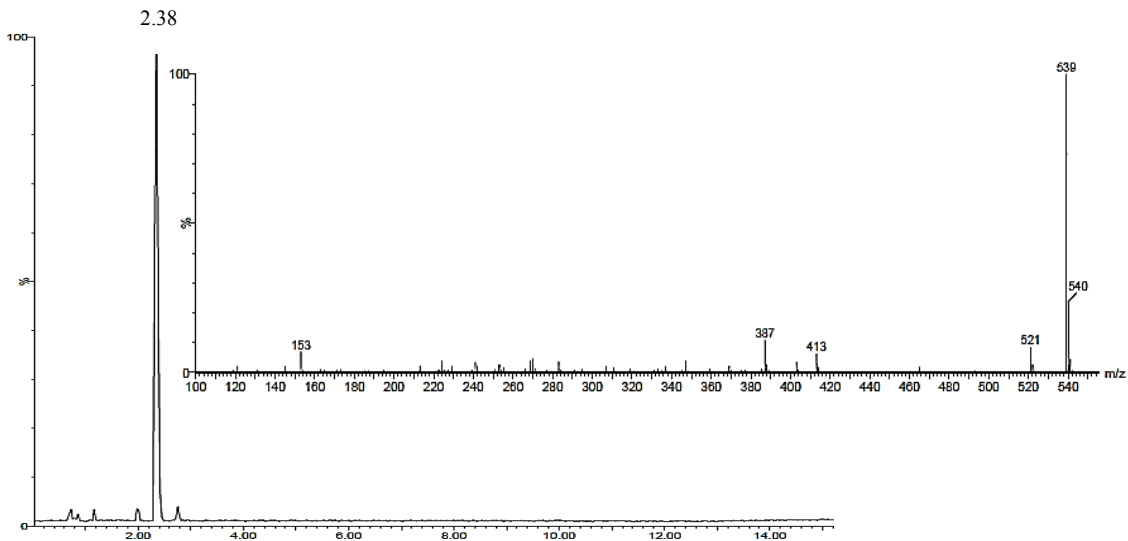


Fig. 15 Análisis por el método de UPLC/MS de robustaflavona (**4**).

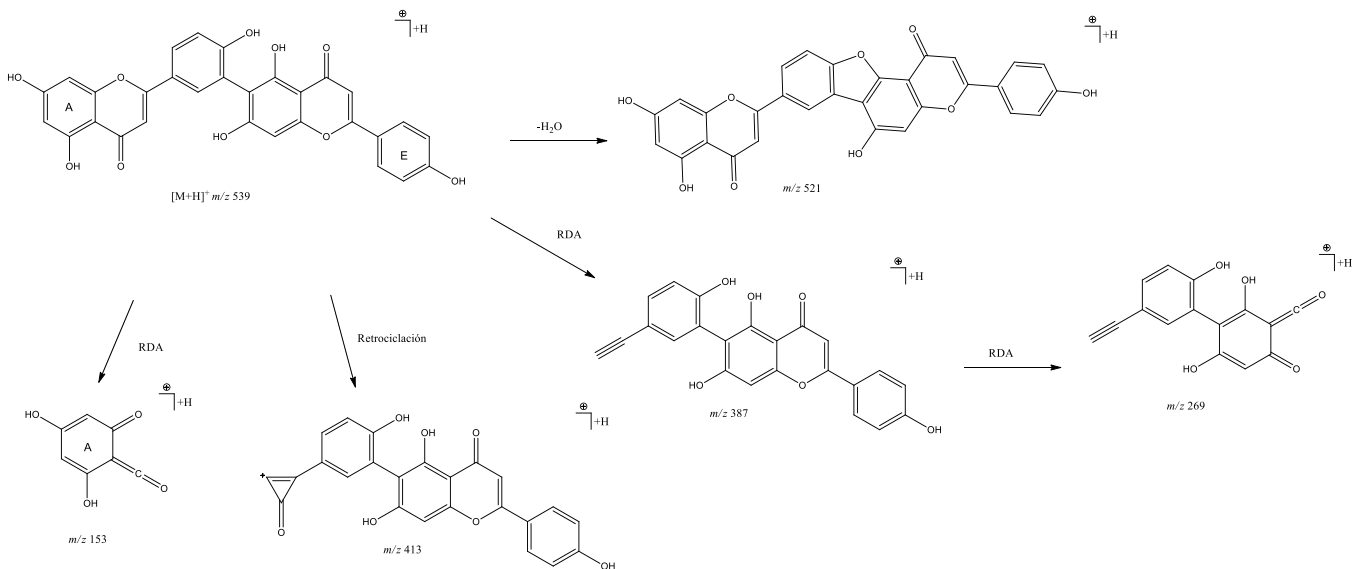


Fig. 16 Patrón de fragmentación para robustaflavona (**4**) por la técnica ESI⁺.



Como se mencionó en párrafos anteriores, en el espectro de masas de la robustaflavona (**2**) se obtiene un fragmento correspondiente a la pérdida de agua que se evidencia como un fragmento estable, al contrario de la amentoflavona (**2**), en la que la pérdida de agua no se registra directamente como un fragmento, sino en los fragmentos posteriores a esta deshidratación. Esto puede ser debido a que en la estructura de mínima energía, de la robustaflavona (**4**) adopta una conformación espacial en la que dos grupos hidroxilo de los anillos contiguos permanecen muy cercanos, derivando en la formación del anillo de furano por deshidratación. La Figura 17 muestra las estructuras de mínima energía calculadas mediante el programa Chem Draw 3D de los biflavonoides.

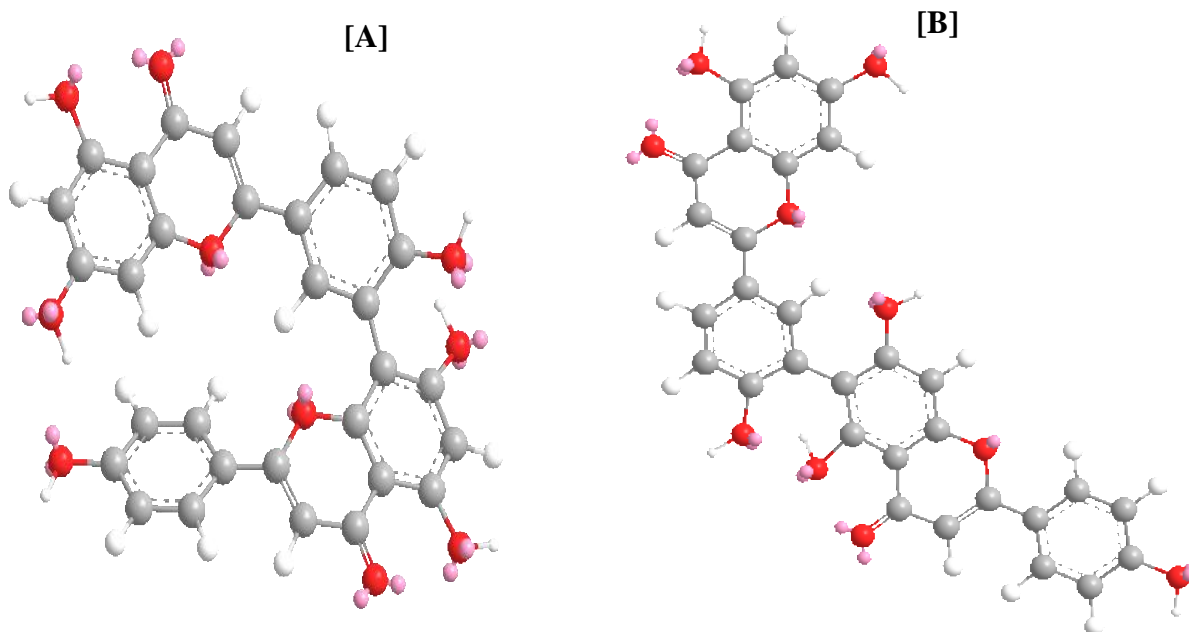


Fig. 17. Estructura tridimensional de amentoflavona (**2**) [A] y robustaflavona (**4**) [B] en su estado de mínima energía.



5.3.4 Elucidación estructural de isocriptomerina (5)

La determinación estructural de este compuesto se logró por el análisis espectroscópico de RMN-¹H y el análisis de masas, comparados con los reportados en literatura.

La naturaleza de este compuesto con respecto a los biflavonoides del tipo amentoflavona (**2**, **3**) y robustaflavona (**4**), se manifestó en el espectro de RMN-¹H (DMSO-*d*₆ a 400 MHz), característico para el grupo de compuestos con arreglo tipo hinoquiflavona, debido a que poseen una unión interflavonoide C-O-C que genera cuatro señales doblete en la región aromática (**Fig. 18**), correspondientes a 2 hidrógenos equivalentes para cada una, pertenecientes a sistemas A₂X₂ y A'₂X'₂ con desplazamientos en 7.89 (d, *J*= 8.6 Hz, H-2' y H-6'), δ_H 7.02 (d, *J*= 8.6 Hz, H-3' y H-5'), δ_H 7.81 (d, *J*= 8.7 Hz, H-2''' y H-6'''), δ_H 6.90 (d, *J*= 8.7 Hz, X'₂=H-3''' y H-5'''), se observan también las señales correspondientes a los hidrógenos H-6 (δ_H 6.11, d, *J*= 2.1 Hz), H-8 (δ_H 6.38, d, *J*= 2.1 Hz), H-8'' (δ_H 6.26, d, *J*= 1.8 Hz) y una señal en δ_H 3.57 (s, 3H) perteneciente a un grupo metoxilo; estas señales coinciden con las reportadas para la isocriptomerina por Silva y colaboradores (1994).

El espectro de ¹³C no se obtuvo con la suficiente resolución para asignar las señales de carbonos, debido a la complejidad de la muestra; sin embargo se pueden apreciar las señales representativas de la molécula: en 116.8 y 128.5 ppm las correspondientes a los sistemas A₂X₂ y en 118.8 y 129.1 para A'₂X'₂, los carbonos singulete aromáticos correspondientes a los anillos A y C se observan entre 100 a 105 ppm, los carbonos base de oxígeno entre 153 y 165.9 ppm y los carbonos correspondientes a los carbonilos alrededor de 182 ppm. En la Tabla 9, se describen los datos espectroscópicos obtenidos para este compuesto.



Tabla 9. Estructura y datos espectroscópicos más sobresalientes de la isocriptomerina (5).

Isocriptomerina (5) C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀																																										
(5)																																										
IR (ATR) 3355, 2918, 2850, 1649, 1563, 1500, 1415, 1379, 1237, 1167, 1109, 833 cm ⁻¹ (Anexo 27).																																										
RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) (Anexo 28).																																										
<table border="1"><thead><tr><th>Asignación</th><th>δ (ppm)</th><th>J (Hz)</th></tr></thead><tbody><tr><td>H-3 ó H-3''</td><td>6.46</td><td>s</td></tr><tr><td>H-3 ó H-3''</td><td>6.61</td><td>s</td></tr><tr><td>H-6</td><td>6.11</td><td>d, J = 2.1 Hz</td></tr><tr><td>H-8</td><td>6.38</td><td>d, J = 2.1 Hz</td></tr><tr><td>H-8''</td><td>6.26</td><td>s</td></tr><tr><td>H-2'/H-6'</td><td>7.89</td><td>d, J = 8.9 Hz</td></tr><tr><td>H-3'/H-5'</td><td>7.02</td><td>d, J = 8.9 Hz</td></tr><tr><td>H-2'''/H-6'''</td><td>7.81</td><td>d, J = 8.8 Hz</td></tr><tr><td>H-3'''/H-5'''</td><td>6.90</td><td>d, J = 8.8 Hz</td></tr><tr><td>O-CH₃</td><td>3.57</td><td>s</td></tr><tr><td>OH-5</td><td>12.79</td><td>s</td></tr><tr><td>OH-5''</td><td>13.07</td><td>s</td></tr></tbody></table>				Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	H-3 ó H-3''	6.46	s	H-3 ó H-3''	6.61	s	H-6	6.11	d, J = 2.1 Hz	H-8	6.38	d, J = 2.1 Hz	H-8''	6.26	s	H-2'/H-6'	7.89	d, J = 8.9 Hz	H-3'/H-5'	7.02	d, J = 8.9 Hz	H-2'''/H-6'''	7.81	d, J = 8.8 Hz	H-3'''/H-5'''	6.90	d, J = 8.8 Hz	O-CH ₃	3.57	s	OH-5	12.79	s	OH-5''	13.07	s
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)																																								
H-3 ó H-3''	6.46	s																																								
H-3 ó H-3''	6.61	s																																								
H-6	6.11	d, J = 2.1 Hz																																								
H-8	6.38	d, J = 2.1 Hz																																								
H-8''	6.26	s																																								
H-2'/H-6'	7.89	d, J = 8.9 Hz																																								
H-3'/H-5'	7.02	d, J = 8.9 Hz																																								
H-2'''/H-6'''	7.81	d, J = 8.8 Hz																																								
H-3'''/H-5'''	6.90	d, J = 8.8 Hz																																								
O-CH ₃	3.57	s																																								
OH-5	12.79	s																																								
OH-5''	13.07	s																																								
RMN- ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) (Anexo 30).																																										
<table border="1"><thead><tr><th># C</th><th>δ (ppm)</th><th># C</th><th>δ (ppm)</th></tr></thead><tbody><tr><td>2'/6'</td><td>128.5</td><td>2'''/6'''</td><td>129.1</td></tr><tr><td>3'/5'</td><td>116.8</td><td>3'''/5'''</td><td>118.8</td></tr><tr><td>4</td><td>182.6</td><td>4''</td><td>182.8</td></tr></tbody></table>				# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)	2'/6'	128.5	2'''/6'''	129.1	3'/5'	116.8	3'''/5'''	118.8	4	182.6	4''	182.8																							
# C	δ (ppm)	# C	δ (ppm)																																							
2'/6'	128.5	2'''/6'''	129.1																																							
3'/5'	116.8	3'''/5'''	118.8																																							
4	182.6	4''	182.8																																							

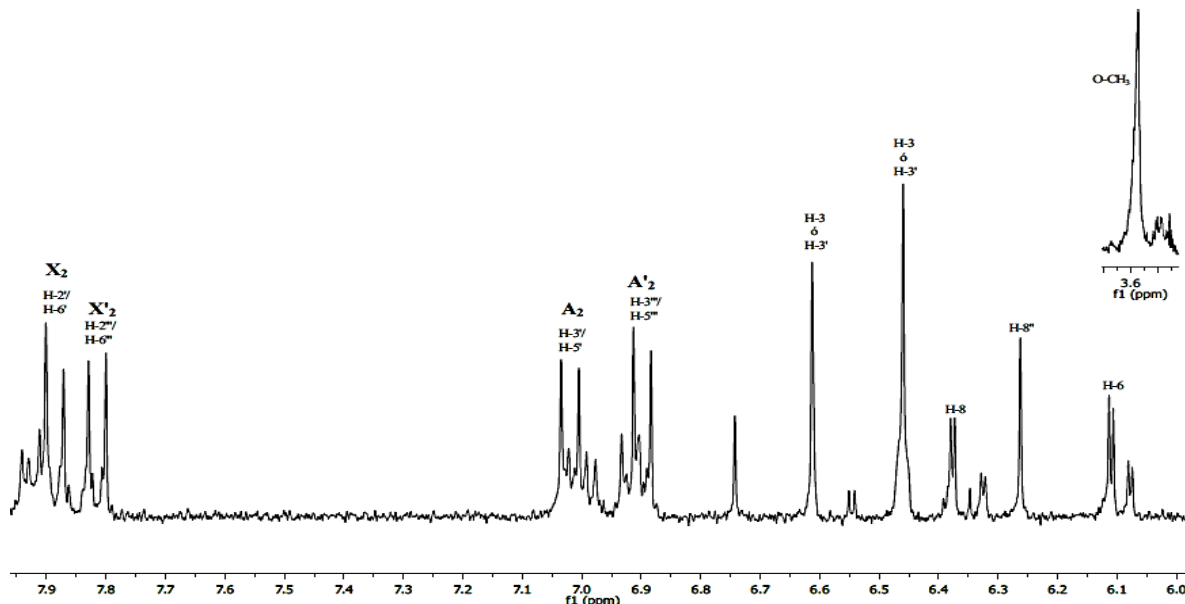


Fig. 18. Espectro de RMN-¹H de la isocriptomerina (**5**) (400 MHz, DMSO-*d*₆).

La confirmación de que se trataba del compuesto isocriptomerina (**5**) se logró con el análisis de UPLC/MS (**Fig. 19**) en el que se registró un cromatograma para dicho compuesto con tr de 10.53 min y un pseudo ión molecular con m/z 553. La diferencia en el patrón de fragmentación (**Fig. 20**) de **5** con el resto de biflavonoides aislados dió evidencia de que el biflavonoide corresponde al tipo hinoquiflavona como lo reporta Zhang y colaboradores (2011). La pérdida del grupo metilo genera el fragmento $[M+H-CH_3]^+$ con m/z 538 y el fragmento $[M+H-HOCH_3]^+$ con m/z 521 por la pérdida de una molécula de metanol, además la molécula sufre una ruptura del enlace interflavonoide C-O-C (lo cual no sucede en los compuestos de tipo amentoflavona y robustaflavona) generando los fragmentos m/z 299 y m/z 254, este último junto con m/z 153 (ruptura RDA) indican que los sustituyentes del anillo A deben ser hidroxilos, así que las posibles posiciones donde puede estar el grupo metoxilo son en 7'' ó 4'''. Sin embargo se ha reportado previamente que la isocriptomerina genera los fragmentos característicos m/z 299 y m/z 271 tal y como aparecen en nuestro análisis, comprobando que el grupo metoxilo está localizado en el anillo D del biflavonoide y particularmente en la posición 7'', por lo que el compuesto (**5**) corresponde a la isocriptomerina (Zhang *et al.*, 2011).

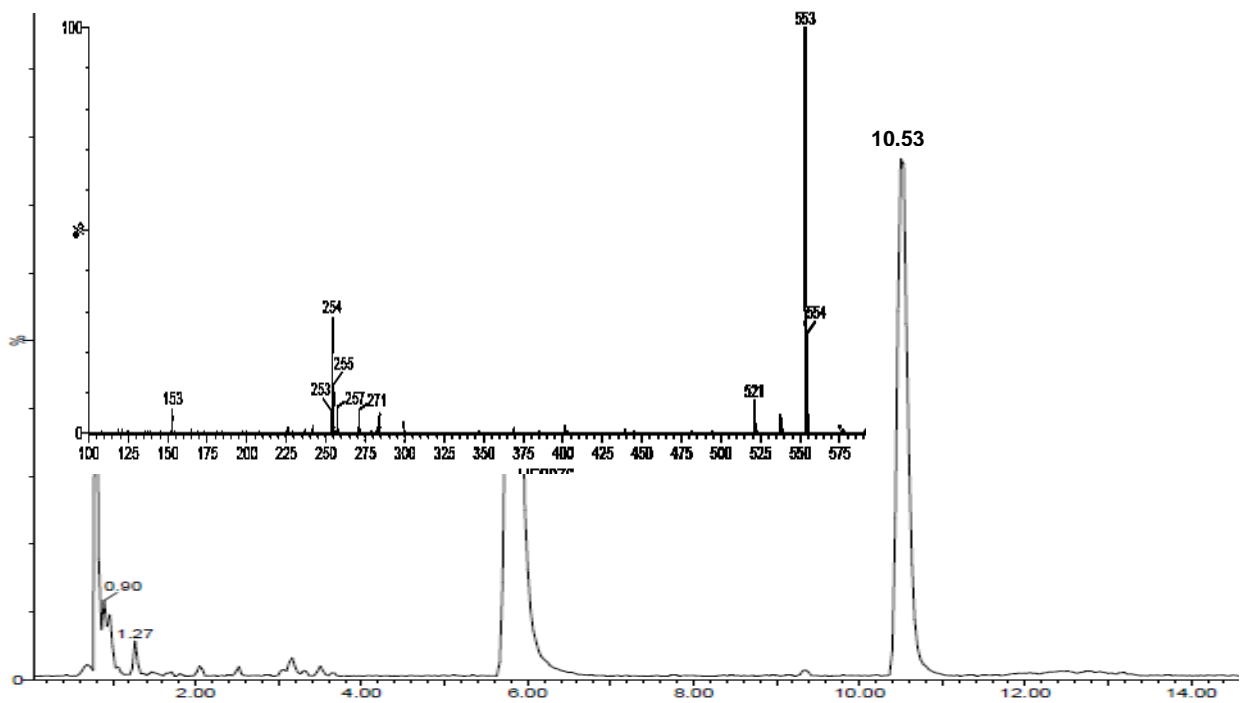


Fig. 19. Análisis por el método de UPLC/MS de la isocriptomerina (5).

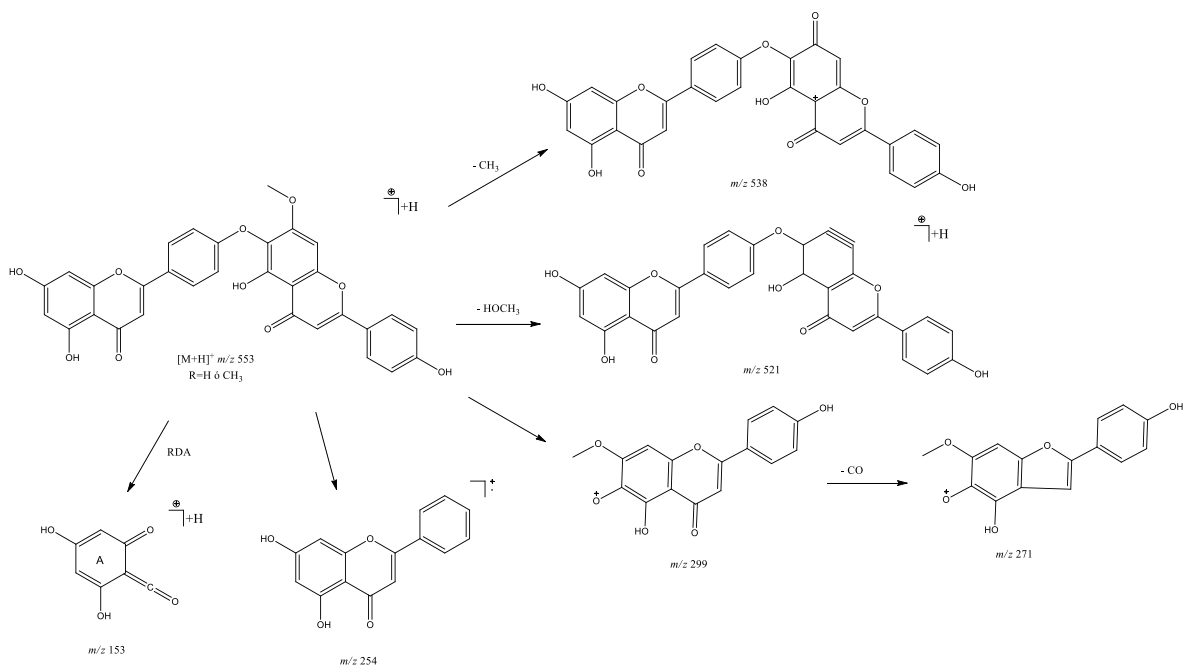


Fig. 20. Patrón de fragmentación de la isocriptomerina (5) por la técnica ESI⁺.



5.4 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos acuosos de cuatro especies de *Selaginella* por CCD, CLAE y UPLC/MS

Establecer el perfil cromatográfico en preparados de plantas medicinales, es de gran importancia para asegurar su calidad y la de sus eventuales preparados. Se evaluó el perfil fitoquímico en extractos acuosos debido a que es la principal forma en la que tradicionalmente se administran por vía oral las “doradillas”. El estudio se enfocó en determinar la presencia de los compuestos **2** y **4**, que son los responsables de la actividad diurética (Colín, 2010) determinada en *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla*. El perfil fitoquímico de los extractos acuosos para las especies *S. wrightii* y *S. pallescens*, *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla* se analizó por los métodos de CCD, CLAE y UPLC/MS.

La CCD, es una técnica reconocida por la OMS y las farmacopeas a nivel mundial (WHO, 1988) para establecer la composición cualitativa de las plantas medicinales, sin embargo los extractos y productos herbolarios pueden llegar a ser muy complejos de manera que el estudio debe enfocarse solo a cierto tipo de compuestos denominados marcadores que pueden tener o no actividad biológica.

El método de CCD mostró de forma cualitativa la presencia de biflavonoides en los extractos acuosos totales de las especies *S. pallescens*, *S. nothohybrida*, *S. wrightii* y *S. lepidophylla* cuando la placa se observó al UV a una λ 365 nm (**Fig. 21**).

A pesar de la gran utilidad de la CCD para obtener perfiles cromatográficos, es una técnica que proporciona información limitada sobre todo cuando sustancias con características fisicoquímicas muy similares se sobreponen, por lo que se puede complementar con otras técnicas como CLAE, que representa una forma más fina y objetiva de determinar la composición química en extractos y preparados fitoterapéuticos ó la técnica UPLC/MS que da información inequívoca del contenido metabólico. La obtención de “huellas digitales” por cromatografía de líquidos de alta eficiencia permite establecer el patrón metabólico presente en la planta (Liang *et al.*, 2009).

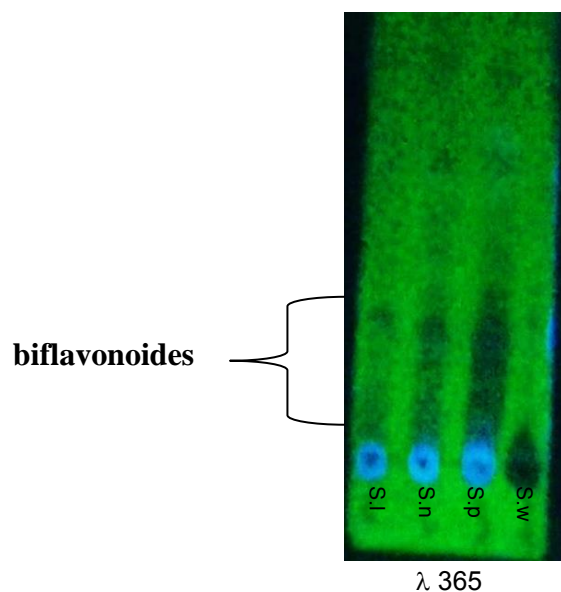


Fig. 21. Perfil fitoquímico de especies de *Selaginella* en CCD para extractos acuosos totales.

Las doradillas estudiadas por nuestro grupo de investigación hasta este momento contienen principalmente a los compuestos **2** y **4**, sin embargo esto puede variar dependiendo de la especie.

Previo a la evaluación del perfil fitoquímico en los extractos acuosos totales de las doradillas, se determinaron las condiciones óptimas para separar e identificar los compuestos **2** y **4** por CLAE. Se inyectaron soluciones stock de cada compuesto puro por separado y posteriormente la mezcla de ambos, para garantizar su separación. Basados en la metodología de Menchaca (2009) con ligeras modificaciones se encontraron como condiciones ideales las reportadas en la tabla 4 de la estrategia experimental.

La inyección de las soluciones stock de los compuestos puros, generó un cromatograma con un pico con t_r de 8.16 min para el compuesto **2** y otro pico con t_r de 8.81 min para el compuesto **4**. En la **Figura 22** se muestran los cromatogramas correspondientes a cada compuesto y su coinyección.

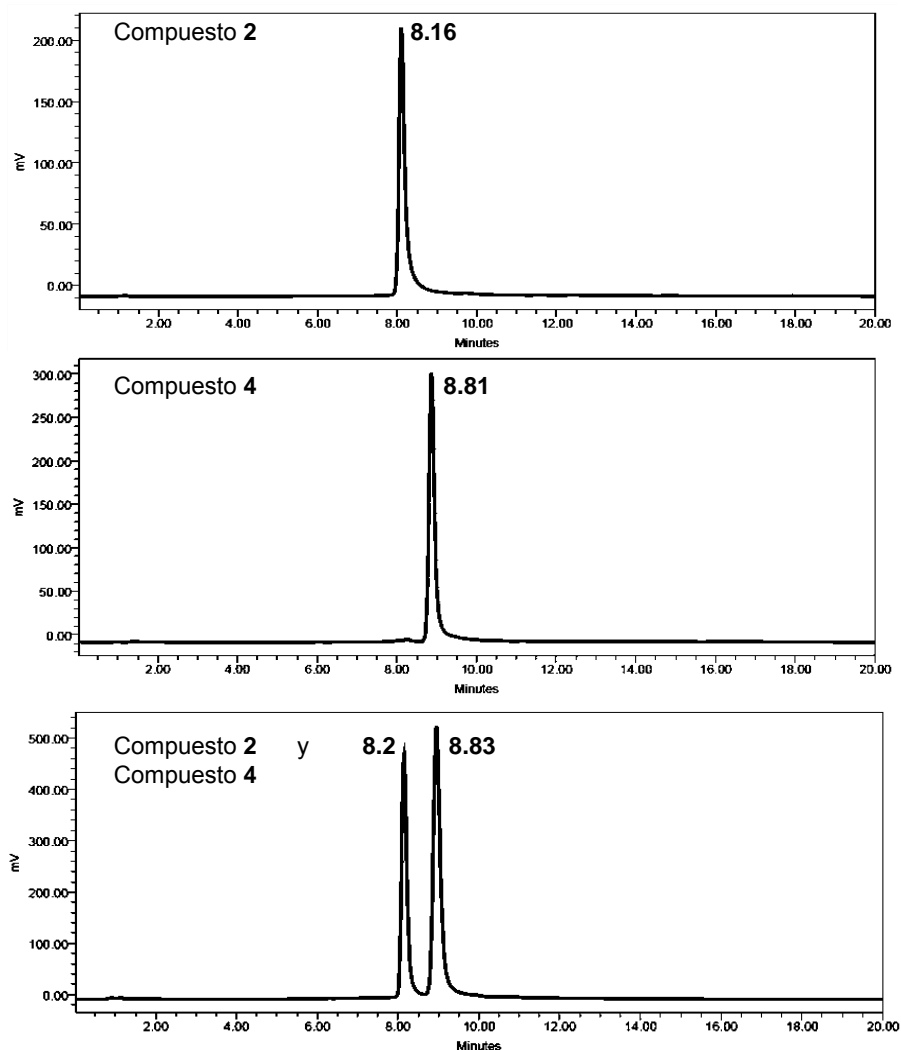


Fig. 22. Cromatogramas de líquidos los compuestos **2** y **4** y de su coelución.

Por otra parte, antes de analizar los extractos acuosos totales de las cuatro especies de *Selaginella* en el equipo de CLAE se les realizó un fraccionamiento por reparto con acetato de etilo y cloroformo (las cuales se juntaron y denominaron extractos acuosos procesados), para obtener muestras más simples y a su vez con los biflavonoides de interés.

En el cromatograma del extracto acuoso procesado de la especie *S. nothohybrida*, se observó la presencia de los compuestos **2** y **4**, comprobándose por coinyección con los de referencia (**Fig. 23**).

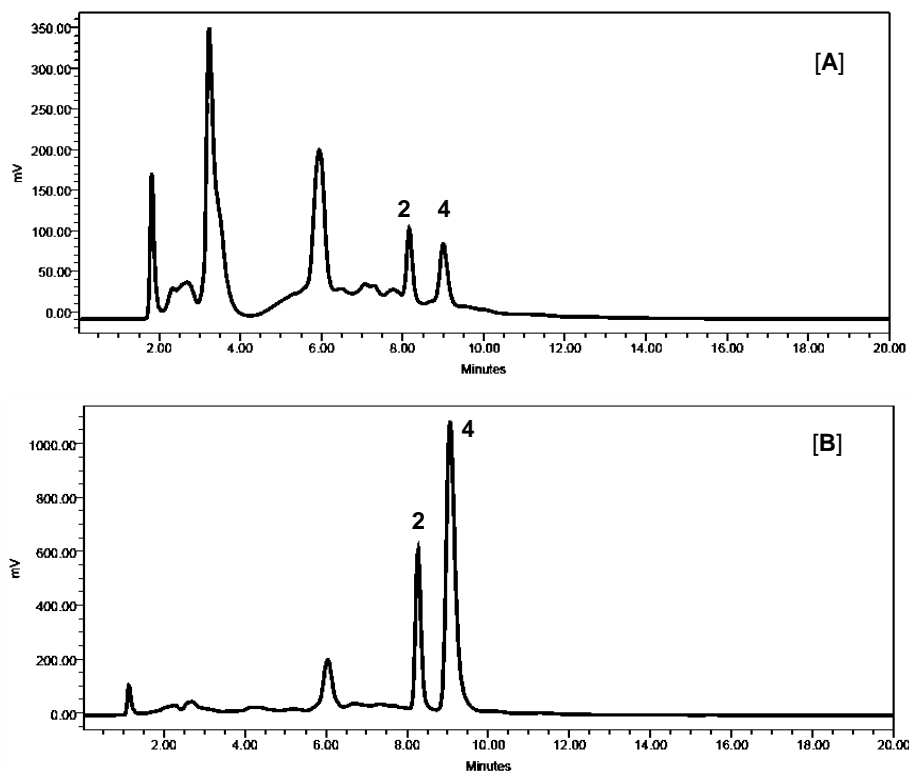


Fig. 23. Cromatogramas: extracto acuoso procesado de *S. nothohybrida* [A] y de extracto acuoso procesado de *S. nothohybrida* adicionados con los compuestos **2** y **4** [B]

En los cromatogramas correspondientes a los extractos acuosos procesados de las especies *S. wrightii*, *S. pallescens* y *S. lepidophylla*, también se observaron dos picos con t_r prácticamente iguales a los obtenidos para los compuestos **2** y **4** (Fig. 24), siendo el de t_r 8.2 min el de mayor intensidad. De tal forma que se pudiera decir con este análisis que los extractos acuosos que se consumen para fines terapéuticos contienen como parte de su composición los mismos biflavonoides que han mostrado tener un efecto biológico significativo.

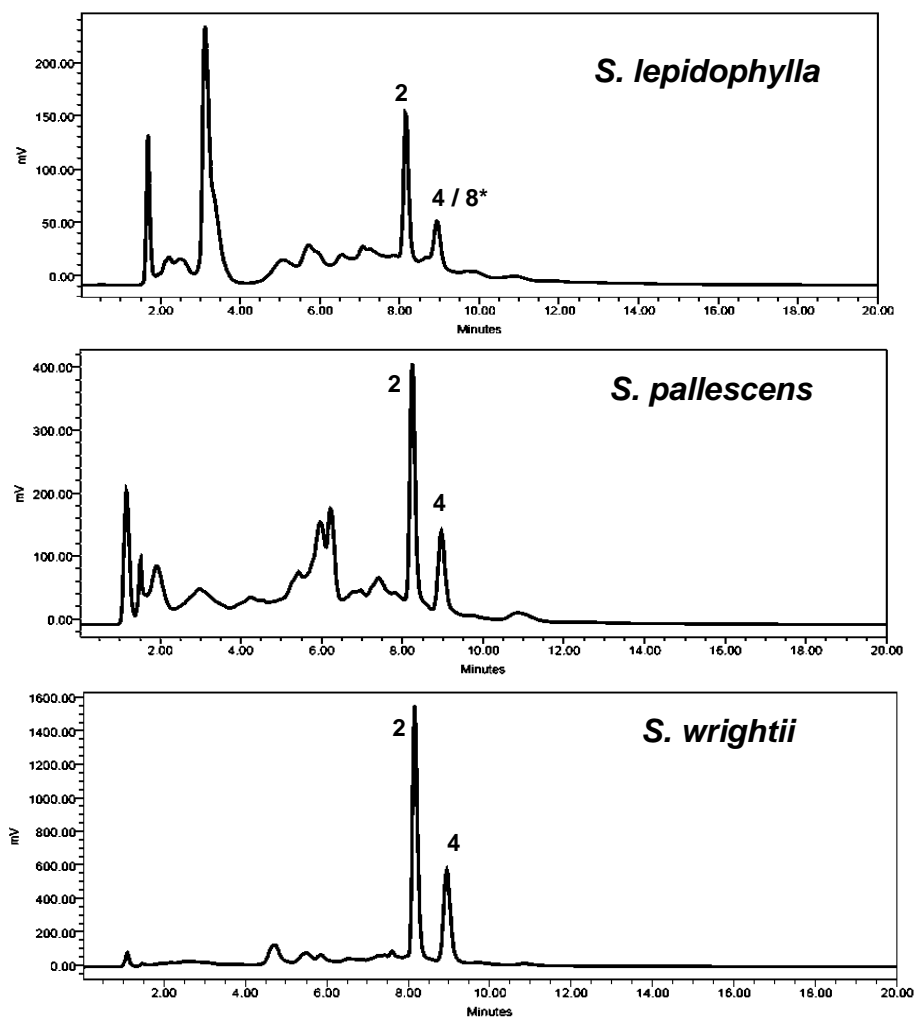


Fig. 24. Cromatogramas de CLAE: extractos acuosos procesados de *S. wrightii*, *S. pallescens* y *S. lepidophylla*. * Asignación correcta.

A fin de corroborar que las señales asignadas en el perfil fitoquímico obtenido por CLAE correspondían a los compuestos **2** y **4**, se realizó un análisis por el método de UPLC/MS, para corroborar el peso molecular de los mismos; los cromatogramas obtenidos se muestran en la **Figura 25**, aquí se puede apreciar que los perfiles fitoquímicos de los extractos acuosos procesados de las especies *S. wrightii* y *S. pallescens*, tienen como parte de su composición a los compuestos **2** y **4**. La asignación de picos se hizo de acuerdo al tiempo de retención, patrón de fragmentación y peso molecular registrados.

En el cromatograma correspondiente a *S. lepidophylla* (**Fig.25**) se apreció a la amentoflavona (**2**) e isocriptomerina (**5**). Investigaciones previas reportan la presencia de



robustaflavona (**4**) en esta especie (Aguilar *et al.*, 2013) sin embargo el análisis por el método de UPLC/MS mostró la ausencia de este compuesto en este extracto y en su lugar se identificó la presencia del compuesto (**8**) con un t_r de 2.42 min y un pseudo ion molecular de $[M+H]^+$ m/z 541 (con dos unidades de masa más que la robustaflavona) lo que indica que se trata de un dihidro derivado de biflavonoide. Por ser **4** y **2** compuestos con tiempo de retención parecidos en el cromatograma de líquidos obtenido en CLAE, no se pudo saber por esta técnica que se trataba de compuestos diferentes. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el método de UPLC/MS resulta ser muy eficiente para la identificación química de compuestos, y en este caso particular tiene gran relevancia, ya que al ser biológicamente activa la robustaflavona (**4**) se puede justificar la falta de actividad biológica en un extracto que no la contiene.

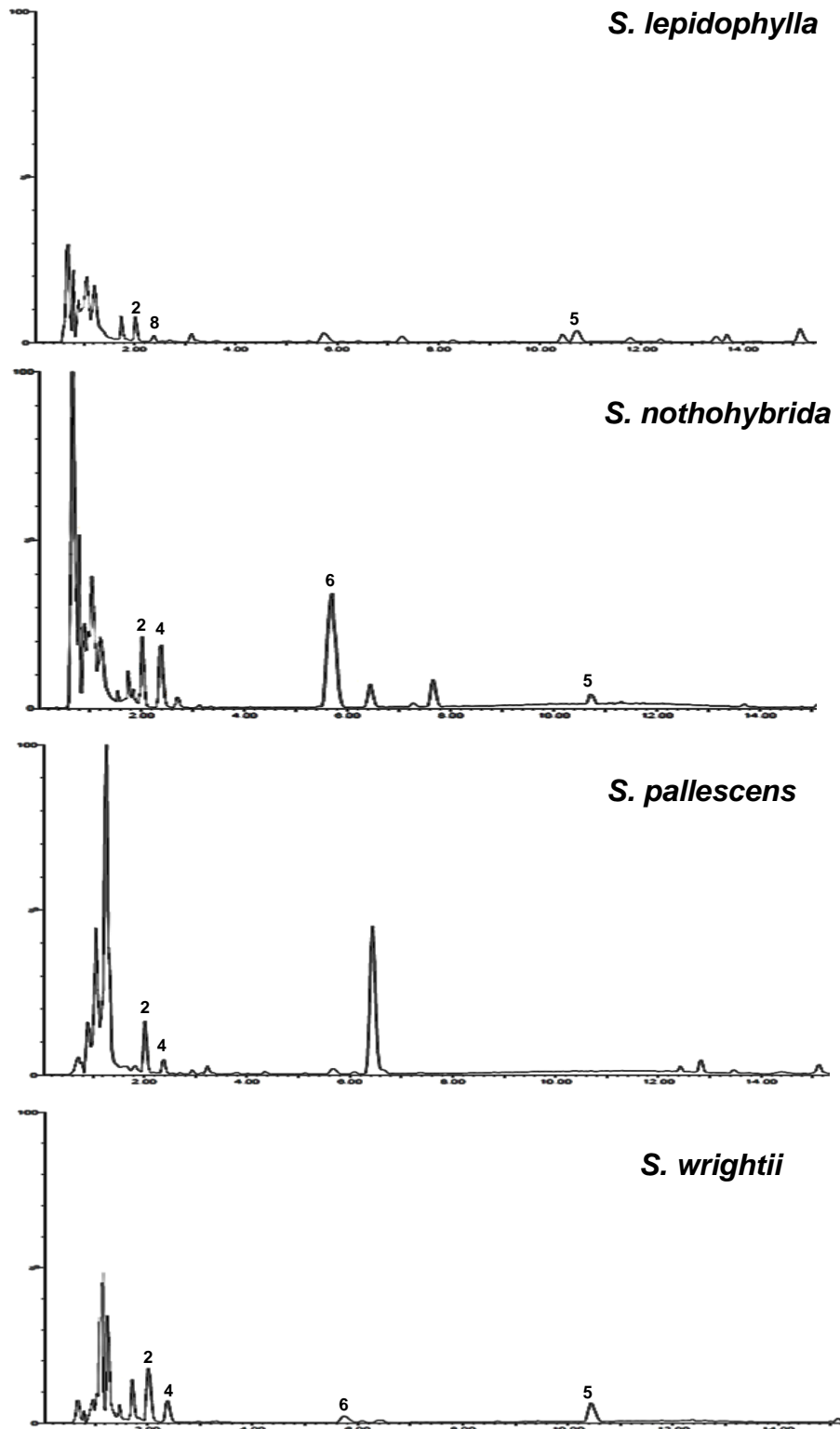


Fig. 25. Cromatogramas por el método de UPLC/MS: perfil fitoquímico de extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii*.



La estabilidad de los compuestos se evaluó por la técnica de CLAE, analizando extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida*, preparados por Menchaca en 2009, empleando las condiciones y el mismo equipo de CLAE que para los estándares. Los cromatogramas de líquidos obtenidos (**Fig. 26**) de ambos extractos muestran los picos correspondientes a los compuestos **2**, **4** y **8**, determinando que los compuestos, así como los extractos, no se degradaron en este periodo, bajo las condiciones descritas en el punto 4.4.

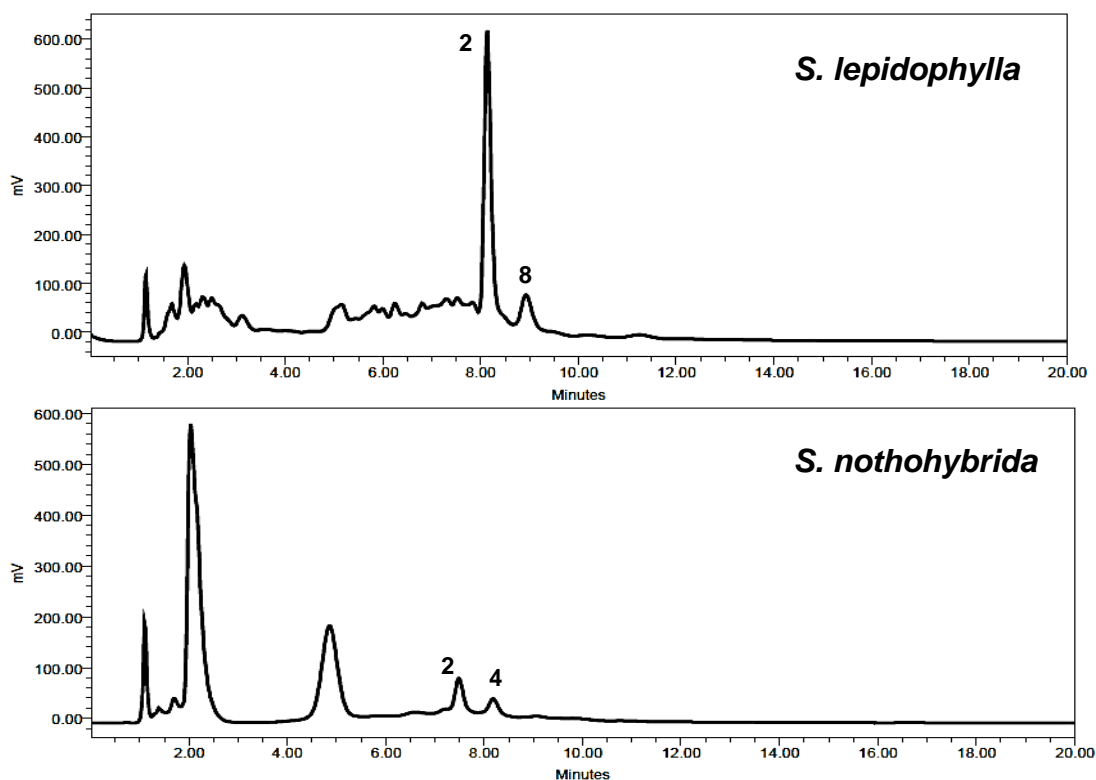


Fig. 26. Cromatogramas de CLAE: extractos acuosos procesados de *S. lepidophylla* y *S. nothohybrida*, preparados en 2009 (prueba de estabilidad).



5.5 Análisis comparativo del perfil fitoquímico en extractos orgánicos de cuatro especies de *Selaginella* por el método de UPLC/MS.

Como ya se mencionó, el contenido químico de las diferentes especies de *Selaginella* de este estudio es muy complejo y los métodos cromatográficos clásicos no han sido eficientes para la separación de algunos de los biflavonoides con estructuras similares.

El método de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución-espectrometría de masas ha mostrado ser muy eficiente para registrar el total de componentes biflavonoides en un extracto orgánico o fracción de una materia prima vegetal y mediante el peso molecular registrado, discernir el estado de oxidación, oxigenación y metilación de cada uno de esos componentes. Lo anterior se aprovechó para el establecimiento de perfiles químicos de biflavonoides activos biológicamente en las diferentes especies de *Selaginella*. A continuación se presenta el análisis de los cromatogramas de líquidos de las fracciones orgánicas de las diferentes especies así como de los espectros de masas de los compuestos detectados. Esto es relevante como ya se mencionó, en cuanto a que los diferentes biflavonoides poseen también diferentes respuestas farmacológicas. Los perfiles cromatográficos de las drogas y extractos reducen el riesgo de confusión asociado al uso de distintas especies con los mismos nombres comunes, sirven como identificadores de plantas del mismo género cuya especie está en duda y ayudan a la detección de sustancias adulterantes y contaminantes (Alaerts *et al.*, 2010)

Se obtuvo por primera vez el perfil fitoquímico de las especies *S.wrightii*, *S. pallescens*, *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla* por el método de UPLC/MS, previamente se habían reportado los perfiles de las tres últimas por el método de CLAE (Aguilar *et al.*, 2013) en donde se identifican en *S. nothohybrida* los compuestos **2**, **4** y **7** y en *S. lepidophylla* y *S. pallescens* los compuestos **2** y **4**. En los resultados obtenidos por el método de UPLC/MS, los perfiles fitoquímicos de *S.wrightii* y *S. pallescens* mostraron tener algunas diferencias: el perfil de *S. pallescens* implica una cantidad menor de componentes con respecto a *S. wrightii* coincidiendo entre sí, solo con tres compuestos **2**, **4** y **8**, estos se encuentran en diferente proporción en las dos especies (**Fig. 27**). El perfil de la especie *S.*



nothohybrida analizada por este método corroboró la presencia de los compuestos que habían sido previamente identificados por CLAE, no así en *S. lepidophylla* en cuyo perfil en nuestro caso se detecta la ausencia de robustaflavona (**4**), que había sido previamente identificado por CLAE. En los resultados obtenidos por UPLC/MS, por ser un método más sensible se logró la identificación de un compuesto más para *S. nothohybrida* (compuesto **7**) y de cinco compuestos más para *S. lepidophylla* (compuestos **3**, **5**, **6**, **7** y **8**) completando así su perfil fitoquímico.

En general los perfiles de las cuatro especies de *Selaginella* muestran como compuesto en común y componente principal a la amentoflavona (**2**), pero no presentan el mismo contenido biflavonoide para los compuestos minoritarios, por ejemplo: la bilobetina (**3**) no se encuentra en *S. nothohybrida*, en el caso de isocriptomerina (**5**), ésta sólo se encuentra en *S. lepidophylla* y *S. wrightii*. La especie con un contenido metabólico más amplio es *S. lepidophylla* al detectar al menos seis biflavonoides dentro de su composición.

Los perfiles por el método de UPLC/MS de *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. lepidophylla*, mostraron en un t_r de 2.79 min al compuesto **7**. Este se identificó como (2*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona (**Fig. 28**) por comparación de su t_r (2.79 min), pseudo ión molecular ($[M+H]^+$ m/z 541) y fragmentación mostrada en el espectro de masas (m/z 415, 397, 389, 371, 279, 270 y 153) con una muestra de este compuesto (**Fig. 29**) aislado de *S. lepidophylla* por Guevara (**2008**). Con base en estos resultados se puede decir *a priori*, que el uso para fines medicinales de una especie por otra, no se puede hacer indistintamente puesto que las cuatro analizadas solo tienen en común al compuesto **2**.

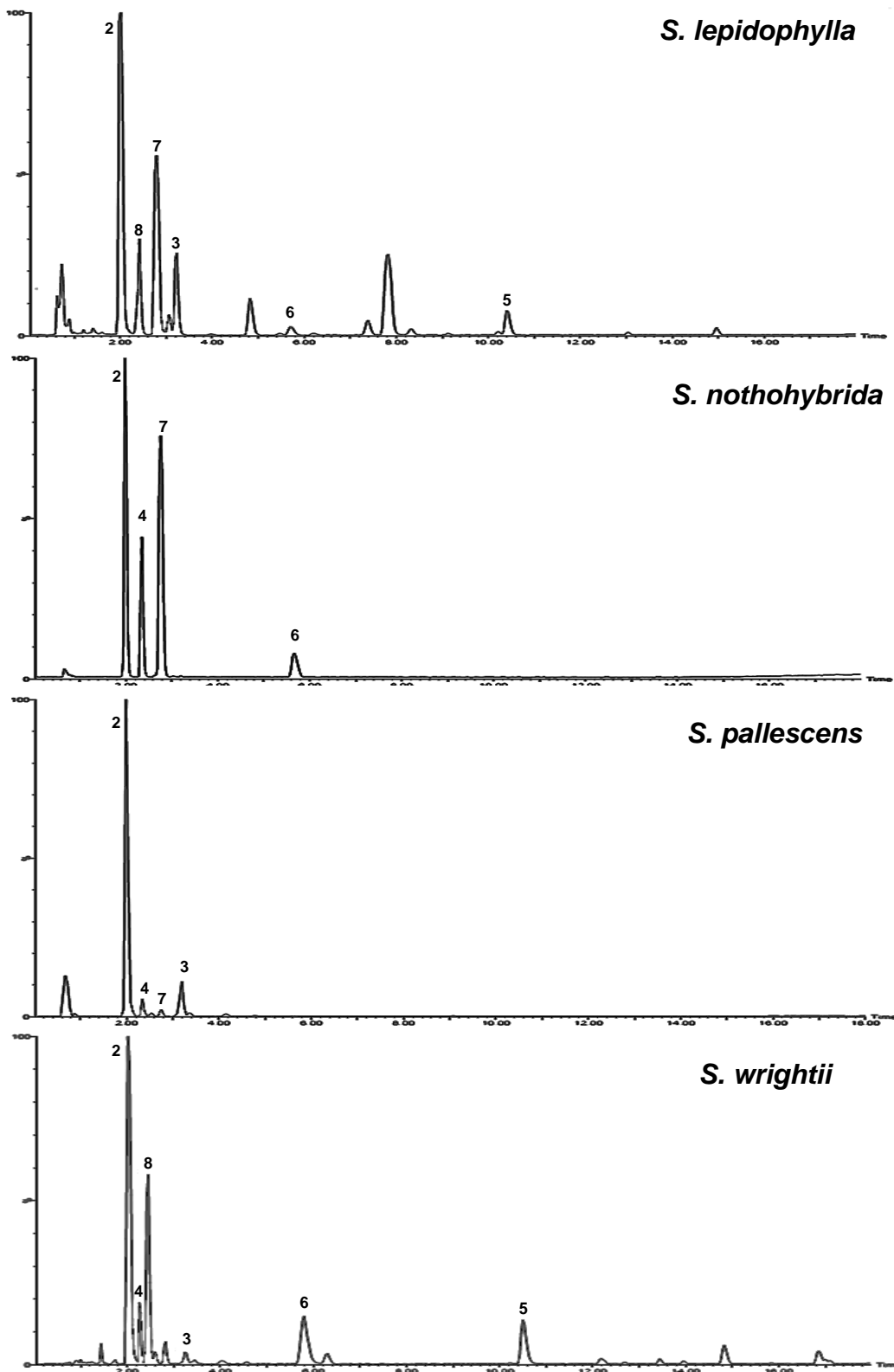


Fig.27. Cromatogramas por el método de UPLC/MS: perfil fitoquímico de extractos orgánicos de *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii* (preparados de acuerdo al Esquema 6).

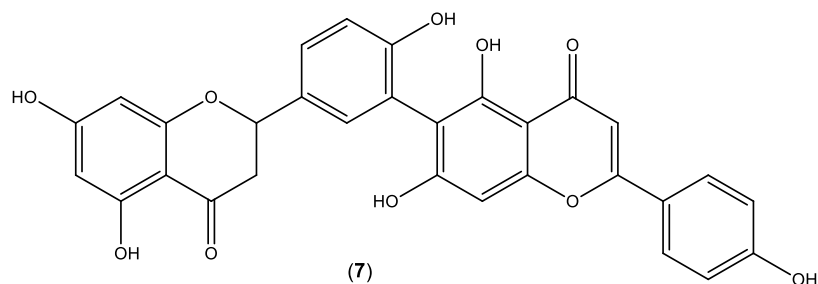


Fig. 28. Estructura del compuesto (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona (7).

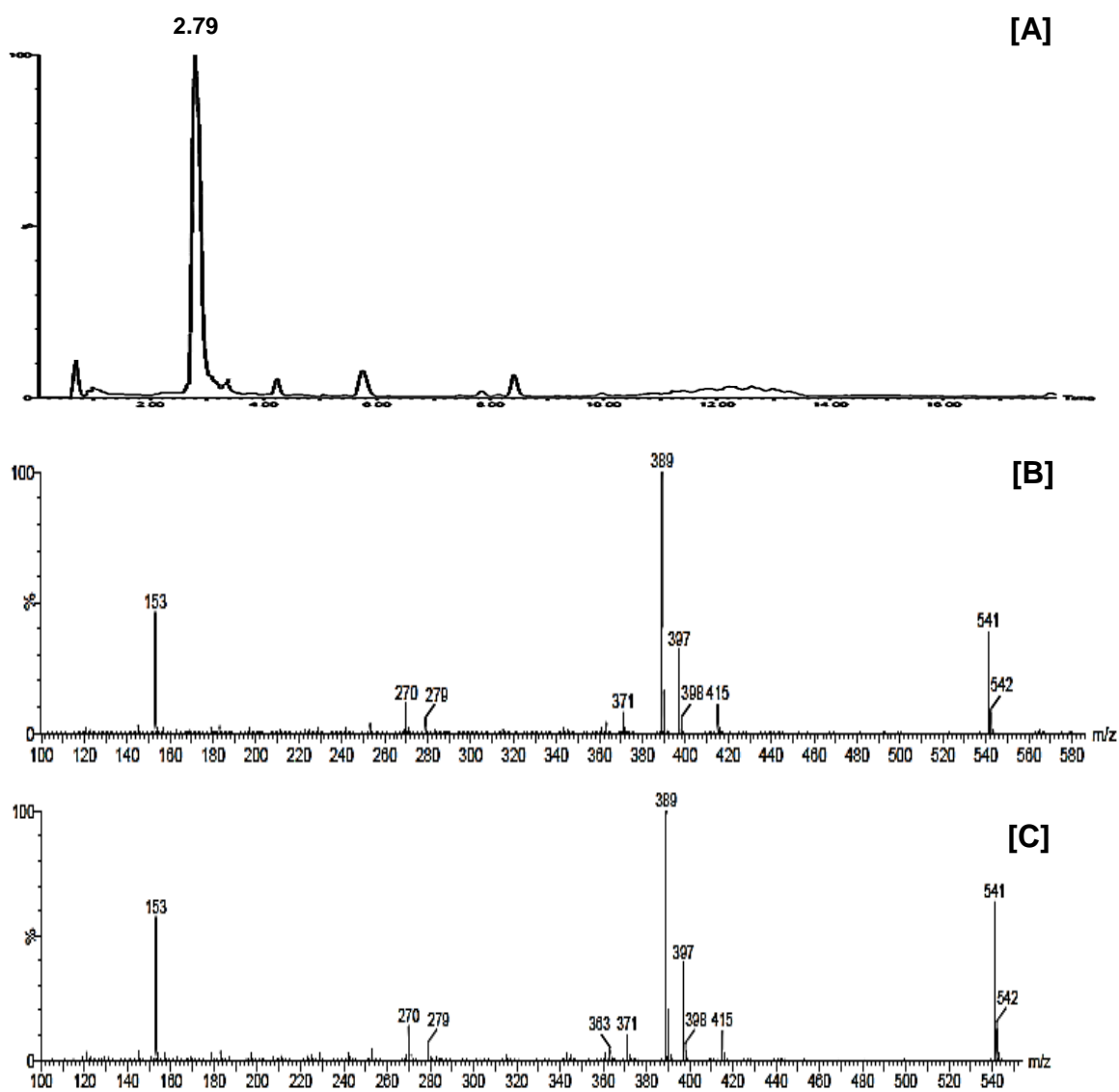


Fig. 29. Cromatograma por el método de UPLC de la (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona [A], espectro de masas de (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona [B], espectro de masas del compuesto (7) [C].



Por otro lado, el compuesto **8** ($[M+H]^+$ m/z 541) presente tanto en el extracto acuoso como en el orgánico de *S. lepidophylla* y en el orgánico de *S. wrightii*, no se pudo caracterizar estructuralmente y sin embargo su peso molecular corresponde a un biflavonoide dihidrogenado.

La Tabla 10 resume las características espectrométricas de los biflavonoides del tipo amentoflavona, robustaflavona e hinoquiflavona, identificados en las cuatro especies de *Selaginella* en estudio.

Tabla 10. Iones moleculares y fragmentos característicos de biflavonoides por la técnica ESI⁺

Tipo de Biflavonoide	Amentoflavona (2)	Bilobetina (3)	Robustaflavona (4)	Isocriptomerina (5)
Pseudo ion molecular $[M+H]^+$	m/z 539	m/z 553	m/z 539	m/z 553
$[M+H-H_2O]^+$	No se observa	NO	m/z 521	No
$[M+H-CH_3OH]^+$	NO	m/z 521	NO	m/z 521
Ruptura interflavonoide C-O-C	NO	NO	NO	m/z 299, m/z 271 y m/z 254
Ruptura tipo retro Diels-Alder	m/z 153, m/z 403	m/z 153, m/z 417	m/z 153, m/z 387, y m/z 269	m/z 153
Fragmentación de retrociclación	m/z 377	NO	m/z 413	NO
Otros fragmentos característicos	m/z 375, m/z 347, m/z 335, m/z 307	m/z 121	NO	m/z 538

5.6 Pruebas antioxidantes: ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos acuosos totales de *S. wrightii* (*S.w*), *S. pallescens* (*S.p*), *S. nothohybrida* (*S.n*), *S. lepidophylla* (*S.l*), amentoflavona (**2**) y robustaflavona (**4**), a través de su capacidad captadora del radical libre DPPH. Es un ensayo empleado con frecuencia por su rapidez, y facilidad para determinar potenciales antioxidantes.



La solución de DPPH recién preparada es de color púrpura oscuro, con un máximo de absorción a 517 nm, este color disminuye cuando un antioxidante está presente en el medio y como consecuencia se produce una disminución en la absorbancia. Cuanto más rápidamente decrece la absorbancia, más potente es la actividad antioxidante de un extracto o sustancia en términos de la capacidad de donar electrones. En este estudio se emplearon como referencia de compuestos antioxidantes a la quercetina y Trolox (ácido (+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) y la capacidad de neutralización del radical DPPH se determinó en un período de 30 minutos, bajo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{remanente}} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

En la siguiente figura se muestra la disminución de la absorbancia con respecto al tiempo, de extractos acuosos totales, amentoflavona (2), robustaflavona (4) y de los compuestos de referencia.

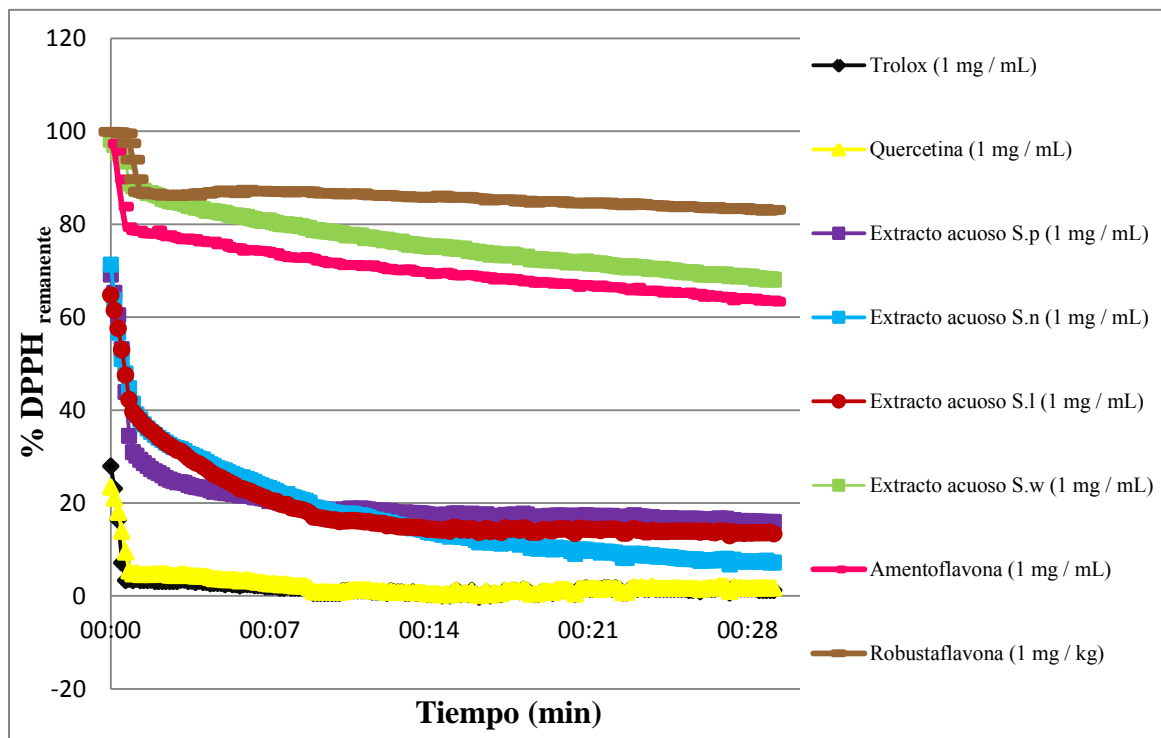


Fig. 30. Curso temporal de la neutralización del radical DPPH.



En el gráfico de la Figura 30 se observa que el poder antioxidante del extracto acuoso de las diferentes especies de *Selaginella* es variable, siendo el de *S. nothohybrida* de mayor actividad y el de menor actividad el de *S. wrightii*, esta diferencia puede deberse a la composición química de las diferentes especies. Por lo que respecta a los compuestos puros estos no mostraron tener una actividad atrapadora de radicales significativa, lo cual está en concordancia con publicaciones anteriores (Hyung *et al.*, 2006; Bonacorsi *et al.*, 2011).

Para cuantificar la capacidad antioxidante en el análisis se calculó, el Área Bajo la Curva (ABC) y la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox® (TEAC). El primero indica la rapidez y eficiencia de la reacción de atrapamiento del radical (Apak *et al.*, 2007) y el segundo sirve para medir la capacidad antirradicalaria de una muestra comparando la cantidad de inhibición del radical libre de la muestra con la de un patrón (Trolox), para lo anterior se empleó la curva de calibración (**Figura 31**), en donde las absorbancias a los 30 minutos de cada muestra fueron interpoladas. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 11.

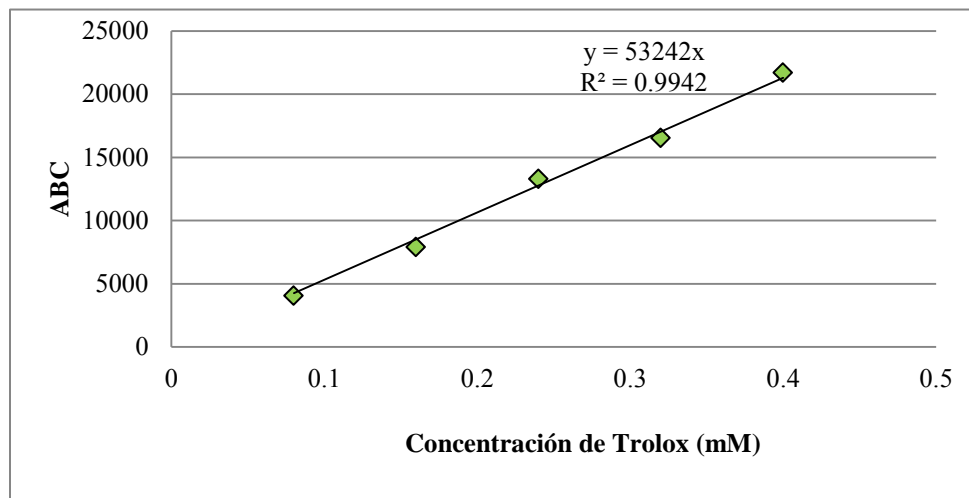


Fig. 31. Curva de Calibración de Trolox.



Tabla 11. Parámetros de actividad antioxidante para extractos acuosos totales y estándar Trolox del ensayo DPPH.

Sustancia de prueba	ABC	TEAC (mM)	% de neutralización de DPPH
Extracto acuoso S.l	18973	0.35	87
Extracto acuoso S.n	20599	0.38	95
Extracto acuoso S.p	18431	0.34	85
Extracto acuoso S.w	8130	0.15	37
Amentoflavona (2)	8673	0.16	40
Robustaflavona (4)	4917	0.09	22
Trolox	21684	0.4	100

Considerando la concentración de 0.4 mM de Trolox en la curva de calibración como 100%, los valores de TEAC reportados en la tabla anterior indican que los extractos acuosos de *S. lepidophylla* (0.35 mM), *S. nothohybrida* (0.38 mM) y *S. pallescens* (0.34 mM) y *S. wrightii* (0.15 mM) capturan una cantidad de radicales aproximada del 87, 95, 85 y 37 % comparable al Trolox®. Los valores de TEAC obtenidos para los compuestos puros amentoflavona (2) y robustaflavona (4) son de 40 y 22 % respectivamente, lo que indica una actividad antioxidante baja relativa al Trolox®.

Como ya se mencionó la actividad de los extractos y compuestos puros no fue mayor a la del compuesto utilizado como estándar, lo anterior se atribuye a que el grupo catecol en el anillo B de los flavonoides y el anillo E en biflavonoides, son los grupos funcionales que intervienen en la actividad antioxidante (Pannala *et al.*, 2001; Seyoum *et al.*, 2006). Los biflavonoides y flavonoides con dos hidroxilos adyacentes en el anillo B, tal como la quercetina, son más efectivos que sus equivalentes monohidroxilados.



5.7 Evaluación de toxicidad aguda del extracto acuoso total de *Selaginella nothohybrida*.

Para llevar a cabo el desarrollo de preparados medicinales a base de plantas medicinales, se debe tener una base científica que avale su eficacia terapéutica e inocuidad, con el fin de propiciar su uso adecuado (OMS, 2002). Por ello se evaluó la toxicidad aguda en *S. nothohybrida* como una de las doradillas más comercializadas y empleadas tradicionalmente en México.

La evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso total de *S. nothohybrida*, se realizó empleando la metodología experimental descrita por Lorke (1983), puesto que es un método que permite calcular de manera sencilla la dosis letal media (DL₅₀) haciendo uso de un pequeño número de animales y durante un periodo de tiempo relativamente corto.

El experimento constó de dos etapas. En la primera se ensayaron tres dosis del extracto acuoso 10, 100 y 1000 mg/kg, las cuales fueron administradas vía oral a ratones con 4 horas de ayuno. Los animales fueron observados durante las primeras dos horas posteriores a la administración donde solo manifestaron un poco de agitación; durante los siguientes 15 días se realizaron observaciones conductuales que no manifestaron ninguna anomalía, o muerte y se observó un aumento de peso por crecimiento. Una vez terminado el periodo de experimentación, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂, y se les hizo una necropsia, con la finalidad de observar algún posible daño macroscópico en órganos como: corazón, pulmón, riñón, hígado y estómago. En ningún órgano se observó algún daño asociado a la administración del preparado que sugiriera efectos tóxicos sistémicos.

En la segunda etapa se administraron dosis de 1600, 1900 y 5000 mg/kg, con la finalidad de determinar la DL₅₀. En esta fase se siguió el mismo proceso que en la primera. Al final tampoco hubo muerte de animales, ni manifestaron daños macroscópicos en sus órganos.



Estos resultados indicaron que el extracto acuoso de la planta *S. nothohybrida*, carece de efectos tóxicos agudos para ratones ($DL_{50} > 5000$ mg/kg), y aunque no se pudo extrapolar esta información al resto de las especies de *Selaginella*, debido a su diferencia en contenido metabólico, sí da una idea de que estas plantas no tienen efectos nocivos en ratones, sumado a que han sido usadas por cientos de años sin haber un reporte tóxico.



6. CONCLUSIONES

1. El método de UPLC/MS resultó ser muy eficiente para dilucidar de manera contundente la presencia de un determinado tipo de biflavonoide en el extracto o fracción de una materia prima vegetal. De acuerdo al peso molecular, el tipo particular de biflavonoide se puede vislumbrar en su forma oxidada, reducida o metoxilada.
2. El patrón de fragmentación de los biflavonoides es característico y por medio del método de UPLC/MS se puede discriminar la presencia de los compuestos amentoflavona (**2**), robustaflavona (**4**) e isocriptomerina (**5**). De acuerdo a su estructura espacial, el biflavonoide robustaflavona presentan un fragmento característico por la pérdida de una molécula de agua (por formación de un anillo de furano) que no es evidente en la amentoflavona (**2**) y en el caso de la isocriptomerina (**5**), la ruptura más evidente se da en el enlace interflavonoide C-O-C.
3. El estudio fitoquímico de los extractos de *S. pallescens* permitió el aislamiento de los biflavonoides amentoflavona (**2**) y bilobetina (**3**) mientras que de *S. wrightii* se aislaron amentoflavona (**2**), robustaflavona (**4**) e isocriptomerina (**5**). El ácido eucómico (**1**) fue aislado por hidrólisis del extracto acuoso total de *S. pallescens* y por primera vez fue evidente en la familia Selaginellaceae.
4. El método de UPLC/MS utilizado para el análisis comparativo de extractos de las especies *S. pallescens*, *S. wrightii*, *S. nothohybrida* y *S. lepidophylla* confirmó la presencia de los biflavonoides determinados por CLAE con asistencia de estándares de referencia, salvo en el caso de robustaflavona, reportada en la literatura como componente de *S. lepidophylla*, en cuyo caso se detectó por el método de UPLC/MS al compuesto **8** (biflavonoide dihidrogenado) el cual coincide con el tiempo de retención de (**4**) en CLAE. A este respecto, cabe la propuesta de asegurar



o discriminar la presencia de (4) en otras colectas de *S. lepidophylla* de diferentes lugares, mediante la realización del análisis por el método de UPLC/MS.

5. De los cuatro extractos representativos de las cuatro especies vegetales estudiadas, el de *S. nothohybrida* mostró la mayor capacidad antioxidante (95 %) en el ensayo de DPPH, seguido por *S. lepidophylla* (87 %) y *S. pallescens* (85 %). *S. wrightii* mostró la mínima capacidad (37 %). Estos resultados contrastan con los obtenidos para los compuestos aislados: amentoflavona (40 %) y robustaflavona (22%).
6. El ensayo de toxicidad aguda realizado al extracto acuoso total de *S. nothohybrida* dió como resultado la no toxicidad para roedores. Esto comprueba el uso ancestral inocuo de estas especies recomendadas para padecimientos renales.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abundiz-Bonilla LA., Tejero-Diez JD. (1990). El género *Selaginella* Pal.-Beauv. (*Selaginellaceae*, Lycopodiophyta) en el oeste del Estado de México. *Acta Botánica Mexicana*. **11**: 23-47.
- Aguilar MI., Romero M., Chávez M., King-Díaz B., Lotina-Hemnsen B. (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 6994-7000.
- Aguilar MI., Mejía IA., Menchaca C., Vázquez I., Navarrete A., Chávez MI., Reyes-García A., Ríos-Gómez R. (2013). Determination of biflavonoids in four Mexican species of *Selaginella* by HPLC. *Journal of AOAC International*. **96**: 712-716.
- Alaerts G., Dajaegher B., Smeyers-Verbeke J., Heyden Y. (2010). Recent developments in chromatographic fingerprints from herbal products: Set-Up and data analysis. *Combinatorial Chemistry And High Throughput Screening*. **13**: 900-922.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik SE., Bektasoglu B., Berker K., Özyurt D. (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. **12**: 1496-1547.
- Argueta A., Cano L. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México: *Intituto Nacional Indigenita*.
- Bi Y., Zheng X., Feng W., Shi S. (2004). Isolation and structural identification of chemical constituents from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yao Xue Xue Bao*. **39**: 41-45.
- Biología I. d. (14 de 06 de 2011). "*Selaginella reflexa* Underw. IBUNAM: MEXU: PVT2370". (U. A. México, Editor) Recuperado el 3 de 07 de 2012, de UNIBIO: Colecciones Biológicas:
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVT2370>



- Bonacorsi C., da Fonseca L., G-Raddi M., R-Kitagawa R., Sannomiya M., Vilegas W. (2011). Relative antioxidant activity of Brazilian medicinal plants for gastrointestinal diseases. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**: 4511-4518
- Botany U. O. (2012). Cal's Plant of the Week. Recuperado el 09 de Julio de 2012, de <http://www.plantoftheweek.org/week266.shtml>
- Cao G., Booth S., Sadowski J., Prior L. (1998a). Increases in human plasma antioxidants capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **68**: 1081-1087.
- Cao Y., Chen J., Tan N., Oberer L., Wagner T., Wu Y., Zeng G., Yan H., Wang Q. (2010c). Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **40**: 2456-2460.
- Cao Y., Chen J., Tan N., Wu Y., Yang J., Wang Q. (2010c). Structure determination of selaginellins G and H from *Selaginella pulvinata* by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **48**: 656-659.
- Cao Y., Tan NH., Chen JJ., Zeng GH., Ma YB., Wu YP., Yan H., Yang J., Lu LF., Wang Q. (2010a). Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Fitoterapia*. **81**: 253-258.
- Castillo J., Benavente-García O., Lorente J., Alcaraz M., Redondo A., Ortuno A., Del Rio JA. (2000). Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 1738-1745.
- Chang CY., Chen XD., Xiao XY., Lin RC. (2000). Studies on micromorphology and its significance in anatomy and identification of *Selaginella*. *Journal of Medication Analysis*. **20**: 75-78.
- Chao L., Seguin E., Tillequin F., Kock M. (1987). New alkaloid glycosides from *Selaginella doederleinii*. *Journal Natural Products*. **50**: 422-426.
- Chen J., Chang H., Park H. (2006). Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **16**: 2373-2375.
- Chen P., Sun J., Xie N., Shi Y. (1995). Chemical constituents of day cai (*Selaginella doederleinii*). *Zhong Cao Tao*. **26**: 397-399.



- Cheng XL., Ma SC., Yu JD., Yang SY., Xiao XY., Hu JY., Lu Y., Shaw PC., But PP., Lin RC. (2008). Selaginellin A y B, two novel natural pigments isolated from *Selaginella tamariscina*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **56**: 982-984.
- Colín Ruíz A. (2010). Estudio Comparativo sobre los efectos diurético y de tránsito intestinal de extractos acuosos de *Selaginella nothohybrida* Valdespino y *Selaginella lepidhophylla* (Hook et Grev.)Spring. Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Czeladzinski S. (2003). *Selaginella* at the Barbican. *Plant Heritage*. **10**: 472-476.
- Dai Z., Ma S., Wang G., Wang F., Lin R. (2006). A New Glucoside From *Selaginella sinensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. **8**: 529-533.
- Dai Z., Wang G., Hou Q., Ni L., Wi F., Lin R. (2001). Chemical constituents of *Selaginella sinensis*. *Zhong Cao Yao*. **32**: 784-785.
- Darias V., Bravo L., Rabanal R., Sanchez M., Gonzalez L., Hernandez-Perez A. (1989). New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. **25**: 77-92.
- De la Cruz M. (1552). *Libellus de Medicinalbus Indorum Herbis* Manuscrito azteca. Segunda traducción latina de Juan Badiano. pág. 36.
- Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G., Navarrete A., Mata R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **110**: 334-342.
- Dornelles-Mello L., Hernandez S., Marrazza G., Mascini M., Tatsuo-Kubota L. (2006). Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. **21**: 1374-1382.
- EPA. U.S. Integrated Risk Information System. Glossary of IRIS terms. (20 de agosto de 2013). Obtenido de www.epa.gov/iris/gloss8.htm
- Feng W., Zhu B., Zheng XK., Zhang YL., Yang LG., Lla YJ. (2011). Chemical constituents of *Selaginella stautoniana*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **9**: 108-111.



- Feng W., Chen H., Zheng X. (2008). Chemical constituents of *Selaginella sinensis*. *Chinese Traditional and Herbal drugs*. **39**: 654-656.
- Feng W., Li K., Zheng X. (2011). A new norlignan lignanoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. **1**: 36-39.
- Fierro A. (2012). “Solo cinco por ciento de las plantas medicinales de México ha sido evaluado farmacológicamente”. Recuperado el 19 de 1 de 2014, de Boletines UAM (en línea): http://www.bidi.uam.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=62:citar-recursos-electronicos-normas-apa&catid=38:como-citar-recursos&Itemid=65
- Gao L., Yin S., Li Z., Sha Y., Pei Y., Shi G., Jing Y., Hua H. (2007). Tree novel sterols isolated from *Selaginella tamariscina* with antiproliferative activity in leukemia cells. *Planta Medica*. **73**: 1112-1115.
- Guedes da Silva-Almeida J., Guilherme Sousa de Sá P., Alves Ribeiro de Oliveira Macedo L., Alves de Siqueira Filho J., Ribeiro de Olivera V., Barbosa Fulho J. (2013). Phytochemistry of the genus *Selaginella* (*Selaginellaceae*). *Journal of Medicinal Plants Research*. **7**: 1858-1868.
- Guevara-Romero 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.
- Guía de Consulta Diversidad Vegetal-FACENA (UNNE). PTERIDOFITAS-Lycophyta.
- Guilherme P., Pereira X., Tolentino J., Alves de Siqueira J., Fontana A., De Souza J., Quintans-Júnior L., Fonseca P., Rodrigues C., Branco A., Guedes da Silva J. (2012). Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **12**: 187.
- Harborne J., Mabry T., Mabry H. (1975). In *The Flavonoids*. Geiger H., Quinn C., Biflavonoids. 692-742. London, UK.: Chapman and Hall.
- Hassler M., Swale B. (s.f.). Family *Selaginellaceae*, genus *Selaginella*; world species list. Recuperado el Septiembre de 2013, de <http://homepages.caverock.net.nz/~bj/fern/selaginella3.htm>



- Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572-584.
- Hyun SK., Jung HA., Chung HY., Choi JS. (2006). *In vitro* peroxy nitrite scavenging activity of 6-Hydroxykynurenic acid and other flavonoids from *Gingko biloba* yellow leaves. *Archives of Pharmacal Research*. **29**: 1074-1079.
- Instituto de Biología UNAM. (27 de 05 de 2010). "*Selaginella pallescens* (Presl.) Spring - IBUNAM: MEXU:PV173650". Recuperado el 09 de 7 de 2012, de UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV173650>
- Ishii M., Uemoto S., Fujieda K., Nonaka M., Shoyama Y., Miyahara Y., Nishioka I. (1979). A new biologically active phenolic from *Cattleya trianaei*. *Phytochemistry*. **18**: 1211-1213.
- Iwu M., Igboko O. (1990). Biflavonoids constituents of *Garcinia kola* roots. *Fitoterapia*. **61**: 178-181.
- Jaramillo S. (1989). *Naturismo como sistema sanitario social*. Barcelona: Léima.
- Jung H., Sung W., Yeo S., Kim H., Lee I., Woo E., Lee D. (2006). Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Archives of Pharmacal Research*. **29**: 746-751.
- Kim H., Park H., Son K., Chang H., Kang S. (2008). Biochemical Pharmacology of Biflavonoids: Implications for Anti-inflammatory Action. *Archives of Pharmacal Research*. **31**: 265-273.
- Korall P., Kenrick P. (2002). Phylogenetic relationships in *Selaginellaceae* based on RBCL sequences. *American Journal of Botany*. **89**: 506-517.
- Korall P., Kenrick P., Therrien J. (1999). Phylogeny of *Selaginellaceae*: evaluation of generic/subgeneric relationships based on rbcl gene sequences. *International Journal of Plant Science*. **160**: 585-594.
- Kunert O., Swamy R., Kaiser M., Presser A., Buzzi S., Rao A., Schühly W. (2008). Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochemistry Letters*. **1**: 171-174.



- Lee C., Choi H., Kim D., Chang I., Moon H., Lee S., Oh W., Woo E. (2008). Biflavoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **16**: 732-738.
- Li J., Wan D., Chen K. (2007). RAPD analysis of 8 medicinal species of *Selaginella*. *Zhong Yao Cai*. **30**: 403-406.
- Lin L., Chou C. (2000). Three new biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *The Chinese Pharmaceutical Journal*. **52**: 211-218.
- Li L., Kuo Y., Chou C. (2000). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella denticulata*. *Journal Natural Products*. **63**: 627-630.
- Liang X., Jin Y., Wang Y., Jin G., Fua Q., Xiao Y. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 2033-2044.
- Lin Y-M., Zembower D., Flavin M., Schure R., Anderson H., Korba B., Chen F-C. (1997). Robustaflavone, a naturally occurring biflavonoid, is a potent non-nucleoside inhibitor of hepatitis B virus replication in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **7**: 2325-2328.
- Lin R., Skaltsounis A., Sequin E., Tilleguin F., Koch M. (1994). Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Medica*. **60**: 168-170.
- Lira R., Riba R. (1996). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Liu J., Xu K., Li F., Shen J., Hu C., Zou H., Yang F., Liu G., Xiang H., Zhou Y., Li Y., Tan G. (2010). A new flavonoid from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **58**: 549-551.
- Lopez-Saez J., Perez-Alonso M., Velasco-Negueruela A. (1994a). Biflavonoids of *Selaginella denticulata* growing in Spain. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*. **49**: 267-270.
- Lopez-Saez J., Pérez-Alonso M., Velasco-Negueruela A. (1995). Flavonoids of *Selaginella denticulata* and Selaginoides. *Fitoterapia*. **66**: 188-189.
- Lorke D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology*. **54**: 275-287.



- Lu P., Jernstedt J. (1996). Rhizophores and root development in *Selaginella martensii*: meristem transitions and identity. *International journal of plant sciences*. **157**: 180-194.
- Ma L., Ma S., Wei F., Lin R., But P., Lee S. (2003). Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycosides from *Selaginella uncinata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **51**: 1264-1267.
- Ma L., Wei F., Ma S., Lin R. (2002). Two new cromone glycosides from *Selaginella uncinata*. *Chinese Chemical letters*. **13**: 748-751.
- Ma S., But P., Ooi V., He Y., Lee S., Lee SF., Lin R. (2001). Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **24**: 311-312.
- Markham K., Sheppard C., Geiger H. (1987). ¹³C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. *Phytochemistry*. **26**: 3335-3337
- Martínez M. (1989). Las plantas medicinales de México (Sexta ed.). México: Ediciones Botas.
- Martínez M. (1978). Flora Medicinal del Estado de México. México: CODAGEM.
- Martínez O. G. (1997). Flora del Valle de Lerma. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta, Herbario MCNS, Buenos Aires.
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M., Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. XVII: 271-278.
- Menchaca-Márquez C. (2009). Aislamiento e Identificación Estructural de Biflavonoides Adicionales Contenidos en la Planta Medicinal *Selaginella lepidophylla* Spring (*Selaginellaceae*). México, D.F.: Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mickel J., Valdespino I. (1992). Five new species of Pteridophytes from Oaxaca, México. *Brittonia*, 44: 312-321.



- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **26**: 211-219.
- Moon J., Shibamoto T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Chemistry*. **57**: 1655-1666.
- Nason A. (1980). *Biología* (18ª reimpresión).ed Trillas. México, DF.
- Okada M., Park S., Koshizawa T., Ueda M. (2009). (R)-Eucomic acid, a leaf-opening factor of the model organism, *Lotus japonicus*. *Tetrahedron*. **65**, 2136-2141.
- Osorio DE., Montaya G., Bastida J. (2009). Caracterización Fitoquímica de una Fracción de Biflavonoides de *Garcinia madruno*: Su inhibición de la Oxidación de LDL Humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. *Viate, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **16**: 369-377.
- Pannala AS., Chan TS., O'Brien PJ., Rice-Evans CA. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **282**: 1161-1168
- Plantas Villor. Recuperado el 09 de JULIO de 2013, de <http://www.plantasvillor.com/?p=17384>
- Qasim M., Roy S., Kamil M., Ilyas M. (1985). Phenolic constituents of *Selaginellaceae*. *Indian Journal of Chemistry*. **69**: 149-152.
- Quansah N. (1988). Sporangial distribution patterns in the strobili of African and Madagascan *Selaginella*. *Annals of Botany*. **61**: 604-610.
- Ratty A., Das N. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. **39**: 69-79.
- Repetto M. (2009). *Toxicología General* (3ª ed.). Ediciones Días de Santos.
- Sagrera G., Bertucci A., Vazquez A., Seoane G. (2011). Synthesis and antifungal activities of natural and synthetic biflavonoids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **19**: 3060-3073.
- Seigler DS. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. United States of America: Kluwer Academic Publishers.



- Setyawan A. (2009). Traditionally utilization of *Selaginella*; field research and literature review. *Nusantara Bioscience*. **1**: 146-154.
- Setyawan A. (2011). Review: Natural products from Genus *Selaginella* (*Selaginellaceae*). *Nusantara Bioscience*. **3**: 44-58.
- Setyawan A. (2011). Review: Recent status of *Selaginella* (*Selaginellaceae*) research in Nusantara. *Biodiversitas*. **12**: 112-124.
- Setyawan A., Darusman L. (2008). Review: Senyawa Biflavonoid pada *Selaginella* Pal. Beauv. dan Pemanfaatannya. *Biodiversitas*. **9**: 64-81.
- Silva G., Chai H., Gupta M., Farnsworth N., Cordell G., Pezzuto J., Beecher C., Kinghorn A. (1995). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. *Phytochemistry*. **40**: 129-134.
- Simmler C., Antheaume C., André P., Bonté F., Lobstein A. (2011). Glucosyloxybenzyl eucomate derivatives from *Vanda teres* stimulate HaCat cytochrome c oxidase. *Journal Natural Products*. **74**: 949-955.
- Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J., Reis S., Borges F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids. A structure-activity relationship study. *Free Radicals Research*. **40**: 433-442.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky FK. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. **67**: 2058-2070.
- Sun C., Syu W., Huang Y., Chen C., Ou JC. (1997). Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*. *Journal Natural Products*. **60**: 382-384.
- Swamy R., Kunert O., Schuhly W., Bucar W., Ferreira D., Rani V., Kumar B., Narasimha A. (2006). Structurally unique biflavonoids from *Selaginella crysochaulos* and *Selaginella bryopteris*. *Chemistry and Biodiversity*. **3**: 405-413.
- Tan G., Chen L., Xu K., Zheng Q., Huang Z., Shu J., Shu JH., Deng T. (2004). Study on the Chemical Constituents of *Selaginella pulvinata* Maxim. *Chinese Journal of Organic Chemistry*. **24**: 1082-1085.
- UNAM, B. D. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 29 de 01 de 2013, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=79> 51.



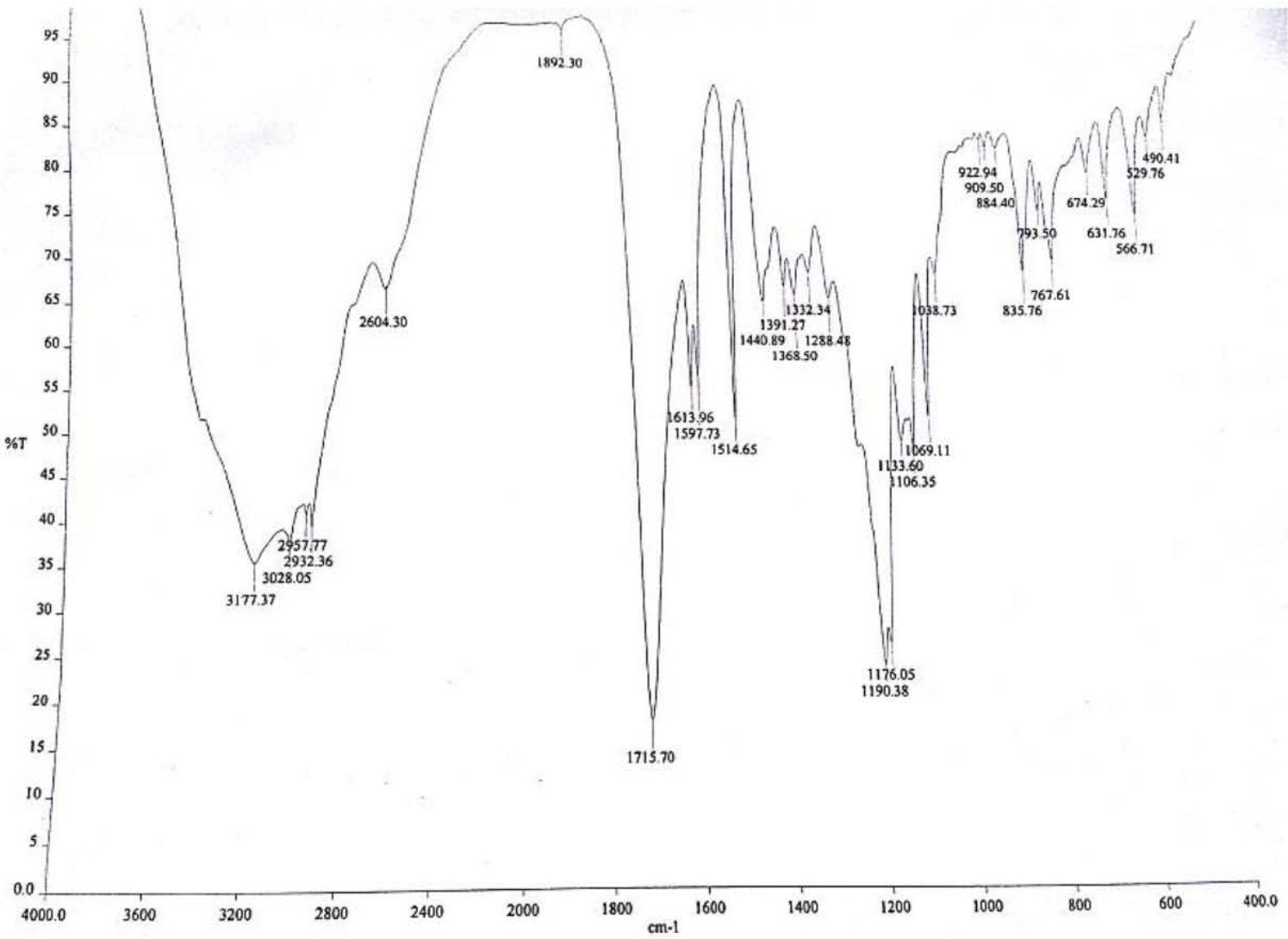
- Velazco-Macías C. (2009). Flora de Nuevo León, México: diversidad y análisis espacio-temporal. Tesis Doctoral, 272. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L.
- Voirin B., Jay M. (1978). Etude chimiosystematique des lycopodiales, isoetales, selaginellales et psilotales. *Biochemical Systematics and Ecology*. **6**: 99-102.
- Wang Y., Chen H., Zheng X., Feng W. (2007). A new sesquilignan from *Selaginella sinensis* (Desv) Spring. *Chinese Chemical Letters*. **18**: 1224-1226.
- Wang Y., Yang F., Wang X., Sun Q., Wang H., Shi Y., Tang G. (2009). Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Selaginella moellendorfi*. *Journal Natural Products*. **72**: 1151-1154.
- Winkelman M. (1986). Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology*. **18**: 109-131.
- Xu J., Liu X., Chen K. (2009). A new biflavonoid from *Selaginella labordei* Hieron. *Chinese Chemical Letters*. **20**: 939-941.
- Yamaguchi L., Vassao D., Kato M., di Mascio P. (2005). Biflavonoids from brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry*. **66**: 2238-2247.
- Yang J., Pokharel Y., Kim M., Woo E., Choi H., Kang K. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Journal of Ethnopharmacology*. **105**: 107-113.
- Zhang Y., Shi S., Wang Y., Huang K. (2011). Target-guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by offline coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments. *Journal of Chromatography B*. **879**: 191-196.
- Zhang Y., Li Q., Yan L., Shi Y. (2011). Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **25**: 2173-2186.
- Zheng XK, Li YJ. Zhang L. (2009). Experimental study of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring on glucose metabolism among type 2 diabetic rats. *Modern Preventive Medicine*. **36**: 1918-1922.



- Zheng J., Wang N., Gao H., Liu H., Chen H., Fan M., Yao X. (2008). A new flavonoid with a benzoic acid substituent from *Selaginella uncinata*. *Chinese Chemical Letters*. **29**: 1093-1095.
- Zheng X., Bi Y., Feng W., Wang J., Niu J. (2004b). Study on chemical constituents of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yao Xue Xue Bao*. **39**: 266-268.
- Zheng X., Du J., Xu Y., Zhu B., Liao D. (2007). A new steroid from *Selaginella pulvinata*. *Fitoterapia*. **78**: 598-599.
- Zheng X., Li K., Wang Y., Feng W. (2008). A new dihydrobenzofuran lignanoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Chinese Chemical Letters*. **19**: 79-81.
- Zheng X., Wang W., Zhang L., Su C., Wu Y., Ke Y., Hou Q., Liu Z., Gao A., Feng W. (2013). Antihyperlipidaemic and antioxidant effect of the total flavonoids in *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in diabetic mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **65**: 757-766.
- Zhu T., Chen K., Zho W. (2008). A new flavones glycoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Chinese Chemical Letters*. **19**: 1456-1458.



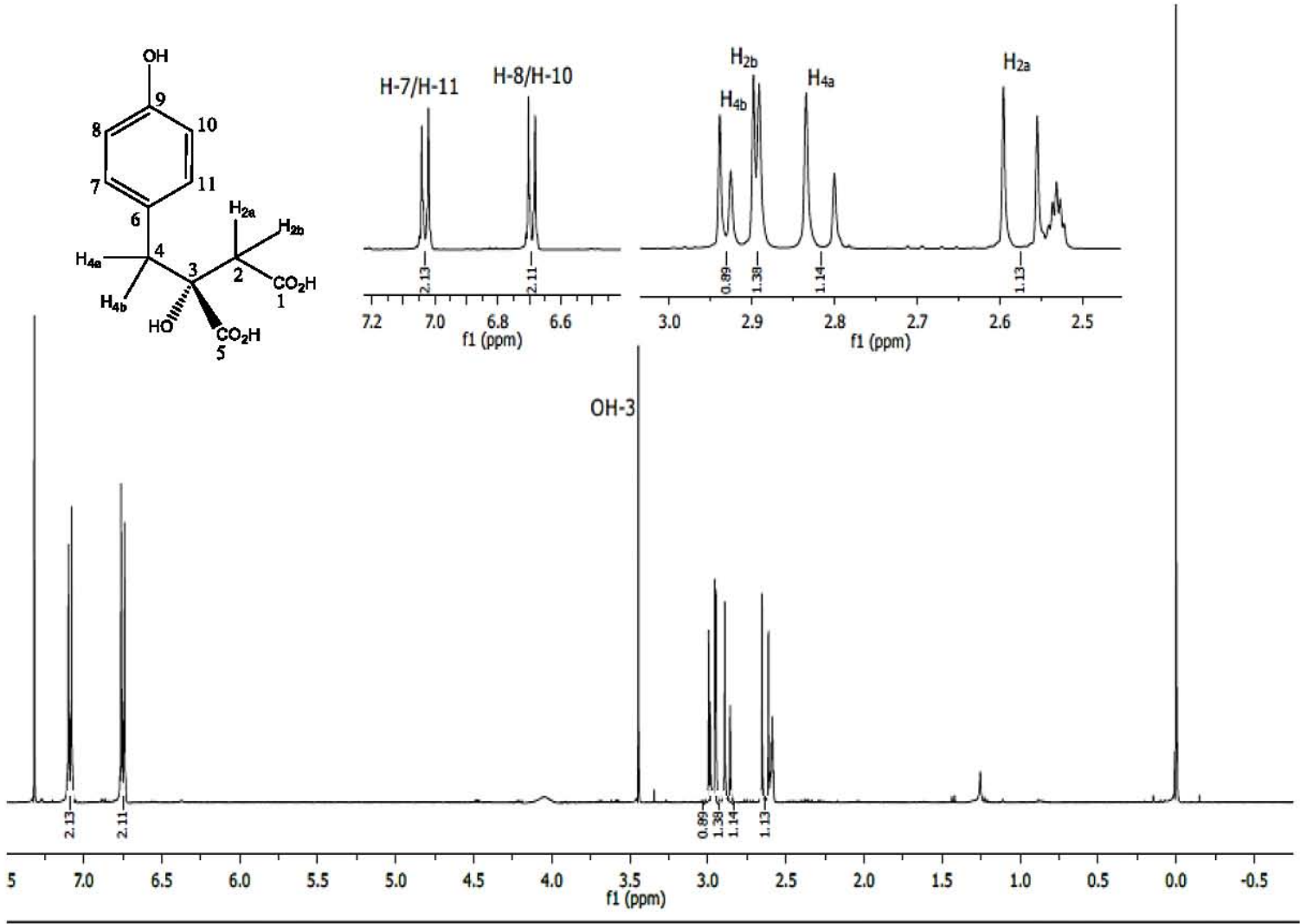
8. ANEXOS



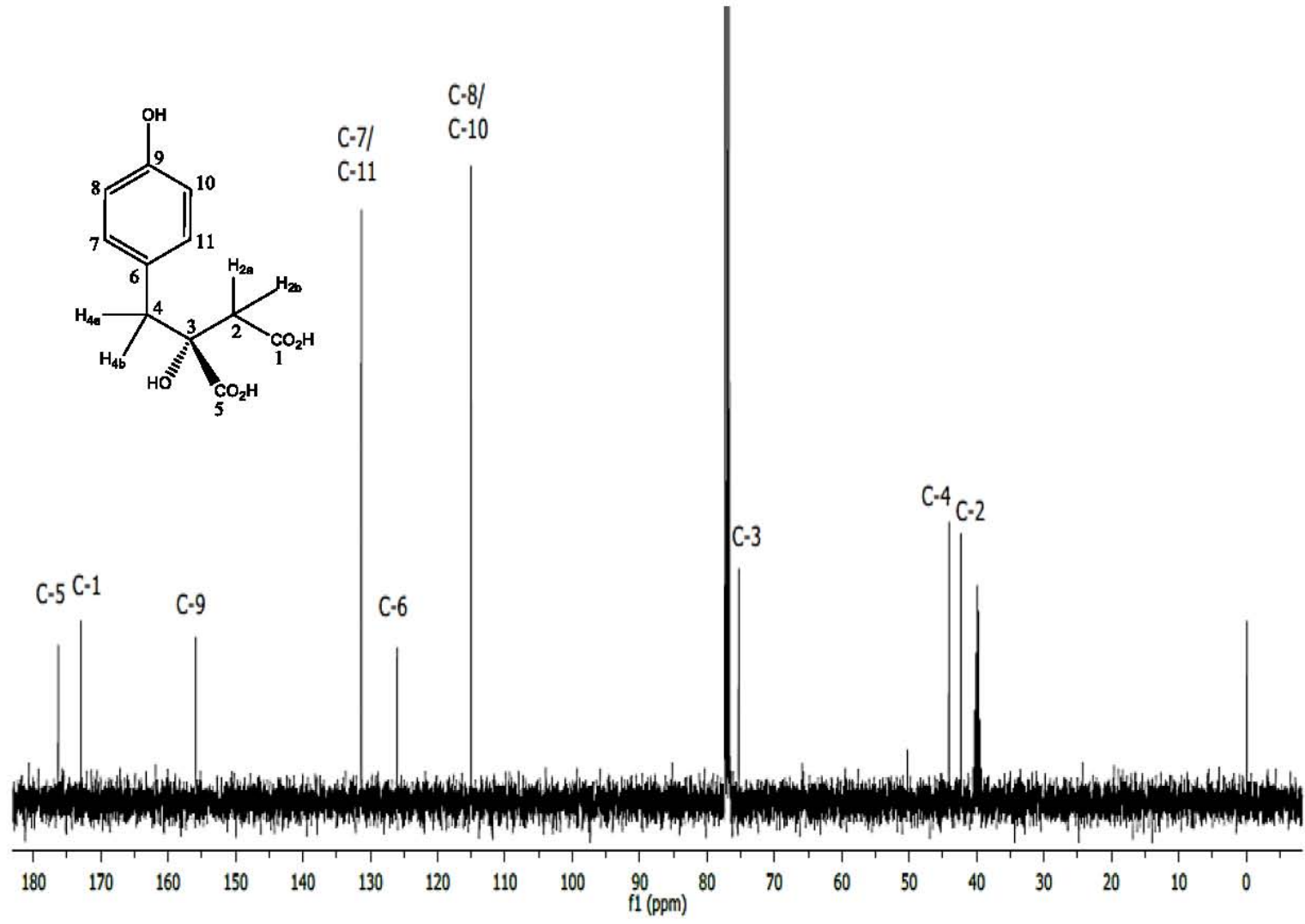
Anexo 1. IR (ATR) de ácido eucónico (I)

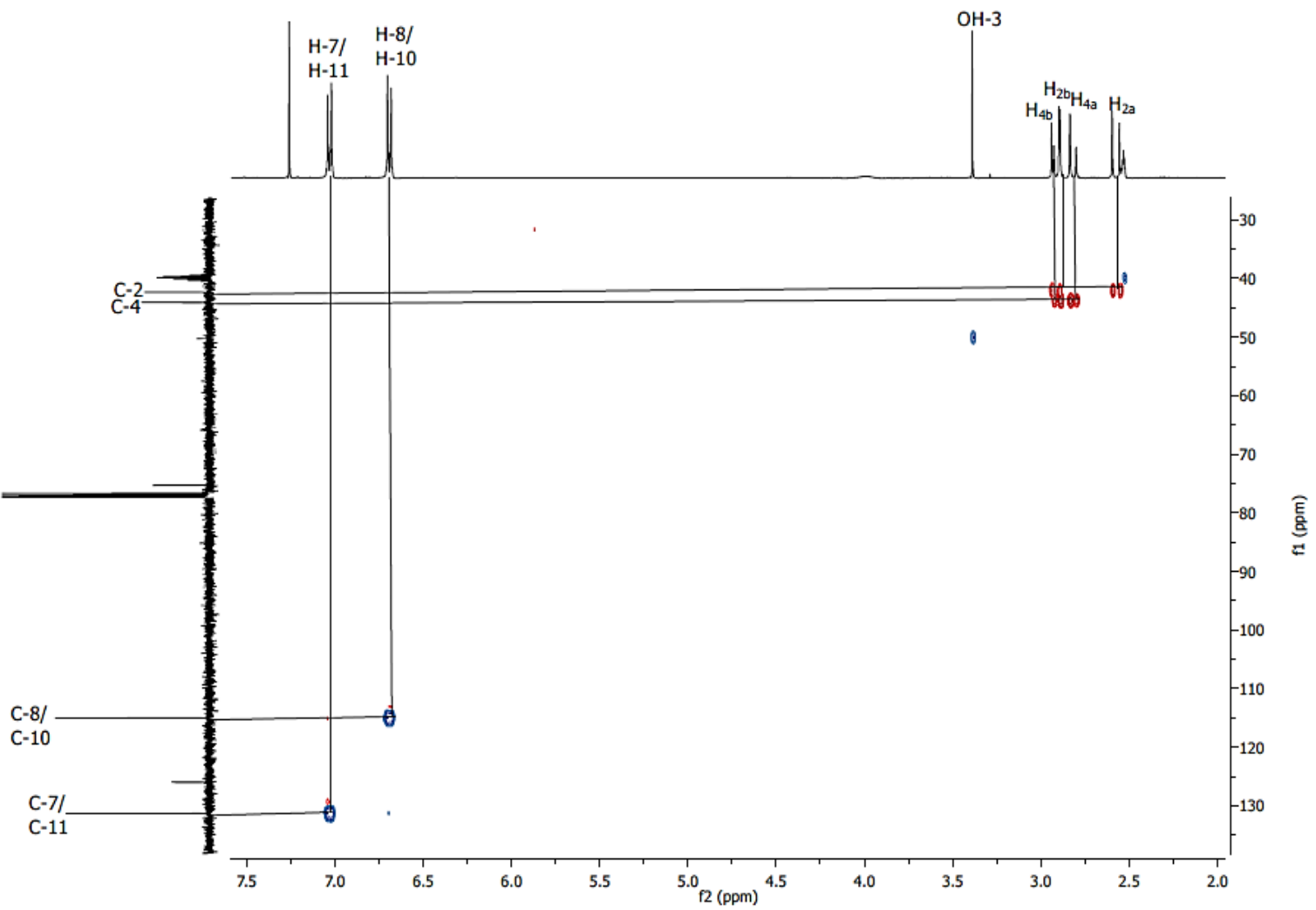


Anexo 2. RMN-¹H de ácido eucómicico (**1**) (400 MHz, CDCl₃)

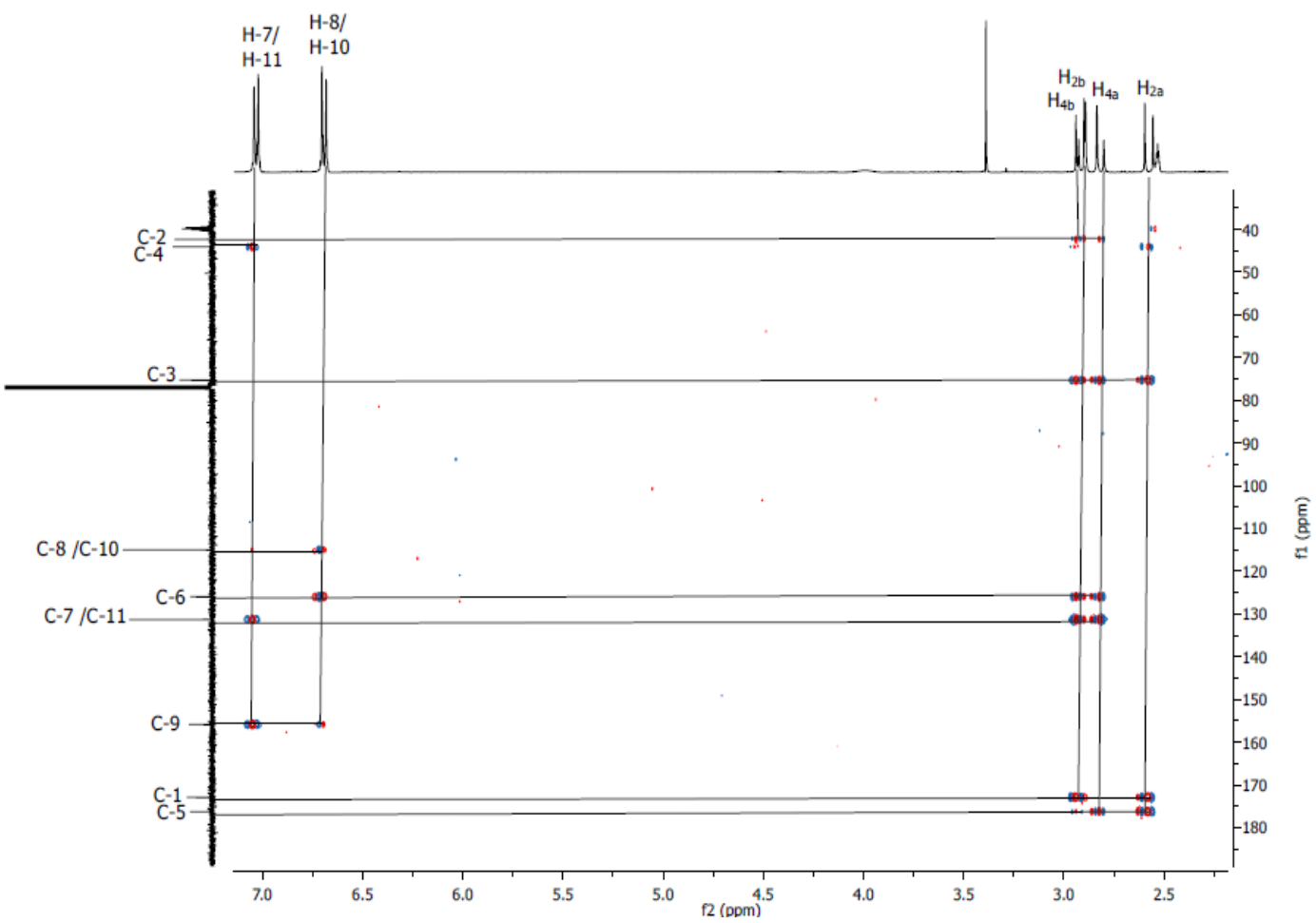


Anexo 3. RMN-¹³C de ácido eucónico (1) (100 MHz, CDCl₃)



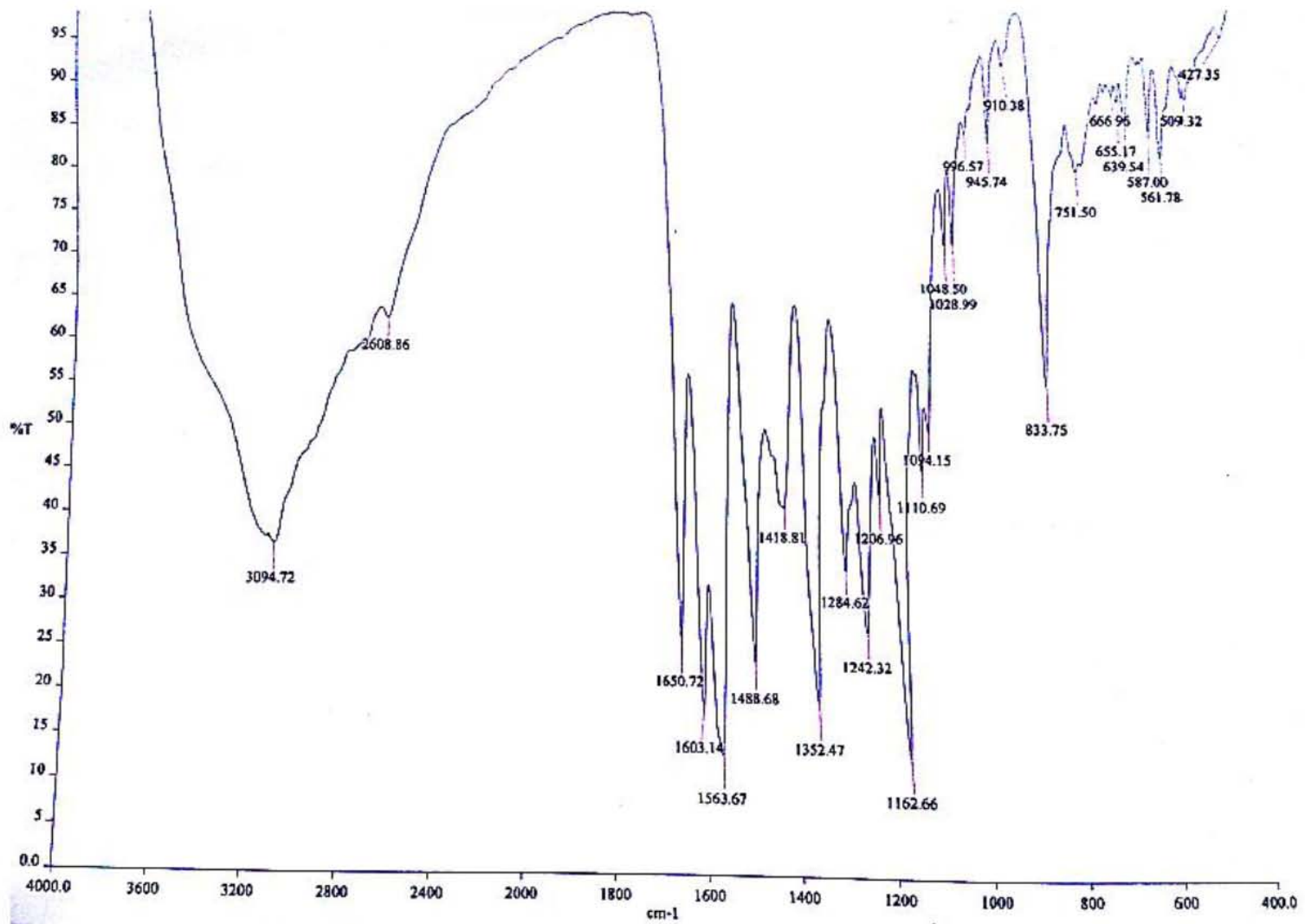


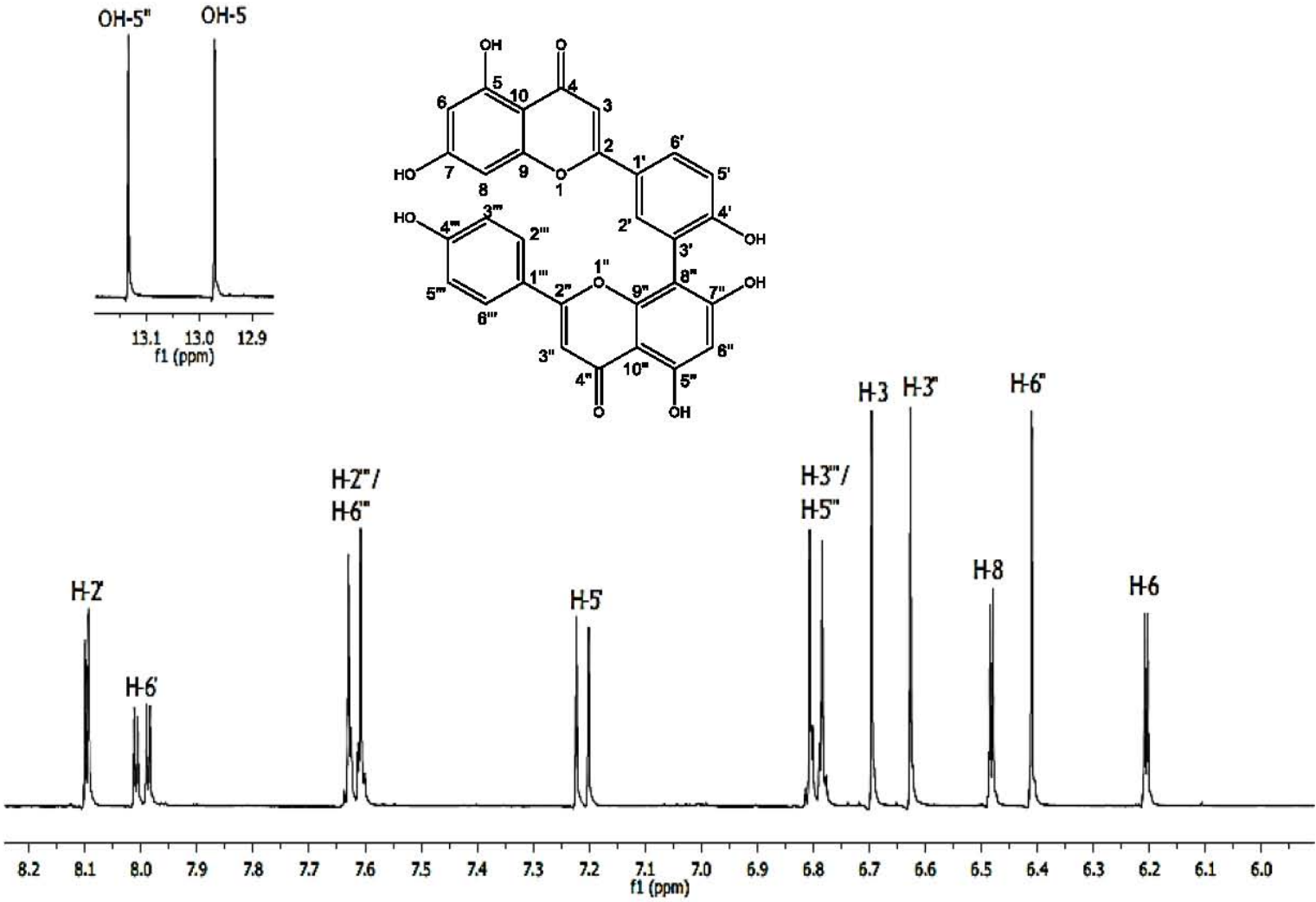
Anexo 4. RMN modalidad HSQC de ácido eucónico (1) (400 MHz, CDCl_3)



Anexo 5. RMN modalidad HMBC de ácido eucómico (**1**) (400 MHz, CDCl₃)

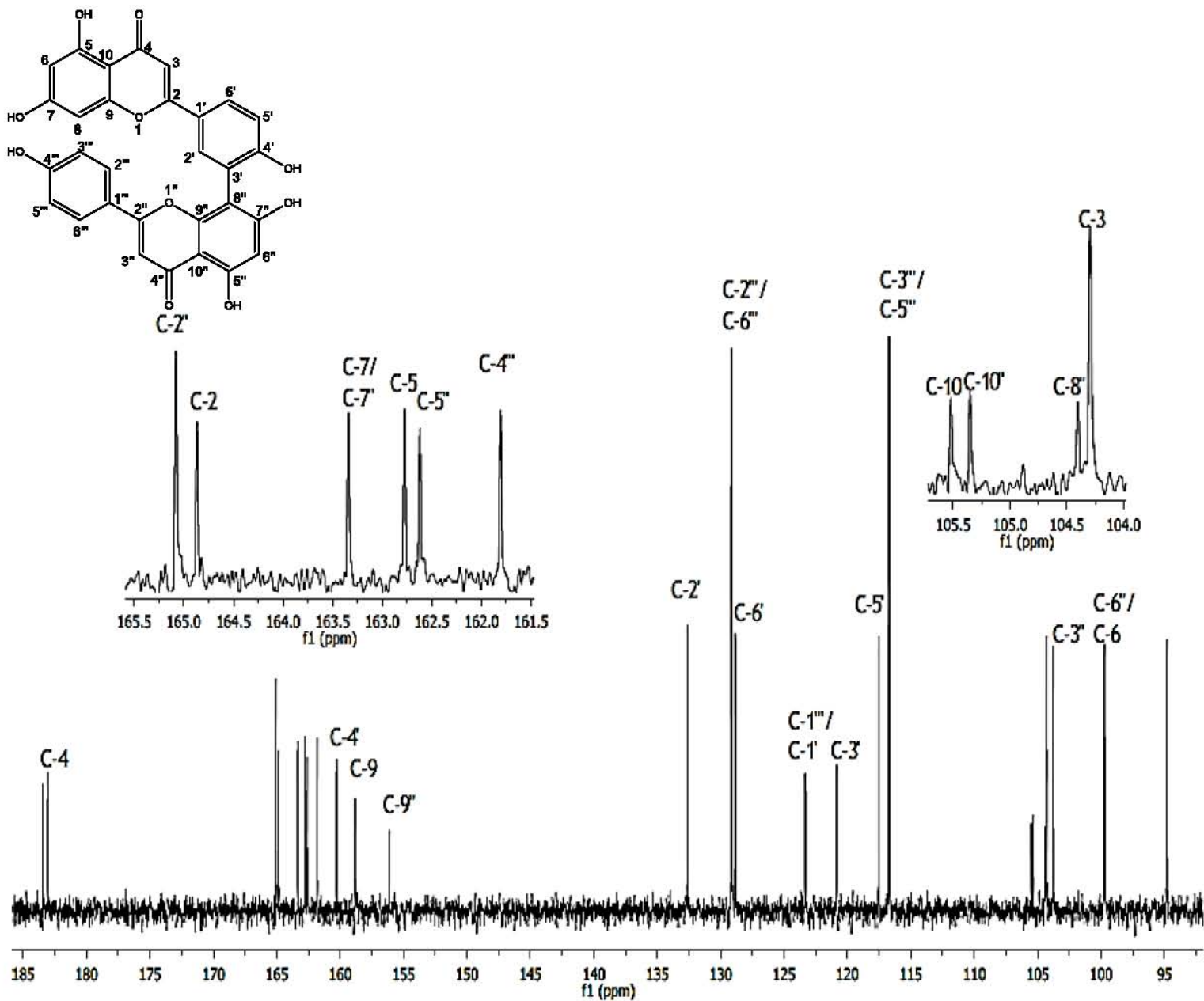
Anexo 6. IR (ATR) de amentoflavona (2)

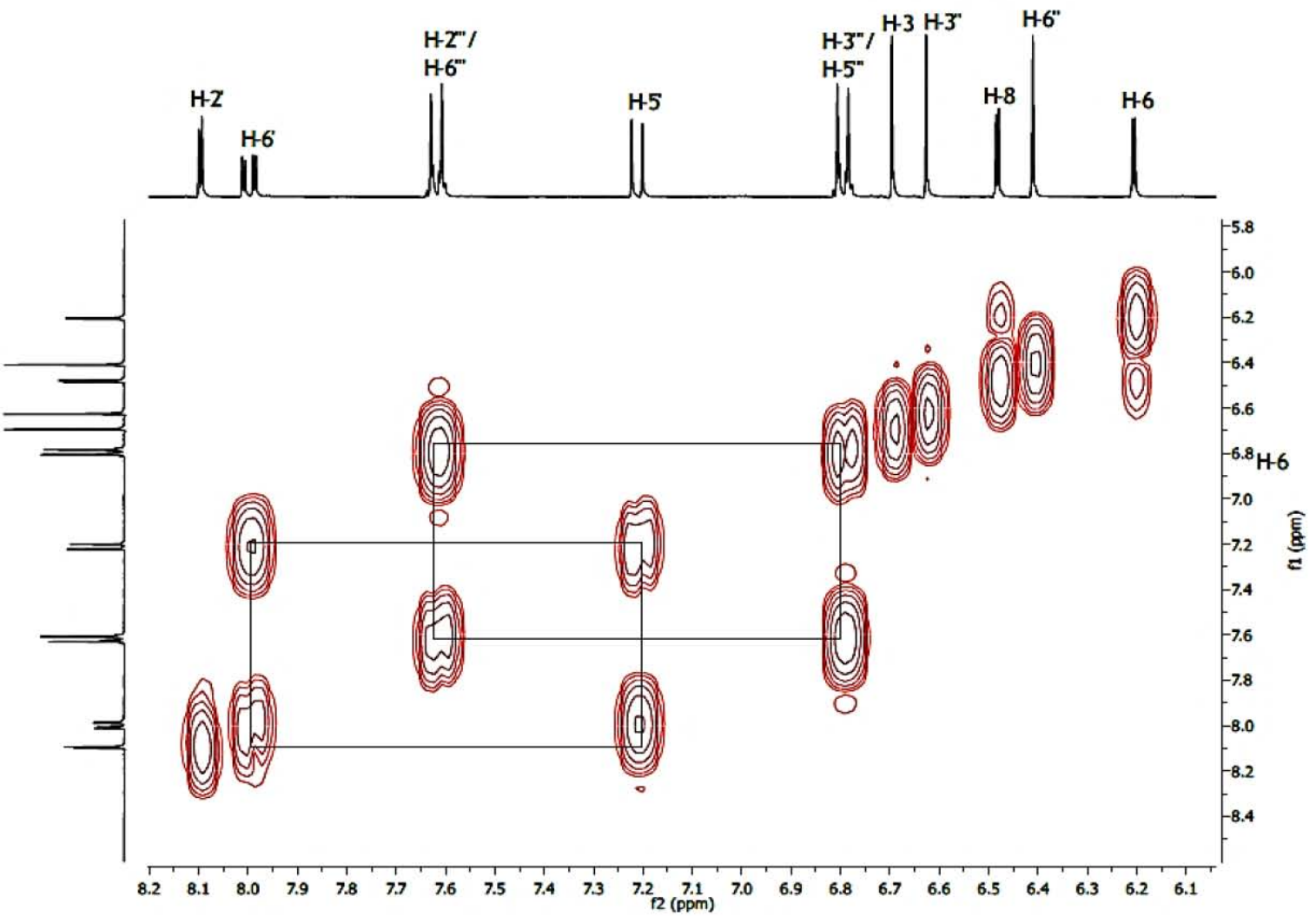




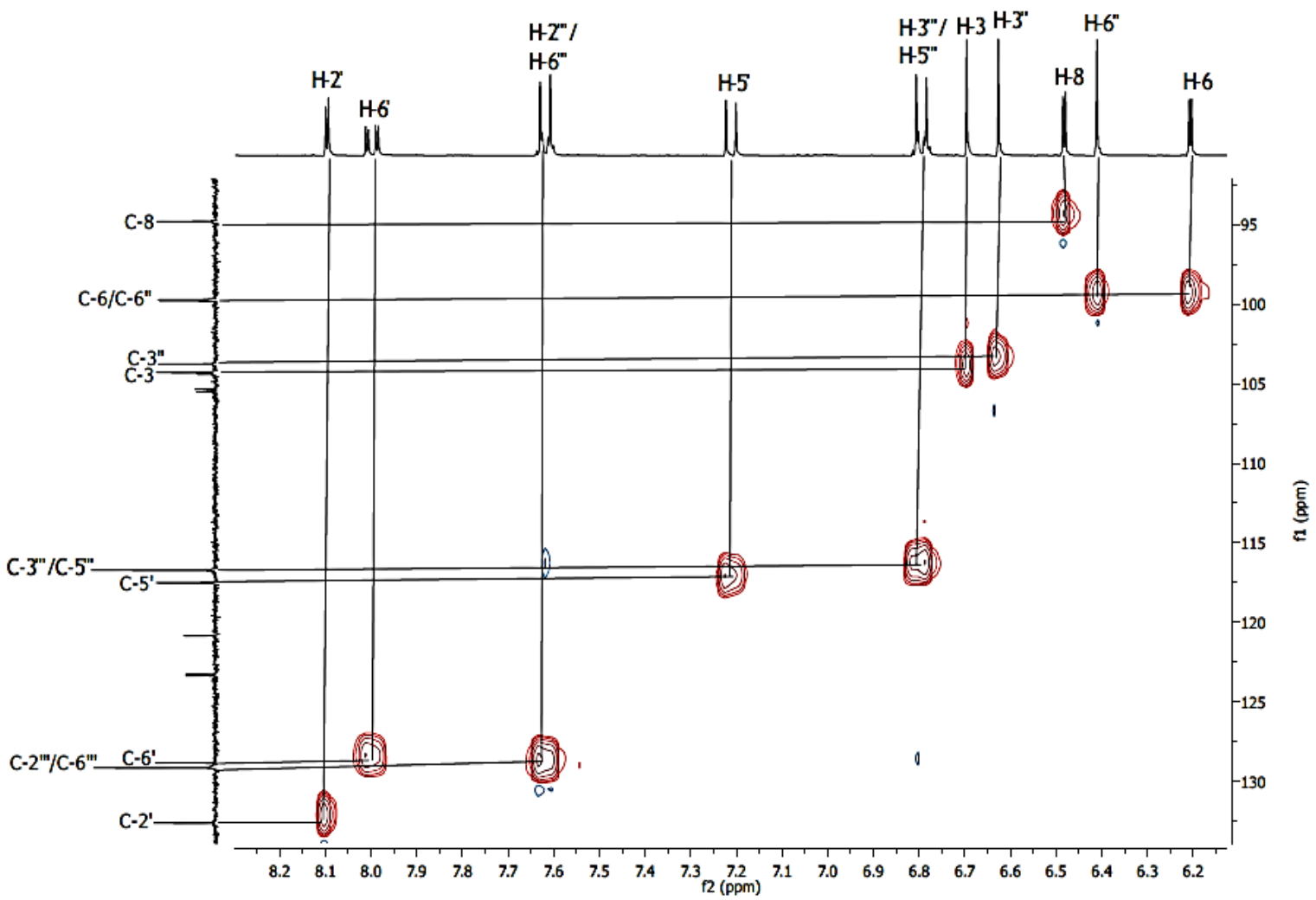
Anexo 7. RMN- ^1H de amentoflavona (2) (400MHz, acetona- d_6)

Anexo 8. RMN-¹³C de amentoflavona (2) (100 MHz, acetona-d₆)

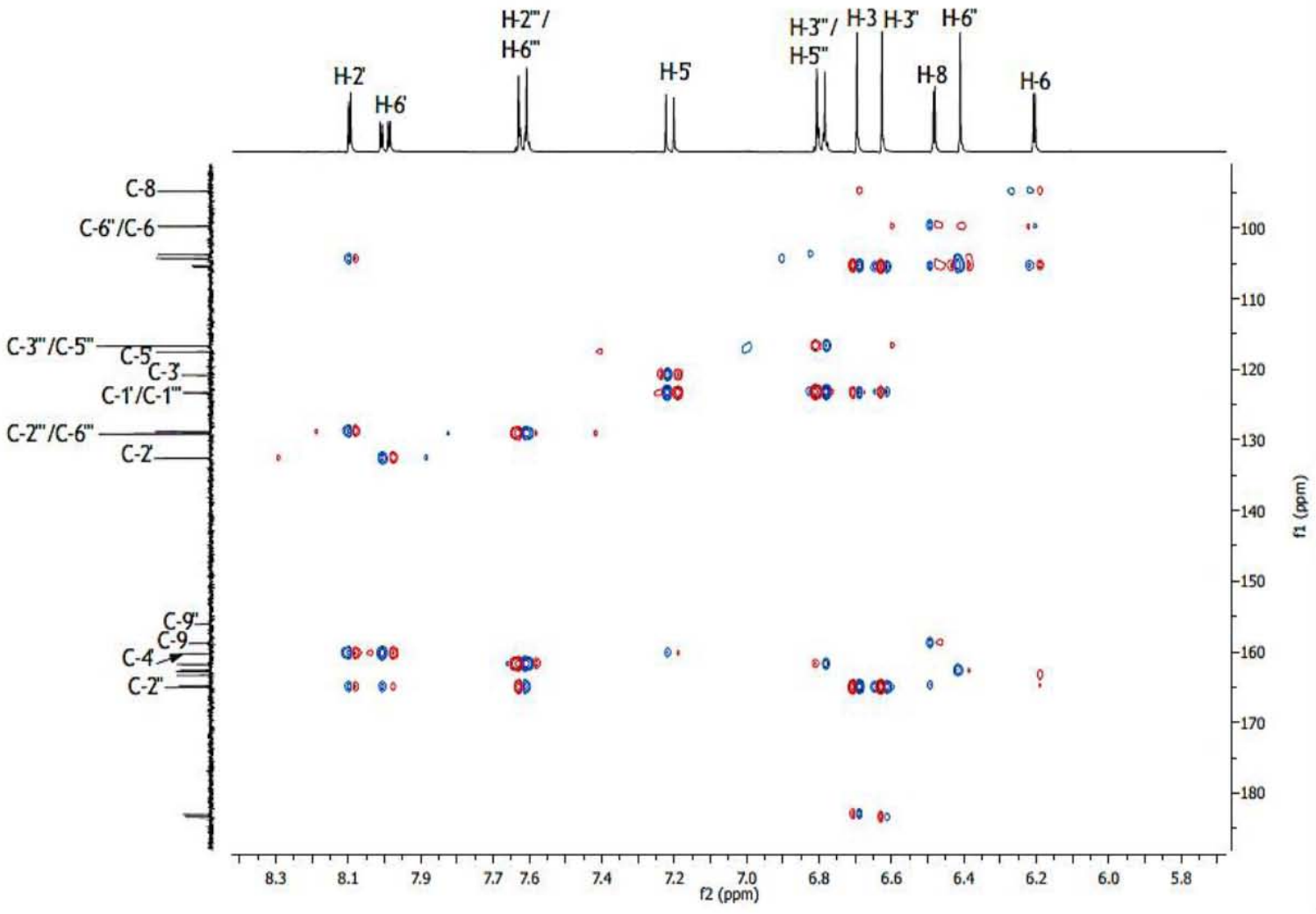




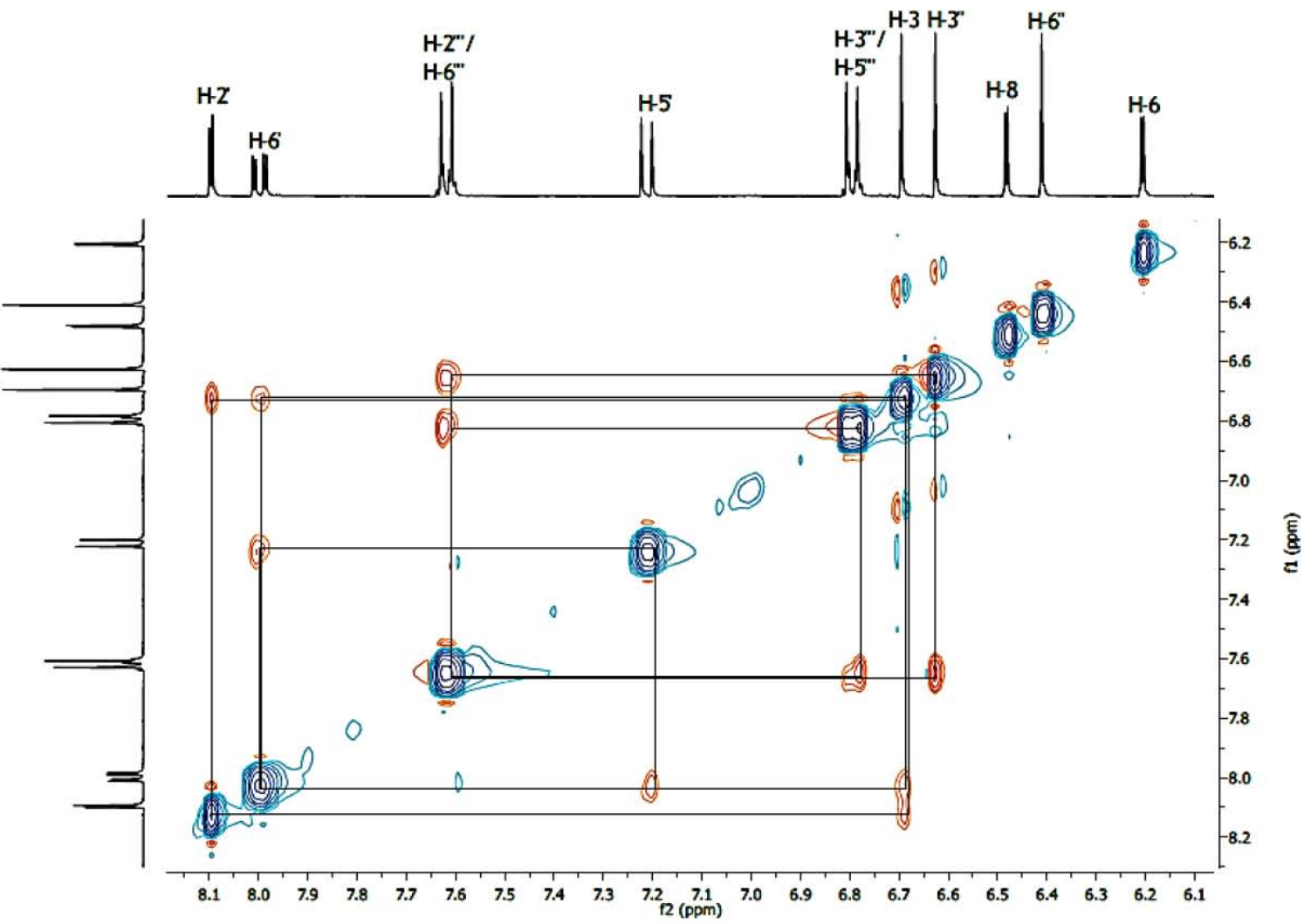
Anexo 9. RMN modalidad COSY de amentoflavona (2) (400 MHz, acetona-*d*₆)



Anexo 10. RMN modalidad HSQC de amentoflavona (2) (400 MHz, acetona-*d*₆)

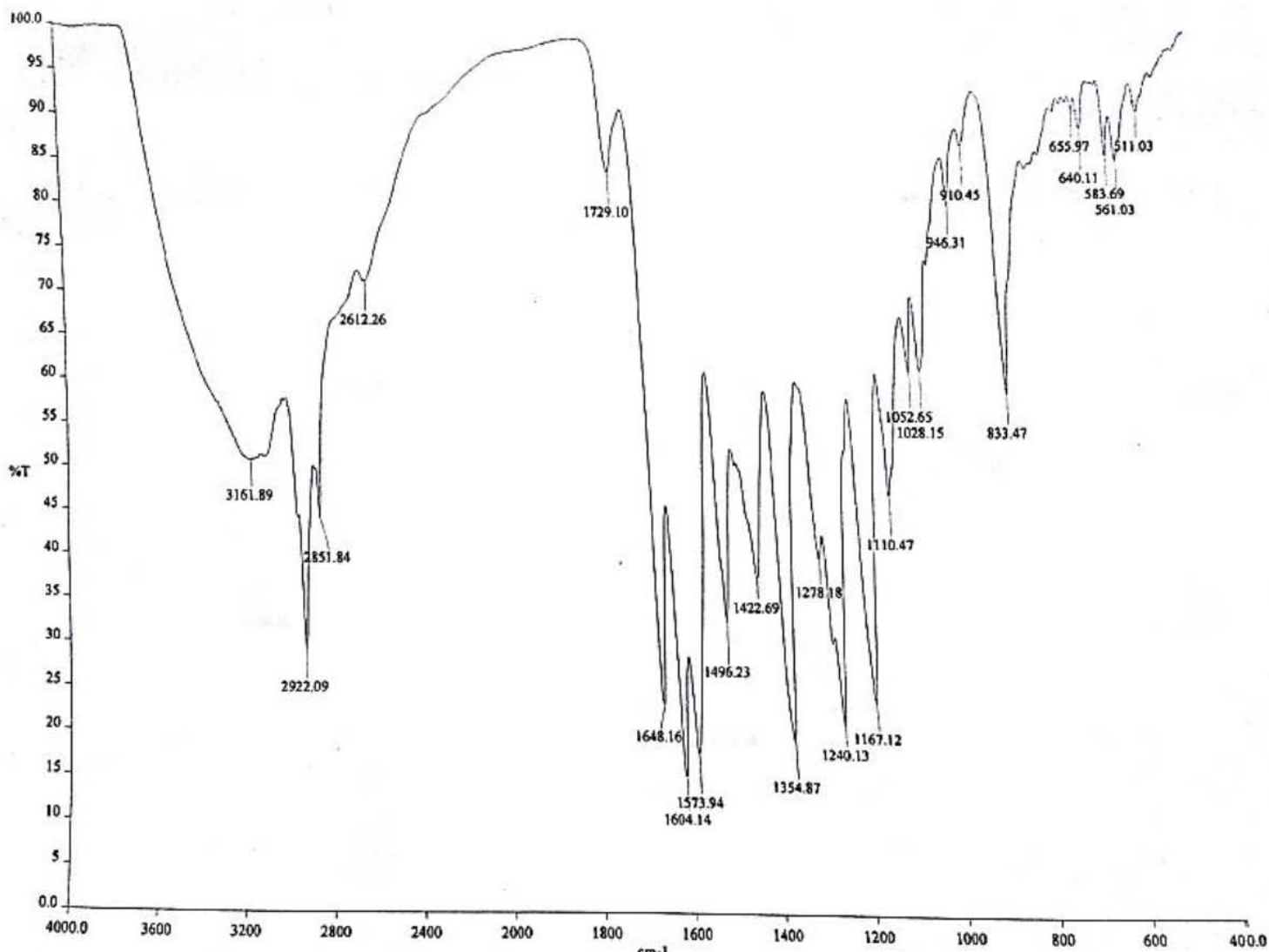


Anexo 11. RMN modalidad HMBC de amentoflavona (2) (400 MHz, acetona-*d*₆)

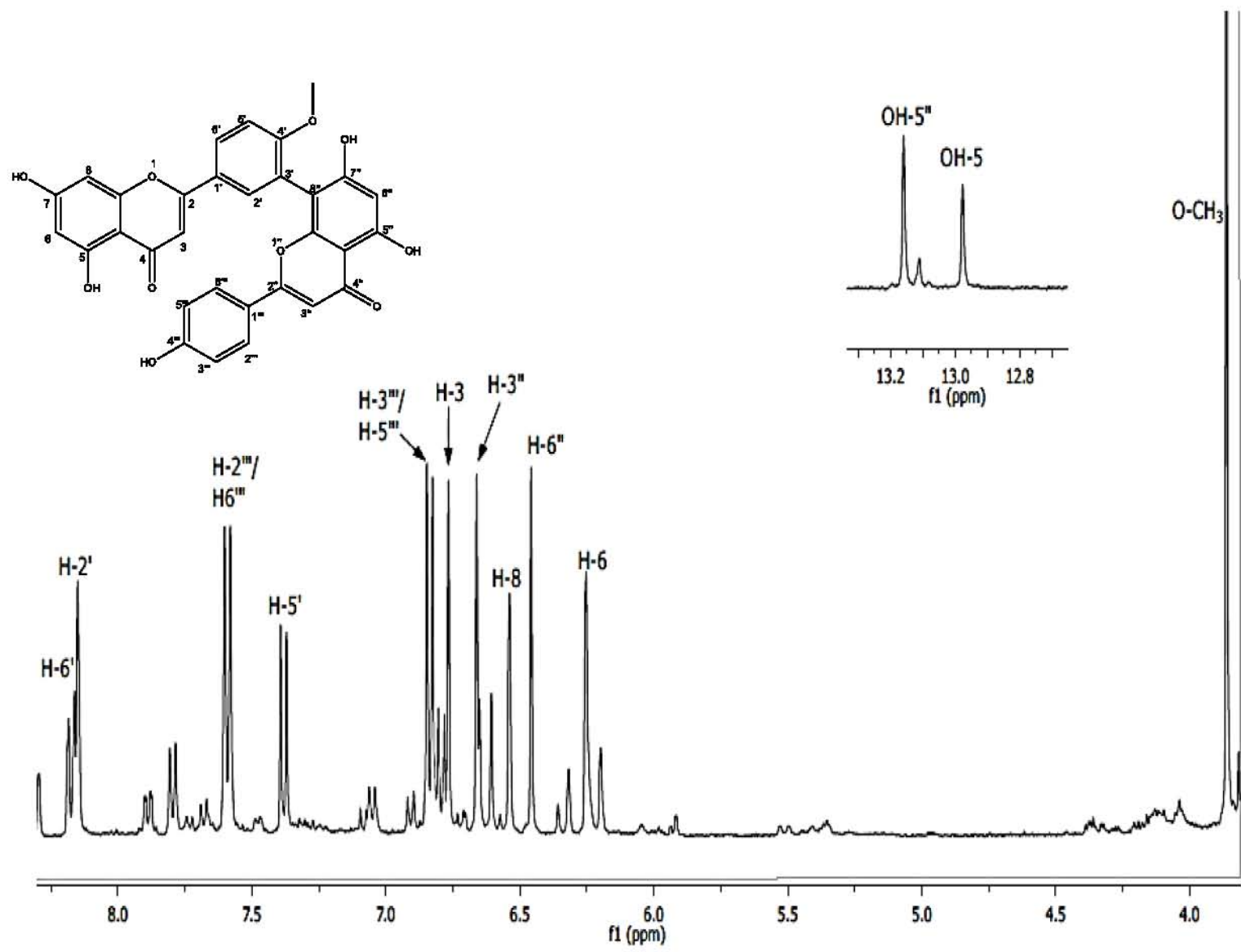


Anexo 12. RMN modalidad NOESY de amentoflavona (2) (400 MHz, acetona-*d*₆)

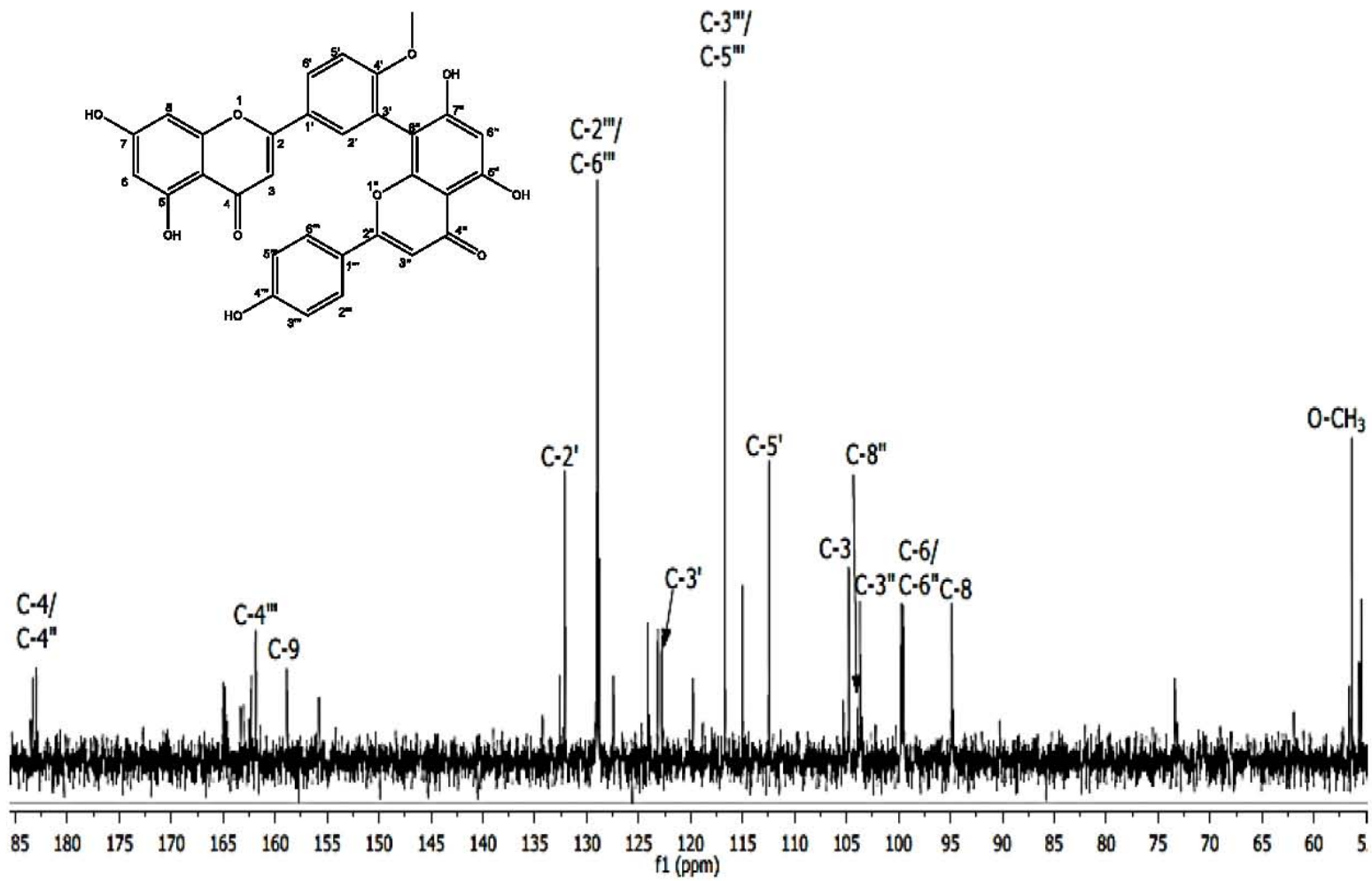
Anexo 13. IR (ATR) de bilobetina (3)

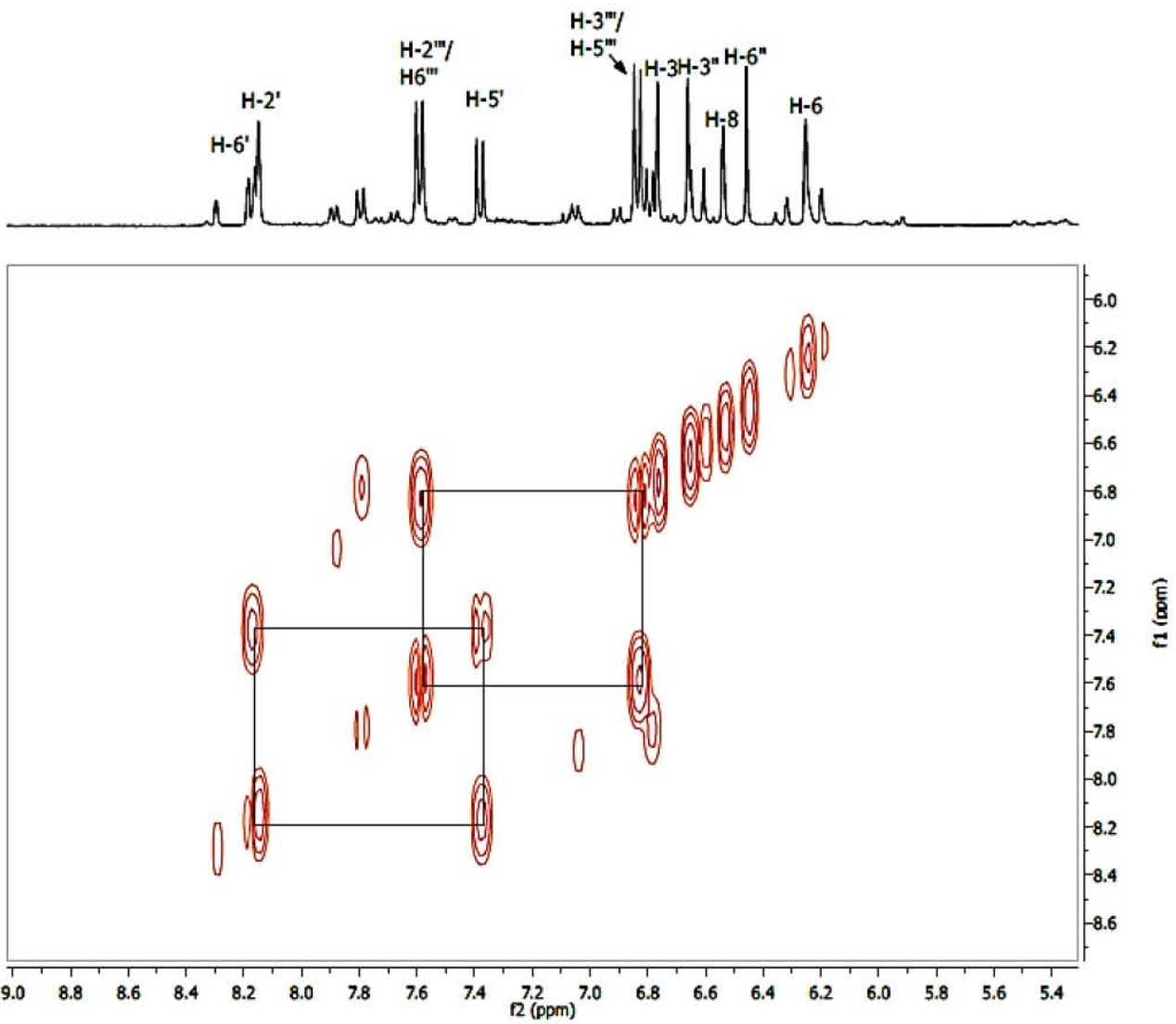


Anexo 14. RMN-¹H de bilobetina (3) (400 MHz, acetona-d₆)

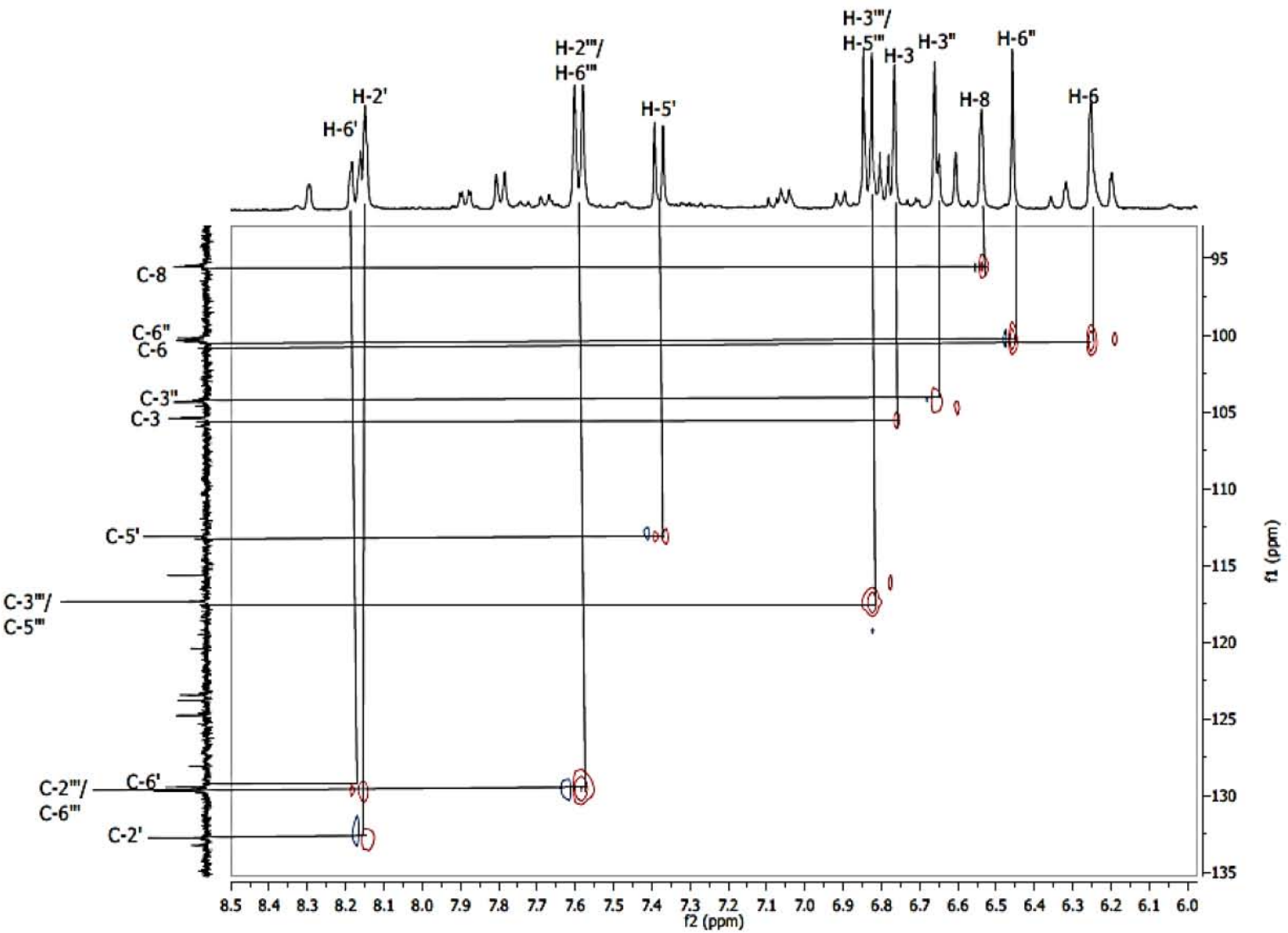


Anexo 15. RMN-¹³C de bilobetina (3) (100 MHz, acetona-d₆)

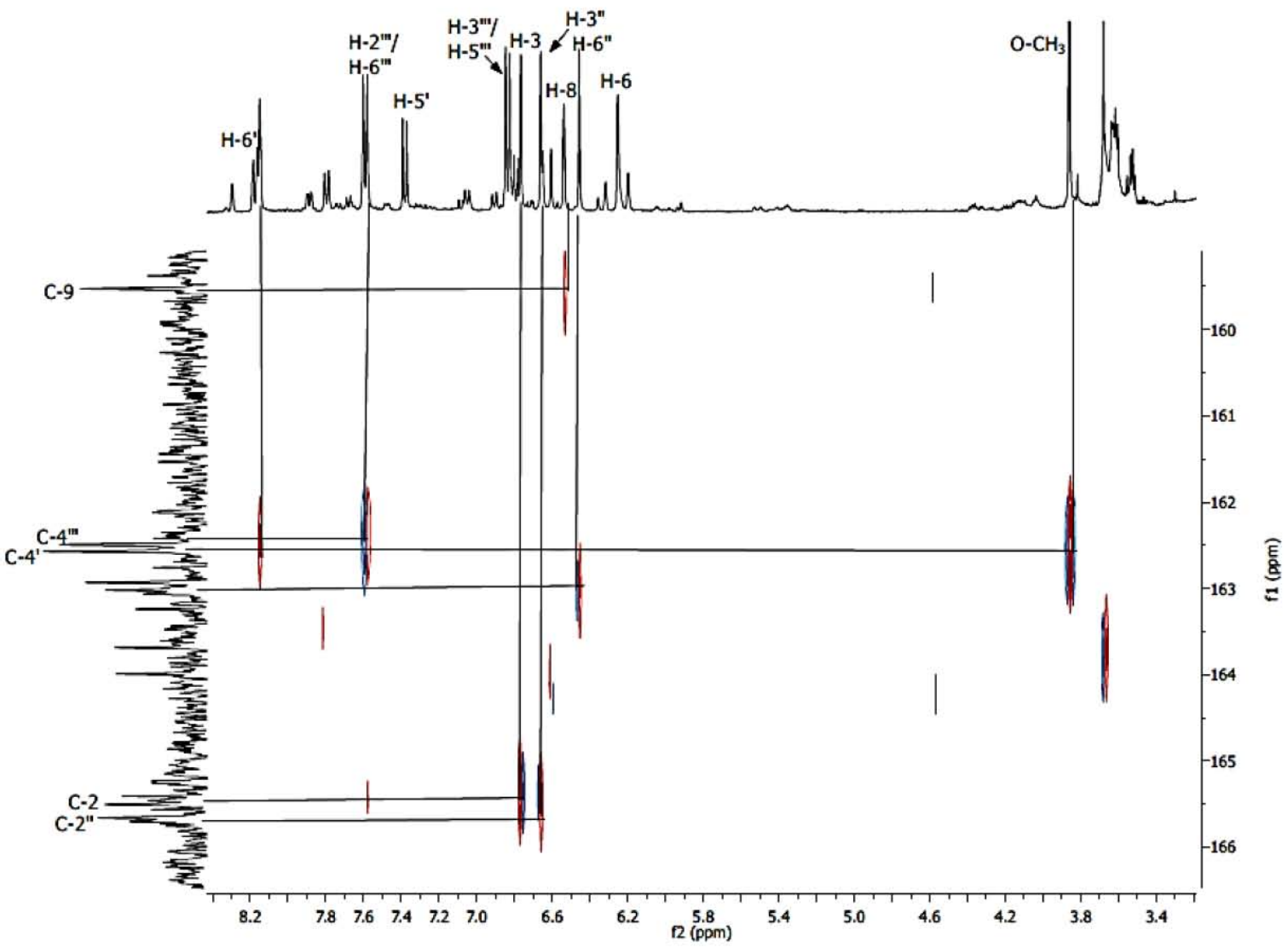




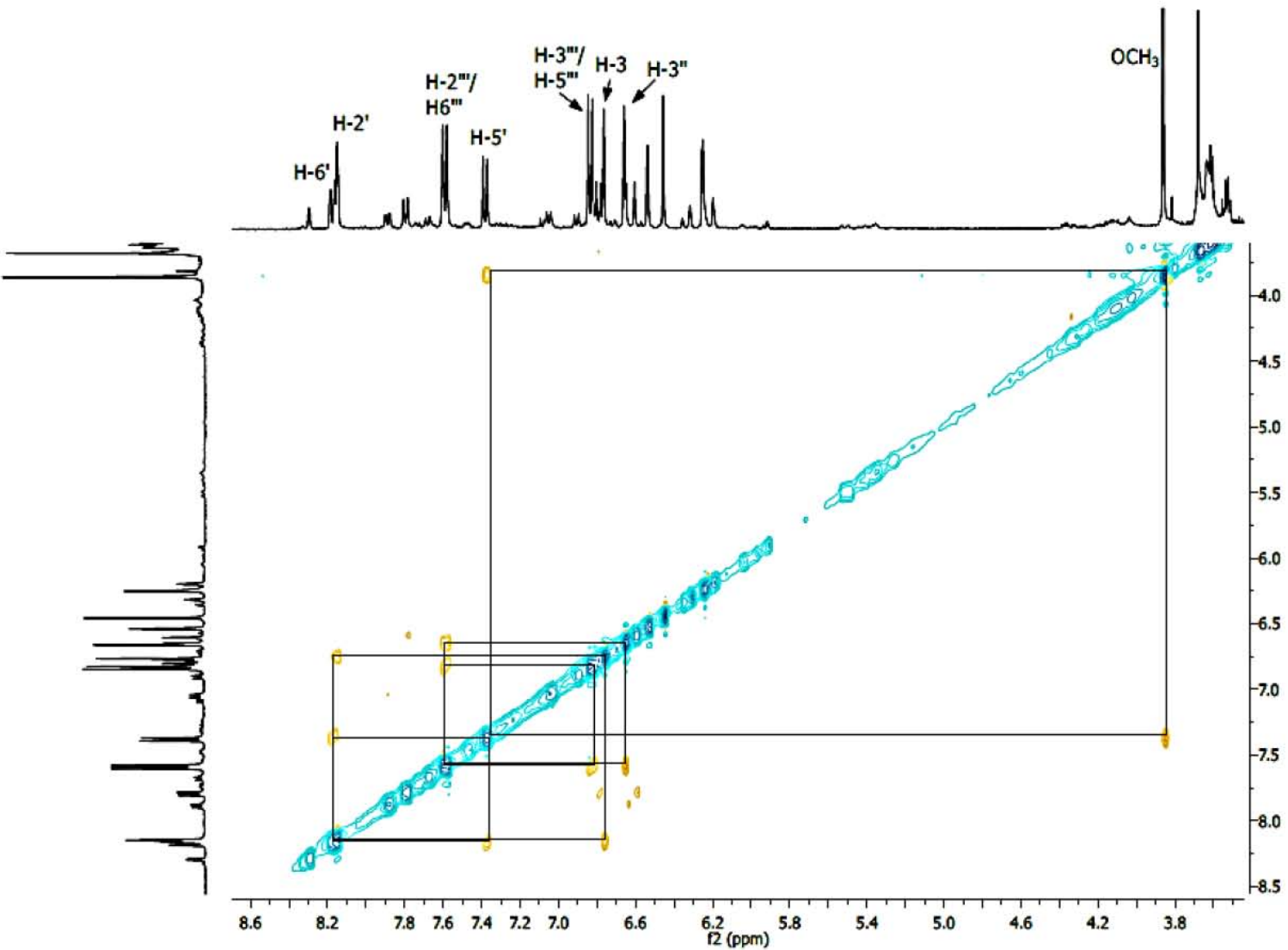
Anexo 16. RMN modalidad COSY de bilobetina (**3**) (400 MHz, acetona- d_6)



Anexo 17. RMN modalidad HSQC de bilobetina (**3**) (400 MHz, acetona-*d*₆)

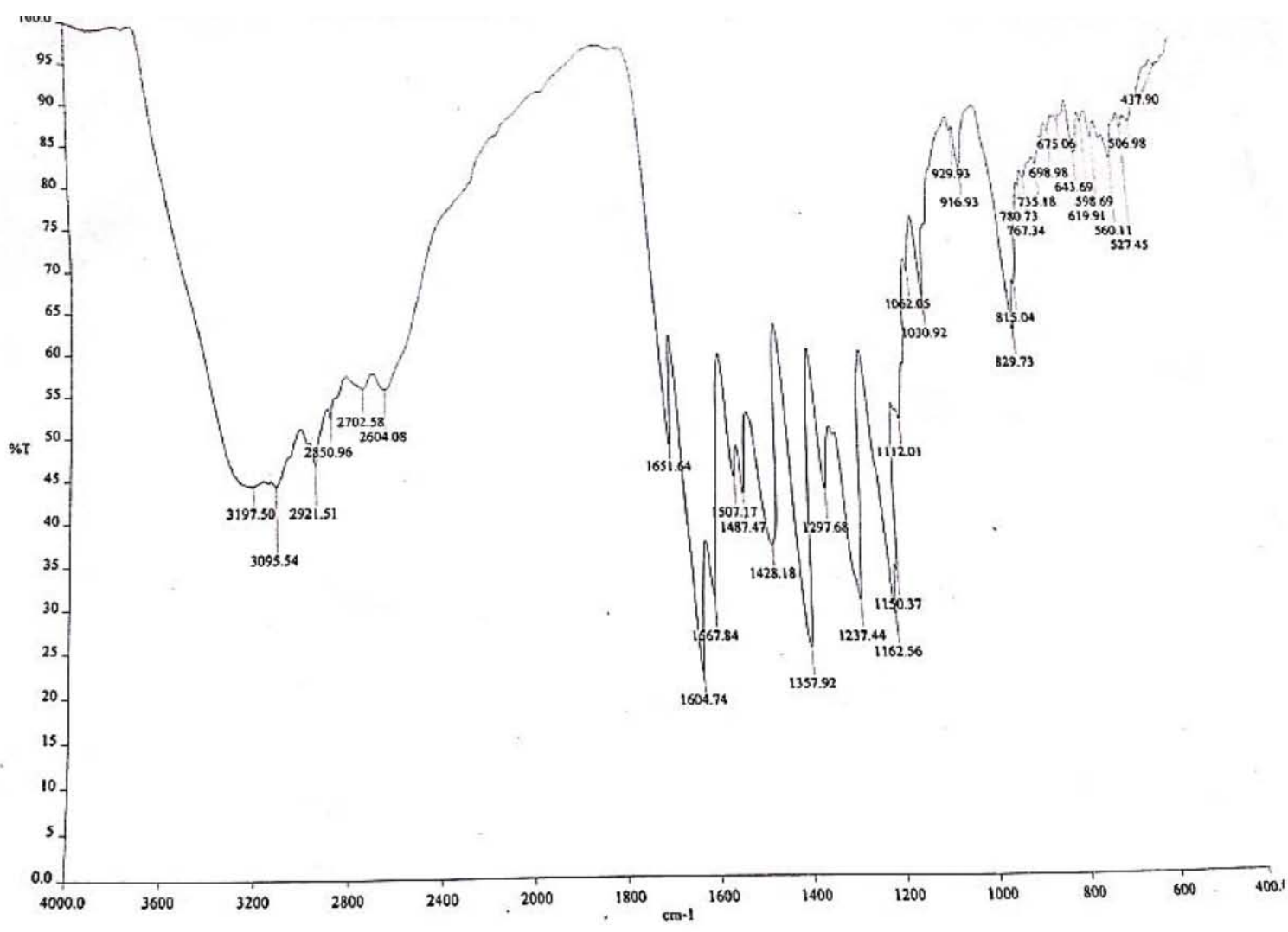


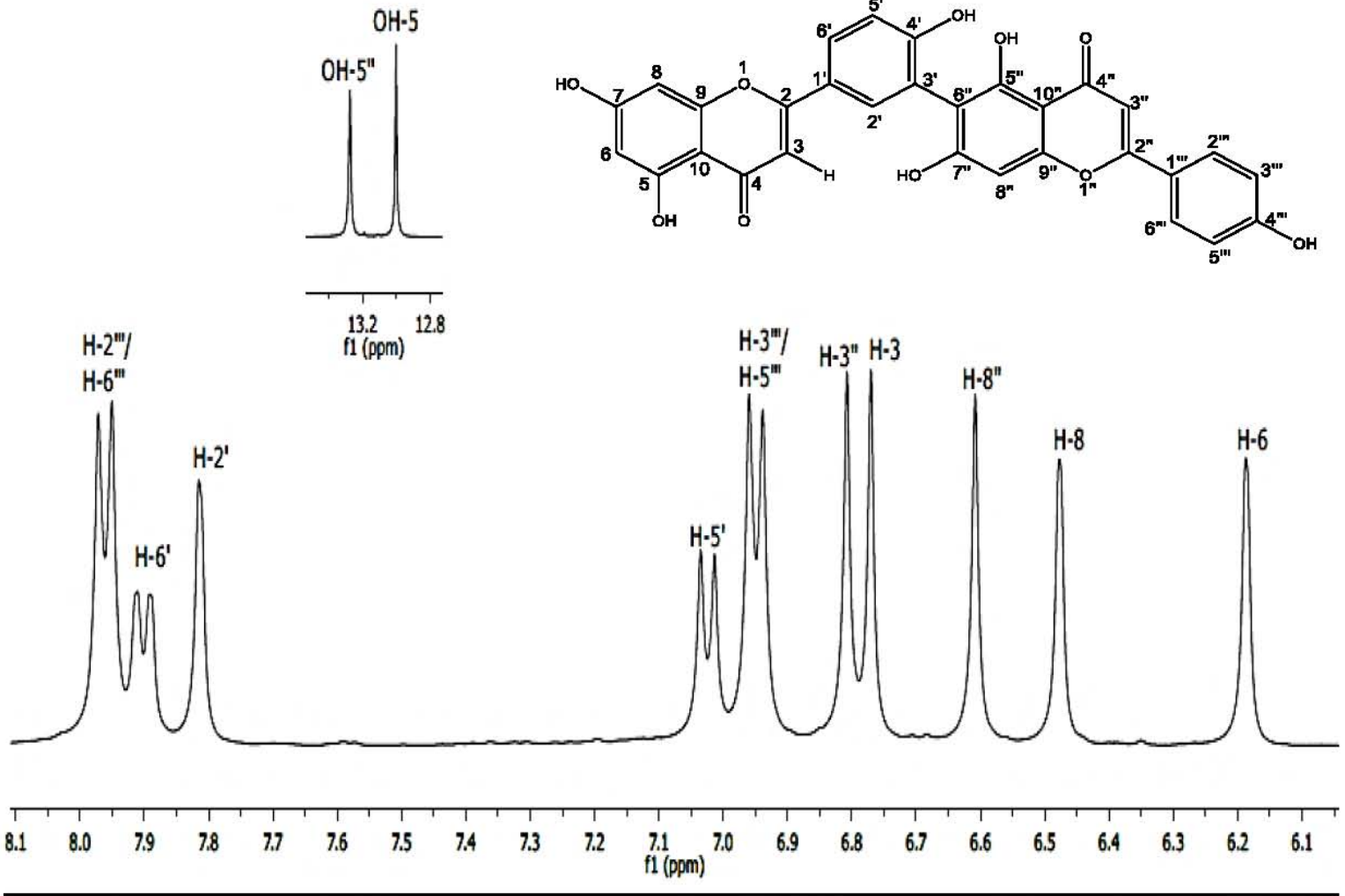
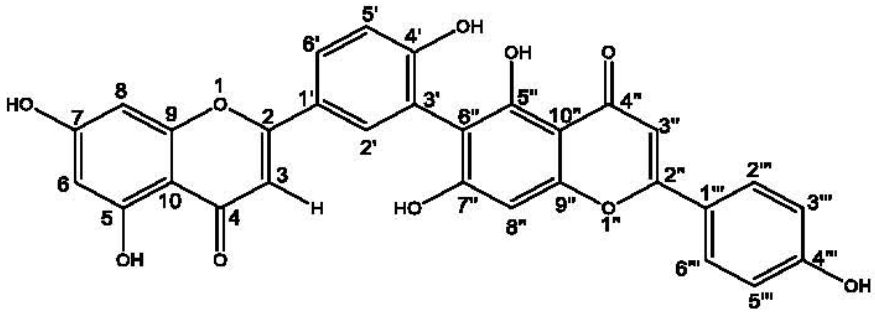
Anexo 18. RMN modalidad HMBC de bilobeina (3) (400 MHz, acetona-*d*₆)



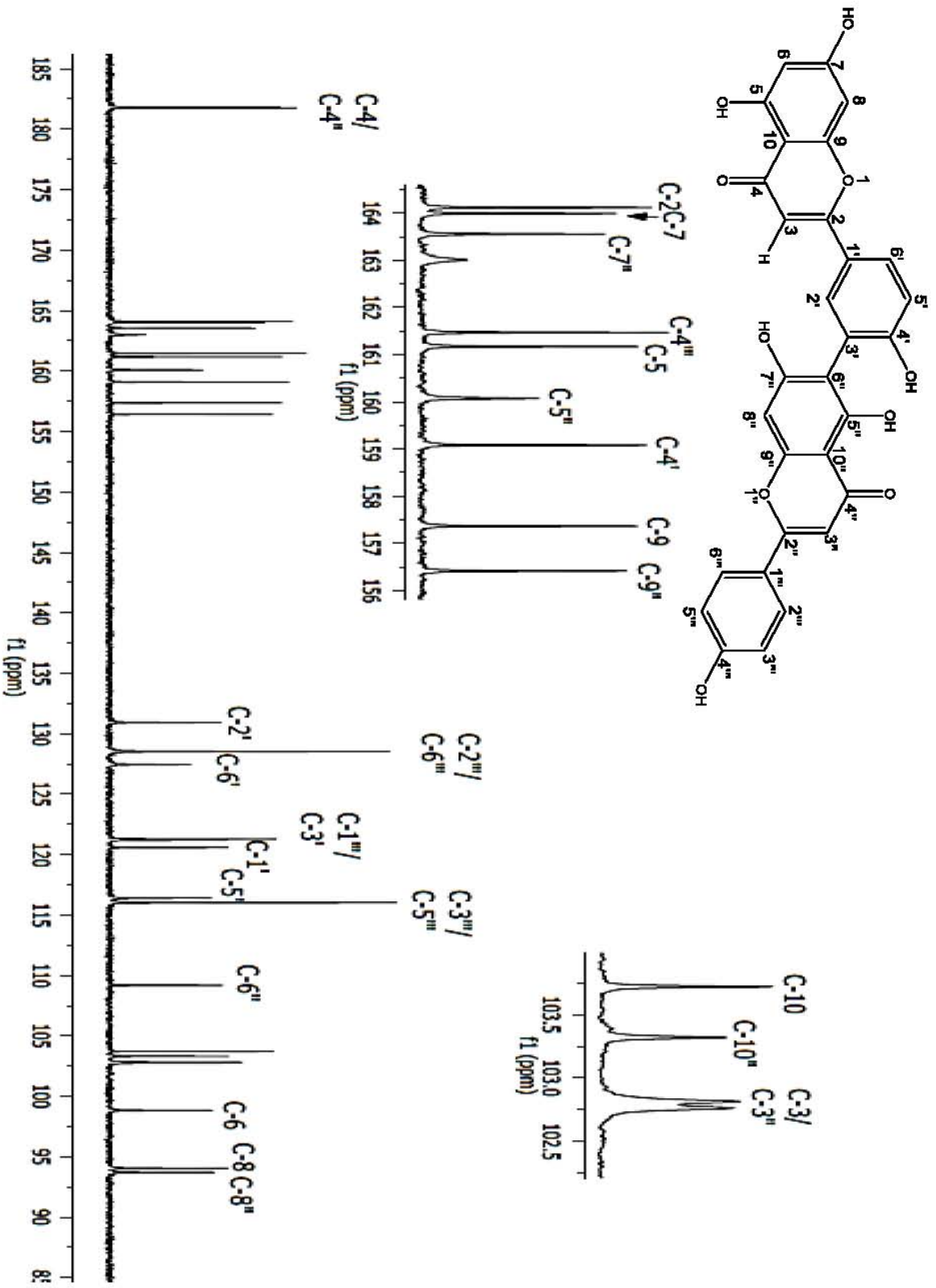
Anexo 19. RMN modalidad NOESY bilobetina (3) (400 MHz, acetona-*d*₆)

Anexo 20. IR (ATR) de robustaflavona (4)

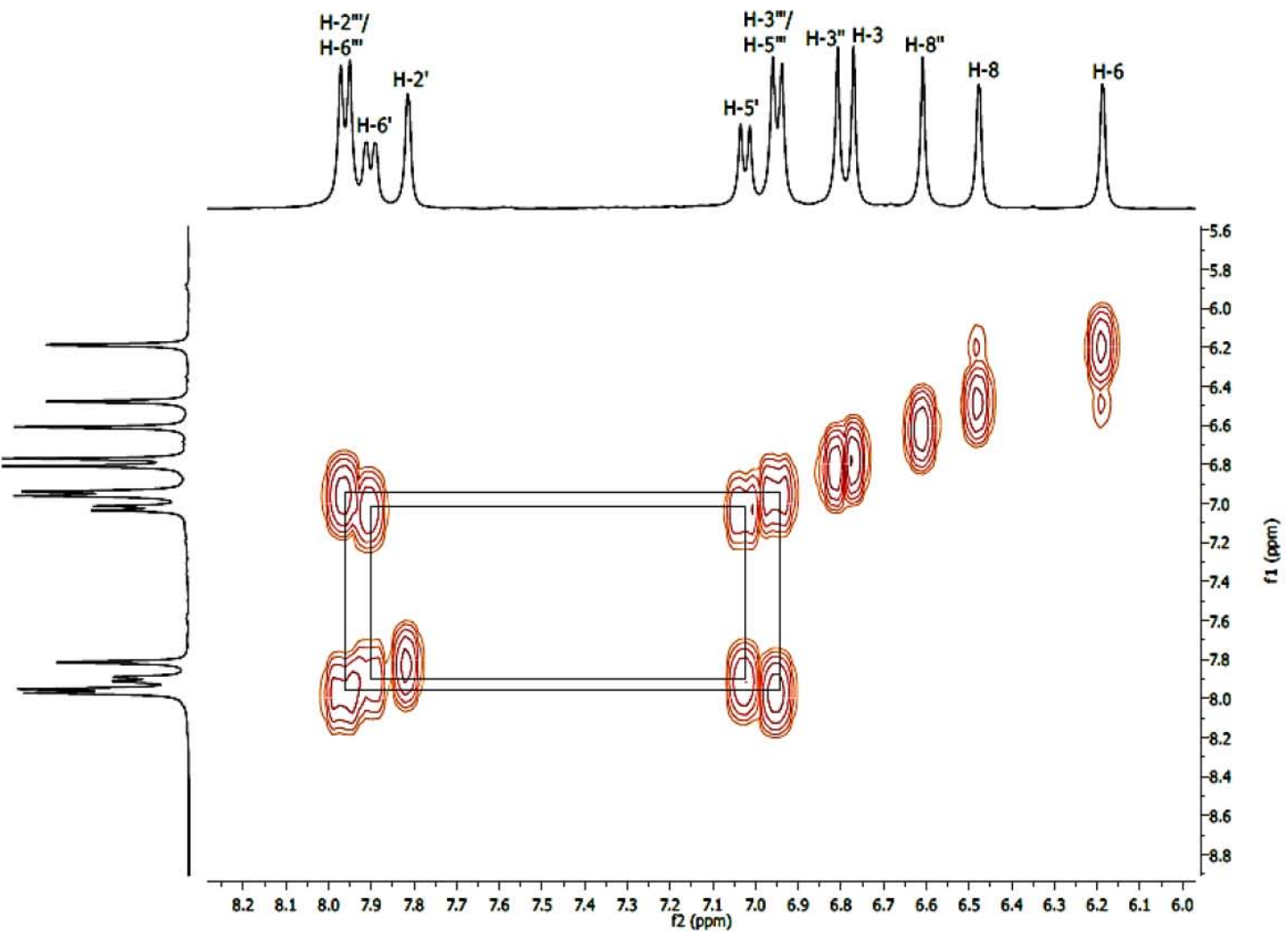




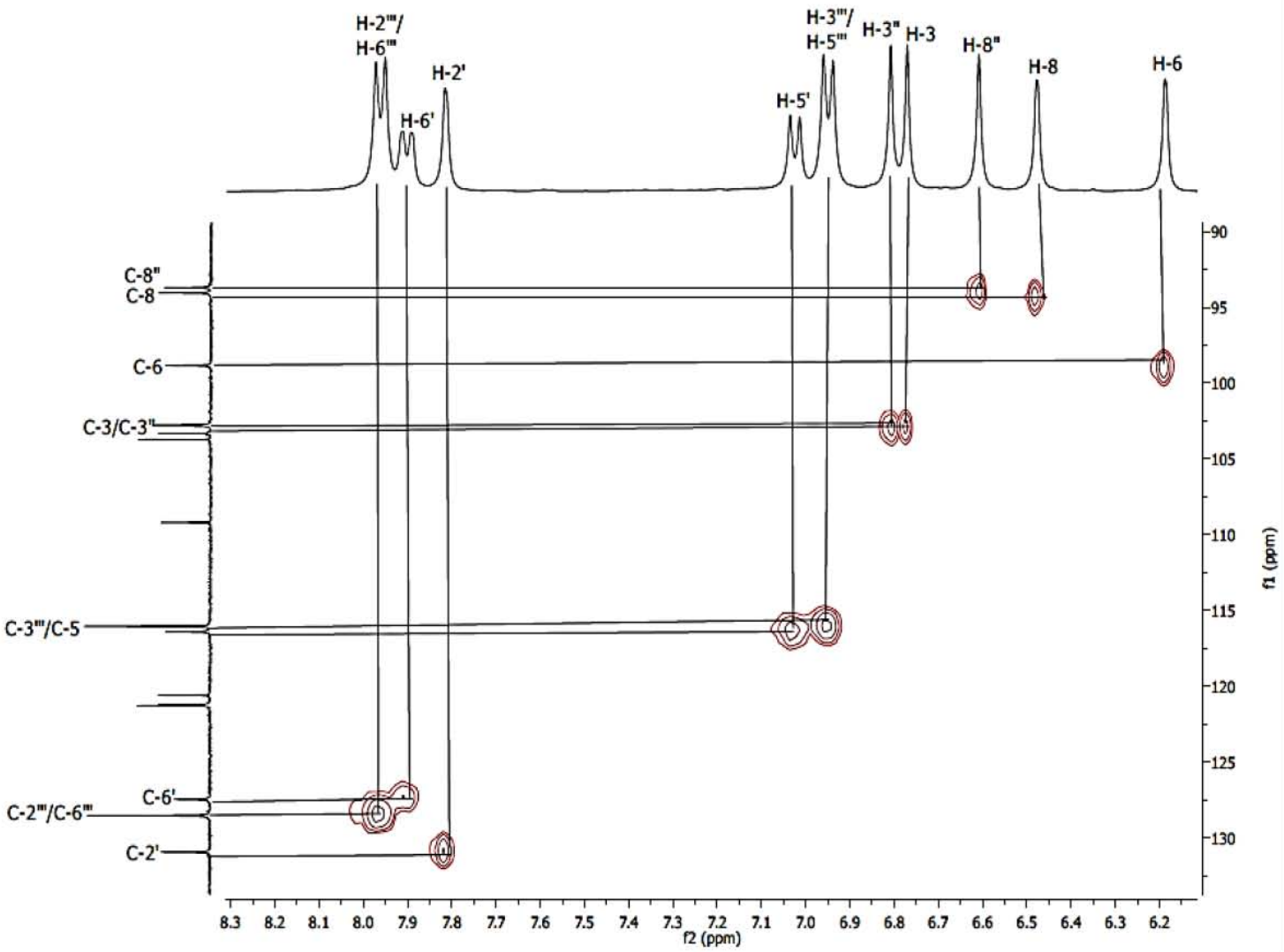
Anexo 21. RMN-¹H de robustaflovanona (4) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



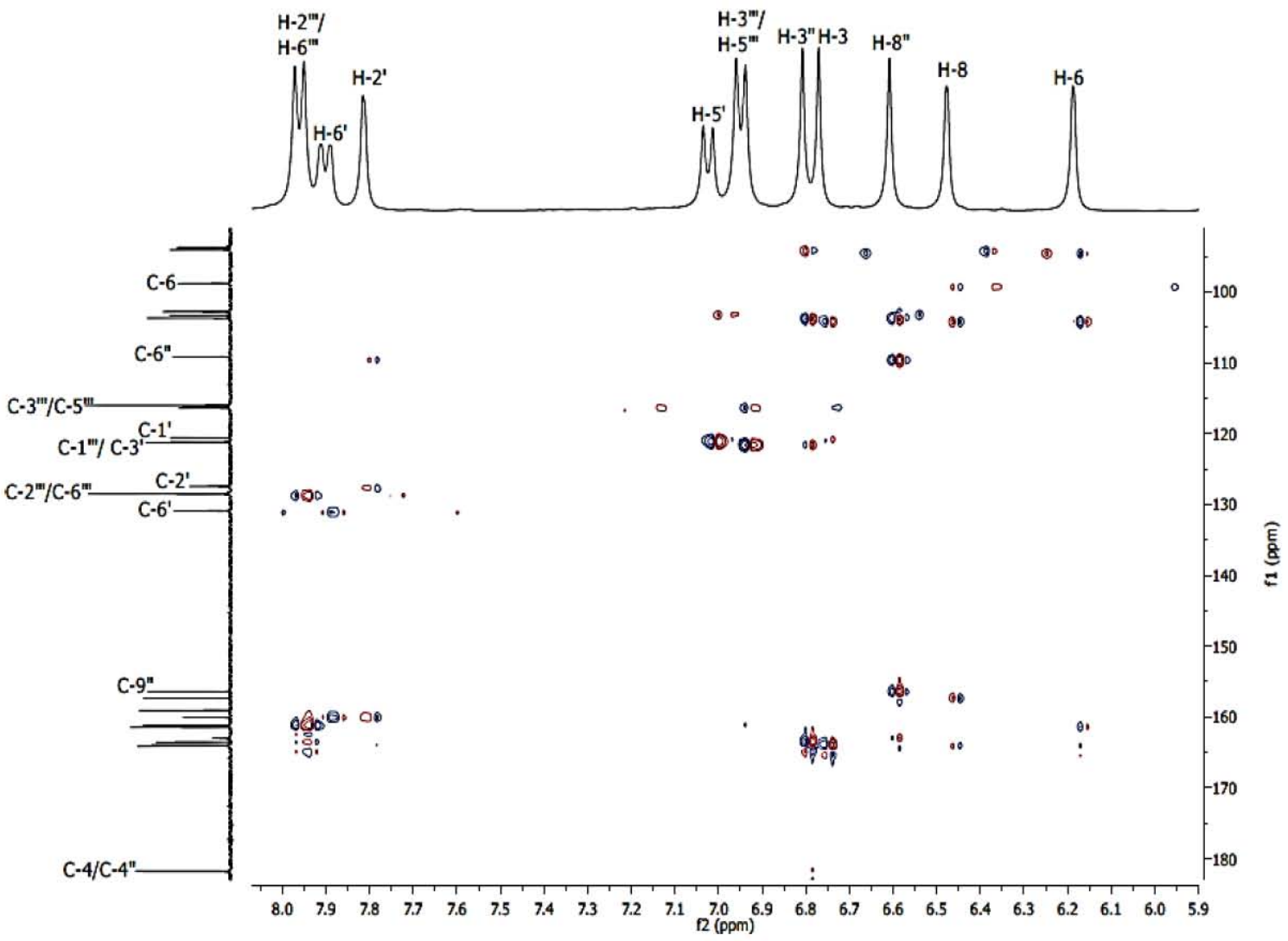
Anexo 22. RMN-¹³C de robustaflavona (4) (100 MHz, DMSO-d₆)



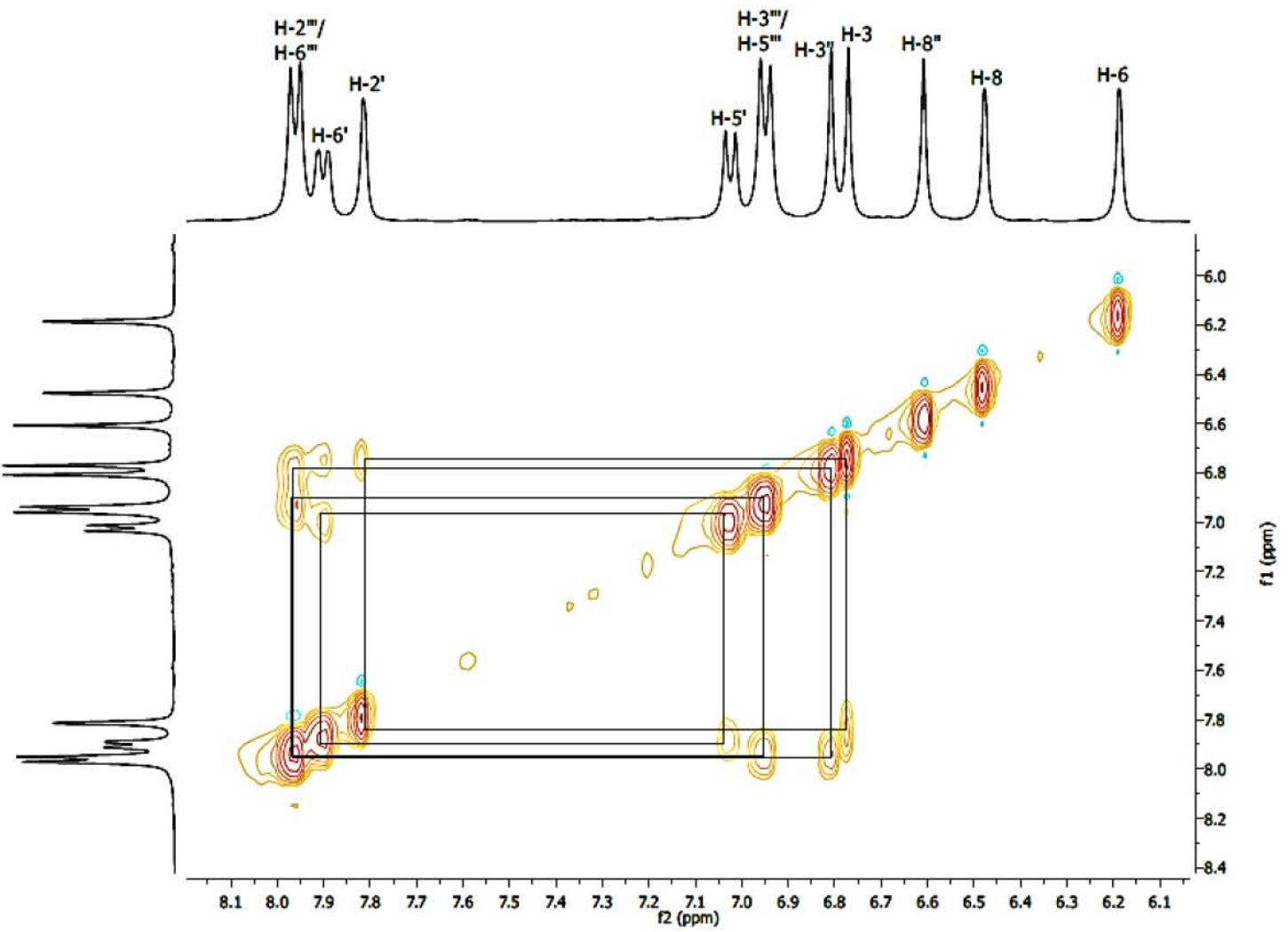
Anexo 23. RMN modalidad COSY de robustaflavona (4) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



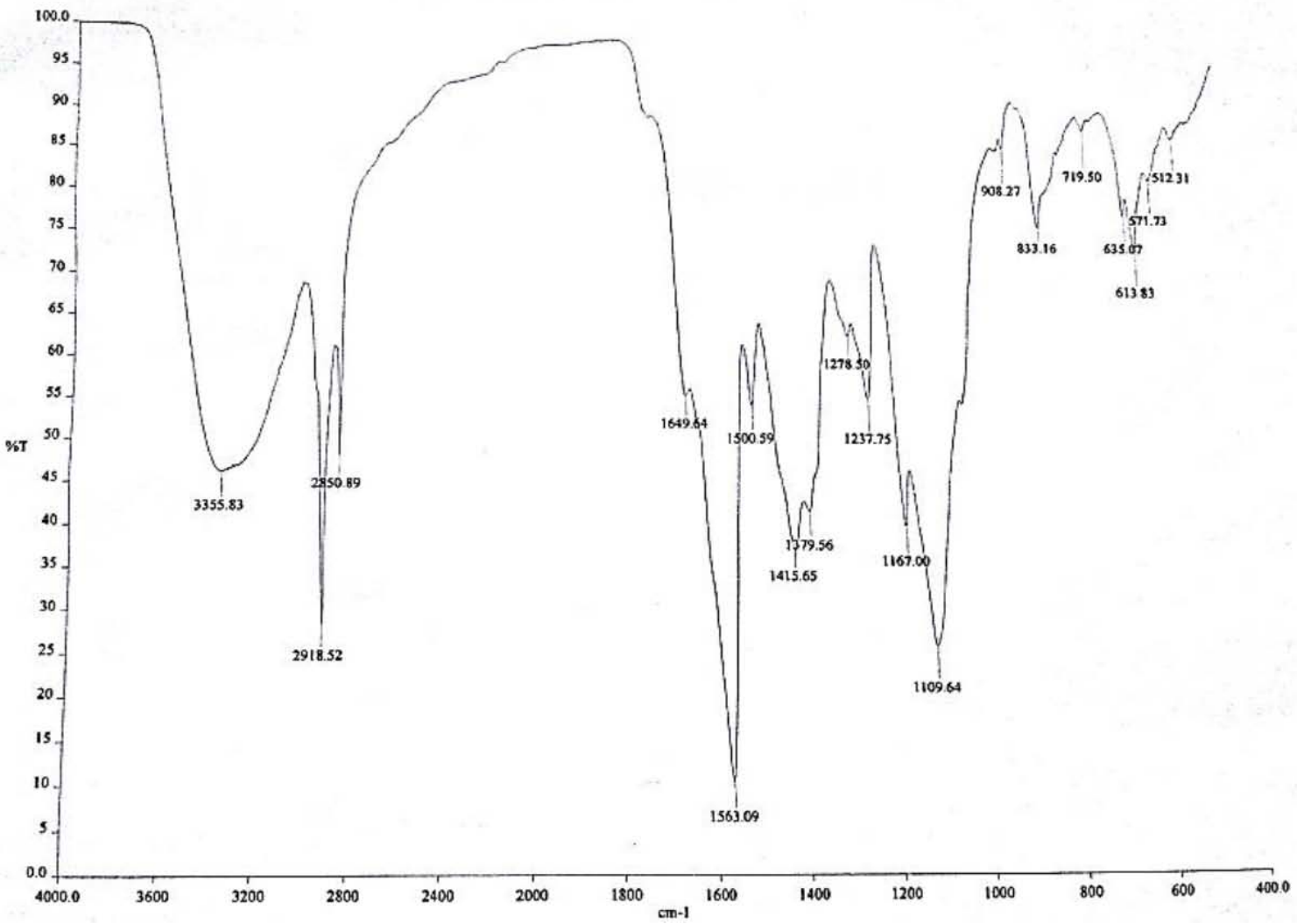
Anexo 24. RMN modalidad HSQC de robustaflavona (4) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



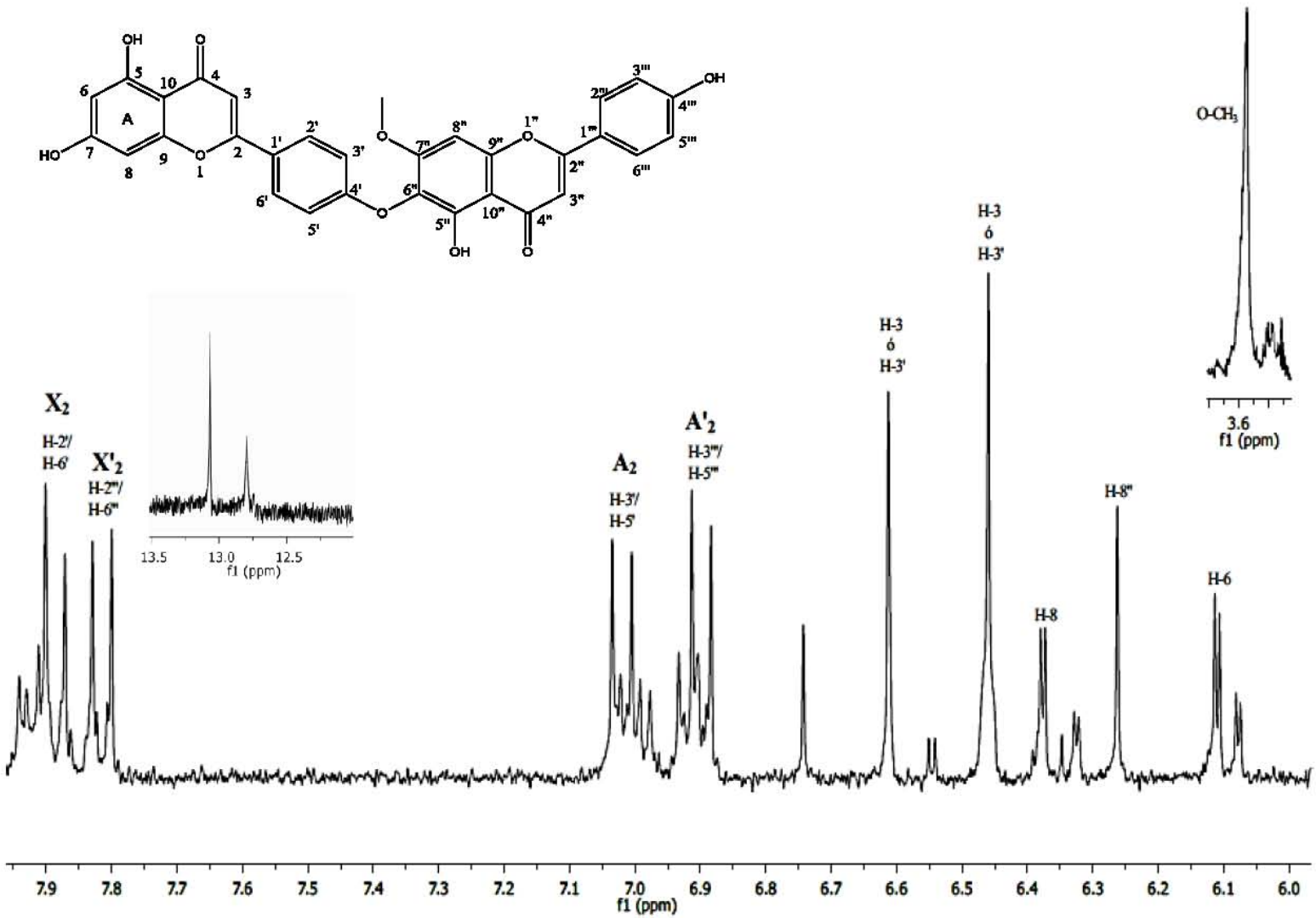
Anexo 25. RMN modalidad HMBC de robustaflavona (4) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



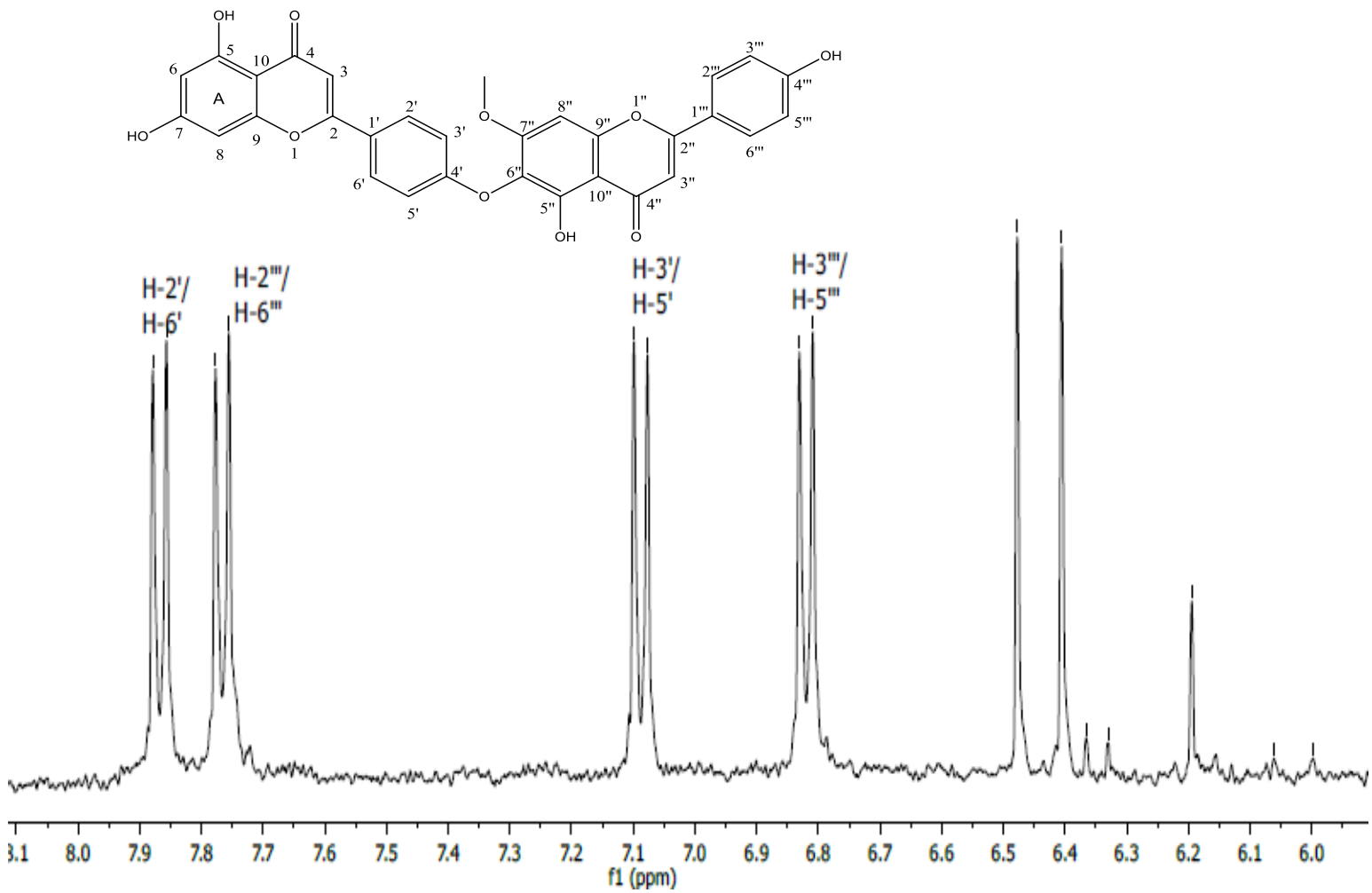
Anexo 26. RMN modalidad NOESY de robustaflavona (4) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



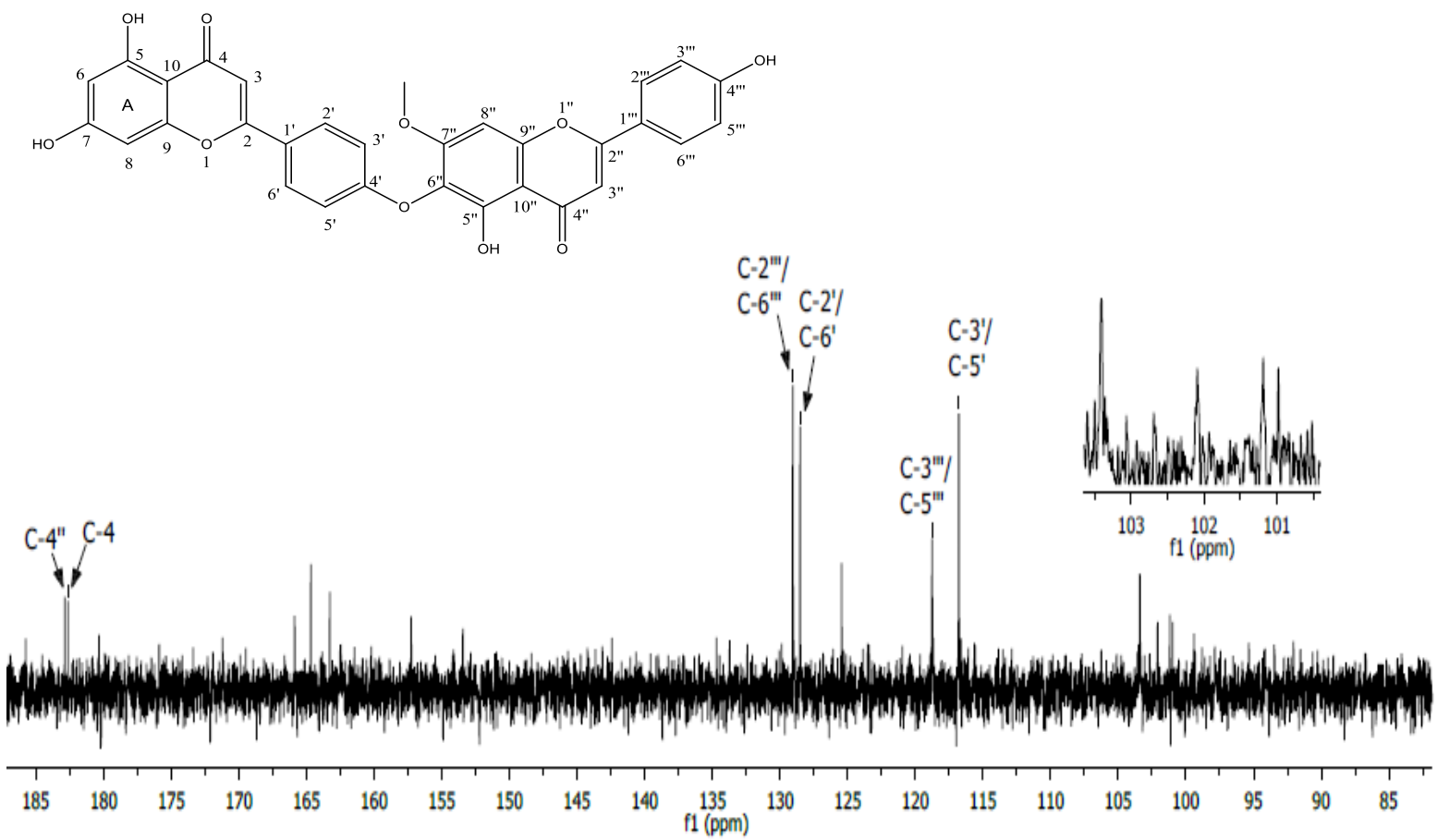
Anexo 27. IR (ATR) de isocriptomerina (5)



Anexo 28. RMN-¹H de iscriptomerina (5) (400 MHz, DMSO-*d*₆)



Anexo 29. RMN-¹H de isocriptomerina (5) (400 MHz, CD₃OD)



Anexo 30. RMN- ^{13}C de isocriptomerina (5) (100 MHz, CD_3OD)