



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**ACTIVIDAD DIURÉTICA DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE *Selaginella wrightii* y  
*S. nothohybrida***

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. WENDY VIRIDIANA BENÍTEZ ALONSO



TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez
Vocal	Dr. Fernando Calzada Bermejo
Secretario	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

## LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA TESIS

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

La evaluación farmacológica de diuresis se realizaron en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades-CORCE 2° piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

## ESTE TRABAJO SE PRESENTÓ EN EL SIGUIENTE EVENTO:

- ❖ Wendy V. Benítez, Arturo Colín, Fernando Calzada, María I. Aguilar. Evaluación de la actividad diurética en la especie medicinal *Selaginella nothohybrida* (*Selaginellaceae*). 10ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (10ª. RIIPN). Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A.C. (AMIPRONAT). Mérida, Yucatán del 21 al 24 de mayo de 2014.
- ❖ Wendy V. Benítez, Arturo Colín, Fernando Calzada, María I. Aguilar. Evaluación de la actividad diurética en la especie medicinal *Selaginella nothohybrida* (*Selaginellaceae*). Semana de la investigación en la FQ 2014. Facultad de Química de la UNAM del 9 al 12 de septiembre de 2014.



## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.
- ✓ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.
- ✓ A mi tutora, la Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, dedicación, enseñanza y valiosos consejos en esta etapa de formación profesional.
- ✓ Al Dr. Fernando Calzada Bermejo por permitirme realizar parte del trabajo experimental en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del IMSS, por sus consejos y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.
- ✓ A mis sinodales: Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dra. Rachel Mata Essayag, M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, Dr. Fernando Calzada Bermejo, Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas por sus valiosos comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.
- ✓ A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, Proyecto IN217914.
- ✓ Al personal académico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI): Q. Margarita Guzmán Villanueva, Q. Georgina Duarte Lisci, QFB Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta, M. en C. Rosa Isela del Villar, Q. Araceli Tovar por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- ✓ A la Dra. María Isabel Chávez Uribe por la asesoría en la parte espectroscópica.



## DEDICATORIAS

A todas las personas que hicieron posible la realización de esta meta profesional.

*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad  
y la energía atómica: la voluntad"*

*Albert Einstein*



## ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE ESQUEMAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Género <i>Selaginella</i>	3
1.1.1 Características botánicas	3
1.2 <i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino (Selaginellaceae)	3
1.2.1 Nombres comunes	3
1.2.2 Clasificación taxonómica	4
1.2.3 Características botánicas de <i>Selaginella nothohybrida</i>	4
1.2.4 Distribución y Hábitat	6
1.2.5 Usos medicinales tradicionales	7
1.2.6 Antecedentes químicos	7
1.2.6.1 Flavonoides	7
1.3 Plantas medicinales con acción diurética	10
1.3.1 Indicaciones	10
1.4 Enfermedad renal crónica en México	11
1.4.1 Factores de riesgo	12
1.5 Formación y eliminación de orina	13
1.5.1 La nefrona	14
1.5.2 Filtración glomerular	16
1.5.2.1 Características del filtrado glomerular	16
1.5.3 Reabsorción tubular	17
1.5.4 Excreción de la orina	17
1.6 Diuresis	17
1.6.1 Diuresis acuosa	18



1.6.2 Diuresis osmótica	18
1.7 Diuréticos	18
1.7.1 Clasificación de los diuréticos	19
1.7.1.1 Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (diuréticos de asa)	19
1.7.1.2 Mecanismos de acción	20
1.7.1.3 Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ (diuréticos tiazídicos)	20
1.7.1.4 Sitio y mecanismo de acción	21
1.7.1.5 Inhibidores de los canales de $\text{Na}^+$ del epitelio renal (diuréticos ahorradores de $\text{K}^+$ )	21
1.7.1.6 Sitio y mecanismo de acción	22
1.7.1.7 Antagonistas de los receptores de mineralocorticoides (diuréticos ahorradores de $\text{K}^+$ )	22
1.7.1.8 Diuréticos osmóticos	23
1.7.1.9 Sitio y mecanismo de acción	24
1.7.1.10 Inhibidores de la anhidrasa carbónica	24
1.7.1.11 Sitio y mecanismo de acción	25
1.8 Inhibidores de la función renal	25
1.9 Espectroscopía de absorción atómica en flama	27
1.9.1 Descripción de la técnica de EAA	27
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	31
5. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1 Material y equipo	32
5.1.1 Material biológico	32
5.1.2 Instrumental de laboratorio	32
5.1.3 Disolventes y reactivos	32
5.2 Procedimientos generales	33



5.3 Metodología experimental para la extracción, aislamiento y purificación de amentoflavona (1) a partir de <i>Selaginella wrightii</i>	34
5.3.1 Material vegetal	34
5.3.2 Preparación del extracto total de <i>S. wrightii</i>	34
5.3.3 Fraccionamiento del extracto total de <i>S. wrightii</i>	35
5.3.4 Aislamiento y purificación de amentoflavona (1)	35
5.4 Metodología experimental para la extracción, aislamiento y purificación de robustaflavona (2) a partir de <i>Selaginella nothohybrida</i>	37
5.4.1 Material vegetal	37
5.4.2 Obtención de extracto total de <i>S. nothohybrida</i>	37
5.4.3 Fraccionamiento del extracto total de <i>S. nothohybrida</i>	38
5.4.4 Aislamiento y purificación de robustaflavona (2)	39
5.5 Preparación del extracto acuoso de <i>S. nothohybrida</i>	39
5.6 (S)-2,3-dihidrorobustaflavona y trehalosa	39
5.7 Ensayo biológico	40
5.7.1 Animales de laboratorio	40
5.7.2 Preparación de la muestra	40
5.7.3 Prueba de diuresis	41
5.8 Evaluación en presencia de inhibidores de COX's para determinar el mecanismo de acción de los compuestos evaluados	41
5.8.1 Acción diurética	42
5.8.2 Actividad diurética	42
5.9 Cuantificación de electrolitos	42
5.9.1 Digestión de las muestras	42
5.9.2 Preparación de muestras para el análisis en EAA	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1 Aislamiento de amentoflavona a partir de la especie <i>Selaginella wrightii</i>	44
6.1.1 Determinación de la estructura de amentoflavona (1)	44
6.2 Aislamiento de robustaflavona a partir de la especie <i>Selaginella nothohybrida</i>	46



6.2.1 Determinación de la estructura de robustaflavona (2)	47
6.3 Evaluación farmacológica de diuresis inducida por los compuestos (1-4) y el extracto en modelo de ratón	49
6.3.1 Efectos en la excreción urinaria	49
6.3.2 Efecto de la excreción de electrolitos en la orina	51
6.3.3 Características físicas de la orina excretada a las 4 h de la administración oral de los compuestos 1-4 y el extracto	53
6.3.4 Análisis estadístico	54
6.3.4.1 Análisis de varianza para los volúmenes promedio finales inducido por todos los tratamientos	54
6.3.4.2 Análisis de comparación múltiple Dunnett	55
6.3.4.3 Análisis de comparación múltiple de Tukey	56
6.4 Estudio en presencia de inhibidores de COX's que involucra a las prostaglandinas en la acción diurética	57
6.4.1 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por furosemida en presencia de inhibidores de COX's	59
6.4.2 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por amentoflavona (1) en presencia de inhibidores de COX's	60
6.4.3 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por robustaflavona (2) en presencia de inhibidores de COX's	62
6.4.4 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por trehalosa (4) en presencia de inhibidores de COX's	63
6.4.5 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por el extracto acuoso de <i>S. nothohybrida</i> en presencia de inhibidores de COX's	65
7. CONCLUSIONES	67
8. REFERENCIAS	69
9. ANEXOS	76



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$\delta$	Desplazamiento químico
AAS	Ácido acetilsalicílico
HAD	Hormona antidiurética
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ANOVA	Análisis de varianza
OMS	Organización Mundial de la Salud
C	Celecoxib
C <sub>H2O</sub>	Producción positiva de agua libre
COX	Ciclooxigenasa
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
DMSO	Dimetilsufóxido
EAA	Espectroscopia de absorción atómica
H <sub>a</sub>	Hipótesis alternativa
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear de múltiples enlaces.
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HSQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple.
I	Indometacina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social



<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NOESY</b>	Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser
<b>NS</b>	Naproxeno sódico
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PGG<sub>2</sub></b>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>ppmh</b>	Pacientes por millón de habitantes
<b>R.A.</b>	Reactivo analítico
<b>RAA</b>	Renina Angiotensina Aldosterona
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SC</b>	Superficie corporal en m <sup>2</sup>
<b>S.S.A.</b>	Secretaría de Salud
<b>T<sup>c</sup>H<sub>2</sub>O</b>	Producción negativa de agua libre
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VD</b>	Variable dependiente
<b>VI</b>	Variable independiente
<b>v.o.</b>	Vía oral



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Procesamiento de la especie vegetal <i>Selaginella wrightii</i>	36
<b>Esquema 2.</b> Procesamiento de la especie vegetal <i>Selaginella nothohyrida</i>	38



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Apariencia de 1/3 de la roseta.	4
<b>Figura 2.</b> Tallo, vista dorsal (H). Tallo, vista ventral (I).	5
<b>Figura 3.</b> De izquierda a derecha, hoja lateral, hoja mediana, hoja axilar.	5
<b>Figura 4.</b> <i>S. nothohybrida</i> seca (J), <i>S. nothohybrida</i> rehidratada (K).	6
<b>Figura 5.</b> Distribución de <i>S. nothohybrida</i> .	6
<b>Figura 6.</b> Estructura base de flavonoides.	8
<b>Figura 7.</b> Estructura de diversos grupos de flavonoides.	8
<b>Figura 8.</b> Ruta biosintética de flavonoides.	9
<b>Figura 9.</b> Estructura del riñón	14
<b>Figura 10.</b> Estructura general de la nefrona.	15
<b>Figura 11.</b> Maceración de <i>S. wrightii</i> .	35
<b>Figura 12.</b> Maceración de <i>S. nothohybrida</i> .	37
<b>Figura 13.</b> Ratones macho BALB/c.	40
<b>Figura 14.</b> Carrusel de muestras listas para la digestión.	43
<b>Figura 15.</b> Excreción urinaria inducida por los compuestos de prueba y el extracto, 4 h después de la administración oral de estos.	51
<b>Figura 16.</b> Excreción urinaria del fármaco de referencia furosemida con inhibidores de COX.	59
<b>Figura 17.</b> Excreción urinaria de amentoflavona con inhibidores de COX.	61
<b>Figura 18.</b> Excreción urinaria de robustaflavona con inhibidores de COX.	62
<b>Figura 19.</b> Excreción urinaria de trehalosa con inhibidores de COX.	64
<b>Figura 20.</b> Excreción urinaria del extracto de <i>S. nothohybrida</i> con inhibidores de COX a las 4 h de la administración.	65

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>S. nothohybrida</i>	4
<b>Tabla 2.</b> Plantas medicinales diuréticas en México	11
<b>Tabla 3.</b> Excreción promedio de diversas sustancias filtradas	16
<b>Tabla 4.</b> Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (diuréticos de asa)	20
<b>Tabla 5.</b> Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ (diuréticos tiazídicos)	21
<b>Tabla 6.</b> Inhibidores de los canales de $\text{Na}^+$ del epitelio renal (diuréticos ahorradores de $\text{K}^+$ )	22
<b>Tabla 7.</b> Antagonistas de la aldosterona (diuréticos ahorradores de $\text{K}^+$ )	23
<b>Tabla 8.</b> Diuréticos osmóticos	23
<b>Tabla 9.</b> Inhibidores de la anhidrasa carbónica	24
<b>Tabla 10.</b> Datos espectroscópicos de amentoflavona (1), 400 MHz acetona- $d_6$	45
<b>Tabla 11.</b> Datos espectroscópicos de robustaflavona (2), 400 MHz acetona- $d_6$	48
<b>Tabla 12.</b> Acción diurética y actividad diurética de los compuestos a las 4 h después de la administración oral	51
<b>Tabla 13.</b> Concentración de electrolitos en la orina excretada	53
<b>Tabla 14.</b> Efecto del tratamiento en las características fisicoquímicas de la orina excretada	54
<b>Tabla 15.</b> Prueba de Dunnett	55
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Tukey	56
<b>Tabla 17.</b> Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el fármaco de referencia furosemida	59
<b>Tabla 18.</b> Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores y el fármaco de referencia furosemida	60
<b>Tabla 19.</b> Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto amentoflavona (1)	61



<b>Tabla 20.</b> Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores y el fármaco compuesto amentoflavona (1)	61
<b>Tabla 21.</b> Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto robustaflavona (2)	62
<b>Tabla 22.</b> Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto robustaflavona (2)	63
<b>Tabla 23.</b> Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el azúcar trehalosa (4)	64
<b>Tabla 24.</b> Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el azúcar trehalosa (4)	64
<b>Tabla 25.</b> Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el extracto de <i>S. nothohybrida</i>	65
<b>Tabla 26.</b> Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el extracto de <i>S. nothohybrida</i>	66



## RESUMEN

El presente trabajo describe la investigación realizada a las plantas medicinales *Selaginella nothohybrida* Valdespino y *S. wrightii* Hieron, con la finalidad de comprobar el uso etnomédico que se les atribuye. Las especies antes mencionadas así como *S. lepidophyla* (Hook. & Grev.) Spring y *S. pallescens* (C. Presl) Spring con amplio uso en la medicina popular mexicana forman parte de un complejo de plantas medicinales comúnmente designadas como “doradillas”; sin embargo, no existen reportes en la literatura que permitan justificar el uso y comercialización de éstas.

Aplicando la experimentación farmacológica necesaria se estableció la eficacia de los compuestos puros mayoritarios aislados de *S. wrightii* así como de compuestos puros mayoritarios y el extracto acuoso de *S. nothohybrida* como agentes diuréticos. Para realizar este experimento fue necesario emplear un modelo de diuresis en ratón, encontrándose que el compuesto que presenta mayor actividad diurética es el azúcar trehalosa, el cual se presenta en grandes cantidades en estas especies de selaginellas. Por lo que respecta a los biflavonoides mayoritarios evaluados de estas especies, amentoflavona y robustaflavona presentan actividad diurética estadísticamente similar; sin embargo, (S)-2,3-dihidrorobustaflavona no resultó activa y el extracto acuoso de *S. nothohybrida* fue menos activo que los compuestos puros evaluados. Por otra parte la evaluación de estos compuestos conjuntamente con inhibidores de las enzimas ciclooxigenasas (COX) mostró que la enzima COX-2 juega un papel muy importante para que se lleve a cabo el mecanismo por el cual los compuestos puros y el extracto acuoso desencadenan su efecto diurético.

La evaluación del efecto diurético de compuestos puros y el extracto acuoso de *S. nothohybrida* proporciona una base científica que avala el uso etnomédico que se le da a la “doradilla”, e indirectamente podemos sugerir que probablemente otras especies como *S. wrightii*, *S. lepidophyla* y *S. pallescens* con contenido metabólico similar pueden presentar actividad diurética.



## INTRODUCCIÓN

Estimaciones recientes indican que México ocupa el quinto lugar en el mundo en mega diversidad después de Brasil (56 000), Colombia (35 000), China (27 000) y sudafrica (23 420), con flora que va desde clima templado hasta tropical. De acuerdo a estudios a nivel nacional hay alrededor de 22 259 especies de plantas vasculares en México y más de 3350 de éstas forman parte de la flora medicinal, y un buen testimonio de la eficacia y el valor cultural de estas especies constituyen su permanencia en el mercado mexicano contemporáneo (Villaseñor & Ortiz, 2012).

Independientemente de su riqueza y variedad, solamente un pequeño porcentaje de la flora medicinal mexicana ha sido investigada desde el punto de vista fitoquímico o farmacológico. Así, las plantas medicinales de México son una fuente importante de compuestos bioactivos inexplorados. Muchos fármacos y agentes de control de plagas se emplean en la actualidad ya que las plantas que los originan han tenido un uso conocido por culturas indígenas. Los estudios se han conducido siguiendo el enfoque considerado como más exitoso para el descubrimiento de principios activos, el aislamiento guiado por bioensayos. Así, en muchos casos el material vegetal es seleccionado de acuerdo al criterio etnomédico y quimiotaxonómico.

Un gran número de personas de diversas comunidades utiliza materias primas vegetales como una alternativa terapéutica para tratar sus enfermedades y en la mayoría de los casos sus usos se transmiten a las nuevas generaciones. Un estudio sistemático de las plantas medicinales que englobe análisis químicos y farmacológicos es conveniente para la comprobación de sus propiedades terapéuticas. En el presente trabajo se describe una metodología para la obtención de extractos y compuestos puros de las plantas medicinales *S. nothohybrida* y *S. wrightii* (Selaginellaceae) para ser sujetos a un ensayo biológico y determinar su potencial diurético, enfocándonos al uso medicinal más frecuente de la “Doradilla”.



## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Género *Selaginella*

#### 1.1.1 Características botánicas

La familia Selaginellaceae, de distribución cosmopolita cuenta con un único género viviente, *Selaginella*. Hay aproximadamente 750 especies en el mundo y se caracterizan por ser plantas herbáceas, terrestres, u ocasionalmente epífitas, tienen hojas siempre verdes, en ocasiones varía el color de acuerdo a la estación, son hierbas perennes (raramente anuales). Su rizoma es erecto, postrado, ascendente o escandente, ramificados.

Tienen hojas simples, nervadas (excepcionalmente bifurcadas), cada una con una lígula en la axila en la superficie adaxial, monomórficas o dimórficas, dispuestas en espiral o en la mayoría de las especies dispuestas en 4 filas, 2 filas sobre el dorso o en el lado superior del tallo y ramas (llamado hojas medias o dorsales), otras 2 filas sobre parte lateral o parte inferior (llamadas hojas laterales o ventrales). Estróbilos en el ápice del tallo principal o branchlet, compacta o laxa, tetragonal, coplanar o raramente cilíndrico. Son plantas que viven en lugares húmedos, especialmente en bosques tropicales, aunque igualmente se pueden encontrar sobre acantilados rocosos, en bosques secos y desiertos. Algunas especies se cultivan en invernaderos como plantas ornamentales, pero la principal utilidad está en la medicina tradicional (Xianchun, 2013).

### 1.2 *Selaginellanothohybrida* Valdospino (Selaginellaceae)

#### 1.2.1 Nombres comunes

- Doradilla
- Flor de piedra
- Siempre viva
- Planta de la resurrección



### 1.2.2 Clasificación taxonómica

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica *S. nothohybrida*\*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Pteridophyta
<b>Clase</b>	Lycopodiopsida
<b>Orden</b>	Selaginellales
<b>Familia</b>	Selaginellaceae
<b>Genero</b>	<i>Selaginella</i>
<b>Epíteto específico</b>	<i>Nothohybrida</i>
<b>Nombre Científico</b>	<i>Selaginella nothohybrida</i> Valdespino
<b>Taxónomo</b>	Ivan A. Valdespino
<b>Fecha de determinación</b>	1997-12-31

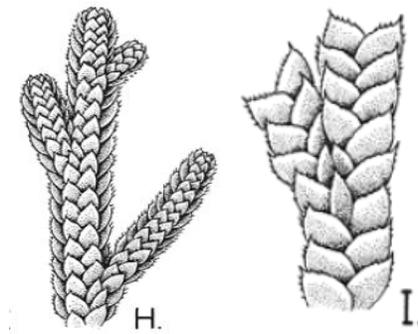
\*Instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México, [UNIBIO: Colecciones Biológicas](#), 2010-05-27.

### 1.2.3 Características botánicas de *Selaginella nothohybrida*

Planta terrestre, cuando están extendidas llegan a medir 9-15 cm de diámetro. Tallos de 0.5-1 mm de diámetro (Figura 2 y 3). Presentan formación de roseta (Figura 1), no articular, glabra, con tallo central en espiral compacta de la que surgen las ramas laterales, 1-4 ramificaciones, ramas planas y extendidas cuando están húmedas, se encrespan hacia dentro cuando se secan (en forma de bola). Rhizophoros ventrales o próximos a la mitad de las ramas, 0.2-0.3 mm de diámetro. Superficie superior verde cuando está en crecimiento, amarillo-marrón y superficie inferior sin brillo de color verdoso a cuando está vieja.

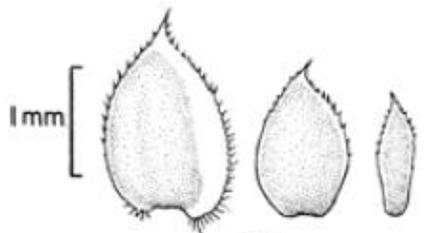


**Figura 1.** Apariencia de 1/3 de la roseta.



**Figura 2.**Tallo, vista dorsal (H) y vista ventral (I).

Hojas laterales (en las ramas primarias) ascendentes, imbricadas, ovadas, ampliamente ovado-lanceoladas u ovado-deltadas, 1.4 a 2.3 x 0.8-1.4 mm; base cordiforme, auriculadas, base acroscópica fuertemente superpuesta a la cara ventral del tallo con aurícula superior (Figura 3).



**Figura 3.** De izquierda a derecha, hoja lateral, hoja mediana, hoja axilar.

*Selaginella nothohybrida* es otro miembro de la serie *Circinata* Spring, un grupo de especies que se caracteriza por la formación de roseta, por lo general como hábito y para resistir los períodos de sequía. Sus ramas se curvan hacia adentro (en seco) para aparecer en forma de bola, y reanudan el crecimiento normal (extendiendo sus ramas) tras la rehidratación (Figura 4). Estas plantas por lo general se llaman "plantas de resurrección", "helechos resurrección" o "doradillas ", dos especímenes de *S. nothohybrida* fueron citadas (Mickel y Beitel, 1988) como posibles híbridos entre *S. lepidophylla* y *S. pallescens*. *Selaginella nothohybrida* de hecho combina algunas características de estas dos especies (Mickel, Beitel, 1988). Un estudio de las esporas



en la serie Circinatae revela que los patrones de estructura de las megasporas y microestructura de *S. nothohybrida* son completamente diferentes a las de *S. lepidophylla* y *S. pallescens* (Mickel & Valdespino, 1992).



**Figura 4.** *S. nothohybrida* seca (J), *S. nothohybrida* rehidratada (K).

#### 1.2.4 Distribución y Hábitat

Se encuentran en bosques de pino-encino, bosques templados, en bancos rocosos húmedos. *S. nothohybrida* se puede encontrar en gran parte del territorio nacional, su distribución conocida es en los estados de Veracruz, Oaxaca y Guerrero principalmente (Figura 5) (Mickel & Valdespino, 1992).



**Figura 5.** Distribución de *S. nothohybrida*.



### 1.2.5 Usos medicinales tradicionales

La especie se emplea bajo la forma de decocción ( se hierve 1-4 plantas en un litro de agua durante 5 a 10 minutos); la via de administracion es oral. La decocción se consume como “agua de tiempo” hasta que desaparece el malestar (Vázquez *et al.*, 2005).

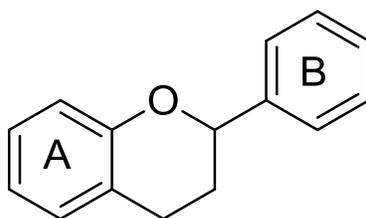
Tanto la infusión como la decocción son empleadas principalmente para diuresis, en caso de riñones inflamados, cistitis, cálculos renales, dolor de espalda, cuando hay obstrucción en la salida de la orina. También se indica para tos, bronquitis, tosferina; se ha reportado su uso en el tratamiento de diabetes, gastritis cáncer, problemas cardiovasculares, hepatitis, enfermedades de la piel, infecciones del tracto urinario y como antiinflamatorias.

### 1.2.6 Antecedentes químicos

Un gran número de compuestos se han aislado de diferentes especies de Selaginellas tales como glucósidos, alcaloides, lignanos y son ricos en biflavonoides del tipo amentoflavona, robustaflavona, (*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona y dihidro-5-metoxi-robustaflavona (Aguilar, 2008), 4-metiléter-robustaflavona, hinokiflavona (Lara, 2014), además de azúcares (trehalosa) y compuestos aromáticos como ácido eucómico (Lara, 2014).

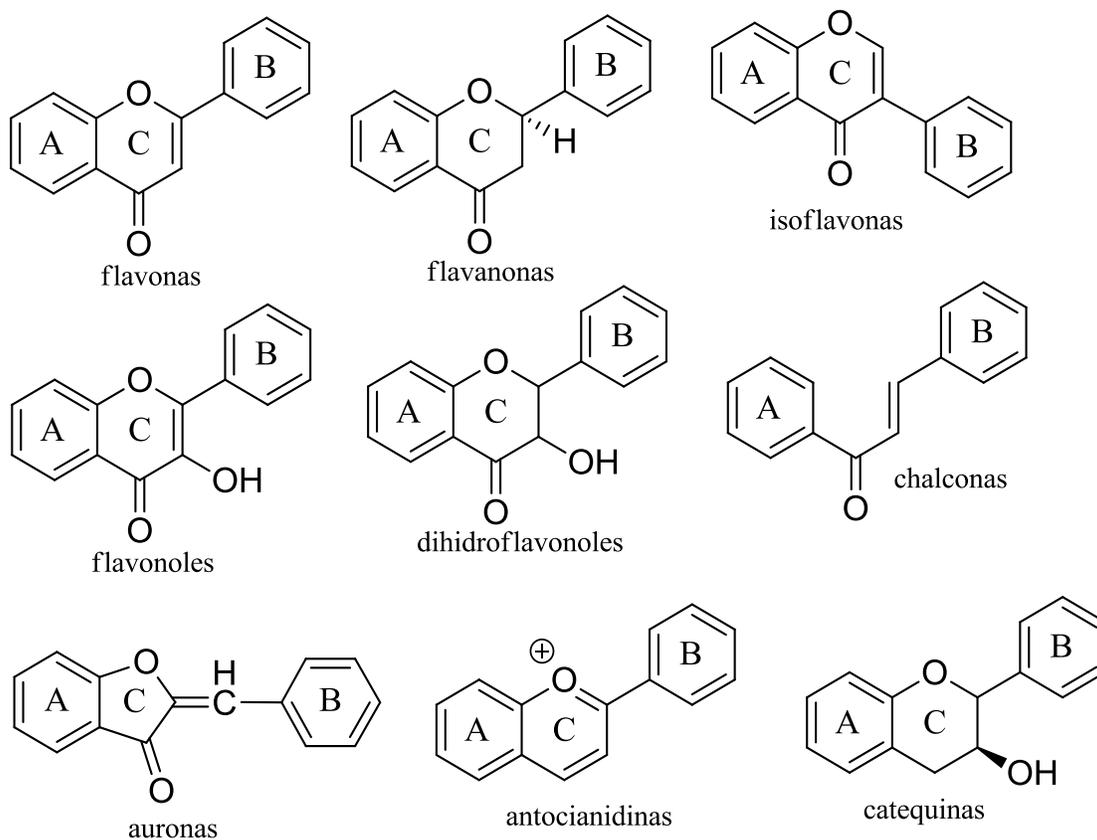
#### 1.2.6.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, polifenoles bioactivos que se caracterizan por tener un núcleo flavano en un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido siquímico, tres átomos de carbono que conectan a los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropanoide (Harborne, 1975), (Figura 6).



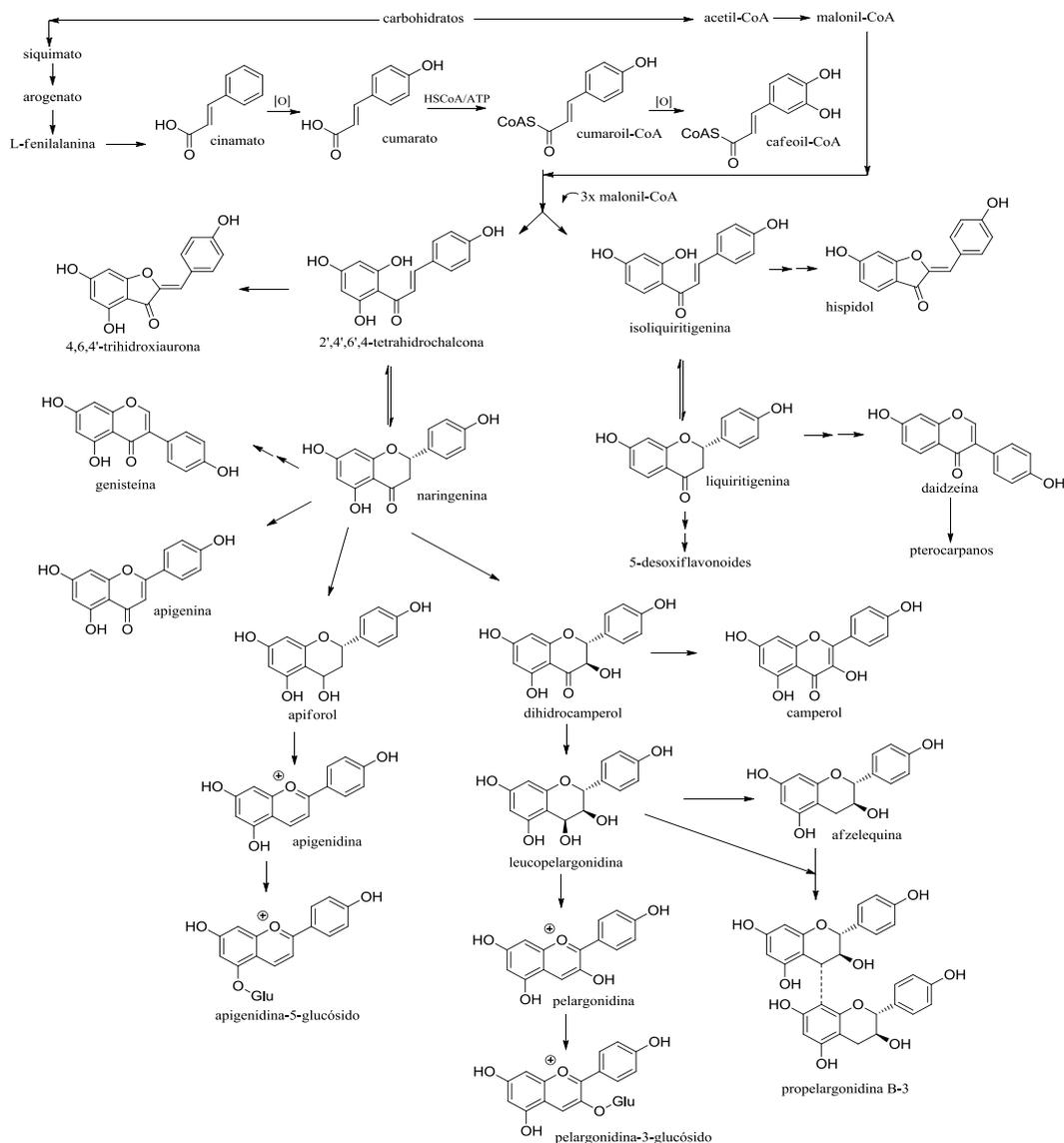
**Figura 6.** Estructura base de flavonoides.

En la figura 7 se incluyen los diferentes grupos de flavonoides.



**Figura 7.** Estructuras de diversos grupos de flavonoides(Harborne, 1975).

Los flavonoides se originan por biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C<sub>3</sub> se originan de la ruta del ácido siquímico, como se denota en la (Figura 8).



**Figura 8.** Ruta biosintética de flavonoides.

En las plantas los flavonoides están frecuentemente presentes como *O*-glicósidos o *C*-glicósidos; los primeros poseen un azúcar enlazado a alguno de los grupos -OH de la aglicona, usualmente en la posición 3 o 7; los *C*-glicósidos poseen el grupo azúcar enlazado a un carbono de la aglicona usualmente en el C-6 o C-8 (Harlen *et al.*, 2011).



Se ha reportado una amplia variedad de flavonoides con actividad biológica importante que va desde su potencial característico antioxidante y para el tratamiento de diversas patologías como son: úlceras gástricas, inflamación, reumatismo, trombosis, cáncer, alergias, depresión, para desórdenes cardiovasculares, diabetes mellitus, hepatotoxicidad y como antimicrobianos (Harleen *et al.*, 2011).

### **1.3 Plantas medicinales con acción diurética**

Existe un gran número de especies vegetales con acción diurética, así como principios activos responsables de esta actividad. Lo más destacable de estas plantas es que suelen promover como parte de su acción biológica una excreción, principalmente de agua, sin que generalmente se vea aumentada la eliminación de iones. Estas plantas presentan una acción suave y cuantitativamente inferior a la de los diuréticos sintéticos (Tabla 2).

La acción diurética puede ser causada por principios activos de naturaleza química muy variada. Frecuentemente, la presencia de varios de estos principios en la misma droga es la responsable de la acción diurética, aunque no está claro el grado de contribución de cada uno de ellos a la actividad diurética total de la materia prima vegetal medicinal; dentro de éstos se encuentran los aceites esenciales, flavonoides, saponósidos y sales de potasio principalmente (López, 2013).

En cuanto a su mecanismo de acción, es probable que podrían actuar a nivel glomerular más que en el túbulo provocando un aumento de la circulación renal e incrementando así la tasa de filtración glomerular y la formación de orina primaria. El efecto obtenido sería, por tanto, una acuaresis. Sin embargo, las sales de potasio podrían producir un efecto diurético gracias a un proceso osmótico (López, 2013).

#### **1.3.1 Indicaciones**

El uso de plantas medicinales con actividad diurética está especialmente indicado en los siguientes casos (López, 2013):



-En afecciones bacterianas e inflamatorias de la pelvis renal y de las vías urinarias bajas. En estos casos se recurre a la denominada terapia de lavado, que consiste en forzar la diuresis con lo que se aumenta la excreción de agua. Esta terapia conlleva la administración de cantidades lo suficientemente elevadas de líquido. Es importante tener en cuenta que, en caso de edemas causados por insuficiencia cardíaca o renal, no deben realizarse tratamientos basados en la terapia de lavado.

-En la prevención y tratamiento de arenillas y cálculos urinarios. En estos casos es recomendable utilizar preparados en forma de infusión, pudiéndose llegar hasta volúmenes de 2 litros por día.

-En regímenes de adelgazamiento. Se utilizan como tratamiento coadyuvante por favorecer la eliminación de líquidos.

**Tabla 2.** Plantas medicinales diuréticas en México

Nombre popular	Nombre científico	Parte utilizada	Atribuciones tradicionales
Cola de caballo	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Parte aérea	Riñones
Granjel	<i>Randia echinocarpa</i>	Frutos	Riñones
Hierba del sapo	<i>Eryngium serratum</i>	Tallos, hojas y flores	Riñones
Alamo	<i>Populus alba</i>	Hojas	Riñones
Crameria	<i>Krameria secundiflora</i>	Raíz	Riñones, Diarrea
Cuajilote	<i>Parmentiera aculeata</i>	Raíz	Diabetes, Riñones
Gramma	<i>Briza minor</i>	Raíz	Riñones
Pelos de elote	<i>Zea mays</i>	Estilos	Riñones
Pingüica	<i>Arctostaphylos pungens</i>	Hojas	Riñones
Vara prieta	<i>Costus spicatus</i>	Tallo	Riñones

Tomado de la FHEUM, 2013.

## 1.4 Enfermedad renal crónica en México

La enfermedad renal crónica es la disminución de la función renal, expresada por una tasa de filtración glomerular menor de 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> SC durante más



de tres meses, manifestada por alteraciones histológicas en la biopsia renal o marcadores de daño renal, como albuminuria o proteinuria mayor de 30 mg/dL, alteraciones en el sedimento urinario o en pruebas de imagen. La enfermedad renal crónica se origina de diversas afecciones crónico-degenerativas, sobre todo diabetes mellitus e hipertensión arterial, fenómeno que ocurre de manera similar en todo el mundo y que, lamentablemente, tiene un desenlace fatal cuando no se trata (Ávila-Saldívar *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 Factores de riesgo

Los factores de riesgo de la enfermedad renal crónica se clasifican en:

- a) *Factores de susceptibilidad*: son los que aumentan la posibilidad de padecer enfermedad renal crónica como edad, factor hereditario, raza, enfermedades crónico-degenerativas y la obesidad.
- b) *Factores iniciadores*: son los que pueden iniciar directamente el daño renal, como las enfermedades autoinmunitarias, infecciosas, obstructivas y fármacos.
- c) *Factores de progresión*: proteinuria, mal control de enfermedades crónicas y dislipidemias.
- d) *Factores de estadio final*: incrementan la morbilidad y la mortalidad en los estadios finales de la enfermedad: anemia, derivación tardía a nefrología, inadecuado control dialítico y alteraciones hidroelectrolíticas.

El control de esos factores puede evitar el inicio de daño renal, incluso puede favorecer la regresión de la enfermedad en fases muy iniciales y ralentizar su progresión cuando ya está establecido. Aunque la edad no es un factor determinante, con los años la función renal puede deteriorarse lenta y progresivamente, y se añaden también otros factores vasculares inherentes al proceso de envejecimiento (Ávila-Saldívar *et al.*, 2013).



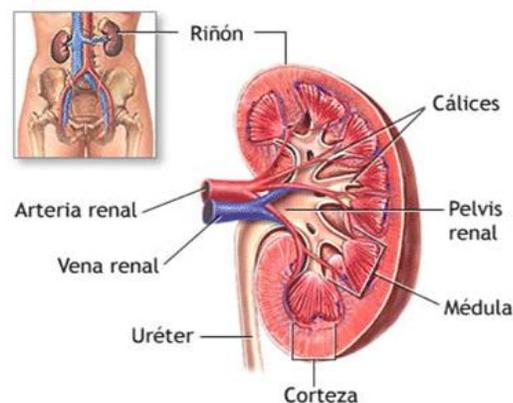
La Sociedad Internacional de Nefrología y la OMS consideran que la enfermedad renal crónica es la clave de los resultados deficientes en el tratamiento de la diabetes y de algunas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial. Se propone incorporar la prevención de la enfermedad renal crónica a los programas de prevención del primer nivel de atención. En México, como en la mayor parte del mundo, se ha observado un incremento importante en la prevalencia e incidencia de la enfermedad renal crónica. En la actualidad se considera una pandemia que afecta aproximadamente, al 10% de la población adulta en diferentes partes del mundo. De acuerdo con las últimas estadísticas establecidas por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la incidencia de pacientes con enfermedad renal crónica es de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia de 1,142. En la actualidad existen alrededor de 52 000 pacientes en terapias sustitutivas, de los que 80% se atienden en esa institución (IMSS). Se registró un incremento de 92 pacientes por millón de habitantes (ppmh) que existían en 1999, a 400 ppmh en el año 2008. La diabetes mellitus ocupa el primer lugar entre las causas de enfermedad renal crónica en México (Ávila-Saldívar *et al.*, 2013).

## 1.5 Formación y eliminación de orina

La formación de la orina se produce en el riñón por filtración, secreción, reabsorción y concentración (Figura 9). Por otra parte, los órganos del sistema excretor de la orina, es decir, la pelvis renal y el uréter, se encargan del transporte de la orina hasta la vejiga urinaria, sitio en el que ésta se almacena hasta su eliminación a través de la uretra. En el riñón se filtra la sangre y se eliminan con la orina productos orgánicos del metabolismo y también sustancias nocivas exógenas que no son catabolizadas. Para ello el riñón filtra grandes cantidades de líquido desde el plasma sanguíneo. En un primer paso se forma como ultrafiltrado la llamada orina primaria u orina previa (isoosmótica e isotónica), que contiene esencialmente la misma concentración de sustancias por eliminar que el plasma de la sangre, aunque en gran parte está libre de grandes moléculas proteicas. Luego el filtrado será intensamente



modificado mediante la reabsorción selectiva de sustancias valiosas que pueden ser utilizadas nuevamente por el organismo (por ejemplo, agua, glucosa, electrolitos y aminoácidos) y mediante concentración y secreción específica de productos de desecho. Entonces se produce la orina secundaria u orina final, que contiene solo alrededor del 1-2% de la orina primaria filtrada originalmente. Por medio de estos procesos de excreción la composición del plasma sanguíneo se mantiene dentro de estrechas normas fisiológicas. La función del riñón consiste en mantener el medio interno u homeostasis (función homeostática) (Tresguerres, 2005).



**Figura 9.** Estructura del riñón.

### 1.5.1 La nefrona

La nefrona es la unidad funcional del riñón, responsable de la formación de orina. Cada riñón contiene alrededor de un millón de nefronas repartidas por toda la corteza renal. Este número se reduce con la edad (aproximadamente 10% cada 10 años), ya que el riñón no tiene capacidad para regenerar nefronas; por tanto, en caso de una pérdida por daño renal o como consecuencia del envejecimiento se produce una adaptación de las nefronas restantes con objeto de mantener la función renal dentro de los límites de la normalidad.

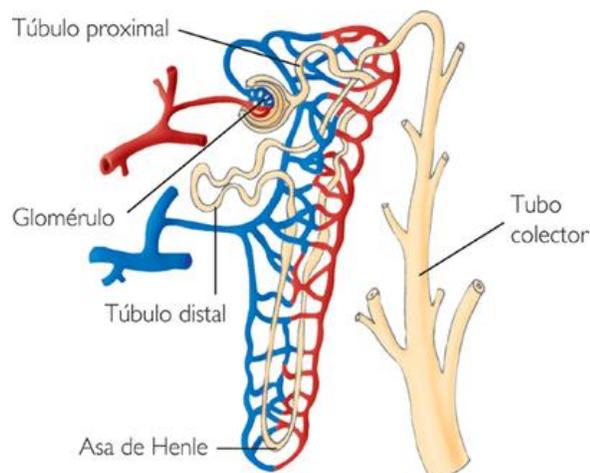


La nefrona consiste en un grupo especializado de células que filtran la sangre y, posteriormente, modifican de manera selectiva el líquido filtrado mediante la reabsorción y la secreción de diferentes sustancias (Figura 10) (Tresguerres, 2005).

La cápsula de Bowman constituye la parte inicial del sistema tubular de la nefrona. Se invagina para englobar al glomérulo dejando en su interior *el espacio de Bowman o espacio urinario*, donde se recoge el líquido filtrado en los glomérulos.

El sistema tubular se encuentra a continuación de la cápsula de Bowman y es responsable de los procesos de reabsorción y secreción, en los cuales el ultrafiltrado es modificado para la formación de la orina. La estructura y la función de estas células varían mucho de unos segmentos a otros del túbulo. La sección tubular se divide en diferentes segmentos.

- Túbulo proximal
- Asa de Henle
- Túbulo distal
- Túbulo colector



**Figura 10.** Estructura general de la nefrona.

Según su localización, las nefronas pueden presentar pequeñas variaciones necesarias para la optimización de su funcionamiento, la corteza, localizada en la zona



externa del riñón, contiene todos los glomérulos, la mayor parte de los túbulos contorneados proximales y parte de los distales, la médula está constituida principalmente por las asas de Henle y por los conductos colectores dispuestos en forma paralela, la médula desempeña un papel importante en la concentración de la orina (Tresguerres, 2005).

### 1.5.2 Filtración glomerular

El proceso inicial en la formación de la orina es la filtración de una fracción del plasma que atraviesa los capilares glomerulares hacia el comienzo del túbulo proximal o cápsula de Bowman. En esencia, la filtración glomerular tiene lugar, al igual que en el resto de capilares sistémicos, como consecuencia del juego de las llamadas fuerzas de Starling que determinan el intercambio de agua y solutos entre el capilar y el intersticio, es decir, las presiones hidrostáticas y oncóticas en el capilar glomerular y la cápsula de Bowman o porción inicial del túbulo proximal (Tabla 3).

**Tabla 3.** Excreción promedio de diversas sustancias filtradas

Sustancia (unidades)	Cantidad filtrada	Cantidad excretada	Reabsorción fraccional (%)
Agua (litros)	180	0.5-3.0	98-99
Sodio (mEq)	25000	50-200	>99
Cloro (mEq)	19500	50-200	>99
Potasio (mEq)	720	40-120	80-95
Bicarbonato (mEq)	4500	0	100
Glucosa (mEq)	180	0	100
Urea (mEq)	56	28	50

#### 1.5.2.1 Características del filtrado glomerular

El filtrado es un ultrafiltrado casi perfecto del plasma que atraviesa los capilares glomerulares, y no es perfecto porque, aunque en muy pequeña proporción, algunas proteínas pequeñas atraviesan la barrera glomerular. Por ejemplo, la



albúmina se encuentra en el líquido tubular en una concentración de 1 mg/100 mL. Esto no supone sino una pequeñísima fracción de la albúmina plasmática (3.5 g/ 100 mL). Es decir la albúmina es restringida en un 99.97% (Tresguerres, 2005).

### 1.5.3 Reabsorción tubular

El filtrado glomerular avanza por los túbulos renales, lugar donde las sustancias útiles para el organismo son reabsorbidas y reincorporadas a la sangre. El túbulo contorneado proximal capta principalmente los solutos como la glucosa, aminoácidos y sales. Aproximadamente el 80% de la reabsorción del agua ocurre en la primera porción de los túbulos renales mediante osmosis y el otro 20% es reabsorbido en el túbulo contorneado distal y en el túbulo colector y depende de los requerimientos del organismo.

### 1.5.4 Excreción de la orina

El líquido de los túbulos llega al tubo recolector, en donde aún se puede reabsorber agua. En este lugar el líquido puede recibir el nombre de orina. Los tubos colectores desembocan en los cálices renales, de allí en la pelvis renal, uréteres y vejiga urinaria donde se almacena la orina hasta que se produce el reflejo de orinar, momento en que la orina es expulsada por la uretra hacia el exterior.

## 1.6 Diuresis

La diuresis es la eliminación urinaria, bien se trate de la cantidad de orina o de su composición. Desde el punto de vista cualitativo, la diuresis hace referencia **a)** la composición de la orina (agua, iones, compuestos orgánicos), y **b)** al trayecto íntegro de la orina desde su formación en el riñón, transporte por el uréter, almacenaje en la vejiga y finalmente la eliminación por medio de la uretra mediante la micción. Desde



el punto de vista cuantitativo, se habla de flujo de orina (medido en litros/día). Un flujo urinario normal comprende entre 800 mL y 1500 mL al día, dependiente de la cantidad de fluido que se absorba (Lasa, 2011).

### **1.6.1 Diuresis acuosa**

Cuando se ingieren cantidades grandes de agua (líquido hipotónico), la diuresis de agua empieza 15 minutos después de la ingestión y alcanza su máximo en aproximadamente 40 minutos. El acto de beber produce una pequeña disminución en la secreción de HAD antes de la absorción del agua, pero la mayor parte de la inhibición se produce mediante la disminución de la osmolalidad plasmática después de la absorción de agua por el tubo digestivo (Segarra, 2003).

### **1.6.2 Diuresis osmótica**

La presencia en los túbulos renales de grandes cantidades de solutos no absorbidos produce un incremento en el volumen de orina denominado diuresis osmótica. Los solutos no reabsorbidos en los túbulos proximales, especialmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ejercen un efecto osmótico importante. La diuresis osmótica se produce al administrar compuestos como el manitol y polisacáridos afines, los cuales se filtran pero no se reabsorben. También se provoca por la presencia de ciertas sustancias como glucosa (Segarra, 2003).

## **1.7 Diuréticos**

Son fármacos que estimulan la excreción renal de agua y electrolitos, como consecuencia de su acción perturbadora sobre el transporte iónico a lo largo de la nefrona. Esta interferencia puede llevarse a cabo en uno o varios sitios del recorrido



tubular, pero la acción en un sitio más proximal puede ser compensada a nivel más distal o desencadenar mecanismos compensadores que contrarresten la acción inicial; los diuréticos no actúan directamente sobre el agua, sino a través del transporte de iones tales como el sodio (diuréticos natriuréticos) o modificando la osmolaridad (diuréticos osmóticos).

Cada segmento de la nefrona posee en su epitelio mecanismos especializados en el transporte de determinados iones. Por lo tanto, la acción del diurético en un segmento determinado provocará un patrón característico de eliminación de agua y electrólitos y viceversa, a partir de un patrón de eliminación iónica se puede deducir, al menos de manera aproximada, el segmento donde el diurético actúa. Por consiguiente, la comprensión de la acción fisiológica de los diuréticos requiere el conocimiento de las funciones específicas de cada segmento tubular (Flórez y Armijo, 2008).

### 1.7.1 Clasificación de los diuréticos

#### 1.7.1.1 Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (diuréticos de asa)

Los miembros de este grupo de diuréticos inhiben la actividad del simportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  en la rama ascendente gruesa del asa de Henle; por ende, también se denominan *diuréticos de asa* (o con acción en asa de Henle). Si bien los túbulos proximales reabsorben alrededor de 65% del ultrafiltrado de  $\text{Na}^+$ , los diuréticos que actúan sólo en dichos túbulos poseen eficacia limitada porque la rama ascendente gruesa tiene gran capacidad de resorción y reabsorbe la mayor parte del líquido que se rechaza desde los túbulos proximales. Los inhibidores del simporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  son sumamente eficaces; por ello, a menudo se denominan diuréticos de límite alto. Son varias las familias químicas con capacidad de actuar en el segmento diluyente del asa de Henle. De todas ellas, los compuestos mejor estudiados y más utilizados son los sulfamoilbenzoatos, cuyo representante más característico es la furosemida, y los



derivados fenoxiacéticos, especialmente el ácido etacrínico (Tabla 4) (Jackson K, 1996).

**Tabla 4.** Inhibidores del simporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (diuréticos de asa)

Fármaco	Estructura
Furosemida	
Ácido etacrínico	

#### 1.7.1.2 Mecanismos de acción

Como su nombre lo indica, los inhibidores del simporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  se unen al transportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  en la rama ascendente gruesa y bloquean su función, lo cual lleva el transporte de la sal de este segmento de la nefrona a un paro virtual. Las pruebas sugieren que estos fármacos se fijan al sitio de unión del  $\text{Cl}^-$  (Hannafin *et al*, 1983), situado en el dominio transmembrana de transportador (Insering & Forbush, 1997). La furosemida y demás diuréticos del asa se fijan a la proteína cotransportadora  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  situada en la membrana luminal del segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle y la inhiben, en consecuencia impiden este importante transporte de iones (Jackson K, 1996).

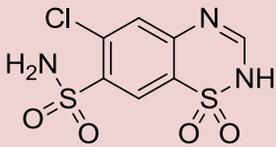
#### 1.7.1.3 Inhibidores del simporte $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ (diuréticos tiazídicos)

En el intento de obtener moléculas sulfamídicas con mayor actividad inhibitoria sobre la anhidrasa carbónica, se sintetizó la clorotiazida que, produciendo menor inhibición de la anhidrasa carbónica, mejoraba la actividad diurética de los inhibidores de esta enzima. La clorotiazida es una benzotiadiazina a partir de la cual



se desarrollan las hidrotiazidas, pero a todas ellas se las suele denominar *tiazidas* (Tabla 5)(Flórez y Armijo, 2008).

**Tabla 5.** Inhibidores del simporte  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (diuréticos tiazídicos)

Fármaco	Estructura
Clorotiazida	

#### 1.7.1.4 Sitio y mecanismo de acción

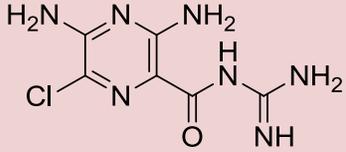
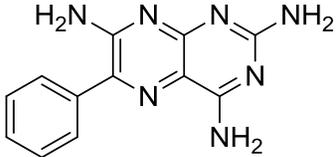
Las tiazidas y fármacos afines actúan desde la superficie luminal de la célula epitelial en la porción inicial del túbulo contorneado distal, donde se fijan selectivamente. Allí inhiben el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  de la membrana luminal, interfiriendo de esta manera en la corriente iónica de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ . Como poseen también cierta capacidad de inhibir la anhidrasa carbónica, es posible que actúen adicionalmente en el túbulo proximal. Como las tiazidas no incrementan el flujo renal, el aumento de presión intratubular secundario a la inhibición de reabsorción de agua hace caer la presión de filtración en el glomérulo, lo que en ocasiones lleva a aumentar la urea en sangre (Flórez y Armijo, 2008).

#### 1.7.1.5 Inhibidores de los canales de $\text{Na}^+$ del epitelio renal (diuréticos ahorradores de $\text{K}^+$ )

El triamtereno y la amilorida son fármacos de esta clase para uso clínico. Ambos causan incrementos pequeños de la excreción de  $\text{NaCl}$  y por lo general se usan por sus efectos anticaliuréticos para compensar los efectos de otros diuréticos que incrementan la excreción de  $\text{K}^+$ ; en consecuencia, junto con la espironolactona (se menciona más adelante) a menudo se clasifican como diuréticos ahorradores de potasio (Tabla 6) (Jackson, 1996).



**Tabla 6.** Inhibidores de los canales de Na<sup>+</sup> del epitelio renal (diuréticos ahorradores de K<sup>+</sup>)

Fármaco	Estructura
Amilorida	
Triamtereno	

#### 1.7.1.6 Sitio y mecanismo de acción

Se conoce mejor el mecanismo molecular de la amilorida que el del triamtereno. La amilorida bloquea los canales de Na<sup>+</sup> que se encuentran en la membrana luminal de las células principales, por donde penetra el ion a favor del gradiente electroquímico creado por la bomba de Na<sup>+</sup> situada en la membrana basolateral. Este bloqueo puede ser competitivo o no competitivo según la concentración del fármaco. Estos diuréticos inhiben la reabsorción de Na<sup>+</sup> en grado muy moderado (no más del 2 % de la carga filtrada), y reducen la secreción del K<sup>+</sup>. Como se comprende, la acción de estos compuestos es independiente de la actividad de la aldosterona. En consecuencia, provocan una saluresis moderada, reducen la eliminación de K<sup>+</sup> y elevan el pH urinario (Flórez y Armijo, 2008).

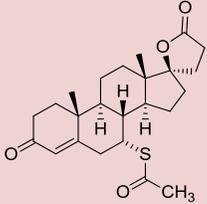
#### 1.7.1.7 Antagonistas de los receptores de mineralocorticoides (diuréticos ahorradores de K<sup>+</sup>)

Los mineralocorticoides causan retención de sal y agua e incrementan la excreción de K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> al unirse a receptores de mineralocorticoides específicos. La



espirolactona posee una estructura esteroide similar a la de la aldosterona, con un anillo lactónico y un radical tioacetilo en posición 7 (Tabla 7), (Jackson, 1996).

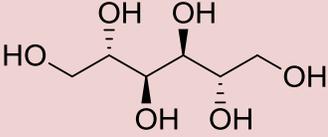
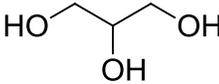
**Tabla 7.** Antagonistas de la aldosterona (diuréticos ahorradores de K<sup>+</sup>)

Fármaco	Estructura
Espironolactona	

#### 1.7.1.8 Diuréticos osmóticos

Se trata de sustancias de bajo peso molecular, osmóticamente activas y farmacológicamente inertes, que son filtradas en el glomérulo y no reabsorbidos (o sólo en forma parcial) en el resto de la nefrona. Las principales son: manitol, urea, glucosa, glicerina e isosorbida. El manitol es una hexosa polihidroxilada formada de la reducción de la manosa; como su absorción intestinal es impredecible y se metaboliza abundantemente en el hígado, se administra por vía intravenosa (Tabla 8), (Flórez y Armijo, 2008).

**Tabla 8.** Diuréticos osmóticos

Fármaco	Estructura
Manitol	
Glicerina	



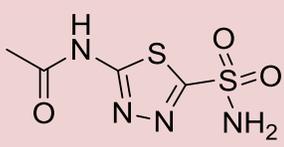
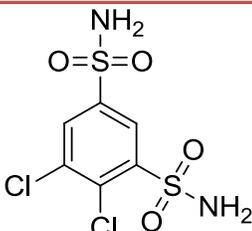
### 1.7.1.9 Sitio y mecanismo de acción

Por su actividad osmótica, el manitol retiene agua dentro del túbulo proximal, no permitiéndole que acompañe al  $\text{Na}^+$  en su reabsorción. Este hecho contribuye a que la concentración de  $\text{Na}^+$  vaya decayendo a lo largo del recorrido, de forma que al final del túbulo proximal se origina un movimiento pasivo de salida de  $\text{Na}^+$  desde el espacio peritubular hacia la luz del túbulo. Asimismo, bajo algunas circunstancias, las prostaglandinas pueden contribuir a la vasodilatación renal y el lavado medular inducido por diuréticos osmóticos. Por último, la existencia de manitol en el tubo colector, junto con la carencia de hipertonia medular, impide que el agua se reabsorba aun si existe HAD (Jackson, 1996).

### 1.7.1.10 Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Son derivados sulfamídicos que inhiben la anhidrasa carbónica que se encuentra en las células de los túbulos renales, sobre todo en el túbulo contorneado proximal. Los más conocidos son la acetazolamida y la diclorfenamida (Tabla 9).

**Tabla 9.** Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Fármaco	Estructura
Acetazolamida	
Diclorfenamida	



#### 1.7.1.11 Sitio y mecanismo de acción

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica inhiben ambas formas de la enzima, tanto la que se encuentra en la membrana del borde luminal como la citoplásmica, suprimiendo casi por completo la reabsorción de  $\text{NaHCO}_3$  en el túbulo proximal. De este modo, aumenta la eliminación de bicarbonato y consiguientemente la de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que llegarán en gran proporción al asa de Henle. En este sitio, sin embargo, se reabsorbe una alta cantidad de ambos iones, por lo que, en parte, se compensa la acción del diurético; ésta es la razón de que su eficacia diurética, en términos de fracción de  $\text{Na}^+$  eliminada, sea moderada (no más del 5 %). En cambio, la fracción de  $\text{K}^+$  que se elimina alcanza el 70 %, debido a la mayor existencia de  $\text{Na}^+$  que llega al túbulo distal. La alcalinización de la orina provoca acidosis, que reduce la eficacia de las dosis siguientes del diurético (Flórez y Armijo, 2008).

### 1.8 Inhibidores de la función renal

Los efectos terapéuticos de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos son consecuencia de su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas (PGs) a través del bloqueo de la ciclooxigenasa (COX), enzima que transforma el ácido araquidónico en prostaglandinas ( $\text{PGG}_2$ ,  $\text{PGH}_2$ ), éstas cumplen importantes funciones homeostáticas, como el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, la función plaquetaria y el flujo plasmático renal, entre otras. Su producción está regulada por dos isoformas de COX, llamadas COX-1 y COX-2. La primera es una isoforma constitutiva que aparece en casi todos los tejidos, pero es particularmente importante en los vasos sanguíneos, plaquetas, estómago, intestino, páncreas y riñón. En este último órgano, se produce en respuesta a hormonas circulantes como la angiotensina II, las catecolaminas y la HAD. La segunda, es una enzima inducible estimulada por citotoxinas, endotoxinas, factores de crecimiento y mitógenos. Es ésta la isoforma que se encuentra aumentada en la inflamación. Pero la COX-2 es también constitutiva de algunos órganos como cerebro y riñón, por lo que el uso de fármacos



inhibidores de COX-2 puede alterar la función de estos órganos. Específicamente en el riñón, estas alteraciones van a depender de la expresión de la COX-1 y COX-2 en los distintos segmentos de la nefrona. Así, en las arterias, arteriolas y capilares se expresa la COX-1, lo que produce vasodilatación, por lo que la inhibición de ésta por los antiinflamatorios no esteroideos produce una disminución del flujo plasmático renal y una caída en de la velocidad de filtración glomerular provocando una insuficiencia renal aguda. En la rama ascendente del asa de Henle en cambio, se expresa la COX-2 que modula el coeficiente de ultrafiltración, la reabsorción de sodio y la secreción de renina respectivamente. Por lo tanto, los inhibidores de COX-2 pueden disminuir la velocidad de filtración glomerular, inducir retención de sodio, disminuir el flujo plasmático renal y reducir la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona. En el túbulo colector y en las células intersticiales de la médula se expresa la COX-1 que a este nivel modula la acción de la HAD, la reabsorción de sodio y contribuye a mantener la vasodilatación, por ende aquí la inhibición de la COX-1 determinará también disminución del flujo plasmático renal, retención de sodio y disminución de la respuesta tubular a la HAD, por lo que a los síndromes clínicos antes mencionados hay que agregar la hiponatremia. En el aparato yuxtaglomerular se expresan tanto la COX-1 como la COX-2, aumentando la síntesis de renina y favoreciendo la autorregulación. De allí que la inhibición de ambas isoenzimas a este nivel determinará una disminución de la actividad del sistema RAA y una caída de la velocidad de filtración glomerular.

Los inhibidores de COX no son inocuos y pueden producir alteraciones importantes en la función renal, sus efectos adversos agudos son producidos indirectamente a través de la inhibición de la síntesis de PGs, son reversibles y se presentan preferentemente en situaciones clínicas asociadas a insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática, el síndrome nefrótico y en pacientes añosos con daño renal previo o que reciben diuréticos (García, 2000 y Langma, 1999).



## 1.9 Espectroscopía de absorción atómica en flama

La espectroscopía de absorción atómica (EAA), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona esta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos.

La absorción depende de los átomos libres no excitados, pero en general la relación entre átomos no excitados y átomos excitados, en un momento determinado, es muy alta. Como la longitud de onda del rayo de luz es característica solamente de cada metal por determinar, la energía luminosa absorbida por la llama es una medida de la concentración del metal en la muestra.

Cuando a un átomo se le suministra energía suficiente para que sus electrones de la capa exterior salten a un nivel de mayor energía, se produce una absorción de luz que le permite permanecer en un estado llamado excitado.

$$E^{\circ} + \text{energía} = E^{\circ} \text{ excitado.}$$

Una vez que el electrón alcanza un nivel superior de energía, permitiendo la existencia del átomo excitado, queda en capacidad de regresar a la capa externa, o sea retornar a su nivel normal, emitiendo una energía igual a la absorbida cuando fue excitado.

$$E^{\circ} \text{ excitado} = E^{\circ} + \text{energía}$$

### 1.9.1 Descripción de la técnica de EAA

La técnica de absorción atómica en flama en una forma concisa consta de lo siguiente: la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y



conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido.

Las gotas en forma de aerosol son conducidas a una llama de gas acetileno, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos, estos átomos absorben cualitativamente la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración.

La señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega a un monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura.



## 2. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha expresado que un 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de salud en los países en desarrollo. En México a pesar de la riqueza y variedad de la flora medicinal pocas especies han sido científicamente estudiadas para garantizar su calidad, seguridad y eficacia. Hay una gran variedad de especies reportadas con actividad diurética, pero no todas cuentan con un respaldo científico que corrobore dicha actividad.

En la medicina tradicional mexicana la doradilla es una planta ampliamente usada, en la actualidad principalmente como un agente diurético. Investigaciones taxonómicas sobre la doradilla demostraron que se puede tratar de diferentes especies del género *Selaginella*, siendo *S. nothohybrida*, *S. lepidophylla*, *S. wrightii* y *S. pallescens*, las más comunes. El estudio químico de estas especies mostró un importante contenido metabólico de biflavonoides (Aguilar *et al*, 2008; Aguilar *et al*, 2013; Lara, 2014), sin embargo, actualmente no se cuenta con un estudio farmacológico que avale el uso de estas plantas como diuréticas. Con la realización del presente proyecto se pretende justificar con bases científicas el amplio uso tradicional de *S. nothohybrida*, así como evaluar el potencial diurético de los principales metabolitos presentes en *S. nothohybrida*, *S. wrightii* e indirectamente en *S. lepidophylla* y determinar el papel de las prostaglandinas renales en el proceso de diuresis promovido tanto por el extracto como por los compuestos aislados de estas especies. Por otra parte, se requirió conocer el contenido metabólico de una colecta de *S. wrightii* proveniente de Tlaxiaco, Oaxaca, originalmente clasificada como *S. peruviana*.



### 3. HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional mexicana se afirma que *S. nothohybrida* “doradilla” es una planta con efecto diurético, entonces se espera que sus preparados y al menos uno de sus compuestos sean agentes diuréticos en el modelo de diuresis en ratones.



## 4. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es evaluar el efecto diurético de la decocción de la especie *S. nothohybrida* Valdespino (Selaginellaceae) y de sus metabolitos principales mediante un modelo biológico en ratón, así como determinar el posible mecanismo de acción de éstos y por otra parte, conocer el contenido metabólico de *S. wrightii*, especie originalmente clasificada como *S. peruviana*.

### 4.1 Objetivos particulares

- Aislar y caracterizar los metabolitos principales de las especies *S. nothohybrida* y *S. wrightii*.
- Determinar la acción diurética del compuesto mayoritario aislado de *S. wrightii*.
- Determinar la acción diurética del compuesto mayoritario y de la decocción de *S. nothohybrida*.
- Determinar la concentración de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  presentes en las muestras de orina excretada por los ratones mediante el uso de Espectroscopía de Absorción Atómica.
- Determinar la acción diurética de los compuestos aislados y el extracto acuoso de *S. nothohybrida* al ser administrados conjuntamente con cuatro inhibidores de COX's.
- Determinar el mecanismo de acción del extracto acuoso y los compuestos mayoritarios aislados de *S. nothohybrida* y *S. wrightii*.



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Materiales y equipo

#### 5.1.1 Material biológico

- 700 g de material vegetal de *S. wrightii*
- 300g de material vegetal *S. nothohybrida*
- Ratones macho BALB/c de entre 25-30 g de peso corporal

#### 5.1.2 Instrumental de laboratorio

- Columna para percolación
- Matraces bola de 500 mL y 5 L
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Columnas cromatográficas
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Frascos viales
- Guantes de látex desechables
- Jeringas para insulina de 1 mL
- Cánula intragástrica
- Placas cromatográficas
- Sephadex LH-20
- Micropipeta Eppendorf de 500-5000  $\mu$ L
- Vasos de teflón para digestión en microondas

#### 5.1.3 Disolventes y reactivos

- $\text{CHCl}_3$  grado R.A J.T. Baker®
- MeOH grado R.A. J.T. Baker®



- Hexano grado R.A J. T. Baker®
- Acetato de Etilo grado R.A J. T. Baker®
- Agua inyectable
- Furosemida de Merck
- Ácido acetilsalicílico PiSA farmacéutica
- Indometacina de Kener
- Naproxeno sódico
- Celecoxib Pfizer
- Sulfato cérico amoniacal

## 5.2 Procedimientos generales

La fragmentación del material vegetal se llevó a cabo en un molino de martillo IKA® WERKE modelo MF 10 basic. Para concentrar al vacío los extractos obtenidos se utilizaron rotaevaporadores marca BÜCHI modelo 461, y B-480 acoplado a una bomba de alto vacío BÜCHI modelo V-710. Las pesadas de la materia prima se hicieron mediante una balanza analítica marca OHAUS PA214.

La evaluación biológica de los metabolitos se hizo empleando cajas metabólicas Maryland plastics, Inc. Modelo 21632, las muestras de orina se colectaron con jeringas marca HAMILTON de 1 mL, el pH así como la densidad se midieron en un pH-metro Conductronic pH 120, la muestra fue pesada en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus. La concentración de iones presentes en las muestra se determinó con un espectrofotómetro de Absorción Atómica de flama Varian modelo spectra AA 220.

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 F<sub>254</sub> Macherey-Nagel), de diferentes dimensiones y empleando como sistema de elución CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1). Como visualizador cromatográfico se empleó una lámpara de luz UV marca UVP con longitud de onda 254, 302 y 365 nm. Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato cérico



amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  al 1% en ácido sulfúrico 2 N. La cromatografía en columna abierta (CCA) se efectuó utilizando como adsorbente Sephadex lipofílico LH-20 (tamaño de partícula 20-100  $\mu\text{m}$ . Sigma Aldrich), empleando como fase móvil metanol.

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 de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y en sus modalidades HSQC, HMBC, COSY y NOESY se realizaron en un equipo Varian Innova a 400 MHz. Se utilizó acetona- $d_6$  como disolvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno.

### **5.3 Metodología experimental para la extracción, aislamiento y purificación de amentoflavona (1) a partir de *Selaginella wrightii***

#### **5.3.1 Material vegetal**

El material vegetal de *S. wrightii* (687.7 g) fue recolectado en Tlaxiaco, Oaxaca por el Dr. Robert Bye (No. De referencia 36955), originalmente identificada como *S. peruviana*. La identificación botánica definitiva fue realizada por el experto en Pteridofitas M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. Una muestra de referencia se encuentra depositada en el laboratorio 111 del Conjunto “E” de la Facultad de Química.

#### **5.3.2 Preparación del extracto total de *S. wrightii***

La desecación de la planta se hizo a temperatura ambiente y en ausencia de luz, fue necesario para su limpieza eliminar restos de otras plantas y polvo que se encontraba adherido a las raíces de la planta; el material vegetal se fragmentó en una licuadora tipo industrial.



687.7g del vegetal fragmentado se colocaron en un percolador de 60 cm de longitud y 10 cm de diámetro y se extrajo exhaustivamente con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) por el método de maceración por periodos de 24 h a temperatura ambiente (Figura 11). El extracto resultante se concentró por evaporación al vacío para dar un extracto total seco de coloración verde oscura y consistencia pastosa.



**Figura 11.** Maceración de *S. wrightii*.

### 5.3.3 Fraccionamiento del extracto total de *S. wrightii*

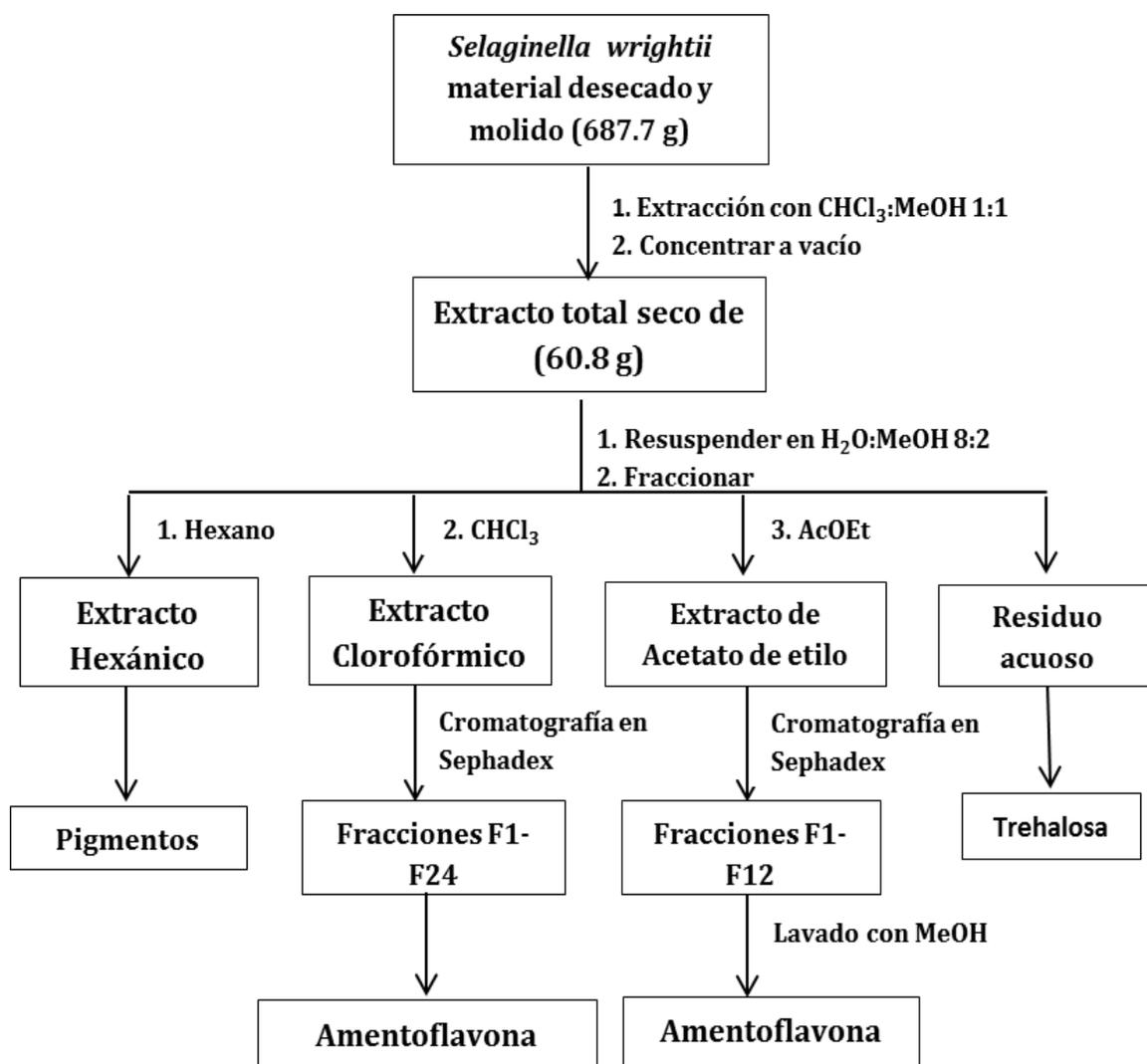
60.8 g del extracto total fueron resuspendidos en 200 mL de una mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ :MeOH (8:2) y se sometió a un fraccionamiento por reparto líquido-líquido, con disolventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y acetato de etilo, respectivamente (Esquema 1). Durante el fraccionamiento se obtuvo un residuo insoluble en los disolventes usados y se separó por filtración, fue poco soluble en metanol y soluble en DMSO.

### 5.3.4 Aislamiento y purificación de amentoflavona (1)

La fracción de acetato de etilo obtenida del extracto total de *S. wrightii* se sometió a cromatografía en columna abierta empleando Sephadex LH-20 como adsorbente y MeOH grado R.A. como fase móvil, se obtuvieron eluatos de 100 mL y el



curso del fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía en capa fina; así, en las fracciones F7 a la F10 se detectó la presencia de biflavonoides (Esquema 1). Esta nueva fracción nombrada spw-IA-12 fue llevada a sequedad y aplicada nuevamente a una columna cromatográfica abierta con Sephadex LH-20 como adsorbente y MeOH grado R.A. como fase móvil; se colectaron nuevamente eluatos de 100 mL y en las subfracciones F13 a la F27 se obtuvo amentoflavona pura.



**Esquema 1.** Procesamiento de la especie vegetal *Selaginella wrightii*.



## 5.4 Metodología experimental para la extracción, aislamiento y purificación de robustaflavona (2) a partir de *Selaginella nothohybrida*

### 5.4.1 Material vegetal

Trecientos gramos de *S. nothohybrida* fueron adquiridos en el anexo del mercado Sonora de la Ciudad de México, local 173 en agosto de 2005. La identificación botánica fue realizada por el M. en C. Alberto Reyes García del Herbario del Instituto de Biología, UNAM. Una muestra de referencia se depositó en la colección botánica del Laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

### 5.4.2 Obtención del extracto total de *S. nothohybrida*

La desecación de la planta se hizo a temperatura ambiente y en ausencia de luz; para su limpieza fue necesario eliminar restos de otras plantas y polvo que se encontraba adherido a las raíces de la planta. El material vegetal se fragmentó en un molino de martillos de la marca IKA® WERKE modelo MF 10 basic.

Ciento cincuenta y ocho gramos del material vegetal se colocaron en un matraz bola de 5 L y se extrajo exhaustivamente con una mezcla  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (1:1) por el método de maceración, en periodos de 24 h (Figura 12); el extracto resultante se concentró a vacío.

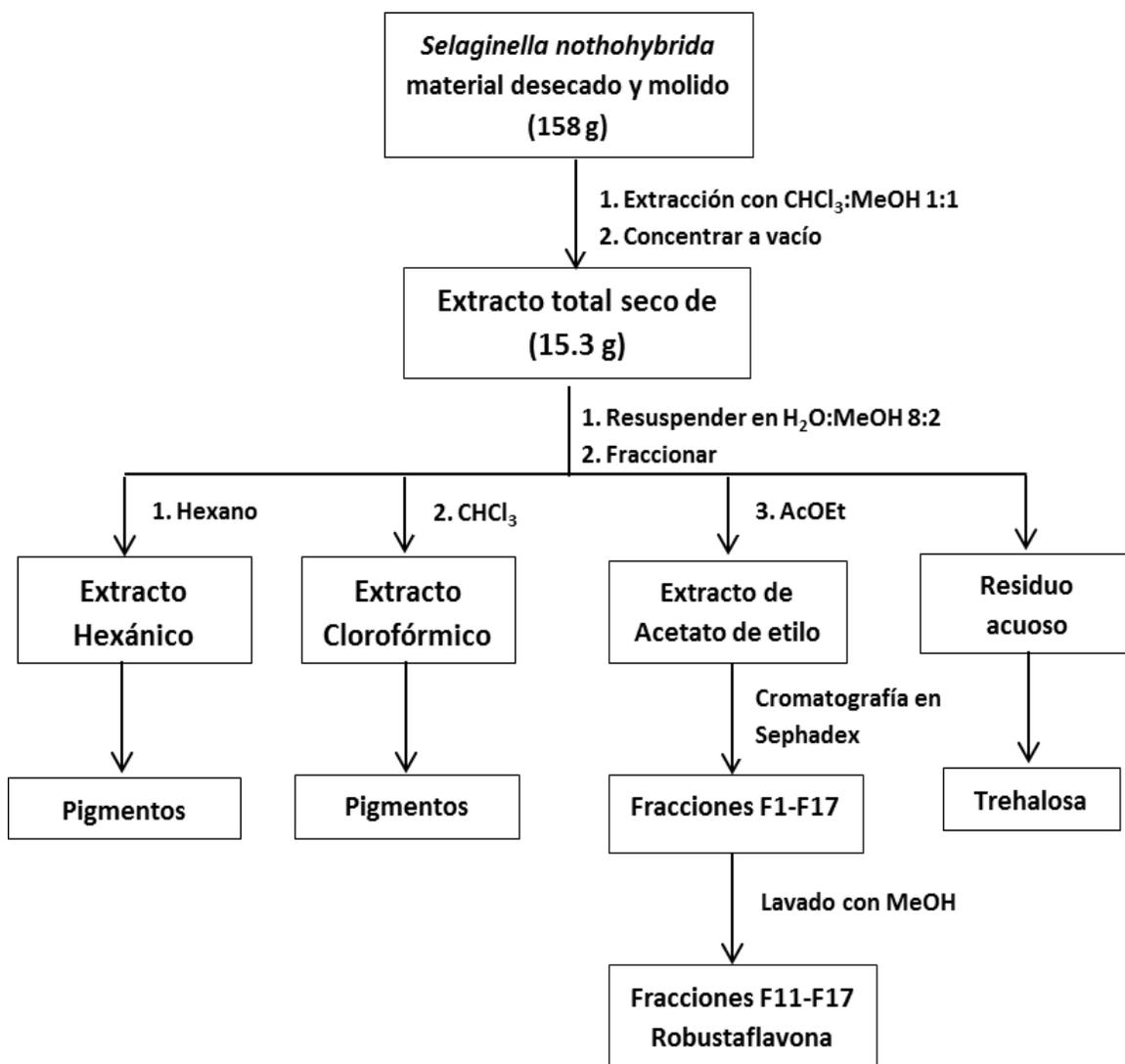


**Figura 12.** Maceración de *S. nothohybrida*.



### 5.4.3 Fraccionamiento del extracto total de *S. nothoxybrida*

El extracto total (15.3 g) fue resuspendido en 100 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2) y se sometió a un fraccionamiento por reparto líquido-líquido, con disolventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo y acetato de etilo, respectivamente (Esquema 2).



**Esquema 2.** Procesamiento de la especie vegetal *S. nothoxybrida*.



#### 5.4.4 Aislamiento y purificación de robustaflavona (2)

La fracción de acetato de etilo obtenida de *S. nothohybrida* se sometió a cromatografía en columna abierta empleando Sephadex LH-20 como adsorbente y MeOH R.A. como fase móvil, se obtuvieron eluatos de 100 mL. A partir de la fracción F4 hasta la F9 se obtuvo una mezcla de 3 compuestos mayoritarios visualizados por CCF, a partir del eluato número 11 hasta el 17 se obtuvo por precipitación robustaflavona (Esquema 2), como se comprobó al comparar por CCF con una muestra de referencia obtenida en el laboratorio 111. Las fracciones siguientes contenían una mezcla de 3 compuestos mayoritarios. El precipitado fue separado del sobrenadante, y posteriormente se sometió a lavados con MeOH para purificarlo.

#### 5.5 Preparación del extracto acuoso de *S. nothohybrida*

El extracto acuoso fue preparado previamente en el laboratorio 111 de acuerdo a la siguiente metodología: el material vegetal (500 g) fue sometido a un proceso de decocción con 5 L de agua, el extracto fue filtrado al vacío y concentrado a presión reducida; una vez que el volumen de agua se redujo al mínimo, el concentrado final fue sometido a un proceso de liofilización, hasta obtener los extractos secos, los cuales se colocaron en frascos de vidrio sellados, y conservados a temperatura ambiente (Colín, 2010).

#### 5.6 (*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona y trehalosa

El compuesto (*S*)-2,3-dihidrorobustaflavona al igual que trehalosa fueron aislados previamente en el laboratorio 111 (Guevara, 2008; Lara, 2014).



## 5.7 Ensayo biológico

### 5.7.1 Animales de laboratorio

Ratones macho BALB/c (de 25-30 g de peso corporal) fueron alojados en una habitación con luz y temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C, ciclo de 12 h luz/ oscuridad), con libre acceso de agua y alimento (Figura 13), los animales se dividieron en grupos (n=6) uno por cada compuesto a evaluar: amentoflavona (1), robustaflavona (2), (S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3), trehalosa (4) y decocción de *S. nothohybrida*; un grupo control recibió únicamente agua (n=6) y otro grupo recibió el fármaco de referencia furosemida (n=6).

Para evaluar el posible mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo la diuresis se emplearon grupos con n=6; todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.



**Figura 13.** Ratones macho BALB/c.

### 5.7.2 Preparación de la muestra

Los compuestos puros presentes en ambas especies: amentoflavona (1), robustaflavona (2), (S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3), trehalosa (4), decocción de *S. nothohybrida*, así como el fármaco de referencia furosemida se prepararon a una dosis de 10 mg/kg de peso; el extracto acuoso de *S. nothohybrida* se preparó a 2 g/kg de peso, ajustando las cantidades anteriormente mencionadas y resuspendiéndolas en un



mL de agua por ratón; se empleó DMSO hasta el 2% para el caso de las muestras que fueron de difícil disolución y para el control sólo se usó agua (1 mL por ratón).

Para el estudio del mecanismo de acción, se pesó la cantidad necesaria de los antiinflamatorios no esteroideos para ajustar a una dosis de 10 mg/kg y se resuspendieron en 0.5 mL de agua por ratón; los compuestos puros amentoflavona (1), robustaflavona (2) y trehalosa (4), así como el fármaco de referencia furosemida se prepararon a una dosis de 10 mg/kg de peso y el extracto acuoso de *S. nothohybrida* 2 g/kg, resuspendiéndose cada uno de estos compuestos en 0.5 mL de agua por ratón.

#### **5.7.5 Prueba de diuresis**

Para la evaluación del efecto diurético de los compuestos de prueba se emplearon ratones los cuales son un modelo ampliamente confiable y utilizado para este tipo de experimentos (Mazid *et al.*, 2009). Grupos de 6 ratones fueron colocados en jaulas metabólicas privadas de alimentos y con libre acceso al agua durante el experimento. Primeramente se les administró v.o. la muestra previamente preparada y al grupo control se le administró v.o. 1 mL de agua; se recolectaron las muestras de orina a las 2 y 4 h después de la administración del tratamiento; se midió el volumen de orina excretado y se pesó. Se tomaron datos de pH, conductividad y la densidad relativa, la cual se determinó dividiendo el peso de la orina total entre el volumen total de ésta, las muestras se guardaron en refrigeración para su posterior análisis de electrolitos.

### **5.8 Evaluación en presencia de inhibidores de COX's para determinar el mecanismo de acción de los compuestos evaluados**

Para determinar el mecanismo de acción, los metabolitos activos así como el extracto se evaluaron frente a un determinado inhibidor de COX para evaluar el papel



de las prostaglandinas y evaluar su importancia en el mecanismo de diuresis. Cuatro grupos de 6 ratones (de 25-30 g de peso) fueron colocados en una jaula metabólica, primeramente se les administró v.o. de manera independiente un antiinflamatorio no esteroideo (ácido acetilsalicílico, naproxeno sódico, indometacina y celecoxib), 30 minutos después se administró v.o. a cada uno de estos grupos el compuesto a evaluar de manera individual a una dosis de 10 mg/kg de peso (amentoflavona, robustaflavona, trehalosa) o el extracto acuoso previamente liofilizado a dosis de 2 g/kg de peso.

### 5.8.1 Acción diurética

La acción diurética fue medida como la relación entre el volumen urinario excretado por el grupo tratado con el metabolito secundario y el grupo control al cual se le administró únicamente agua (Mukherjee 2002).

$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{volumen excretado por el grupo problema}}{\text{volumen excretado por el grupo control}}$$

### 5.8.2 Actividad diurética

Para obtener la actividad diurética, la acción diurética de los grupos tratados con los metabolitos secundarios y el extracto es relacionada con la acción diurética del fármaco de referencia furosemida, mediante la siguiente ecuación (Mukherjee 2002).

$$\text{Actividad diurética} = \frac{\text{Acción diuretica del grupo problema}}{\text{Acción diuretica de farmaco de referencia}}$$

## 5.9 Cuantificación de electrolitos

### 5.9.1 Digestión de las muestras

Se realizó el proceso de digestión de la muestras por microondas en el cual se tomaron 500 µL con una micropipeta y se colocaron en vasos especiales de teflón, se



pesaron en una balanza analítica, se les adicionaron 2.5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, se cerraron y se acondicionaron para ser calentadas durante 2 h en un equipo de microondas, para que ocurra la degradación completa de la muestra (Figura 14).

El resultado tras la digestión es una disolución acuosa ácida de la muestra, adecuada para su posterior análisis mediante técnicas espectroscópicas.



**Figura 14.** Carrusel de muestras listas para la digestión.

### 5.9.2 Preparación de muestras para el análisis en EAA

El contenido resultante de la digestión se transfirió a matraces volumétricos de 10 mL y se llevó al aforo con agua. Para determinar la concentración de  $\text{Na}^+$  se realizaron diluciones 1/200 y para determinar la concentración de  $\text{K}^+$  se realizaron diluciones 1/1000, mismas que fueron colocadas en el muestreador del equipo de AA para su análisis.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consultó la literatura sobre plantas medicinales de nuestro país y se realizó una búsqueda de información a través de revistas de carácter científico sobre la “doradilla”. No se encontraron reportes de estudios farmacológicos previos para *S. nothohybrida* ni para la especie *S. wrightii*.

### 6.1 Aislamiento de amentoflavona a partir de la especie *Selaginella wrightii*

El extracto total obtenido de esta especie vegetal fue sometido a fraccionamiento por reparto con hexano, cloroformo y acetato de etilo. La fracción hexánica, de coloración verde oscura y consistencia pastosa, mostró un alto contenido en clorofilas; el extracto clorofórmico y de acetato de etilo presentaron una tonalidad amarilla, la cromatografía en capa delgada realizada a estas fracciones mostró que el contenido de biflavonoides de interés se encontraba presente.

El extracto clorofórmico así como el de acetato de etilo se procesaron independientemente por cromatografía en columna abierta en Sephadex LH-20 obteniéndose de ambas fracciones que contenían como compuesto mayoritario amentoflavona (1) el producto se purificó realizando nuevamente cromatografía en columna abierta en Sephadex LH-20.

#### 6.1.1 Determinación de la estructura de amentoflavona (1)

De manera general, los biflavonoides son dímeros de flavonoide; los enlaces que los conectan entre sí son principalmente de dos tipos: bifenilo en los cuales se forman enlaces C-C y bifenil éter los cuales forman enlaces C-O-C, los que pueden estar localizados en C-3' y C-8'' de los esqueletos flavonoide. Los biflavonoides del tipo amentoflavona tienen su enlace interflavonoide de tipo bifenilo y se da entre los carbonos 3'-8'', en este caso el espectro de RMN <sup>1</sup>H contiene siempre un sistema de



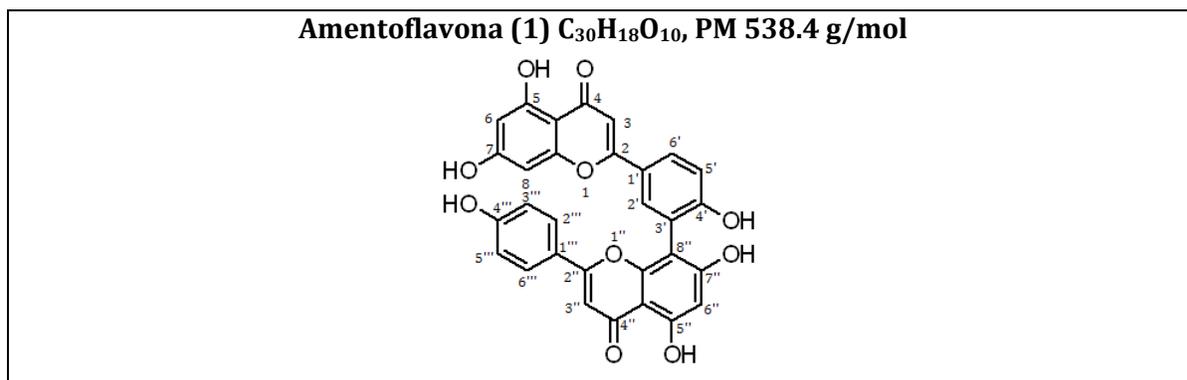
señales ABX (hidrógenos H-2', 5' y 6'), un sistema AX (H-6' y 8'), un sistema  $A_2X_2$  (H-2'', 6'' y H-3'', 5'') y tres señales aisladas (H-3, 3'' y 8' ó 6') (Anexo 2).

La estructura de amentoflavona fue corroborada por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear, en cuyo espectro de  $^1\text{H}$  (Tabla 10) se observó el sistema ABX con señales en  $\delta_{\text{H}}$ : 8.15 (d,  $J=2.4$  Hz, H-2'), 8.02 (dd,  $J=8.68, 2.4$  Hz, H-6') y 7.25 (d,  $J=8.68$  Hz, H-5'). Las señales correspondientes al sistema  $A_2X_2$  se localizaron en  $\delta_{\text{H}}$ : 7.65 (d,  $J=8.88$  Hz, H-2'', 6'') y 6.83 (d,  $J=8.88$  Hz, H-3'', 5''), las señales doblete en  $\delta_{\text{H}}$ : 6.51 y 6.25 con constante de acoplamiento  $J=2.12$  Hz, corresponden a los hidrógenos H-6 y H-8 que se encuentran en posición meta en concordancia con el espectro COSY (Anexo 4). Se observaron también tres señales singulete en  $\delta_{\text{H}}$ : 6.72, 6.65 y 6.45 asignados a los protones H-3, H-3'' y H-6'', el enlace interflavonoide entre el C-3'-C-8'' se corroboró con el experimento HMBC (Anexo 6) con base en la correlación entre H-2' y C-8''. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  confirmó la presencia de 30 átomos de carbono en esta molécula (Anexo 3) y sus correspondientes hidrógenos se observaron en el experimento HSQC (Anexo 5).

En la Tabla 10 se muestran la estructura y los datos espectroscópicos de la amentoflavona (1), los cuales coinciden con los reportados por Zhang (2011).

**IR:** (ATR) 3096, 1650, 1603, 1353, 1293, 1238, 1164, 1132, 829  $\text{cm}^{-1}$  (Anexo 1).

**Tabla 10.** Datos espectroscópicos de amentoflavona (1), 400 MHz acetona- $d_6$





RMN <sup>1</sup> H			
<b>Anexo 2</b>			
Asignación	δ (ppm)	J (Hz)	
H-3	6.72	S	
H-6	6.25	d, J=2.12 Hz	
H-8	6.51	d, J=2.12 Hz	
H-2'	8.13	d, J=2.4 Hz	
H-5'	7.25	d, J=8.68 Hz	
H-6'	8.02	dd, J=8.68, 2.4 Hz	
H-3''	6.65	S	
H-6''	6.45	S	
H-2'''/H-6'''	7.65	d, J=8.88 Hz	
H-3'''/H-5'''	6.83	d, J=8.88 Hz	
OH-5	12.99	S	
OH-5''	13.15	S	

RMN <sup>13</sup> C			
<b>Anexo 3</b>			
Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
2	164.92	2''	165.10
3	104.37	3''	103.76
4	183.45	4''	183.07
5	162.73	5''	162.73
6	99.79	6''	99.79
7	163.33	7''	163.33
8	94.82	8''	104.45
9	158.84	9''	156.12
10	105.51	10''	105.34
1'	123.30	1'''	123.30
2'	132.62	2'''	129.14
3'	120.90	3'''	116.72
4'	160.32	4'''	161.84
5'	117.54	5'''	116.72
6'	128.81	6'''	129.14

## 6.2 Aislamiento de robustaflavona a partir de la especie *Selaginella nothoybrida*

El extracto total de *S. nothoybrida* se observó de coloración verde oscuro y consistencia viscosa; éste se sometió a un fraccionamiento por reparto con hexano, cloroformo y acetato de etilo. La partición hexánica tuvo una coloración verde oscura



y resultó con un alto contenido de clorofilas. La partición clorofórmica se observó de una tonalidad amarilla y la cromatografía en capa delgada mostró que tenía un contenido principal de pigmentos. La partición de acetato de etilo se observó con una coloración amarilla, la cromatoplaqueta realizada a ésta reveló cuatro manchas correspondientes a los biflavonoides de interés, por lo cual se prosiguió al aislamiento de los compuestos.

La fracción de acetato de etilo se sometió a cromatografía en columna abierta en Sephadex LH-20; a partir de ésta se obtuvo robustaflavona como un precipitado amarillo que se formó en la fracción combinada F11-F17.

### 6.2.1 Determinación de la estructura de robustaflavona (2)

En el biflavonoide robustaflavona (2) el sistema ABX se encuentra localizado de manera diferente al caso de amentoflavona ya que H-B se desplaza a campo más bajo que H-X contrario a lo que sucede con amentoflavona donde H-X se encuentra a campo más bajo que H-B, además de que en robustaflavona (2) la rama  $A_2$  del sistema  $A_2X_2$  se encuentra desplazada a campo más bajo que el sistema ABX.

La estructura de robustaflavona fue corroborada por Resonancia Magnética Nuclear, en el espectro de RMN  $^1H$  se observó el sistema ABX con señales en  $\delta_H$ : 9.32 (d,  $J=9.32$  Hz, H-5'), 7.95 (dd,  $J=8.68, 2.4$  Hz, H-6'),  $\delta_H$ : 7.94 (s, H-2'). Las señales correspondientes al sistema  $A_2X_2$  se localizaron en  $\delta_H$ : 7.98 (d,  $J=8.88$  Hz, H-2'''/H-6'''), 7.05 (d,  $J=8.88$  Hz, H-3'''/H-5'''), las señales doblete en  $\delta_H$ : 6.25 y 6.55 con constante de acoplamiento  $J=2.12$  Hz, corresponden a los hidrógenos H-6 y H-8 que se encuentran en posición meta en concordancia con el espectro COSY (Anexo 11). Se observaron también tres singuletes en  $\delta_H$ : 6.73, 6.69, 6.69 asignados a los protones H-3'', H-3 Y H-8'', el enlace interflavonoide entre el C-3'-C-6'' se corroboró con el experimento HMBC (Anexo13). El espectro de RMN $^{13}C$  confirmó la presencia de 30 átomos de carbono en



esta molécula (Anexo 10) y sus correspondientes hidrógenos se observaron en el experimento HSQC (Anexo 12).

En la tabla 11 se muestran la estructura y los datos espectroscópicos del compuesto robustaflavona (2), los cuales coinciden con los reportados por Zhang (2011).

**IR:** (ATR) 3134, 3076, 2918, 1655, 1604, 1563, 1497, 1450, 1354, 1239, 1171, 1115, 1029, 830  $\text{cm}^{-1}$  (Anexo 8).

**Tabla 11.** Datos espectroscópicos de robustaflavona (2), 400 MHz acetona- $d_6$

Robustaflavona (2) $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ , PM 538.4 g/mol		
RMN <sup>1</sup> H		
<b>Anexo 9</b>		
Asignación	$\delta$ (ppm)	J (Hz)
H-3	6.6975	S
H-6	6.25	d, J=2.12 Hz
H-8	6.55	d, J=2.12 Hz
H-2'	7.94	S
H-5'	9.32	d, J=9.32 Hz
H-6'	7.95	dd, J=8.68, 2.4 Hz
H-3''	6.73	s
H-8''	6.6932	s
H-2'''/H-6'''	7.98	d, J=8.88 Hz
H-3'''/H-5'''	7.05	d, J=8.88 Hz
OH-5	13.05	S
OH-5''	13.46	S



RMN <sup>13</sup> C			
Anexo 10			
Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
2	163.11	2''	132.31
3	105.41	3''	105.41
4	165.25	4''	183.10
5	161.21	5''	160.9
6	99.69	6''	109.17
7	165.06	7''	164.70
8	94.75	8''	94.75
9	158.88	9''	158.26
10	104.19	10''	104.19
1'	123.19	1'''	123.35
2'	132.31	2'''	129.33
3'	123.35	3'''	116.90
4'	160.39	4'''	161.92
5'	117.53	5'''	116.90
6'	128.56	6'''	129.33

### 6.3 Evaluación farmacológica de diuresis inducida por los compuestos (1-4) y el extracto acuoso en modelo de ratón

#### 6.3.1 Efectos en la excreción urinaria

Se analizaron diferentes parámetros para determinar la acción diurética de los metabolitos aislados y el extracto de *S. nothohybrida*, de tal forma que se determinó la concentración de electrolitos en orina ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), volumen de orina excretado (mL), pH, conductividad y densidad de la orina. Furosemida se utilizó como diurético de referencia.

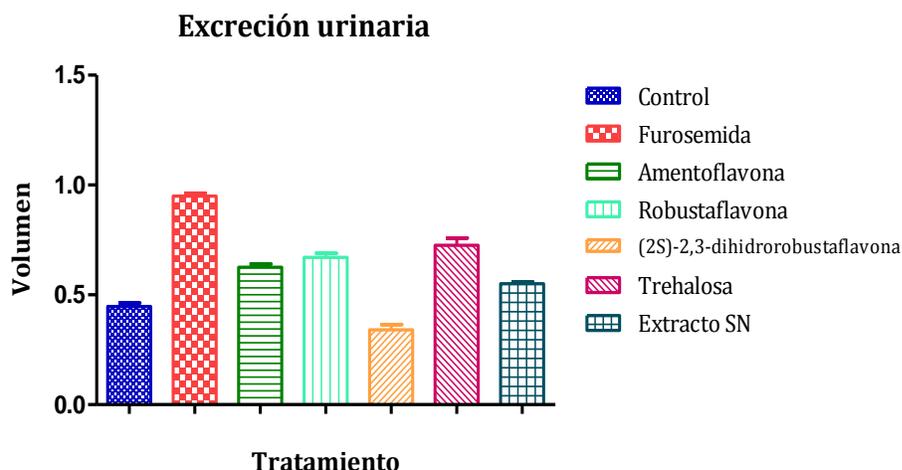
La furosemida es un diurético de asa que produce una diuresis de instauración rápida y corta duración, bloquea el sistema de cotransporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ , localizado en la membrana de la célula luminal de la rama ascendente del asa de Henle: la eficacia de la acción salurética de la furosemida, por consiguiente, depende del fármaco que llega a los túbulos a través de un mecanismo de transporte de aniones.



La acción diurética resulta de la inhibición de la resorción de cloruro sódico en este segmento del asa de Henle. Los efectos secundarios de la excreción aumentada de sodio son el incremento de la excreción de orina (debido al agua unida por ósmosis) y el incremento de la secreción de potasio del túbulo distal. La excreción de iones calcio y magnesio también resulta aumentada. Es recomendable el uso de furosemida como fármaco de referencia (Gasparotto, 2009), con un tiempo de duración del experimento de 4 h ya que el inicio de la diuresis después de la administración oral ocurre en 1 h. El efecto máximo ocurre dentro de la primera o segunda hora y la duración del efecto diurético es entre 6 a 8 horas (S.S.A., 2005).

Furosemida induce significativa excreción de orina, 2.06 veces la diuresis causada por el agua, la concentración de  $\text{Na}^+$  obtenida fue de  $132.2 \pm 5.9$  mmol/L y  $315.5 \pm 5.0$  de  $\text{K}^+$  mmol/L, valores que se encuentran elevados debido al mecanismo de acción de este fármaco cuando se compara con el grupo control al cual únicamente se le administró el vehículo (Tabla 12).

La Figura 13 muestra un importante incremento en la excreción urinaria inducido por la administración oral de los compuestos y extracto de prueba, siendo ésta más notoria para el compuesto robustaflavona (2) el cual resultó ser el más activo de los biflavonoides evaluados con 1.45 de acción diurética; en amentoflavona (1) la acción diurética fue de 1.34 y el compuesto 3 no fue activo ya que la excreción urinaria de los ratones tratados con éste no superó la excreción ejercida por el grupo control (Figura 15). El azúcar trehalosa (4) mostró el valor más alto de acción diurética el cual fue de 1.58 con una actividad diurética de 0.76 cuando se compara con el fármaco de referencia furosemida.



**Figura 15.** Excreción urinaria inducida por los compuestos de prueba y el extracto, 4 h después de la administración oral de éstos.

**Tabla 12.** Acción diurética y actividad diurética de los compuestos probados a las 4 h después de la administración oral

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Acción diurética	Actividad diurética
Agua, 1 mL (control)	0.46±0.03	1	0.484
Furosemida	0.95±0.01	2.065	1
Robustaflavona (2)	0.67±0.03	1.456	0.705
Amentoflavona (1)	0.62±0.02	1.347	0.652
(S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3)	0.34±0.02	0.760	0.368
Trehalosa (4)	0.73±0.03	1.586	0.7684
Extracto <i>S. nothoxytricha</i>	0.54±0.02	1.195	0.5789

Los datos se muestran como el promedio ± el error estándar de la media.

### 6.3.2 Efecto de la excreción de electrolitos en la orina

Furosemida tiene un importante efecto salurético, debido a su mecanismo de acción antes mencionado, el incremento en la diuresis inducida por amentoflavona (1) mostró un efecto salurético menor al del grupo control a diferencia de robustaflavona la cual induce una significativa excreción de Na<sup>+</sup> aunque la concentración de K<sup>+</sup> excretado es menor que la del grupo control. El análisis de los valores muestra que a



pesar de que estos dos biflavonoides tienen estructuras muy similares, presentan un mecanismo de acción diferente entre ellos; es bien conocido que este tipo de compuestos (biflavonoides) incrementa la circulación renal, así como la tasa de filtración glomerular lo cual promueve un incremento en la formación de orina. (Loew *et al.*, 1991). (S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3) no mostró actividad, lo que fue evidente en cuanto a que la excreción urinaria que indujo este compuesto fue menor a la del grupo control (agua); sin embargo, presenta un importante efecto natriurético y kaliurético, de hecho, con los valores más altos con respecto a todos los compuestos evaluados, esto puede deberse a que la orina se encuentra concentrada debido a la poca cantidad de agua que se eliminó. Este compuesto al igual que robustaflavona presenta un comportamiento similar al de furosemida (Tabla 13) ya que los tres tienen efecto natriurético. El incremento en la diuresis inducida por el azúcar trehalosa (4) no se reflejó de igual manera en la excreción de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) ya que la concentración de éstos en la orina fue menor a la del grupo control, se sugiere que este azúcar está induciendo diuresis de tipo osmótica ya que ésta se produce al administrar compuestos como el manitol y polisacáridos afines, los cuales se filtran pero no se reabsorben; la diuresis osmótica también se provoca por la presencia de ciertas sustancias como glucosa (Segarra, 2003). Los diferentes resultados de excreción de electrolitos obtenidos de los compuestos 1-4 y el extracto indican una diferencia importante en su perfil diurético.

El extracto acuoso de la planta tuvo menor actividad que los compuestos puros esto puede deberse al hecho de que probablemente en el extracto se esté llevando a cabo un efecto aditivo por parte de los compuestos activos, además de la presencia de otras sustancias carentes de actividad diurética que incluso pudieran estar interfiriendo con la actividad diurética del extracto.

**Tabla 13.** Concentración de electrolitos en la orina excretada

Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	Concentración de electrolitos en orina	
			Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Agua, 1 mL (control)	6		87.0±5.4	280.8±6.1
Furosemida	6	10	132.2±5.9	315.5±5.0
Amentoflavona (1)	6	10	69.8±5.7	161.5±2.5
Robustaflavona (2)	6	10	122.3±5.7	181.9±8.5
(S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3)	6	10	139.0±7.4	377.2±8.8
Trehalosa (4)	6	10	81.4±4.2	246.5±7.6
Extracto acuoso	6	2000	84.0±2.3	195.6±3.4

Los resultados muestran los valores medios  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.); n= número de ratones usado en cada grupo.

### 6.3.3 Características físicas de la orina excretada a las 4 h de la administración oral de los compuestos 1-4 y el extracto

La medición del pH, así como la conductividad y densidad de la orina excretada son parámetros importantes para evaluar los cambios en las características fisicoquímicas de ésta, después de administrar los diferentes tratamientos.

Las características fisicoquímicas de la orina excretada no sufrieron cambios importantes, sin embargo el pH se observó aumentado cuando se administró furosemida, amentoflavona (1) y robustaflavona (2). Es conocido que los agentes diuréticos del tipo de furosemida causan alcalosis (Abdala *et al.*, 2008). La medición de la densidad de la orina es un método sencillo y rápido que indica el peso de los solutos disueltos en la orina; el valor de ésta se obtiene al comparar el peso de la orina entre los mililitros de ésta (densidad relativa). El fundamento de esta prueba radica en que la densidad es reflejo de la concentración, aunque en orinas con una concentración elevada de solutos de alto peso molecular (como glucosa) el valor de la densidad es superior a la concentración estimada. La densidad de la orina excretada por los ratones a los cuales se les administraron los compuestos de prueba y el extracto no se vio modificada de manera importante ya que se mantuvo en un rango de 1.012 g/mL a 1.064 g/mL (Tabla 14), valores muy cercanos a 1 g/mL. La



conductividad en medios líquidos está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar energía eléctrica; estos conductores iónicos se denominan electrolitos. Se puede observar que la conductividad varió de acuerdo a la concentración de estos conductores presentes en la muestra, sin dejar de lado que el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  no son los únicos iones que ahí se encuentran, por lo que el valor de conductividad únicamente puede indicar si la concentración de iones en la muestra de orina es alta o baja.

**Tabla14.** Efecto del tratamiento en las características fisicoquímicas de la orina excretada

Tratamiento	<i>n</i>	Dosis (mg/Kg)	pH	Conductividad	Densidad
Agua, 1 mL (control)	6		4.98	-0.41	1.064
Furosemida	6	10	5.33	-0.77	1.012
Robustaflavona (2)	6	10	5.17	-0.64	1.005
Amentoflavona (1)	6	10	5.41	-0.42	1.033
(S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3)	6	10	4.17	-0.32	1.108
Trehalosa (4)	6	10	4.23	-0.36	1.022
Extracto acuoso	6	2000	4.15	-0.31	1.045

### 6.3.4 Análisis estadístico

Para los volúmenes promedio de excreción de orina totales a las 4 horas después de la administración de los compuestos 1-4, el extracto acuoso de *S. nothohybrida*, el fármaco de referencia furosemida y el control, los valores estadísticos fueron obtenidos mediante la utilización del programa GraphPad Prism 5 en el cual se hizo el ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett y Tukey.

#### 6.3.4.1 Análisis de varianza para los volúmenes promedio finales inducido por todos los tratamientos

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales (las medias de la variable dependiente de cada nivel de la variable



independiente) son iguales. Si las medias poblacionales son iguales eso significa que los grupos no difieren en la VD y que en consecuencia, la VI o factor es independiente de la VD.

El análisis de ANOVA para el estudio farmacológico de diuresis tuvo un valor de  $p < 0.0001$  a un nivel de significancia de 0.05 lo cual nos indica que las medias de los siete grupos analizados son estadísticamente diferentes por lo que se rechaza la  $H_0$  de que todos los grupos son iguales y no presentan diferencias y se acepta la  $H_a$  la cual indica que al menos uno de los grupos es diferente.

#### 6.3.4.2 Análisis de comparación múltiple Dunnett

La prueba de Dunnett es útil para comparar el tratamiento control (testigo) con otros tratamientos, en el caso de un grupo tratado con placebo (control) y varios grupos tratados con terapias cuya eficacia se quiere comparar respecto al grupo basal (control).

**Tabla 15.** Prueba de Dunnett

Comparación múltiple Dunnett	Diferencia media	Significante $P < 0.05$	Intervalo de confianza (95%)
Control vs Furosemida	-0.5033	Si	-0.5804 a -0.4262
Control vs amentoflavona	-0.1783	Si	-0.2554 a -0.1012
Control vs robustaflavona	-0.2233	Si	-0.3004 a -0.1462
Control vs (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	0.1067	Si	0.02956 a 0.1838
Control vs trehalosa	-0.2783	Si	-0.3554 a -0.2012
Control vs Extractos SN	-0.1033	Si	-0.1804 a -0.02622

En la Tabla 15 se observa que el análisis comparativo de Dunnett a un nivel de confianza de 95% indicó que todos los tratamientos son estadísticamente diferentes al del control administrado, es decir que los compuestos tienen actividad diurética a excepción del compuesto (S)-2,3-dihidrorobustaflavona (3), el cual tiene efecto antidiurético.



### 6.3.4.3 Análisis de comparación múltiple de Tukey

La prueba de Tukey involucra una comparación múltiple de un solo paso, se utiliza en conjunción con un ANOVA para encontrar medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla 16.** Prueba de Tukey

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia media	Significante P < 0.05	Intervalo de confianza (95%)
Control vs Furosemida	-0.5033	Si	-0.5927 to -0.4139
Control vs amentoflavona	-0.1783	Si	-0.2677 to -0.08895
Control vs robustaflavona	-0.2233	Si	-0.3127 to -0.1339
Control vs (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	0.1067	Si	0.01728 to 0.1961
Control vs trehalosa	-0.2783	Si	-0.3677 to -0.1889
Control vs Extracto SN	-0.1033	Si	-0.1927 to -0.01395
Furosemida vs amentoflavona	0.3250	Si	0.2356 to 0.4144
Furosemida vs robustaflavona	0.2800	Si	0.1906 to 0.3694
Furosemida vs (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	0.6100	Si	0.5206 to 0.6994
Furosemida vs trehalosa	0.2250	Si	0.1356 to 0.3144
Furosemida vs Extracto SN	0.4000	Si	0.3106 to 0.4894
Amentoflavona vs robustaflavona	-0.04500	No	-0.1344 to 0.04439
Amentoflavona vs (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	0.2850	Si	0.1956 to 0.3744
Amentoflavona vs trehalosa	-0.1000	Si	-0.1894 to -0.01061
Amentoflavona vs Extracto SN	0.07500	No	-0.01439 to 0.1644
Robustaflavona vs (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	0.3300	Si	0.2406 to 0.4194
Robustaflavona vs trehalosa	-0.05500	No	-0.1444 to 0.03439
Robustaflavona vs Extracto SN	0.1200	Si	0.03061 to 0.2094
(S)-2,3-dihidrorobustaflavona vs trehalosa	-0.3850	Si	-0.4744 to -0.2956
(S)-2,3-dihidrorobustaflavona vs Extracto SN	-0.2100	Si	-0.2994 to -0.1206
Trehalosa vs Extractos SN	0.1750	Si	0.08561 to 0.2644

En la Tabla 16 se observan los resultados del análisis de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza de 95%. Los datos estadísticos muestran que después del fármaco de referencia furosemida, el más activo fue trehalosa seguido por robustaflavona, amentoflavona, el extracto acuoso y el compuesto (S)-2,3-dihidrorobustaflavona, el cual, como se ha mencionado, se consideró sin actividad, por lo que la diferencia entre los ratones tratados con furosemida y los tratados con trehalosa no fue muy significativa en comparación con los ratones que recibieron el compuesto (S)-2,3-dihidrorobustaflavona.



Entre los tratamientos con amentoflavona vs robustaflavona, estadísticamente la diferencia no fue significativa, así como en el caso de amentoflavona vs extracto acuoso, lo que nos indica que amentoflavona puede tener una actividad equiparable a la del compuesto robustaflavona y el extracto acuoso.

El tratamiento de robustaflavona vs el tratamiento de trehalosa estadísticamente no fue diferente; sin embargo, sí fue significativa comparado con el tratamiento con extracto acuoso.

#### **6.4 Estudio en presencia de inhibidores de COX's que involucra a las prostaglandinas en la acción diurética**

Para evaluar el papel de las prostaglandinas en la diuresis y proponer un posible mecanismo de acción de los compuestos evaluados que mostraron efecto diurético, éstos se trataron con cuatro inhibidores de enzimas COX's. Dichas enzimas al ser inhibidas traen como consecuencia la interrupción de la síntesis de prostaglandinas las cuales son de importancia en la diuresis como se mencionó en el apartado de antecedentes.

Primeramente se evaluó si existía variación en los volúmenes de excreción urinaria así como en las características fisicoquímicas de la orina de los ratones empleando inhibidores de COX's inespecíficos como es el caso de ácido acetilsalicílico, naproxeno sódico e indometacina. Los valores obtenidos a partir de la administración conjunta de inhibidores de COX inespecíficos con los compuestos y el extracto de *S. nothoybrida* mostraron que hubo una importante inhibición de la acción diurética ejercida por los tres AINE's administrados con todos los compuestos de prueba. Por otra parte y continuando con el experimento, se administró un inhibidor específico de COX-2 (Celecoxib) el cual produjo los más altos datos de inhibición del efecto diurético ejercido por todos los compuestos evaluados, estos datos nos permiten atribuir un papel relevante a la actividad de esta enzima para el proceso de diuresis,



probablemente los compuestos administrados tengan un mecanismo de acción favorecido por la enzima COX-2.

La inhibición de la síntesis de prostaglandinas renales ejercida por los inhibidores de COX's reduce la tasa de filtración glomerular y el flujo renal lo que explica la disminución del efecto diurético; al administrar los compuestos de prueba, éstos no ejercen su efecto diurético ya que la cantidad de prostaglandinas renales está disminuida lo cual no favorece el incremento de circulación renal promovido por los biflavonoides (Lote, 1982).

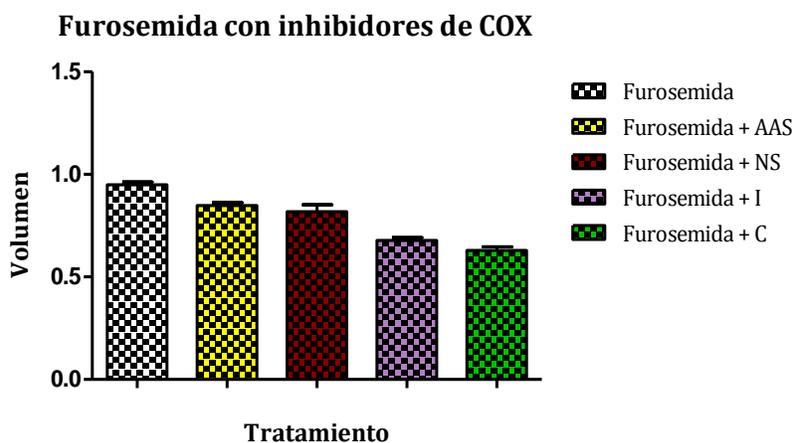
Furosemida y robustaflavona mostraron un comportamiento similar cuando los ratones fueron tratados con AAS, naproxeno sódico e indometacina ya que en todos los casos se inhibió el efecto diurético de ambas, además de que la concentración de electrolitos disminuyó considerablemente en los tres casos (Tabla 9) siendo más importante el efecto en el caso de indometacina. Un contraste con lo anterior, ocurrió con amentoflavona (1), trehalosa (4) y el extracto, ya que a pesar de que estos observaron concentraciones de electrolitos por debajo del grupo control cuando se administraron solos, al ser administrados conjuntamente con los inhibidores de COX's inespecíficos, la concentración de electrolitos determinada en la orina excretada por estos tratamientos aumentó en los tres casos. Se puede notar que los resultados de los tratamientos con los tres inhibidores de COX's inespecíficos fueron similares entre ellos (Tablas 19, 21, 23, 25).

Las características fisicoquímicas de la orina no se vieron modificadas de manera importante, el pH de la orina excretada después del tratamiento con los AINE's se volvió ligeramente más ácido en todos los casos, los salicilatos actúan sobre los túbulos renales afectando la resorción del ácido úrico, lo que ocasiona un efecto uricosúrico (Instituto Químico Biológico, 2014) lo cual podría explicar la acidificación de la orina además de que puede haber déficit en la reabsorción de  $H_2CO_3$  filtrado, la densidad de la orina se mantuvo aproximada a 1 g/mL, por otra parte, la conductividad la cual es una medida indirecta del contenido iónico en la orina varió de acuerdo a la concentración de electrolitos presentes en ésta.



#### 6.4.1 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por furosemida en presencia de inhibidores de COX's

Los ratones que fueron tratados primeramente con AAS, naproxeno sódico e indometacina y 30 minutos después con furosemida mostraron inhibición de su efecto diurético siendo más importante el efecto en el caso del inhibidor específico de COX-2 el cual mostró un 33.6 % de inhibición y la inhibición más baja se dio con AAS (10.5 %) (Fig. 16). La concentración de electrolitos también disminuyó de acuerdo a la disminución de orina excretada, observándose un importante efecto kalurético en el caso del AINE ácido acetilsalicílico (Tabla 17). Como era de esperarse la conductividad disminuyó en todos los casos ya que la concentración de iones también disminuyó y el pH se acidificó (Tabla 18).



**Figura 16.** Excreción urinaria del fármaco de referencia Furosemida con inhibidores de COX.

**Tabla 17.** Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el fármaco de referencia Furosemida

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Dosis (mg/kg)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Furosemida + AAS	0.85±0.01	10	92.3±2.86	486.9±11.5
Furosemida +NS	0.82±0.03	10	125.2±1.6	186.7±9.5
Furosemida +I	0.68±0.01	10	77.5±10.2	49.5±4.7
Furosemida +C	0.63±0.01	10	58.8±9.4	40.1±4.2

Los resultados muestran los valores medios ± error estándar de la media (S.E.M.).



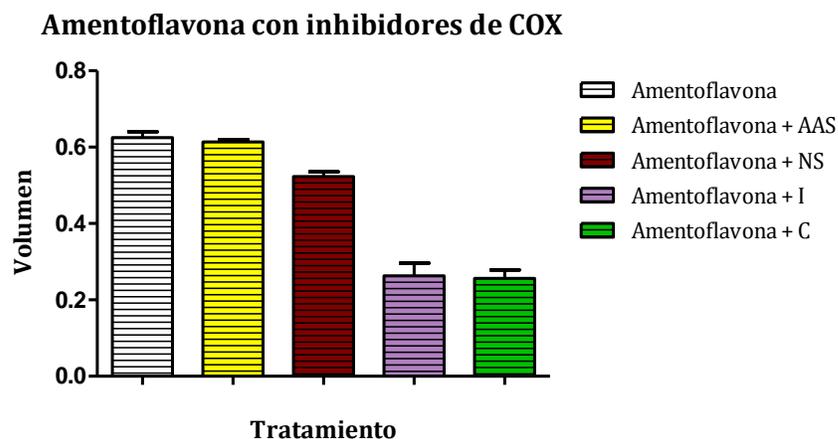
**Tabla 18.** Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores y el fármaco de referencia Furosemida

Tratamiento	<i>n</i>	Dosis (mg/kg)	pH	Conductividad	Densidad (g/mL)
Furosemida + AAS	6	10	4.58	-055	1.00
Furosemida +NS	6	10	4.40	-037	1.02
Furosemida +I	6	10	4.15	-035	1.03
Furosemida + C	6	10	4.23	-040	1.02

Se administraron inhibidores de COX 10 mg/Kg BW, 30 minutos después se administró el compuesto problema 10 mg/Kg, n= número de ratones usado en cada grupo.

#### 6.4.2 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por amentoflavona (1) en presencia de inhibidores de COX's

El compuesto amentoflavona (1) también tuvo una importante inhibición de su actividad diurética cuando se probó conjuntamente con indometacina y con celecoxib con porcentajes de inhibición de 58.0 y 59.6 %, respectivamente. La inhibición más baja se observó con AAS la cual fue de 3.22 %, este resultado coincidió con los obtenidos de furosemida con respecto a la disminución de la excreción urinaria (Figura 17); sin embargo, la concentración de electrolitos en el tratamiento de amentoflavona con los inhibidores de COX's aumentó en todos los casos con respecto al tratamiento de amentoflavona (1) sin inhibidores, es decir que la excreción urinaria disminuyó pero la concentración de electrolitos se elevó (Tabla 19), esto puede dar una idea de que el mecanismo de acción se está llevando a cabo de manera diferente al mecanismo de furosemida. Las características fisicoquímicas en este caso se muestran en la Tabla 20.



**Figura 17.** Excreción urinaria de amentoflavona con inhibidores de COX.

**Tabla 19.** Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto amentoflavona (1)

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Dosis (mg/kg)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Amentoflavona + AAS	0.60±0.01	10	107.7±3.83	293.7±8.42
Amentoflavona + NS	0.52±0.01	10	97.0±1.7	510.6±4.6
Amentoflavona + I	0.26±0.03	10	62.9±14.5	148.9±4.5
Amentoflavona + C	0.25±0.02	10	102.7±1.8	190.4±3.7

Los resultados muestran los valores medios ± error estándar de la media (S.E.M.).

**Tabla 20.** Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores y el compuesto amentoflavona (1)

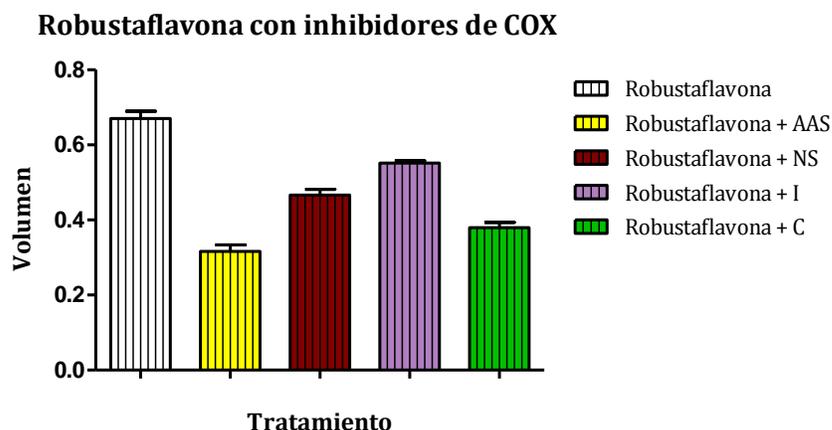
Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	pH	Conductividad	Densidad (g/mL)
Amentoflavona + AAS	6	10	4.30	-040	1.01
Amentoflavona + NS	6	10	4.47	-037	1.01
Amentoflavona + I	6	10	4.40	-049	1.03
Amentoflavona + C	6	10	4.35	-046	1.03

Dosis de administración de inhibidores de COX: 10 mg/kg, 30 minutos después administración del compuesto problema (10 mg/kg), n= número de ratones usado en cada grupo.



### 6.4.3 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por robustaflavona (2) en presencia de inhibidores de COX's

El compuesto robustaflavona (2) también presentó inhibición de su efecto diurético cuando se administró conjuntamente con inhibidores de COX; el valor más alto de inhibición obtenido fue de 52.2% con AAS y el más bajo lo presentó con indometacina el cual fue de 11.3% (Figura 18). Al disminuir la cantidad de orina excretada también disminuyó la concentración de electrolitos presentes en la orina tal como se vio en el caso del fármaco de referencia furosemida (Tabla 21). La Tabla 22 muestra las características fisicoquímicas de este experimento en donde se aprecian pequeños cambios en el pH, así como en la conductividad, relacionados con la excreción de electrolitos.



**Figura 18.** Excreción urinaria de robustaflavona con inhibidores de COX.

**Tabla 21.** Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto robustaflavona (2)

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Dosis (mg/kg)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Robustaflavona + AAS	0.32±0.01	10	64.6±6.58	154.5±2.05
Robustaflavona + NS	0.47±0.01	10	84.9±4.1	214.7±3.0
Robustaflavona + I	0.55±0.01	10	41.5±1.4	115.7±6.4
Robustaflavona + C	0.39±0.03	10	48.3±3.2	114.4±0.5

Los resultados muestran los valores medios ± error estándar de la media (S.E.M.).



**Tabla 22.** Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el compuesto robustaflavona (2)

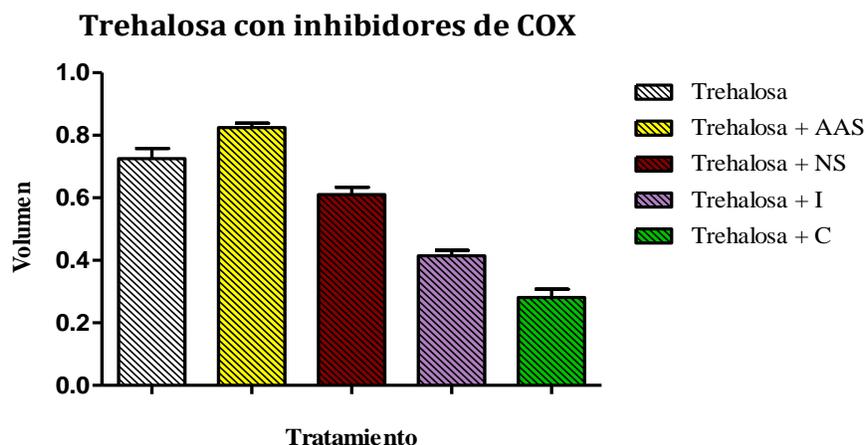
Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	pH	Conductividad	Densidad (g/mL)
Robustaflavona + AAS	6	10	4.23	-036	1.04
Robustaflavona + NS	6	10	4.55	-045	1.03
Robustaflavona + I	6	10	4.48	-054	1.05
Robustaflavona + C	6	10	4.18	-036	1.06

Dosis de administración de inhibidores de COX: 10 mg/kg BW, 30 minutos después administración del compuesto problema (10 mg/kg), n= número de ratones usado en cada grupo.

#### 6.4.4 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por trehalosa (4) en presencia de inhibidores de COX's

La presencia de prostaglandinas en el riñón es determinante en el mecanismo diurético como está documentado (García, 2000); al inducir la inhibición de la síntesis de éstas mediante la administración de inhibidores de COX's se observó como se esperaba, disminución en la diuresis. En el apartado 6.3.1 se demuestra mediante experimentos la actividad diurética de todos los compuestos de prueba (salvo en el caso del compuesto 3). Al administrar los compuestos de prueba a los ratones previamente tratados con inhibidores de COX-2 se observó inhibición de la diuresis aún en mayor proporción que para los inhibidores de COX-1 lo que sugiere que la presencia de prostaglandinas en el riñón es determinante para que se lleve a cabo el efecto diurético promovido por los compuestos de prueba ya que cuando están disminuidas la diuresis se abate.

El efecto contrario fue observado con el azúcar trehalosa ya que incrementó su efecto diurético en un 12.3% cuando fue administrado posteriormente al AAS, mientras que con NS, I, y C la diuresis disminuyó siendo el valor más alto de inhibición observado con el inhibidor específico de COX-2 similar al comportamiento de amentoflavona; la excreción de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> aumentó al disminuir la excreción urinaria (Tabla 23). Una explicación se plantea como que el azúcar trehalosa presenta un efecto sinérgico con el AAS, mientras que con el resto de los inhibidores de COX's se comporta de manera similar a los compuestos 1 y 2.



**Figura 19.** Excreción urinaria de trehalosa con inhibidores de COX.

**Tabla 23.** Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el azúcar trehalosa (4)

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Dosis (mg/kg)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Trehalosa + AAS	0.82±0.01	10	94.3±4.95	166.3±9.46
Trehalosa + NS	0.61±0.02	10	94.3±4.9	166.3±9.4
Trehalosa + I	0.41±0.01	10	105.3±4.8	374.5±5.8
Trehalosa + C	0.28±0.02	10	87.0±5.4	175.4±5.0

Los resultados muestran los valores medios ± error estándar de la media (S.E.M.).

**Tabla 24.** Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el azúcar trehalosa (4)

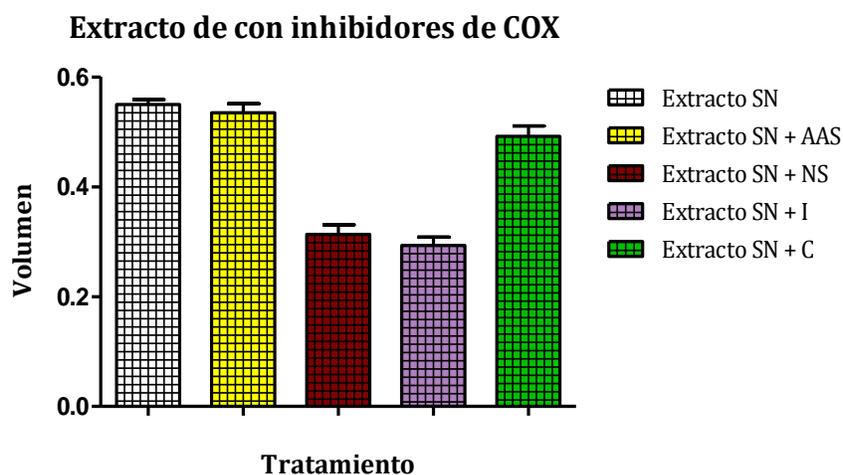
Tratamiento	n	Dosis (mg/kg)	pH	Conductividad	Densidad (g/mL)
Trehalosa + AAS	6	10	4.40	-048	0.96
Trehalosa + NS	6	10	4.40	-053	1.03
Trehalosa + I	6	10	4.48	-053	1.12
Trehalosa + C	6	10	4.30	-045	1.07

Dosis de administración de inhibidores de COX: 10 mg/kg, 30 minutos después administración del compuesto problema (10 mg/kg), n= número de ratones usado en cada grupo.



#### 6.4.5 Efecto sobre la excreción urinaria y de electrolitos inducida por el extracto acuoso de *S. nothoxybrida* en presencia de inhibidores de COX's

El extracto tuvo su mayor inhibición al ser administrado conjuntamente con indometacina (46.2 %) cuando se comparó con el grupo que únicamente recibió el extracto sin inhibidor de COX, la menor inhibición de la actividad se observó cuando se administró el celecoxib (Figura 20 y Tabla 25), contrario con lo que sucedió con los compuestos puros ya que estos mostraron los valores más altos de inhibición de su efecto diurético cuando se administraron con el inhibidor específico de COX-2, lo anterior permite sugerir que los compuestos al estar juntos en el extracto presentan un efecto diurético aditivo.



**Figura 20.** Excreción urinaria del extracto de *S. nothoxybrida* con inhibidores de COX a las 4 h de la administración.

**Tabla 25.** Excreción urinaria y excreción de electrolitos cuando se administraron inhibidores de COX y el extracto de *S. nothoxybrida*

Tratamiento	Volumen de orina (mL)	Dosis (mg/kg)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)
Extracto acuoso + AAS	0.48±0.01	2000	98.7±2.21	249.7±8.46
Extracto acuoso + NS	0.32±0.01	2000	139.8±7.9	285.0±8.6
Extracto acuoso + I	0.24±0.01	2000	86.2±1.1	484.8±4.7
Extracto + C	0.43±0-01	2000	85.3±10.8	106.8±6.9

Los resultados muestran los valores medios ± error estándar de la media (S.E.M.).



**Tabla 26.** Características fisicoquímicas de la orina cuando se administraron inhibidores de COX y el extracto de *S. nothohybrida*

Tratamiento	<i>n</i>	Dosis (mg/kg)	pH	Conductividad	Densidad (g/mL)
Extracto acuoso + AAS	6	2000	4.20	-043	1.05
Extracto acuoso + NS	6	2000	4.26	-040	1.02
Extracto acuoso + I	6	2000	4.30	-042	0.93
Extracto acuoso + C	6	2000	4.05	-028	1.02

Dosis de administración de inhibidores de COX: 10 mg/kg, 30 minutos después, administración del compuesto problema (10 mg/kg), *n*= número de ratones usado en cada grupo.

Con la metodología utilizada se puede demostrar el importante papel que tienen las prostaglandinas renales en la diuresis las cuales favorecen el mecanismo de acción por el cual se da la excreción urinaria en cada caso con los compuestos y el extracto evaluado, la trehalosa mostró el mayor efecto diurético, y al tratarse de un azúcar, éste probablemente esté actuando como un diurético osmótico modificando la osmolaridad de la nefrona en el riñón y provocando una mayor excreción de líquido.

Existen evidencias que muestran que el óxido nítrico modula la autorregulación del flujo sanguíneo renal, la superficie glomerular apta para la filtración y la liberación de renina, por lo que la inhibición de la síntesis del NO puede alterar todos estos mecanismos homeostáticos y por tanto modificar la natriuresis y la reabsorción tubular de sodio (Romero *et al.*,1993). Algunos autores sugieren que amentoflavona induce vaso relajación asociada con la activación de la ruta NO-cGMP (Kang *et al.*, 2004); al incrementar la síntesis del NO se induce vaso relajación renal y así se produce un aumento de la diuresis (y natriuresis), el bloqueo de la síntesis del NO conduce a una disminución del flujo sanguíneo renal y de la excreción de sodio (Bachmann *et al.*1994).

Los resultados de esta investigación avalan el uso de *Selaginella nothohybrida* en la medicina tradicional mexicana como un agente diurético. Sin embargo, se requiere la realización de estudios que permitan determinar el mecanismo preciso por el cual el extracto acuoso y los compuestos puros afectan la excreción urinaria de electrolitos.



## 7. CONCLUSIONES

- ✓ El presente estudio respalda el uso etnomédico de la “doradilla” como un agente diurético, con base en el patrón de excreción de sodio, potasio y volumen de orina observados en los resultados obtenidos en este trabajo.
- ✓ Tanto los metabolitos evaluados como el extracto tienen mecanismos de acción diferentes, ya que no siguen un patrón similar de natriuresis y kaliuresis, además de que el comportamiento con inhibidores de COX's es diferente para cada uno.
- ✓ La administración conjunta de los compuestos aislados con inhibidores de COX evidencia que en nuestro caso las prostaglandinas renales juegan un papel determinante en la diuresis y es notable que la enzima COX-2 favorezca en mayor medida la excreción de orina promovida por los compuestos que se evaluaron.
- ✓ Amentoflavona (1) es un biflavonoide mayoritario en *S. wrightii*, el cual mostró actividad diurética en la evaluación farmacológica.
- ✓ El biflavonoide robustaflavona (2) aislado de *S. nothohybrida* mostró actividad diurética estadísticamente similar a la de amentoflavona (1).
- ✓ El extracto acuoso de *S. nothohybrida* mostró menor actividad diurética a la de los compuestos puros, por lo que se evidencia que los metabolitos activos presentes en el extracto tienen un efecto aditivo, además de que pudieran estar presentes otros compuestos con efecto antagonista, con lo que la actividad neta del extracto disminuye.
- ✓ El azúcar trehalosa mostró mayor actividad diurética que los biflavonoides evaluados, el alto contenido de este azúcar en las selaginellas, además de proporcionarle a la planta un mecanismo de protección en periodos largos de sequía (poiquilohidria), le confiere a la planta actividad farmacológica.



- ✓ El contenido metabólico de *S. lepidophyla* y *S. wrightii* similar al de *S. nothohybrida* nos sugiere que estas otras especies puedan presentar actividad diurética.



## 8. REFERENCIAS

- ❖ Abdala S, Herrera D, Benjumea D, Pérez P. (2008). Diuretic activity of *Smilax canariensis*, an endemic Canary Island species. *J. Ethnopharmacol.*, 119, 12-16.
- ❖ Aguilar MI, Guevara M, Chavez MI, King DB, Lotina HB. (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts. *J. Agric. Food Chem.*, 6994-7000.
- ❖ Aguilar MI, Mejía IA, Menchaca C, Vázquez I, Chávez MI, Reyes GA, Ríos GR. (2013). Determination of biflavonoids in four mexican medicinal species of *Selaginella* by HPLC. *J. AOAC Int.*, 96, 712-716.
- ❖ Alamgeer, Hayat MMN, Qayum KA, Naveed MM, Rashid M, Akram M, Samreen S. (2013). Evaluation of diuretic activity of *Paspalidium flavidum* in rats. *Bangladesh J. Pharmacol.*, 8, 177-180.
- ❖ Argueta A, Cano LM, Rodarte E. (1994). *Atlas de Plantas Medicinales*. México, D.F.: Instituto Nacional Indigenista.
- ❖ Ávila-Saldívar MN, Conchillos OG, Rojas B, Ordoñez C, Ramírez F. (2013). Enfermedad renal crónica: causa y prevalencia en la población del hospital general La Perla. *Medicina Interna de México*, 473-478.
- ❖ Bachmann S, Mundel P. (1994). Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. *Am. J. Kidney Dis.*, 24: 112-129.
- ❖ Boesen EI. (2013). Chronic elevation of IL-1 induces diuresis via a cyclooxygenase 2 mediated mechanism. *Am. J. Physiol.*, F189-F198.
- ❖ Bye R, Linares E, Estrada E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico. In *Phytochemistry of medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry*. (Arnason TJ, Editor) Plenum Press, N. Y.



- ❖ Chari VM, Iyas M, Wagner H, Neszmelyi A, Chen FC, Chen LK, Lin YC, Lin YM. (1977).  $^{13}\text{C}$ -NRM spectroscopy of biflavonoids. *Phytochemistry*, 16, 1273-1278.
- ❖ Colin RA. (2010). Estudio comparativo sobre los efectos diuretico y de transito intestinal de extractos acuosos de *Selaginella nothohybrida* Valdespino y *Selaginella lepidophyla* Spring. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Cragg GM, Newman DJ. (s.f.). Drug discovery and development from natural products: The Way Forward. *11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings*, 56-69.
- ❖ Evans, William Charles. (2002). *Trease and Evans Pharmacognosy*. W. B. Saunders.
- ❖ *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. (2013). México, D.F.
- ❖ Flórez J, Armijo AJ. (2008). *Farmacología humana*. Santander: elservier masson.
- ❖ García RE. (2000). Inhibidores de la COX-2 y funcion renal. *Revista medica de Chile*.
- ❖ Gasparotto A, Boffo MA, Botelho Lourenco EL, Alves Stefanello ME, Leite Kassuya CA, Andrade Marques MC. (2009). Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 122, 517-522.
- ❖ Guevara RM. (2008). Caracterizacion química y biológica de biflavonoides de *Selaginella lepidophyla* Spring. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Haas M, Moolenaar F, Meijer DKF, De Jong PE, De Zeeuw D. (1998). Renal targeting of a non-steroidal antiinflammatory drug: effects on renal prostaglandin synthesis in the rat. *Clin. Sci.*, 603-609.



- ❖ Hannafin J, Kinne-Saffran E, Friedman D, Kinne R. (1983). Presence of a sodium-potassium-chloride cotransport system in the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J. Membr. Biol.*, 75, 73-83.
- ❖ Harborne J. (1975). Biflavonoids. En Q. C. Geiger H. *The Flavonoids* (págs. 692-). London, UK: Chapman and Hall.
- ❖ Harleen KS, Bimlesh K, Sunil P, Prashant T, Manoj S, Pardeep S. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1, 25-41.
- ❖ Hernández LF, Abdala S, Dévora S, Benjumea D, Martín HD. (2014). Electrical conductivity measurements of urine as a new simplified method to evaluate the diuretic activity of medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 1019-1022.
- ❖ Insering P, Forbush B. (1997). Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporters: importance of transmembrane domains. *J. Biol. Chem.*, 272, 24556-24562.
- ❖ Instituto Químico Biológico. (14 de 02 de 2014). Recuperado el 02 de 12 de 2013, de <http://www.iqb.es/>
- ❖ Jackson EK. (1996). Drugs affecting renal and cardiovascular functions. En L. L. Gilman J.C., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th* (págs. 685-713). Pergamon Press, New York.
- ❖ Kang DG, Yin MH, Oh H, Lee DH, Lee HS. (2004). Vasorelaxation by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Medica*. 70: 718-722.
- ❖ Lahlo S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B. (2007). Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum curvi* and *Tanacetum vulgari* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.*, 110, 458-463.



- ❖ Landry DW, BH. (s.f.). *Ecu red*. Recuperado el 14 de Enero de 2014, de Ecu red: <http://www.ecured.cu>.
- ❖ Langma MJ, Jensen DM, Watson DJ, Harper SE, Quan Zhao P-L. (1999). Adverse upper gastrointestinal effects of refecoxib compared with NSAIDs. *JAMA*.
- ❖ Lara AN. (2014). Estudio fitoquímico y analítico comparativo por UPLC/MS de cuatro especies medicinales del género *Selaginella*. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- ❖ Lasa AM. (28 de Diciembre de 2011). *Medicopedia*. Recuperado el 25 de Junio de 2014, de medicopedia: <http://www.portalesmedicos.com>
- ❖ Laurence L, Brunton J, Lazo S, Keith L Parker. (2006). *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill.
- ❖ Lipschitz WL, Hadidian Z, Kerpcsar A. (1942). Bioassay of diuretics. *J Pharmacol Exp Ther.*, 79, 97-110.
- ❖ Loew DH. (1991). *Diuréticos: Química, Farmacología y Terapéutica incluida Fitoterapia*. Barcelona: Salvat editores S.A.
- ❖ López MT. (1998). Plantas medicinales con acción diurética. *Fitoterapia*. Recuperado 22 de febrero de 2014, de Ambito farmacéutico: <http://apps.elsevier.es>
- ❖ Lote CJ. (1982). Renal prostaglandins and sodium excretion. *Exp. Physiol.*, 377-385.
- ❖ Madrid MI, García Salomon M, Tornel J, López E, Fenoy FJ. (1998). Interactions between nitric oxide and renal nerves on pressure-diuresis and natriuresis. *JASN*, 9, 1588-1595.
- ❖ Márquez A, Lara F, Esquivel B, Mata R. (1999). *Plantas medicinales de México II. Composición, Usos y Actividad Biológica*. México: UNAM.



- ❖ Martínez M. (1989). *Las plantas medicinales de México*. México, D.F.: Ediciones Botas.
- ❖ Mazid MA, Datta BK, Nahar L, Khairu Bashir SAM, Bachar SC, Sarker SD. (2009). Antinociceptive, anti-inflammatory and diuretic properties of *Polygonum barbatum* (L.) Hara var. *barbata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(3), 749-754.
- ❖ Mickel J, Valdespino NA. (1992). Five new species of Pteridophytes from Oaxaca México. *Brittonia*, 312-321.
- ❖ Mickel JT, Beitel JM. (1988). Pteridophyte flora of Oaxaca, Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 1-568.
- ❖ Mukherjee PK. (2002). Evaluation of diuretic agents. In: Quality control of herbal drugs. *Business Horizons, New Delhi*.
- ❖ Nava E. (1998). Disfunción del endotelio, riñón e hipertensión arterial. *Nefrología*, 1, 84-89.
- ❖ Nedi T, Mekonnen N, Uрга K. (2004). Diuretic effect of the crude extracts of *Carisa edulis* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 95, 57-61.
- ❖ Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234.
- ❖ Okigawa M, Wu Hwa C, Kawano N. (1971). Biflavones in Selaginella Species. *Phytochemistry*, 10, 3286-3287.
- ❖ Ramírez JH, Palacios M, Gutierrez O. (2006). Efecto diurético de la especie *Salvias cutellarioides* en ratas. *Biomédica*, 26, 145-149.
- ❖ Ratnasooriya WD, Jayakody JRAC. (2004). Diuretic activity of hot flower infusion of *Nyctanthes arbo-tristi* in rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 3(005), 84-87.



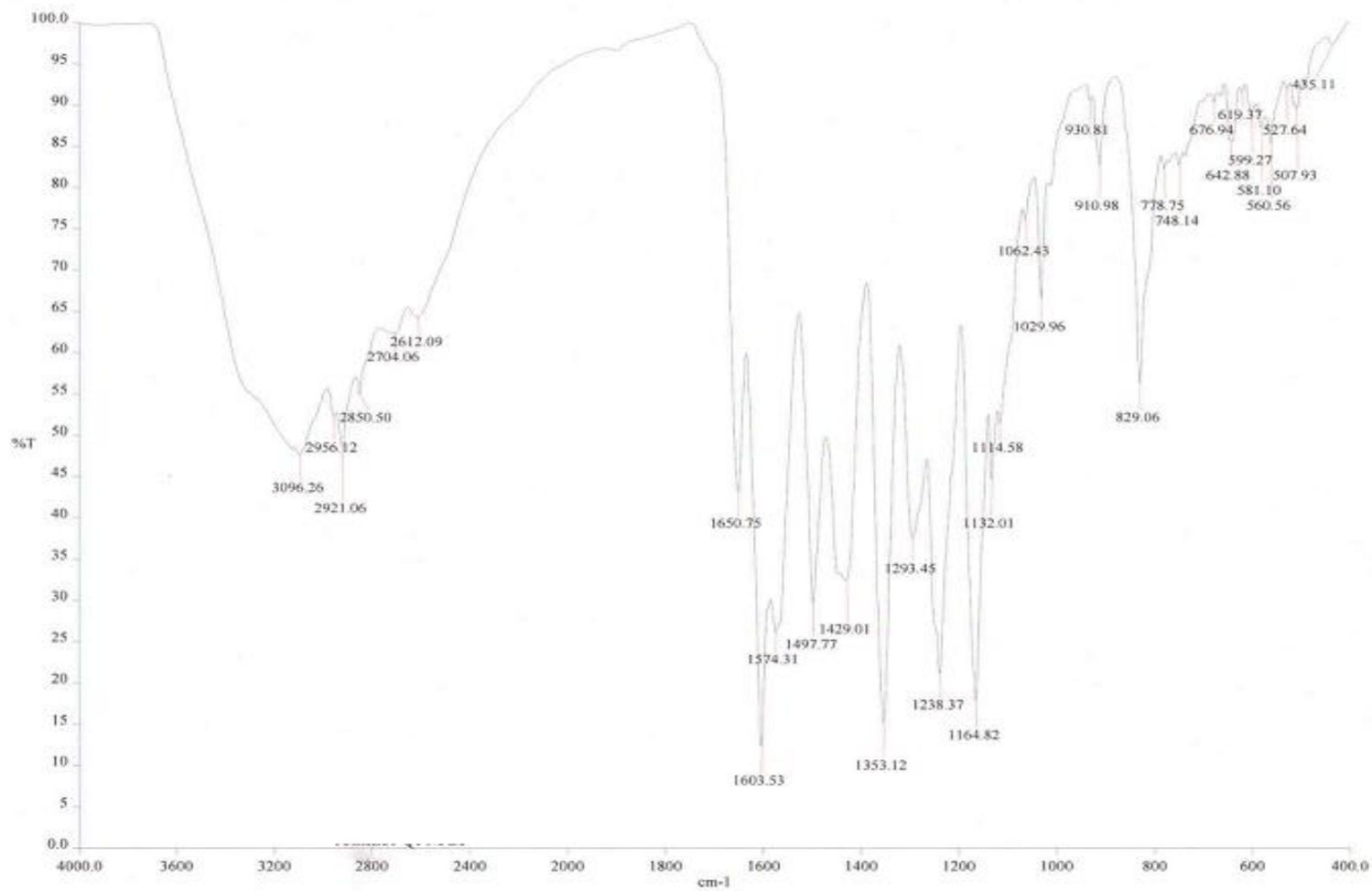
- ❖ Romero JC, Strick DM. (1993). Nitric oxide and renal function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2:114-121.
- ❖ Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) (2005). *Catalogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para Farmacias y público en general*. México, D.F.
- ❖ Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. (2011). A review of Phytochemistry and Pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceuticas Scientia*, 25-41.
- ❖ Schwertschlag U, Gerber JG, Barnes JS, Nies AS. (1986). A dual effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal water handling in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 653-658.
- ❖ Segarra E. (2003). *Fisiología de los aparatos y sistemas*. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.
- ❖ Shaoguang Li MZ. (2014). Preparative isolation of six anti-tumour biflavonoids from *Selaginella Doederleinii* Hieron by High-Speed counter-Current Chromatography. *Phytochem. Anal.*, 127-133.
- ❖ Swamy RC, Kunert O, Schühly W, Bucar F, Ferreira D, Rani VS, Kumar BR, Appa Rao AVN. (2006). Structurally unique from *Selaginella chrysocaulos* and *Selaginella bryopteris*. *Chemistry and Biodiversity*, 3, 405- 413.
- ❖ Tresguerres JA. (2005). *Fisiología humana*. Madrid: Mc Graw Hill.
- ❖ Vane JR. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 231, 232-235.
- ❖ Vázquez MA, Meléndez ME, Arreguin ML. (2005). *Selaginella*. *Polibotánica*. Instituto Politecnico Nacional, 105-115.



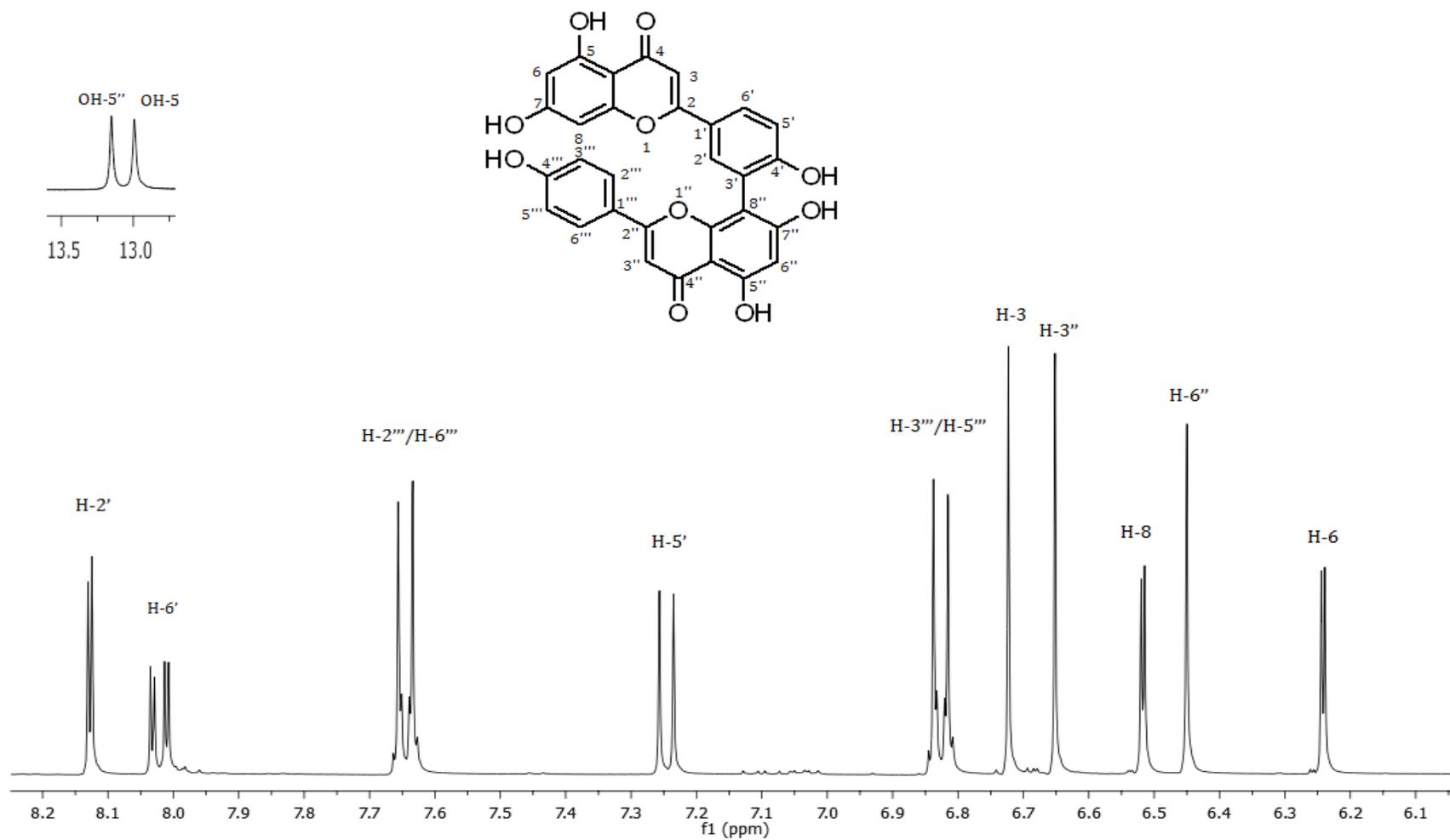
- ❖ Villaseñor JL, Ortiz E. (2012). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. Supl. 85: S134-S142.
- ❖ Xianchun Z, Nooteboom HP, Kato M. (2013). Selaginellaceae. *Flora of China*, 37-66.
- ❖ Zhang Y, Li Q, Yan L, Shi Y. (2011). Structural characterization and identification of biflavonoids in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25: 2173-2186.



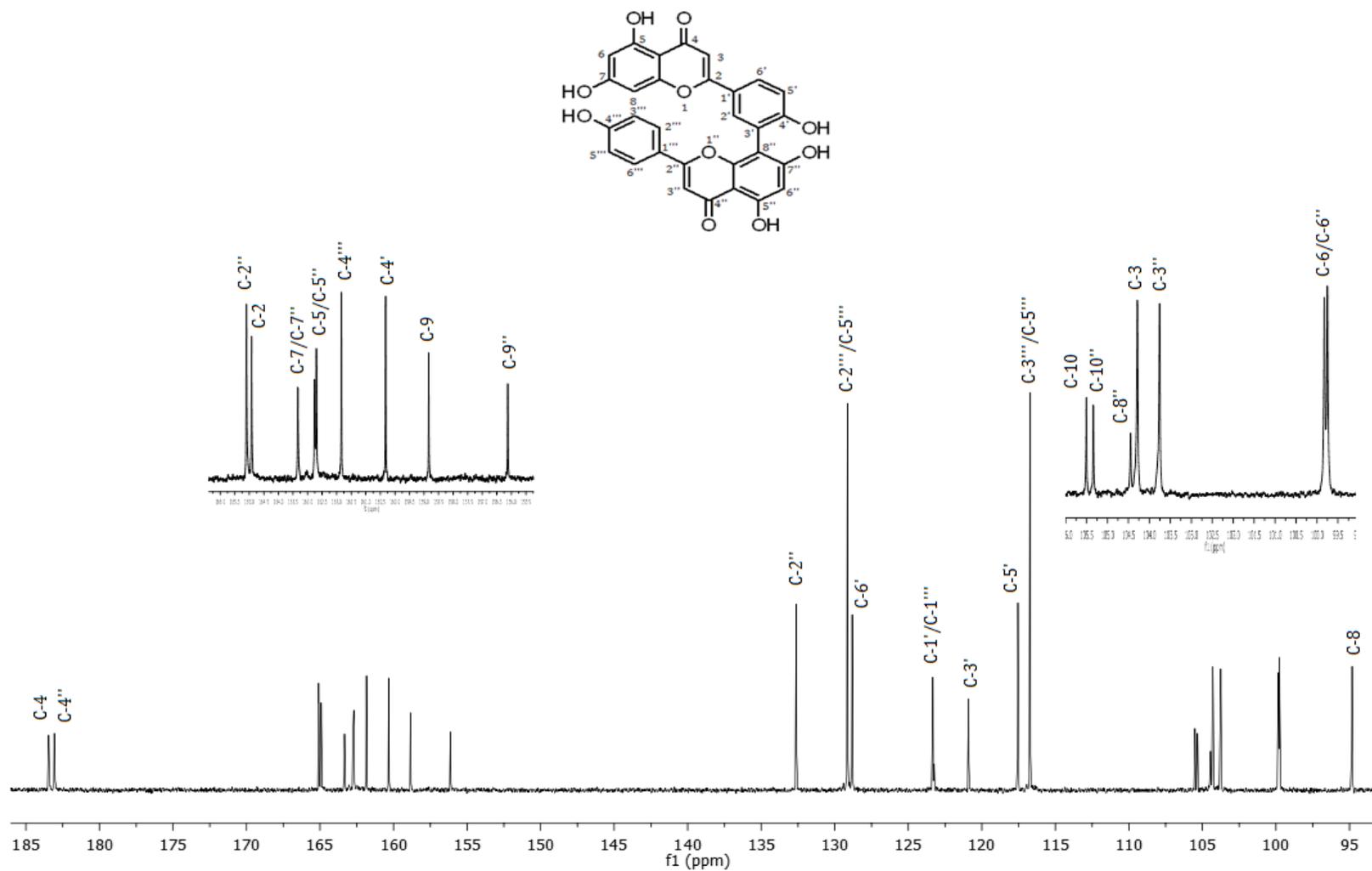
## 9. ANEXOS



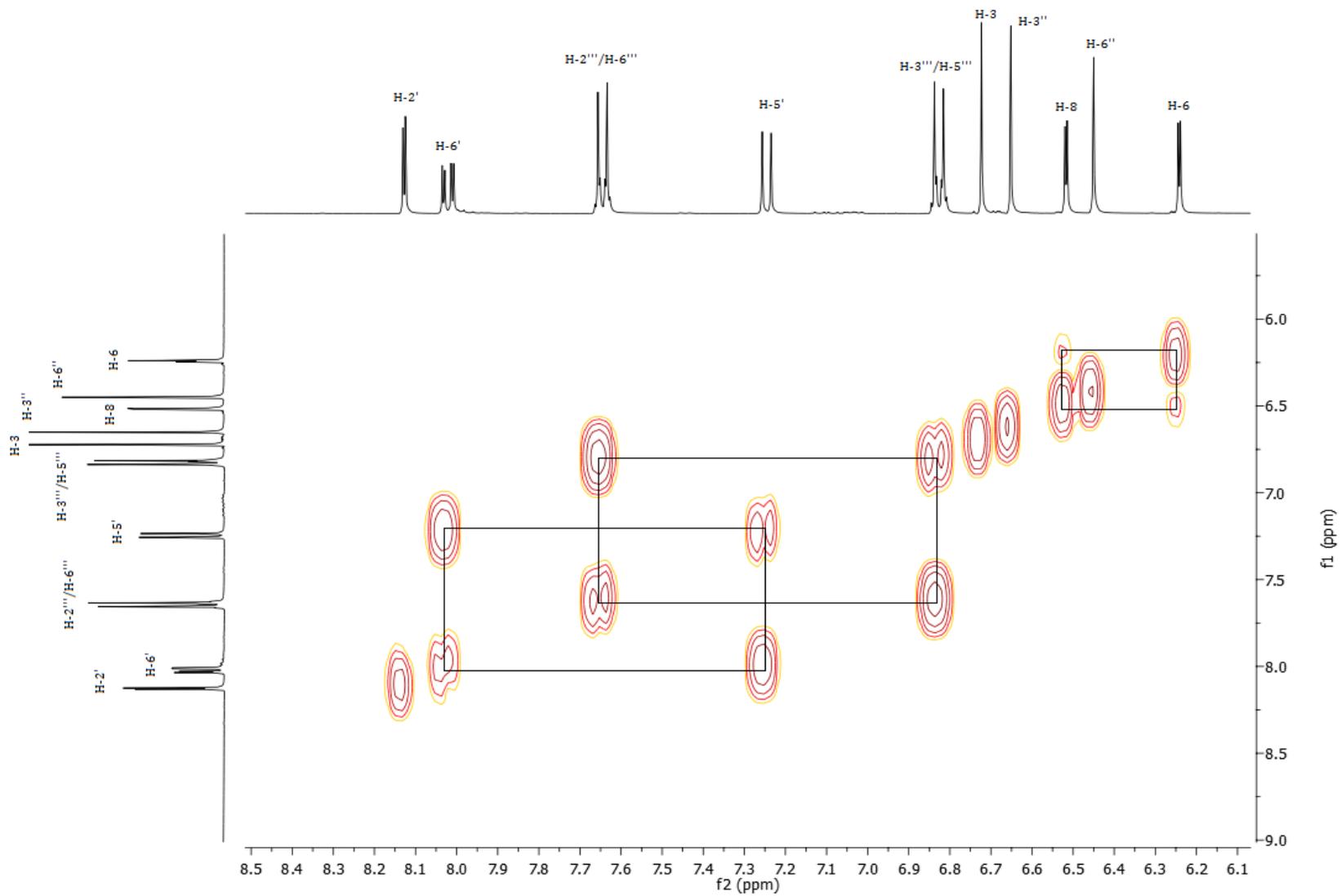
**Anexo 1.** IR de amentoflavona (1), por reflectancia ATR.



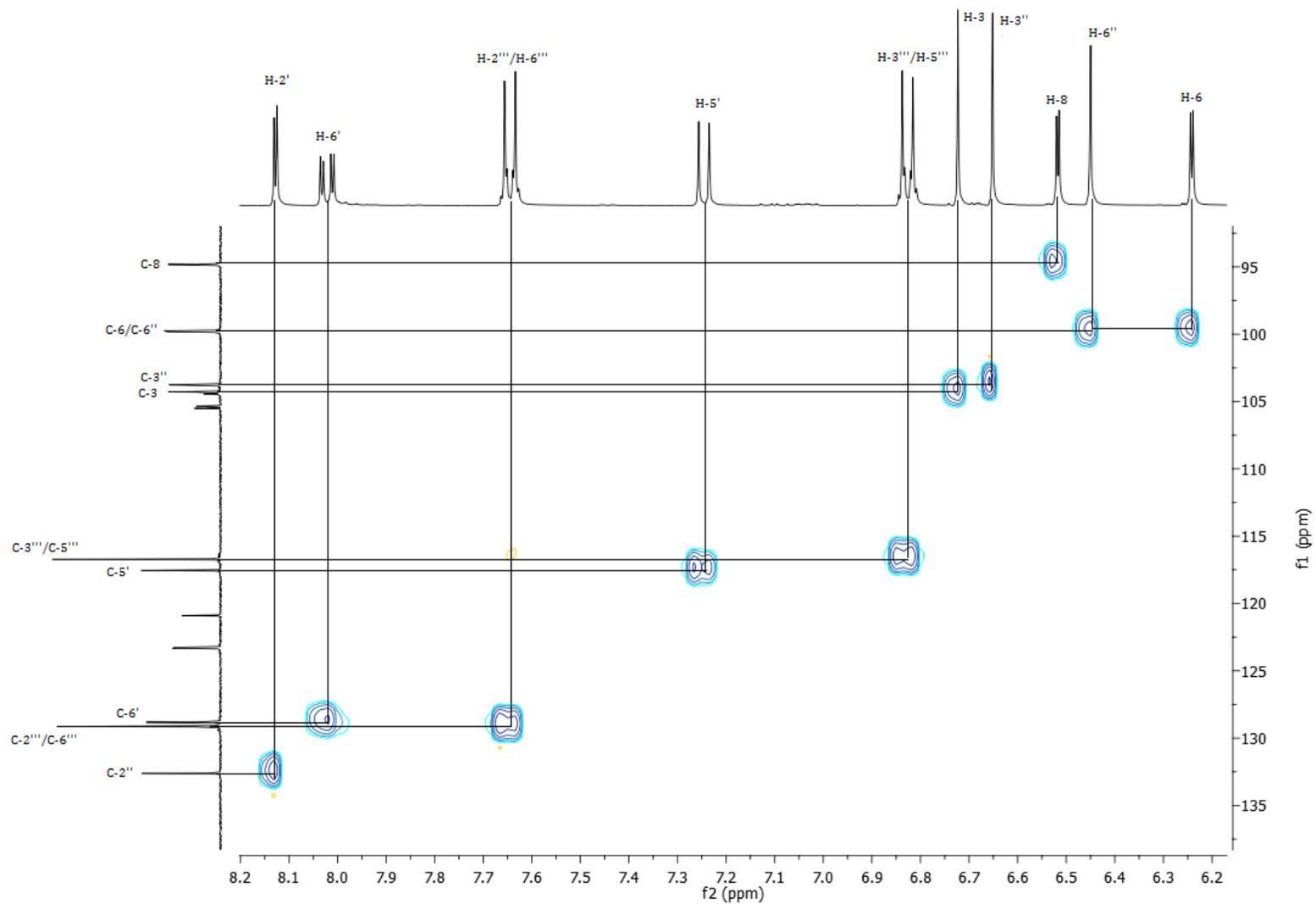
Anexo 2. RMN  $^1\text{H}$  de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



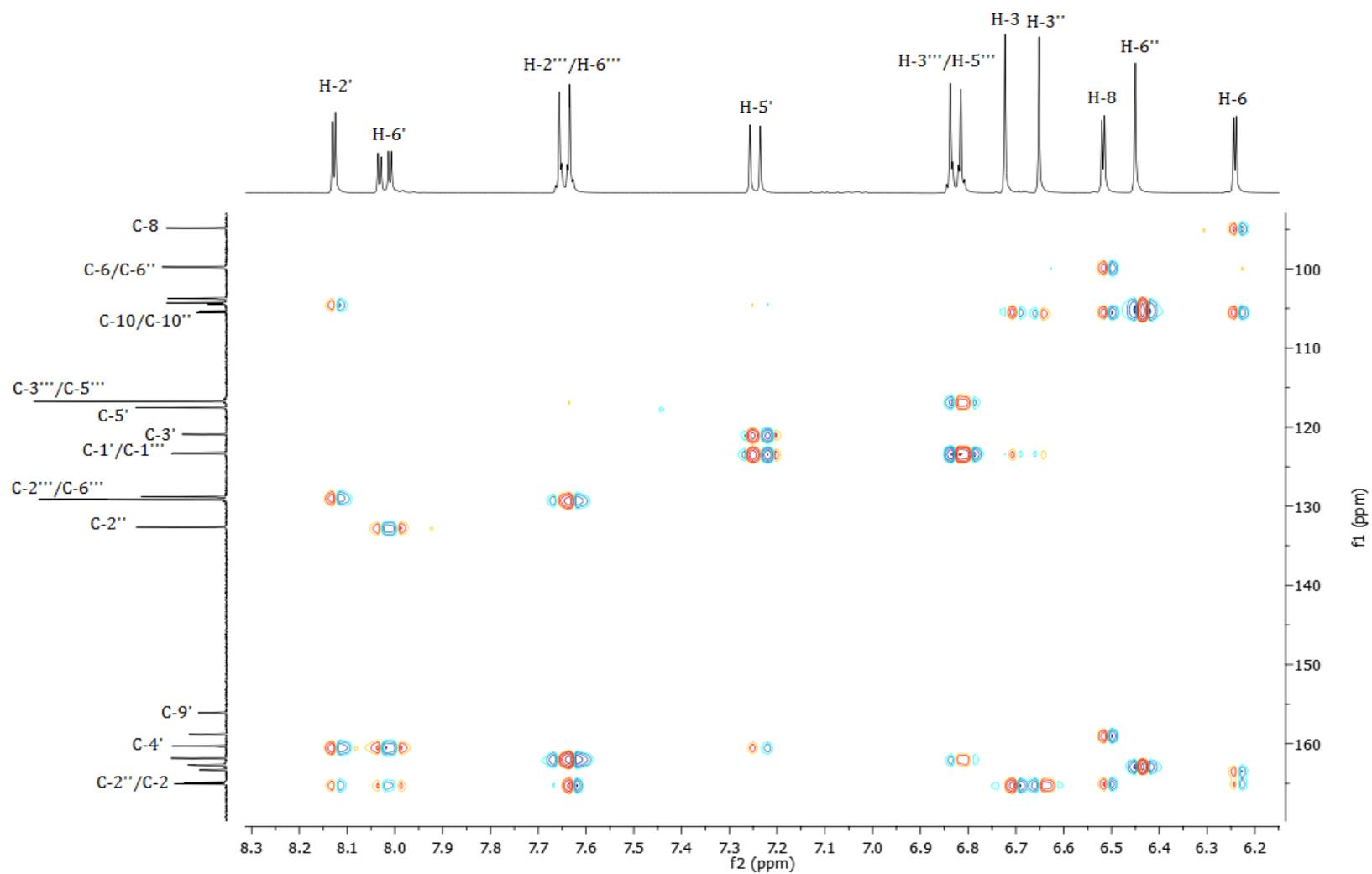
Anexo 3. RMN  $^{13}\text{C}$  de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



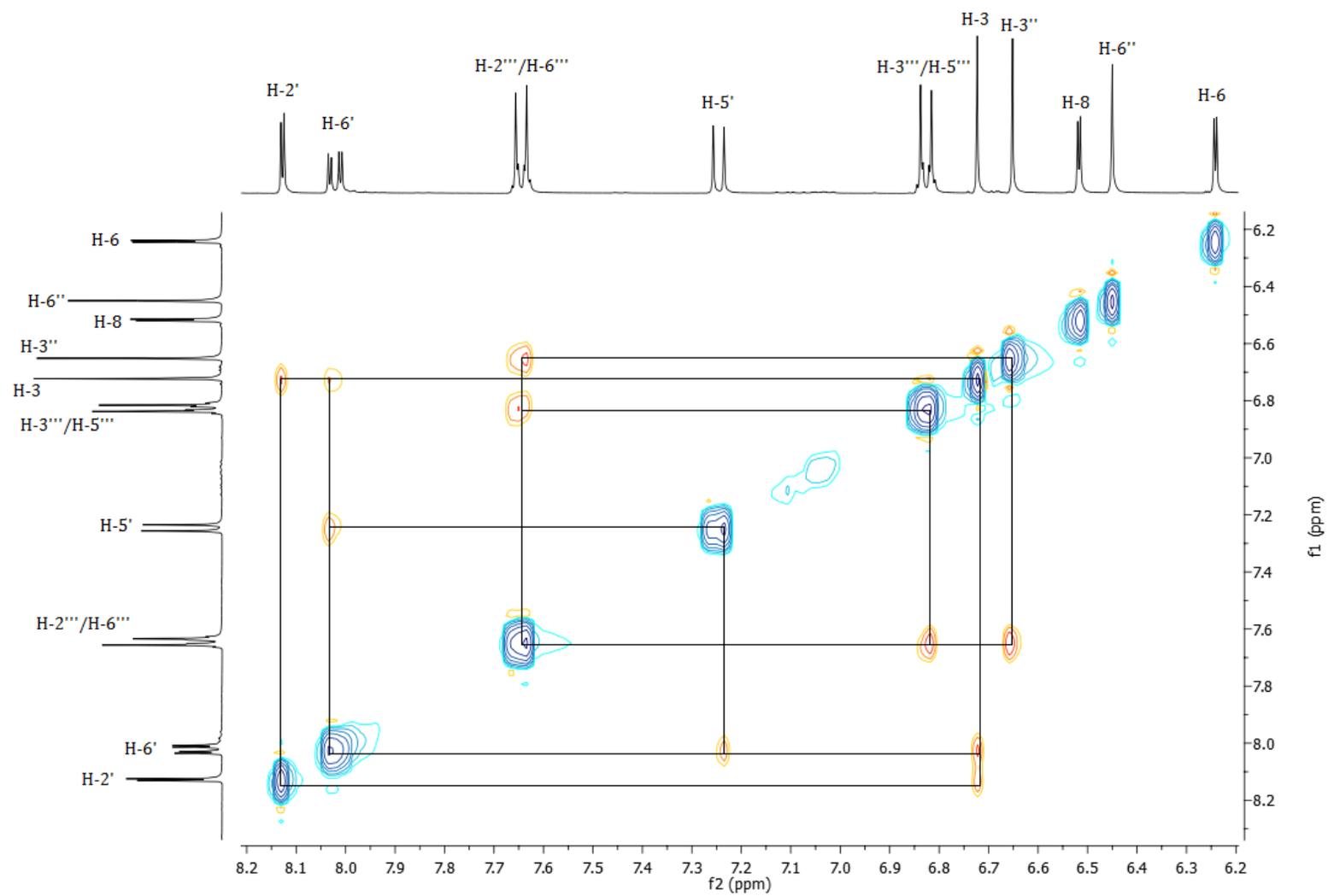
Anexo 4. Experimento COSY de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



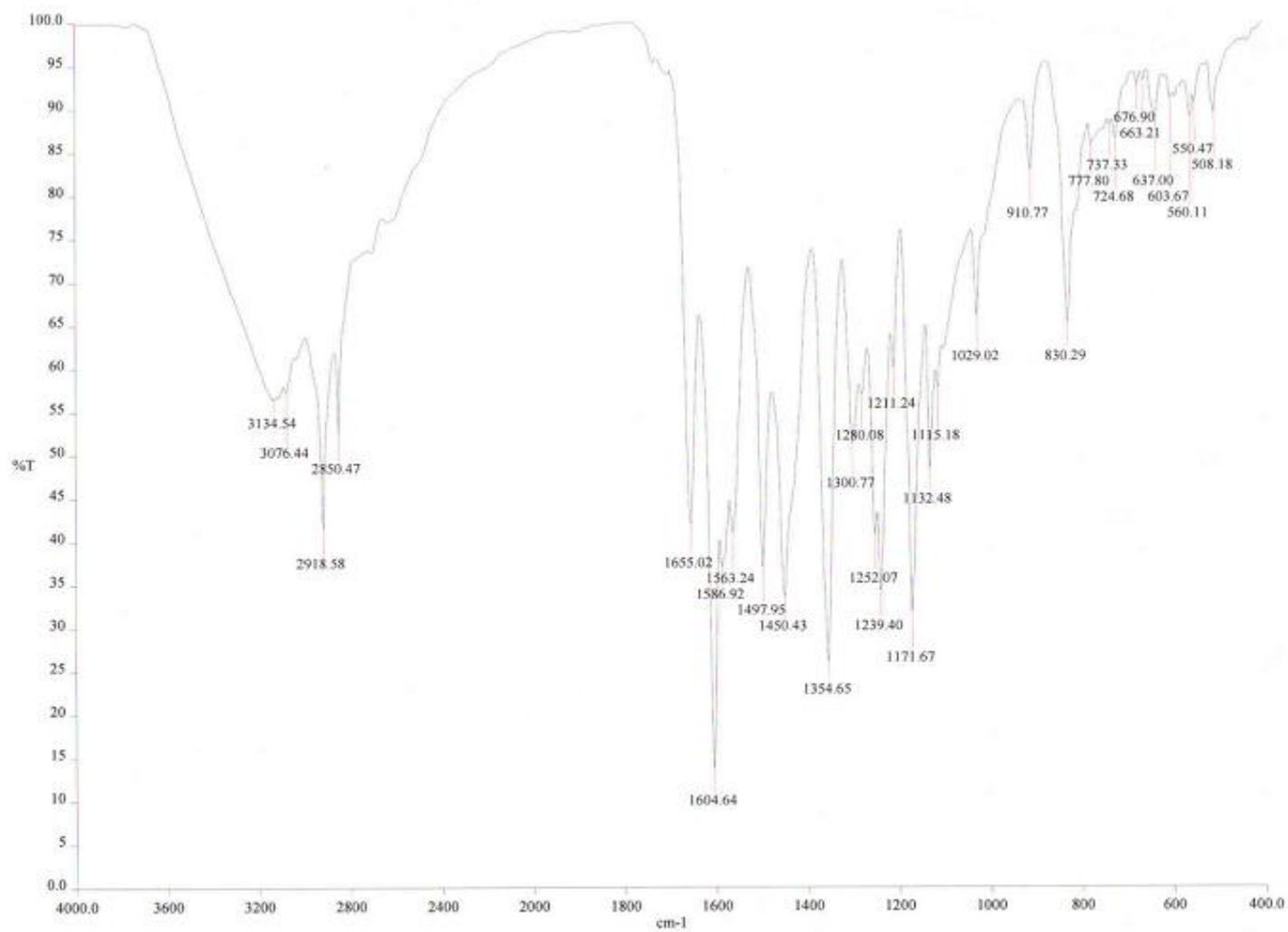
**Anexo 5.** Experimento HSQC de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



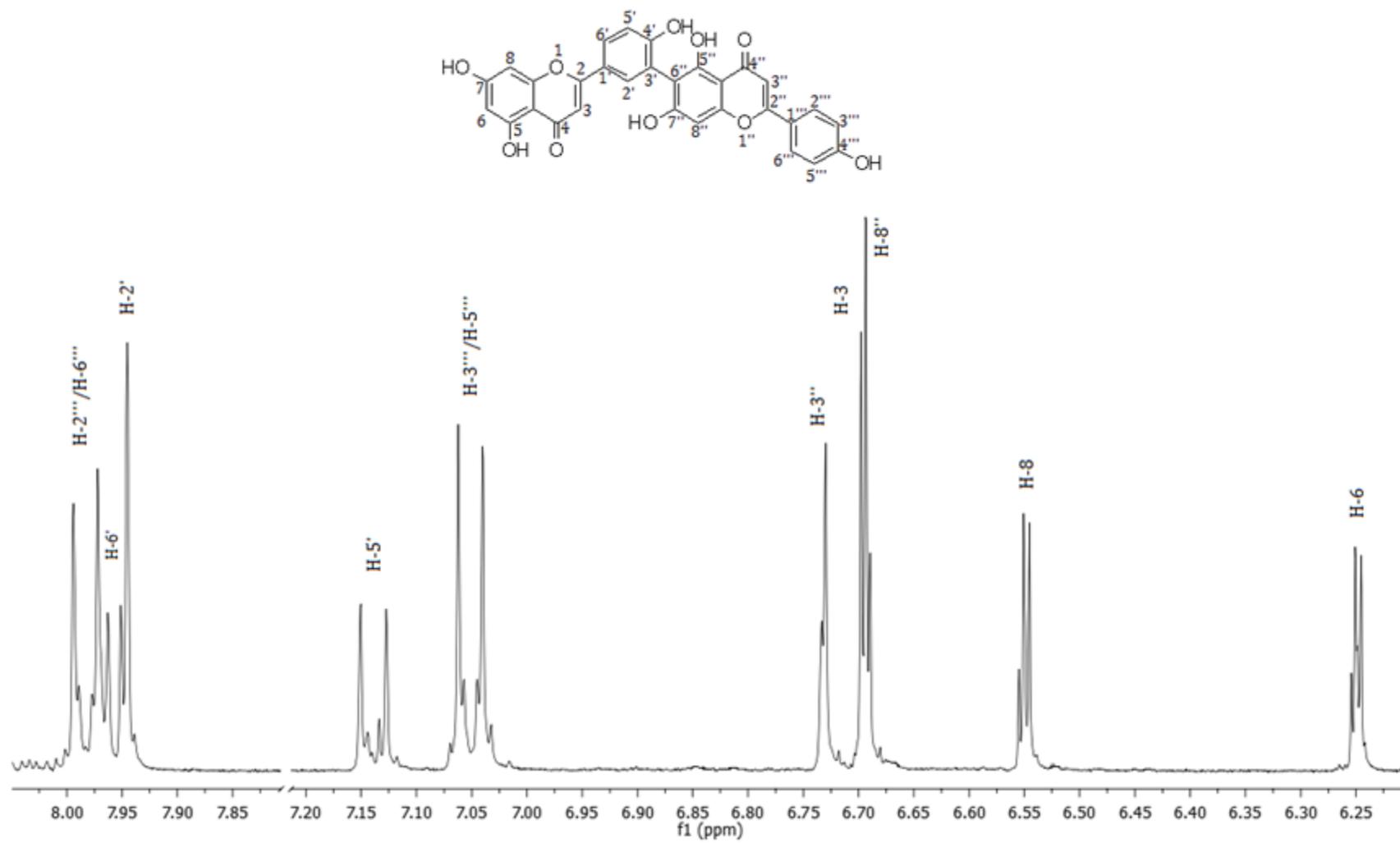
**Anexo 6.** Experimento HMBC de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



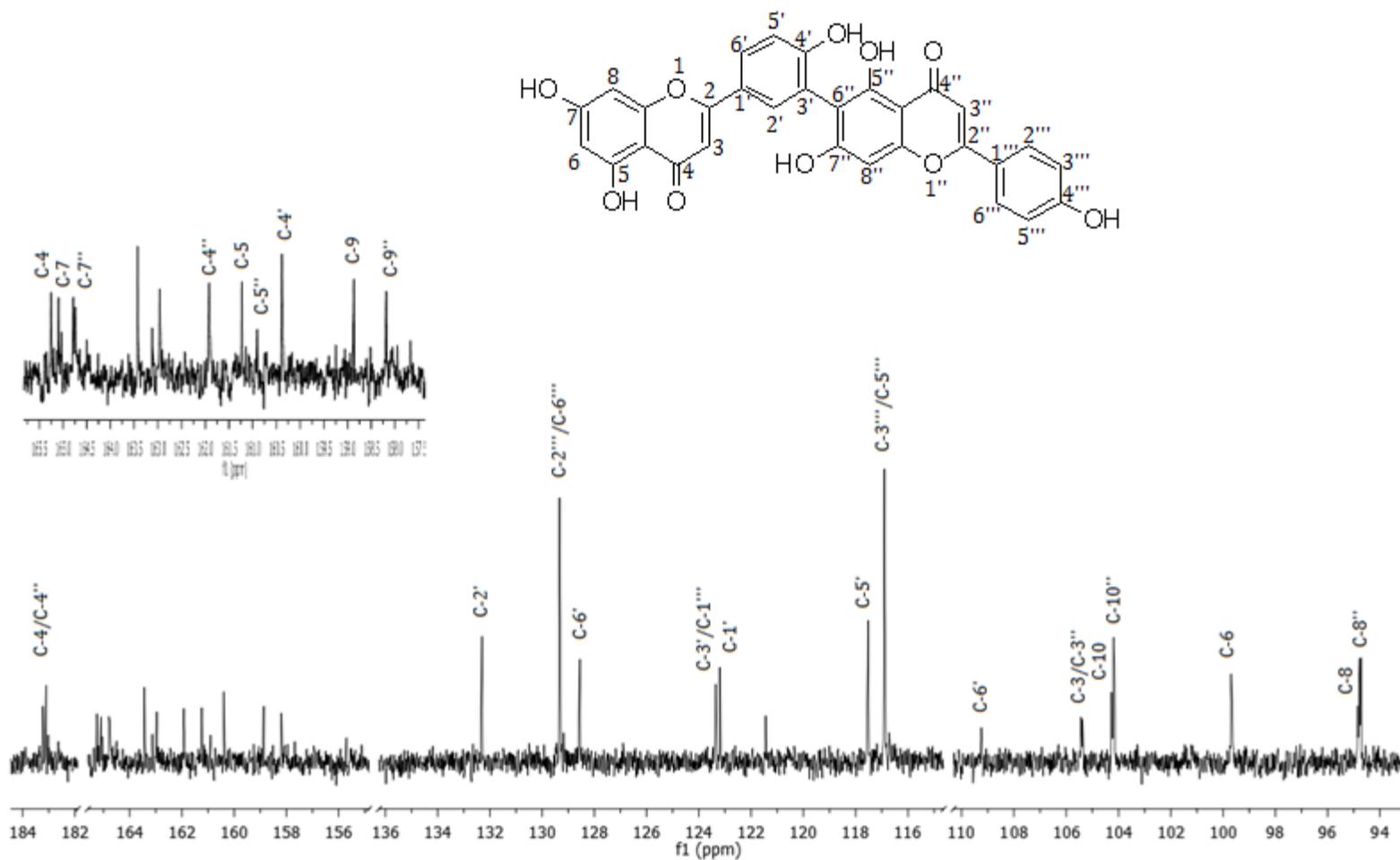
**Anexo 7.** Experimento NOESY de amentoflavona (1), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



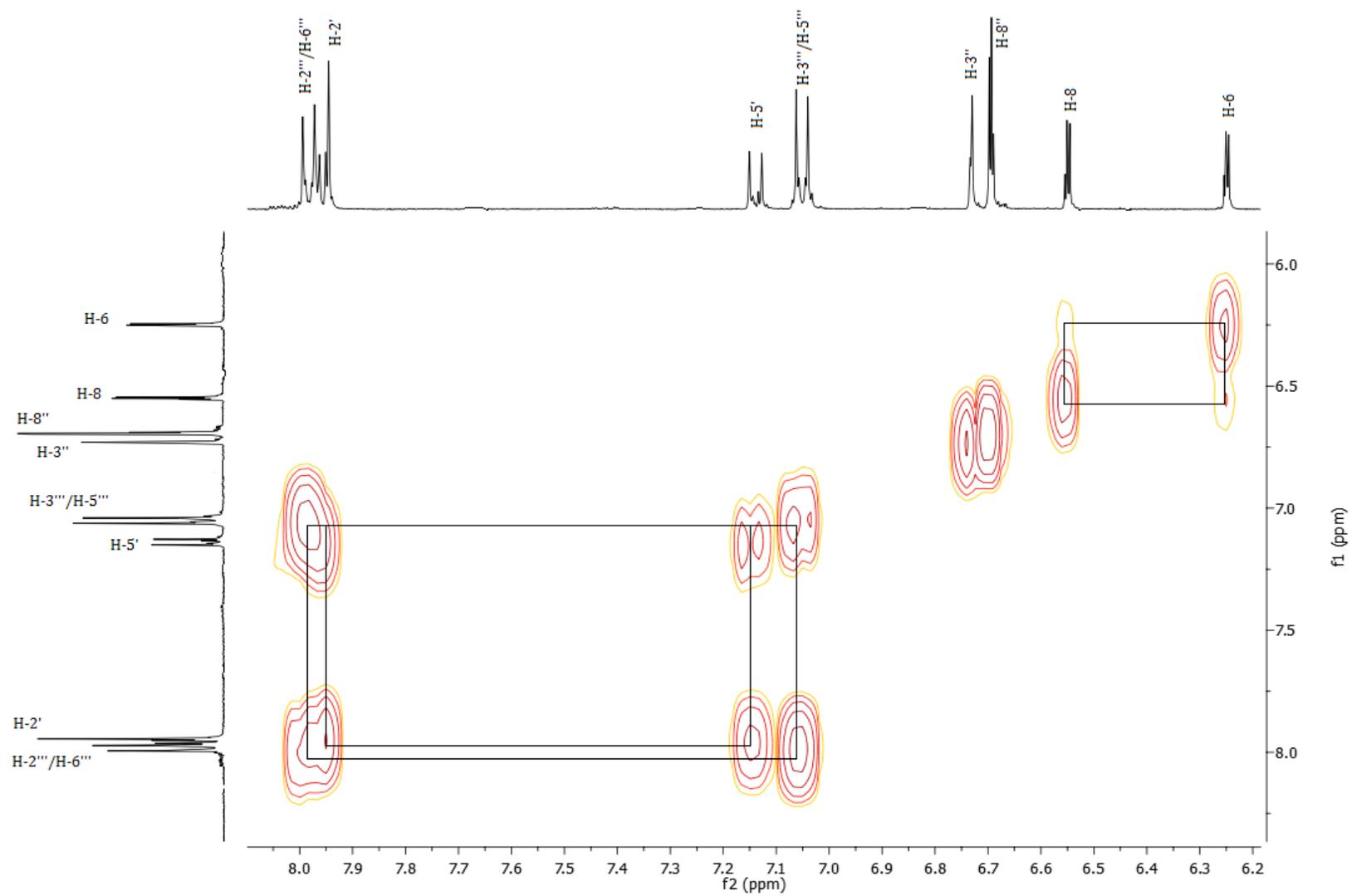
Anexo 8. IR de robustaflavona (2), por reflectancia ATR.



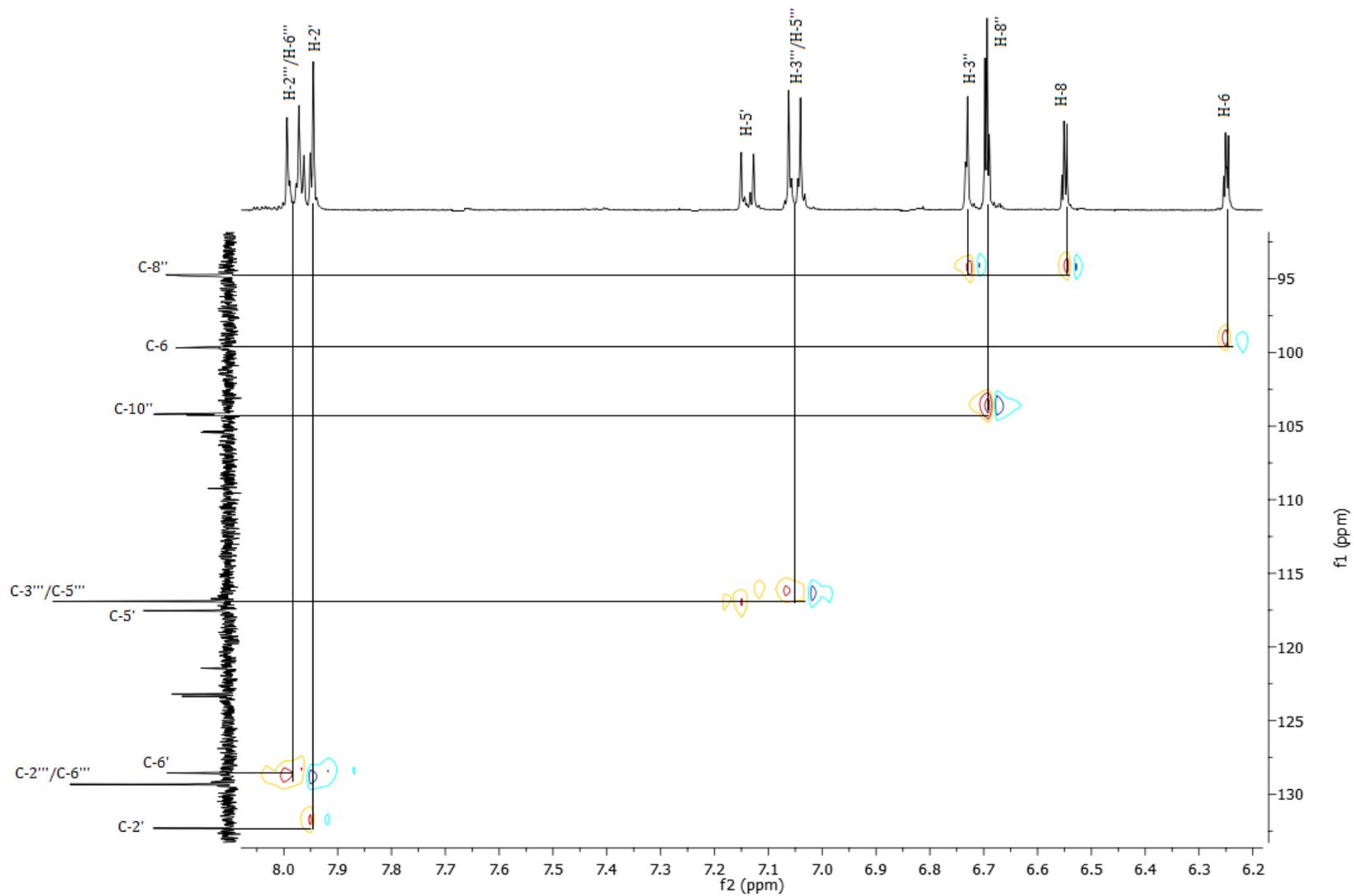
**Anexo 9.** RMN  $^1\text{H}$  de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



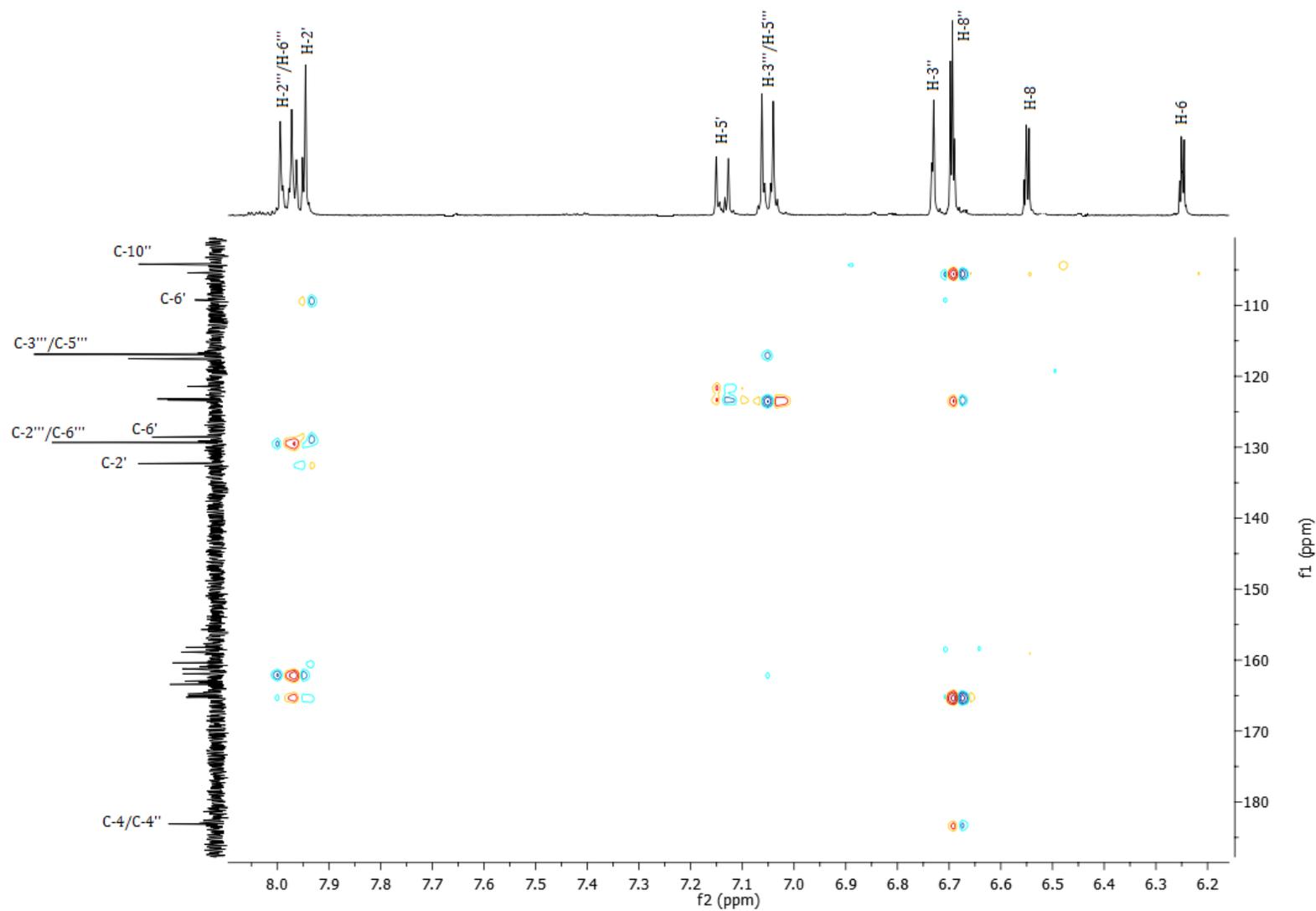
Anexo 10. RMN  $^{13}\text{C}$  de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



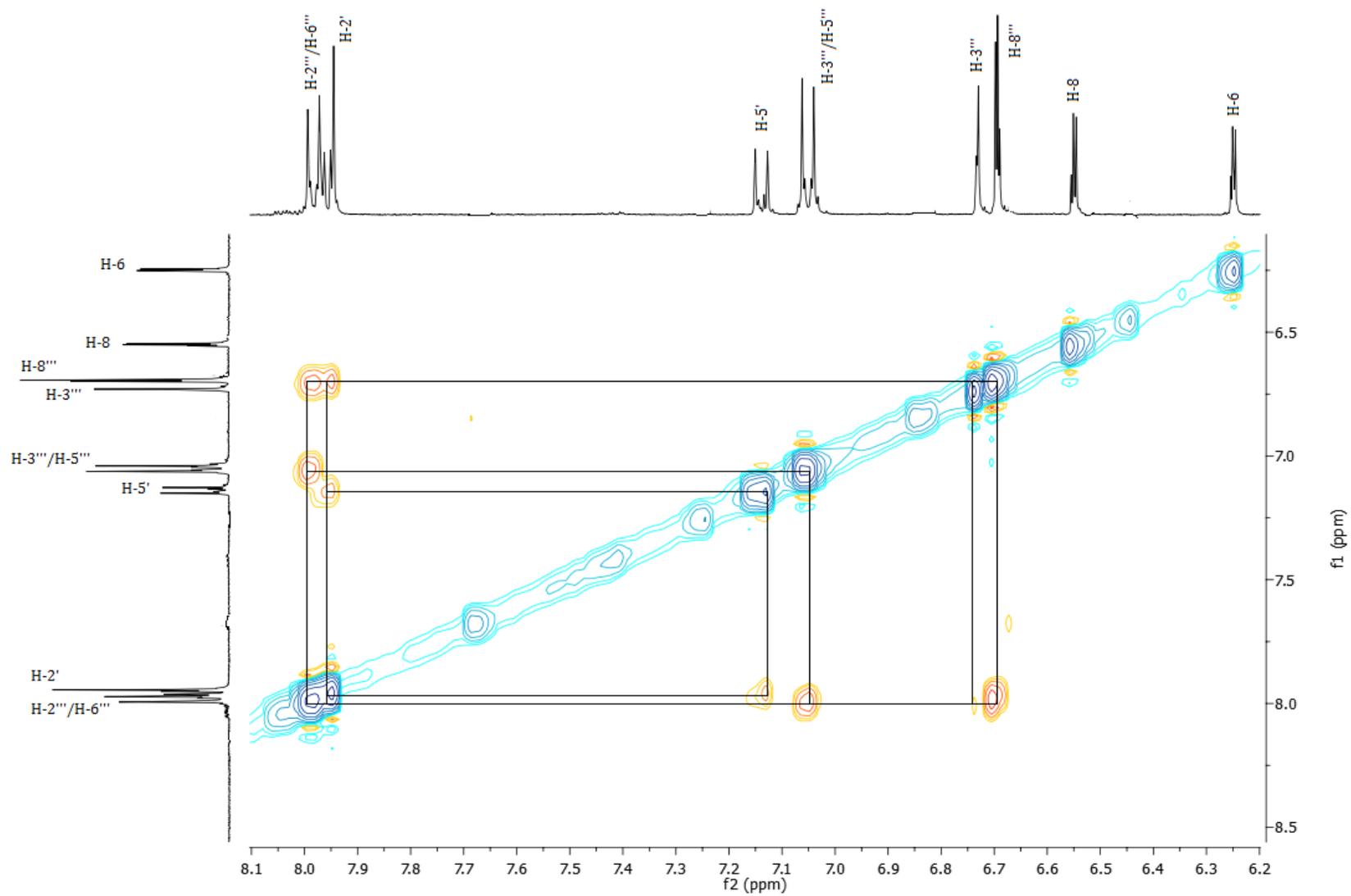
**Anexo 11.** Experimento COSY de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



Anexo 12. Experimento HSQC de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



Anexo 13. Experimento HMBC de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).



**Anexo 14.** Experimento NOESY de robustaflavona (2), (400 MHz acetona- $d_6$ ).