



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA LA  
OBTENCIÓN EFICIENTE DE BIFLAVONOIDES EN CUATRO ESPECIES DEL  
GÉNERO *SELAGINELLA*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**VALERIA MARIBEL CORREA ESQUIVEL**



**CDMX**

**AÑO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents

**VOCAL:** Dr. José Fausto Rivero Cruz

**SECRETARIO:** Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

**1er. SUPLENTE:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**2° SUPLENTE:** Dr. Abraham Madariaga Mazón

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, DIVISIÓN DE  
POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

### **ASESOR DEL TEMA**

---

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

### **SUSTENTANTE**

---

VALERIA MARIBEL CORREA ESQUIVEL

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la gran oportunidad de ser parte de ella y desarrollarme profesional y personalmente; así como a la Facultad de Química, por otorgarme los conocimientos, experiencias, amistades de gran valor en mi vida y por ofrecerme diferentes perspectivas respecto al trabajo académico, laboral y personal.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN222619, y al proyecto PAIP 5000-9131, ambos a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

A los miembros de mi jurado: Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. José Fausto Rivero Cruz y Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano, por invertir su valioso tiempo en la revisión de mi trabajo, correcciones, sugerencias y consejos respecto al desarrollo del mismo.

Al personal técnico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos, particularmente a la M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Nayelli López Balbiaux y a la Q. Marisela Gutiérrez.

Al M. en C. Alberto Reyes García del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM por la ayuda en la identificación botánica de los especímenes vegetales.

Al M. en C. Ramiro Ríos del Departamento de Botánica, FES Zaragoza, UNAM por la colecta de los especímenes vegetales.

A los I.Q. Ramiro del Carmen y Roberto Díaz por la asistencia técnica informática.

Especialmente le agradezco Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por el gran apoyo incondicional que me ofreció desde el primer día en que me presenté en el laboratorio, por su paciencia, constancia, y sobre todo por sus consejos de gran valor en mi vida profesional, académica y personal.



## ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de esquemas.....	ii
Lista de tablas.....	ii
Lista de figuras.....	iii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Familia <i>Selaginellaceae</i> y género <i>Selaginella</i> .....	3
2.1.1 Familia <i>Selaginellaceae</i> .....	3
2.1.2 Género <i>Selaginella</i> .....	3
2.2 Flavonoides y biflavonoides .....	10
2.2.1 Estructura química de los flavonoides .....	11
2.2.2 Clasificación de flavonoides.....	12
2.2.3 Biosíntesis de flavonoides .....	13
2.2.4 Estructura química de los biflavonoides .....	16
2.2.5 Clasificación de los biflavonoides .....	17
2.2.6 Biosíntesis de biflavonoides.....	18
2.2.7 Importancia biológica.....	21



2.2.8 Obtención e identificación dentro de la planta .....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Objetivo principal.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>26</b>
5.1 Material .....	26
5.1.1 Material vegetal .....	26
5.1.2 Disolventes, reactivos y sustancias de referencia .....	26
5.1.3 Equipos.....	27
5.2 Procedimientos generales de análisis .....	27
5.2.1 Análisis cromatográfico por capa delgada (CCD).....	27
5.2.2 Análisis cromatográfico en columna abierta (CCA) .....	27
5.2.3 Caracterización de productos naturales .....	28
5.3 Metodologías para la obtención e identificación de metabolitos .....	28
5.3.1 Identificación.....	28
5.3.2 Limpieza y fragmentación .....	29
5.3.3 Método de extracción por decocción .....	29
5.3.3.1 Obtención de la fracción orgánica y acuosa.....	29
5.3.4 Método de extracción por Soxhlet .....	32



5.3.4.1 Preparación del extracto orgánico total.....	32
5.3.4.2 Extracción por Soxhlet.....	32
5.3.4.2.1 Estudio químico de <i>Selaginella pallescens</i> .....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
6.1 Método de extracción por decocción.....	36
6.1.1 Análisis espectroscópico de las fracciones de metanol obtenidas de <i>Selaginella pallescens</i> (Sp), <i>S. nothohybrida</i> (Sn) y <i>S. wrightii</i> (Sw) .....	37
6.1.2 Análisis espectroscópico de fracciones de <i>S. pallescens</i> obtenidas por reparto de la decocción .....	38
6.1.3 Análisis espectroscópico de fracciones de <i>S. nothohybrida</i> obtenidas por reparto de la decocción .....	40
6.1.4 Análisis espectroscópico de fracciones de <i>S. lepidophylla</i> obtenidas por reparto de la decocción .....	41
6.1.5 Análisis espectroscópico de fracciones de <i>S. wrightii</i> obtenidas por reparto de la decocción .....	42
6.2 Método de extracción por Soxhlet.....	42
6.2.1 <i>Selaginella nothohybrida</i> .....	43
6.2.1.1 Análisis de las fracciones de hexano y de CHCl <sub>3</sub> .....	43
6.2.1.2 Análisis de la fracción de acetona.....	43
6.2.1.3 Análisis de la fracción de metanol.....	44



6.2.2 <i>Selaginella pallescens</i> .....	44
6.2.2.1 Análisis de la fracción de hexano y de CHCl <sub>3</sub> .....	44
6.2.2.2 Análisis de la fracción de acetona.....	45
6.2.2.3 Análisis de la fracción de metanol.....	45
6.2.3 <i>Selaginella lepidophylla</i> .....	45
6.2.3.1 Análisis de la fracción de hexano y de CHCl <sub>3</sub> .....	45
6.2.3.2 Análisis de la fracción de acetona.....	45
6.2.3.3 Análisis de la fracción de metanol.....	46
6.2.4 <i>Selaginella wrightii</i> .....	46
6.2.4.1 Análisis de la fracción de hexano y de CHCl <sub>3</sub> .....	46
6.2.4.2 Análisis de la fracción de acetona.....	46
6.2.2.4 Análisis de la fracción de metanol.....	46
7. CONCLUSIONES.....	47
8. PERSPECTIVAS.....	48
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
10. ANEXO.....	55





## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
acetona- $d_6$	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
$\delta$	Desplazamiento químico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CD <sub>3</sub> OD/ MeOH- $d_4$	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
d	Doblete
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
IR	Infrarrojo
$J$	Constante de acoplamiento
$\lambda$	Longitud de onda
MeOH	Metanol
$\mu\text{m} / \mu$	Micrómetros / Micras
mm	Milímetros
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
RA	Reactivo analítico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Singulete
T	Temperatura
TMS	Tetrametilsilano



### LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> Procesamiento de extracción para <i>Selaginella lepidophylla</i> , <i>S. nothohybrida</i> , <i>S. pallescens</i> y <i>S. wrightii</i> .....	31
<b>Esquema 2</b> Extracción por Soxhlet para las 4 especies del género <i>Selaginella</i> .....	33
<b>Esquema 3</b> Procesamiento de la fracción de metanol de <i>S. pallescens</i> .....	35

### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Características químicas del género <i>Selaginella</i> .....	5
<b>Tabla 2</b> Propiedades y efectos de los flavonoides y biflavonoides.....	22
<b>Tabla 3</b> Principales señales diagnósticas de las fracciones de metanol en tres especies de <i>Selaginella</i> (Sp, Sn y Sw).....	37



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Especies del género <i>Selaginella</i> : <i>Selaginella lepidophylla</i> (A), <i>Selaginella nothohybrida</i> (B), <i>Selaginella pallescens</i> (C) y <i>Selaginella wrightii</i> (D).....	10
<b>Figura 2</b>	Estructura C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> .....	11
<b>Figura 3</b>	Numeración del esqueleto flavonoide .....	12
<b>Figura 4</b>	Esqueletos básicos de diferentes tipos de flavonoides .....	13
<b>Figura 5</b>	Biogénesis de flavonoides.....	15
<b>Figura 6</b>	Estructuras generales de biflavonoides.....	16
<b>Figura 7</b>	Biflavonoides tipo I .....	17
<b>Figura 8</b>	Biflavonoides tipo II .....	18
<b>Figura 9</b>	Biogénesis de biflavonoides.....	19
<b>Figura 10</b>	Estructura del ácido caféico .....	38
<b>Figura 11</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del biflavonoide amentoflavona, fracción “AGATIV23” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	55
<b>Figura 12</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del biflavonoide robustaflavona, fracción “AGII10” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	56
<b>Figura 13</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del estándar trehalosa “Treha” (400 MHz, D <sub>2</sub> O).....	57
<b>Figura 14</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción de metanol de <i>S. wrightii</i> “Swxanx10” (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	57
<b>Figura 15</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción de metanol de <i>S. nothohybrida</i> “Snxetx8” (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	58
<b>Figura 16</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción de metanol de <i>S. pallescens</i> “Spxmex5” (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	58



<b>Figura 17</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Spxorgx5” (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ).....	59
<b>Figura 18</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la fracción “Spxorgx5” (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ).....	59
<b>Figura 19</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Snxorgx8” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	60
<b>Figura 20</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Slxorgx9” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	61
<b>Figura 21</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Slxorgx10” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	62
<b>Figura 22</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Snxacx33” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	63
<b>Figura 23</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Snxmex33” (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ).....	64
<b>Figura 24</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “Spxacx38” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	65
<b>Figura 25</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “F43xMx54” (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ).....	66
<b>Figura 26</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “SI-h-9” (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	67
<b>Figura 27</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “SI-k-10” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	68
<b>Figura 28</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “SWxHx27” (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	69
<b>Figura 29</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción “SWxAx27” (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	70



## 1. INTRODUCCIÓN.

En México, las plantas medicinales forman parte muy importante de las estrategias que utiliza la población para el tratamiento de enfermedades. Esta práctica resulta de la gran diversidad botánica que ofrece el país así como de la gran diversidad de grupos étnicos dentro de la población y de la necesidad de contar con recursos accesibles para la salud por parte de ésta.

Dentro de las plantas de amplio uso en la medicina tradicional mexicana se encuentran las “doradillas” las cuales representan especies botánicas diferentes dentro de un mismo género y son empleadas medicinalmente con fines similares. Estas especies contienen principalmente metabolitos secundarios de tipo biflavonoide los cuales se han determinado en la mayor parte de especies estudiadas dentro del género *Selaginella* al cual, como se mencionó, pertenecen las “doradillas”. Diversos biflavonoides han mostrado tener actividades biológicas importantes y pueden ser considerados como los compuestos “marcadores” de las diferentes especies; sin embargo la gran cantidad de componentes contenidos en sus extractos, entre ellos azúcares y pigmentos, principalmente clorofilas, hacen que el aislamiento de los biflavonoides sea en ocasiones complicado y con bajos rendimientos. Esta situación es importante ya que para el control de calidad del material vegetal es importante establecer una técnica fitoquímica que muestre en forma directa el contenido de los compuestos marcadores, por lo que el objetivo de este trabajo fue ensayar y comparar entre sí dos métodos de aislamiento para detección de biflavonoides contenidos en cuatro especies de *Selaginella* para determinar las condiciones idóneas de análisis en estos vegetales.



## 2. ANTECEDENTES.

Las plantas medicinales han ocupado desde la antigüedad un lugar central en la terapéutica. Inicialmente, por su proximidad natural al ser humano, se utilizaban siguiendo criterios mágico-religiosos, y paulatinamente, durante siglos, se fue adquiriendo un conocimiento empírico de sus propiedades medicinales por procedimientos de ensayo-error.

El interés por el empleo y aprovechamiento de los recursos que proporciona la biodiversidad se ha mantenido continuamente a lo largo de la historia, sin embargo, sólo a partir del siglo XX fue posible aislar y caracterizar químicamente a las sustancias responsables de los efectos biológicos.

La química de productos naturales ha experimentado una gran diversificación de temas y enfoques; ha permitido integrar un acervo de estructuras moleculares a partir de diversas fuentes naturales (terrestres, marinas, bacterias, hongos, líquenes, etc.), que ha promovido la síntesis orgánica de las mismas, sus biotransformaciones, la biosíntesis y la racionalización de su reactividad química entre otros aspectos. Los hallazgos referentes a sus actividades biológicas han permitido ampliar y profundizar significativamente el conocimiento de los mecanismos que operan en la naturaleza, especialmente relacionados con aspectos ecológicos, medicinales, nutricionales y agronómicos.

Es oportuno destacar la pertinencia de la investigación de los productos naturales para los países poseedores de diversidad biológica y gran tradición en su uso, como el nuestro, no sólo por los hallazgos de utilidad práctica que pueden obtenerse, sino por la responsabilidad de su conservación (Delgado, 2015).



## 2.1 Familia *Selaginellaceae* y género *Selaginella*.

### 2.1.1 Familia *Selaginellaceae*.

La familia *Selaginellaceae* consta de hierbas terrestres, epipétricas, rara vez epifíticas y generalmente son perennes. Consta de un solo género, *Selaginella*, y se encuentra en el grupo de plantas criptógamas vasculares (no posee semillas, sino que se reproduce por medio de esporas) que se les conoce como “licopodios pequeños” debido a la similitud morfológica con las plantas *Lycopodiales*. Esta familia es el único miembro dentro del orden *Selaginelalles*; junto con las plantas *Lycopodiales*, *Lipodendrales* y las *Isoetales* conforman la clase *Lycopodiopsida* (Martínez, 1997).

Dentro de la familia, unas especies poseen tallos postrados y otras los tienen erguidos y delgados. El sistema vascular de los tallos se constituye por una o varias ramificaciones con bifurcaciones desiguales y sin crecimiento en el espesor. El tallo se encuentra recubierto por hojas pequeñas en cuatro hileras longitudinales, pueden estar dispuestas en forma helicoidal o con frecuencia se encuentran decusadas. Las hojas se caracterizan por la presencia de una pequeña lígula a la base del haz y es de consistencia membranosa, órgano que se encarga de captar y facilitar la absorción del agua (Rost *et al.*, 1985).

### 2.1.2 Género *Selaginella*.

Las plantas herbáceas del género *Selaginella* varían de tamaño pequeño a moderado, son más de 750 especies las que conforman el género y están ampliamente distribuidas en el mundo, pero abundan en las zonas tropicales y unas cuantas se extienden en las altas latitudes del norte y sur del país. Algunas especies están adaptadas a soportar ciertos periodos de sequía, por lo que pueden crecer sin problema, en lugares relativamente secos (Martínez, 1997).



Algunas especies se cultivan en invernaderos como plantas ornamentales, pero la principal utilidad está en la medicina tradicional. A este respecto, “doradilla” es el nombre popular que se da a un grupo de plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana que pertenecen a diferentes especies de *Selaginella* y que presentan similares características botánicas macroscópicas y son comercializadas sin distinción (Aguilar *et al.*, 2015).

Las diferentes especies de “doradillas” tienen la habilidad para resistir largos periodos de sequía debido a las propiedades poiquilohídricas y su alto contenido en trehalosa provee un mecanismo de protección contra la sequía (Valdespino, 1992). Bajo condiciones de sequedad las ramas de la doradilla se cierran hacia dentro y parecen como bolas doradas cerca de 10 cm de diámetro; en hábitat húmedos sus ramas se extienden y reverdecen nuevamente de manera que las “doradillas” están caracterizadas por su apariencia tipo roseta (Korall *et al.*, 1999; Korall *et al.*, 2002). Otros nombres comunes para estas plantas han sido “helechos de resurrección” o “plantas de resurrección”, “much-kok”, “texochitl yamanqui” y “flor de piedra” (Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

Los tratamientos tradicionales con “doradilla” incluyen obstrucción urinaria, cistitis, cálculos renales, inflamación de riñones y para dolores de cintura y de espalda. La mayoría de las preparaciones terapéuticas están basadas en la decocción de la planta completa. Otros usos incluyen el tratamiento de problemas digestivos, como eupéptico así como para tos, bronquitis e infecciones por parásitos (Martínez, 1989; Argueta *et al.*, 1994).

Dentro de la composición química de estas plantas se encuentran compuestos aislados pertenecientes a las clases de alcaloides, aceites, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos (cromonas, cumarinas, flavonoides, lignanos, fenilpropanoides, carbohidratos (sacarosa y trehalosa), pigmentos, compuestos quinoides, esteroides, etc. (**Tabla 1**).



**Tabla1.** Características químicas del género *Selaginella*.

ESPECIE	METABOLITOS SECUNDARIOS	USOS Y/O ACTIVIDAD	REFERENCIA
<i>Selaginella bryopteris</i>	<b>Flavonoides:</b> amentoflavona, (2S)-2,3-dihidroamentoflavona, (2''S)-2'',3''-dihidroamentoflavona, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahydroamentoflavona, hinoquiflavona, (2S)-2,3-dihidrohinoquiflavona, (2''S)-2'',3''-dihidrohinoquiflavona, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahidrohinoquiflavona, tetra-O-metilhinoquiflavona, bilobetina, lanaroflavona, siadopitisina, secoiaflavona, 4',7''-tri-O-metilamentoflavona y heveaflavona.	Antiprotozoaria contra <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>T. rhodesiense</i> , <i>T. cruzi</i> ; regeneración de energía y vitalidad.	Kunert <i>et al.</i> , 2008. Ramírez <i>et al.</i> , 2010. Swamy <i>et al.</i> , 2006.
<i>Selaginella chrysocaulos</i>	<b>Flavonoides:</b> amentoflavona, 3',3''-binaringenina, 5'',7''-dihidroxi-2''-fenoxicromonil-(3''',4')-naringenina, naringeninil-(4''''-O-3)-kaempferol y 8''-metilnaringeninil-(4''''-O-3)-kaempferol.	Regeneración de energía y vitalidad.	Swamy <i>et al.</i> , 2006.
<i>Selaginella delicatula</i>	<b>Flavonoides:</b> robustaflavona, amentoflavona, 2,3-dihidroisocriptomerina, 2'',3''-dihidro-4',7,7''-trimetiléter-robustaflavona, 2,3-dihidro-4',7,7''-trimetiléter-robustaflavona, 2'',3''-dihidro-4',7-dimetiléter-robustaflavona, 4',7-dimetiléter-robustaflavona y 4'-metiléter-robustaflavona. <b>Fenilpropanoides:</b> ácidos cafeoilquínicos y ácido isoclorogénico A, B y C.	Inhibe el crecimiento de las líneas celulares tumorales Raji y Calu-1.	Lin <i>et al.</i> , 2000a. Lin L. <i>et al.</i> , 2000b.

**Tabla1.** Características químicas del género *Selaginella* (continuación).

<i>Selaginella denticulada</i>	<b>Flavonoides:</b> robustaflavona, amentoflavona, criptomarina B, isocriptomarina, e hinoquiflavona.	Para epilepsia, con efecto narcótico, antihelmíntico y antiespasmódico.	Lopez-Saez J. <i>et al.</i> , 1994. Lopez-Saez <i>et al.</i> , 1995.
<i>Selaginella doederleinii</i>	<b>Alcaloides:</b> hordenina, hordenina-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido, N-metiltiramina-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido y hordenina-O-[(6''-O-transcinamoil)-4'-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido]. <b>Cumarinas:</b> isopimpinellina. <b>Esteroles:</b> $\beta$ -sitosterol. <b>Flavonoides:</b> amentoflavona, apigenina, heveaflavona 4'-metiléter-robustaflavona, 4,7,7''-trimetiléter-robustaflavona, y derivados metoxilados de amentoflavona. <b>Lignanos:</b> (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B, (+)-matairesinol A, (+)-wilkstromol, (-)-nortraquelósido y (+)-nortraquelósido.	Enfermedades cardiovasculares, actividad bactericida, fuerte actividad citotóxica <i>in vitro</i> . Antimutagénico contra mutaciones en <i>Salmonella typhimurium</i> y antitumoral en ratones.	Chao <i>et al.</i> , 1987. Chen <i>et al.</i> , 1995. Lin <i>et al.</i> , 1987. Lin <i>et al.</i> , 1994.
<i>Selaginella labordei</i>	<b>Flavonoides:</b> 2,3-dihidro-5,5'',7,7'',4'-pentahidroxi-6,6''-dimetil-[3'-O-4''']-biflavona, 2'',3''-dihidroocnaflavona y 2'',3''-dihidro-3',3'''-biapigenina.	Inhibe la proliferación de células causantes del cáncer de colon.	Xu <i>et al.</i> , 2009.
<i>Selaginella lepidophylla</i> *	<b>Flavonoides:</b> robustaflavona, amentoflavona, 2,3-dihidrorobustaflavona, 5-metiéter de 2,3-dihidrorobustaflavona, hinoquiflavona, isocriptomarina, heveaflavona, trimetiléter-hinoquiflavona y 5',5''-dihidroxi-7,7'',4',4'''-tetrametoxiamentoflavona. <b>Glucósidos:</b> sacarosa y trehalosa.	Enfermedades urinarias, diarrea y malestares hepáticos.	Adams <i>et al.</i> , 1990. Aguilar <i>et al.</i> , 2008. Qasim <i>et al.</i> , 1985.

**Tabla1.** Características químicas del género *Selaginella* (continuación).

<i>Selaginella moellendirffii</i>	<p><b>Alcaloides:</b> ácido selaginético, ácido 5-hidroxiselaginético, 5-hidroxi-N<sub>8</sub>,N<sub>8</sub>-dimetilpseudoprinaminol, N-selagineloil-L-fenilalanina, N-(5-hidroxiselagineloil)-L-fenilalanina y derivados del ácido neoselaginético.</p> <p><b>Flavonoides:</b> amentoflavona, 7',4,7'',4''-tetrametiléter-amentoflavona, 7,4'',7''',4''''-tetrametoxi-amentoflavona, apigenin-7-O-β-neosperidósido, apigenina-8-C-β-D-glucopiranosido, 6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosil-apigenina, 6,8-di-C-β-D-glucopiranosil-apigenina, 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-β-D-glucopiranosil-apigenina, kayaflavona, ginkgetina, podocarpusflavona A, β-sitosterol e isopimpinina.</p> <p><b>Linganos:</b> moellenósido A y moellenósido B.</p>	Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> sobre el virus de la hepatitis B (VHB) y la gonorrea. Posee actividad citotóxica contra adenocarcinoma ovárico.	Cao <i>et al.</i> , 2010a. Evans <i>et al.</i> , 1990. Sun <i>et al.</i> , 1997. Wang <i>et al.</i> , 2009. Zhu <i>et al.</i> , 2008.
<i>Selaginella nothohybrida</i> *	<p><b>Flavonoides:</b> amentoflavona, robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.</p>	Desordenes renales y actividad antioxidante.	Aguilar <i>et al.</i> , 2015. Andrade <i>et al.</i> , 2018.
<i>Selaginella pallescens</i> *	<p><b>Flavonoides:</b> amentoflavona, bilobetina y ácido eucómico.</p>	“Mal del orín” (enfermedades urinarias), desordenes renales y actividad antioxidante.	Andrade <i>et al.</i> , 2018.

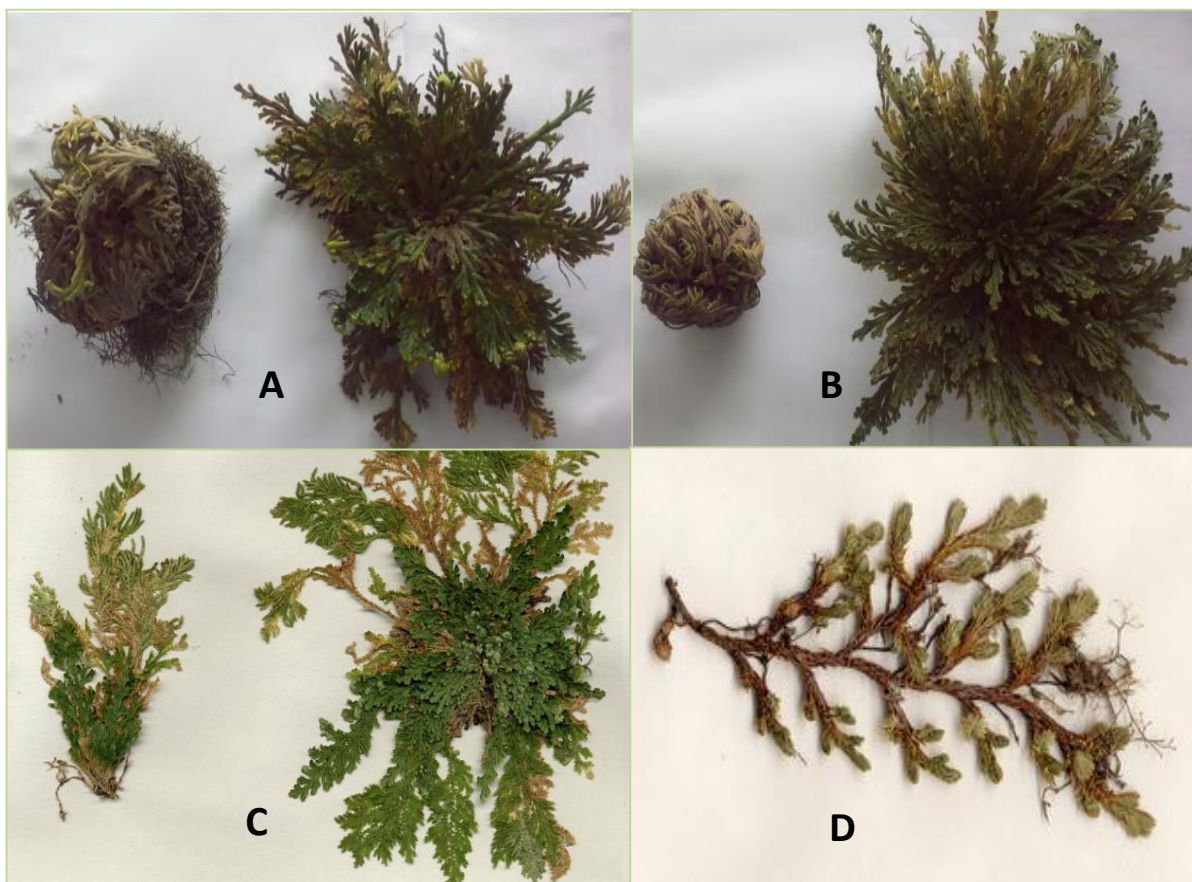
**Tabla1.** Características químicas del género *Selaginella* (continuación).

<i>Selaginella pulvinata</i>	<b>Esteroides:</b> ácido 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-(5 $\alpha$ )-colestano-21-oico y $\beta$ -sitosterol. <b>Flavonoides:</b> amentoflavona, pulvinatadiona, pulvinatabiflavona y 5,5''',4'''-trihidroxi-7,7''-dimetoxi-[4'-O-6'']-biflavona. <b>Pigmentos:</b> selaginelina C, selaginelina D, selaginelina E, selaginelina F, selaginelina G y selaginelina H.	Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Cao <i>et al.</i> , 2010b. Cao <i>et al.</i> , 2010c. Ma <i>et al.</i> , 2001. Tan <i>et al.</i> , 2004. Zheng <i>et al.</i> , 2007.
<i>Selaginella selaginoides</i>	<b>Flavonoides:</b> robustaflavona, amentoflavona e hinoquiflavona.	Antiepiléptico y antiespasmódico.	Lopez-Saez <i>et al.</i> , 1995.
<i>Selaginella sinensis</i>	<b>Flavonoides:</b> amentoflavona, 4', 7''-di-O-metilamentoflavona, ginkgetina, genistina, quercetina, apigenina, hinoquiflavona, 2,3-dihidroamentoflavona, 4-O-metilrobustaflavona. <b>Lignanos:</b> sinesiol A, pinoresinol diglucósido, (7S,8R)-4,9,9'-trihidroxi-3,3'-dimetoxi-7,8-dihidrobenzofuran-1'-propilneolignano, pinoresinol-4-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, siringaresinol-4,4'-O-di- $\beta$ -D-glucopiranosido, sesquiligano, siringaresinol, (-)-pinoresinol. <b>Pigmento:</b> selaginelina.	Antioxidante y antiviral (virus sincitial respiratorio, virus de influenza A y B, HSV-1, HSV-2, VIH).	Dai <i>et al.</i> , 2001. Dai <i>et al.</i> , 2006. Feng <i>et al.</i> , 2008. Ma <i>et al.</i> , 2001. Wang <i>et al.</i> , 2007. Zhang <i>et al.</i> , 2011.

**Tabla1.** Características químicas del género *Selaginella* (continuación).

<i>Selaginella tamariscina</i>	<p><b>Ácidos:</b> ácido 3<math>\beta</math>,16<math>\alpha</math>-dihidroxi-5<math>\alpha</math>,17<math>\beta</math>-coleston-21-carboxílico, ácido 3<math>\beta</math>-acetoxi-16<math>\alpha</math>-hidroxi-5<math>\alpha</math>,17<math>\beta</math>-coleston-21-carboxílico y ácido 3<math>\beta</math>-(3-hidroxibutiroxi)-16<math>\alpha</math>-hidroxi-5<math>\alpha</math>,17<math>\beta</math>-coleston-21-carboxílico.</p> <p><b>Alcaloides:</b> adenosina y guanosina.</p> <p>Bencenoides: arbutina, ácido vanílico</p> <p><b>Flavonoides:</b> amentoflavona, robustaflavona, 6-(2-hidroxi-5-acetilfenil)-apigenina, heveaflavona, sumaflavona, taiwaniaflavona, 2',8''-biapigenina, isocriptomerina, hinoquiflavona.</p> <p><b>Lignanós:</b> 5-acetildihidro-2-(3'.5'-dimetoxi-4'-dihidroxifenil)-7-metoxibenzofurano, siringaresinol, tamariscinósido B y C.</p> <p><b>Pigmentos:</b> selaginelina A y B</p> <p>Quinoides: 1-metoxi-3-metilanttraquinona.</p>	<p>Promueve la circulación, estimula la descarga menstrual.</p> <p>Actividad antiproliferativa en células humanas con leucemia, regulan la expresión de metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-2) en fibroblastos de piel humana, antifúngico y con actividad antidiabética.</p>	<p>Bi <i>et al.</i>, 2004.</p> <p>Gao <i>et al.</i>, 2007.</p> <p>Jung <i>et al.</i>, 2006.</p> <p>Lara, 2014.</p> <p>Lee 2008.</p> <p>Liu <i>et al.</i>, 2010.</p> <p>Swamy <i>et al.</i>, 2006.</p> <p>Yang <i>et al.</i>, 2006.</p> <p>Zheng <i>et al.</i>, 2013.</p>
<i>Selaginella willdenowii</i>	<p><b>Flavonoides:</b> isocriptomerina, tetracetilisocriptomerina, robustaflavona, bilobetina, 2'',3''-dihidroisocriptomerina, 4',7''-di-O-metilamentoflavona, 7''-O-metilrobustaflavona, amentoflavona.</p>	<p>Citotóxico</p>	<p>Silva <i>et al.</i>, 1995.</p>
<i>Selaginella wrightii</i> *	<p><b>Flavonoides:</b> amentoflavona, robustaflavona e isocriptomerina.</p>	<p>No reportado.</p>	<p>Lara, 2014.</p>

\* Especies de interés para el desarrollo del presente trabajo.



**Figura 1** Especies del género *Selaginella*: *Selaginella lepidophylla* (A), *Selaginella nothohybrida* (B), *Selaginella pallescens* (C) y *Selaginella wrightii* (D) (Lara, 2014).

## 2.2 Flavonoides y biflavonoides.

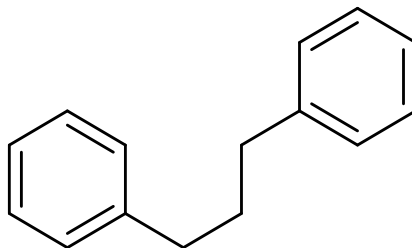
Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de los vegetales. Descubiertos por el doctor Albert Szent-Györgyi, científico húngaro ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937, les dio el nombre de “vitamina P” (por permeabilidad) y en un inicio también “vitamina C” (por presentar algunas propiedades similares a la vitamina C), al aislar del aceite esencial de la cáscara de limón la citrina, sustancia que probó regular la permeabilidad de los capilares venosos al ser consumida (Singleton, 1987).



### 2.2.1 Estructura química de los Flavonoides

*Flavonoide* (del latín *flavus*, “amarillo”) es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en el citoplasma, en las vacuolas y en las membranas de las células vegetales, tanto en estado libre como en el glicosilado, y constituyen el grupo más amplio de fenoles naturales. Son los pigmentos responsables del color otoñal de las hojas y de muchas gamas del amarillo, naranja, rojo, azul, blanco y violeta en las flores (Aguilar, 2015).

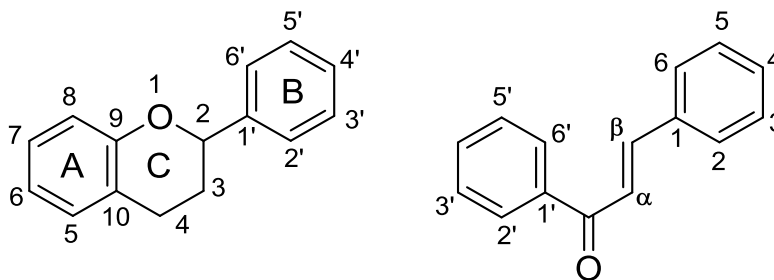
Los flavonoides son compuestos fenólicos diarilpropánicos, es decir, su estructura es del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (15 átomos de carbono) (Pietta, 2000), con dos anillos bencénicos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos, en donde un anillo bencénico “A”, es derivado de una cadena policétida, un anillo “B”, derivado del ácido siquímico y los tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, corresponden a la parte alquílica del fenilpropano (**Fig. 2**). En la **Fig. 3** se puede observar la numeración de la estructura la cual comienza con el oxígeno del anillo C.



**Figura 2.** Estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.



La estructura puede conformar un heterociclo (fenil-benzopirano) o una cadena abierta, como en las chalconas. Por otra parte, dependiendo de la posición de unión del anillo aromático al residuo de benzopirano (cromano), este grupo de *productos naturales* puede dividirse en tres clases: los flavonoides (2-fenil-benzopiranos), isoflavonoides (3-fenil-benzopiranos) y los neoflavonoides (4-fenil-benzopiranos). Todos los flavonoides se numeran en sentido horario, con números simples en los anillos A y C, y números con “prima” en el anillo B (**Fig. 3**). La excepción son las auronas, donde la numeración se invierte (Harborne *et al.*, 1975).

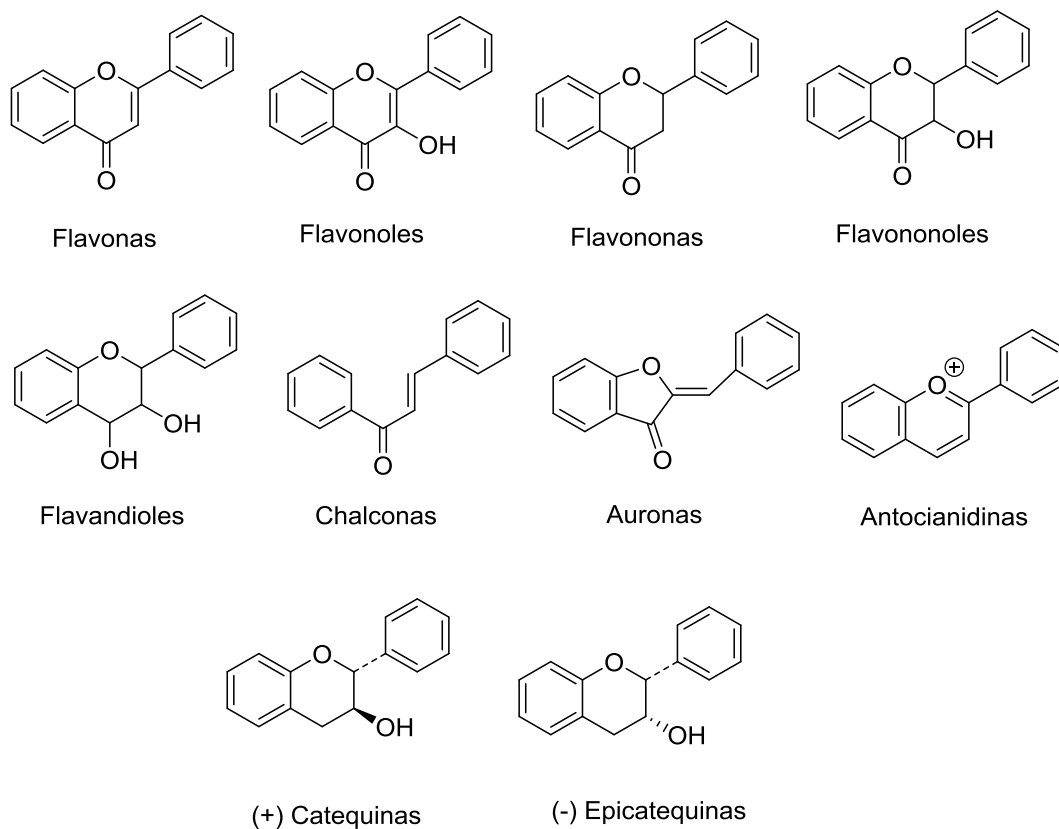


**Figura 3.** Numeración del esqueleto flavonoide.

### 2.2.2 Clasificación de Flavonoides.

Los flavonoides naturales que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las variantes estructurales que presenta la cadena central C<sub>3</sub>, las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados. Los principales grupos se encuentran listados en la **Fig. 4** (Harborne *et al.*, 1975).





**Figura 4.** Esqueletos básicos de diferentes tipos de flavonoides.

En las plantas, se ha demostrado que los flavonoides se encuentran ligados a otro tipo de moléculas. La combinación del núcleo flavonoide básico (**Fig. 2**) más una o más unidades de carbohidratos, se denominan glicósidos; la composición flavonoide-lignano se denomina flavolignano y cuando no están unidos a carbohidratos se les denominan agliconas flavonoides.

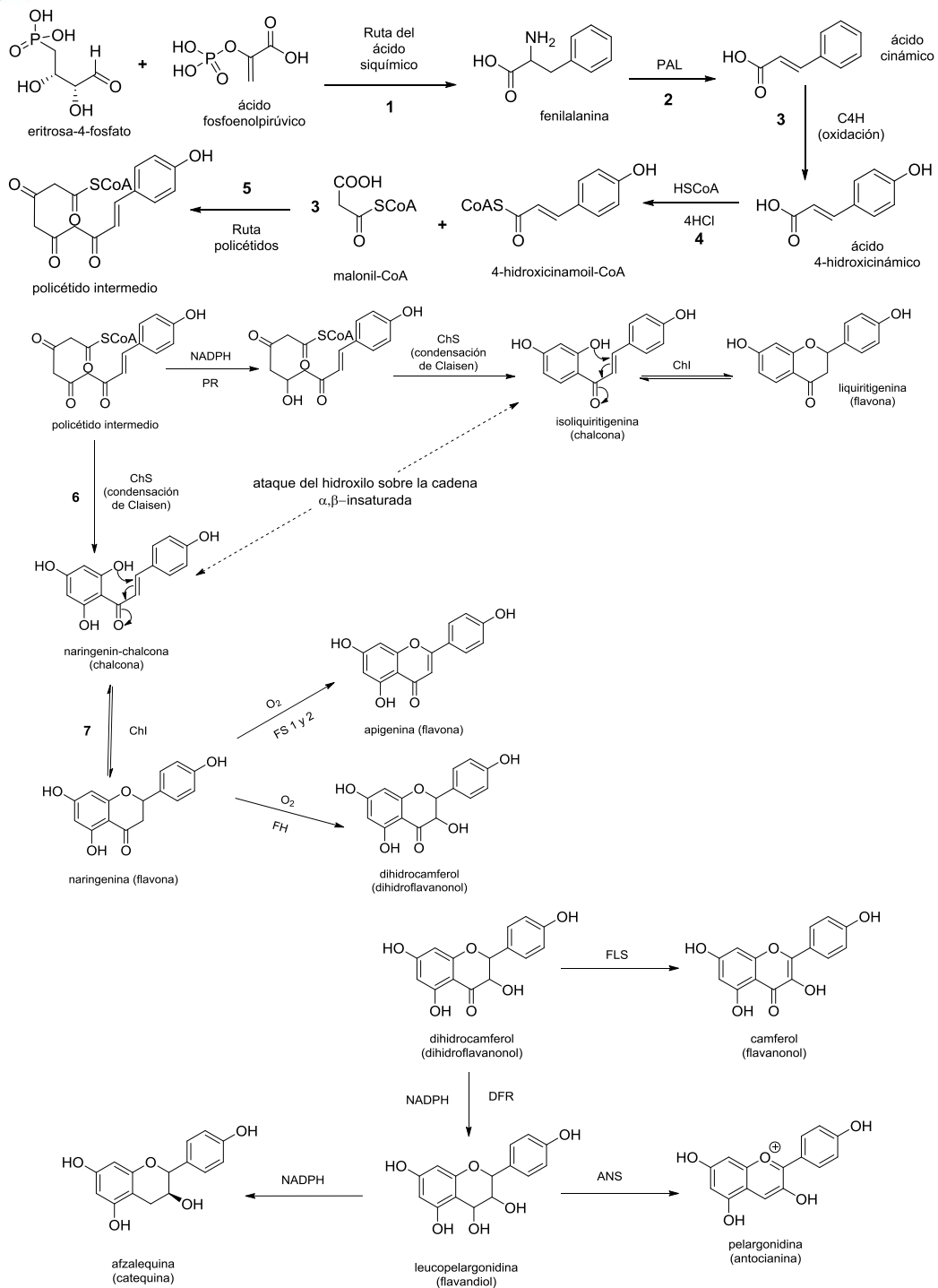
### 2.2.3 Biosíntesis de Flavonoides

Los flavonoides se originan en la naturaleza por biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos y el anillo B y la cadena C<sub>3</sub> se originan de la ruta del ácido siquímico. En la **Fig. 5** se esquematizan los siguientes pasos (Dewick, 2009; Mann, 1987; Winkel-Shirley, 2001; Winkel, 2006):



- 1) La biosíntesis inicia con la ruta del ácido siquímico, por condensación de los metabolitos primarios, eritrosa 4-fosfato y el fosfoenol piruvato (FEP) y por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico, a partir del cual se forma el precursor de aminoácidos aromáticos, el ácido corísmico y éste conduce a la formación del aminoácido fenilalanina.
- 2) Eliminación del amonio de la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (FAL) para dar origen al ácido cinámico.
- 3) El ácido cinámico es transformado en ácido 4-hidroxicinámico (o ácido *p*-cumárico) por acción de la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H), que se encarga de incorporar un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático.
- 4) Posteriormente, con la incorporación de una unidad de acetil-CoA, la enzima 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa (4HCL) da origen al precursor 4-hidroxicinamoil-CoA.
- 5) Por la ruta de los policétidos, se forma un policétido intermediario con la unión de 4 hidroxicinamoil-CoA, (unidad iniciadora), y 3 unidades de malonil-CoA (unidad extendedora).
- 6) Por la acción de la chalcona sintetasa, el policétido se cicla por condensación tipo Claisen, para dar origen al anillo A y formar una chalcona.
- 7) Las flavonas se forman con un ataque nucleofílico tipo Michael del hidroxilo sobre la cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada.

Las chalconas pueden dar lugar a las auronas y a las flavonas, y a partir de éstas, mediante la acción de diversas enzimas, se originan otros tipos de flavonoides (**Fig. 4**). El número de flavonoides diferentes es elevado si se considera que diez de los carbonos del esqueleto pueden ser sustituidos por una variedad de grupos, que a su vez pueden ser hidroxilados, metoxilados, metilados, isoprenilados, bencilados, etc.



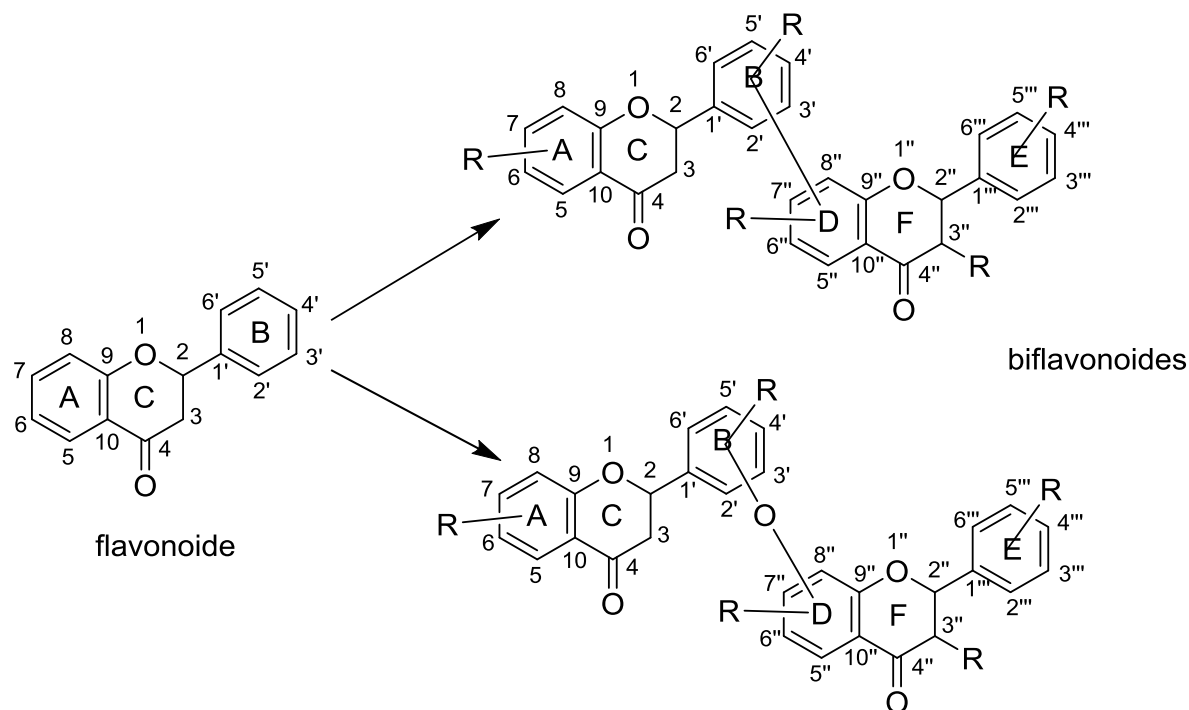
PAL: fenilalanina amonioliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4HCL:4-hidroxicinamato-CoA-ligasa, PR: policétido reductasa, ChS: chalcona sintetasa, ChI:chalcona isomerasa, FS1 y 2: flavona sintetasa 2 y 2, FH: flavona 3-hidroxilasa, FLS: flavonol sintetasa, DFR: dihidroxiflavanol-4-reductasa, ANS: antocianidina sintetasa.

**Figura 5.** Biogénesis de flavonoides.



## 2.2.4 Estructura química de los biflavonoides

*Biflavonoides* (también llamados bisflavonoides) son moléculas polifenólicas integradas por dos unidades de flavonoide (**Fig. 2**), las cuales pueden ser o no iguales, unidas de manera simétrica o no, por medio de un enlace -C- u -O- de longitud variable (**Fig. 6**). Estos compuestos se encuentran en estado libre y algunas veces como O-glicósidos. Son encontrados frecuentemente en gimnospermas, pero mayoritariamente en briofitas y pteridofitas (Kassem *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006).



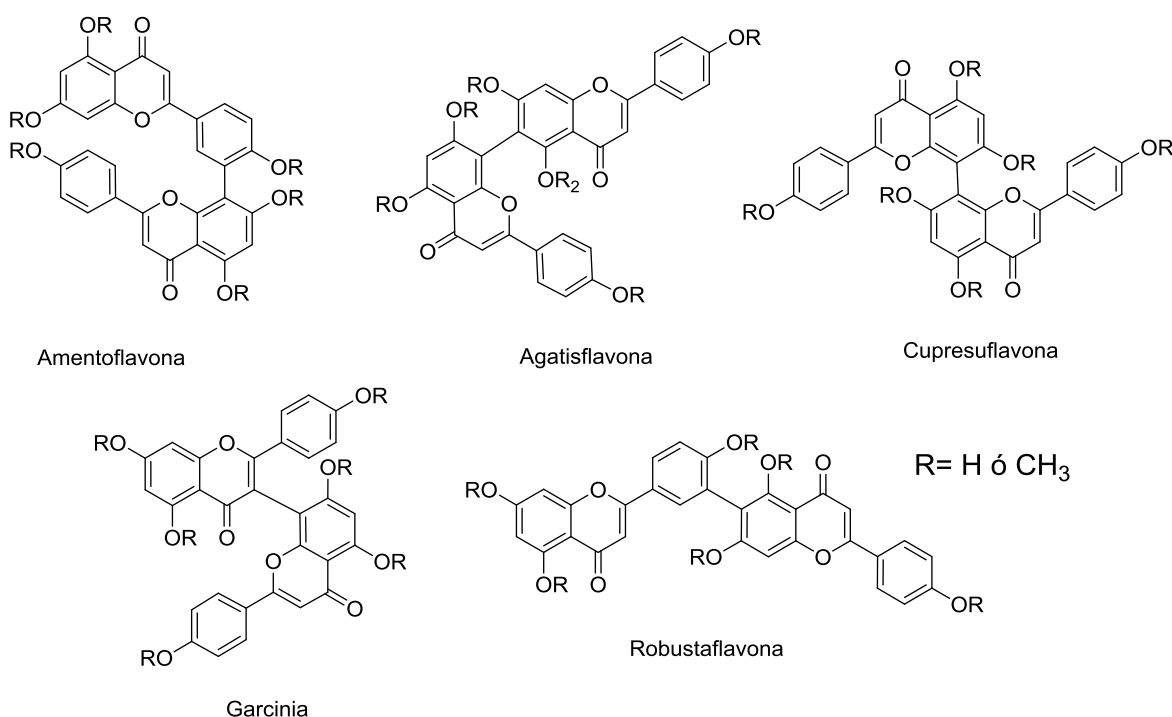
**Figura 6.** Estructuras generales de biflavonoides.

Pueden existir como monómeros de flavonoides con conexión C-C, ó C-O-C. El nombramiento de las posiciones en cada caso comienza con el anillo que contiene el átomo de oxígeno y en el segundo esqueleto, los números de los anillos, A y C se numeran con bi-primas ('), mientras que los del anillo C, con tri-primas (''').



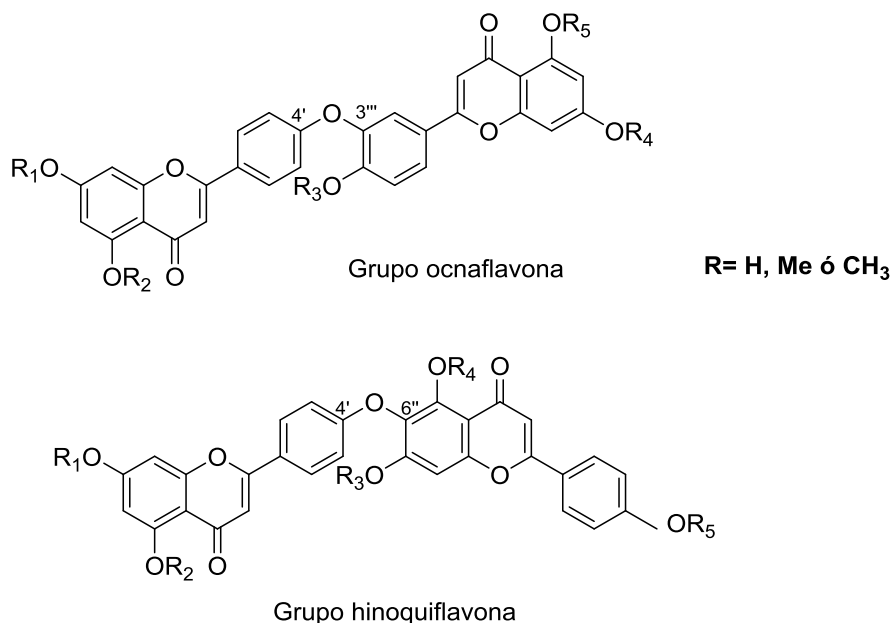
### 2.2.5 Clasificación de los biflavonoides

En los biflavonoides conocidos, la unión de los monómeros puede ser de varios tipos, los tipo unión C-C bifenilo (I) y a través de una unión éter bifenílico (II) (Ferreira *et al.*, 2006; Widyastuti *et al.*, 1992). El tipo I (**Fig. 7**) incluye a los biflavonoides del grupo agatisflavona, cuya unión C-C se da entre el C-6 y C-8''; el grupo cupresuflavona se une entre C-8 y C-8''; el grupo amentoflavona en donde la unión se da entre C-3 y C-8'' y los biflavonoides del grupo robustaflavona los cuales se unen en C-3' y C-6''.



**Figura 7.** Biflavonoides tipo I.

Entre los biflavonoides del tipo II (**Fig. 8**) se encuentra el tipo hinoquiflavona donde la unión C-O-C se da en el C-4' y C-6'' y el grupo ochnaflavona se unen entre C-4 y C-6''.



**Figura 8.** Biflavonoides tipo II.

#### 2.2.6 Biosíntesis de biflavonoides.

Los biflavonoides se forman a través del acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y modificaciones subsecuentes del carbono central C<sub>3</sub>. Si un electrón es abstraído del anión C-4 de naringeninochalcona, se forma un radical que puede ser representado con las fórmulas canónicas A y B. Si el electrón abstraído del anión C-4' de la misma chalcona genera el radical representado por C, D y E, por la unión de dos de los radicales antes mencionados, se obtienen los precursores de los biflavonoides naturales (**Fig. 9**) (Harborne *et al.*, 1975).

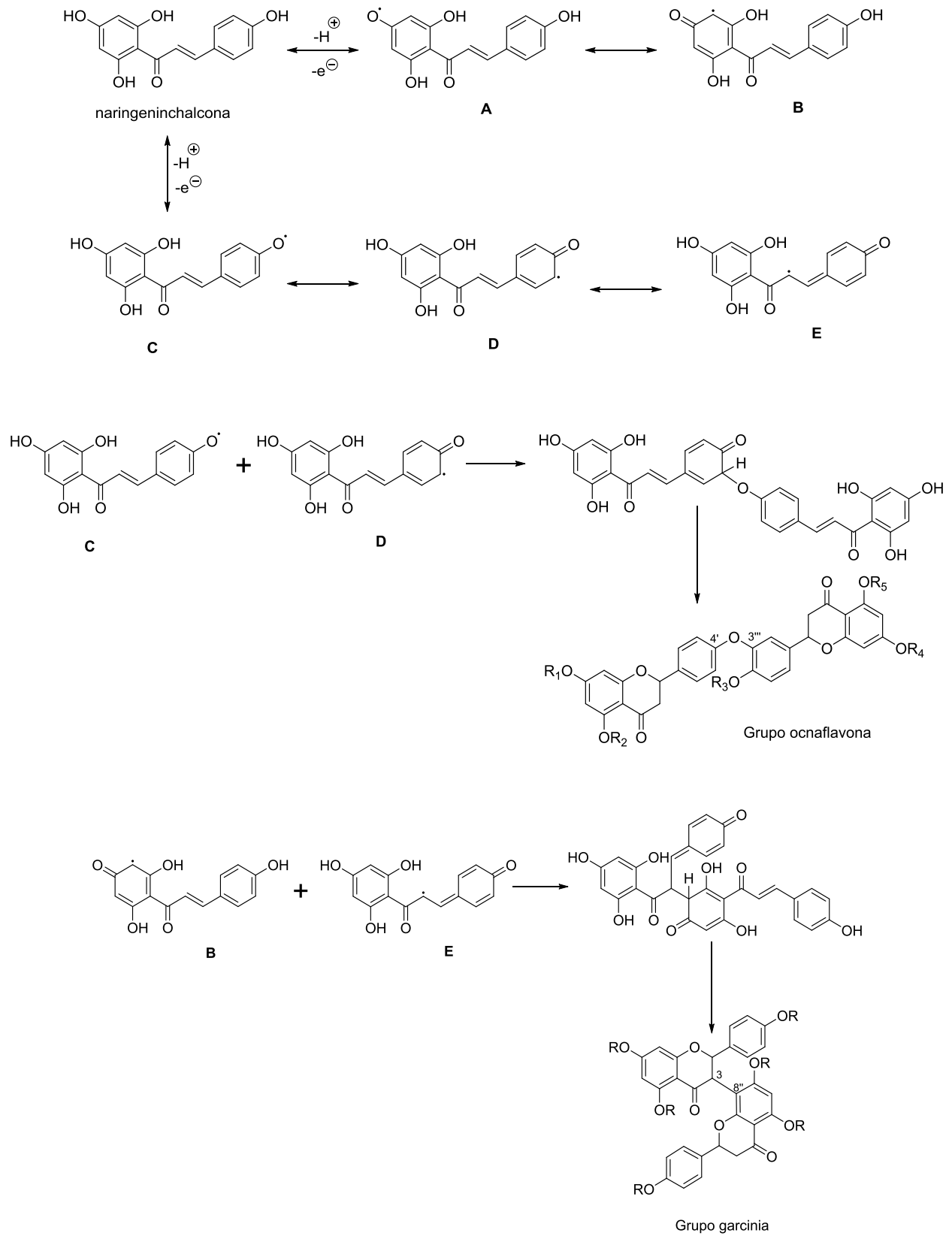


Figura 9. Biosíntesis de biflavonoides

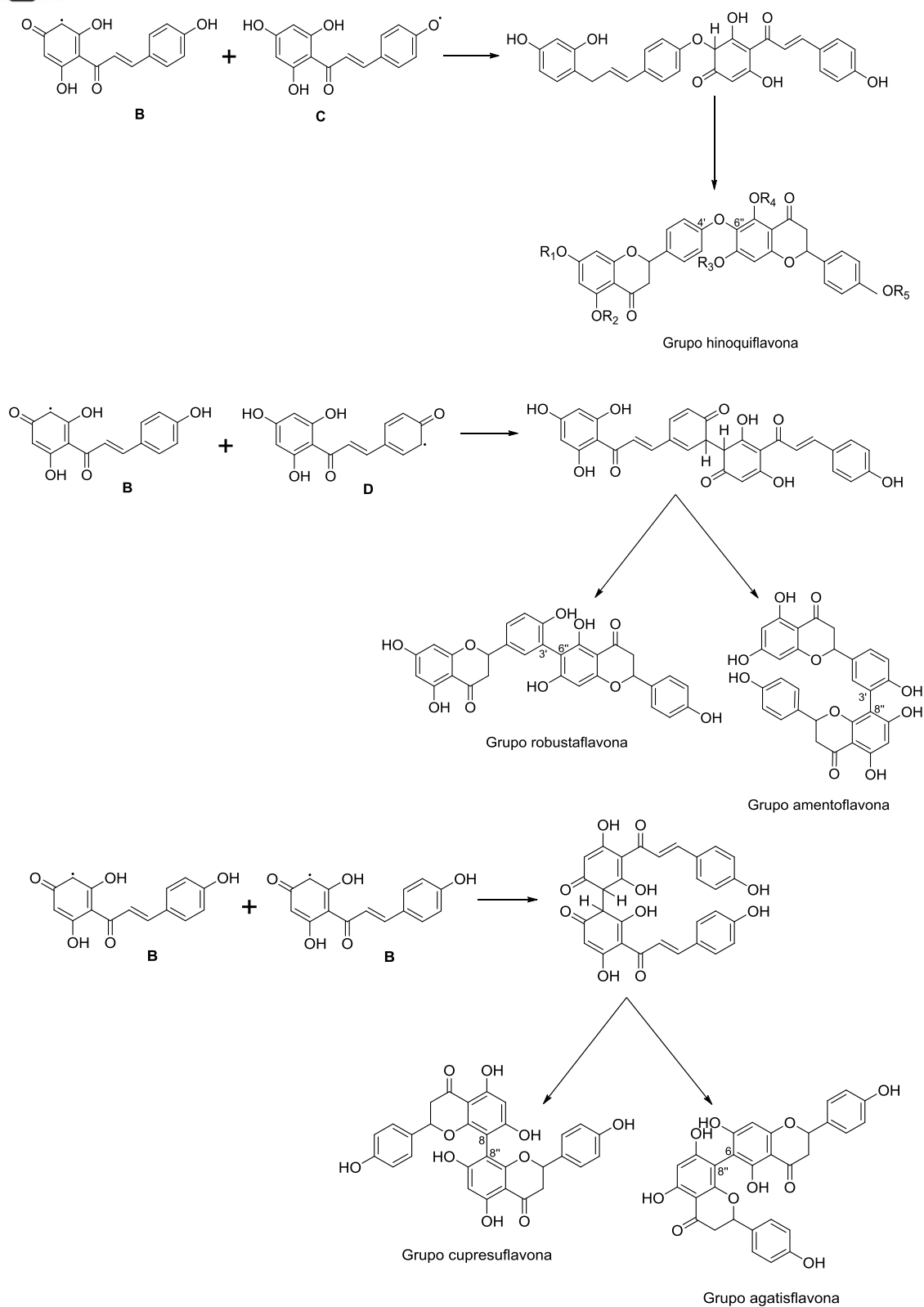


Figura 9. Biosíntesis de biflavonoides (continuación).





### 2.2.7 Importancia biológica.

El interés por los biflavonoides se ha incrementado debido a que se ha observado que presentan diversas propiedades farmacológicas; las plantas utilizan estos biflavonoides principalmente como respuesta a las diversas condiciones ambientales, defensa contra las plagas, enfermedades y competencia entre plantas (Setyawan *et al.*, 2008). En la **Tabla 2** se muestran algunas de las propiedades mencionadas:

**Tabla 2.** Propiedades y efectos biológicos de los flavonoides y biflavonoides.

Humanos	Plantas
Propiedades quimiopreventivas contra el cáncer y antimutagénicas: algunos flavonoides han demostrado eficacia en la inhibición del crecimiento de cierto tipo de células cancerosa. (Harborne, 1994).	Protección ante la luz UV. Los flavonoides incoloros suelen acumularse en las capas más superficiales de las plantas y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, así impiden los efectos nocivos en los tejidos internos.
En el sistema cardiovascular ayudan a la regulación de la permeabilidad capilar y actúan como antiagregantes plaquetarios, antihemorrágicos, vasodilatadores, con actividad venotónica y de protección vascular por regulación de la permeabilidad capilar y aumento de su resistencia (Nestel, 2003)	Atracción de animales polinizadores. Muchos flavonoides y biflavonoides son componentes de los pigmentos de las flores y hojas que confieren coloraciones atrayentes de insectos, por lo que atraen a los polinizadores hacia las flores y con esto, la preservación de especies vegetales.
Protección del hígado, algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado, como la silimarina la cual protege y regenera el hígado durante la hepatitis (Aguilar, 2015)	Atracción de presas. Las plantas carnívoras, como la <i>Drosera</i> y la <i>Dionea</i> , poseen antocianidinas en sus flores y sus hojas, que cumplen una función de atracción de los insectos que les sirven de alimento.
Protección del estómago: ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el canferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.	Defensa, algunas antocianinas protegen a la planta al generar sabores o texturas desagradables para los herbívoros.
Antiinflamatorios y analgésicos: acción que se debe a los efectos antioxidantes y a la capacidad de actuar contra la histamina y otros mediadores de los procesos inflamatorios como son las prostaglandinas y los leucotrienos. (Abiodun <i>et al.</i> , 1996)	Atracción de animales dispersores de semillas y de frutos. Algunas plantas, con el uso de biflavonoides, confieren aromas y colores a los frutos y semillas que tienen volviéndolos más apetecibles para los herbívoros que cumplen la función de dispersión de semilla
Antimicrobianos: isoflavonoides y furanocumarinas han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. (Basile <i>et al.</i> , 1999)	



### 2.2.8 Obtención e identificación dentro de la planta.

Los flavonoides se biosintetizan en todas las plantas de taxón *Embryophyta* y también de algunas algas *Charophyta*; aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides y biflavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente y su adaptación a éste. Se sintetizan en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas son comunes a todas ellas y otras son específicas de algunos taxones.

Las chalconas intervienen en la estimulación de la polinización porque inducen el desarrollo de colores en el espectro visible y UV al atraer insectos. Las flavonas son amarillas y pueden estar en flores para brindarle el color a los pétalos, o frutos, como en la piel de las uvas, son responsables del color amarillento de los vinos blancos. Las antocianidinas, pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolas de las células, son responsables de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas, también contribuyen al sabor astringente del té.



### 3. JUSTIFICACIÓN.

El aislamiento de determinados compuestos contenidos en ciertas plantas de uso medicinal requiere de un método apropiado para su rastreo o detección en esa determinada fuente vegetal.

Existe una gran variedad de métodos para el aislamiento de metabolitos secundarios, sin embargo, de acuerdo al contenido metabólico tan diverso de cada especie vegetal, el método de obtención es específico para obtener un mejor rendimiento de los compuestos activos o de los marcadores analíticos y poder eliminar fácilmente los compuestos que no son de interés para un determinado estudio. A este respecto, las especies del género *Selaginella* tienen un alto contenido del azúcar trehalosa y también de diversos pigmentos (clorofilas y pigmentos rojos). Es necesaria experimentación para establecer un procedimiento que permita la detección y el aislamiento de biflavonoides contenidos en especies de *Selaginella* de manera más eficaz, para eliminar la interferencia con los otros de no interés por lo que en este trabajo se plantea la comparación de un método tradicional de obtención de biflavonoides por extracción por maceración del material vegetal con el método de extracción por Soxhlet que permite el uso de disolventes que no son utilizados en el método tradicional el cual incluye procesamiento por reparto líquido-líquido. El método por Soxhlet permite a lo largo de su desarrollo monitorear las fracciones en donde están presentes los biflavonoides, lo que disminuye el tiempo de aislamiento y al mismo tiempo se puede intentar el estudio metabólico de las especies utilizando un biflavonoide específico como compuesto marcador de esa especie.



## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 Objetivo principal.

Desarrollar un método de extracción eficaz para cuatro especies del género *Selaginella*, que permita la determinación directa de la presencia de un compuesto marcador de tipo biflavonoide contenido en ese extracto.

### 4.2 Objetivos particulares.

1. Revisión bibliográfica de antecedentes en la literatura de experimentos de aislamiento de biflavonoides.
2. Obtención del material vegetal (*Selaginella nothohybrida*, *S. pallescens*, *S. lepidophylla* y *S. wrightii*).
3. Desarrollo de operaciones fitoquímicas preliminares (limpieza, desecación y fragmentación) con el material vegetal.
4. Obtención del extracto total de cada una de las especies del punto 2 (cloroformo/metanol 1:1, v/v).
5. Obtención de la decocción de las cuatro especies vegetales y fraccionamiento por reparto líquido-líquido con acetato de etilo, monitoreando la presencia de algún biflavonoide en las fracciones resultantes por CCD y RMN-<sup>1</sup>H.
6. Fraccionamiento del extracto total obtenido de cada una de las especies de *Selaginella* por el método de Soxhlet, empleando disolventes de diversas polaridades y monitoreando la presencia de algún biflavonoide en las fracciones resultantes por CCD y RMN-<sup>1</sup>H.



## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

### 5.1 Material.

#### 5.1.1 Material Vegetal.

Colectas de especies del género *Selaginella*:

- *Selaginella lepidophylla*
- *Selaginella nothohybrida*
- *Selaginella pallescens*
- *Selaginella wrightii*

#### 5.1.2 Disolventes, reactivos y sustancias de referencia.

- Cloroformo grado RA
  - Metanol grado RA
  - Acetona grado RA
  - Hexano grado RA
  - Acetato de etilo grado RA
  - Agua grado HPLC
  - Ácido acético glacial grado RA al 0.1%
  - Solución de sulfato cérico amoniacal  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N
  
  - Referencia de robustaflavona\*
  - Referencia de amentoflavona\*
  - Referencia de trehalosa\*
- \*Aislados e identificados en el Laboratorio 111, Departamento de Farmacia.
- Sephadex lipofílico LH-20, tamaño de partícula 20 - 100  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich
  - Sílicagel 60, tamaño de partícula 0.063- 0.200 mm



#### 5.1.4 Equipos

- Rotaevapor marca IKA RV10 y Büchi R-124, RE 111
- Balanza analítica y granataria marca Ohaus Pioneer y Ohaus Scout-pro, respectivamente.
- Cámara con lámpara de luz UV Spectroline modelo CM-10 a dos longitudes de onda (254 y 365 nm)
- Aparato Fisher Johns para determinar punto de fusión

### **5.2 Procedimientos generales de análisis.**

#### 5.2.1 Análisis cromatográfico por capa delgada (CCD).

Los análisis cromatográficos se efectuaron utilizando placas de aluminio de 0.2 mm de grosor, recubiertas con Sílicagel 60 (F<sub>254</sub> Merck KGaA) de diferentes dimensiones y empleando diversos sistemas de elución.

Para visualizar el contenido metabólico en el proceso cromatográfico en placa fina se utilizó una cámara con lámpara de luz UV a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y como revelador químico una solución de sulfato cérico amoniacal  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N seguido de calentamiento en parrilla eléctrica.

#### 5.2.2 Análisis cromatográfico en columna abierta (CCA).

La cromatografía en columna abierta se efectuó utilizando columnas de vidrio de diferentes capacidades, empleando Sephadex lipofílico LH-20, tamaño de partícula 20 - 100  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich y Sílicagel 60, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm como adsorbentes y mezclas de diversos disolventes como fases móviles.



### 5.2.3 Caracterización de productos naturales.

La determinación de la estructura molecular de los productos naturales se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos de IR y RMN.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un equipo Varian Innova a 400 y 100 MHz. Se utilizaron acetona- $d_6$ , metanol- $d_4$ ,  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{D}_2\text{O}$  como disolventes. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno.

## 5.3 Metodologías para la obtención e identificación de metabolitos.

### 5.3.1 Identificación.

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

Las especies vegetales *Selaginella lepidophylla*, *S. pallescens* y *S. wrightii* fueron recolectadas en septiembre de 2009 en el “Cerro Pájaro”, localizado en el Km 122, carretera a Putla, Oaxaca por el M. en C. Ramiro Ríos del Departamento de Botánica, FES Zaragoza, UNAM:

- Una muestra de referencia de *Selaginella lepidophylla* (SL-0909-03) se depositó en la colección botánica del Herbario FEZA de la FES Zaragoza de la UNAM.
- Una muestra de referencia de *Selaginella pallescens* (SP-090902) se depositó en la colección botánica del Herbario FEZA de la FES Zaragoza de la UNAM.





- Una muestra de referencia de *Selaginella wrightii* (SW-0909-04) se depositó en la colección botánica del Herbario FEZA de la FES Zaragoza de la UNAM.

La especie vegetal *Selaginella nothohybrida*, se adquirió en el anexo del mercado de Sonora de la Ciudad de México, local 173 en agosto del 2005.

- Una muestra de referencia (SN.0805) se depositó en la colección botánica del Laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

### 5.3.2 Limpieza y fragmentación

El material vegetal (planta completa de cada una de las especies del género *Selaginella*) fue sometido a secado al aire libre y a la sombra. Posteriormente se fragmentó con las manos y el uso de tijeras eliminando los restos de otras plantas, pasto, polvo y tierra contenida en cada planta.

### 5.3.3 Método de extracción por decocción.

#### 5.3.3.1 Obtención de la fracción orgánica y acuosa.

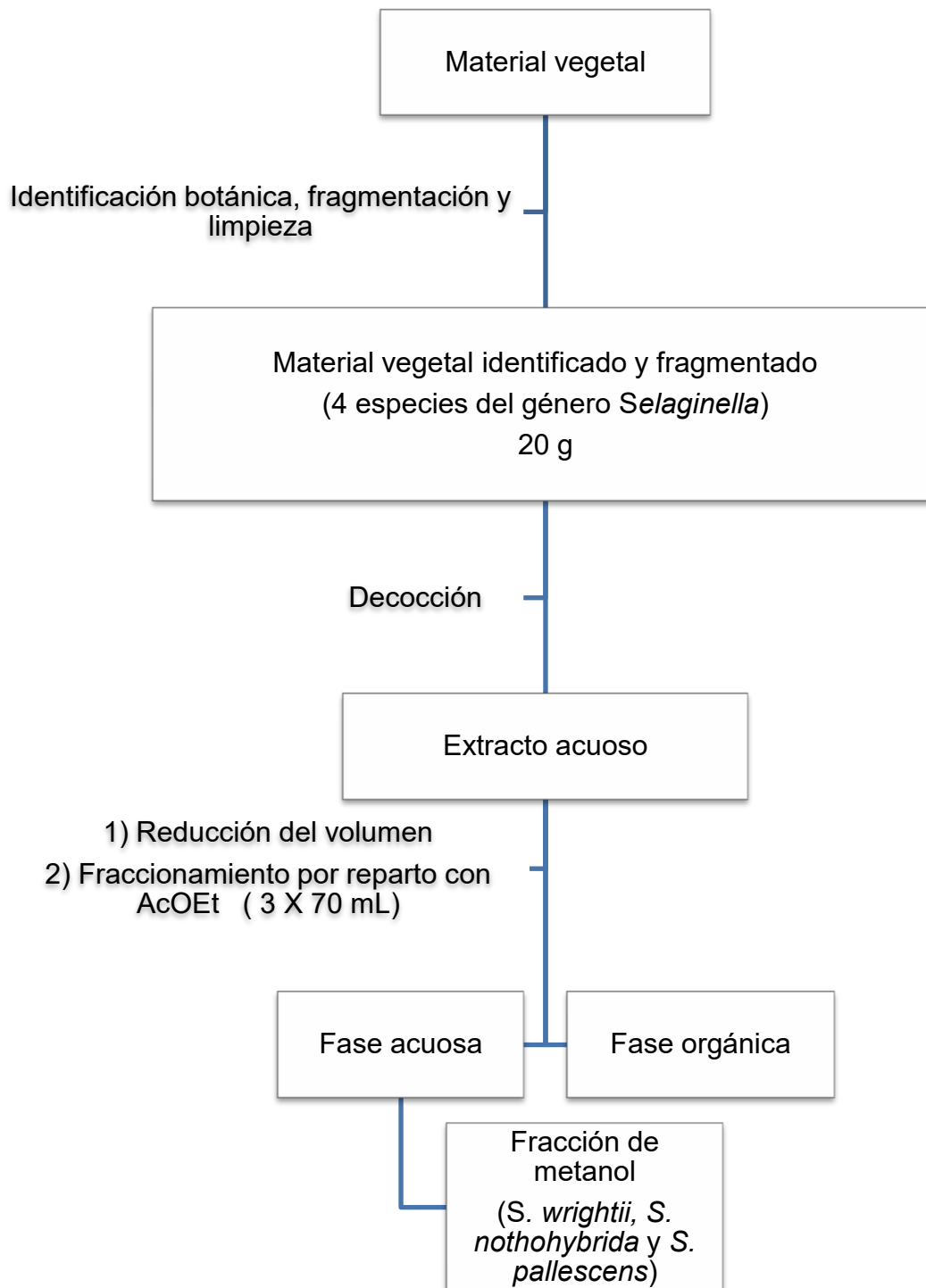
Se preparó el extracto acuoso de cada una de las especies de estudio con el material limpio, desecado y molido (20 g de *S. wrightii*, *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. pallescens*) por decocción con 500 mL de agua desionizada a ebullición; se dejó hervir durante 10 minutos y posteriormente se filtró con algodón y papel filtro.

Los extractos acuosos se concentraron hasta un volumen de 100 mL para ser fraccionados por reparto líquido-líquido (por triplicado) con 70 mL de acetato de etilo RA.



Posterior al fraccionamiento, la fase acuosa remanente se concentró a sequedad a presión reducida empleando una bomba de alto vacío mientras que la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y concentró a vacío. Se obtuvieron espectros de RMN  $^1\text{H}$  para cada uno de los extractos finales.

La fase acuosa obtenida en el procesamiento de *S. wrightii*, *S. nothohybrida* y *S. pallescens* presentó residuos adheridos en el matraz y fueron recuperados con metanol. Dicha fracción se llevó independientemente a sequedad (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Procesamiento de extracción por decocción para *Selaginella lepidophylla*, *S. nothohybrida*, *S. pallescens* y *S. wrightii*.



#### 5.3.4 Método de extracción por Soxhlet.

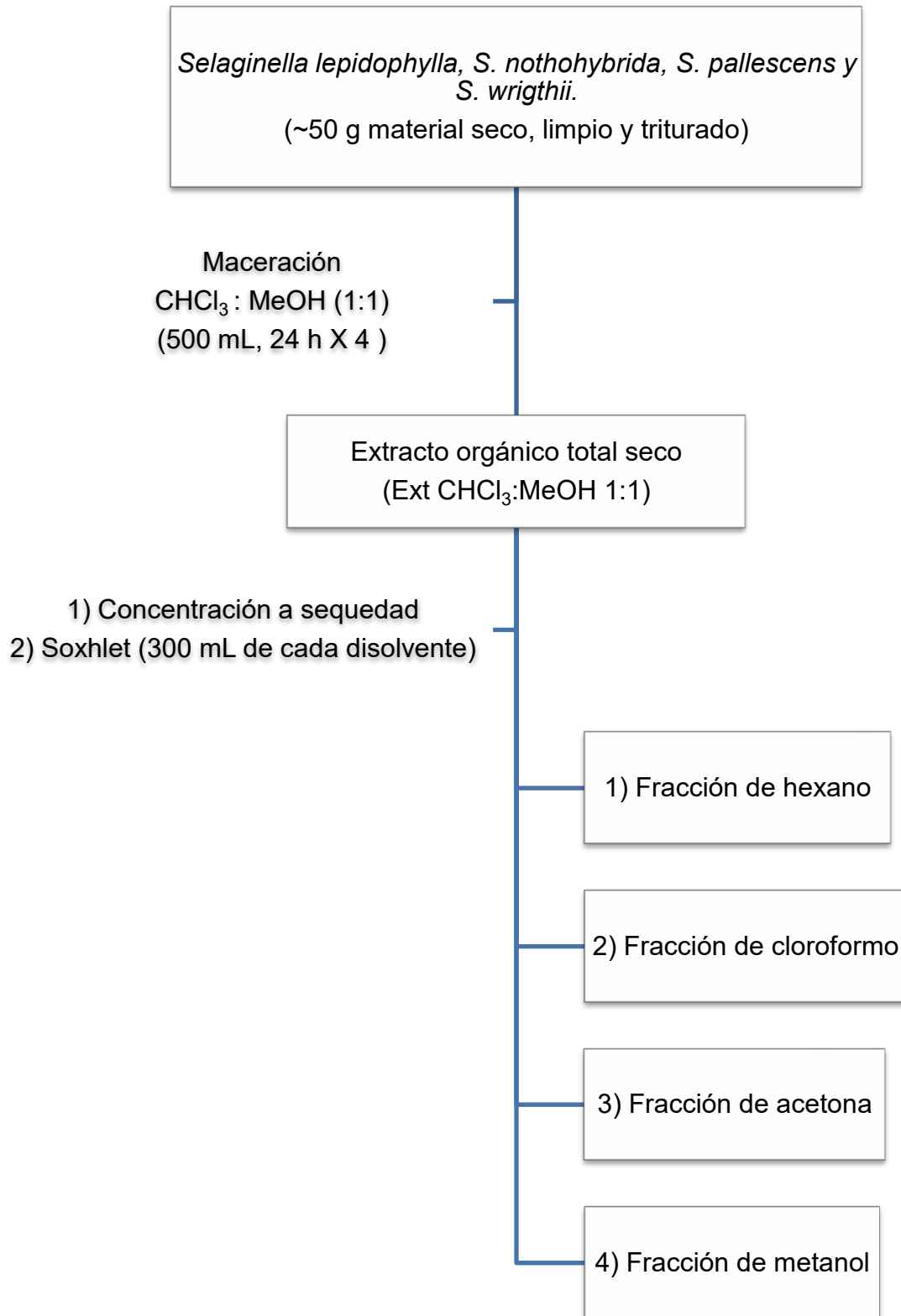
##### 5.3.4.1 Preparación del extracto orgánico total.

Aproximadamente 50 g de material vegetal (*S. wrightii*, *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. pallescens*), limpio, desecado y triturado, se sometieron de manera independiente a un proceso de maceración, con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) (4 x 500 mL) por periodos de 24 horas cada uno. Posteriormente cada uno de los extractos se filtró con algodón y luego con papel filtro, se concentraron a presión reducida para obtenerse los extractos totales de las cuatro especies estudiadas.

##### 5.3.4.2 Extracción por Soxhlet.

El producto de la maceración (extracto orgánico total libre de disolvente), se depositó en un cartucho de papel filtro de 7 cm, para su extracción vía Soxhlet, consecutivamente con hexano, cloroformo, acetona y metanol (**Esquema 2**).

Se obtuvieron espectros de RMN  $^1\text{H}$  para cada una de las fracciones finales.



**Esquema 2.** Extracción por Soxhlet para las 4 especies del género *Selaginella*.



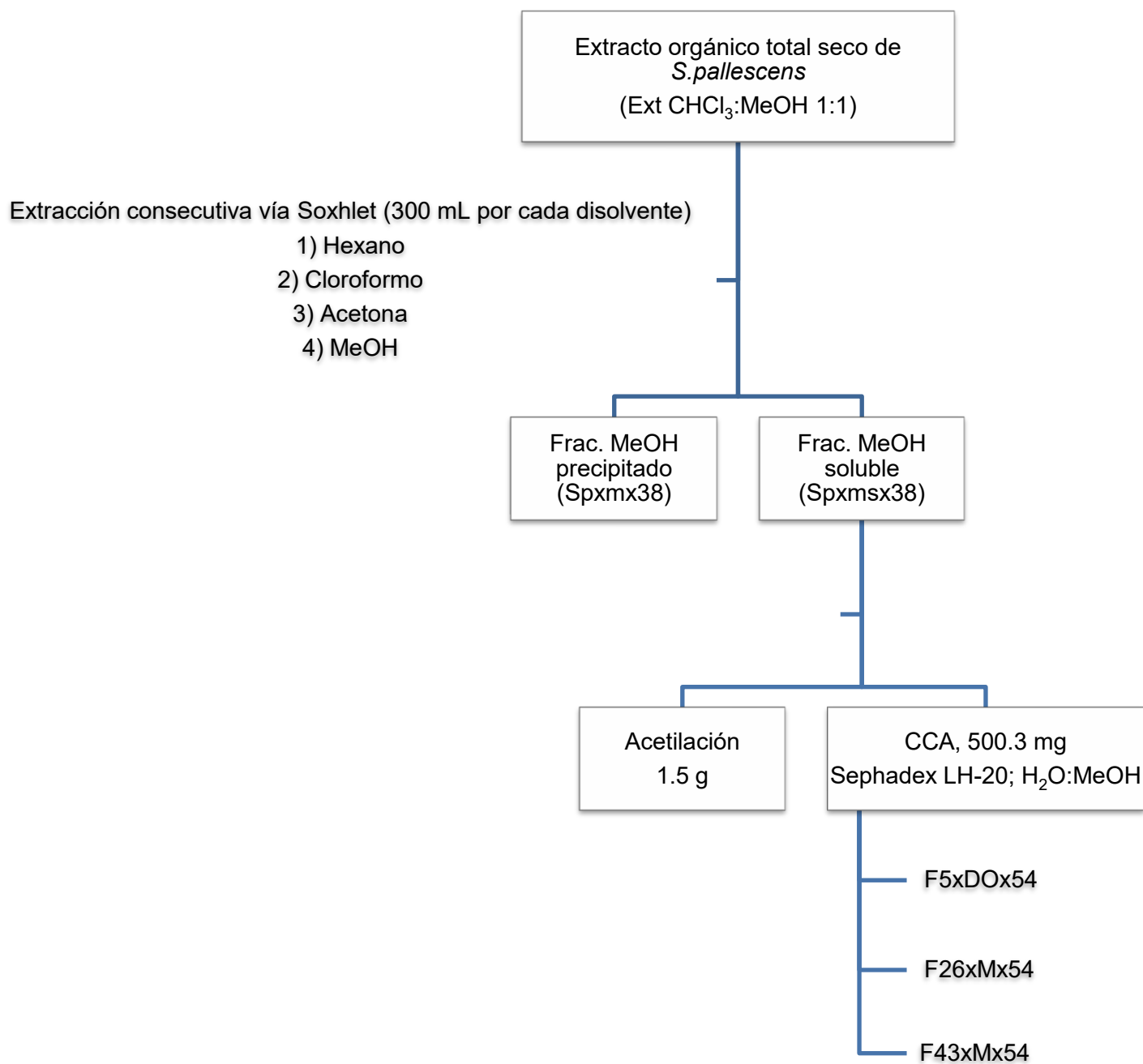
#### 5.3.4.2.1 Estudio fitoquímico de *Selaginella pallescens*

Después de su evaporación, la fracción de metanol producto del proceso por Soxhlet se obtuvo en dos partes, una soluble y un precipitado, por lo que se les dio un tratamiento diferente al de las fracciones de acetona, cloroformo y hexano.

Se realizó un espectro de RMN  $^1\text{H}$  a las porciones “Frac. MeOH precipitado” y a “Frac. MeOH soluble”.

La fracción de MeOH (soluble) se dividió en 2 partes; 1.5 g de ésta, se concentró a presión reducida hasta obtener un polvo; éste se sometió a un fraccionamiento cromatográfico empleando Sephadex lipofílico y como fase móvil mezclas de  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH con incrementos de polaridad (1:0 $\rightarrow$ 0:1),  $\text{H}_2\text{O}$  grado HPLC. De ese tratamiento se obtuvieron 56 eluatos que fueron agrupados por similitud en 20 fracciones de acuerdo a su contenido visualizado por CCD. Tres fracciones mayoritarias que presentaron sedimentos sólidos se analizaron por RMN  $^1\text{H}$  (Fracción F5, F26 y F43) (**Esquema 3**).

Por otra parte, 500.3 mg de la fracción soluble en MeOH se sometieron a una reacción de acetilación con 5 mL de anhídrido acético y 1.5 mL de piridina con agitación magnética y a temperatura ambiente durante 24 h. Al cabo de este tiempo se añadieron 25 g de agua/hielo y se aciduló con HCl al 10% hasta un pH cercano a 2 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se extrajo con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 10 mL) y finalmente el extracto orgánico se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvo la fracción acetilada (**Esquema 3**).



**Esquema 3.** Procesamiento de la fracción de metanol de *S. pallescens*.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con el objetivo de extraer compuestos de tipo biflavonoide a partir de especies de *Selaginella* por un método simple que permita la detección directa de éstos en un extracto o fracción determinados, se ensayaron dos métodos de extracción: por decocción (y posterior fraccionamiento por reparto) y por Soxhlet (con disolventes de diferentes polaridades). Las fracciones obtenidas en cada caso fueron analizadas espectroscópicamente por RMN-<sup>1</sup>H y en algunos casos de <sup>13</sup>C.

Para el estudio comparativo por RMN de biflavonoides se emplearon espectros de compuestos obtenidos en forma pura en el laboratorio 111 (apartado 5.1.3) (**Fig. 11**, espectro de amentoflavona; **Fig. 12**, espectro de robustaflavona) (González, 2015; Lara, 2014).

### 6.1 Método de extracción por decocción.

La decocción del material vegetal en todas las muestras (*S. nothohybrida*: Sn, *S. pallescens*: Sp, *S. lepidophylla*: Sl y *S. wrightii*: Sw) dio como resultado un extracto acuoso de color verde intenso, muy denso, con un volumen aproximado de 120 mL; cada uno de ellos se fraccionó por reparto líquido-líquido con acetato de etilo (F1<sup>a</sup>); el contenido de la fase acuosa remanente evaporado casi a sequedad y transferido a un matraz de reacción fue sometido a condiciones ácidas con calentamiento (hidrólisis ácida) y la solución resultante fue extraída con acetato de etilo; esta fracción orgánica secundaria (F2<sup>a</sup>) fue sometida cromatográficamente en columna para aislar probables productos de hidrólisis como el ácido eucómico que fue aislado en un experimento previo de *S. pallescens* (Lara, 2014).

En todos los casos, la fracción de AcOEt primaria (F1<sup>a</sup>) así como la obtenida del primer reparto (en frío, 2<sup>a</sup>) fueron analizadas por RMN-<sup>1</sup>H y algunas por <sup>13</sup>C.





6.1.1 Análisis espectroscópico de las fracciones de metanol obtenidas de *Selaginella pallescens* (Sp), *S. nothohybrida* (Sn) y *S. wrightii* (Sw).

Al transferir la fase acuosa proveniente de la hidrólisis ácida y posterior separación por reparto líquido-líquido al matraz de reacción, quedó como remanente un precipitado que fue lavado con MeOH. El análisis por RMN-<sup>1</sup>H de este precipitado, aislado en muy pequeña cantidad de todas las colectas, dio evidencia de la presencia del azúcar trehalosa, ubíquo en especies de *Selaginella*, junto con otro tipo de azúcares minoritarios (Tabla 3, Figs. 13, 14, 15 y 16, Anexo).

**Tabla 3.** Principales señales diagnósticas de las fracciones de metanol en tres especies de *Selaginella* (Sp, Sn y Sw).

Espectro	Especie	Señales diagnósticas	Estándar de trehalosa en D <sub>2</sub> O "Treha" (Fig 13)
<b>Swxanx10</b> (Fig 14)	<i>Selaginella wrightii</i>	Se visualizaron todas las señales del estándar	5.16 (d, $J= 3.6$ Hz H-1), 3.70-3.84 (m, H-3, H-5, H-6a y H-6b) 3.61 (dd, $J= 9.9$ , $J= 3.8$ Hz, H-2), 3.41 (dd, $J= 9.4$ H-4).
<b>Snxetx8</b> (Fig 15)	<i>Selaginella nothohybrida</i>	Se visualizaron todas las señales del estándar	
<b>Spxmex5</b> (Fig 16)	<i>Selaginella pallescens</i>	Se visualizaron todas las señales del estándar	



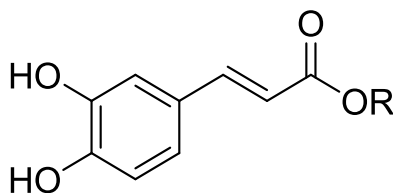
6.1.2 Análisis espectroscópico de fracciones de *S. pallescens* obtenidas por reparto de la decocción.

La fracción de *acetato de etilo* (F1<sup>a</sup>) mostró señales complejas de una mezcla de compuestos en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, sin embargo fueron evidentes las siguientes señales diagnósticas para un derivado del ácido cafeico (**Fig. 10**):

- Un par de dobletes en 7.98 y 6.72 con constantes de acoplamiento de 15.9 Hz asignadas a dos hidrógenos en una doble ligadura con isomería trans.
- Tres señales en  $\delta_H$  7.18 (d,  $J = 8.0$  Hz), 7.11 (dd,  $J = 8.0$  Hz) y 7.39 (d,  $J = 1.7$  Hz) para un sistema ABX correspondiente a un anillo bencénico trisustituído (**Fig. 17**)

Por otra parte, en el espectro de RMN<sup>13</sup>C no se observó la señal del carbonilo del ácido, pero sí las de un sistema aromático:

- De 110.0 a 148.0 ppm, numerosas señales bien definidas en dos grupos, de 146.0 a 147.0 ppm, como cinco carbonos cuaternarios aromáticos base de oxígeno, dos señales en 133.0 y 136.0 ppm para carbonos de doble ligadura y seis señales de carbono de doble ligadura o de carbonos base de oxígeno entre 110.0 y 121.0 ppm (**Fig. 18**).
- Lo anterior no concuerda con un sistema aromático como el de los biflavonoides.



Ácido cafeico

R= azúcar

**Figura 10.** Estructura del ácido cafeico



En otra parte del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Fig. 17**) se observó:

- Una señal doble en  $\delta_H$  5.23 con constante de acoplamiento de 6.16 Hz asignada a un hidrógeno de un carbono anomérico, y de 3.10 a 4.50 ppm se observan multipletes asignados a hidrógenos en carbonos base de oxígenos, con señales correspondientes en el espectro de <sup>13</sup>C, y en conjunto se asignaron a un azúcar.

En el mismo espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Fig.17**) se observan las señales diagnósticas de un biflavonoide en muy escasa concentración:

- Entre 10.06 y 10.29 ppm, 7 señales de hidroxilos aromáticos
- En 13.45 ppm y 13.62 dos singuletes característicos de los hidrógenos de hidroxilos unidos por puentes de hidrógeno a carbonilos de flavonoides.
- Entre 6.30 y 8.10 ppm, señales sobrelapadas con las otras señales aromáticas descritas en párrafos anteriores, que corresponderían a las señales para una o más moléculas de biflavonoide.
- Las observaciones anteriores denotan que este sistema de extracción y fraccionamiento no es óptimo para la visualización por un análisis con RMN-<sup>1</sup>H o de <sup>13</sup>-C de biflavonoides presentes en ese extracto o fracción en una especie de Selaginella.

Como se mencionó en el apartado 6.1, se intentó aislar ácido eucómico que había sido obtenido en dos estudios previos de esta especie (Lara, 2014; Andrade *et al.*, 2018), para lo cual se realizó una hidrólisis ácida de las cuatro muestras de Selaginella (fase acuosa) con HCl 1 M, calentando a 80°C y posteriormente se extrajo con AcOEt por reparto. Al analizar el producto de reacción en la fracción de AcOEt, no se observó evidencia de su presencia en esta colecta.



### 6.1.3 Análisis espectroscópico de fracciones de *S. nothohybrida* obtenidas por reparto de la decocción.

- La fracción de acetato de etilo proveniente del reparto acuoso-orgánico de la decocción (F1<sup>a</sup>) fue analizada por RMN-<sup>1</sup>H (**Fig. 19**) también mostró ser una mezcla compleja de compuestos, pero a diferencia del experimento con *S. pallescens* (sección 6.1.1), se observaron señales características de los biflavonoides presentes en esa especie, dentro de las cuales las más importantes fueron las siguientes:
- En  $\delta_H$  13.00 y 12.00 se observaron dos singuletes característicos de los hidrógenos de los hidroxilos aromáticos ligados al grupo carbonilo de la flavona por puentes de hidrógeno. Estas señales integraron para cuatro biflavonoides, correlacionándolas con las señales de la zona de aromáticos (8.00 y 8.21 ppm).
- En la zona entre 9.50 y 10.00 ppm se observaron señales distintivas de hidrógenos de grupos hidroxilo fenólicos.
- Entre 7.70 y 8.20; 7.54 y 7.42; 7.12 y 7.25; 5.97 y 6.72 se apreciaron señales características de los biflavonoides amentoflavona, robustaflavona, bilobetina e isocriptomerina. De los biflavonoides anteriormente mencionados, sólo amentoflavona y robustaflavona habían sido detectados en esta especie.
- Por otra parte, al analizar el producto de la reacción de hidrólisis realizada para esta colecta como se mencionó en el apartado 6.1.1, no se observó evidencia de la presencia de ácido eucómico.



6.1.4 Análisis espectroscópico de fracciones de *S. lepidophylla* obtenidas por reparto de la decocción.

La fracción de acetato de etilo proveniente del reparto acuoso-orgánico de la decocción (F1<sup>a</sup>) de *S. lepidophylla*, también mostró tener una mezcla compleja de señales y también a diferencia del experimento con *S. pallescens*, al ser analizada por RMN-<sup>1</sup>H (**Fig. 20**), se observaron las señales características del biflavonoide amentoflavona y de otros presentes en esa especie. Las señales más importantes fueron las siguientes:

- En  $\delta_H$  13.18 y 13.01 se observaron dos singuletes característicos de los hidrógenos de los hidroxilos aromáticos ligados a grupos carbonilos de las flavonas por puentes de hidrógeno. Estas señales integraron para un biflavonoide principalmente, correlacionándolas con las señales de la zona de aromáticos (8.02 y 8.10 ppm).
- En la zona entre 9.50 y 10.00 ppm se observaron señales distintivas de hidrógenos de grupos hidroxilo fenólicos.
- En 8.10, 8.02, 7.60, 7.20, 6.50, 6.40 y 6.20 ppm se aprecian señales características del biflavonoide amentoflavona. Entre 7.90 y 7.80, dos señales dobles parecidas a las de hinokiflavona; adicionalmente se observan señales múltiples, algunas sobrepuestas entre sí, correspondientes a hidrógenos aromáticos, probablemente correspondientes a biflavonoides o a otros compuestos de naturaleza aromática; cabe mencionar que amentoflavona e hinokiflavona habían sido detectados en esta especie. Otros compuestos presentes en esta fracción son azúcares cuyas señales se observaron entre 2.90 y 5.20 ppm.

Como en los casos de las otras especies estudiadas en este trabajo, al analizar el producto de la reacción de hidrólisis realizada para esta colecta como se mencionó en el apartado 6.1.1, no se observó evidencia de la presencia de ácido eucómico.



6.1.5 Análisis espectroscópico de fracciones de *S. wrightii* obtenidas por reparto de la decocción.

La fracción de acetato de etilo proveniente del reparto acuoso-orgánico de la decocción (F1<sup>a</sup>) de *S. wrightii*, también mostró tener una mezcla compleja de señales y por lo tanto de compuestos y a diferencia del experimento con *S. pallescens*, al ser analizada por RMN-<sup>1</sup>H (**Fig. 21**) se observaron las señales características de biflavonoides presentes en esa especie, dentro de las cuales las más importantes fueron las siguientes:

- En  $\delta_H$  13.64 y 13.47 se observaron dos singuletes característicos de los hidrógenos de los hidroxilos aromáticos ligados a grupos carbonilos de las flavonas por puentes de hidrógeno.
- En la zona entre 10.16 y 10.30 ppm se observaron señales distintivas de hidrógenos de grupos hidroxilo fenólicos.
- Entre 8.60 y 5.90 ppm se aprecian numerosas señales entre las cuales no fue posible identificar las de un biflavonoide específicamente. En este espectro también son evidentes las señales de compuestos de naturaleza azucarada.

Como en los casos de las otras especies estudiadas en este trabajo, al analizar el producto de la reacción de hidrólisis realizada para esta colecta como se mencionó en el apartado 6.1.1, no se observó evidencia de la presencia de ácido eucómico.

## 6.2 Método de extracción por Soxhlet.

El residuo seco de maceración del material vegetal con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1,1, v/v) de cada una de las especies de *Selaginella* se empacó en una camisa de papel filtro y se fraccionó en un sistema de extracción por Soxhlet utilizando disolventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol.



### 6.2.1 *Selaginella nothohybrida*.

#### 6.2.1.1 Análisis de las fracciones de hexano y de $\text{CHCl}_3$ .

El producto de fraccionamiento en ambos casos fue analizado por cromatografía en capa fina mostrando en su mayoría manchas visibles a la longitud de onda de 365 nm de color rojizo que denotaron la presencia principalmente de clorofilas en las fracciones por lo que no se analizó espectroscópicamente.

#### 6.2.1.2 Análisis de la fracción de acetona.

De acuerdo a los análisis de los espectros de RMN de la fracción de acetona se observó que ésta contiene tres biflavonoides en relación 1:0.3:0.2 correlacionando las integraciones de los hidrógenos unidos por puentes de hidrógeno a los grupos carbonilo (13.00 y 13.18, 13.31 y 12.94, 13.43 y 13.03 ppm).

Las señales de estos compuestos se compararon con la de biflavonoides reportados en la literatura (González, 2015; Lara, 2014) De acuerdo a las señales que se encuentran en la zona de hidrógenos aromáticos, el compuesto mayoritario es amentoflavona por las siguientes observaciones en su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Fig. 22**, ver Anexo):

- Sistema ABX de un benceno 1, 3, 4 trisustituído en  $\delta_{\text{H}}$  8.10 (d,  $J=2.0$  Hz, H-2''), 8.03 (dd,  $J=8.7$  Hz, H-6') y 7.25 (d,  $J=8.7$  Hz, H-5').
- Sistema  $\text{A}_2\text{X}_2$  de 4 hidrógenos aromáticos en  $\delta_{\text{H}}$  7.65 (d,  $J=8.8$  Hz, H-2''' y H-6''') y  $\delta_{\text{H}}$  6.80 (d,  $J=8.8$  Hz, H-3''' y H-5''').
- Dos dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  6.24 y 6.50 ( $J=2.0$  Hz, H-6 y H-8).
- En 6.73, 6.66 y 6.45 tres singuletes (H-3, H-3'', H-6'')

El compuesto de intensidad del 30 % con respecto al mayoritario de los 3 biflavonoides obtenidos en esta fracción se identificó como robustaflavona por la observación de algunas de las siguientes señales:



- Sistema de señales ABX del anillo B, con desplazamientos entre  $\delta_H$  7.93 y 8.00, H-5', H-6' y H2'.
- Sistema  $A_2X_2$  perteneciente a las señales del anillo E con desplazamientos en  $\delta_H$  7.13 (d,  $J=8.0$  Hz, H-2''' y H-6'''),  $\delta_H$  7.05 (d,  $J=8.0$  Hz, H-3''' y H-5''').
- En 6.70 se centran dos señales para los hidrógenos en 3 y 3''
- En 6.50 y 6.20 se aprecian dos señales dobles de los hidrógenos H-6 y H-8 del anillo A.

El compuesto minoritario no se pudo identificar ya que sus señales se encuentran en muy baja intensidad y en algunos casos sobrepuestas con las de los otros dos biflavonoides sin embargo las señales a campo bajo entre  $\delta_H$  13.00 y 13.40 dan evidencia de que se trata de otro biflavonoide.

#### 6.2.1.3 Análisis de la fracción de metanol.

El análisis de los espectros de RMN de la fracción de metanol mostró señales características de azúcares así como las señales diagnósticas de la trehalosa siendo ésta el azúcar el mayoritario (**Tabla 3, Figs. 13 y 23**)

#### 6.2.2 *Selaginella pallescens*.

##### 6.2.2.1 Análisis de la fracción de hexano y de $CHCl_3$ .

El producto de fraccionamiento fue analizado por cromatografía en capa fina mostrando en su mayoría manchas visibles a la longitud de onda de 365 nm de color rojizo que denotaron la presencia principalmente de clorofilas en las fracciones por lo que no se analizó espectroscópicamente.





#### 6.2.2.2 Análisis de la fracción de acetona.

En esta fracción fue evidente la presencia del biflavonoide amentoflavona por las señales características mencionadas en el apartado 6.2.1.2 y su composición es similar a la de la misma fracción proveniente de *S. nothohybrida* (**Figs. 22 y 24**)

#### 6.2.2.3 Análisis de la fracción de metanol.

De esta fracción precipitó un compuesto que resultó ser un azúcar de acuerdo a las señales en el espectro de RMN; la parte soluble restante fue sometida en una CCA de Sephadex y un precipitado obtenido de la fracción F43 correspondió como en el extracto de acetona al biflavonoide amentoflavona (**Figs. 22 y 25**) con señales similares a las que se mencionan en el apartado 6.2.1.2.

### 6.2.3 *Selaginella lepidophylla*.

#### 6.2.3.1 Análisis de la fracción de hexano y de CHCl<sub>3</sub>.

El producto de fraccionamiento en ambos casos fue analizado por cromatografía en capa fina mostrando en su mayoría clorofilas y glicéridos y ausencia de biflavonoides (**Fig. 26**).

#### 6.2.3.2 Análisis de la fracción de acetona.

Esta fracción estuvo conformada principalmente por el biflavonoide amentoflavona mostrando señales similares a las presentes en el apartado 6.2.1.2. (**Figs. 22 y 27**).



#### 6.2.3.3 Análisis de la fracción de metanol.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de esta fracción mostró azúcares como contenidos mayoritarios y ausencia de biflavonoides.

#### 6.2.4 *Selaginella wrightii*.

##### 6.2.4.1 Análisis de la fracción de hexano y de CHCl<sub>3</sub>.

El producto de fraccionamiento en ambos casos fue analizado por cromatografía en capa fina mostrando en su mayoría clorofilas y glicéridos y ausencia de biflavonoides (**Fig. 28**).

##### 6.2.4.2 Análisis de la fracción de acetona.

Esta fracción estuvo conformada por el biflavonoide amentoflavona principalmente mostrando señales similares a las presentes en el apartado 6.2.1.2. (**Figs. 22 y 29**).

##### 6.2.2.4 Análisis de la fracción de metanol.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H esta fracción mostró una mezcla de azúcares como contenidos mayoritarios y ausencia de biflavonoides.



## 7. CONCLUSIONES.

El método de extracción por decocción y posterior fraccionamiento por reparto líquido-líquido de las cuatro especies estudiadas de *Selaginella* no fue conveniente para la obtención de una fracción constituida por biflavonoides principalmente.

De acuerdo al análisis por RMN de los productos de fraccionamiento por Soxhlet a partir del extracto total  $\text{CHCl}_3$ :MeOH de las cuatro especies de *Selaginella* estudiadas, se concluye que este método es muy conveniente para la obtención de fracciones susceptibles de emplearse para un análisis de control de calidad y quimiométrico de la planta.

El fraccionamiento por Soxhlet de las cuatro especies estudiadas dio evidencia del mismo contenido metabólico que está descrito en la literatura permaneciendo los biflavonoides amento y robustaflavona como componentes mayoritarios.

En este trabajo, se identificó por el método de decocción a la trehalosa como componente mayoritario de las fracciones polares en las cuatro especies estudiadas, mientras que el método de fraccionamiento por Soxhlet permitirá identificar espectroscópicamente biflavonoides de manera directa.



## 8. PERSPECTIVAS.

Analizar las fracciones de acetona provenientes de la extracción por Soxhlet de las cuatro especies de *Selaginella* estudiadas en este trabajo para el aislamiento de biflavonoides adicionales contenidos en ellas.

Abordar un estudio quimiométrico con diferentes colectas de la misma especie de *Selaginella*, empleando como estándares de referencia a los biflavonoides mayoritarios identificados en las cuatro especies estudiadas.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- » Adams, R. P., Kendall, E., Kartha, K. (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 18, 107-110.
- » Aguilar, M. I., Romero, M., Chávez, M. King-Díaz, B., Lotina-Hennsen, B. (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6994-7000.
- » Aguilar, M. I. (2015). Flavonoides. Biogénesis, aislamiento, determinación estructural y bioactividad de flavonoides y biflavonoides En: *Temas Selectos de Productos Naturales*. Ciudad de México: UNAM, Instituto de Química.
- » Aguilar, M. I., Benítez, W. V., Colín, A., Bye, R. (2015). Evaluation of the diuretic activity in two Mexican medicinal species: *Selaginella nothohybrida* and *Selaginella lepidophylla* and its effects with ciclooxigenases inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 167-172.
- » Andrade, A. W., Machado, K., Machado, K., Figueredo, D. (2018). In vitro antioxidant properties of the biflavonoid agathisfavone. *Chemistry Central Journal* 12, 75-84.
- » Argueta, A., Cano, L. M., Rodarte, E. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista.
- » Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., Cobianchi, R. C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 1479-1482.
- » Bi, Y., Zheng, X., Feng, W., Shi, S. (2004). Isolation and structural identification of chemical constituents from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Yao Xue Xue Bao* 39, 41-45.
- » Cao, Y., Chen, J., Tan, N., Wu, Y., Yang, J., Wang, Q. (2010 c). Structure determination of selaginellins G and H from *Selaginella pulvinata* by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* 48, 656-659.



- » Cao, Y., Chen, J., Tan, N., Oberer, L., Wagner, T., Wu, Y., Zeng, G., Yan, H., Wang, Q. (2010 b). Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 40, 2456-22460.
- » Cao, Y., Tan, N. H., Chen, J. J., Zeng, G. H., Ma, Y. B., Wu, Y. P. (2010 a). Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii*. *Fitoterapia* 81, 253-258.
- » Chao, L., Seguin, E., Tillequin, F., Kock, M. (1987). New alkaloid glycosides from *Selaginella doederleinii*. *Journal Natural Products* 50, 422-426.
- » Chen, P., Sun, J., Xie, N., Shi, Y. (1995). Chemical constituents of day cai (*Selaginella doederleinii*). *Zhong Cao Tao* 26, 397-399.
- » Dai, Z., Ma, S., Wang, G., Wang, F., Lin, R. (2006). A New glucoside from *Selaginella sinensis*. *Journal of Asian Natural Products Research* 8, 529-533.
- » Dai, Z., Wang, G., Hou, Q., Ni, L., Wi, F., Lin, R. (2001). Chemical constituents of *Selaginella sinensis*. *Zhong Cao Yao* 32, 784-785.
- » Delgado, G. (2015). Aspectos Generales Introdutorios a la Química de Productos Naturales En: Temas Selectos de Química de Productos Naturales. Ciudad de México: UNAM, Instituto de Química.
- » Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- » Evans, R., Raffauf, R. F. (1990). *The healing forest: Medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia*. Oregon: Dioscorides Press.
- » Feng, W., Chen, H., Zheng, X. (2008). Chemical constituents of *Selaginella sinensis*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 39, 654-656.
- » Ferreira, D., Slade, D., Marais, J. P., Andersen, O. M., Markham, K. R. (2006). Bi, tri, tetra, penta and hexaflavonoids. En: *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, Florida: CRC Taylor & Francis.
- » Gao, L., Yin, S., Li, Z., Sha, Y., Pei, Y., Shi, G. Jing, Y. (2007). Three novel sterols isolated from *Selaginella tamariscina* with antiproliferative activity in leukemia cells. *Planta Medica* 73, 1112-1115.



- » González, A. (2015). Identificación botánica y búsqueda del biflavonoide robustaflavona en dos diferentes colectas de *Selaginella lepidophylla* (Doradilla). Tesis para obtener el título de QFB. México: UNAM.
- » Guedes, J. A., Guilherme, P., Alves, L. (2013). Phytochemistry of the genus *Selaginella*. Journal of Medicinal Plants Research, 1858-1868.
- » Harborne, J. B., (1994). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Great Britain: Chapman & Hall.
- » Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. (1975). The Flavonoids (2 parts). New York: Academic Press.
- » Iwu, M., Igboko, O. (1982). Flavonoids of *Garcinia kola* Seeds. Journal of Natural Products 45, 650-651.
- » Jung, H., Shung, W., Yeo, S., Kim, H., Lee, I., Woo, E., Lee, D. (2006). Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. Archives of Pharmacal Research 31, 265-273.
- » Kassem, M. E., El-Desoky, S. K., Sharaf, M. (2004). Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. Chemistry of Natural Compounds, 477- 450.
- » Korall, P., Kenrick, P. (2002). Phylogenetic relationships in *Selaginellaceae* based on rbcL sequences. American Journal of Botany 89, 506–517.
- » Korall, P., Kenrick, P., Therrien, J. P. (1999). Phylogeny of *Selaginellaceae*: evaluation of generic/subgeneric relationships based on rbcL gene sequences. International Journal of Plant Science 160, 585-594.
- » Kunert, O., Swamy, R., Kaiser, M., Presser, A. (2008). Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. Phytochemistry Letters 1, 171-174.
- » Lara, N. (2014). Estudio fitoquímico y analítico comparativo por UPLC/MS de cuatro especies medicinales del género *Selaginella*. Tesis para obtener el grado de M.C. México: Posgrado UNAM.
- » Lee C., Choi H., Kim D., Chang I., Moon H., Lee S., Oh W., Woo E. (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of



- matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 16, 732-738.
- » Lin, L. C., Kuo, Y. C., Chou, C. J. (2009). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products*, 627-630.
  - » Lin, L. R., Seguin, E., Tillequin, F., Koch, M. (1987). New glycosides from *Selaginella doederleinii*. *Journal of Natural Products* 60, 422-427.
  - » Lin, L. R., Skaltsounis, A. L., Seguin, E., Tillequin, F., Koch, M. (1994). Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Medica* 60, 168-170.
  - » Lin, L., Chou, C. (2000). Three new biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *The Chinese Pharmaceutical Journal* 52, 211-218.
  - » Liu, J., Xu, K., Li, F., Shen, J., Hu, C., Zou, H., Yang, F. (2010). A new flavonoid from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58, 549-551.
  - » Lopez-Saez, J., Pérez-Alonso, M., Velasco-Negueruela, A. (1994). Biflavonoids of *Selaginella denticulata* growing in Spain. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 267-270.
  - » Lopez-Saez, J., Pérez-Alonso, M., Velasco-Negueruela, A. (1995). Flavonoids of *Selaginella denticulata* and *Selaginoides*. *Fitoterapia* 66, 188-189.
  - » Ma, S., But, P., Ooi, V., He, Y., Lee, S., Lee, S. F., Lin, R. (2001). Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 24, 311-312.
  - » Mann, J. (1987). *Secondary Metabolism*. USA: Oxford University Press.
  - » Marchand, L. L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids -- a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 296-301.
  - » Márquez, C., Lara, F., Esquivel, B., Mata, R. (1999). *Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
  - » Martínez, M. (1989). *Plantas Medicinales de México*. Ciudad de México, D.F.: Ediciones Botas, México.
  - » Martínez, O. G. (1997). *Selaginellaceae Willk. Aportes Botánicos de Salta - Ser. Flora*.





- » Nestel, P. (2003). Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Curr Opin Lipidol*, 3-8.
- » Ogundaini, A., Farah, M., Perera, P., Samuelsson G., and Bohlin, L. (1996). Isolation of two new antiinflammatory biflavanoids from *Sarcophyte piriei*. *Journal of Natural Products*, 587-590.
- » Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 1035-1040.
- » Qasim, M. A., Roy, S. K., Kamil, M., Ilyas, M. (1985). Phenolic constituents of *Selaginellaceae*. *Indian Journal of Chemistry* 24B, 220.
- » Ramírez, M. E., Mendoza, J. A., Arreola, R. H. (2010). Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 6-21.
- » Rost, T. L., Barbour, M. G., Thornton, R. M. (1985). *Botánica: Introducción a la biología vegetal*. México, DF: Limusa.
- » Setyawan, A., Darusman, L. (2008). Recent status of *Selaginella* (*Selaginellaceae*) research in Nusantara. *Biodiversitas* 9, 64-81.
- » Silva, G., Chai, H., Gupta, M., Farnsworth, N., Cordell, G, Pezzuto, J. (1995). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. *Phytochemistry*, 129-134.
- » Singleton, V. L. (1987). *Advances in Food Research*. Nueva York: Academic Press.
- » Sun, C. M., Syu, W. Jr., Huang, Y. T., Chen, C. C., Ou, J. C. (1997). Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*. *Journal of Natural Products* 60, 382-384.
- » Swamy, R. C., Kunert, O., Schühly, W., Bucar, F., Ferreira, D., Rani, V. S. (2006). Structurally unique biflavonoids from *Selaginella chrysocaulos* and *Selaginella bryopteris*. *Chemistry and Biodiversity*, 405-413.
- » Tan, G., Chen, L., Xu, K., Zheng, Q., Huang, Z., Shu, J., Shu, J. H., Deng, T. (2004). Study on the Chemical Constituents of *Selaginella pulvinata* Maxim. *Chinese Journal of Organic Chemistry* 24, 1082-1085.
- » Valdespino, I. A. (1992). New species of *Selaginella* (*Selaginellaceae*) from the Guayana Highland of Venezuela. *New York Botanical Garden, Bronx, NY*, 199-207.



- » Wang, Y., Chen, H., Zheng X., Feng, W. (2007). A new sesquilignan from *Selaginella sinensis* (Desv) Spring. Chinese Chemical Letters 18, 1224-1226.
- » Wang, Y., Yang, F., Wang, X., Sun, Q., Wang, H., Shi, Y., Tang, G. (2009). Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Selaginella moellendorffii*. Journal of Natural Products 72, 1151–1154.
- » Widyastuti, S. M., Nonka, F., Watanabe, K., Sako, N., Tanaka, K. (1992). Isolation and characterization of two aucuparin-related phytoalexins from *Photinia glabra* Maxim. Japanese Journal of Phytopathology 58, 228-233.
- » Winkel, B. (2006). The Biosynthesis of Flavonoids. Chapter 3. En: The Science of Flavonoids. Springer.
- » Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology 126, 485-493.
- » Xu, J., Liu, X., Chen, K., (2009). A new biflavonoid from *Selaginella labordei* Hieron. Chinese Chemical Letters 20, 939-941.
- » Yang, J., Pokharel, Y., Kim, M., Woo, E., Choi, H., Kang, K. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. Journal of Chromatography B 879, 191-196.
- » Zhang, Y., Shi, S., Wang, Y., Huang, K. (2011). Target guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by offline coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments. Journal of Chromatography B. 879, 191-196.
- » Zheng, X., Du J., Xu, Y., Zhu, B., Liao, D. (2007). A new steroid from *Selaginella pulvinata*. Fitoterapia 78, 598-599.
- » Zheng, X., Wang, W., Zhang, L., Su, C., Wu, Y., Ke, Y. (2013). Antihyperlipidaemic and antioxidant effect of the total flavonoids in *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in diabetic mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 757-766.
- » Zhu, T., Chen, K., Zho, W. (2008). A new flavones glycoside from *Selaginella moellendorff* Hieron. Chinese Chemical Letters 19, 1456-1458.



## 10. ANEXO

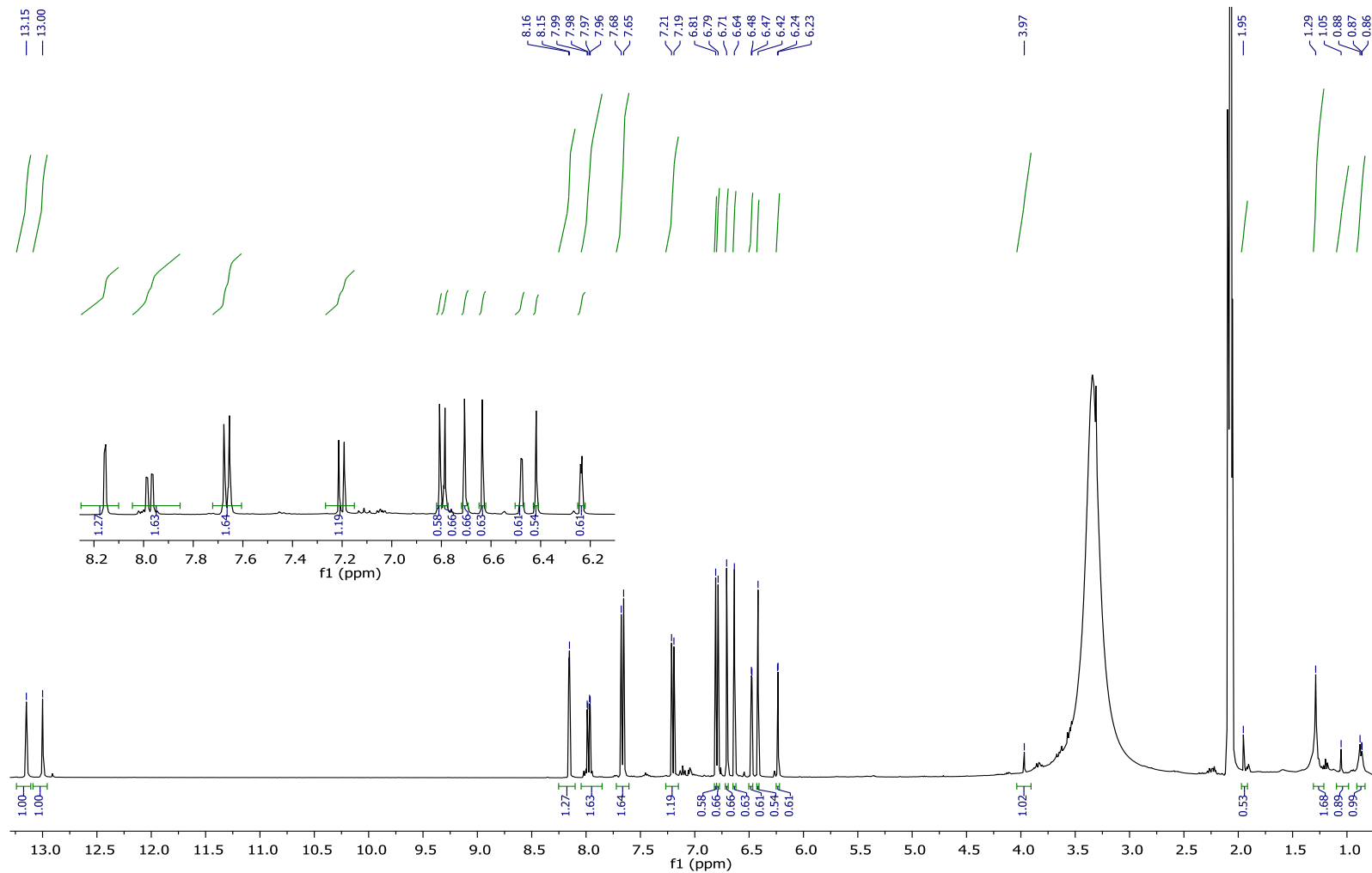


Figura 11. RMN-<sup>1</sup>H del biflavonoide amentoflavona, fracción "AGATIV23" (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)

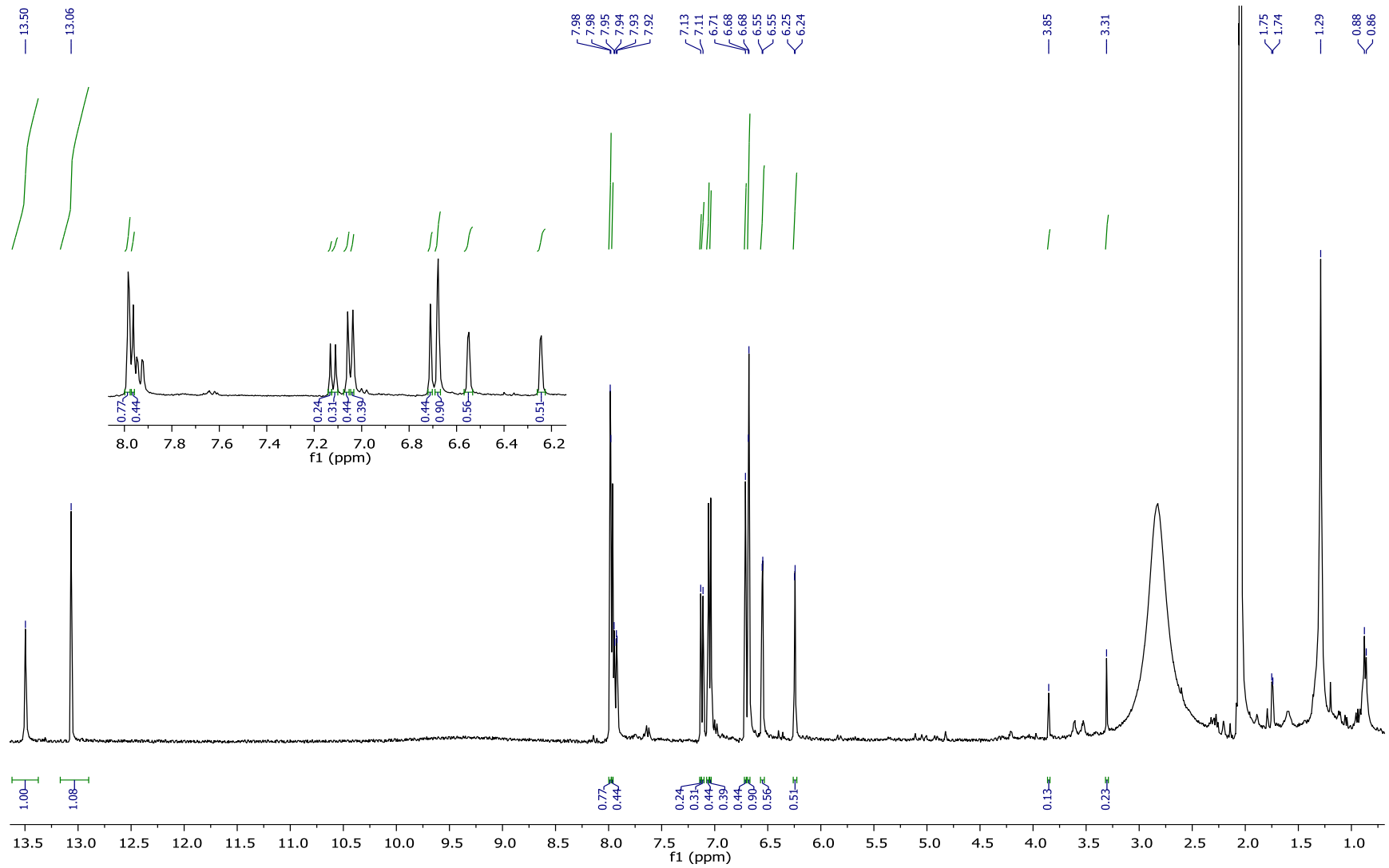


Figura 12. RMN-<sup>1</sup>H del biflavonoide robustaflavona, fracción "AGII10" (400 MHz, Acetona-*d*<sub>6</sub>)

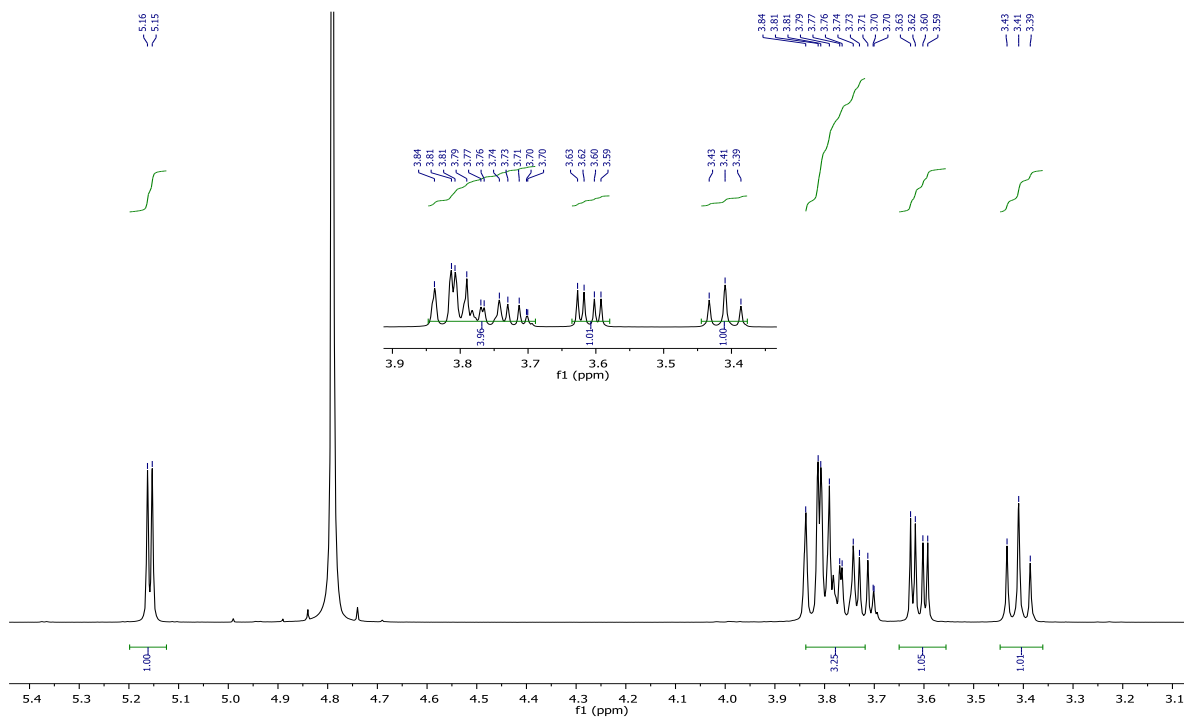


Figura 13. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del estándar trehalosa “Treha” (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

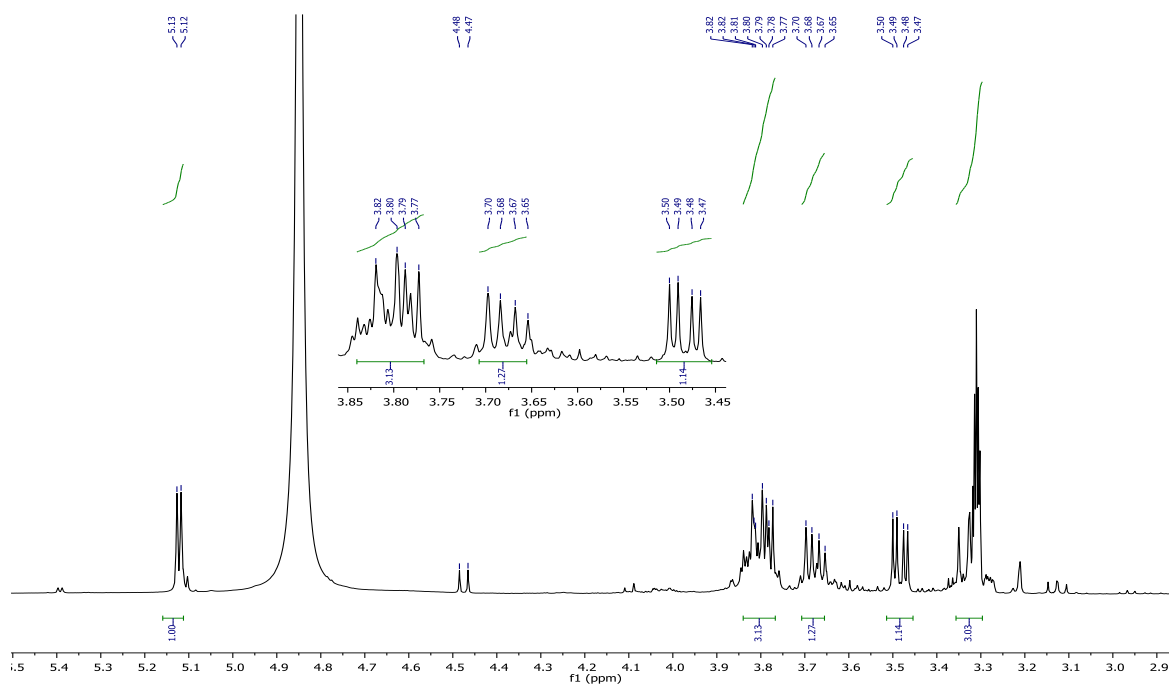


Figura 14. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción de metanol de *S. wrightii* “Swxanx10” (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

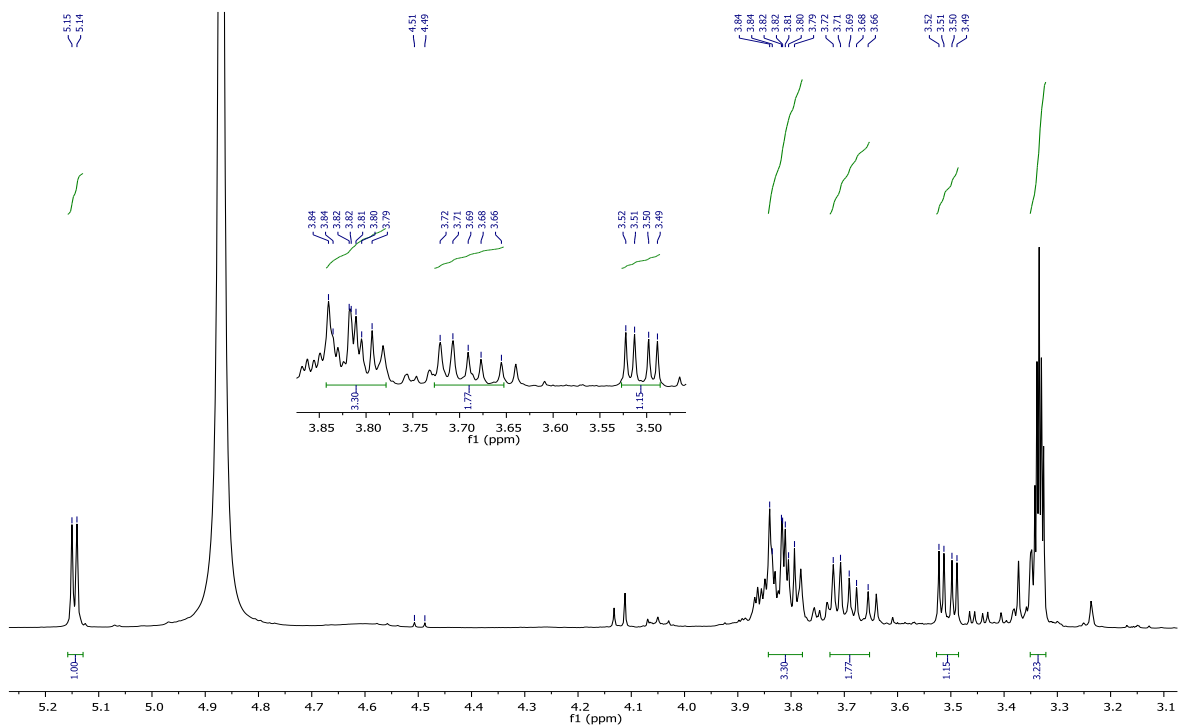


Figura 15. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la fracción de metanol de *S. nothohyrida* “Snxetx8” (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

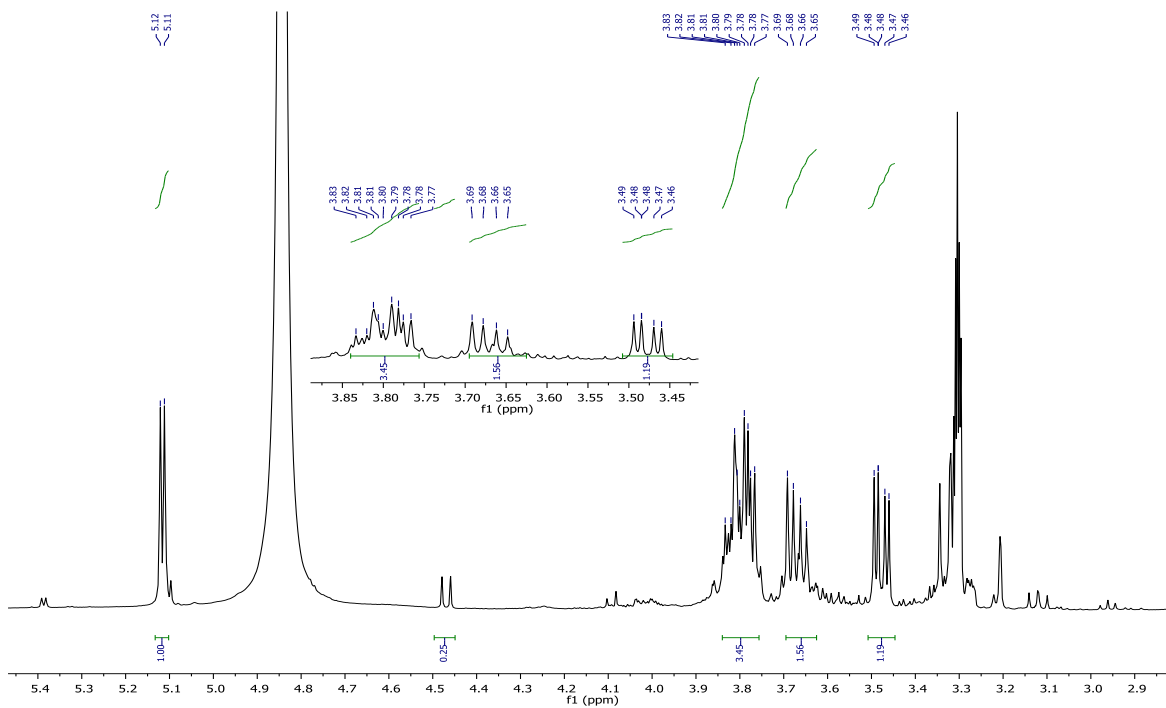


Figura 16. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la fracción de metanol de *S. pallescens* “Spxmex5” (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

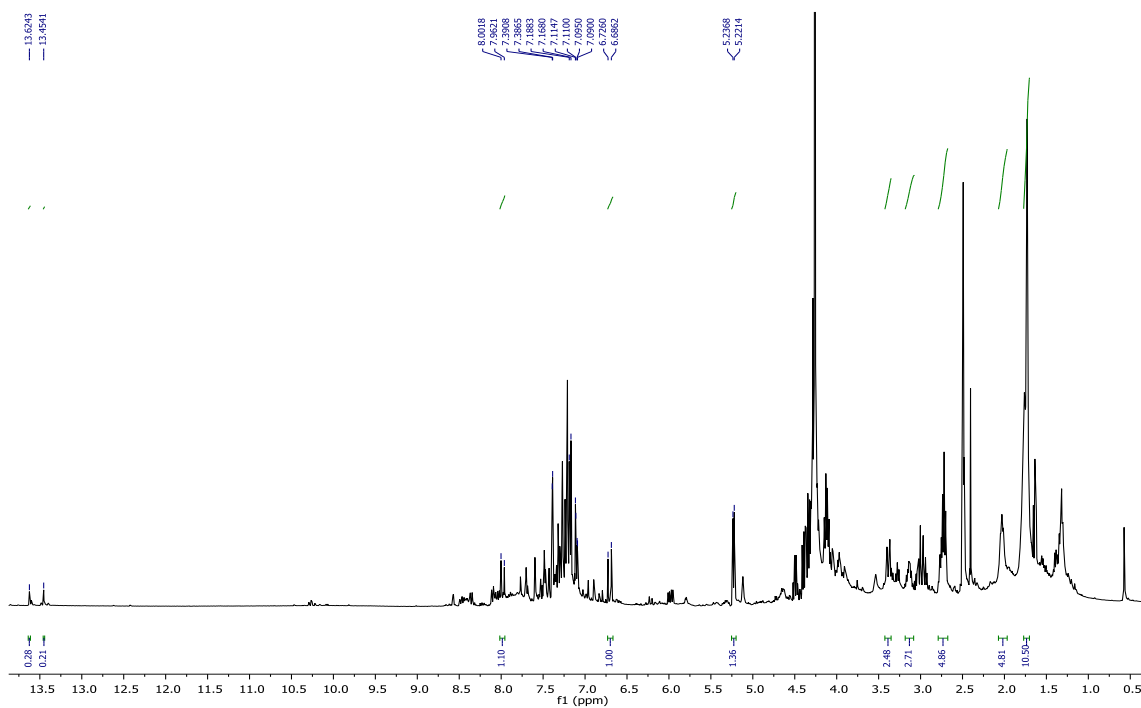


Figura 17. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "Spxorgx5" (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

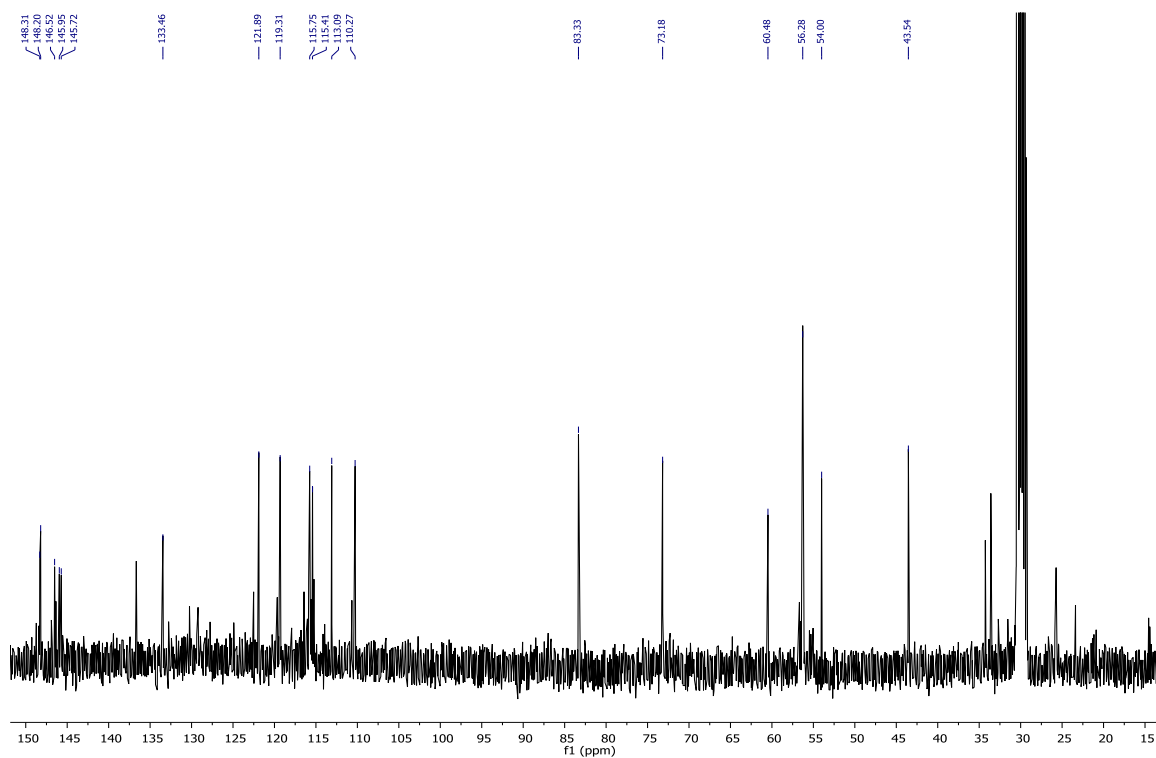


Figura 18. RMN- $^{13}\text{C}$  de la fracción "Spxorgx5" (400 MHz, MeOH- $d_4$ ).

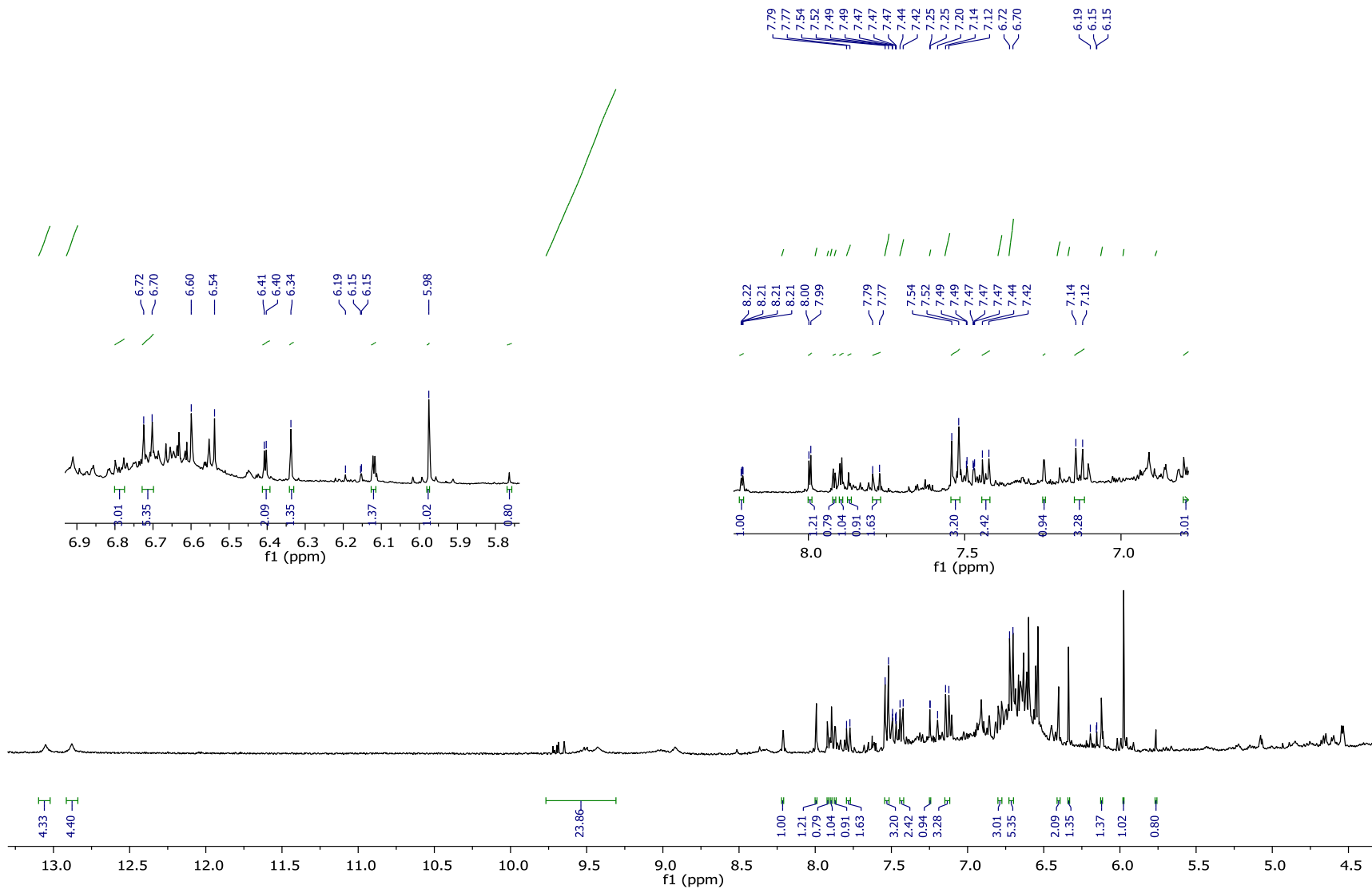


Figura 19. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "Snxorgx8" (400 MHz,  $\text{Acetona-}d_6$ )



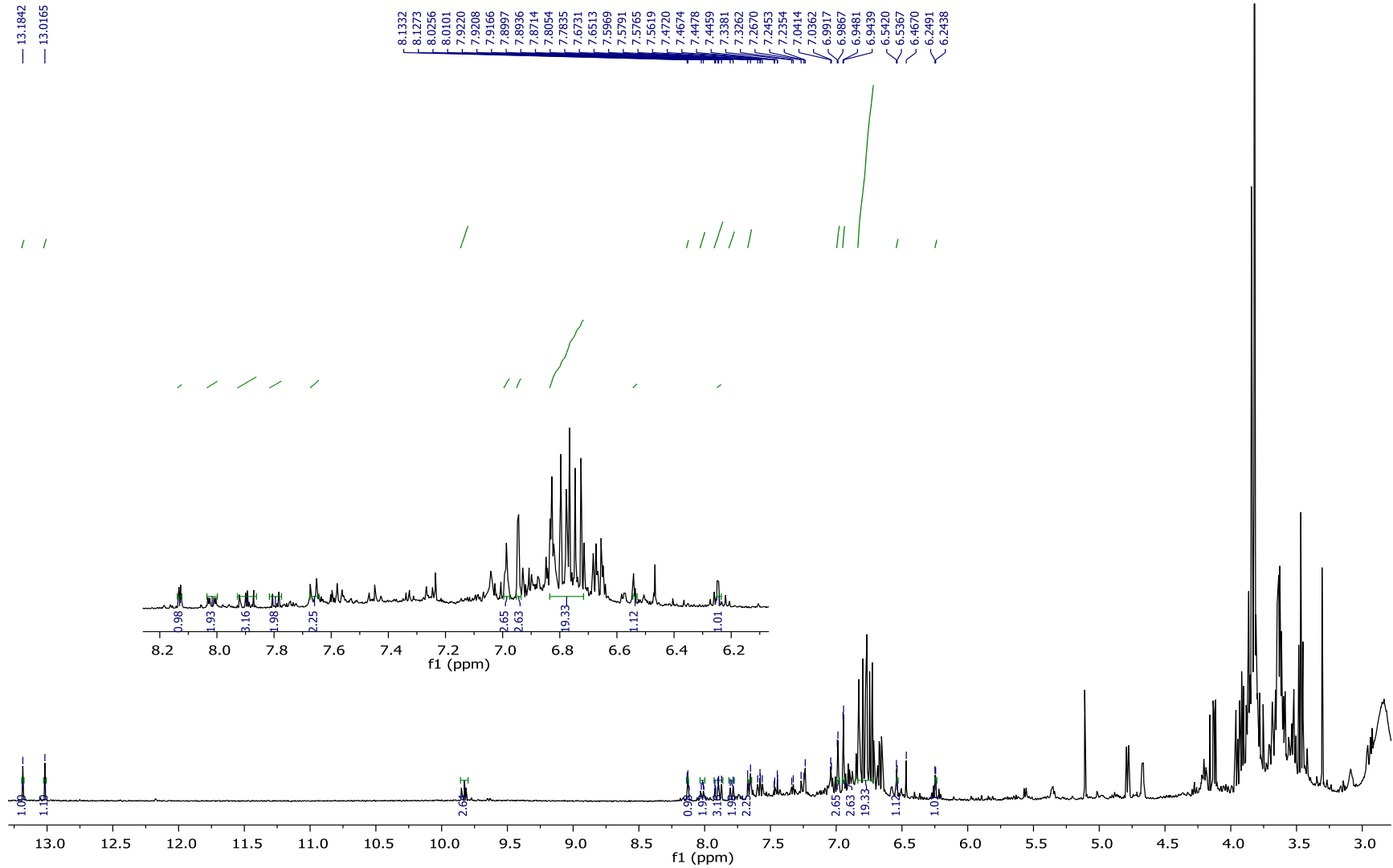


Figura 20. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "Slxorgx9" (400 MHz, Acetona- $d_6$ )



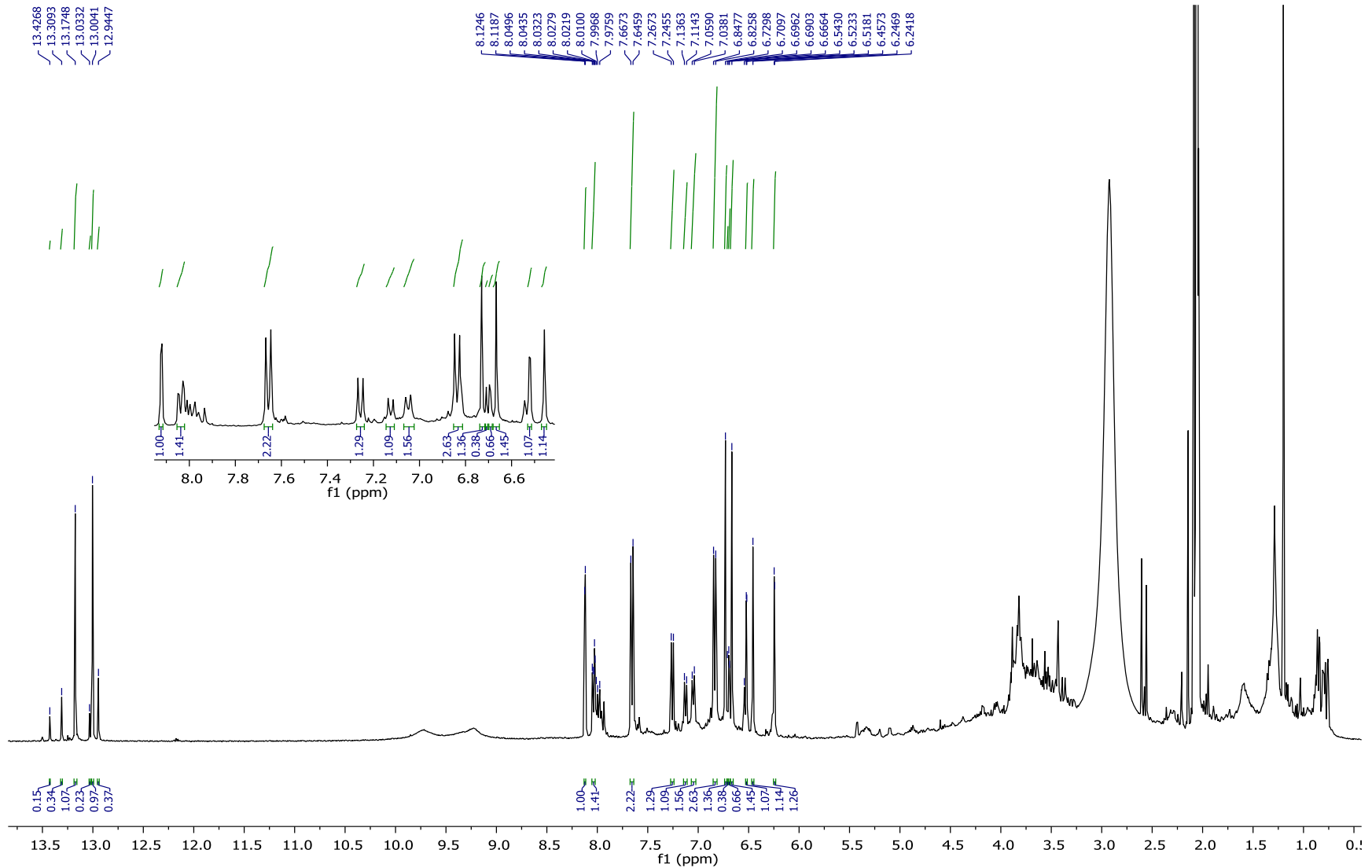


Figura 22. RMN-<sup>1</sup>H de la fracción "Snxaxc33" (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>)

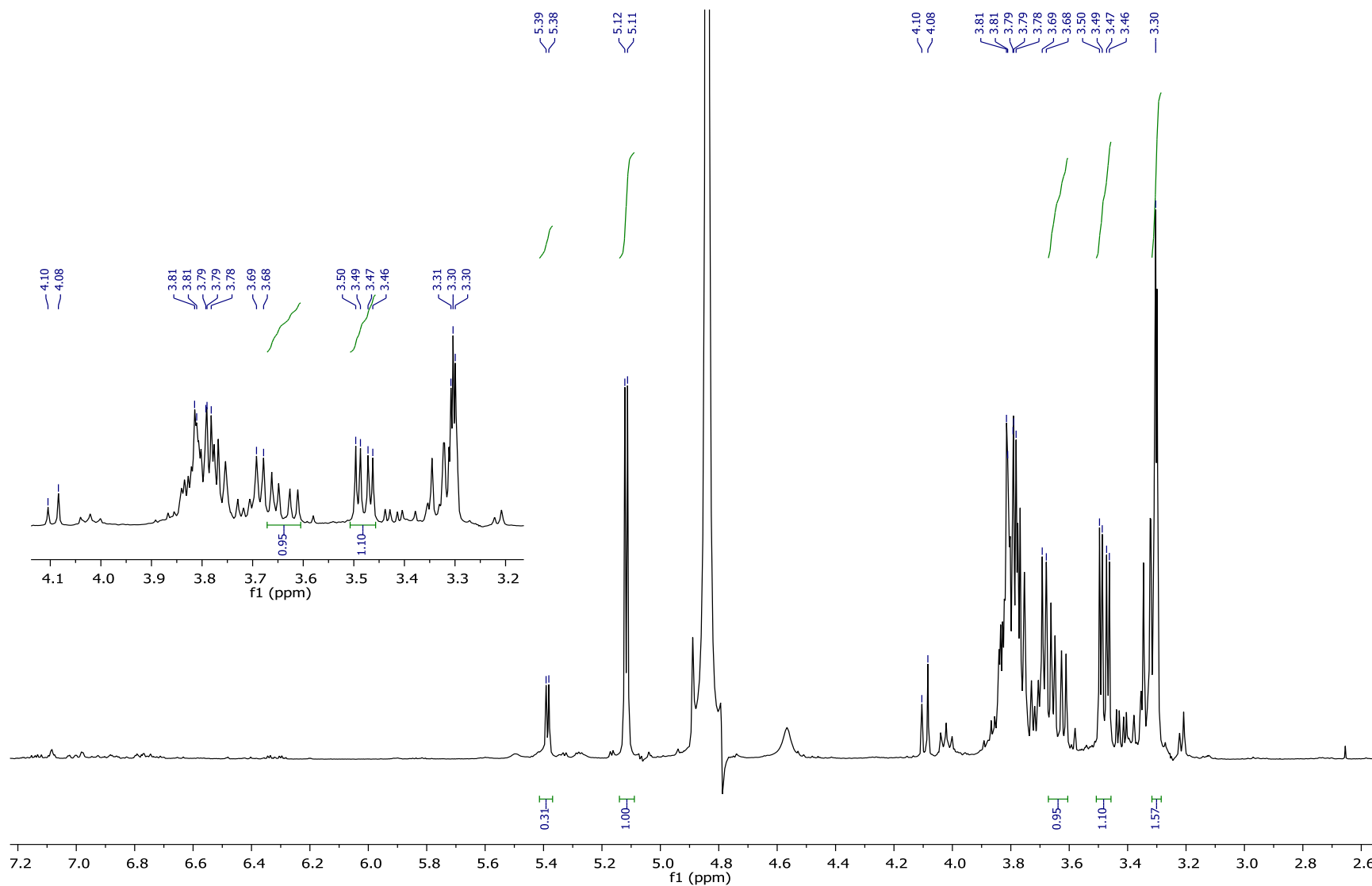


Figura 23. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "Snxmex33" (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

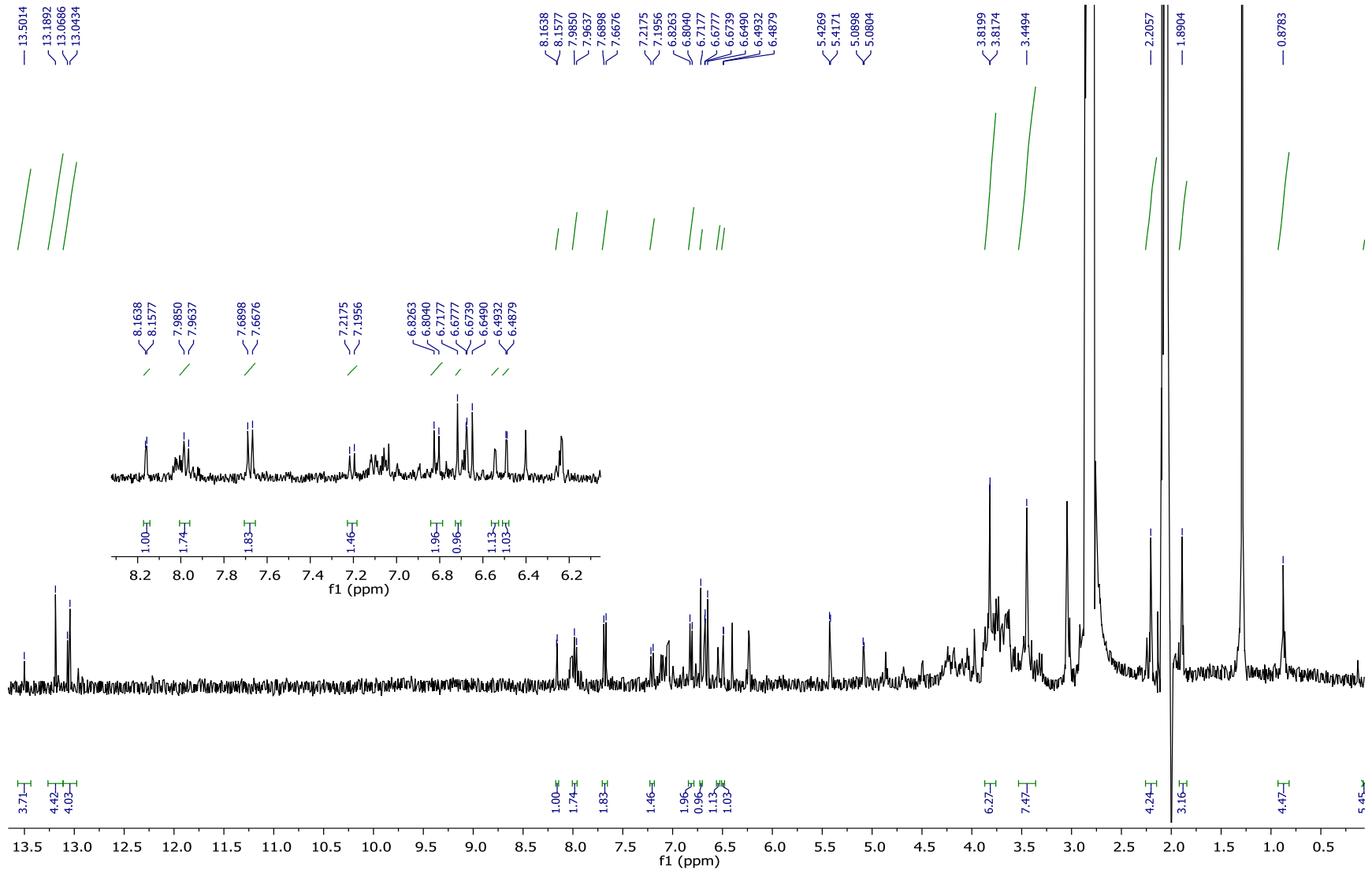


Figura 24. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "Spxacx38" (400 MHz, Acetona- $d_6$ )

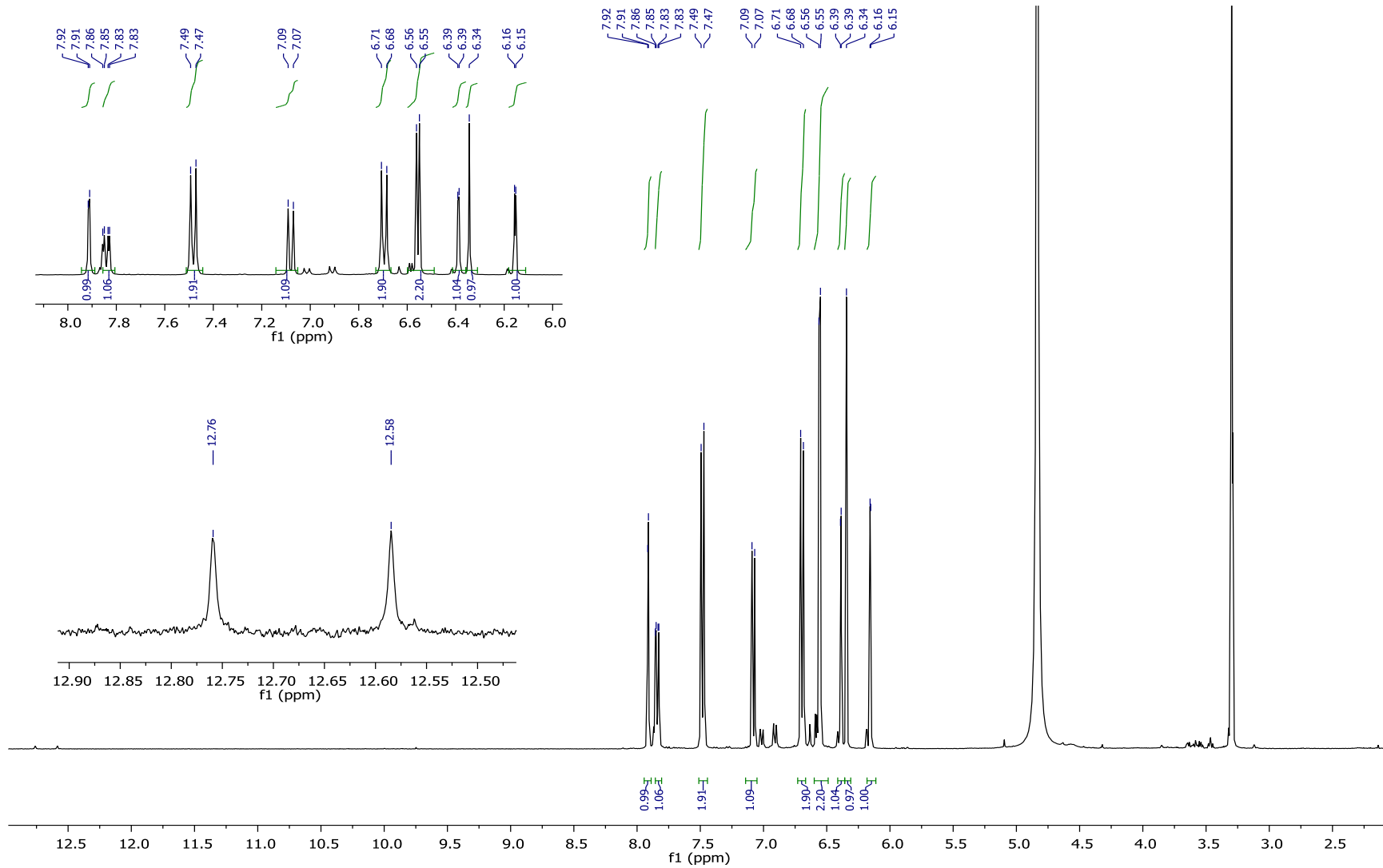


Figura 25. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "F43xMx54" (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

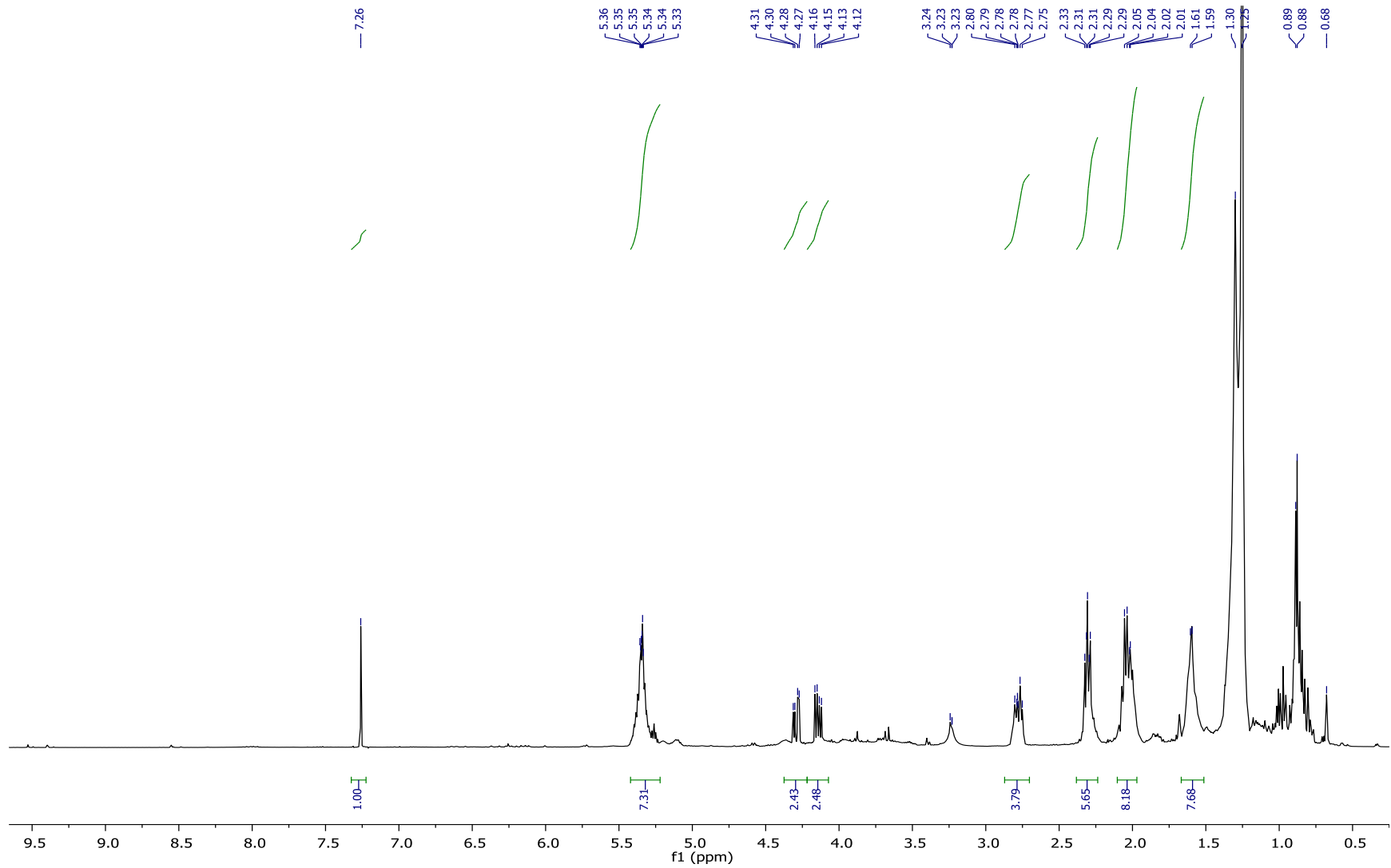


Figura 26. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "SI-h-9" (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

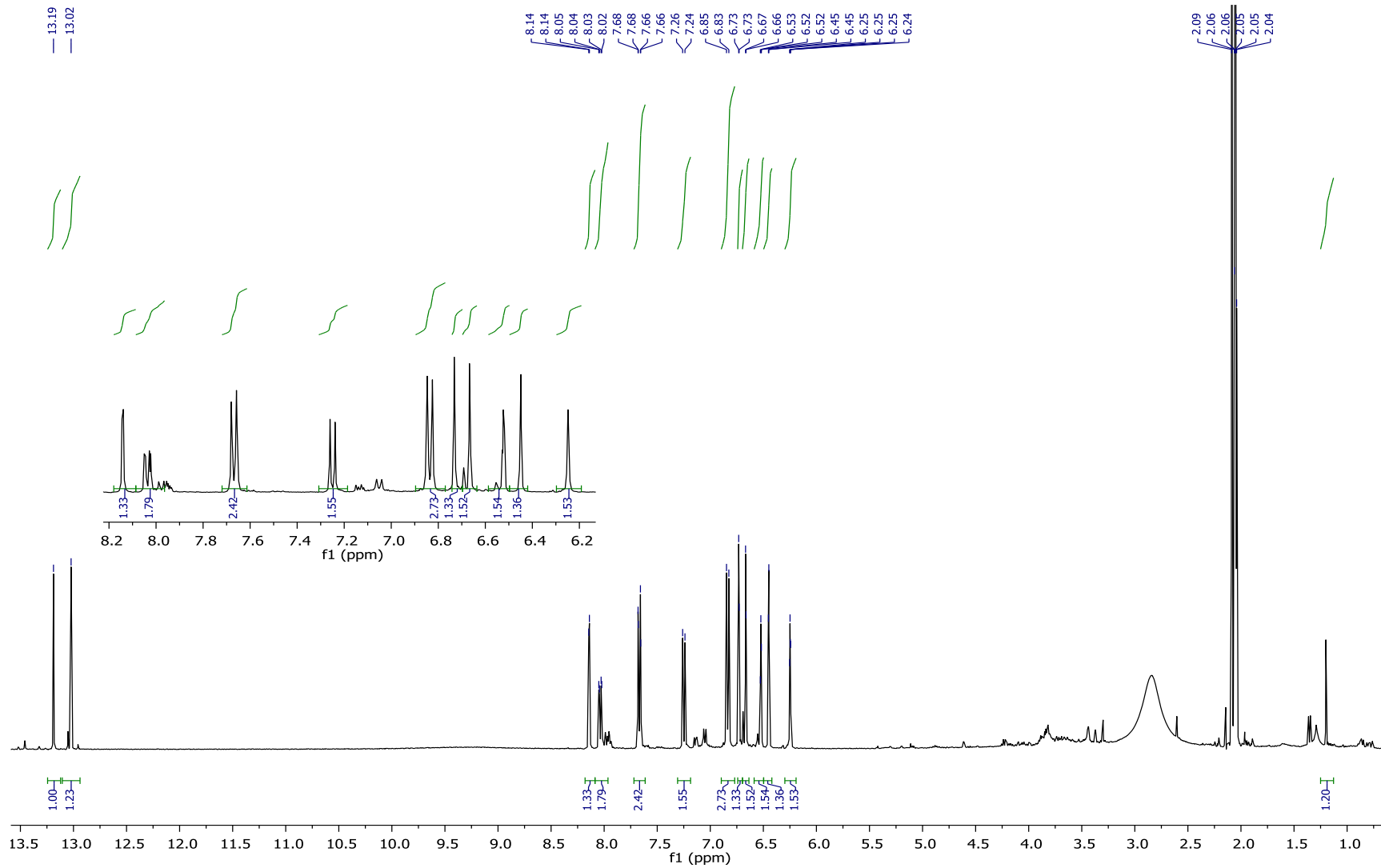


Figura 27. RMN- $^1\text{H}$  de la fracción "SI-k-10" (400 MHz, Acetona- $d_6$ )



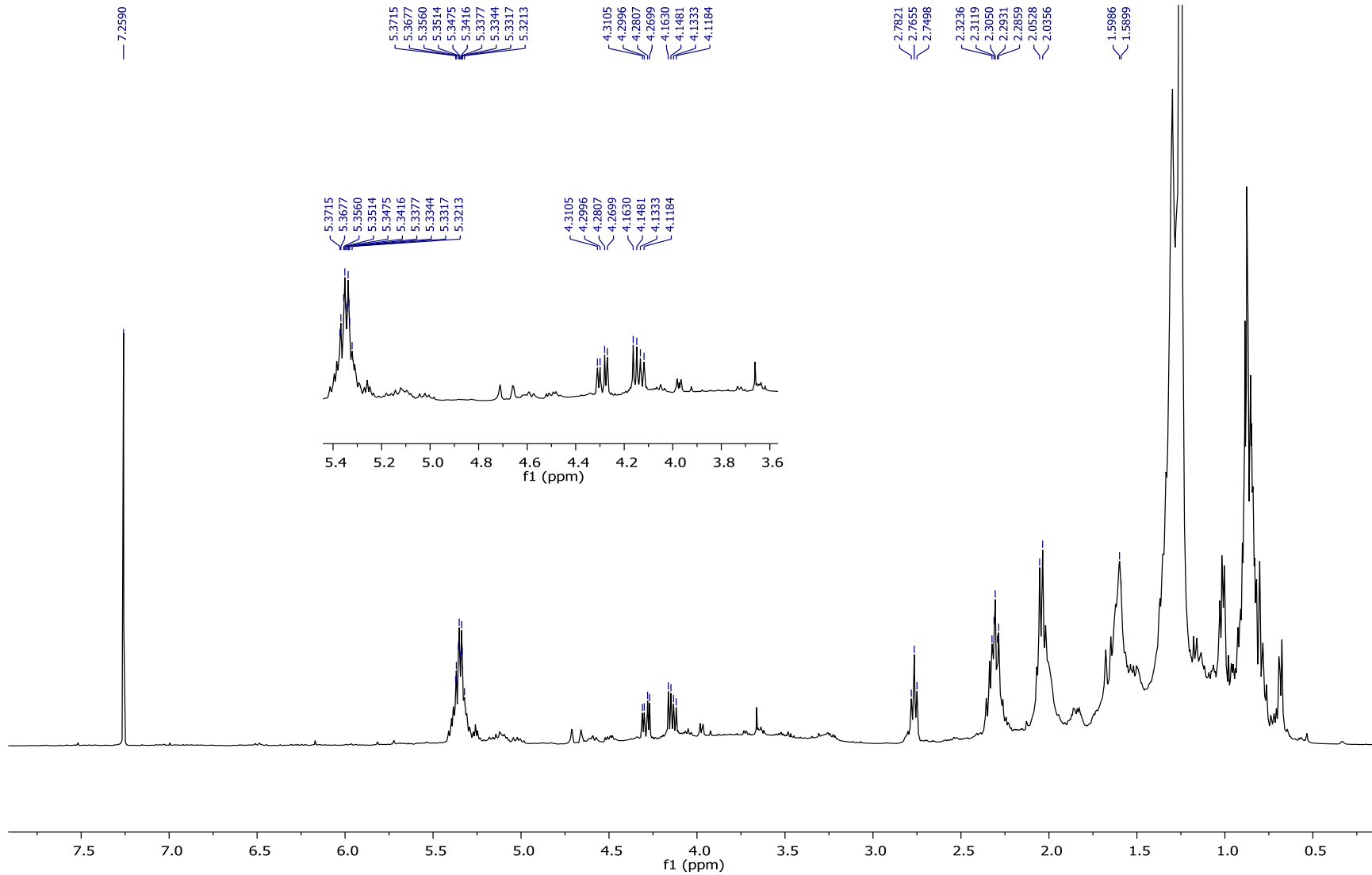


Figura 28. RMN-<sup>1</sup>H de la fracción “SWxHx27” (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

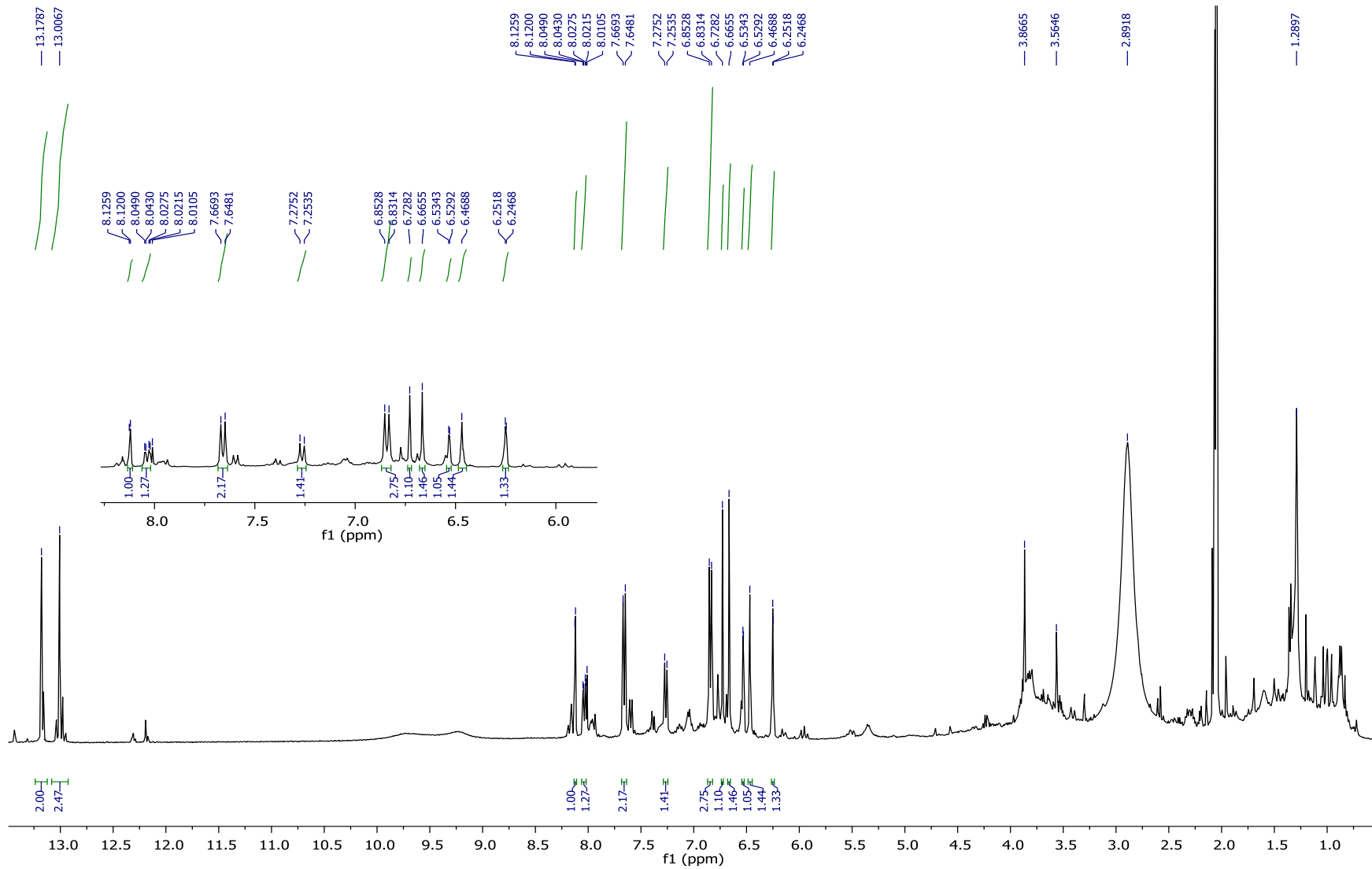


Figura 29. RMN-<sup>1</sup>H de la fracción "SwxAx27" (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>)