



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BIFLAVONOIDES DE *Selaginella stellata*  
Spring. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO TOTAL.

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. Cecilia Ruiz Alemán**

TUTORA

**Dra. María Isabel Aguilar Laurents**

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2020



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BIFLAVONOIDES DE *Selaginella stellata*  
Spring. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO TOTAL**

**T E S I S**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q. CECILIA RUIZ ALEMÁN**



**TUTORA: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2020.**

## **Jurado**

<b>Presidente</b>	Dra. Rachel Mata Essayag
<b>Vocal</b>	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
<b>Vocal</b>	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
<b>Vocal</b>	Dr. José Fausto Rivero Cruz
<b>Secretario</b>	Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

### **LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

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

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

---

### **SUSTENTANTE:**

Q. Cecilia Ruiz Alemán

---

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en los eventos siguientes:

- ❖ AMIPRONAT, 15ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrado en San Luis Potosí, S. L. P., México, del 22 al 25 de mayo de 2019 con el trabajo “BIFLAVONOIDES DE *Selaginella stellata* Spring: DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL”.
- ❖ Sociedad Química de México, 54º Congreso Mexicano de Química, celebrado en Puebla, Pue., México, del 30 de septiembre al 3 de octubre de 2019 con el trabajo “BIFLAVONOIDES DE *Selaginella stellata* Spring: DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL”.



## AGRADECIMIENTOS

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por admitirme, haberme permitido realizar mis estudios de Maestría y desarrollar mi trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (915088) por la beca otorgada que me permitió realizar mis estudios de maestría y realizar este trabajo.

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 5000-91-31, ambos a cargo de la Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por su amable asesoría en la realización del trabajo experimental y la redacción de este escrito y a los doctores Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez, Dr. José Fusto Rivero Cruz y el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por sus valiosas aportaciones.

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Unidad de Integración en Sistemática Vegetal y Suelo, FES Zaragoza, UNAM, por la colecta de los especímenes vegetales.

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

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

Al personal técnico de la Unidad de Servicios Analíticos e Instrumentales Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), particularmente se agradece a las M. en C. Rosa Isela del Villar, M. en C. Nayeli López Balbiaux y Q. Marisela Gutiérrez de la FQ, UNAM, por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopía y espectrometría.

A la M. en C Karol Carrillo Jaimes por la asesoría y apoyo en las pruebas de actividad antioxidante, contenido de fenoles y contenido de flavonoides.

A l M. en C. Antonio Nieto Camacho del Instituto de Química por la realización de las pruebas de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.



## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	12
Lista de esquemas.....	13
Lista de tablas.....	14
Lista de figuras.....	14
Lista de espectros.....	15
Lista de gráficas.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 Familia <i>Selaginellaceae</i> .....	18
2.2 Género <i>Selaginella</i> .....	18
2.3 Clasificación taxonómica de <i>Selaginella stellata</i> .....	19
2.4 <i>Selaginella stellata</i> Spring.....	20
2.5 Flavonoides y Biflavonoides.....	21
2.5.1 Propiedades físicas.....	24
2.5.2 Funciones en las plantas.....	25
*2.5.3 Propiedades biológicas.....	26
2.5.4 Biosíntesis de flavonoides.....	27
2.5.5 Biflavonoides.....	34
2.5.6 Biosíntesis de biflavonoides.....	37
2.3 Compuestos aislados de diversas especies del género <i>Selaginella</i> .....	39
2.4 Biflavonoides aislados en distintas plantas y sus actividades biológicas.....	46.



2.5 El proceso de oxidación, radicales libres, especies reactivas, estrés oxidativo, antioxidantes, una breve explicación.....	49
2.6 Regulación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, implicaciones en el tratamiento de trastornos neurológicos.....	52
3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES.....	56
4. JUSTIFICACIÓN.....	57
5. OBJETIVO GENERAL.....	58
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
7. HIPÓTESIS.....	58
8. METODOLOGÍA.....	60
8.1 Material vegetal.....	60
8.1.1 Tratamiento previo a la extracción.....	60
8.1.2 Extracción del material vegetal.....	60
8.1.3 Separación preliminar de biflavonoides.....	60
8.1.4 Fraccionamiento del extracto total.....	60
8.1.5 Aislamiento de Biflavonoides.....	61
8.2 Determinación de la actividad antioxidante del extracto total de <i>Selaginella stellata</i> por: Atrapamiento del radical DPPH, estimación del contenido de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu y estimación del contenido de flavonoides totales con el método de Kamasawa.....	63
8.2.1 Determinación de la actividad antioxidante por atrapamiento del radical DPPH.....	63
8.2.2 Estimación del contenido de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	64
8.2.3 Estimación del contenido de flavonoides totales con el método de Kamasawa.....	65
8.3 Determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos, fracciones y compuestos aislados.....	66
9. RESULTADOS.....	67





9.1 Espectro de Infrarrojo obtenido del precipitado formado durante la extracción.....	68
9.2 Elucidación de la estructura de los compuestos aislados.....	68
9.2.1 Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SSFB1C (Compuesto 1, 7-O-metil-2'',3''-dihidro-isocriptomerina).....	68
9.2.2 Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SS1G1C (Compuesto 2, Amentoflavona).....	69
9.2.3 Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SS2G2C (Compuesto 3, 2'',3''-dihidroamentoflavona).....	70
9.3 Resultados de pruebas de actividad antioxidante, contenido de fenoles y contenido de compuestos flavonoides en el extracto total de <i>Selaginella stellata</i> .....	72
9.3.1 Determinación de actividad antioxidante por atrapamiento del radical DPPH.....	72
9.3.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu en el extracto total.....	73
9.3.3 Determinación del contenido de flavonoides en el extracto total.....	75
9.4 Resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.....	76
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	79
10.1 Espectro de infrarrojo obtenido del precipitado formado durante la extracción.....	79
10.2 Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	80
10.2.1 Compuesto 1: 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina.....	80
10.2.2 Compuesto 2: Amentoflavona, compuesto 3: 2'',3''-dihidroamentoflavona.....	83



10.3 Resultados obtenidos en las pruebas de actividad antioxidante, contenido de fenoles y contenido de flavonoides del extracto total de <i>Selaginella stellata</i> .....	88
10.4 Inhibición de actividad de la enzima acetilcolinesterasa.....	89
11 CONCLUSIONES.....	91
12 BIBLIOGRAFÍA.....	92
13 ESPECTROS DE IR Y RMN.....	99



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub>	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
Δ	Desplazamiento químico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CPP	Cromatografía en Placa Preparativa
[(NH <sub>4</sub> )Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O]	Sulfato cérico amoniacal dihidratado
D	Doblete
H <sub>2</sub> O	Agua
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Nm	Nanómetro
MeOH	Metanol
μM	Micromolar
μL	Microlitrio
MHz	Mega Hertz
Ppm	Partes por millón
EtOH	Etanol
N	Frecuencia
G	Gramo
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
COSY	COrelated SpectroscopY
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
NOESY	NOE SpectroscopY



## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Estructuras de los diarilpropanoides.

Esquema 2: Estructuras de antocianinas flavonas, flavonoles, flavanonas dihidroflavonoles, 3,4-dihidroflavandioles, auronas, catequinas, epicatequinas, pterocarpanos, y rotenoides.

Esquema 3: Sitios frecuentes de hidroxilación y metoxilación.

Esquema 4: Biosíntesis del ácido siquímico.

Esquema 5: Biosíntesis del ácido corísmico a partir del ácido siquímico.

Esquema 6: Biosíntesis del ácido prefénico a partir del ácido corísmico.

Esquema 7: Biosíntesis de la L-fenilalanina y la L-tirosina a partir del ácido prefénico.

Esquema 8: Biosíntesis del ácido cinámico y del ácido 4-cumárico a partir de la L-fenilalanina y la L-tirosina.

Esquema 9: Biosíntesis de flavonoides a partir del 4-cuamroil-CoA.

Esquema 10: Biflavonoides de tipo I, unidos por un enlace C-C.

Esquema 11: Biflavonoides de tipo II, unidos por un enlace C-O.

Esquema 12: Biosíntesis de biflavonoides.

Esquema 13: Correlaciones vistas en el espectro COSY (Compuesto 1).

Esquema 14: Correlaciones observadas en el espectro HMBC (Compuesto 1).

Esquema 15: Correlaciones observadas en el espectro NOESY Compuesto 1).

Esquema 16: Estructura de 7-O-metil-2'',3''-dihidroisocriptomerina (Compuesto 1).

Esquema 17: Correlaciones observadas en el experimento COSY de los compuestos 2 y 3.

Esquema 18: Correlaciones observadas en el experimento HMBC de los compuestos 2 y 3.

Esquema 19: Correlaciones observadas en el experimento NOESY de los compuestos 2 y 3.

Esquema 20: Estructura de la amentoflavona (Compuesto 2).



Esquema 21: Estructura de la 2'',3''-dihidroamentoflavona (Compuesto 3).

### LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la especie *Selaginella stellata* Spring.

Tabla 2: Diversos compuestos aislados a partir de distintas Selaginellas.

Tabla 3: Biflavonoides provenientes de otras especies vegetales y sus actividades biológicas.

Tabla 4: Absorbancias de las disoluciones de Trolox® con DPPH para obtener una curva de calibración concentración vs absorbancia.

Tabla 5: Absorbancias promedio vs concentraciones de Trolox® de cada disolución.

Tabla 6: Concentración de Trolox® vs porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Tabla 7: Absorbancias a distintas concentraciones de las disoluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Tabla 8: Absorbancias promedio de las diluciones en el espectrofotómetro vs concentración de ácido gálico.

Tabla 9: Absorbancias de las diluciones de ácido gálico vs concentraciones.

Tabla 10: Datos de absorbancia de las diluciones de quercetina con AlCl<sub>3</sub> y sus respectivas concentraciones.

Tabla 11: Absorbancias promedio de las diluciones vs concentraciones de las diluciones (ppm).

Tabla 12: Concentraciones de las diluciones de quercetina vs absorbancias resultantes de las diluciones.

Tabla 13: Resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa.

Tabla 14: Porcentajes de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, absorbancias y concentración de las muestras.

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Selaginella stellata* Spring.



Figura 2: Estructuras de los compuestos aislados: 7-O-metiléter 2'',3''-dihidroisocriptomerina, amentoflavona, 2'',3''-dihidroamentoflavona.

### LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de IR del precipitado formado durante la extracción.

Espectro 2: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 3: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 4: Espectro COSY del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 5: Espectro HSQC del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 6: Espectro HMBC del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 7: Espectro NOESY del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

Espectro 8: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la amentoflavona (2).

Espectro 9: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la amentoflavona (2).

Espectro 10: Espectro COSY de la amentoflavona (2).

Espectro 11: Espectro HSQC de la amentoflavona (2).

Espectro 12: Espectro HMBC de la amentoflavona (2).

Espectro 13: Espectro NOESY de la amentoflavona (2).

Espectro 14: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

Espectro 15: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

Espectro 16: Espectro COSY del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

Espectro 17: Espectro HSQC del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

Espectro 18: Espectro HMBC del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

Espectro 19: Espectro NOESY del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).



### **LISTA DE GRÁFICAS**

Gráfica 1: Curva de calibración del porcentaje de inhibición del radical DPPH con una disolución de Trolox<sup>®</sup>.

Gráfica 2: Curva de calibración de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Gráfica 3: Curva de calibración, concentración de quercetina vs. Absorbancia de las diluciones.



### 1) INTRODUCCIÓN.

A lo largo de toda la historia de la humanidad y en todo el mundo, las plantas medicinales han sido de gran importancia en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Se estima que la gran mayoría de la población, ha utilizado de alguna forma, estos recursos, principalmente, para resolver problemas de atención primaria a la salud. El uso de determinadas especies depende principalmente de su disponibilidad en alguna región en específico.

Con base en el uso tradicional de las plantas, se han realizado estudios químicos y biológicos con el fin de tener mayor información de sus beneficios. A partir de aquí se han aislado y caracterizado compuestos con alguna actividad biológica. Los resultados que se obtienen de estos estudios son de gran ayuda para el desarrollo de medicamentos que pueden tener impacto en la salud de la humanidad.

El estudio químico y biológico de las plantas medicinales no solo contribuye al desarrollo de fármacos, también es relevante en cuanto a la obtención de información quimiotaxonómica de las especies, lo cual puede llevar al desarrollo de nuevos productos químicos de interés para otras industrias. Además, con esta información se ha revalorado el uso tradicional de las especies.

Las especies del género *Selaginella* son utilizadas en la medicina tradicional en diversas regiones del mundo para el tratamiento de muchos problemas de salud. A partir de estudios realizados con especies de este género se han aislado principalmente biflavonoides de varios tipos que han sido investigados principalmente como fuente de compuestos con actividad citotóxica.





## 2) MARCO TEÓRICO.

### **Familia Selaginellaceae**

La familia Selaginellaceae pertenece a un grupo de plantas criptógamas vasculares que están relacionadas con la familia de los licopodios debido a que ambas pertenecen a la clase Lycopodiopsida.

Esta familia está constituida únicamente por el género Selaginella, la familia Selaginellaceae forma al orden Selaginellales, el orden Selaginellales pertenece a la clase Lycopodiopsida la cual pertenece a la división Tracheophyta.

Dentro de la familia se pueden encontrar especies que tienen tallos postrados y otras que tienen tallos erguidos y delgados, presentan una o varias ramificaciones con bifurcaciones desiguales y sin crecimiento del espesor, están cubiertas por hojas pequeñas en cuatro hileras longitudinales que pueden estar dispuestas en forma helicoidal o estar decusadas. Las hojas presentan una pequeña lígula en la base del haz de consistencia membranosa, este órgano les permite captar el agua y facilitar su absorción.

Son plantas capaces de producir dos tipos de esporas. Tienen gametofitos demasiado pequeños, los gametofitos femeninos producen cuatro esporas grandes (macrosporangios) y los gametofitos masculinos producen muchas esporas pequeñas (microsporangios). Las esporas están contenidas en órganos que están en la extremidad de las ramas y se presentan como flores apicales.

Existen grandes variaciones morfológicas entre las especies del género, esto se debe a las diferencias edáficas y climáticas; las especies del género presentan polimorfismo de acuerdo a estudios genéticos (Prashant et al., 2014).

### **Género Selaginella.**

El género Selaginella está formado por más de 700 especies que se encuentran distribuidas ampliamente por el mundo, especialmente en zonas tropicales.



Las especies de este género pueden ser de tamaño pequeño a moderado. Algunas plantas pueden resistir a periodos de sequía relativamente largos, esto se debe a que presentan propiedades poiquilohídricas, lo que significa que están en equilibrio con la humedad de la atmósfera.

Estas plantas se utilizan en varias partes del mundo, principalmente en medicina tradicional para el tratamiento de diversos problemas de salud, por ejemplo, para tratar problemas del tracto urinario como dolor de riñón, cistitis, obstrucción urinaria, irritación en los riñones y cálculos renales; también se utilizan para el tratamiento de problemas digestivos, hepáticos y del sistema circulatorio. Algunas especies son utilizadas como plantas ornamentales.

### Información taxonómica de *Selaginella stellata* Spring

La clasificación taxonómica de esta planta se obtuvo de la base de datos [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org) (Tabla 1) y en ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Selaginella stellata* Spring

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino</b>	<b>Embryophyta asiphogama</b>
<b>División</b>	<b>Tracheophyta</b>
<b>Clase</b>	<b>Equisetopsida</b>
<b>Subclase</b>	<b>Lycopodiidae</b>
<b>Orden</b>	<b>Selaginellales</b>
<b>Familia</b>	<b>Selaginellaceae</b>
<b>Género</b>	<b><i>Selaginella</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>S. stellata</i> Spring</b>



Figura 1: *Selaginella stellata* Spring.

***Selaginella stellata* Spring.**

Se conoce comúnmente como “licopodio estrellado” (NRCS, 2015), crece de forma natural en el sureste de México, Guatemala y Belice (Eol, 2015). Fue introducida en Hawaii en donde crece en los caminos del parque estatal Akaka Falls y en los valles de la costa Hamakua (Davidse y Sousa, 1995; Stolze, 1983; Htbg, 2015; Palmer, 2003).

Los licopodios estrellados son plantas perennes que se pueden encontrar en senderos y acantilados (Davidse y Sousa et. al., 1995; Palmer et. al., 2003). De acuerdo con la base de datos USDA (*United States Department of Agriculture*), esta planta es no hidrófita, por lo tanto, es posible encontrarla en humedales aunque esto no es muy común (Plants. USDA Gov, 2015, Plants, USDA Gov-2, 2015).

Las plantas de esta especie tienen las articulaciones hinchadas a lo largo del tallo principal de la planta junto con rizóforos localizados en el tercio bajo del tallo. Normalmente los tallos son de color paja, crecen a partir del suelo. Al crecer, las ramas forman un patrón en forma de huevo. Las hojas pueden ser ovadas, estrechamente oblongas o lanceoladas, miden aproximadamente entre 1 a 3 mm de largo. El estrobillo puede medir entre 1 a 2.5 cm de altura (Davidse y Sousa 1995; Palmer et. al., 2003). La especie se encuentra estrechamente emparentada con *Selaginella galeotii* (Stolze et al., 1983).

De acuerdo con el Diccionario Etnobotánico de la Amazonia, esta planta forma parte de una decocción utilizada por los brasileños conocida como “Palillo” o “Sapo magui” para el tratamiento de la gripe (Duke, 1994).

Hasta la fecha, no existen reportes en donde haya información acerca de la composición química de *Selaginella stellata*, sin embargo, se han realizado estudios en donde se evaluó la actividad antiepiléptica y ansiolítica del extracto etanólico, debido a que es una de las plantas utilizadas por la etnia maya q’eqchi para tratar la epilepsia y el “susto”, una enfermedad de filiación cultural que se presenta por una impresión fuerte y repentina causada por algún episodio



traumático que pone en riesgo la integridad física o emocional del individuo. Los estudios realizados con esta planta consistieron en inhibir la actividad de la enzima GABA transaminasa, que se asocia con actividad antiepiléptica y el desplazamiento del complejo GABA-benzodiazepina fenómeno respuesta asociada con la ansiedad. En este estudio se puede observar que el extracto de la planta no inhibió la actividad de GABA transaminasa, sin embargo, hubo un desplazamiento significativo del complejo GABA-benzodiazepina (Awad, et al., 2009).

### **Flavonoides y biflavonoides.**

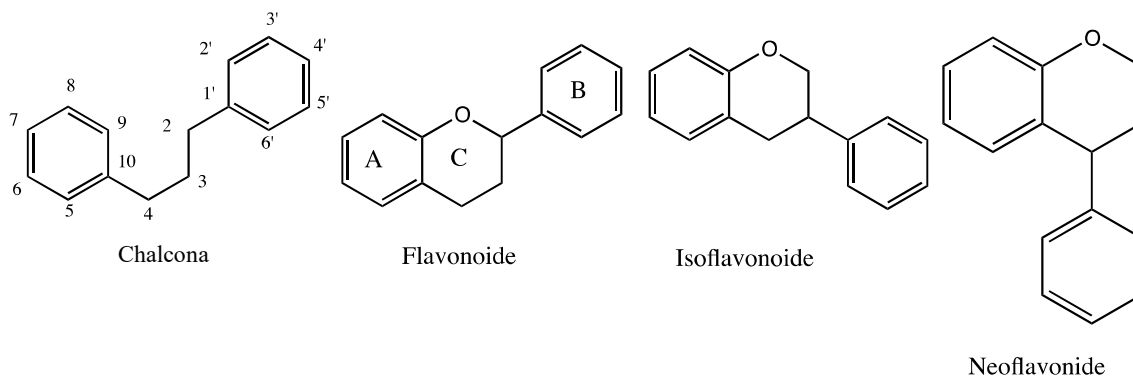
Los flavonoides son un grupo de productos naturales que se encuentran principalmente en las plantas, presentes en las vacuolas de las flores, hojas, semillas, raíces y tejidos superficiales. Estos compuestos son los responsables del color de muchas flores.

Los flavonoides se pueden encontrar como agliconas, o bien como glucósidos cuando el flavonoide se encuentra unido a uno o más carbohidratos por medio de un enlace hemiacetal (O-glucósidos), o por un enlace carbono-carbono (C-glucósido); como flavonolignanos en donde el flavonoide está unido a un lignano; como sulfuros o también pueden encontrarse como dímeros o polímeros.

Los flavonoides son compuestos diaril propanoides, la estructura básica consta de dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos (C6-C3-C6), la cadena que une a los anillos aromáticos puede estar abierta (tal es el caso de las chalconas) o bien puede estar formando otro anillo con un anillo aromático formando un cromano, éste se numera de acuerdo al orden de las manecillas del reloj, comenzando por el átomo de oxígeno mientras que para numerar el anillo aromático restante (el anillo B), se utilizan números con prima. En el caso de los benzopiranos, dependiendo de la unión del carbono a otro anillo de benceno, es posible clasificar a los diaril propanoides en tres clases: flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) y neoflavonoides (4-

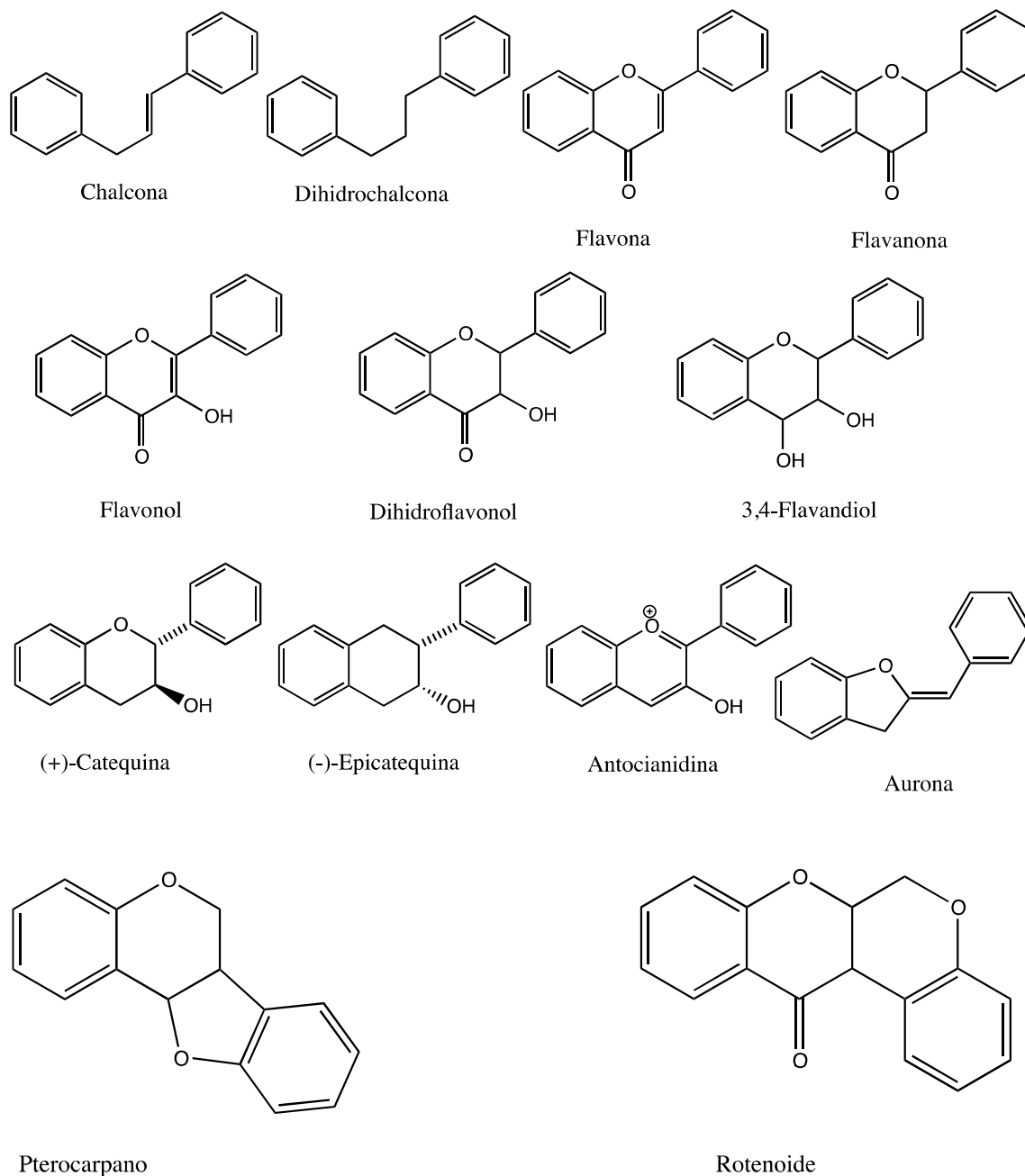


fenilbenzopiranos). En el esquema 1 se presentan las estructuras de diaril propanoides y su numeración.



Esquema 1: Estructuras de los diarilpropanoides (Aguilar, 2015).

En los diaril propanoides, la estructura heterocíclica que se encuentra con mayor frecuencia es la de las  $\gamma$ -pironas, los sitios más frecuentes de hidroxilación son 5, 7, 3', 4', el carbono 3 en los flavonoides y el carbono 2' en los isoflavonoides; únicamente se pueden observar variaciones en el estado de oxidación a lo largo de toda la molécula. Estas diferencias producen diversos grupos de diaril propanoides como antocianidinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, 3,4-flavandirol, auronas, catequinas, epicatequinas, pterocarpanos y rotenoides. En el Esquema 2 se presenta una figura de los distintos esqueletos de diaril propanoides.

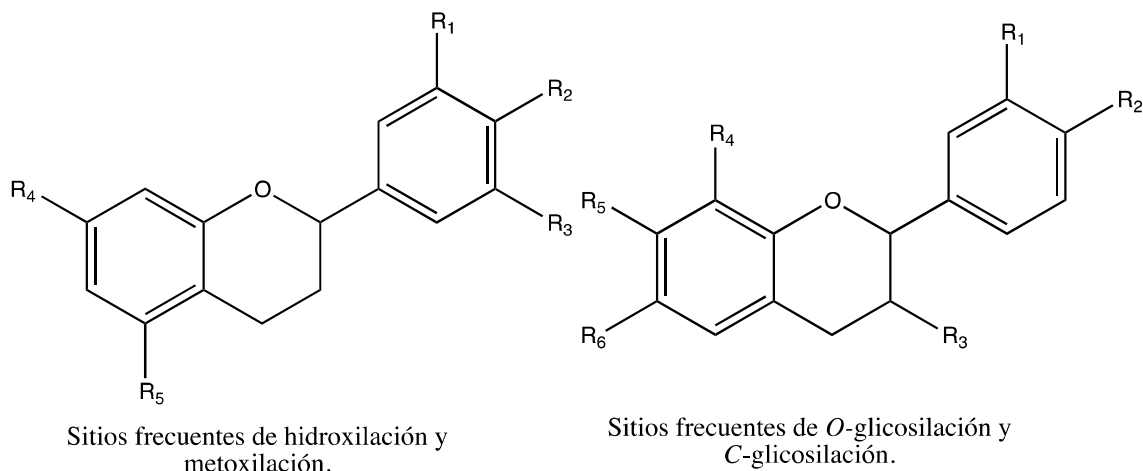


Esquema 2: Estructuras de antocianinas flavonas, flavonoles, flavanonas dihidroflavonoles, 3,4-dihidroflavandioles, auronas, catequinas, epicatequinas, pterocarpanos, y rotenoides (Aguilar, 2015).

Además, los carbonos o grupos hidroxilo de los flavonoides pueden tener unidos grupos metilo, prenilo y/o metil-dioxílos, generalmente, los grupos hidroxilo que se encuentran en el anillo A no tienen grupos metoxilo, es más frecuente encontrarlos en el anillo B.



Los glicósidos más comunes son los que están formados por moléculas de glucosa, sin embargo, pueden tener moléculas de ramnosa o galactosa, muchas veces los grupos hidroxilo son el punto de unión de los carbohidratos en los O-glicósidos. Los sitios más frecuentes de este tipo de sustitución son las posiciones 3, 5, 6, 7, 8 y 4'; en los isoflavonoides la posición 2' es también un sitio común de sustitución (Aguilar, 2015).



Esquema 3: Sitios frecuentes de hidroxilación y metoxilación de los flavonoides (Aguilar, 2015).

### Propiedades físicas:

Dependiendo de la forma en la que se encuentren los flavonoides, los compuestos presentarán determinadas propiedades físicas. Por ejemplo, las antocianidinas se encuentran como sales de colores rojo, violeta o azul, las flavanonas, flavonoles y auronas tienen colores que pueden ser desde un amarillo muy tenue hasta el color rojo, las flavanonas presentan rotación óptica debido a que el carbono 2 es estereogénico. Los glicósidos son sólidos amorfos mientras que las agliconas y los flavonoides con muchos grupos metoxilo son sólidos cristalinos. En cuanto a la solubilidad, los glicósidos, los sulfatos y las antocianidinas son solubles en agua y en alcohol. Las agliconas con muchos grupos hidroxilo son solubles en alcohol mientras que las agliconas con pocos grupos hidroxilos son solubles en éter dietílico, acetato de etilo y acetona. Los flavonoides que tienen muchos grupos



metoxilo son solubles en disolventes como cloroformo y éter de petróleo. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en disoluciones básicas esta propiedad permite reconocerlos y distinguirlos, sin embargo, algunos de ellos se descomponen (Aguilar et. al., 2015).

### **Funciones en las plantas:**

Los flavonoides pueden cumplir funciones en común en diversas plantas o pueden cumplir funciones específicas en un taxón determinado. A continuación, se presentan algunas funciones importantes de los flavonoides en las plantas.

- **Protección ante los rayos UV:** Los flavonoides incoloros (p. ejemplo la naringenina) que se encuentran en las capas superficiales de las plantas, capturan hasta un 90% de los rayos UV.
- **Defensa ante los herbívoros:** Algunas antocianinas producen sabores y texturas desagradables para los herbívoros.
- **Atraen a los animales polinizadores:** Muchos flavonoides dan colores a las flores y a las hojas lo cual atrae a los insectos polinizadores y esto asegura la preservación de las especies.
- **Atraen a las presas:** En las plantas carnívoras se encuentran antocianidinas que atraen a los insectos que las alimentan.
- **Atracción de animales dispersores de semillas:** Los flavonoides también dan color y algunos aromas a los frutos lo cual produce frutos más apetecibles para los animales que dispersan a las semillas.
- **Estimulan la presencia de bacterias que se encargan de la fijación de nitrógeno.**
- **Permiten la reabsorción de nutrientes y minerales de las hojas que están envejeciendo.**





### **Propiedades biológicas:**

Los flavonoides resultan ser benéficos para los humanos, a continuación, se presentan algunas propiedades que se les atribuyen.

- Propiedades quimiopreventivas en contra del cáncer y propiedades antimutagénicas, algunos flavonoides han podido inhibir el crecimiento de algunas células cancerosas.
- Resultan ser buenos antioxidantes ya que inactivan a los radicales libres, esto hace que puedan proteger a los humanos de los rayos UV y de la contaminación ambiental, reducen los síntomas de las alergias y de la artritis, hacen más lentos los procesos de envejecimiento, disminuyen el calor producido durante la menopausia y pueden combatir algunos síntomas de esta etapa, además evitan la oxidación del colesterol LDL lo que evita la formación de placa arterioesclerótica
- Son venoprotectores debido a que regulan la permeabilidad capilar, actúan como antiagregantes plaquetarios, vasodilatadores y antihemorrágicos, presentan actividad venotónica. Es probable que incrementen la resistencia de los capilares al mejorar la actividad de la vitamina C. Esto ayuda a proteger a los humanos contra infecciones y enfermedades de los vasos sanguíneos. Además, son capaces de relajar al músculo liso, esto ayuda a disminuir la presión sanguínea y a mejorar la circulación, algunos flavonoides tienen actividad antitrombótica.
- Son hepatoprotectores: Algunos flavonoides disminuyen la probabilidad del desarrollo de enfermedades hepáticas.
- Algunos flavonoides presentes en diversas plantas tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.
- Funcionan como antiinflamatorios y analgésicos: Algunos flavonoides actúan en contra de sustancias implicadas en los procesos inflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos.



- Poseen propiedades antibióticas: Algunos isoflavonoides y furocumarinas tienen actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral.

No existe algún estudio en donde se demuestre el desarrollo de problemas de salud en los humanos debido a la deficiencia en el consumo de flavonoides, se considera que por medio de la dieta se adquiere la cantidad suficiente de flavonoides.

Los flavonoides también se utilizan en el cultivo de plantas ornamentales; con esto, las hojas y flores adquieren colores más intensos.

### **Biosíntesis de flavonoides:**

Al observar la estructura básica de los flavonoides se puede notar que estos compuestos se biosintetizan por medio de dos rutas, la parte correspondiente al anillo B y la cadena de tres carbonos se biosintetizan por medio de la ruta del ácido siquímico mientras que la parte correspondiente al anillo A se biosintetiza por medio de la ruta del acetato malonato.

Ruta biogenética del ácido siquímico:

La ruta del ácido siquímico es el medio por el cual se sintetizan algunos compuestos aromáticos, esta ruta se desarrolla únicamente en los microorganismos y en las plantas. Los intermediarios de estas rutas son el ácido siquímico, la fenilalanina y la tirosina, estos aminoácidos proporcionan la estructura básica C6–C3 (Dewick, 2009).

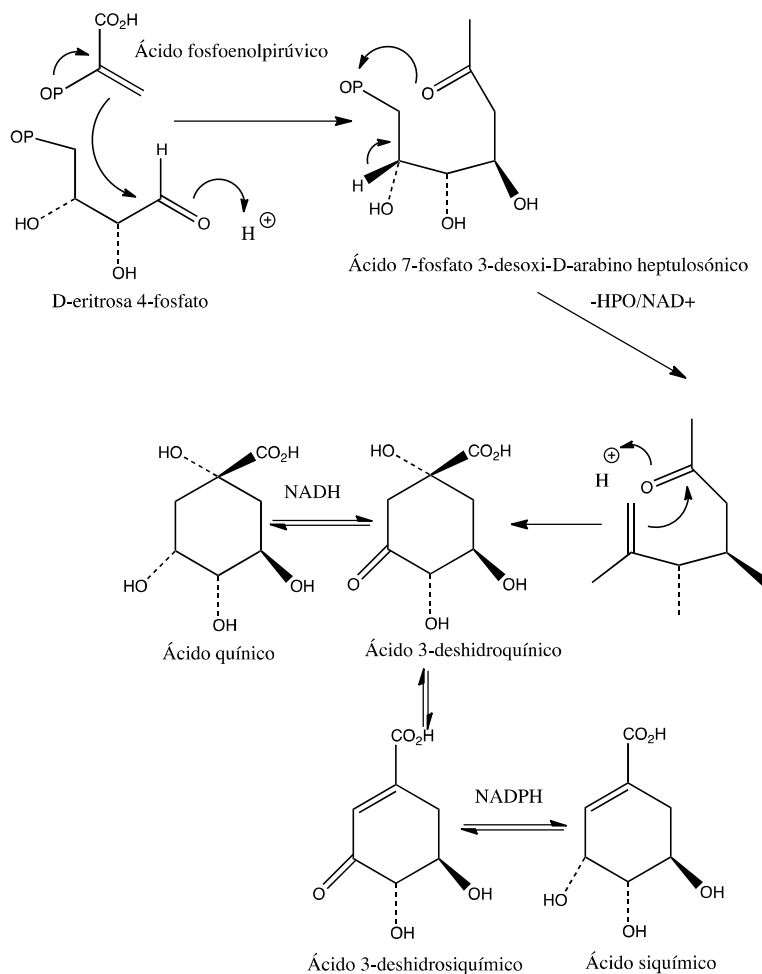
La ruta del ácido siquímico comienza por la unión de una molécula de ácido fosfoenol pirúvico que es un intermediario de la glucólisis y una molécula de eritrosa-4-fosfato que proviene del ciclo de las pentosas fosfato, esto genera al ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato. Este paso se lleva a cabo por medio de una reacción tipo condensación aldólica y es catalizada por la enzima 7-fosfato 3-desoxi-D-arabino-heptulosa sintasa (Dewick, 2009).



Posteriormente se pierde una molécula de ácido fosfórico y se lleva a cabo una reacción tipo aldólica intermolecular para formar al primer carbociclo de la ruta, el ácido 3-deshidroquínico. Después de la eliminación de la molécula de ácido fosfórico se produce una reacción de oxidación de un grupo hidroxilo, dependiente de  $\text{NAD}^+$  y después, una reacción de reducción dependiente de  $\text{NADH}$ , esto sucede antes de la reacción aldólica (Dewick, 2009).

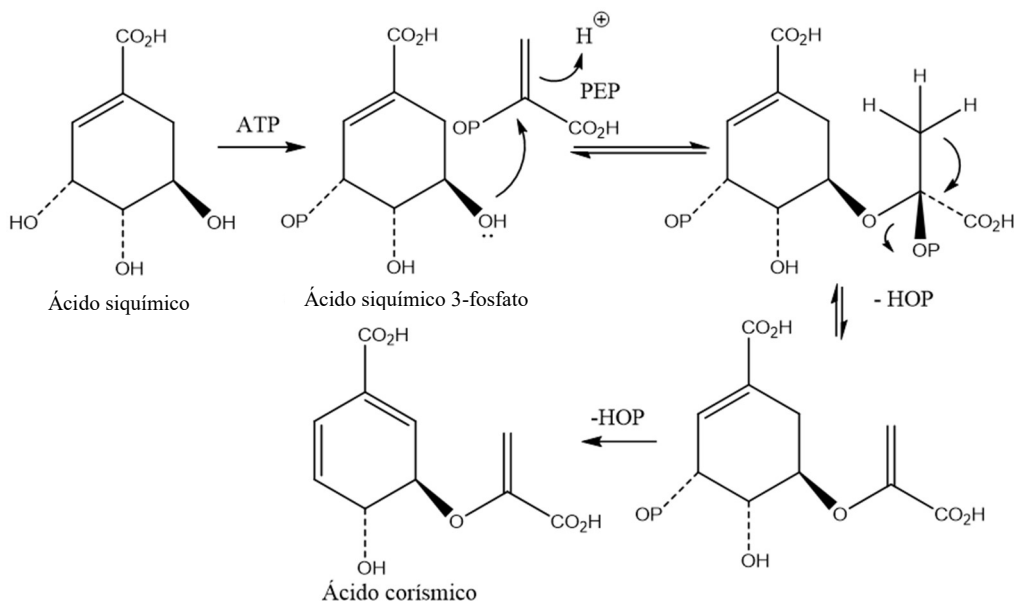
La reducción del ácido 3-deshidroquínico lleva a la formación del ácido quínico; este compuesto se puede encontrar en las especies vegetales de forma libre (Dewick, 2009).

El ácido siquímico se forma a partir del ácido 3-deshidroquínico por medio de una reacción de deshidratación catalizada por la enzima 3-deshidroquinasa seguida de una reacción de reducción catalizada por una enzima siquímato deshidrogenasa (Dewick, 2009).



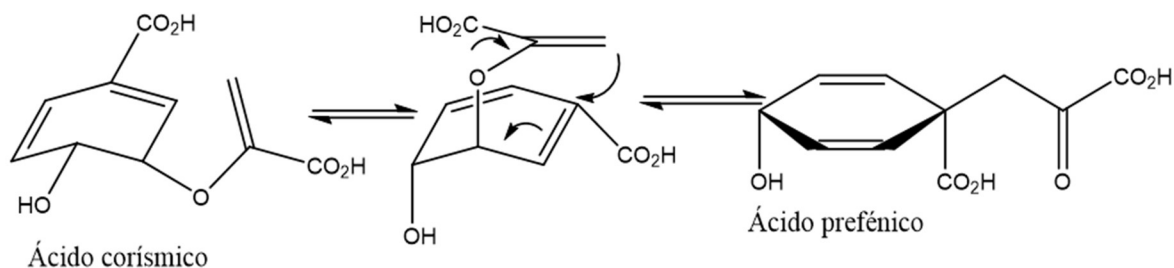
Esquema 4: Biosíntesis del ácido siquímico (Dewick, 2009).

Una reacción de fosforilación dependiente de ATP lleva a la formación del ácido siquímico-3-fosfato. Posteriormente se lleva a cabo una reacción de adición y eliminación con el ácido fosfoenol pirúvico, esto genera al ácido 5-enolpiruvilsiquímico. Después de una reacción de eliminación 1,4 de ácido fosfórico de esta molécula se forma el ácido corísmico. En la catálisis de todas estas reacciones, la mayoría de los procariontes, utilizan enzimas monofuncionales, las plantas utilizan enzimas bifuncionales y los hongos poseen un complejo enzimático que cataliza 5 reacciones (Dewick, 2009).



Esquema 5. Biosíntesis de ácido corísmico a partir del ácido siquímico (Dewick, 2009).

La transformación del ácido corísmico al ácido prefénico se realiza a través de una transposición, en donde, por medio de una reacción de Claisen, la parte correspondiente al fosfoenolpiruvato cambia de posición y entonces queda unida directamente al carbociclo, la reacción es catalizada por la enzima corismato mutasa. Esto forma a la estructura básica C6 - C3 que es la precursora de los aminoácidos fenilalanina y tirosina y muchos compuestos fenólicos (Dewick, 2009).

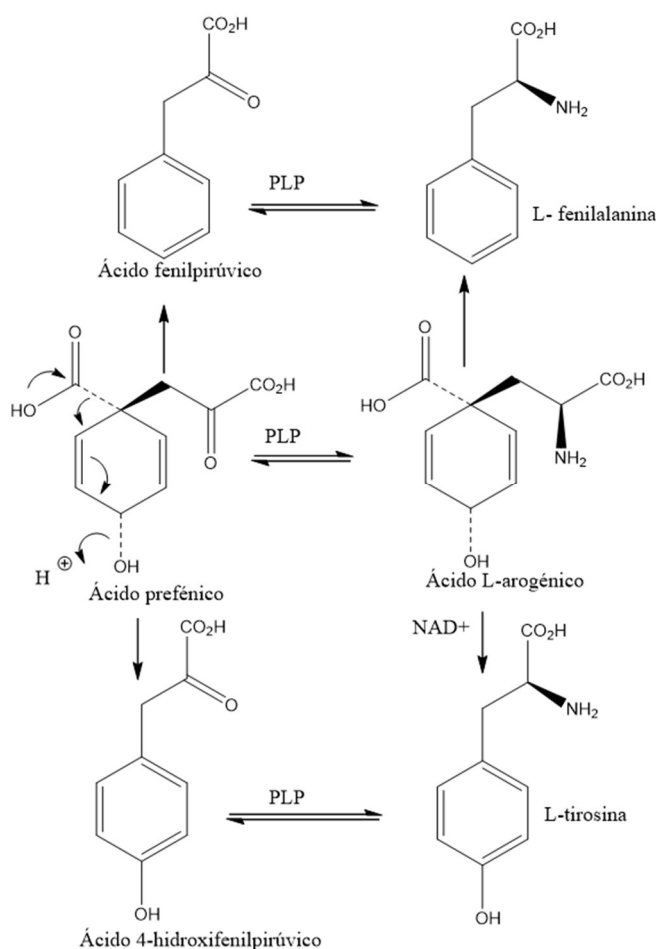


Esquema 6. Biosíntesis de ácido prefénico a partir del ácido corísmico (Dewick, 2009).

La formación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina vía ácido prefénico puede llevarse a cabo por rutas diferentes, esto depende de la especie y de las enzimas activas que se encuentren disponibles. Básicamente, la transformación, consiste



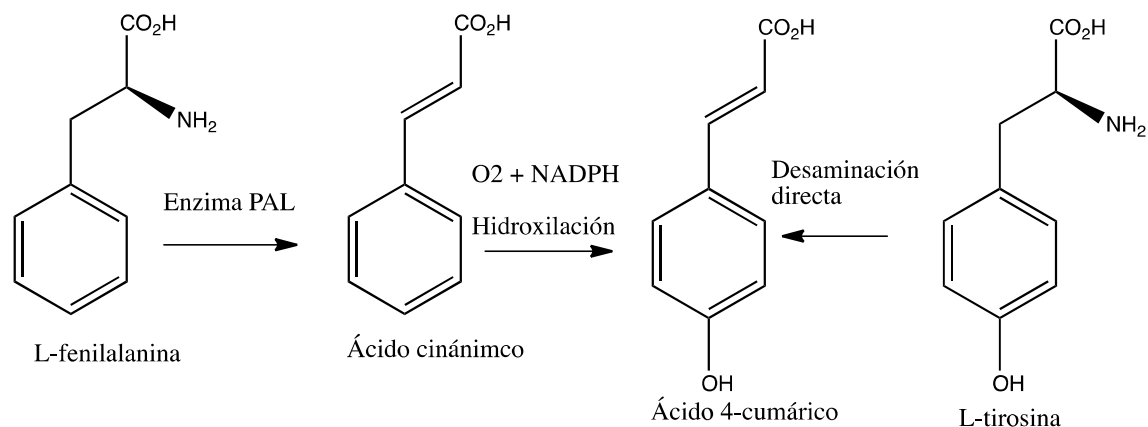
en tres reacciones, una aromatización descarboxilativa, una transaminación y una oxidación en el caso de la tirosina. La aromatización descarboxilativa del ácido prefénico genera al ácido fenilpirúvico y la posterior transaminación forma a la L-fenilalanina, en el caso de la biosíntesis de la L-tirosina, la aromatización descarboxilativa se produce por un paso de oxidación adicional en donde queda retenido un grupo hidroxilo. La L-fenilalanina y la L-tirosina también se pueden formar por la aromatización descarboxilativa del ácido L-arogénico que se produjo después de la transaminación del ácido prefénico. En la biosíntesis de la L-tirosina, la aromatización se produce junto con una reacción de oxidación que retiene al grupo hidroxilo (Dewick, 2009).



Esquema 7. Biosíntesis de la L-fenilalanina y L-tirosina a partir del ácido prefénico (Dewick, 2009).



Tanto la L-fenilalanina como la L-tirosina pueden generar una gran gama de productos naturales que están presentes en muchas plantas. Cuando se produce la desaminación, se llega a la formación del ácido cinámico en el caso de la L-fenilalanina y a la formación del ácido 4-cumárico en el caso de la L-tirosina. Casi todas las reacciones son catalizadas por la enzima fenilalanina amonio liasa (Dewick, 2009).



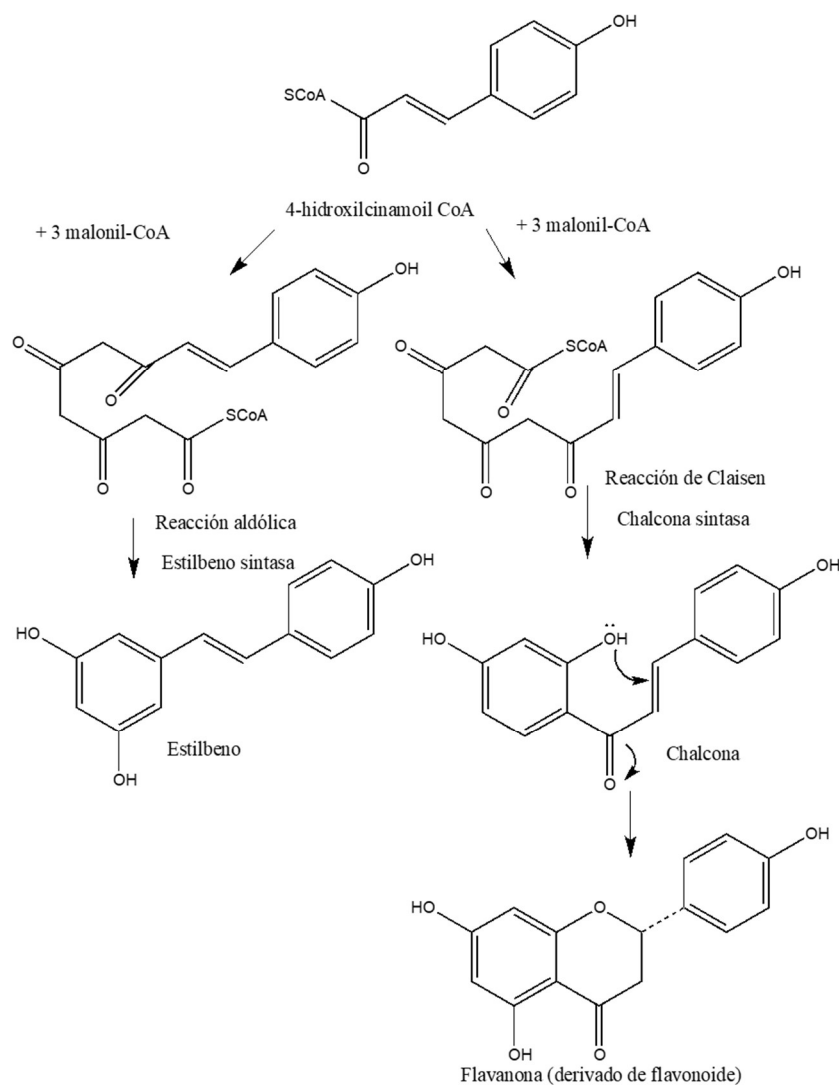
Esquema 8: Biosíntesis del ácido cinámico y ácido 4-cumárico a partir de la L-fenilalanina y L-tirosinas (Dewick, 2009).

Los ácidos cumáricos y el éster cumaroil-CoA son los precursores de los flavonoides y estilbenos. El éster cumaroil-CoA se enlaza a una unidad de malonil-CoA de 6 carbonos formada en la ruta del acetato malonato. Estas reacciones son catalizadas por la enzima PKS tipo III, estas enzimas utilizan a los ésteres de coenzima A y tienen sólo un sitio activo. En este paso se produce un policétido que dependiendo de la dirección en la que se doble, formará a los flavonoides o a los estilbenos. En el caso de las chalconas y flavonoides, la extensión de la cadena, las reacciones de condensación y de ciclización que se lleva a cabo por una reacción tipo Claisen, son catalizadas por la enzima chalcona sintasa. Mientras tanto, los compuestos que se producen por la unión del éster cinamoil-CoA y una unidad de policétido formada en la ruta del acetato malonato son poco comunes (Dewick, 2009).

Las chalconas son las precursoras de una gran gama de flavonoides, muchos tipos de flavonoides tienen en sus estructuras un anillo heterocíclico de 6



miembros que se forma por el ataque nucleofílico del oxígeno de un grupo hidroxilo que se encuentra en el anillo A sobre el carbono en posición  $\beta$  al carbonilo. Se puede observar que muchos flavonoides han perdido un grupo hidroxilo, esto se debe a la actividad de las enzimas chalcona sintasa en combinación con la enzima chalcona reductasa. En este paso produce la reducción del  $\beta$ -ceto éster o de la triona cíclica, se cree que esto ocurre de forma espontánea. Las flavanonas pueden llevar a la formación de una gran variedad de flavonoides (Dewick, 2009).



Esquema 9: Biosíntesis de flavanonas a partir de ácido 4-hidroxilcinámico (Dewick, 2009).





Existen muchas enzimas que se encargan de catalizar reacciones en donde se modifica el patrón de oxigenación de los anillos aromáticos. También puede haber modificaciones en el patrón de hidroxilación de los anillos aromáticos, así como glicosilaciones y metilaciones.

### **Biflavonoides:**

Los biflavonoides son compuestos polifenólicos formados por dos unidades de flavonoides, los cuales pueden ser o no los mismos, estos flavonoides se pueden encontrar unidos de forma simétrica o no simétrica por un enlace con un carbono o con un oxígeno (Silva et al., 2017). Los biflavonoides se pueden encontrar en estado libre o como *O*-glicósidos. Las variaciones en las parejas de flavonoides, las diferentes posiciones y variaciones en el enlace interflavonoidico y la posición variable de grupos funcionales y de centros estereogénicos lleva a una gran diversidad en la estructura de los biflavonoides (Aguilar, 2015).

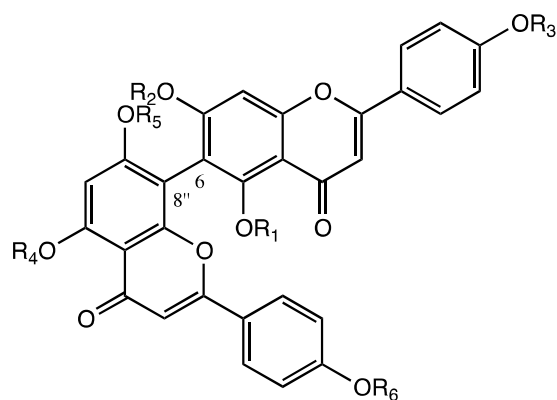
Los biflavonoides se han encontrado en un extenso rango de plantas vasculares, desde las Briofitas y Traqueofitas primitivas hasta en las Angiospermas, se pueden encontrar en muchas especies de musgos de las Briofitas, sin embargo, la distribución de estos compuestos parece ser discontinua, esto sucede especialmente en las Angiospermas, mientras que en las gimnospermas se encuentran distribuidos ampliamente. No es posible encontrarlos en muchos miembros de la familia Pineaceae y de la clase Gnetales y en Angiospermas primitivas relacionadas sin embargo se han encontrado en varias familias de Angiospermas. Los grupos vasculares primitivos Psilotum y Tmesipteris han presentado flavonoides y biflavonoides, pero no proantocianidinas mientras que los helechos contienen principalmente flavonoides y proantocianidinas (Stafford, 1990).

Los biflavonoides se encuentran en distintas partes de las plantas, predominantemente en la cutícula de la superficie en las células epidérmicas de las hojas (Stafford, 1990). Presentan actividades biológicas de interés como antiinflamatoria, anticancerígena, antibiótica, vasorelajante, anticoagulante y

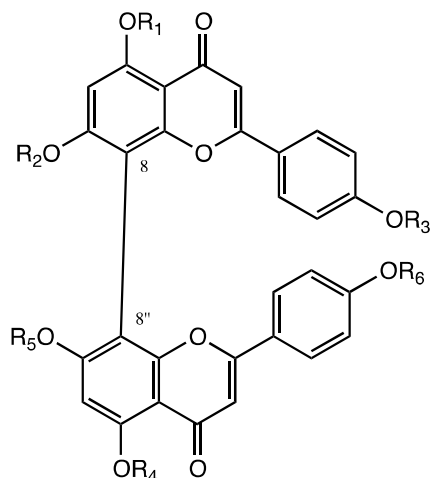


antioxidante, sin embargo, esta actividad suele ser menor a la de los flavonoides a pesar de tener aproximadamente el doble de grupos hidroxilo; algunos biflavonoides pueden inhibir a la enzima citocromo P450 en los humanos (Aguilar, 2015).

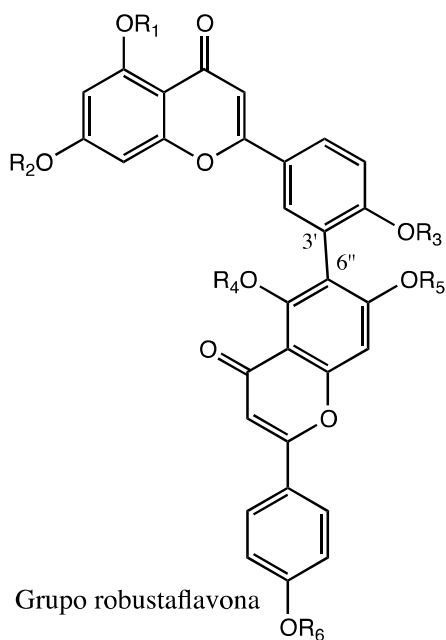
Existen más de 200 tipos de biflavonoides, en cuanto a los biflavonoides en donde los monómeros se unen por medio de un enlace C-C, existen los biflavonoides de tipo agastiflavona en donde la unión se da en C6-C8'', los biflavonoides de tipo cupressuflavona en donde los monómeros se unen por medio de los carbonos C8-C8'', los biflavonoides de tipo amentoflavona en donde los flavonoides se unen por medio del enlace entre C3' y C8'' y los flavonoides de tipo robustaflavona en donde la unión se produce entre C3' y C6''. En el Esquema 10, se presentan las estructuras correspondientes (Aguilar, 2015).



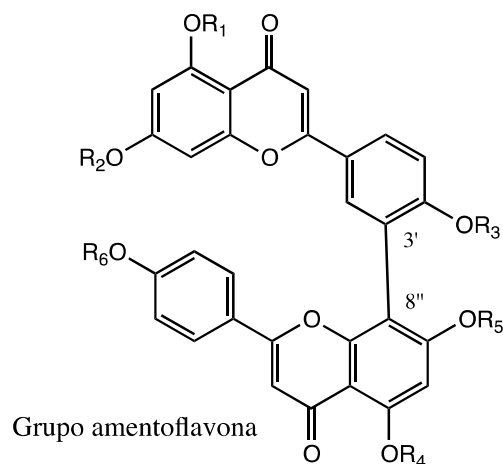
Grupo Agatisflavona



Grupo cupressuflavona



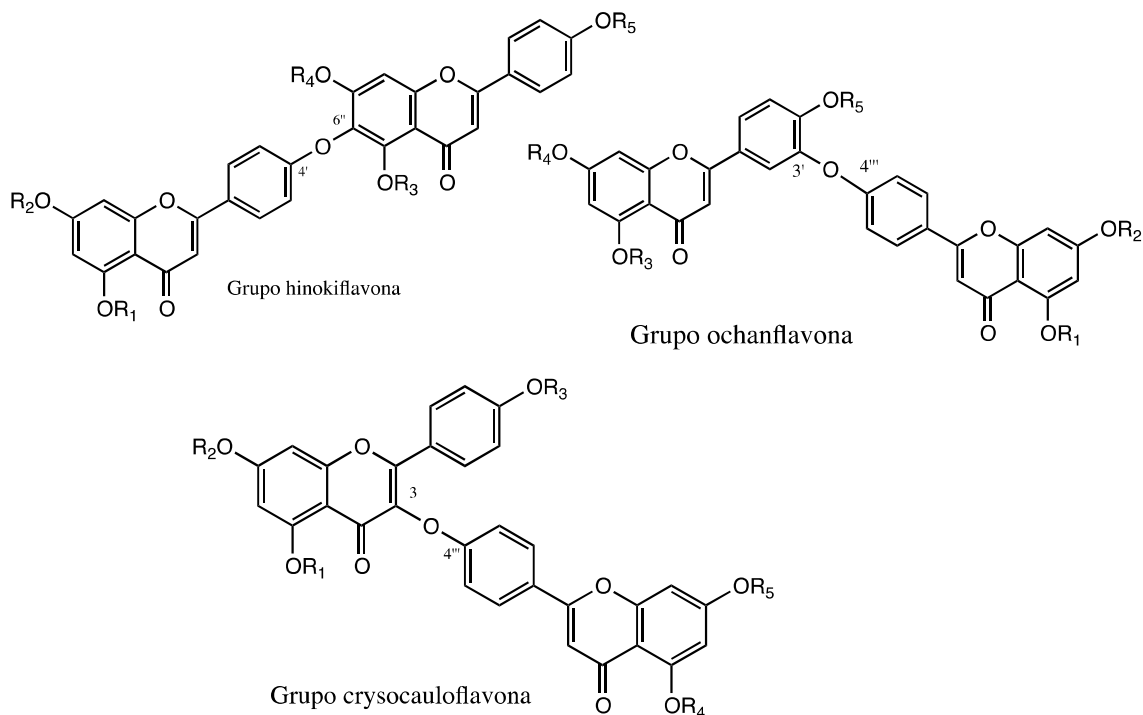
Grupo robustaflavona



Grupo amentoflavona

Esquema 10: Biflavonoides de tipo I, unidos por un enlace C-C (Aguilar, 2015).

Se pueden identificar tres tipos de biflavonoides en donde los monómeros se encuentran unidos por medio de un átomo de oxígeno, uno pertenece al grupo de las hinokiflavonas en donde la unión se da entre C4' y C6'', otro es el grupo a las ochnaflavonas en donde la unión entre los monómeros se encuentra en C4' y C3'' y otro pertenece al grupo de las crysocauloflavonas en donde los monómeros se unen por medio de los carbonos C3 y C4''. En el Esquema 11 se presentan los dos tipos de estructuras (Aguilar, 2015, Swamy et al., 2006).



Esquema 11: Biflavonoides de tipo II, unidos por un enlace C–O (Aguilar, 2015, Swamy et al., 2006).

### Biosíntesis de biflavonoides

La ruta biogénica in vivo más aceptada de biflavonoides es por acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y modificaciones subsecuentes del carbono C-3. Si de la naringenina chalcona se abstrae un electrón del grupo hidroxilo unido al C-4, se forman los radicales representados en las estructuras A y B mientras que si se abstrae un electrón del C-4, se forma un radical que está representado por las estructuras C, D, y E. La unión de estos radicales da origen a los precursores de los biflavonoides (Aguilar, 2015).

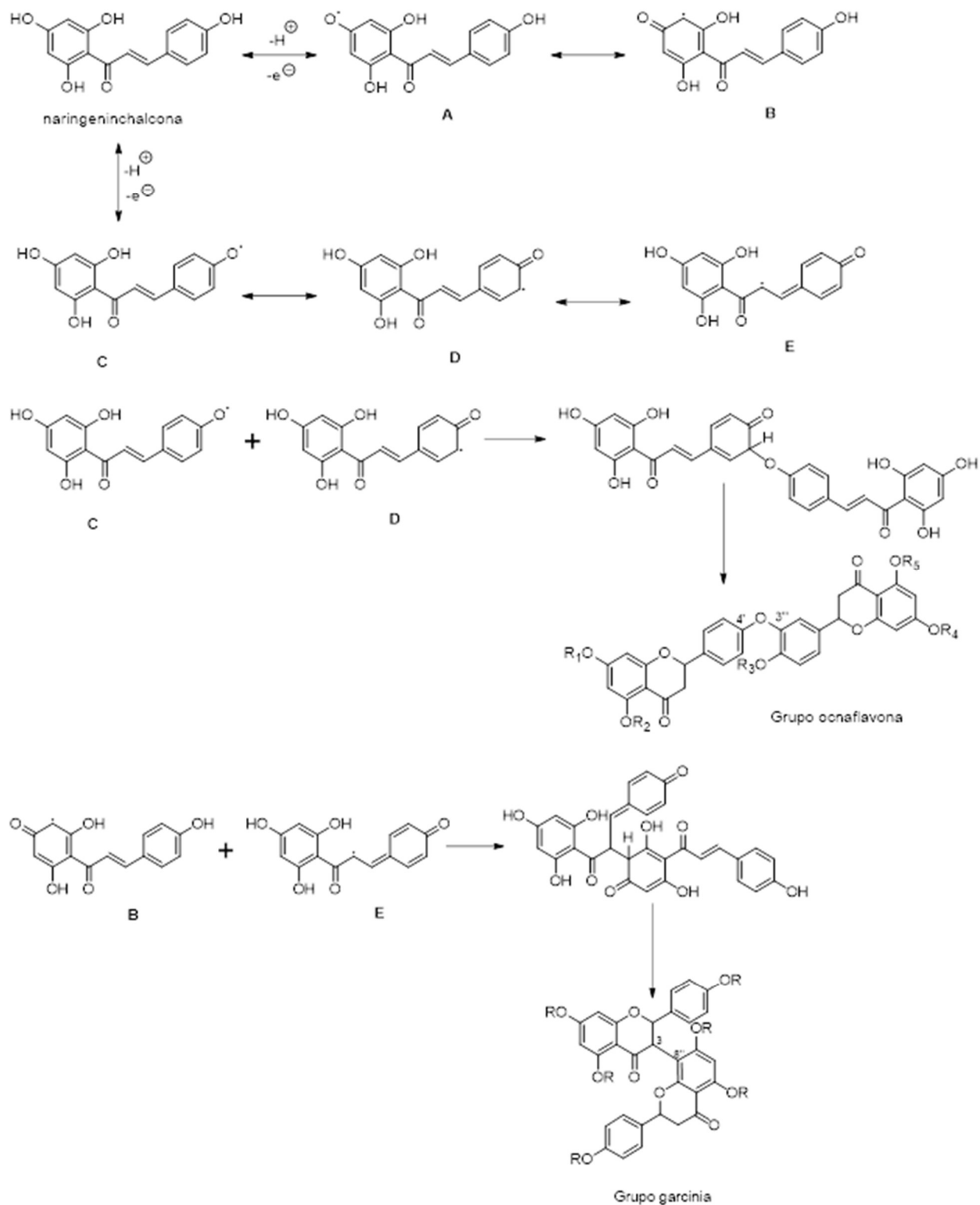
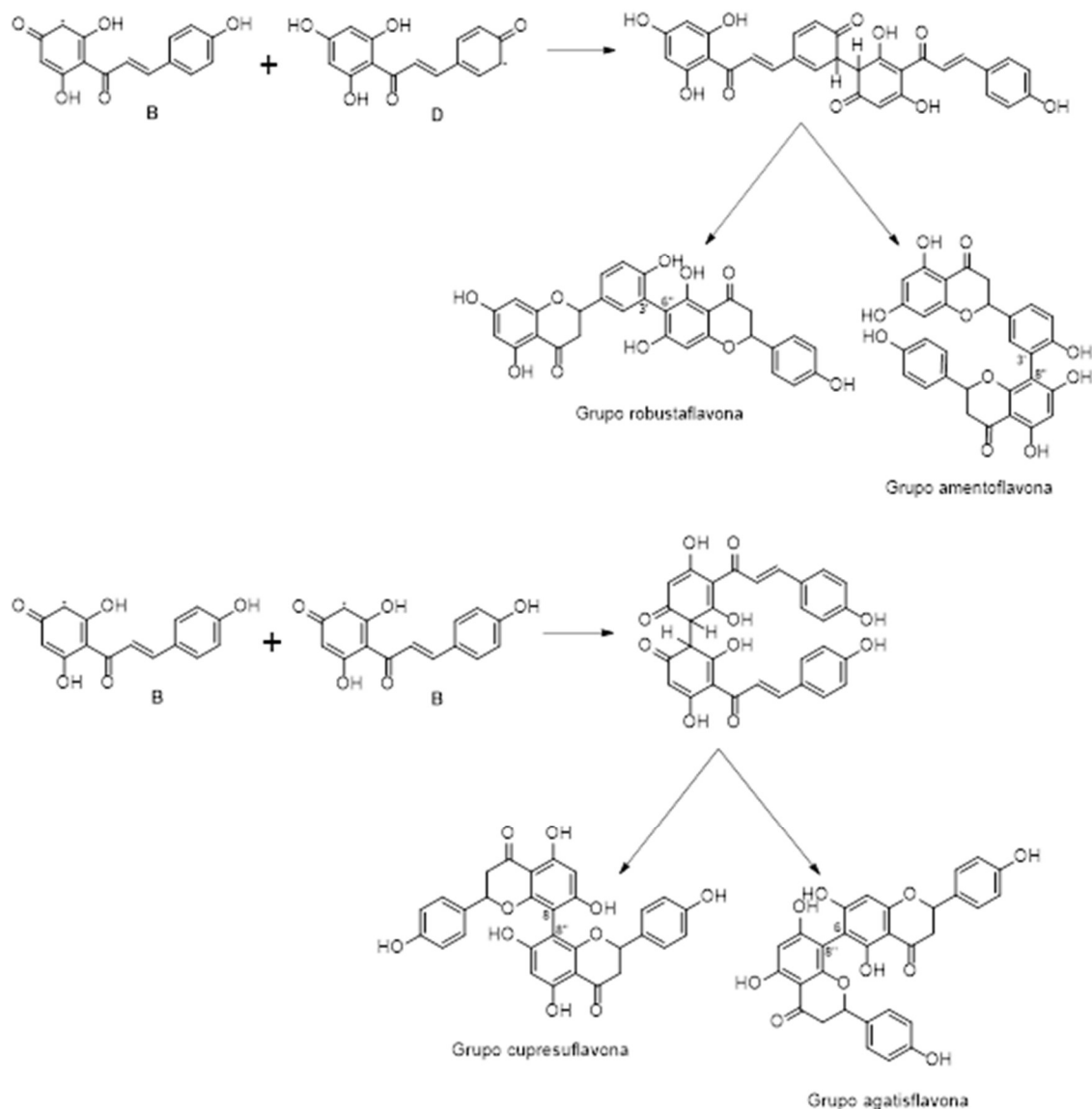


Figura 12: Biosíntesis de biflavonoides (Aguilar, 2015).



Esquema 12: Biosíntesis de biflavonoides (continuación) (Aguilar, 2015).

### Compuestos aislados de diversas especies del género *Selaginella*.

Se han realizado estudios fitoquímicos de varias especies del género *Selaginella*. A partir de éstas se han podido aislar flavonoides, glucósidos, lignanos y alcaloides, sin embargo, los compuestos que se han encontrado con mayor frecuencia han sido los biflavonoides, especialmente de tipo amentoflavona, robustaflavona, hinokiflavona y heveaflavona.



Tabla 2: Diversos compuestos aislados a partir de especies de selaginelas:

<b>Especie</b>	<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Usos y actividades</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>Selaginella bryopteris</i></b>	Amentoflavona, (2S)-2,3-dihidroamentoflavona, (2''S)-2'',3''-dihidroamentoflavona, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahydroamentoflavona, hinokiflavona, (2S)-2,3-dihidrohinoikiflavona, (2''S)-2'',3''-dihidrohinoikiflavona, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahydrohinoikiflavona bilobetina, seqoiaflavona, heveaflavona, neocriptomerina. Tetra-O-metilhinokiflavona, lanaroflavona, siadopitina, 4',7''-O-dimetilamentoflavona.	“Regeneración de energía y vitalidad”, actividad antiprotzoaria de compuestos tirimetoxilados, actividad antioxidante y protege ante el “golpe de calor”.	Swamy et al., 2006. Kunert et al., 2008. Sah et al., 2005. Ramírez et al, 2010
<b><i>Selaginella crysocaulos</i></b>	Naringeninil-(4''',O,3)-kamperol (crisocauloflavona 1), 8''-metilnaringeninil-(4''', O, 3)-kampferol (crisocauloflavona 2), 5'',7''-dihidroxil-2''-fenoxicromonil-(3''', 4')-naringenina (crisocauloflavona 3), 3,3'-binaringenina y amentoflavona.	No reportada	Swamy et al. 2006
<b><i>Selaginella convoluta</i></b>	Presencia de derivados de antraceno, flavonoides, lignanos, naftoquinonas, esteroides y triterpenoides	Antidepresiva, afrodisiaca, diurética, analgésica, antiinflamatoria, aumenta la fertilidad de las hembras, actividad antioxidante, antibacteriana y citotóxica (débil)	Alves et al., 2018 Guillherme et al., 2012.
<b><i>Selaginella delicatula</i></b>	Robustaflavona, amentoflavona, 4-	Actividad citotóxica en	Lin et al., 2000



	<p>7,4'-metileterobustaflavona, 7,4'-dimetileterobustalfavona, 7,4'-dimetileter-2'',3''-dihidrorobustaflavona, 7,4',7''-trimetileter-2'',3''-dihidrorobustaflavona, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, 7,4',4'''-trimetileterobustaflavona, 4,4'''-dimetileter-2,3-amentoflavona, 7,4',7''-trimetileter-2,3-dihidroamentoflavona, 7,4'-dimetileter-2,3-dihidroamentoflavona, 7-metileter-2'',3''-dihidroisocriptomerina y <math>\alpha</math>-tocoferil quinona</p>	<p>contra de células cancerígenas, actividad neuroprotectora y antioxidante.</p>	<p>Chen et al., 2005 Girish et al., 2012, 2014</p>
<p><b><i>Selaginella denticulata</i></b></p>	<p>7,4',7'',4'''-amentoflavona, tetrametoxilamentoflavona, criptomerina B, hinokiflavona, isocriptomerina, sotetsuflavona (7-metoxilamentoflavona), robustaflavona</p>	<p>No reportada</p>	<p>López-Sáez et al., 1994</p>
<p><b><i>Selaginella doederleinii</i></b></p>	<p><b>Alcaloides:</b> hordenina, hordenina-O-<math>\alpha</math>-L-ramnopiranosido, N-metiltiramina-O-<math>\alpha</math>-L-ramnopiranosido y hordenina-O-[(6''-O-transcinamoil)-4'-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-<math>\alpha</math>-L-ramnopiranosido]. <b>Biflavonoides:</b> amentoflavona, robustaflavona, 2'',3''-dihidro-3',3'''-biapigenina, 3',3'''-biapigenina, heveaflavona, 7,4',7'',4'''-tetra-O-metilamentoflavona. <b>Lignanos:</b> (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B,</p>	<p>Utilizada para “eliminar el aire”, tratar la tos y el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Actividad antitumoral, antioxidante</p>	<p>Shaoguang et al.,2013, Li et al., 2017. Chao et al., 1995. Lin et al., 1994</p>





	(+)-matairesinol A, (+)-wilkstromol, (-)-nortraquelósido y (+)-nortraquelósido.		
<b><i>Selaginella Helvética</i></b>	Determinación del contenido de biflavonoides	Antipirético, Desintoxicante, Estimula la circulación de la sangre, utilizada para combatir la tos. Actividad antioxidante	Jiang et al., 2018.
<b><i>Selaginella lepidophylla</i></b>	Biflavonoides: Robustaflavona, amentoflavona, 2,3-dihidrorobustaflavona, 5-metiléter 2,3-dihidrorobustaflavona, hinokiflavona, heveaflavona, isocriptomerina, trimetiléteramentoflavona, 5',5''-dihidroxi-7,7'',4',4'''-tetrametoxiamentoflavona. Glucósidos: trealosa y sacarosa.	Utilizada para eliminar piedras en el riñón, en el tratamiento de problemas urinarios, problemas digestivos y hepáticos. Actividad diurética, hepatoprotectora, Inhibición de la producción de ATP.	Aguilar et al., 2008, et al., 2015. Prashant et al. 2014. Adams et al, 1990. Qasim et al., 1985.
<b><i>Selaginella moellendorffii</i></b>	Alcaloides: ácido selaginético, ácido 5-hidroxiselaginético, 5-hidroxi-N8,N8-dimetilpseudoprinaminol, N-selagineloil-L-fenilalanina, N-(5-hidroxiselagineloil)-L-fenilalanina y derivados del ácido neoselaginético. Flavonas: ácido [7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4H-cromeno-5-il] -acético, éster etílico del ácido [7-hidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-4-oxo-4H-cromen-5-il] -acético, éster butílico del ácido [7-hidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-4-oxo-4H-cromen-5-il] -acético.	Actividad citotóxica, antiviral en contra de la Hepatitis B	Yuan et Al., 2010. Chang-Ming et al, 1997. Wang et al., 2009. Zhu et al., 2008.



	<p>Biflavonoides: Ginketina, amentoflavona, 7,4',7'',4'''-tetrametiléteramentoflavona, kayaflavona, podocarpusflavona A, crisoeritol, isoginketina, bilobetina, 4-metoxiléterobustaflavona.</p> <p>Glucósidos: 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.</p>		
<b><i>Selaginella nothohibrida</i></b>	Amentoflavona, robustaflavona y (S)-2,3-dihidrorobustaflavona	Actividad diurética.	Aguilar, 2015
<b><i>Selaginella pallescens</i></b>		Actividad antiespasmódica, antimicrobiana.	Rojas et al., 1999
<b><i>Selaginella pulvinata</i></b>	<p>(S)-(-)-N-[2-(3-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)etil]acetamida, 6-formil-5-isopropil-3-hidroximetil-7-metil-1H-indeno.</p> <p>Selaginelinas G y H, selaginelinas D-F, selaginelinas M y S.</p> <p>Esteroides: Ácido, 3β,16α-dihidroxi-(5α)-colestano-21-óico.</p> <p>Biflavonoides: Amentoflavona, robustaflavona.</p>	<p>Utilizada para el tratamiento del cáncer, daño traumático y asma.</p> <p>Actividad antiproliferativa, antifúngica en contra de <i>Candida albicans</i>, Antimicrobiana en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Wang et al., 2016.</p> <p>Cao et al., 2010.</p> <p>Cao et al., 2010.</p> <p>Zheng et al., 2007.</p> <p>Cao et al., 2015.</p>
<b><i>Selaginella selaginoides</i></b>	Amentoflavona, robustaflavona	No reportada	López-Sáez et al., 1994
<b><i>Selaginella sinensis</i></b>	<p>Neolignanos:</p> <p>Sinencioles B-G, sinenciol A, alcohol (7R,8S)-deshidrodiconiferílico, alcohol (7R,8S)-dihidrodeshidrodiconiferílico.</p>	Es utilizada para tratar la hepatitis, colecistitis, nefritis, eczema y el sangrado.	<p>Chen et al, 2019.</p> <p>Feng et al., 1994.</p> <p>Zhang et al., 2011a.</p> <p>Ma et al., 2001.</p>



	<p>Esteroides: <math>\beta</math>-sitosterol.          Compuestos fenólicos:          Ácido vanílico, (7S,8R)-4,9,9'-trihidroxi-7,8-dihidrobenzofurano-1'-propilenlignano, siringaresinol, pinosresinol, pinosresinol, 4-O-D-glucopiranosido, siringaresinol-4,4'-O-di-D-glucosido, metil-D-xilopiranosido, metil-D-arabinopiranosido.          Biflavonoides: Amentoflavona, hinokiflavona.</p>	<p>Actividad antioxidante, actividad antiviral en contra del virus sincital respiratorio, influenza A y B, HVS-1 HVS-2.</p>	
<p><b><i>Selaginella tamariscina</i></b></p>	<p>Esteroides:          Ácido <math>3\beta, 16\alpha</math>-dihidroxi-<math>5\alpha, 17\beta</math>-colestano-21-carboxílico, ácido <math>3\beta</math>-acetoxi-<math>16\alpha</math>-hidroxi-<math>5\alpha, 17\beta</math>-colestano-21-carboxílico, ácido <math>3\beta</math>-(3-hidroxibutiroxi)-<math>16\alpha</math>-hidroxi-<math>5\alpha, 17\beta</math>-colestano-21-carboxílico.          Biflavonoides: Amentoflavona, robustaflavona, ginketina, neocriptomerina, hinokiflavona, sumaflavona, taiwaniflavona, pulvinatabiflavona, 7-O-metilamentoflavona, 7''-O-metilamentoflavona, 7-O-metilrobustaflavona, 4'-O-metilrobustaflavona, 2,3-dihidroamentoflavona, 2'',3''-dihidroamentoflavona, 2'.8''-biapigenina, Isocriptomerina.          Derivados de selaginina: Selagininas A, C, M y N.          Compuestos fenólicos:          (2R,3S)-dihidro-2-(3'-5'-dimetoxil-4'-</p>	<p>Utilizada para el tratamiento del cáncer en estado avanzado, hematuria, prolapso del ano y de la hepatitis crónica.          Actividad citotóxica moderada (selagininas M y N).          Regula la expresión de la matriz metaloproteínasa en humanos.          Produjo la apoptosis de células de leucemia promielótica humana.          Actividad antihiperlipidémica del extracto de EtOH.          Actividad vasorelajante (amentoflavona), Actividad antialérgica (extracto EtOH).          Actividad Antiproliferativo</p>	<p>Zhang et al., 2011.          Zhang et al., 2012.          Lee et al., 2008.          Ahn et al., 2006.          Zheng et al., 2011.          Kang et al., 2004.          But et al., 2005.          Liu et al., 2017.          Bi et al., 2004.          Gao et al., 2007.          Lee et al., 2008.          Hang et al., 2015.</p>



	hidroxifenil)-7-metoxil-5-acetilbenzofurano, éster del ácido 3-hidroxil-(2'-metoxil-4'-carboxifenil)-propanoico (éster de tamariscina A), sigringaresinol, 1-(4'-hidroxil-3'-metoxifenil)-glicerol, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido vanílico, ácido siríngico, unbeliflavona, ácido protocatéquico, tamarinscinol T.	en células de cáncer de ovario (amentoflavona). Actividad antibacteriana. Actividad antifúngica en contra de <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Actividad inhibitoria de las enzimas epóxido hidrolasas.	
<b><i>Selaginella uncinata</i></b>	Uncinataflavona, cirsimarina, psatirotina, 2,3-dihidroisocriptomerina, 2'',3''-dihidroisocriptomerina, amentoflavona, (2S)-2,3-dihidroamentoflavona-4-metil éter, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahydroamentoflavona-4-metil éter, (2S,2''S)-2,3,2'',3''-tetrahydroamentoflavona, (2S)-2'',3''-dihidroamentoflavona-4-metil éter, (2S)-2,3-dihidroamentoflavona, (2S)-2'',3''-dihidroamentoflavona.	Utilizada para tratar la ictericia, la disentería, el edema y la enfermedad de beriberi. Actividad antioxidante de los compuestos aislados. Los biflavonoides de tipo amentoflavona tuvieron un efecto protector en contra de la anoxia.	Zou et al., 2013, Jun-Xia et al., 2011.
<b><i>Selaginella willdernowii</i></b>	Biflavonoides: Amentoflavona, robustaflavona, isocriptomerina, 4',7''-di-O-metilamentoflavona, 7''-O-metilisocriptomerina, 2'',3''-dihidroisocriptomerina. Determinación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides	Utilizada para curar heridas, como antipirético y para aliviar el dolor de espalda. Actividad antioxidante de las decocciones. Actividad citotóxica de algunos biflavonoides.	Chai et al, 2012. Silva et al., 1995.
<b><i>Selaginella Wrightii</i></b>	Amentoflavona, robustaflavona, hinokiflavona	No reportada	Lara, 2014.



**Biflavonoides aislados en distintas plantas y sus actividades biológicas.**

A continuación, se presenta una tabla en donde se proporcionan ejemplos de biflavonoides que se han aislado de otras plantas y sus respectivas actividades biológicas



Tabla 3: Biflavonoides provenientes de otras especies vegetales y sus actividades biológicas.

<b>Especie</b>	<b>Biflavonoides</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Fuentes</b>
<b><i>Ormocarpum kirki</i></b>	Apigenil-(1-3Il-3)-naringenina, isochamaejasmina.	Actividad antiplasmódica y antiprotozoaria.	Dhooghe et al., 2010.
<b><i>Garcinia livingstonei</i></b>	<i>Ent</i> -naringenil-(1-3all-8)-4'-O-metilnaringenina	Actividad antiplasmódica moderada	Mbwambo et al., 2006
<b><i>Compnoperma panamense</i></b>	Lanaroflavona.	Actividad anrtiplasmódica y antimalárica.	Weniger et al., 2006
<b><i>Ginko biloba</i></b>	Ginketina, isoginketina, bilobetina.	Actividad leishmanicida, antiparacitaria, antiplasmódica y antiinflamatoria.	Weniger et al., 2006. Lim et al. 2006
<b><i>Garcinia garderiana</i></b>	Moreloflavona, GB-2 <sup>a</sup>	Actividad antiinflamatoria, antiedemato-génica, actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa	Castardo et al., 2008. Campos et al. 2015).
<b><i>Lonicera japonica</i></b>	Ochnaflavona	Actividad antiinflamatoria, produjo lesiones en los tejidos, shock séptico y apoptosis.	Shang et al., 2010.
<b><i>Potentilla fulgens</i></b>	Polifulgeno	Actividad antioxidante menor que epicatequina	Benzie et al., 1996
<b><i>Garcinia kola</i></b>	Moreloflavona, GB2a	Actividad antioxidante	Okoko, 2009a, 2009b.
<b><i>Semecarpus anacardium</i></b>	Tetrahidro-Amentoflavona	Actividad antioxidante	Arimboor et al., 2011.
<b><i>Wikstroemia Indica</i></b>	Genkwanol B, genkwanol C, stelleranol	Actividad antiviral en contra del virus sincital respiratorio (VSR).	Rodrigues et al., 2007.
<b><i>Compylospermum flavum</i></b>	4'''-O-metilagastiflavona	Actividad antimicrobiana en contra de <i>Staphylococcus</i>	Likhitwitayawuild et al., 2005.



		<i>aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i> .	
<b><i>Ormocarpum trichocarpum</i></b>	(+)-chamaejasmina, (-)-dificina, 3''-epidificina, 7,7''-di-O- metilchamaejasmina, 7,7''-di-O- metilisochemaejasmina.	Actividad antimicrobiana en contra de <i>S. aureus</i> , <i>B.</i> <i>subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> <i>pneumonia</i> .	Chukwujekwu et al., 2012.
<b><i>Lonicera japonica</i></b>	Lanaroflavona, 4'''-O- metilgastiflavona	Actividad antiproliferativa y antitumoral en contra de células de cáncer	Huang et al., 2012.
<b><i>Abies stachalinensis</i></b>	Abiesinolos A-F.	Actividad quimiopreventiva y actividad antitumoral	Wada et al., 2010.
<b><i>Garcinia dulis</i></b>	Moreloflavona	Actividad antiproliferativa	Pang et al., 2009.
<b><i>Cupressus sempervirens</i></b>	8,8''-biapnenina	Inhibidor de la osteroclasto- génesis	Siddiqui et al., 2010.
<b><i>Cephalotaxus koreana</i> <i>nakai</i></b>	Bilobetina, Siadopiticina, tetra-O- metilamentoflavona	Promueve la diferenciación de osteoblastos, la síntesis de colágeno y la mimetización.	Lee et al., 2006.
<b><i>Garcinia prainiana</i></b>	Moreloflavona, (+)- volkensiflavona, 4'''-metoxil- Amentoflavona	Inhibidores de la actividad de la enzima tirosinasa	On et al., 2016.



## **El proceso de oxidación, radicales libres, especies reactivas, estrés oxidativo, antioxidantes, una breve explicación.**

El oxígeno, presente en el aire que nos rodea se encuentra en su forma diatómica, este gas es de vital importancia para muchos seres vivos debido a que con él producimos energía de forma eficiente, sin embargo, el oxígeno es tóxico, incluso para los seres aerobios los que sobreviven gracias a que han desarrollado defensas antioxidantes (Halliwell et al., 2015).

Se sabe que el oxígeno que es procesado durante la respiración no se aprovecha al 100 %. Incluso, se ha visto que, en muchos procesos biológicos, los seres vivos quedan afectados, sobretodo, cuando los organismos se encuentran expuestos a condiciones de hiperoxia o cuando el oxígeno es administrado a alta presión, esto debido a la producción de radicales libres de oxígeno que desactivan a las enzimas que catalizan estos procesos, de hecho, se sabe que el oxígeno es un radical libre. Partiendo del hecho de que un radical libre es una sustancia que existe de forma independiente y tiene uno o más electrones desapareados que ocupan un orbital atómico o molecular; en la molécula de oxígeno hay dos electrones desapareados que se encuentran en dos orbitales pi de antienlace ( $\pi^*$ ). Esto hace que el oxígeno reaccione preferentemente con sustancias que son radicales libres, por fortuna muchas sustancias presentes en los sistemas biológicos no son radicales libres por lo que la oxidación en las biomoléculas se lleva a cabo lentamente (Halliwell et al., 2015).

Existen muchos radicales libres en los sistemas biológicos, por ejemplo, los que están formados por átomos de oxígeno que comúnmente se conocen como especies reactivas de oxígeno (ERO), sin embargo, no todas los radicales libres se consideran especies reactivas debido a que algunos radicales libres son selectivos en sus reacciones con moléculas biológicas y por lo tanto, no reaccionan con la mayoría de ellas, además, el término especies reactivas toma en cuenta a moléculas que no son radicales libres y que reacciona fácilmente con moléculas biológicas lo que contribuye al proceso de oxidación. También existen especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas de sulfuro (ERS) y





especies reactivas de halógenos (ERC y ERB); la reactividad de los radicales libres y de las especies reactivas varía extensamente (Halliwell et al., 2015).

El oxígeno es una molécula dañina, los aerobios han sobrevivido gracias a que, poseen defensas antioxidantes (superóxido dismutasa SOD, superóxido reductasa, glutatión reducido, proteínas disulfuro isomerasas, peroxiredoxinas entre otras), estas sustancias también se pueden adquirir de forma externa, por ejemplo, por medio de la dieta (vitamina E, carotenoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos). **Un antioxidante es una sustancia que retrasa, previene o repara el daño producido por los procesos de oxidación.** Los antioxidantes reaccionan con diferentes especies reactivas a diferentes velocidades y por mecanismos distintos tales como remoción de forma catalítica de los radicales libres, regulación en la producción de especies reactivas, protección de las biomoléculas ante el ataque de los radicales libres, desactivación de las especies reactivas, remplazo de los sustratos sensibles a la oxidación por moléculas más resistentes y compartimentalización. Los niveles de defensas antioxidantes difieren en cada tejido, incluso, en cada célula, normalmente aumentan cuando se ha incrementado la cantidad de especies reactivas (Halliwell et al., 2015).

En organismos aerobios sanos, los sistemas de antioxidantes se encuentran casi en equilibrio con las especies reactivas (radicales libres), el balance nunca es perfecto, esto se debe a lo siguiente: las especies reactivas se generan de forma continua y algunas reaccionan fácilmente con cualquier sustrato, por lo que resulta prácticamente imposible detenerlos, el tener un exceso de defensas antioxidantes tendría un gran costo energético, además, muchas especies reactivas cumplen funciones importantes en los sistemas biológicos, lo importante aquí es que se desarrollen defensas antioxidantes suficientes para minimizar el efecto oxidativo a la vez que se siga desarrollando dicha función. El daño producido por los procesos de oxidación casi siempre tiende a la reparación (Halliwell et al., 2015).

¿Qué sucede cuando se pierde el equilibrio entre antioxidantes y especies reactivas y este se encuentra a favor de las especies reactivas? Cuando se pierde dicho equilibrio y las especies reactivas se encuentran en una cantidad mucho



mayor a la de los antioxidantes, los organismos se encuentran en un estado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede deberse básicamente a dos cosas, a que hay una cantidad insuficiente de antioxidantes para neutralizar a los radicales y por lo tanto, haya una gran cantidad de agentes oxidantes o bien, a fallas en el sistema de reparación y remplazo de biomoléculas afectadas (Halliwell et al., 2015).

Generalmente el estrés oxidativo tiene consecuencias, la severidad de éstas está relacionada con las células o el tejido afectado, con la intensidad del estrés oxidativo y con el tiempo transcurrido bajo esta condición. A continuación, se presenta una descripción breve de estas consecuencias: **proliferación celular** que ocurre cuando las células crecen, sin embargo, si el crecimiento es descontrolado, se presentan enfermedades como aterosclerosis, cáncer, artritis reumatoide o fibrosis; **adaptación**, que se presenta cuando se genera una mayor cantidad de antioxidantes debido al aumento leve o moderado en la cantidad de especies reactivas. El fenómeno de adaptación se puede presentar también por el remplazo de ciertas biomoléculas a otras más resistentes; **daño celular** que se presenta debido a un estímulo físico o químico en exceso o en deficiencia que altera la homeostasis de las células de forma temporal o permanente; mientras el daño celular está presente, las células se encuentran en un estado redox alterado sin llegar a la muerte celular, en este caso la comunicación intercelular también puede quedar afectada; **envejecimiento**, cuando las células sobreviven pero ya no se dividen y en casos severos de estrés oxidativo, se presenta la **muerte celular** que puede darse por necrosis que ocurre cuando la célula y los organelos se hinchan, se pierde la integridad de las mitocondrias, se rompe la membrana plasmática y se libera el contenido de las células lo cual, es capaz de dañar a las células vecinas, o bien por apoptosis en donde la célula se mata a sí misma, aquí la célula no libera su contenido pero se pueden liberar peróxidos que dañan a las células de los alrededores; la muerte celular se puede dar también por una combinación de ambos mecanismos (Halliwell et al., 2015).



### **Regulación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa: implicaciones en el tratamiento de trastornos neurológicos.**

La acetilcolinesterasa es una enzima del grupo de las colinesterasas que se encarga de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor que participa en la transmisión de impulsos nerviosos. Cuando este neurotransmisor se hidroliza, deja de cumplir su función y esto hace que se interrumpan la transición de señales eléctricas. El papel de la enzima es de gran importancia debido a que durante la transmisión de los mensajes por parte de los neurotransmisores, siempre existen moléculas que no logran cruzar la barrera sináptica y al ser hidrolizadas pueden ser aprovechados, en parte, para sintetizar nuevamente al neurotransmisor (Rozenzweig et al., 1992). Sin embargo, en algunas enfermedades, la enzima está sobre estimulada o bien, las neuronas comienzan a morir y existen problemas con su reproducción (Khatoon et al. 2018).

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia. Se estima que en el mundo hay alrededor de 25 millones de personas que la padecen, esta es una enfermedad neurodegenerativa, la más común de todas, que afecta la memoria y a las habilidades cognitivas lo que finalmente tiene repercusiones en la vida cotidiana de los pacientes. Como todas las enfermedades neurodegenerativas, esta enfermedad, no tiene cura y comienza por aparecer con síntomas que tienen poca o ninguna relevancia (un síntoma característico de las primeras etapas es la pérdida de la memoria a corto plazo) pero con el transcurso del tiempo, la enfermedad avanza y los síntomas son cada vez más severos, como en todas las enfermedades neurodegenerativas, en la última etapa, los pacientes terminan dependiendo totalmente de los cuidadores. Los medicamentos aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) para el tratamiento del Alzheimer, donepezil, galantamina, que ha sido aislada de *Lycoris radiata*, *Galanthus nivalis* y *Narcissus spp*, tacrina, huperzina A, un compuesto aislado de *Huperzia serrata*, y rivastigmina, inhiben la actividad de la enzima acetilcolinesterasa o incrementan el nivel de acetilcolina mientras que el N-metil-D-aspartato (NMDA), la memantina, es un receptor antagonista utilizado en los casos moderados y severos de la enfermedad que bloquea la sobrestimulación de los



receptores por glutamato regula la actividad del glutamato lo cual podría llevar a la excitotoxicidad en el Alzheimer. Sin embargo, el problema con estos medicamentos es que tienen efectos secundarios tales como diversos trastornos gastrointestinales por lo que existe la necesidad de buscar nuevos agentes terapéuticos que sean eficaces y menos tóxicos. Los investigadores están tratando de encontrar los medicamentos adecuados para prevenir la degeneración de las células cerebrales o al menos, disminuir de forma significativa su degeneración (Alzheimer's Association, Khatoon et al., 2018).

Aunque no se conocen las causas exactas de la enfermedad, se han propuesto cuatro hipótesis principales en donde la causa se asocia con la formación de las placas  $\beta$ -amiloide, con problemas en el sistema colinérgico, en el sistema glutamatérgico y con el estrés oxidativo. A continuación, se describen brevemente estas hipótesis:

- 1) Hipótesis de la cascada amiloide: Esta hipótesis plantea que la deposición de los péptidos  $\beta$ -amiloide es de los primeros signos patológicos, esto lleva a la formación de las placas  $\beta$ -amiloide, al desarrollo de nudos neurofibrilares, a la muerte de neuronas y a la demencia (Katoon et al., 2018).
- 2) Hipótesis colinérgica: Esta hipótesis plantea que la atenuación presináptica encontrada en los cerebros de las personas con Alzheimer está relacionada con el rol de la acetilcolina y el comportamiento de los sujetos. En esta hipótesis se plantea que los fármacos colinomiméticos podrían contribuir a la mejora de las funciones cognitivas (Katoon et al., 2018).
- 3) Hipótesis del estrés oxidativo: Se ha visto que los cerebros de las personas con Alzheimer se encuentran bajo estrés oxidativo acrecentado, esto podría relacionarse con la degeneración neuronal. Aquí se plantea que los radicales libres reactivos son peligrosos y producen una serie de eventos que llevar a la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Con respecto a esta idea, se han buscado fármacos que puedan remover a los radicales libres o al menos, controlar su producción (Katoon et al 2018).



- 4) Hipótesis glutamatérgica: La pérdida de las funciones glutamatérgicas podría estar relacionada con el aumento del estrés oxidativo asociado con la acumulación de los péptidos  $\beta$ -amiloide. Se han buscado agentes terapéuticos que pudieran traer mejoras en el sistema glutamatérgico (Katoon et al., 2018).

Por su parte, la enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población humana, los pacientes que padecen esta enfermedad presentan síntomas como temblor en las manos, rigidez, sensación privada del equilibrio y debilidad en el sistema nervioso central. La enfermedad de Parkinson se asocia con los bajos niveles de los neurotransmisores dopamina y acetilcolina, involucra varios mecanismos que llevan a manifestaciones fisiológicas tales como disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, formación de agregados proteínicos, neuroinflamación, apoptosis, exitotoxicidad y pérdida de los factores tróficos. Al tomar en cuenta estos factores, se pueden encontrar moléculas que sean útiles en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Khatoon et al., 2018).

La regulación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa que se encuentra en las neuronas así como la que se encuentra en las conexiones sinápticas tiene un rol importante en el tratamiento de trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, miastenia gravis y en el envenenamiento por insecticidas organofosforados (Kumar et al., 2017).

Se han realizado estudios con derivados semisintéticos obtenidos a partir de la (-)-fisostigmina (conocida como eserina), un alcaloide de origen natural que se usa como control positivo en los ensayos de este tipo. En este estudio se evaluó el efecto inhibitorio de la enzima; los compuestos que fueron evaluados fueron la (+)-fisostigmina, la (+)-eserolina, la (-)-eserolina, la (-)-dihidrosecofisostigmina y la N-metilfisostigmina. Los resultados obtenidos en este estudio revelan que la (-)-fisostigmina es uno de los compuestos más activos. Para la (+)-fisostigmina, el enantiómero del compuesto natural, se observó una disminución significativa en su actividad. Las (+) y (-) eserolina tuvieron una actividad mucho menor que la del



alcaloide. La (-)-dihidrofisostigmina fue un poco menos activa que la eserina. Sin embargo, la N-metilfisostigmina fue más activa que la eserina. El aumento en la actividad de esta última se puede deber a factores estéricos o bien, a una mayor lipofiliidad. Como conclusión, se puede afirmar que la actividad de los derivados de (-)-fisostigmina se debe a factores estéricos (Brossi et al., 1986).

Existen muchos reportes en donde se ha evaluado la capacidad para inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, tanto extractos de plantas como productos naturales tales como terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides, lignanos, witenolidas y cumarinas, aislados de plantas medicinales, muchas de ellas, utilizadas para mejorar la memoria, para el tratamiento de algunos problemas cognitivos y desordenes psiconeurológicos. De acuerdo a lo que se ha observado, se han obtenido buenos resultados en la mayoría de los casos, sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para describir de forma explícita el mecanismo de acción, investigar la calidad, seguridad y eficacia de los productos naturales y descubrir el mecanismo detrás de los efectos sinérgicos de estos compuestos (Khatoon et al. 2018).

Se han estudiado los extractos acuoso y metanólico de *Selaginella delicatula* los cuales han reducido la actividad endógena de la acetilcolinesterasa en las especies de *Drosophila melanogaster* y atenuado el aumento en la actividad de la enzima, efecto que fue inducido por la rotenona. Los resultados obtenidos fueron similares a los que se presentaron con ratones y larvas de *D. melanogaster* (Girish et al., 2014).

A pesar de las pruebas que se han realizado con diversos agentes con actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa, continúa la posibilidad de evaluar nuevas actividades mediante las que se puedan encontrar nuevos agentes terapéuticos más efectivos, dirigidos principalmente, a la regulación de la actividad de esta enzima (Kumar et al., 2017).



### 3) **INSTRUMENTOS Y MATERIALES.**

Separación y análisis cromatográfico cualitativo por Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía en Placa Preparativa (CCFP) y Cromatografía en Columna Abierta (CCA).

Para las separaciones por cromatografía en columna abierta de Sephadex se utilizó como adsorbente Sephadex LH-20 (tamaño de partícula 20-100  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) mientras que para la columna de sílice se utilizó como adsorbente gel de sílice (tamaño de partícula 0.063-0.200, Kieselgel 60 Merck), utilizando metanol, acetona, acetato de etilo y hexano previamente destilados como disolventes para la fase móvil. Para las separaciones realizadas por Cromatografía en Placa Preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20 X 20 cm cubiertas por gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck) de 1 mm de grosor y como fase móvil se utilizaron sistemas de elución tales como hexano-AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH en distintas proporciones. Para el análisis cualitativo de las fracciones obtenidas por Cromatografía en Capa Fina fueron utilizados cromatofolios de aluminio cubiertos por una capa de gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Macherey-Nagel) con 0.2 mm de grosor, como fase móvil se utilizaron diversos sistemas de elución; como agente revelador fue utilizada una disolución de sulfato cérico amoniacal [(NH<sub>4</sub>)Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O] con 1% de ácido sulfúrico 2N.

Los análisis espectroscópicos fueron realizados en las instalaciones de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII). Con el fin de obtener información respecto a la composición química del sólido que precipitó en la extracción, se obtuvo un espectro de IR por reflectancia, para esto se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum RX 1 FTIR. Para determinar la estructura de los compuestos aislados se obtuvieron espectros de Resonancia Magnética Nuclear en primera y segunda dimensión, para los espectros de protón de 400 MHz se utilizó un espectrómetro Varian Unity Inova, para los de RMN-<sup>1</sup>H de 600 MHz se utilizó un espectrómetro marca JEOL, modelo JMN-ECZ600R y para los de RMN-<sup>13</sup>C y segunda dimensión se utilizó un espectrometro marca Varian, modelo VNNRS. Las muestras fueron disueltas en acetona deuterada CD<sub>3</sub>OCD<sub>3</sub> y como referencia interna se utilizó TMS.



#### 4) JUSTIFICACIÓN.

Resulta de importancia realizar el estudio con las plantas de las que no se tiene información acerca de su composición química y se utilizan en medicina tradicional, debido a que se consideran una fuente potencial para el desarrollo de medicamentos y productos útiles, como es el caso de la especie *Selaginella stellata*, la cual se recomienda en medicina tradicional para el tratamiento de la epilepsia y como ansiolítico.

Por otra parte, resulta relevante contribuir al conocimiento de la composición química de las plantas del género *Selaginella* ya que, aparte de tener más información del perfil químico de estas plantas, muchos de los compuestos que se han aislado de ellas, han presentado actividades biológicas importantes, por ejemplo, actividad citotóxica, actividad antibacteriana, actividad antiprotozoaria entre otras.

También resulta interesante obtener información acerca de la actividad antioxidante de la planta debido a que el proceso de oxidación es un detonante de muchas enfermedades de importancia y de gran impacto que afectan, en especial, a la población de edad avanzada. Esta propiedad se ha reportado en los extractos de mayor polaridad en otras especies del género *Selaginella*.





### 5) **OBJETIVO GENERAL.**

Realizar un estudio fitoquímico para obtener información con respecto al contenido de biflavonoides en la especie *Selaginella stellata* Spring, así como evaluar la capacidad antioxidante del extracto total y la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos, fracciones y compuestos aislados con el fin de obtener información respecto a su posible actividad neuroprotectora.

### 6) **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Obtener información bibliográfica acerca de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los compuestos presentes en las especies del género *Selaginella* los cuales pudieran ser encontrados en esta planta.
- Realizar el fraccionamiento por reparto del extracto total y a partir de la fracción de acetato de etilo, aislar a los biflavonoides mayoritarios.
- Determinar la estructura de los compuestos aislados por medio de experimentos de Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones.
- Obtener información acerca del contenido de flavonoides y de compuestos fenólicos presentes en el extracto total, así como evaluar la capacidad antioxidante del extracto por medio del atrapamiento del radical DPPH.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos, fracciones y compuestos aislados.
- Contribuir a la información de la composición química de especies del género *Selaginella*.

### 7) **HIPÓTESIS.**

De acuerdo con lo que está reportado en la literatura científica, mediante de un estudio químico de esta especie, es posible aislar principalmente biflavonoides, sin embargo, también será posible encontrar flavonoides, lignanos, compuestos fenólicos, alcaloides y glicósidos. De acuerdo a múltiples estudios químicos con otras especies de salaginelas, los biflavonoides se podrán encontrar mayormente en el extracto de acetato de etilo. Es posible que el extracto presente actividad antioxidante y que pueda inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, esto se puede



atribuir, principalmente, a los compuestos que se encuentran en los extractos de mayor polaridad. En la literatura no existe algún reporte en donde se haya evaluado la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los biflavonoides.



## 8) METODOLOGÍA.

### Material vegetal.

*Selaginella stellata* fue colectada en la región de Ocozotepec en el estado de Veracruz, México, el 8 de junio de 2018 por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez y fue identificada por el M. en C. Alberto Reyes García. Un ejemplar de la planta se encuentra depositado en el Herbario FEZA con el número de colecta 1894.

#### I) Tratamiento previo a la extracción.

Las partes aéreas de la planta fueron desecadas a temperatura ambiente a la sombra; el material se pesó, separó manualmente de materia extraña y se pulverizó con una licuadora doméstica.

#### II) Extracción del material vegetal.

La extracción se realizó por el método de maceración; la planta pulverizada se colocó en un matraz bola de 4 L al que se le agregaron 2 L de una mezcla formada por  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 1:1, y así permaneció durante 10 días. El extracto se concentró por destilación a presión reducida con un rotavapor. Este procedimiento se repitió cuatro veces para obtener al extracto total.

#### III) Separación preliminar de biflavonoides

Durante el proceso de extracción se formó un sólido de color amarillo claro (20.2 mg) el cual fue recuperado y pesado, se determinó su punto de fusión y se analizó por cromatografía en capa fina utilizando como eluyente  $\text{CHCl}_3$ -MeOH en diferentes proporciones. Por otra parte, se obtuvo un espectro en el IR para obtener información acerca de su composición. El sólido fue separado en sus constituyentes por cromatografía por placa preparativa (CPP) de sílica gel, como eluyente se utilizó una disolución de hexano-AcOEt 2:8 y fue analizado por RMN- $^1\text{H}$ . Se identificó el **compuesto 1**, (8.5 mg).



#### IV) Fraccionamiento del extracto total.

##### 1) Fraccionamiento por partición líquido-líquido.

El extracto total fue resuspendido en una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2), y fraccionado por reparto líquido-líquido sucesivamente con hexano y AcOEt. Se obtuvieron tres fracciones: fase de hexano, de AcOEt y la fase acuosa remanente; la fase de AcOEt fue concentrada por destilación a presión reducida y posteriormente fue pesada.

La fracción remanente que se obtuvo en el reparto con MeOH-H<sub>2</sub>O fue analizada por medio de espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H con el objetivo de visualizar señales correspondientes a las de trehalosa.

##### 2) Aislamiento de Biflavonoides.

El extracto de AcOEt fue separado en sus componentes mediante cromatografía en columna abierta de Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como eluyente. Se obtuvieron 48 fracciones primarias que se reunieron en 12 de acuerdo a su similitud en su perfil cromatográfico observado por CCF.

Las fracciones 8 a 11 obtenidas en la columna de Sephadex fueron separadas por medio de cromatografía en columna abierta de sílica gel 60 empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt de polaridad ascendente. De esta separación se obtuvieron 84 fracciones (C1-C84) las cuales fueron reunidas de acuerdo con su perfil cromatográfico observado por CCF.

Las fracciones C18 a C21 fueron reunidas y después separadas en sus componentes por cromatografía en placa preparativa (CPP) de sílica gel 60 empleando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt en proporción 6:4. Las fracciones que se generaron fueron analizadas por RMN-<sup>1</sup>H.

Posteriormente se reunieron las fracciones C-25 a C-32, luego fueron separadas por medio de una columna cromatográfica abierta de Sephadex LH-20. Como eluyentes se utilizaron sucesivamente metanol y acetona. Se obtuvieron 15



fracciones que después de ser reunidas por su similitud cromatográfica por CCF, se obtuvo un total de 9 fracciones (E1-E9).

Las fracciones E-3, E-4-5 y E-6 fueron reunidas y posteriormente separadas en sus componentes mediante CPP de sílica gel, empleando como eluyente una disolución formada por hexano–AcOEt 2:8. Las fracciones que se generaron fueron analizadas por RMN-<sup>1</sup>H. Se aisló el **compuesto 2**, (5.8 mg).

Las fracciones E-7-8 y E-9-10 fueron separadas en sus componentes de manera independiente por medio de CPP formadas por sílica gel, como eluyente se utilizó una disolución formada por hexano–AcOEt 2:8. Las fracciones que se obtuvieron fueron analizadas por RMN-<sup>1</sup>H de 400 MHz. De las fracciones E-7-8 se aisló el compuesto 2, (7.1 mg). De las fracciones 9-10 se aisló el **compuesto 3**, (4.7 mg).

Las fracciones C-42 a C-74 fueron reunidas ya que presentaron un perfil cromatográfico similar en CCF. Al reunirse, se observó la precipitación de un sólido que fue insoluble en MeOH y acetona el cual fue separado por filtración. Las aguas madre se concentraron y fueron separadas en sus componentes por CPP de sílica, empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–acetona 6:4. Las fracciones que se generaron fueron analizadas por espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H, en ellas se logró identificar a dos compuestos, sin embargo, no fue posible realizar la determinación de su estructura.



**Determinación de la actividad antioxidante del extracto total de *Selaginella stellata* por: Atrapamiento del radical DPPH, determinación del contenido de fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu y determinación del contenido de flavonoides con quercetina.**

Las siguientes pruebas fueron realizadas con el extracto total de la planta.

**Determinación de la actividad antioxidante por atrapamiento del radical DPPH.**

- Preparación de la curva de calibración con Trolox® para DPPH.

La metodología de esta prueba se realizó con base en lo descrito en la literatura (Cheng et. al.) con algunas modificaciones, en una placa de 96 pozos con una capacidad de 200 µL. Para esto se obtuvo una curva de calibración que fue preparada con 6 disoluciones de Trolox® en un rango de concentraciones de 2 µM a 125 µM que fueron preparadas a partir de una disolución madre con concentración de 500 µM, en MeOH. Por otra parte, se preparó una disolución del radical DPPH con una concentración de 2 mM en metanol. Las diferentes disoluciones de Trolox fueron adicionadas en cada pozo de la placa y posteriormente se adicionaron a cada pozo las disoluciones del radical DPPH y la cantidad necesaria de MeOH a completar a 200 µL. La placa se mantuvo bajo la oscuridad para evitar su descomposición. Después de 2 h, las absorbancias fueron determinadas en un lector de placas de ELISA a 517 nm. Como blanco se utilizó MeOH. Finalmente, el porcentaje de inhibición fue determinado por medio de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}}$$

- Determinación de la actividad antioxidante del extracto total por atrapamiento del radical DPPH.

Las diluciones fueron preparadas en placas de 96 pozos con una capacidad de 200 µL cada una. Se prepararon 8 diluciones del extracto, estas fueron preparadas a partir de una disolución del extracto total con una concentración de 500 ppm, posteriormente, fue adicionada la disolución del radical DPPH y la cantidad



necesaria de MeOH para obtener un volumen de 200  $\mu\text{L}$ .. Las diluciones permanecieron en la oscuridad durante 30 minutos mientras se llevaba a cabo la reacción. Como blanco se utilizó MeOH. Se realizó la lectura de las placas en el espectrofotómetro a 517 nm. Finalmente, se determinó el porcentaje de inhibición del radical por medio de la misma ecuación para la curva.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}}$$

### **Estimación del contenido de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.**

- Preparación de la curva de calibración con ácido gálico.

Se obtuvo una curva de calibración con una disolución acuosa de ácido gálico en un rango de concentraciones de 0.5 a 200 ppm y otra de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en agua con una concentración de 8% m/v. Por otra parte, fue preparada la disolución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu a una concentración de 2.0 N. En una placa de 96 pozos con capacidad de 200  $\mu\text{L}$  se adicionaron en cada pozo las diluciones de ácido gálico, la disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu y 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La placa se mantuvo en la oscuridad durante 60 minutos, a 25°C, esto para que se lleve a cabo la reacción. Las lecturas de absorbancia fueron obtenidas a 670 nm. Finalmente se calculó el contenido de fenoles por medio de la ecuación siguiente. El contenido de fenoles se expresó como eq. AG/ g de extracto.

$$\text{Abs. de la muestra} = \text{Abs. obtenida} - \text{Abs. blanco}$$

- Determinación del contenido de fenoles en el extracto total por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu a una concentración de 1000 ppm.

Se prepararon ocho diluciones a partir de una disolución del extracto total con una concentración de 500 ppm. Posteriormente, se adicionó la disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu y 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , las diluciones permanecieron en la oscuridad durante 60 minutos, a 25°C con el fin de llevar a cabo la reacción. Las lecturas de las placas se realizaron a 670 nm. Se determinó



el contenido de fenoles por medio de la misma ecuación que se utilizó para la curva, los resultados fueron expresados en eq AG/ g de extracto.

$$\text{Abs. de la muestra} = \text{Abs. obtenida} - \text{Abs. blanco}$$

### **Estimación del contenido de flavonoides totales por el método de Kamazawa.**

- Preparación de la curva de calibración de quercetina y  $\text{AlCl}_3$ .

El contenido de flavonoides en el extracto total se obtuvo al reaccionar a las diluciones preparadas con una disolución de  $\text{AlCl}_3$ . Para esto, se obtuvo una curva de calibración con quercetina y  $\text{AlCl}_3$ , las diluciones utilizadas para generar la curva de calibración y las diluciones del extracto fueron preparadas en placas de 96 pozos con una capacidad de 200  $\mu\text{L}$ . Para obtener la curva se prepararon diluciones etanólicas de quercetina en un rango de concentraciones de 0.4 a 25 ppm a partir de una disolución con una concentración de 200 ppm. Fue preparada una disolución de  $\text{AlCl}_3$  con una concentración de 2% m/v. Las diluciones para la curva de calibración se prepararon al adicionar la disolución de  $\text{AlCl}_3$  a las diluciones de quercetina y completar cada pozo con la cantidad necesaria de EtOH; las placas se mantuvieron en la oscuridad durante un periodo de 15 minutos mientras transcurría la reacción. Se midió la absorbancia a 420 nm. El contenido de flavonoides se determinó con la siguiente ecuación y fue expresado en  $\mu\text{g}$  eq. de quercetina/ g de extracto.

$$\text{Abs. disoln.} = \text{Abs. obtenida} - \text{Abs. blanco}$$

- Determinación del contenido de flavonoides en el extracto total.

Se prepararon 8 diluciones del extracto total a partir de una disolución con una concentración de 200 ppm. Se les adicionó la disolución de  $\text{AlCl}_3$  y permanecieron en la oscuridad durante 15 minutos mientras se llevaba a cabo la reacción. En seguida, se leyó la absorbancia a 420 nm. El contenido de flavonoides fue determinado con la misma ecuación que se utilizó para la curva de calibración; los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  eq. quercetina/ g de extracto.





$$Abs. disoln. = Abs. obtenida - Abs. blanco$$

### **Determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos, fracciones y compuestos aislados.**

El ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa se realizó en una placa de 96 pozos, cada uno de ellos fue rotulado con letras que iban de la A a la H por cada fila mientras que, a los pozos de cada columna se les asignaron números del 1 al 12. Para esta prueba se prepararon 500 mL de un buffer de fosfatos a pH 8, compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaCl}$ . Posteriormente, se tomaron 100 mL del buffer de fosfatos al que se le adicionó acetonitrilo para obtener una disolución al 2%. La disolución resultante fue adicionada a los pozos 1A-1D. Después, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de las muestras, disueltas en  $\text{MeOH}$ , en los pozos 1E-1H, 2A-4H y 8E-11H. Luego fueron adicionados 50  $\mu\text{L}$  del buffer de fosfatos a todos los pozos. Después, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de una dilución de la enzima acetilcolinesterasa obtenida de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*), marca SIGMA, en los pozos de las filas B-G, a una concentración 0.195 U/mL disuelta en buffer salino de fosfatos. Las disoluciones en las placas se mantuvieron en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para que la reacción comenzara, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución que contenía al sustrato (acetilcolina) formada por el buffer de fosfatos, una dilución de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzónico) y una dilución de yoduro de acetilcolina. La placa fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación, protegiéndola de la luz. Finalmente, la absorbancia fue leída a 412 nm inmediatamente después del tiempo transcurrido.



## 9) RESULTADOS.

El presente trabajo se llevó a cabo dentro de un proyecto de análisis químico de especies del género *Selaginella* con uso en la medicina popular. *Selaginella stellata* no corresponde como otras especies de *Selaginella*, a las “doradillas”, plantas comunes en la parte centro de la República Mexicana caracterizadas por ser plantas adheridas al suelo con características poiquilohídricas, que en ausencia de agua se enroscan formando una roseta de color dorado y con la humedad extienden sus ramas. En contraste, *S. stellata* es una especie con tallos erguidos y delgados que no forma roseta en ausencia de agua.

En el estudio químico de *S. stellata* se aislaron los biflavonoides 7-O-metil-2'',3''-dihidro-isocriptomerina (1) del que se obtuvieron 8.5 mg, amentoflavona (2) del que se aislaron 12.9 mg y 2'',3''-dihidro-amentoflavona (3) del que se pesaron 4.7 mg (Figura 2).

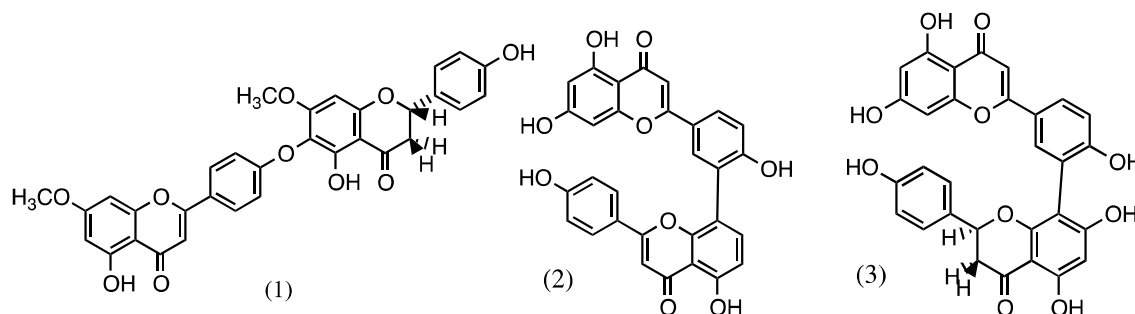


Figura 2: Estructuras de los compuestos aislados: 7-O-metiléter 2'',3''-dihidroisocriptomerina, amentoflavona, 2'',3''-dihidroamentoflavona.

### Extracción

Se obtuvieron 21.0 g (10 %) de extracto total de *S. stellata* del cual precipitaron 20.2 mg de un sólido amarillento, se observó que el sólido no presentó punto de fusión. Al ser analizado por cromatografía en capa fina se observó que era una mezcla formada por al menos cinco componentes en donde predominaban tres de ellos.



Fraccionamiento del extracto total.

Al evaluar por medio de RMN-1H la fracción remanente formado por MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2 no se observaron señales correspondientes a las de la trehalosa

**Resultados del espectro de Infrarrojo obtenido del precipitado formado durante la extracción.**

IR, FTIR por reflectancia ATR ( $\nu_{\text{máx}} = \text{cm}^{-1}$ ): 800, 833, 884, 1030, 1059, 1070, 1021, 1127, 1170, 1197, 1219, 1244, 12778, 1301, 1356, 1438, 1452, 1495, 1512, 157, 1607, 1645, 1734, 2849, 2917, 3061, 3284.

**Elucidación de la estructura de los compuestos aislados.**

**Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SSFB1C (Compuesto 1, 7-O-metil-2'',3''-dihidroisocriptomerina).**

RMN-<sup>1</sup>H 600 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta = \text{ppm}$ ): 2.83 (s, 1H, H-3''a), 3.31 (s, 1H, H-3''b), 3.85 (s, 3H, H-OCH<sub>3</sub>, 7), 3.96 (s, 3H, H-OCH<sub>3</sub> 7''), 5.55 (dd, J = 12.96, 2.88, 2.94 Hz, H-2''), 6.07 (d, 2H, J = 2.34, H-6, 8), 6.76 (s 1H, H-3), 6.97 (d, 2H, J = 8.76 Hz, H-3''' y 5'''), 7.02 (s, 1H, H-8''), 7.06 (d, 2H, J = 8.7, H-3' y 5'), 7.49 (d, 2H, J = 8.7, H-2'' y 6'''), 8.02 (d, 2H, J = 8.88 Hz, H-2' y 6'), 12.14 (s, 1H, H-OH 5), 13.10 (s, 1H, H-OH 5'').

RMN-<sup>13</sup>C, 100 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta = \text{ppm}$ ): 42.6 C-3'', 55.4 C-OCH<sub>3</sub> 7, 56.3 C-OCH<sub>3</sub> 7'', 79.0 C-2'', 91.5 C-8'', 93.8 C-8, 94.7 C-6, 103.2 C-3, 105.8 C-10, 114.9 C-3''' y 5''', 116.1 C-3' y 5', 122.3 C-6'', 126.2 C-10'', 128.1 C-2'' y 6''', 128.6 C-2' y 6', 132.3 C-1''', 153.6 C-6'', 154.6 C-9'', 158.7 C-4'', 159.1 C-7'', 161.4 C-4', 163.3 C-9, 164.2 C-5, 164.8 C-2, 168.1 C-7, 182.7 C-4, 196.7 C-4''.

Correlaciones observadas en COSY del compuesto presente en la fracción SSFB1C.

COSY ( $\delta = \text{ppm}$ ): H-3' y 5'/ H-2' y 6' (8.02: 7.06), H-2'' y 6'''/ H-3''' y 5''' (7.49: 6.97), H-2''/ H-3''b (5.55: 3.31), H-2''/ H-3''a (5.55: 2.83), H-3''b/ H-3''a (3.31: 2.83).

Correlaciones observadas en HSQC del compuesto presente en la fracción SSFB1C.



HSQC ( $\delta$  = ppm): H-3''a y H-3''b/ C-3'' (42.6: 3.31, 2.83), OCH<sub>3</sub> de C-7 (55.4: 3.85), OCH<sub>3</sub> de C-7'' (56.3:3.96), H-2''/ C-2'' (79.0: 5.55), H-8''/ C-8'' (91.5: 7.02), H-8/ C-8 (93.8: 6.07), H-6/ C-6 (94.7: 6.07), H-3/ C-3 (103.2: 6.76), H-3''' y 5'''/ C-3''' y 5''' (114.9: 6.97), H-3' y H-5'/ C-3' y 5' (116.1: 7.06), C-2''' y 6''' (128.1: 7.49), C-2' y C-3' (128.6: 8.02).

Correlaciones observadas en HMBC del compuesto presente en la fracción SSFB1C.

HMBC ( $\delta$  = ppm): H-2''', H-6''', H-3''b/ C-2'' (7.49, 3.31: 79.0), H-8/ C-6 (6.07: 94.7), H-3/ C-10 (6.76: 105.8), H-3''' y 5'''/ C-3''' y 5''' (6.97: 114.9), H-3' y 5'/ C-3' y 5' (7.06: 116.1), H-3', y 5'/ C-1' (7.06: 122.3), H-8''/ C-10'' (7.02: 126.2), H-2''' y 6'''/ C-2''' y 6''' (7.06: 128.1), H-2' y 3'/ C-2' y 6' (8.02: 128.6), H-3''' y 5'''/ C-1''' (6.97: 132.3), H-8''/ C-10'' (7.02: 154.6), H-2''' y 6'''/ C-4''' (7.49: 158.7), OC-H3 7''/ C-7'' (3.96: 159.1), H-2' y 6'/ C-2 (8.02: 161.4), H-8/ C-9 (6.07: 163.3), H-6/ C-5 (6.07: 164.2), H-3, H-2' y 6' (8.02, 6.76: 164.8), OC-H3 7/ C-7 (3.85: 168.1).

Correlaciones observadas en NOESY del compuesto presente en la fracción SSFB1C.

NOESY ( $\delta$  = ppm): H-2' y 6'/ H-8'' (8.02: 7.02), H-2' y 6'/ H-3 (8.02: 6.76), H-2''' y 6'''/ H-8'' (7.49: 7.02), H-2''' y 6'''/ H-2'', H-3/ OC-H3 7'' (7.02: 3.96). H-8 / OC-H3 7 (6.07: 3.85).

**Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SS1G1C (Compuesto 2, Amentoflavona).**

RMN-<sup>1</sup>H 400 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta$  = ppm): 6.21 (d, 1H, J = 2.08 Hz, H-6), 6.29 (s, 1H, H-6''), 6.41 (d, 1H, J = 2.12 Hz, H-8), 6.58 (s, 1H, H-3''), 6.67 (s, 1H, H-3), 6.74 (d, 2H, J = 8.84 Hz, H-3''' y 5'''), 7.09 (d, 1H, J = 8.64 Hz, H-5'), 7.71 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-2''' y 6'''), 7.91 (dd, 1H, J = 8.76, 2.45, 2.28 Hz), H-6', 8.27 (d, 1H, J = 2.44 Hz), 13.17 (s, 1H, OH-5), 13.18 (s, 1H, OH-5'').

RMN-<sup>13</sup>C 100 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta$  = ppm): 93.9 C-8, 98.7 C-6, 100.8 C-5'', 102.6 C-3 y C-3'', 103.2 C-10'', 104.2 C-10, 105.9 C-8'', 115.6 C-3''' y 5''', 118.4 C-5', 120.1 C-1', 122.5 C-4', 122.6 C-1''', 126.9 C-6', 128.1 C-2''' y C-6''', 131.6 C-2', 155.2 C-9'', 157.9 C-9, 160.7 C-4''', 161.6 C-7'', 162.3 C-5, 162.6 C-4', 163.5 C-2'', 164.0 C-7, 164.8 C-2, 167.6 C-5'', 182.1 C-4, 182.2 C-4''.

Correlaciones observadas en COSY del compuesto presente en la fracción SS1G1C.



COSY ( $\delta = \text{ppm}$ ): H2'-H6' (8.27: 7.91), H2'-H5' (7.91: 7.09), H6'''-H5''' (7.71: 6.74), H6-H8 (6.21: 6.41).

Correlaciones observadas en HSQC del compuesto presente en la fracción SS1G1C.

HSQC ( $\delta = \text{ppm}$ ): C8-H8 (93.9: 6.41), C6-H6 (98.7: 6.21), C5''-H5'' (100.8: 6.29), C3-H3 (102.6: 6.67), C3''-H3'' (102.6: 6.58), C3'''-H3''' (115.6: 6.74), C6'-H6' (126.9: 7.91), C6'''-H6''' (128.1: 7.71), C2'-H2' (131.6: 8.27).

Correlaciones observadas en HMBC del compuesto presente en la fracción SS1G1C.

HMBC ( $\delta = \text{ppm}$ ): C8-H6 (93.9: 6.21), C6-H8 (98.7: 6.41), C10''-H3'' y H5'' (103.2: 6.58, 6.29), C10-C3, C6 y C8 (104.2: 6.67, 6.41, 6.21), C8''-H2' y H6'' (105.9: 8.27, 6.29), C5'''-H3''' (115.6: 6.74), C1'-H3 y H5' (120.1: 6.67, 7.09), C3'-H5' (122.5: 7.09), C1'''-H5''' y H6''' (122.6: 6.74, 7.71), C6'-H2' (126.9: 8.27), C6'''-H2''' (128.1: 7.71), C2'-H6' (131.6: 7.91), C9-H8 (157.9: 6.41), C4'''-H3''' y H2''' (160.7: 7.71, 6.74), C7''-H6'' (161.6: 6.29), C5-H6 (162.3: 6.21), C4'-H2', H5' y H6' (162.6: 8.27, 7.91, 7.09) C2''-H2''' y H3'' (163.5: 7.71, 6.58), C7-H6-H8 (164.0: 6.21, 6.41), C2-H3, H2' y H6' (164.8: 6.67, 8.27, 7.91), C5''-H6'' (167.6: 6.29), C4-H3 (182.1: 6.67), C4''-H3'' (182.2: 6.58).

Correlaciones observadas en NOESY del compuesto presente en la fracción SS1G1C.

NOESY ( $\delta = \text{ppm}$ ): H3-H6' (6.67: 7.91), H5'-H6' (7.09: 7.91), H2'-H3 (8.27: 6.67), H2'-H2''' (8.27: 7.71), H5'''-H6''' (6.74: 7.71), H6'''-H3'' (7.71: 6.58).

**Resultados obtenidos en los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear del compuesto presente en la fracción SS2G2C (Compuesto 3, 2'', 3''-dihidroamentoflavona).**

RMN-<sup>1</sup>H 400 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta = \text{ppm}$ ): 2.67 (d, 1H, J = 3.12 Hz, H-3''a), 3.06 (d, 1H, J = 3.08 Hz, H-3''b), 5.41 (dd, 1H, J = 12.64, J = 3.08 Hz, J = 3.08 Hz, H-2''), 5.93 (s, 1H, H-6''), 6.21 (d, 1H, J = 2.12 Hz, H-6), 6.52 (d, 1H, J = 2.16 Hz, H-8), 6.58 (s, 1H, H-2), 6.89 (d, 2H, J = 8.56, H-3''' y 5'''), 6.97 (d, 1H, J = 8.6, H-5'), 7.40 (d, 2H, J = 8.52, H-2''' y 6'''), 7.76 (dd, 1H, J = 2.44, J = 2.48 Hz, J = 8.62 Hz, H-6), 8.16 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-2'), 13.11 (s, 2H, OH-4 y 4'').

RMN-<sup>13</sup>C 100 MHz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> ( $\delta = \text{ppm}$ ): 42.8 C-2'', 78.5 C-3'', 93.8 C-8, 97.4 C-6'', 98.7 C-6, 100.2 C-10'', 102.4 C-2, 104.3 C-10, 107.9 C-8'', 115.2 C-3'' y 5''', 118.3 C-5', 119.9 C-1', 123.7 C-3', 125.9 C-6', 128.0 C-2''' y 6''', 130.6 C-1''', 131.8



C-2', 157.6 C-4"', 157.9 C9, 162.1 C-5"', 162.1 C-7"', 162.4 C-4', 162.4 C-5, 164.2 C-7, 165.4 C-2, 172.7 C-9"', 182.1 C4, 194.1 C-4''.

Correlaciones observadas en COSY del compuesto presente en la fracción SS2G2C.

COSY ( $\delta$  = ppm): H3''a-H3''b (2.67: 3.06), H3''b-H2'' (3.06: 5.41), H6-H8 (6.21: 6.52), H5'''-H6''' (6.89: 7.34), H5'-H6' (6.97: 7.76), H6'-H2' (6.97: 8.16).

Correlaciones observadas en HSQC del compuesto presente en la fracción SS2G2C.

HSQC ( $\delta$  = ppm): C3''-H3''a y H3''b (42.8: 3.06 y 2.67), C2''-H2'' (78.5: 5.41), C8-H8 (93.8: 6.52), C6''-H6'' (97.4: 5.93), C6-H6 (98.7: 6.21), C3-H3 (102.4: 6.58), C3'''-H3''' (115.2: 6.89), C5'-H5' (118.3: 6.97), C6'-H6'(125.9: 7.76), C2'''-H2''' (128.0: 6.89), C2'-H2' (131.8: 8.16).

Correlaciones observadas en HMBC del compuesto presente en la fracción SS2G2C.

HMBC ( $\delta$  = PPM): C2''-H2''' y H3''b (78.5: 7.40, 5.06), C8-H6 (93.8: 6.21), C6-H8 (98.7: 6.52), C10''-H6'' (100.2: 5.93), C10-H3, H6 y H8 (104.3: 6.52, 6.21, 6.52), C8''-H2' y H6'' (107.9: 8.16, 5.93), C3'''-H2''' (115.2, 6.89), C1'-H3 y H5' (119.9: 6.97, 6.58), C3'-H5' (123.7: 6.97), C6'-H2' (125.9: 8.16), C2'''-C6''' (128.0: 7.40), C1'''-H5''' y H3''b (130.6: 6.88, 3.06), C2'-H6' (131.8: 7.76), C4'''-H5''' y H6''' (157.6: 7.40, 6.89), C9-H8 (157.92: 6.52), C5''-H6'' (162.1: 5.93), C7''-H6'' (162.1: 5.93), C4'-H5' y H6' (162.4: 6.97, 7.76), C5-H6 (162.4: 6.21), C7-H6 y H8 (164.2: 6.52, 6.21), C5-H2', H5' y H6' (165.4: 8.16, 6.97, 7.76), C4-H3 (182.1: 7.76), C4''-H3''a, H3''b y H2'' (194.3: 2.67, 3.06, 5.41).

Correlaciones observadas en el espectro NOESY del compuesto presente en la fracción SS2G2C.

NOESY ( $\delta$  = ppm): H2'-H6' y H2''' (8.16: 7.76, 7.40), H6'-H5' (7.76: 6.9694), H2'''-H3''' (7.40: 6.89), H6-H8 (6.52: 6.21), H2''-H3''b (5.41: 3.06), H3''a-H3''b (3.06: 2.66).



**Resultados de pruebas de actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides totales en el extracto total de *Selaginella stellata*.**

**Determinación de actividad antioxidante por atrapamiento del radical DPPH.**

En la tabla siguiente se muestran las absorbancias que se midieron para obtener una curva de calibración con Trolox® a diferentes concentraciones; se descartaron algunos resultados para una mayor precisión.

Tabla 4: Absorbancias de las disoluciones de Trolox® con DPPH para obtener una curva de calibración concentración vs absorbancia.

	Blanco	Blanco	Conc µM									Control
	-	-	<b>1.95</b>	<b>3.91</b>	<b>7.81</b>	<b>15.63</b>	<b>31.25</b>	<b>62.50</b>	<b>125.00</b>	<b>250.00</b>	<b>500.00</b>	
<b>A</b>	0.439	0.488	-	0.480	0.471	0.449	0.401	0.350	0.120	0.070	0.069	-
<b>B</b>	0.438	0.492	0.494	0.487	0.476	0.450	0.403	0.338	0.118	0.069	0.069	0.040
<b>C</b>	0.453	0.499	0.491	0.482	0.476	0.455	-	0.348	0.122	0.071	0.070	0.040
<b>D</b>	0.449	0.500	0.501	0.489	0.482	-	-	-	-	0.070	0.071	0.041
<b>E</b>	0.437	0.497	0.496	0.491	0.485	0.445	0.401	0.340	0.121	0.071	0.068	0.041
<b>F</b>	0.435	0.489	0.489	0.477	-	-	-	-	-	0.068	-	0.042
<b>G</b>	0.437	0.488	0.475	0.473	0.462	0.440	0.384	0.329	0.118	0.069	0.068	0.040
<b>H</b>	0.420	-	-	0.465	-	0.439	0.381	-	-	0.068	-	0.041

(-) valores fuera de rango.

A continuación, se presenta una tabla que muestra los resultados promedio de las absorbancias para cada dilución de Trolox®.

Tabla 5: Absorbancias promedio vs concentraciones de Trolox® de cada disolución.

Conc.	-	-	1.95	3.91	7.81	15.63	31.25	62.50	125.00	250.00	500.00	
Abs.	0.439	0.493	0.491	0.481	0.475	0.446	0.394	0.341	0.120	0.070	0.069	0.041

En la tabla siguiente, se presentan los porcentajes de inhibición correspondientes a cada dilución, fueron descartados algunos resultados para una mayor precisión.

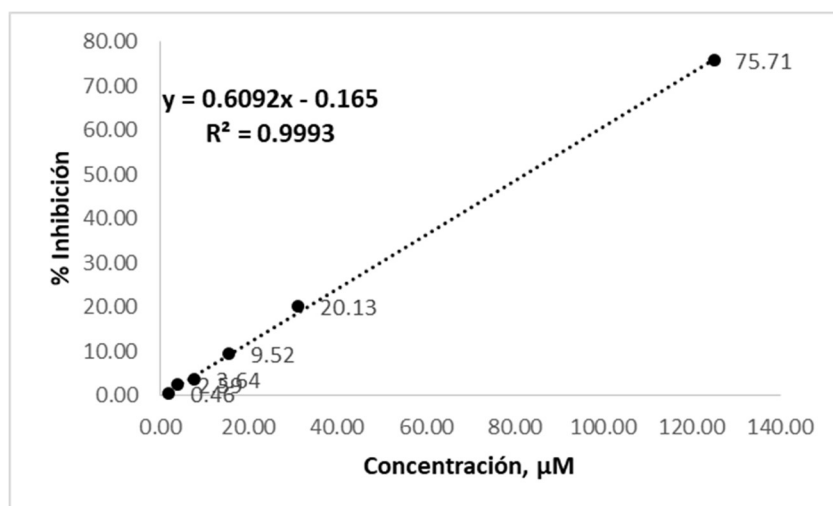
Tabla 6: Concentración de Trolox® vs porcentaje de inhibición del radical DPPH.

<b>Conc. uM</b>	<b>1.95</b>	<b>3.91</b>	<b>7.81</b>	<b>15.63</b>	<b>31.25</b>	-	<b>125.00</b>	-	-
Abs.	0.46	2.59	3.64	9.52	20.13	-	75.71	-	-

(-) valores fuera de rango.



En la gráfica 1 se presenta la curva de calibración.



Gráfica 1: Curva de calibración del porcentaje de inhibición del radical DPPH con una disolución de Trolox®.

Con los resultados de las absorbancias de las diluciones del extracto total se determinó que el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue de 850.86 µmol de Trolox®/ g de extracto lo que corresponde a un porcentaje de inhibición de 56.05%.

### Estimación del contenido de compuestos fenólicos totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu en el extracto total.

A continuación, se presentan los resultados de las absorbancias que se observaron para las diluciones a distintas concentraciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu, algunas absorbancias se descartaron para obtener una curva más precisa.

Tabla 7: Absorbancias a distintas concentraciones de las disoluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

	Blanco	Blanco	Conc.									
			0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
A	0.088	0.075	-	0.083	-	-	-	-	-	0.437	-	1.546
B	0.083	0.077	0.079	-	0.085	0.104	0.131	0.164	0.253	0.431	-	1.566
C	-	0.079	0.081	-	-	0.096	0.124	0.179	0.255	0.463	0.837	1.495
D	0.084	0.075	0.077	0.084	0.092	0.109	-	-	-	-	0.815	1.526
E	-	0.078	0.079	0.083	0.093	0.105	0.121	0.174	0.284	0.459	-	-
F	0.089	-	0.080	0.086	-	-	0.127	-	0.257	0.462	0.860	-
G	0.088	0.078	0.078	0.087	0.092	-	0.128	0.190	0.281	-	0.863	-
H	0.088	0.074	-	0.085	0.091	0.100	0.128	0.181	0.268	0.476	0.835	1.489

(-) valores fuera de rango.





A continuación, se presentan los datos de absorbancia promedio de las diluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Tabla 8: Absorbancias promedio de las diluciones en el espectrofotómetro vs concentración de ácido gálico.

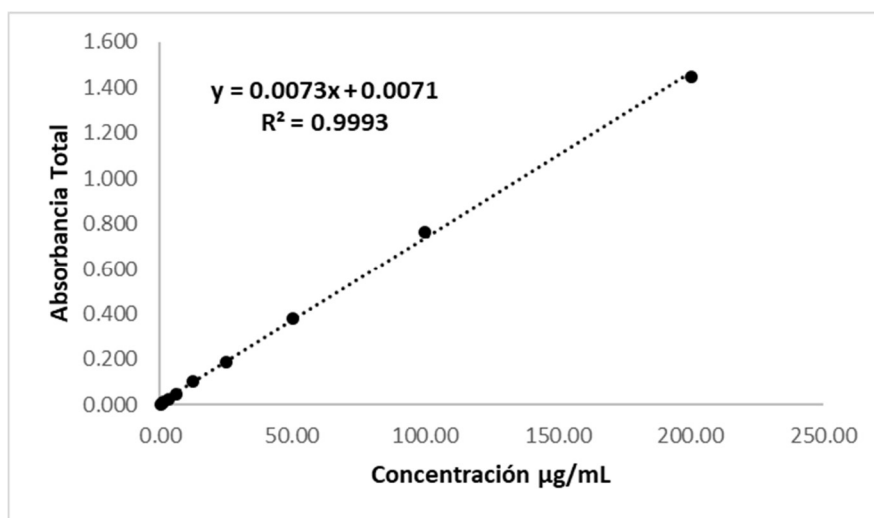
Conc. $\mu$ M	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
Abs. Prom.	0.002	0.008	0.014	0.026	0.050	0.101	0.190	0.378	0.765	1.448

En la tabla 9 se presentan los datos de absorbancia correspondientes a cada dilución con las concentraciones de ácido gálico de cada una de ellas. Con estos datos se obtuvo la curva de calibración.

Tabla 9: Absorbancias de las diluciones de ácido gálico vs concentraciones.

Conc. Mm	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00
Abs.	0.002	0.008	0.014	0.026	0.050	0.101	0.190	0.378	0.765	1.448

En la gráfica 2 se presenta la curva de calibración obtenida para las diluciones de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.



Gráfica 2: Curva de calibración de ácido gálico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Con los datos de absorbancia de las diluciones del extracto total con el reactivo de Folin-Ciocalteu se calculó un contenido de compuestos fenólicos en este extracto de 42.61 mg eq. de AG/ g del extracto.

**Estimación del contenido de flavonoides totales en el extracto total.**

En la tabla 10 se presentan las absorbancias que se observaron en el espectrofotómetro para las disoluciones de quercetina con  $AlCl_3$ , algunos resultados fueron descartados con el fin de obtener resultados más precisos.

Tabla 10: Datos de absorbancia de las diluciones de quercetina con  $AlCl_3$  y sus respectivas concentraciones.

	Blanco	Blanco	<b>Conc. Ppm</b>						
			<b>0.39</b>	<b>0.78</b>	<b>1.56</b>	<b>3.125</b>	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>	<b>25</b>
A	0.049	0.046	0.05	0.053	0.062	0.076	0.112	0.163	0.286
B	0.045	0.046	0.054	0.056	0.063	0.076	0.101	0.163	0.272
C	0.045	0.05	0.051	0.054	0.062	0.074	0.101	0.165	-
D	0.045	0.046	0.052	0.056	0.068	0.085	0.117	0.199	0.309
E	0.046	0.046	0.057	0.057	0.068	0.085	-	-	0.309
F	0.048	0.049	0.054	0.058	0.069	-	0.127	-	0.278
G	0.046	0.048	0.053	0.057	0.065	0.083	0.113	0.178	-
H	0.045	0.045	0.051	0.054	0.066	0.081	0.112	0.183	0.282

(-) valores fuera de rango.

En la tabla 11 se presentan las absorbancias promedio de las diluciones obtenidas y sus respectivas concentraciones.

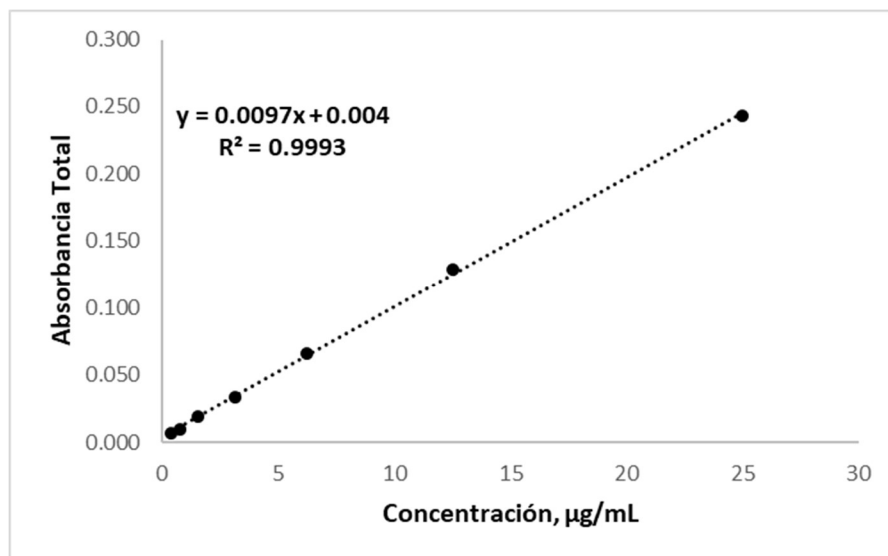
Tabla 11: Absorbancias promedio de las diluciones vs concentraciones de las diluciones (ppm).

<b>Conc. (pm)</b>	-	-	<b>0.39</b>	<b>0.78</b>	<b>1.56</b>	<b>3.125</b>	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>	<b>25</b>
Abs.	0.046	0.047	0.053	0.056	0.065	0.08	0.112	0.175	0.289

En la tabla 12 se presentan las absorbancias resultantes de las diluciones de quercetina con  $AlCl_3$  y las respectivas concentraciones obtenidas. Con estos datos fue posible obtener la curva de calibración en donde se representa al contenido de flavonoides en cada concentración (gráfica 3).

Tabla 12: Concentraciones de las diluciones de quercetina vs absorbancias resultantes de las diluciones.

<b>Conc. (ppm)</b>	-	-	<b>0.39</b>	<b>0.78</b>	<b>1.56</b>	<b>3.125</b>	<b>6.25</b>	<b>12.5</b>	<b>25</b>
Abs.	0.007	0.010	0.019	0.034	0.066	0.129	0.243	0.007	0.010



Gráfica 3: Curva de calibración, concentración de quercetina vs. Absorbancia de las diluciones.

Con los datos de las absorbancias de las diluciones del extracto total con  $\text{AlCl}_3$  se logró determinar el contenido de flavonoides en el extracto de 18.53 mg eq de Quercetina/ g de extracto.

#### **Resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa**

En la tabla 13 se presentan los datos de absorbancia a 412 nm obtenidos de todas las disoluciones preparadas en el ensayo. Las claves asignadas a los extractos y fracciones fueron las siguientes: Extracto total de la planta SSECLM, fracción de AcOEt SSFACE, fracción formada por MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2 SSFMEW, se mantuvieron las mismas claves para los compuestos aislados. Como blanco se utilizaron disoluciones a las que no se les agregó enzima y disoluciones a las que no se les agregó muestra. Los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos para una disolución de eserina con concentración de 0.003 µg/mL.



Tabla 13: Datos de absorbancia a 412 nm de las disoluciones obtenidas vs concentraciones de las muestras evaluadas.

		Sin enzima			
		A	B	C	D
	Sin muestra	0.055	0.500	0.514	0.512
Muestra	Concentración	Sin muestra			
SSECLM	1 µg/mL	0.059	0.492	0.468	0.437
SSECLM	10 µg/mL	0.077	0.448	0.476	0.473
SSECLM	100 µg/mL	0.246	0.577	0.596	0.594
SSFACE	1 µg/mL	0.061	0.378	0.381	0.359
SSFACE	10 µg/mL	0.076	0.391	0.366	0.365
SSFACE	100 µg/mL	0.242	0.524	0.542	0.529
SSFMEW	1 µg/mL	0.057	0.322	0.320	0.393
SSFNEW	10 µg/mL	0.058	0.334	0.350	0.359
SSFMEW	100 µg/mL	0.086	0.384	0.391	0.396
Compuesto 1	1 µg/mL	0.060	0.454	0.444	0.436
Compuesto 1	10 µg/mL	0.078	0.492	0.493	0.475
Compuesto 1	100 µg/mL	0.231	0.617	0.633	0.385
Compuesto 2	1 µg/mL	0.062	0.366	0.373	0.375
Compuesto 2	10 µg/mL	0.089	0.447	0.448	0.455
Compuesto 2	100 µg/mL	0.434	0.807	0.880	0.849
Compuesto 3	1 µg/mL	0.059	0.406	0.465	0.452
Compuesto 3	10 µg/mL	0.104	0.442	0.439	0.436
Compuesto 3	100 µg/mL	0.369	0.642	0.647	0.652
Eserina	0.003 µg/mL	0.081	0.315	0.327	0.391

Donde: SSECLM corresponde al extracto total, SSFACE corresponde a la fracción de AcOEt y SSMEW corresponde a la fracción remante de MeOH-H<sub>2</sub>O, compuesto 1: 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina, compuesto 2: amentoflavona, compuesto 3: 2'',3''-dihidroamentoflavona.

En la tabla 14 se presentan los porcentajes de inhibición con respecto a las concentraciones de muestra en las disoluciones y sus datos de absorbancia,



Tabla 14: Porcentajes de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, absorbancias y concentración de las muestras.

Muestras	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	D. O. 412 nm	% de inhibición
Sin muestra	-	0.454	-
SSECLM	1	0.407	<b>10.36</b>
SSECLM	10	0.389	<b>14.33</b>
SSECLM	100	0.343	<b>24.39</b>
SSFACE	1	0.312	<b>31.30</b>
SSFACE	10	0.298	<b>34.31</b>
SSFACE	100	0.290	<b>36.15</b>
SSFMEW	1	0.255	<b>43.86</b>
SSFMEW	10	0.295	<b>35.05</b>
SSFMEW	100	0.304	<b>32.92</b>
Compuesto 1	1	0.385	<b>15.21</b>
Compuesto 1	10	0.409	<b>9.92</b>
Compuesto 1	100	0.381	<b>16.09</b>
Compuesto 2	1	0.309	<b>31.89</b>
Compuesto 2	10	0.361	<b>20.43</b>
Compuesto 2	100	0.411	<b>9.33</b>
Compuesto 3	1	0.382	<b>15.80</b>
Compuesto 3	10	0.335	<b>26.16</b>
Compuesto 3	100	0.278	<b>38.72</b>
Eserina	0.003	0.230	<b>49.30</b>

Donde: SSECLM corresponde al extracto total, SSFACE corresponde a la fracción de AcOEt y SSMEW corresponde a la fracción remante de MeOH-H<sub>2</sub>O, compuesto 1: 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina, compuesto 2: amentoflavona, compuesto 3: 2'',3''-dihidroamentoflavona.



## **10) ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

### **Espectro de infrarrojo obtenido del precipitado formado durante la extracción.**

De acuerdo a la información que se puede obtener con el espectro de IR sobre los compuesto que se encuentran en la mezcla del sólido que precipitó en la extracción se puede ver que hay grupos carbonilo que están  $\alpha,\beta$ -insaturados y que además el oxígeno del grupo carbonilo se encuentra interactuando el hidrógeno de un grupo hidroxilo por medio de un enlace de hidrógeno, esto se observa al encontrar dos bandas de absorción intensas y ensanchadas en  $1645$  y  $1607\text{ cm}^{-1}$  que aparece debido al estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$ . También es posible saber que hay grupos hidroxilo en donde el hidrógeno esta enlazado a un grupo carbonilo por medio de un puente de hidrógeno debido a que hay una banda de absorción ancha en  $3060\text{ cm}^{-1}$ , esta banda surge debido al estiramiento del enlace  $\text{O}-\text{H}$ . Con el espectro también es posible observar que hay grupos hidroxilo que se encuentran unidos a anillos aromáticos, esto debido a la presencia de dos bandas que se encuentran en  $1300$  y  $1169\text{ cm}^{-1}$  que se generan debido al estiramiento del enlace  $\text{C}-\text{O}$  que está acoplado con el doblamiento del enlace  $\text{O}-\text{H}$ . Es posible ver que en las moléculas presentes en esta mezcla existen aril-alquil éteres debido a que en el espectro aparece una banda que se encuentra en  $1244\text{ cm}^{-1}$  y surge debido al estiramiento asimétrico de los enlaces en  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . Se puede observar que en la mezcla hay éteres vinílicos, esto debido a que se observa una banda en  $1219\text{ cm}^{-1}$  que aparece debido al estiramiento asimétrico de los enlaces  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . Tanto la presencia de aril-alquil éteres como la presencia de éteres vinílicos se puede asegurar debido a que se presentan bandas de baja intensidad en la región de  $1075-1020\text{ cm}^{-1}$  que surgen debido al estiramiento simétrico de los enlaces  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . En el espectro también es posible observar una banda de absorción de intensidad moderada a una frecuencia de  $832\text{ cm}^{-1}$ , esta banda se presenta debido al doblamiento fuera de fase de los enlaces  $\text{C}-\text{H}$  acoplados entre sí de un anillo aromático. Se observan dos bandas de absorción en  $2917$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces  $\text{C}-\text{H}$  de grupos metilos (Silverstein, 2005).



### Elucidación estructural de los compuestos aislados.

#### Compuesto 1: 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina:

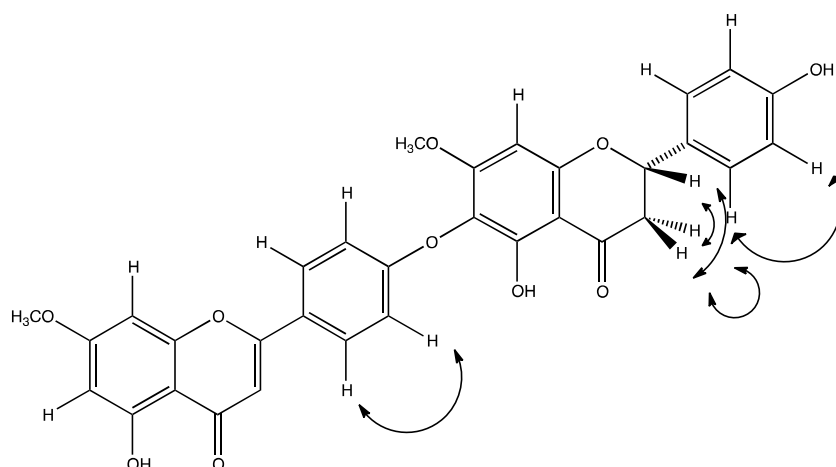
En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 2) se observan dos señales con un desplazamiento químico de 13.10 y 12.14 ppm las cuales corresponden a los hidrógenos de los grupos hidroxilo unidos a los carbonos 5 y 5'' de un biflavonoide; el desplazamiento a campo bajo indica que estos hidrógenos se encuentran interactuando por medio de un enlace de hidrógeno con los oxígenos de los grupos carbonilo vecinos. En la región de los hidrógenos unidos a anillos aromáticos se pueden observar dos sistemas de señales A<sub>2</sub>X<sub>2</sub> que denotan la presencia de dos anillos bencénicos sustituidos en posición *para*, los cuales corresponden a los hidrógenos unidos a los anillos B de cada unidad de flavonoide (H-2', H-3', H-5', H-6' y H-2''', H-3''', H-5''' y H-6'''). Estas señales dan evidencia de que el biflavonoide es del tipo II (Esquema 11) en el cual la unión entre los flavonoides existe a través de un enlace de tipo éter. En esta región también se pueden observar las señales de los hidrógenos unidos a los anillos A y C de la flavona (H-6 y H-8). En 5.54 ppm se encuentra un doble de dobles que corresponde al hidrógeno unido al carbono 2''. Se observan dos singuletes en 3.85 y 3.96 ppm, estas señales corresponden a los hidrógenos de los grupos metoxilo que se encuentran unidos a los carbonos 7 y 7'' respectivamente. Por último, se observan dos señales de un metileno, que son de los hidrógenos unidos al carbono 3'' en 3.30 y 2.83 ppm.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 3) se observan dos señales en 196.7 y 182.6 ppm que corresponden a los carbonos de los grupos carbonilo; las señales se encuentran separadas una de la otra debido a que el ambiente electrónico para ambos carbonos es distinto ya que uno de estos carbonos se encuentra en posición alfa a un doble enlace (C-4). A campo más alto se pueden observar señales de los carbonos cuaternarios de anillos aromáticos que están enlazados a un átomo de oxígeno (153.5 a 168.1 ppm). También es posible encontrar a las señales de los carbonos aromáticos cuaternarios unidos a otros átomos de carbono (105.8, 126.2, 122.3, 132.3 ppm, de C-10, C-10'', C-1' y C-1''') y a los



carbonos de anillos aromáticos que están sustituidos por hidrógenos (91.5, 93.8., 94.7, 114.9, 116.1, 128.1, 128.6 ppm, de C-8", C-8, C-6, C-3'",5'", C-3',5', C-2'",6'", C-2',6'). Se encuentra una señal en 79.0 ppm que corresponde al C-2". También se pueden encontrar dos señales que corresponden a los carbonos de los grupos metoxilo unidos a los carbonos 7 y 7" en 56.2 y 55.4 ppm. En 42.6 ppm es posible observar una señal que corresponde al carbono en 3".

En el experimento COSY (Espectro 4) se pueden observar correlaciones entre los hidrógenos de los anillos B de cada flavonoide y correlaciones entre los hidrógenos unidos a los carbonos alifáticos 2" y 3" (Esquema 13).



Esquema 13: Correlaciones observadas en el experimento COSY.

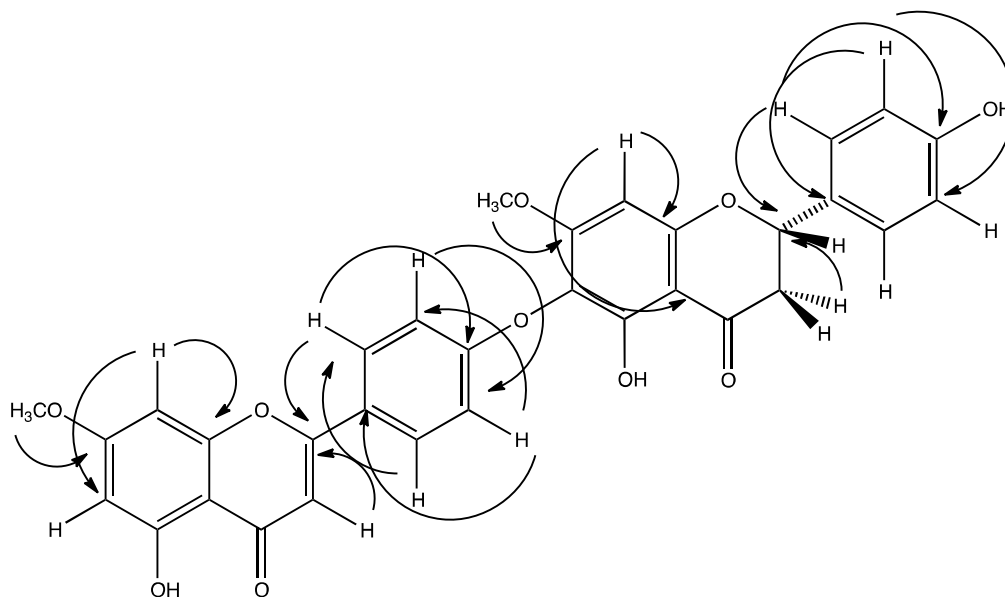
Por medio del experimento HSQC (Espectro 5) es posible ver que hay 16 carbonos que están sustituidos con hidrógenos. Además, fue posible identificar a los carbonos e hidrógenos de los grupos metoxilo y los hidrógenos que se encuentran unidos a los carbonos 2" y 3".

El experimento HMBC (Espectro 6) fue de gran ayuda para llevar a cabo la asignación de las señales a los carbonos e hidrógenos presentes en la molécula. En este espectro es posible observar las correlaciones que dan información de la posición de los grupos metoxilo. También es posible obtener información de la conectividad de los anillos en cada flavonoide. Además, se puede ver la relación



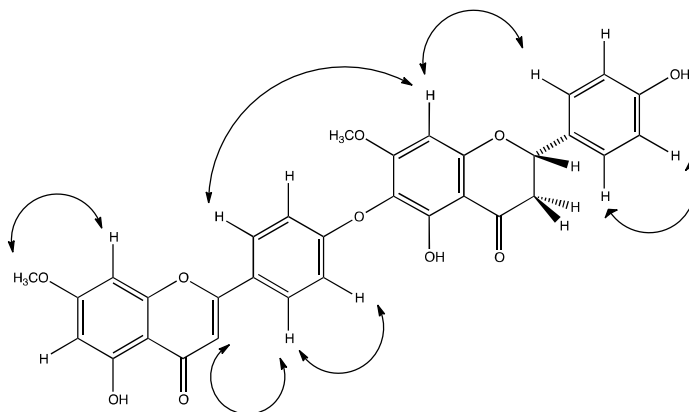


que existe entre los hidrógenos y carbonos en las posiciones 2'' y 3'' del anillo C de la flavanona, una subunidad del compuesto (Esquema 14).



Esquema 14: Correlaciones observadas en el experimento HMBC.

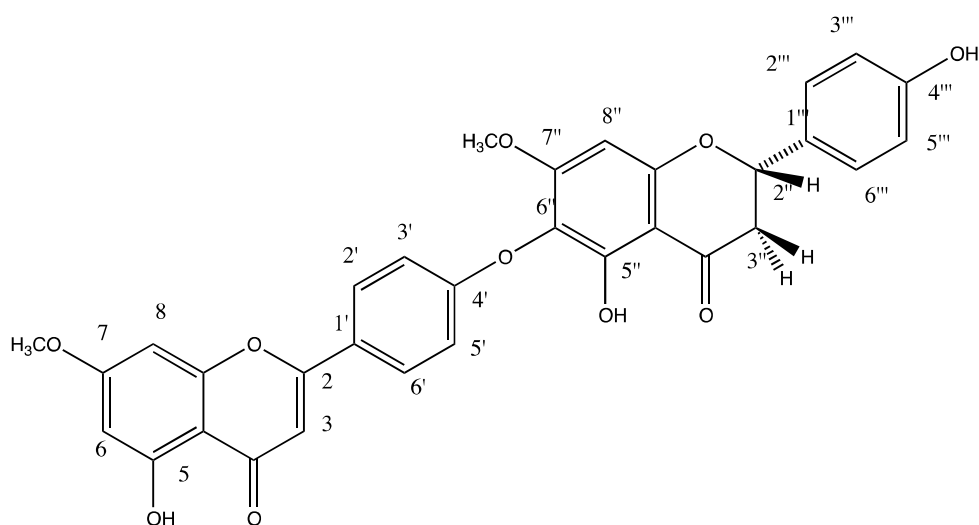
En el experimento NOESY (Espectro 7) es posible observar las correlaciones en el espacio que existen entre hidrógenos que se encuentran cercanos en la molécula; sorprendentemente, se observan correlaciones entre el hidrógeno H-2' con el hidrógeno H-8'' y de H-8'' con el H-2''', además de la correlación entre H-3' con los hidrógenos del metoxilo unido a C-7''. Las correlaciones observadas nos dan información del arreglo tridimensional de la molécula (Esquema 15).



Esquema 15: Correlaciones observadas en el experimento NOESY.



Los resultados de los experimentos obtenidos en los espectros de RMN fueron comparados con los presentados por Chen (2005). De acuerdo con este análisis, el compuesto fue identificado como 2''-3''-dihidroisocriptomerina-7-O-metil éter (esquema 16). Este biflavonoide fue aislado por primera vez de *Selaginella delicatula* y fue evaluado por su actividad citotóxica en contra de células de leucemia linfocítica de ratón (P-388) y células de carcinoma de colon humano (HT-29). En ese experimento se pudo ver que el compuesto presentó actividad citotóxica no significativa



Esquema 16: Estructura de 7-O-metil-2'',3''-dihidroisocriptomerina (Compuesto 1).

**Compuesto 2: Amentoflavona, compuesto 3: 2'',3''-dihidroamentoflavona:**

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 2 (Espectro 8) se observan dos señales con un desplazamiento químico de 13.18 y 13.17 ppm, y una señal en 13.11 ppm en el espectro del compuesto 3 (Espectro 14), estas señales corresponden a los hidrógenos de los grupos hidroxilo unidos a los carbonos C5 y C5'', la aparición de estas señales a campo bajo se debe a que estos hidrógenos están interactuando con los oxígenos de los carbonilos vecinos por medio de enlaces de hidrógeno. En la región de los protones de los anillos aromáticos se puede observar en ambos espectros, una serie de señales correspondientes a un sistema ABX para un anillo aromático trisustituido en las posiciones 1,3 y 4, en 8.27 ppm (d,  $J$  2.4 Hz,  $H_X=H-2'$ ), 7.09 (d,  $J$  8.6,  $H_A=H-5'$ ) y 7.91 ppm (dd, 8.7,  $J$  2.4 Hz,  $H_B=H-6'$ ) para el caso

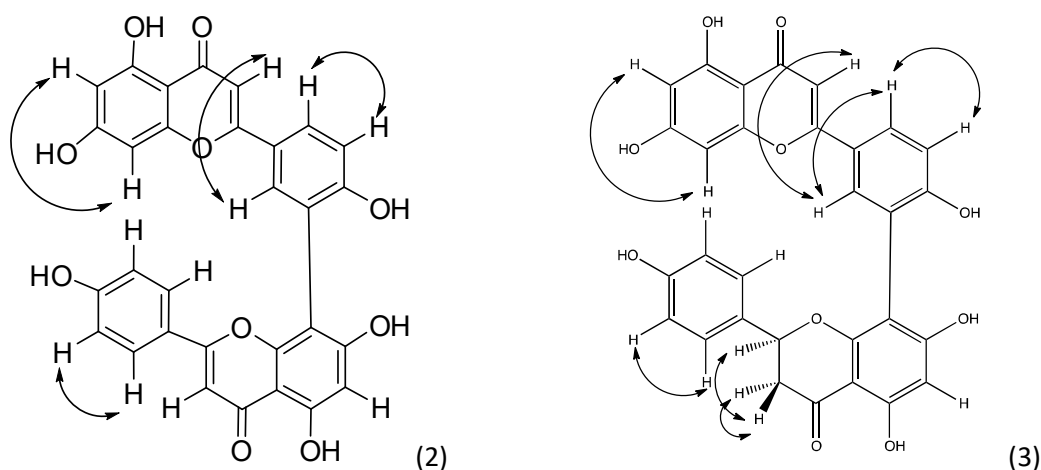


del compuesto 2 y en 8.16 ppm (d,  $J$  2.4 Hz,  $H_x=H-2'$ ), 7.76 ppm (dd,  $J$  2.44, 2.48, 8.62 Hz,  $H_A=H-6'$ ) y 6.97 ppm (d,  $J$  8.6 Hz,  $H_B=H-5'$ ) para el caso del compuesto 3; además, otras dos señales dobles correspondientes a un sistema  $A_2-X_2$ , integrando cada una para dos hidrógenos, en el compuesto 2 ( $H-2'''$ ,  $H-6'''$  y  $H-3'''$ ,  $H-5'''$ ) en 6.73 ppm y (d,  $J$  8.8 Hz,  $H-3'''$  y  $5'''$ ) en 7.0 ppm (d,  $J$  8.8 Hz,  $H-2'''$  y  $5'''$ ) y en el compuesto 3 en los desplazamientos 6.89 ppm (d,  $J$  8.56 Hz,  $H-3'''$ ,  $5'''$ ) y 7.40 ppm (d,  $J$  8.52 Hz,  $H-2'''$  y  $H-6'''$ ); lo anterior, indica que la estructura de la molécula corresponde a un biflavonoide de tipo I. Los dobletes presentes en 6.41 y 6.21 ppm en el espectro del compuesto 2 y 6.21 y 6.52 ppm en el del compuesto 3 corresponden a dos hidrógenos acoplados entre sí en posición *meta* del anillo A. Cabe mencionar que en el espectro del compuesto 2 sólo son evidentes señales en la región de los anillos aromáticos mientras que en el espectro del compuesto 3 se observa un doble de dobles presente en 5.41 ppm que corresponde al hidrógeno del carbono 2'', de la subunidad de flavanona. Las señales que se encuentran en 3.06 y 2.67 ppm corresponde a los hidrógenos de C-3'' de la subunidad de flavanona.

En el espectro de RMN- $^{13}C$  del compuesto 2 (Espectro 9) se observa que las señales correspondientes a los carbonos de los dos grupos carbonilo están muy cercanas una de la otra lo cual indica que se encuentran dentro de un ambiente electrónico similar mientras que en el espectro del compuesto 3 (Espectro 15) se observa que estas señales se encuentran separadas una de la otra (194.3 y 182.1 ppm) debido a la diferencias en el ambiente electrónico de los carbonos adyacentes. En la región que va de 175 a 150 ppm de ambos espectros se encuentran las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios aromáticos unidos a átomos de oxígeno. En la región comprendida entre 135 y 90 ppm de ambos espectros se encuentran las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios unidos a otros carbonos y a los carbonos sustituidos por átomos de hidrógeno. Las señales presentes en 42.8 y 78.4 ppm corresponden a los carbonos C-2'' y C-3'' en la subunidad de la flavanona del compuesto 3.

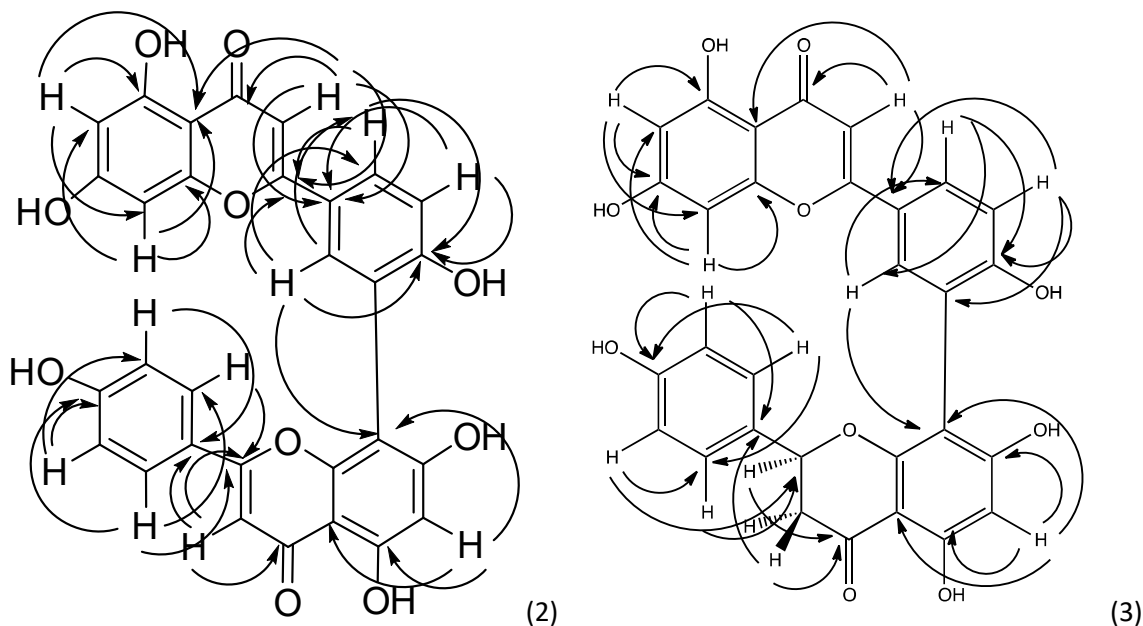


En el experimento HSQC (Espectro 11) del compuesto 2 se puede observar que en la molécula existen 12 carbonos sustituidos por hidrógeno, todos de tipo Sp<sup>2</sup> mientras que en el caso del compuesto 3 (Espectro 17), hay 13 carbonos sustituidos por hidrógeno, de los cuales la señal correspondiente al C3'' está correlacionada con dos señales presentes en 2.67 y 3.06 ppm del espectro de RMN-H<sup>1</sup> indicando la presencia de un grupo metileno alifático. En el experimento COSY del compuesto 2 (Espectro 10), se pueden observar las correlaciones entre los hidrógenos de los anillos aromáticos (Esquema 17), en el experimento COSY del compuesto 3 (Espectro 16) se observan las correlaciones entre los protones unidos a C-3'' y el protón del metino en C-2''.



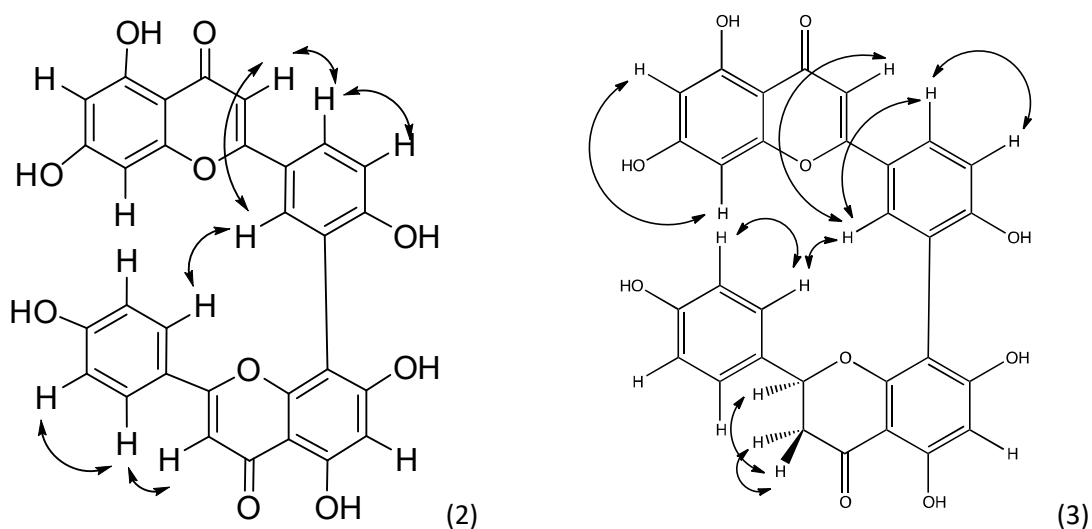
Esquema 17: Correlaciones observadas en el experimento COSY de los compuestos 2 y 3.

El experimento HMBC (Espectros 12 y 18) de ambos compuestos fue de gran ayuda para asignar los desplazamientos de cada uno de los carbonos y protones que se encuentran en las moléculas. Entre las correlaciones más importantes, se observa la que existe entre el protón unido al carbono 2' y el C-8'' lo que indica que el enlace entre los flavonoides se encuentra entre C3' y C8'', con esto, se confirma que los biflavonoides 2 y 3 son de tipo amentoflavona. Además en el experimento del compuesto 3 es posible observar la interacción entre el C2'' con uno de los protones unidos a C3'' (Esquema 18).



Esquema 18: Correlaciones observadas en el experimento HMBC de los compuestos 2 y 3.

En los experimentos NOESY de los compuestos 2 y 3 (Espectros 13 y 19) se puede notar que el protón H2' está cerca del protón unido a C2''' mientras que el protón unido a C2' está cerca del protón en C3. Estas evidencias proporcionan información del arreglo tridimensional de las moléculas (Esquema 19).



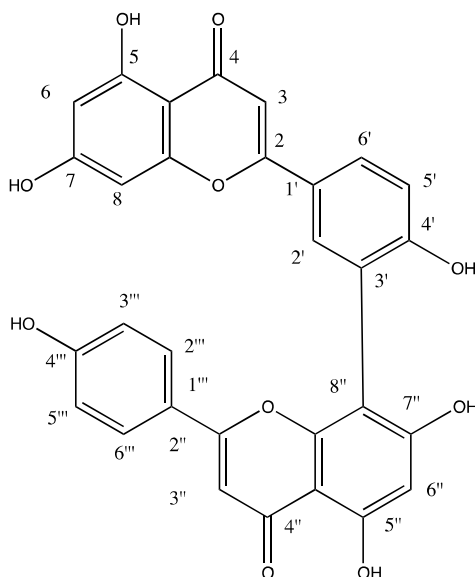
Esquema 19: Correlaciones observadas en los experimentos NOESY de los compuestos 2 y 3.



## Compuesto 2: Amentoflavona.

Los resultados obtenidos en los espectros de RMN fueron comparados con los obtenidos por Lara (2014), con lo que fue posible identificar al compuesto **2** como amentoflavona. Este biflavonoide se ha encontrado como compuesto mayoritario en prácticamente todas las selaginelas que han sido estudiadas. La amentoflavona aislada a partir de *Selaginella tamariscina* indujo la relajación del músculo liso vascular por medio de la señalización de la vía nitrérgica del cGMP cíclico del endotelio dependiente del óxido nítrico con posible implicación de canales no específicos de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  (Kang et al., 2004).

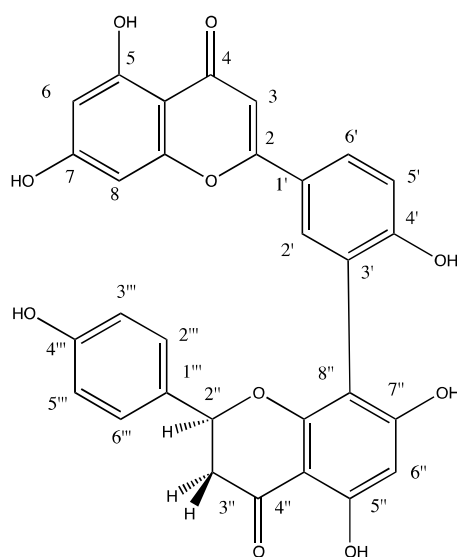
En otro estudio en donde la amentoflavona fue evaluada por su actividad antitumoral en contra de líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 y OVACAR-3, se pudo observar que el compuesto, de forma significativa logró suprimir la proliferación de las células al inducir su apoptosis y bloquear la progresión del ciclo celular; en términos mecanísticos, se pudo observar que la regulación negativa de la proteína quinasa 2 en la fase S del ciclo, contribuyó a la actividad antitumoral de la amentoflavona. También fue posible observar que el compuesto reprimió la expresión del Skp2 por medio de la señalización de ROS/AMPK/mTOR (Liu et al., 2017).



Esquema 20: Estructura de la amentoflavona (Compuesto **2**).

**Compuesto 3: 2'',3''-dihidroaamentoflavona.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de RMN se determinó que el compuesto **3** corresponde a la 2'',3''-dihidroaamentoflavona. Este compuesto fue aislado por primera vez de los frutos de *Schinus terebinthifolius* Rabbi (Anacardiaceae) (Skopp et al., 1986), sin embargo, también ha sido encontrado en otras selaginelas como en *S. bryopteris* (Swamy et al., 2006), *S. remotifolia*, *S. uncinata* en donde el compuesto presentó un efecto protector particularmente significativo en contra de la anoxia (Jun-Xia et al., 2011) y a partir de *S. tamariscina* en donde el compuesto presentó actividad inhibitoria significativa de la enzima epóxido hidrolasa que convierte a los ácidos eicosatrienóicos en ácidos dihidroxieicosatrienóicos (Hang et al., 2015).



Esquema 21: Estructura de la 2'',3''-dihidroaamentoflavona (Compuesto **3**).

**Resultados obtenidos en las pruebas de actividad antioxidante, contenido de fenoles y contenido de flavonoides del extracto total de *Selaginella stellata*.**

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en estas pruebas, se puede afirmar que el extracto presenta actividad antioxidante moderada, la presencia de actividad se debe, principalmente, al contenido de compuestos fenólicos que se pudieran encontrar en mayor proporción en la fracción de MeO-H<sub>2</sub>O. Se han realizado estudios de actividad antioxidante con las infusiones, extractos acuosos



y otros extractos polares de otras especies de selaginelas en donde se han obtenido buenos resultados (Sha et al., 2005, Chai et al., 2012, Gayathri, et al., 2005) y también se han evaluado compuestos fenólicos aislados a partir de otros miembros del género *Selaginella* los cuales también han presentado buena actividad antioxidante (Wang-Hu et al., 2010, Arimboor et al., 2011).

Casi todos los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante ya que inhiben la peroxidación de lípidos al remover a los radicales peróxido. También son capaces de atrapar a otros radicales como  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}_2\cdot$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ONOOH}$  y  $\text{HOCl}$ , pueden disminuir los niveles de peroxidación inducidos por las proteínas heme al atrapar a los radicales ferrilo. Algunos compuestos fenólicos, especialmente los que tienen dos o tres grupos hidroxilo, reaccionan con el radical  $\text{O}_2\cdot^-$ . Los compuestos fenólicos que contienen dos grupos OH adyacentes pueden enlazarse con los iones de metales de transición y transformarlos en sustancias poco activas en la promoción de reacciones de radicales libres. Se ha visto que la capacidad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos está relacionada con la cantidad de grupos OH y la posición en la que se encuentran (Haliwell et al. 2015).

Existen otros estudios en donde se ha evaluado la actividad antioxidante de los biflavonoides en donde se ha visto que algunos presentan actividad, sin embargo, éstos han resultado menos activos que los flavonoides, utilizados como estándares positivos en estas pruebas (Aguilar, 2015, Alves et al. 2018, Silva et al., 2017, Zhang et al., 2011).

### **Inhibición de actividad de la enzima acetilcolinesterasa**

En los resultados que se obtuvieron con respecto al porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Tabla 14), se pudo observar que, la capacidad inhibitoria de algunas muestras aumentaba dependiendo de la concentración, sin embargo, en otras, la capacidad inhibitoria disminuía conforme aumentaba la concentración, esto se pudo deber al aumento en la concentración de los compuestos que antagonizan a los activos y a que realmente los compuestos presentes en las fracciones que presentaron tal efecto, eran prácticamente





inactivos. Fue posible observar que la capacidad inhibitoria de las muestras que se evaluaron fueron significativamente más bajas que la de eserina (control positivo), se considera que hubo un poco de actividad inhibitoria por parte de las fracciones obtenidas con AcOEt, con MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2 y con el compuesto **3**, la 2'',3''-dihidroamentoflavona. Los resultados obtenidos con las fracciones pueden deberse a las múltiples contribuciones de los compuestos presentes en ellas, especialmente, a los de mayor polaridad; como compuestos fenólicos debido a que la fracción obtenida con MeOH-H<sub>2</sub>O 8:2 tuvo el porcentaje de inhibición más alto; la probable presencia de alcaloides en la fracción de AcOEt (Wang et al., 2009) pudo haber contribuido a la inhibición. Se ha observado que los extractos polares de *S. delicatula* han logrado inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Girish et al., 2012). Este es el primer reporte con respecto a ensayos de inhibición de la acetilcolinesterasa con la 2'',3''-dihidroamentoflavona. Además, se ha evaluado la capacidad para inhibir a la enzima acetilcolinesterasa de compuestos fenólicos, alcaloides y extractos obtenidos de otras plantas en donde se han obtenido resultados significativos (Khatoon et al., 2018).



## **11) CONCLUSIONES.**

En este trabajo se realizó un estudio fitoquímico con la especie *Selaginella stellata* Spring de donde fueron aislados tres biflavonoides, uno de tipo hinokiflavona y dos de tipo amentoflavona que ya se han reportado en otras especies de *Selaginella*. Este es el primer trabajo en el que se provee información referente a la composición química de esta especie, lo que va a contribuir al conocimiento del perfil químico de las especies del género *Selaginella*.

La capacidad antioxidante que presentó el extracto total de la planta determinado por el método de atrapamiento del radical DPPH se debió principalmente a la presencia de compuestos fenólicos que fueron determinados mediante la estimación del contenido de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Con respecto a la capacidad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, se puede considerar que es muy baja a pesar de los resultados obtenidos con las fracciones de MeOH, de AcOEt y del compuesto **3**. La capacidad para inhibir la actividad enzimática del extracto total, de la amentoflavona (**2**) y de la 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (**1**) es nula.

**12) BIBLIOGRAFÍA.**

- 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., Benítez W. V., Colin A., Robert Bye., Ríos R., Calzada F., 2015, Evaluation of diuretic activity in two mexican medicinal species: *Selaginella lepidophylla* and *Selaginella nothohybrida* and its effects with ciloxigenases inhibitors, *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 167-172.
- Aguilar M. I., Romero M., Chávez M. I., King-Díaz B., Lotna-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, Capítulo 3: Flavonoides. Biogénesis, aislamiento, determinación estructural y bioactividad de flavonoides y biflavonoides, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 59-94.
- Ahn M., Mun S., Lee Y., Kwak S., Choi S., Baik M., Kim S., Woo Y., Hong W., 2006, *Selaginella tamariscina* induces apoptosis via a caspase-3-mediated mechanism in human pro-mielositic leukemia cells, *Journal of medicinal food*, 9, 138-144.
- Alves L., Goncalves R., Rocha G., Oliveira A., Martins E., Gama M., Gomes A., Rose I., Douglas H., Ó Pessoa C., Pineiro M., Guedes J., 2018, Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities and evaluation of cytotoxicity of the fractions obtained from *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae), *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32 (2), 506-512.
- Arimboor R., Rangan M., Aravind S. G., Arumughan C., 2011, Tetra hydroamentoflavone (THA) from *Semecarpus anacardium* as a potent inhibitor of xanthine oxidase, *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 117-112.
- Awad R., Ahmed F., Bourbonnais N., Mullaly M., Anh C., Tang A., Merali Z., Maquin P., Caal F., Cal V., Poveda L., Sánchez P., Trudeau V., Arnason J. T., 2009, Ethnopharmacology of Q'eqchi Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effect on the GABAergic system, *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 257-264.
- Benzie I. F. F., Strain J. J., 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay", *Analytical Biochemistry*, 239, 1, 70-76.
- 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.



- Brossi A., Schönenberger, Clark O. E., Ray R., 1986, inhibition of acetylcholinesterase from electric eel by (-) and (+)-physostigmine and related compounds, ETH Zürich Switzerland, 201, 2, 190-192.
- But P., Chu L., Chan Y., 2005, Inhibitory effects of *Selaginella tamariscina* on immediate allergic reactions, The American Journal of Chinese Medicine, 33(6), 957-966.
- Campos P. M., Prudente A. S., Horinouchi C. D. S., Cechinel-Filho V., Fávero G. M., Cabrini D. A., Otuki M. F., 2015, Inhibitory effect of GB-2a (l3-naringenin-118-eriodictyol) on melanogenesis, Journal of Ethnopharmacology, 174, 224-229.
- Cao Y., Chen J., Tan N., Wu Y., Yang J., Wang Q., 2010, 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, Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 40, 2456-22460.
- Cao Y., Wu YP, Duan A., 2015, A new selaginelin derivative from *Selaginella pulvinata*, Yao Xue Xue Bao, 50, 199-202.
- Castardo J.C., Prudente A.S., Ferreira J., Guimarães C.L., Monache F.D., Filho V.C., Otukia, M.F., Cabrinia D.A., 2008, Antiinflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema, Journal of Ethnopharmacology, 118, 405-411.
- Chai T., Wong Fai., 2012, Antioxidant properties of aqueous extracts of *Selaginella willdernowii*, Journal of Medicinal Plants Research, vol 6(7), 1289-1296.
- Chang-Ming S., Wan-Jr S., Yi-Tsa H., Chien-Chih C., Jun-Chih O., 1997. Selective cytotoxicity of ginketin from *Selaginella moellendorffii*, Journal of Natural Products, 60, 382-384.
- Chao, L., Seguin, E., Tillequin, F., Kock, M. 1987. New alkaloid glycosides from *Selaginella doederleinii*. Journal Natural Products 50, 422-426.
- Chen J., Duh C., Chen J., 2005, New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*, Planta Medica, 71, 659-665.
- Chen X., Xu P.-S., Zou Z.-X., Liu Y., Zou W.-H., Ren Q., Li D., Li X.-M., Xu K.-P., Tan G.-S., 2019, Sinensiols B-G, six novel neolignans from *Selaginella sinensis*, Fitoterapia, 134, 256-263.
- Cheng Z., Moore J., Yu L., 2006, High-throughput relative DPPH Radical Scavenging capacity assay, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 7429-7436.



- Chukwujekwu J. C., De Kock C. A., Smith P. J., Heerden F. R., Staden J., 2012, Antiplasmodial and antibacterial activity of compounds isolated from *Ormocarpum trichocarpum*, *Planta Medica*, 78, 1857-1860.
- Davidse, et al., G.; Sousa Sánchez, M. (eds.). *Flora Mesoamericana*, Volume 1 (in Spanish). UNAM (1995).
- Delgado G., Romo de Vivar A., 2015, *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dewick P., 2009, *Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach*, 3<sup>o</sup> edición, Reino Unido, A Jonh Wiley & Sons Ltd, Publications.
- Dhooghe L., Maregesi S., Mincheva I., Ferreira D., Jannie P.J.M., Lemièrè F., Matheussen A., Cos P., Maes L., Vlietinck A., Apers S., Pieters L., 2010, Antiplasmodial activity of (I-3,II-3)biflavonoids and other constituents from *Ormocarpum kirkii*. *Phytochemistry*, 71, 785-791.
- Duke J. A., Vasquez R., 1994, *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. CRC Press. p. 154.
- Eol.org. 2014-09-15 "Descriptions and articles about the Starry Spikemoss (*Selaginella stellata*) - Encyclopedia of Life". Recuperado el 2 de marzo de 2015.
- Feng W., Chen H., 1994, Chemical constituents from *Selaginella sinensis*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 39, 654-656.
- Gao L., Yin S., Li Z., Sha Y., Pei Y., Shi G., Jing Y., Hue H., 2007, Three novel sterols isolated from *Selaginella tamariscina* with antiproliferative activity in leukemia cells, *Planta Medica*, 73, 1112-1115.
- Gayathri V., Asha V., Subramoniam A 2005, Preliminary studies on the immunomodulatory and antioxidant properties of *Selaginella* species. *Indian Journal of Pharmacology*, 37: 381-5.
- Girish C., Muralidhara, 2012, Propensity of *Selaginella delicatula* aqueous extract to offset rotenone-induced oxidative dysfunctions and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Implications for Parkinson's disease, *Neurotoxicology*, 33, 444-456.
- Girish C., Muralidhara, 2014, Insights on the Neuromodulatory Propensity of *Selaginella* (Sangeevani) and its Potential Pharmacological Applications, *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2014, 13, 82-95.
- Guilherme S., Pereira X., Tolentino J., Alves J., Paviotti A., Souza J., Quincans-Junior L., Fonseca P., Rodrigues C., Branco A., Guedes J., 2012, Anrtinociceptive Effect of Ethanolic Extract of *Selaginella convoluta* in mice, *Complementary and Alternative Medicine*, 12 (187),
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., 2015, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5<sup>o</sup> edición, Oxford University Press.



- Hang H. K., Bui H. T., Seo Y. Y., Ji E. K., Sang K. K., Young H. K., 2015, Soluble epoxide hydrolase inhibitory constituents from *Selaginella tamariscina*, Bulletin of the Korean Chemical Society, 36, 300-304.
- Htbg.com. (Hawaii Tropical Botanical Garden). "*Selaginella stellata* of the family Selaginellaceae". Recuperado el 2 de marzo de 2015.
- Huang W. H., Zhou G. X., Wang G. C., Chung H. Y., Ye W. C., Li Y. L., 2012, A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*, Journal of Asian Natural Products Research, 14(4), 401-406.
- Jiang Y., Li D., Ma X., Jiang F., He Q., Qiu S., Li Y., Wang G., 2018, Ionic liquid-ultrasound-based extraction of biflavonoids from *Selaginella helvetica* and investigation of their antioxidant activity, Molecules, 23, 3284.
- Jun-Xia Z., Yang Z., Hui Z., Yi D., Nai-Li W., Yan-Xiong F., Zhi-Yun D., Kun Z., Ming-Ming L., Li-Ying W., Ming F., 2011, New 3'-8''-linked biflavonoids from *Selaginella uncinata* displaying protective effect against anoxia, Molecules, 16, 6206-6214.
- Kang D., Yin M., Oh H., Lee D., Lee H., 2004, Vasorelaxation of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*, Planta Medica, 70, 718-722.
- Khatoun S. S., Rehman M., Rahman A., 2018, Capítulo 3: The role of the Natural Products in Alzheimer's and Parkinson's Disease, H. E. J. Institute of Chemistry, International Center of Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, 69-127.
- Kumar A., Darreh-Shori T., 2017, DMSO: A mixed-Competitive inhibitor of human acetylcholinesterase, American Chemical Society Chemical Neuroscience, 8, 2618-2625.
- Kunert O., Swamy R. C., Kaiser M., Presser A., Buzzi S., Rao A., Schühly, 2008, Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*, Phytochemistry Letters, 1, 171 - 174.
- Lara N., 2014, Estudio fitoquímico y comparativo por UPLC/MS de cuatro especies medicinales del género *Selaginella*, tesis para obtener el grado de M. en C., México, Posgrado UNAM.
- Lee C., Choi H., Kim 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, Biorganic & Medicine Chemistry, 16, 732-738.
- Lee M.K., Lim S. W., Yang H., Sung S. H., Lee Heum-Sook., Parkc, M.J.; Kim Y. C., 2006, Osteoblast differentiation stimulating activity of biflavonoids from *Cephalotaxus koreana*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16, 2850-2854.



- Li D., Qian Y., Tian Y., Yuan S., Wei W., Wuang G., 2017, Optimization of ionic liquid-assisted extraction of biflavonoids from *Selaginella doederleinii* and evaluation of its antioxidant and antitumor activity, *Molecules*, 22, 586.
- Li J., Lei X., Chen K., 2014, Comparison of cytotoxic activities of extracts from *Selaginella* species, *Pharmacognosy Magazine*, 10 (40), 529-535.
- Likhitwitayawuid K., Kaewamatawong R., Ruangrungrasi N., 2005, Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*. *Biochem. Sys. Ecolog.*, 33, 527-536.
- Lim H., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., Kim H. P., 2006, Effects of Anti-inflammatory Biflavonoid, Ginkgetin, on Chronic Skin Inflammation, *Biol. Pharm. Bull.*, 29(5), 1046-1049.
- Lin L-C., Kuo Y.-C., Chou C.-J., 2000, Cytotoxic Biflavonoids from *Selaginella delicatula*, *Journal of Natural Products*, 63, 627-630.
- Lin, L. R., Skaltsounis, A. L., Seguin, E., Tillequin, F., Koch, M. 1994. Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Medica* 60, 168-170.
- Liu H., Yue Q., He S., 2017, Amentoflavone suppress tumor growth in ovarian cancer by modulating Skp2, *Life Sciences*, 198, 96-105.
- López J. A., Pérez J. M., Velasco A., 1994, The biflavonoid pattern of *Selaginella selaginoides*, *Zeitschrift für Naturforsch.* 49c, 265-266.
- López-Sáez J. A., Pérez M. J., Velasco A., 1994, Biflavonoids from *Selaginella denticulata* growing in Spain, *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 49c, 267-270.
- 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.
- Mbwambo Z.H., Kapingu M.C., Moshi M.J., Machumi F., Apers S., Cos P., Ferreira D., Marais J.P.J., Berghe D.V., Maes L., Vlietinck A & Pieters L., 2006, Antiparasitic Activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia liwingstonei*, *Journal of Natural Products*, 69, 369-372.
- Natural Resources Conservation Service (NRCS), PLANTS Database. USDA. Recuperado el 9 de noviembre de 2015.
- Okoko T., 2009a, Chromatographic characterisation, in vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. *Afr. Journal of Biotechnology*, 8(24), 7133-7137.
- Okoko T., 2009b, In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of *Garcinia kola* seeds. *Food Chemical Toxicology*, 47, 2620-2623.
- On S., Aminudin N., Ahmad F., Sirat H. M., Taher M., 2016, Chemical Constituents from Stem Bark of *Garcinia prainiana* and Their Bioactivities,



- Internal Journal of Pharmacognosy Phytochemical Research,8(5), 756-760.
- Pang X., Yi T., Yi Z., Cho S. G., Qu W., Pinkaew D., Fujise K., Liu M., 2009, Morelloflavone, a Biflavonoid, Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Rho GTPases and Extracellular Signal Regulated Kinase Signaling Pathways, *Cancer Research*, 69(2), 518-525.
  - Palmer, D. D. (2003). *Hawai'i's Ferns and Fern Issues 2002-2010 of Contribution* (Hawaii Biological Survey). University of Hawaii Press.
  - Plants.USDA.Gov. "Plants profile for *Selaginella stellate* (starry spikemoss). Recuperado el 2 de marzo de 2015.
  - Plants.USDA.Gov-2. "More information and sources. Recuperado el 2 de marzo de 2015.
  - Prashant T., Dheeraj A., Anish C., Bharti A., 2014, Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla*, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, 581-586.
  - 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., Flavonoides con actividad antiprotozoaria, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 6-21.
  - Rojas A., Bah M., Rojas J. I., Serrano V., Pacheco S., 1999, Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders, *Phytomedicine*, 6, 367-371.
  - Rodrigues J., Rinaldo D., Dos Santos L. C., Vilegas W., 2007, An unusual C6-C6` linked flavonoid from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Phytochemistry*, 2007, 68, 1781-1784.
  - Rosenzwing M. R., Leiman A. I., 1992, *Psicología fisiológica*, 2° edición McGraw-Hill.
  - Sah, N. K., Singh S. N., Sahdev S., Banerji S., Jha V., Khan Z., Hasnain S. E., 2005, Indian herb sanjeevani (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultraviolet and oxidative stress, *Journal of Biosciences*, 30 (4), 499-505.
  - Shang X., He X., He X., Li M., Zhang R., Fan P., Zhang Q., Jia Z., 2010 The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review, *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 279-313.
  - Shaoguang L., Meifeng Z., Yuxiang L., Yuxia S., Hong Y., Liying H., Xinhua L., 2013, Preparative Isolation of Six Anti-Tumour Biflavonoids from *Selaginella doederleinii* Hieron by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Phytochemical Analysis*, 127-133.
  - Siddiqui A., Swarnkar G., Sharan K., Chakravarti, B., Sharma G., Rawat P., Kumar M., Khan F. M., Pierroz D., Maurya R., Chattopadhyay N., 2010, 8,8`-Biapigeninyl stimulates osteoblast functions and inhibits





- osteoclast and adipocyte functions: Osteoprotective action of 8,8''-biapigeninyl in ovariectomized mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323, 256-267.
- Silva G., Chai H., Gupta M., Fransworth N., Cordell G., Pezzuto J., Beecher C., Kinghorn D., 1995, Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdernessii*, *Phytochemistry*, 40(1), 129-134.
  - Silva V., Dos Santos M., Viegas C., 2017, Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review, *Medicinal Chemistry*, 29 pags.
  - Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J., 2005, Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7° edición, John Willey & Sons Inc.
  - Skopp G., Schwenker G., 1986, Biflavonoide aus *Schinus terebinthifolius* Rabbi (Anacardiaceae), *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 41(b), 1479-1482.
  - Stafford H., 1990, *Flavonoid metabolism*, CRC Press, USA.
  - Stolze, Robert G. (1983). "Ferns and fern allies of Guatemala. Part III. Marsileaceae, Salviniaceae, and the fern allies": 51.
  - Swamy R. C., Kunert O., Schülhy W., Bucar, F., Ferreira D., Ranni VS Kumar B. Appa R. AVN, 2006, Structurally unique biflavonoids from *Selaginella crysochaetos* and *Selaginella bryopteris*, *Chemistry & Biochemistry*, vol 3., 405-414.
  - Wada S., Hitomia T., Tokuda H., Tanaka R., 2010, Anti-Tumorinitiating effects of Spiro-biflavonoids from *Abies sachalinensis*, *Chem. Biodivers.*, 2010, 7(9), 2303-2308.
  - Wang C. J., Hu C. P., Xu K. P., 2010. Protective effect of selaginellin on glutamate-induced cytotoxicity and apoptosis in differentiated PC12 cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381(1) 73-81.
  - 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.
  - Wang Y., Zang J., Wang Y., Yang J., Li H., Cai L., 2016, Anti-proliferative constituents from *Selaginella pulvinata*, *Phytochemistry Letters*, 15, 26-29.
  - Weniger B., Vonthron-Senecheau C., Kaiser M., Brun R., Anton R., 2006, Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids, *Phytomedicine*, 13, 176-180.
  - Yuan C., Nin-Hua T., Ji-Jun C., Guang-Zhi Z., Yun-Bao M., Yong-Ping W., He Y., Jie Y., Lai-Feng L., Qiang W., 2010, Bioactive flavone and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron, *Fitoterapia*, 81, 253-258.
  - Zhang G., Zhang Y., Ma E., Guan J., Xue F., Liu H., Sun X., 2012, Isolation and cytotoxic activity of selaginellin derivatives and biflavonoids from *Selaginella tamariscina*, *Planta Medica*, 78, 390-392.

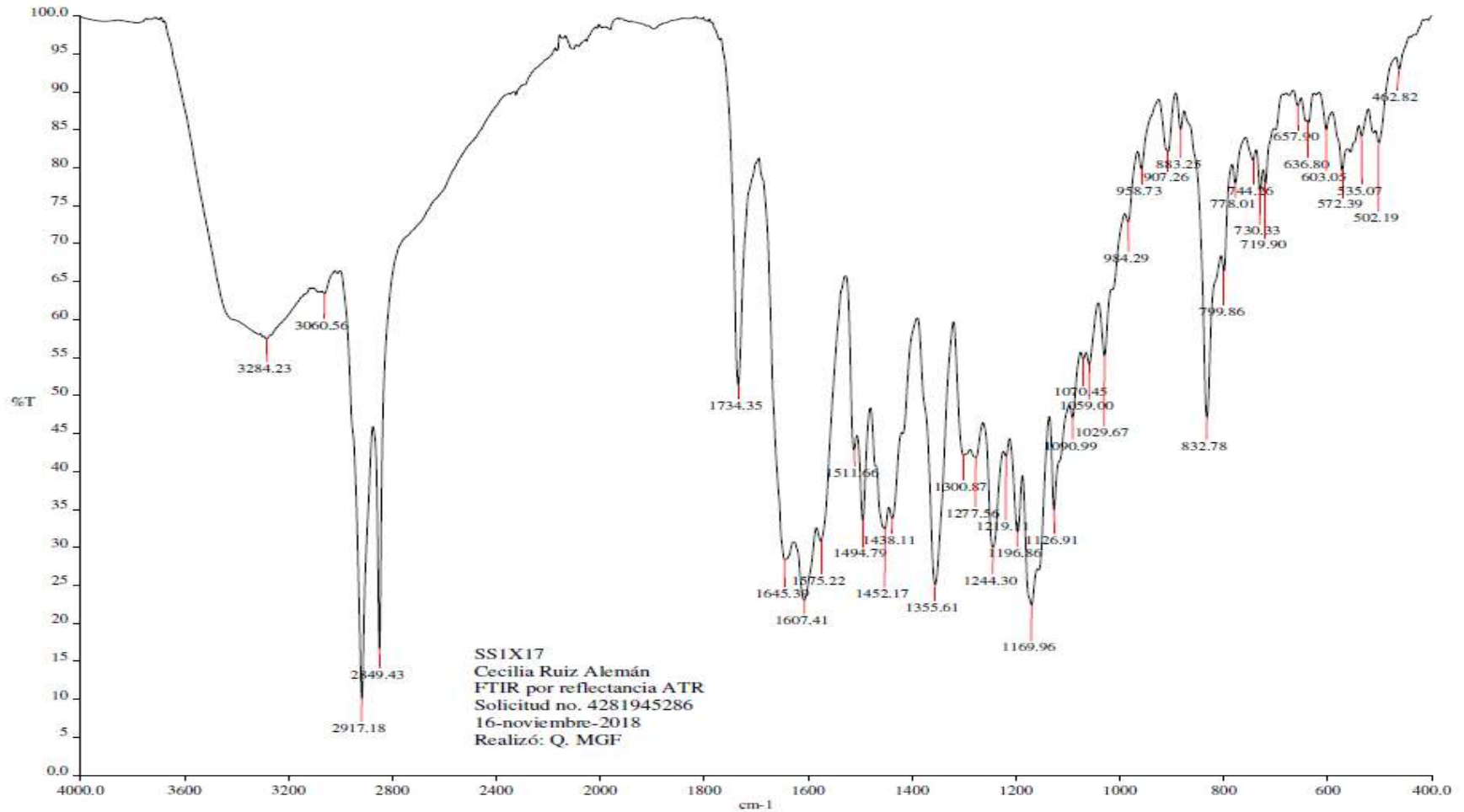


- Zhang Y., Shi S., Wang Y., Huang K., 2011, Target guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by offline coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments. *Journal of Chromatography B*, 879, 191-196.
- Zhang Y., Li Q., Yan L., Shi Y., 2011, Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 2173-2186.
- Zheng X., Du J., Xu Y., Zhu B., Liao D., 2007, A new steroid form *Selaginella pulvinata*, *Fitoterápia*, 78, 598-599.
- Zheng X., Li Y., Zhang L., Feng W., Zhang X., 2011, Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring, *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 531-537.
- Zhu T., Chen K., Zho W., 2008, A new flavone glycoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Chinese Chemical Letters* 19, 1456-1458.
- Zou H., Xu K., Li F., Zou Z., Long H., Li G., Wang H., Tan G., 2013, Uncinataflavone, a new flavonoid with a methyl benzoate substituent from *Selaginella uncinata*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 15 (4), 408-413.
- <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/tratamientos?lang=es-MX>
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=sus-to&letra=S&opcion=D&id=2623>.
- <http://www.tropicos.org/Name/26619541>



### 13) ESPECTROS IR Y RMN

Espectro 1: Espectro de IR del precipitado formado durante la extracción.

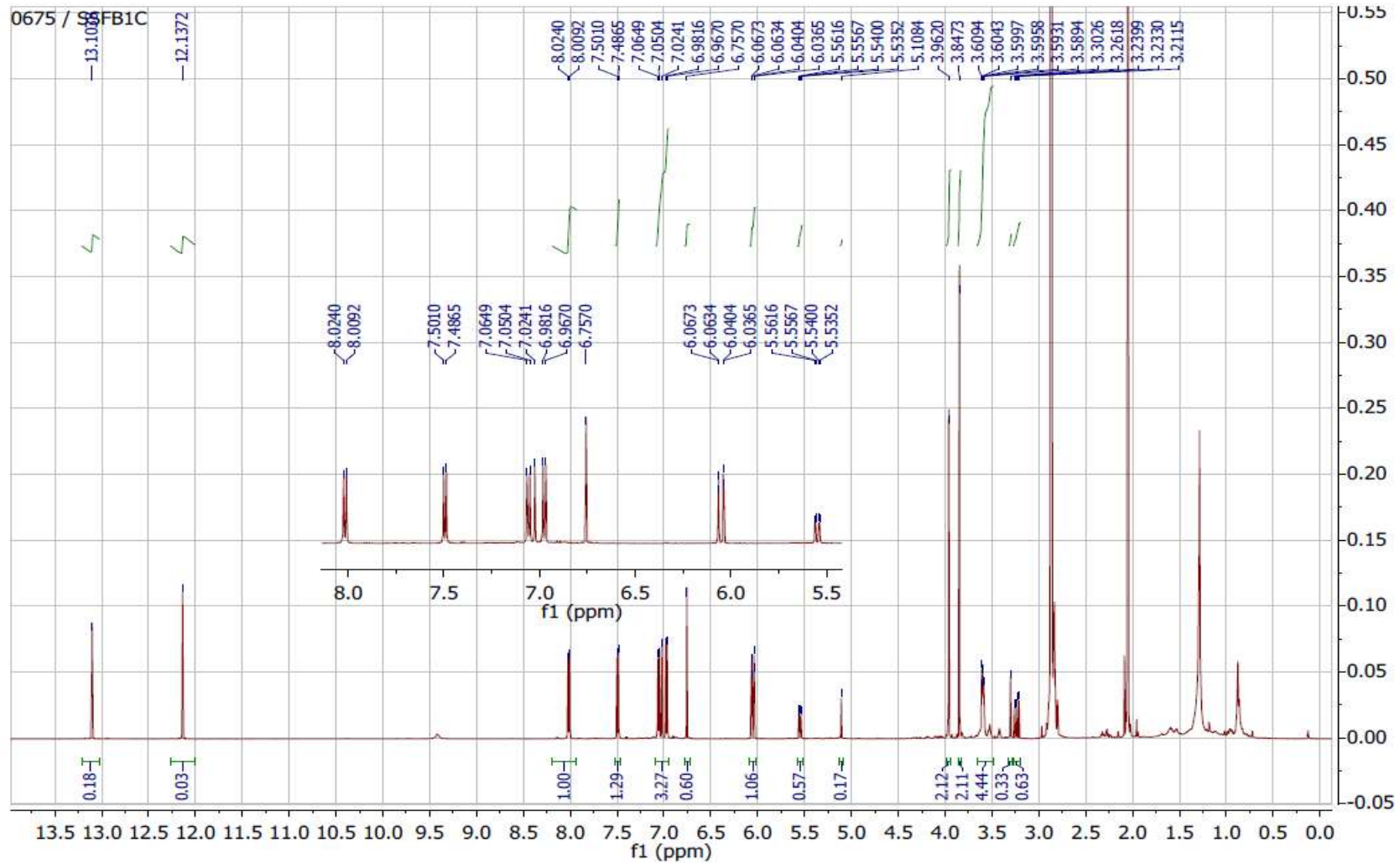


SS1X17  
Cecilia Ruiz Alemán  
FTIR por reflectancia ATR  
Solicitud no. 4281945286  
16-noviembre-2018  
Realizó: Q. MGF

c:\documents and settings\peservice\my documents\zip ir-uv\farmacia\dra. isabel aguilar\cecilia ruiz aleman\ss1x17.asc - 162 By viernes, noviembre 16 2018

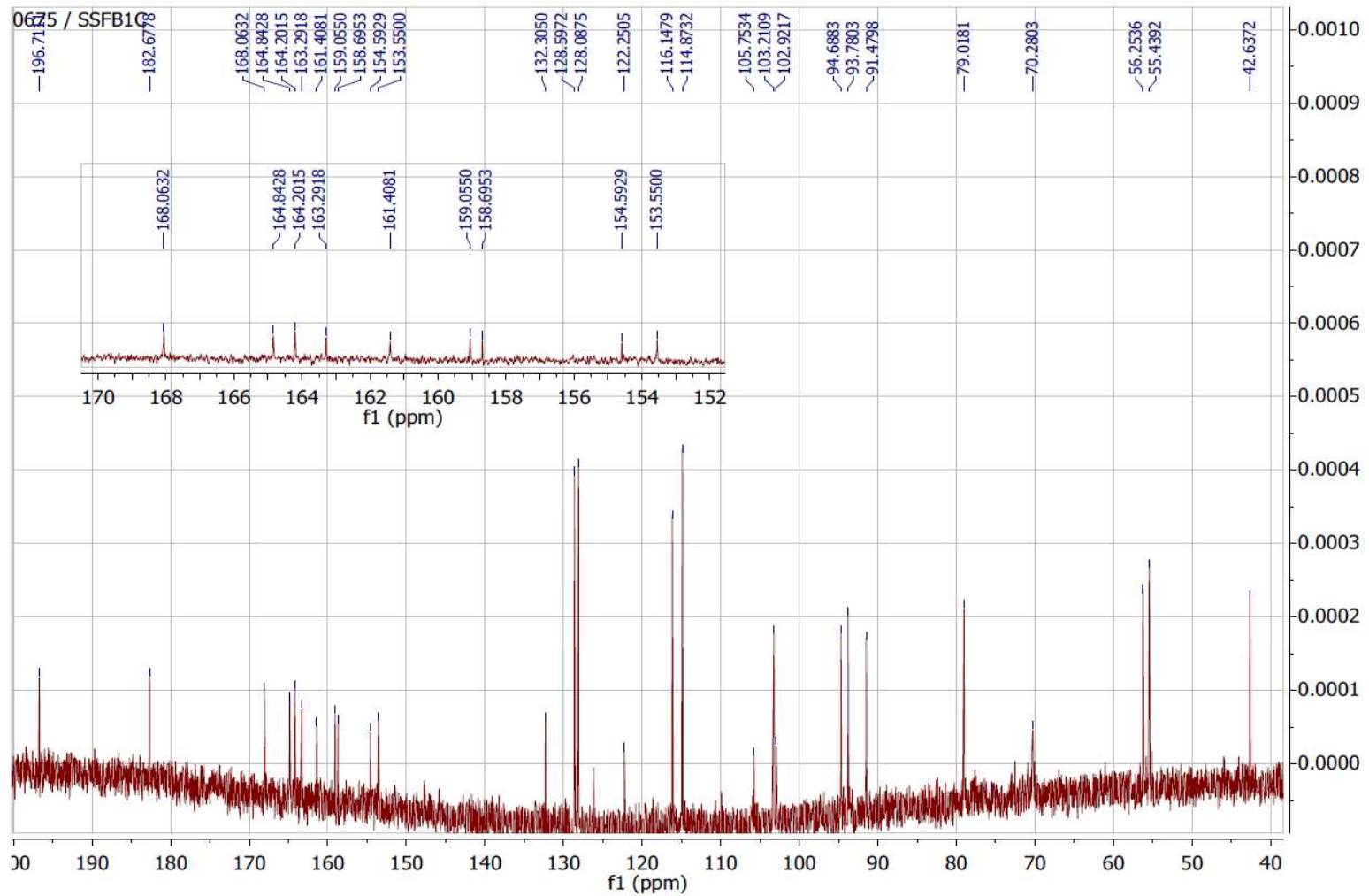


Espectro 2: Espectro de RMN-1H del compuesto 1, 7-O-metiléter 2'',3''-dihidroisocriptomerina.



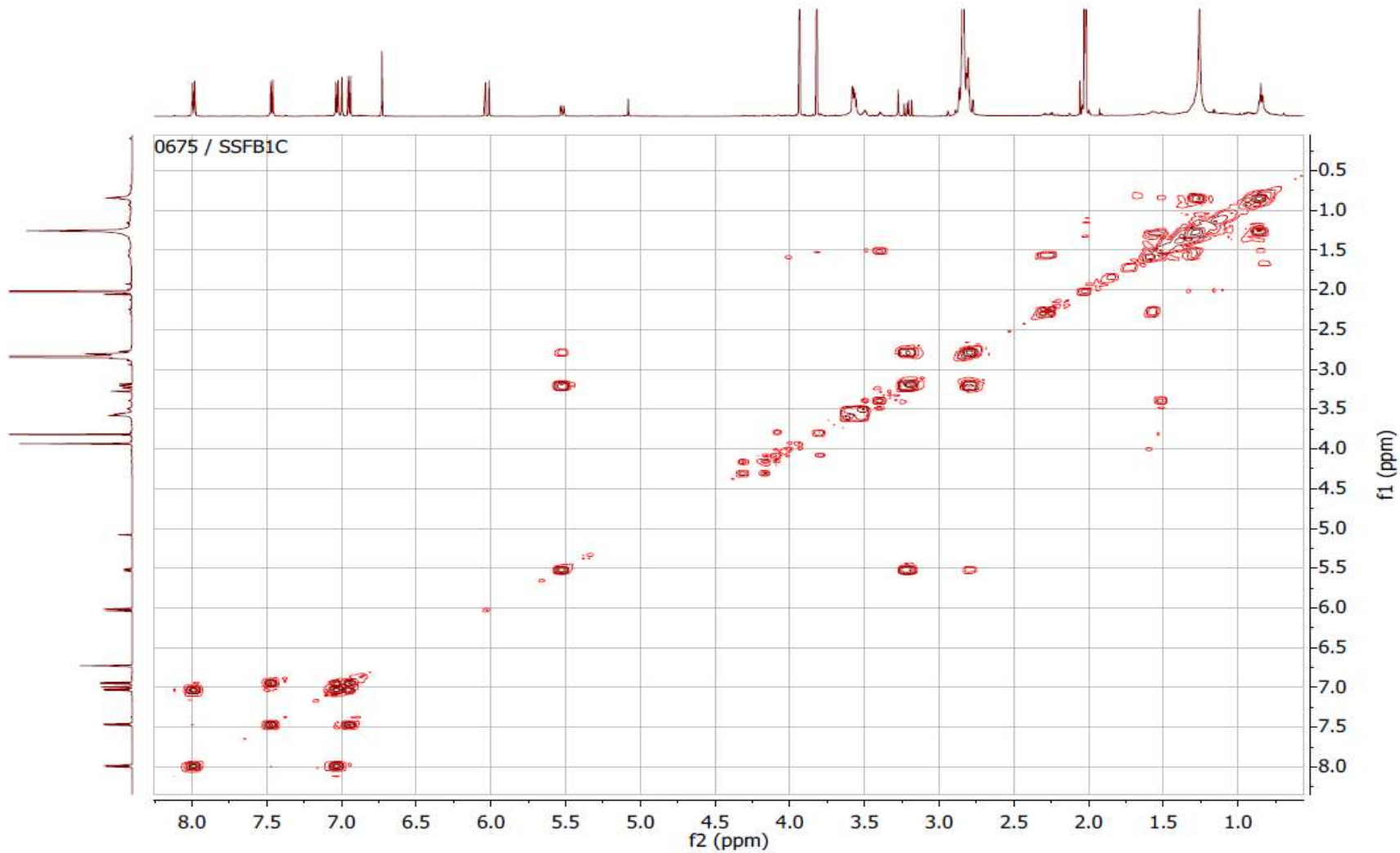


Espectro 3: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 1, 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina.



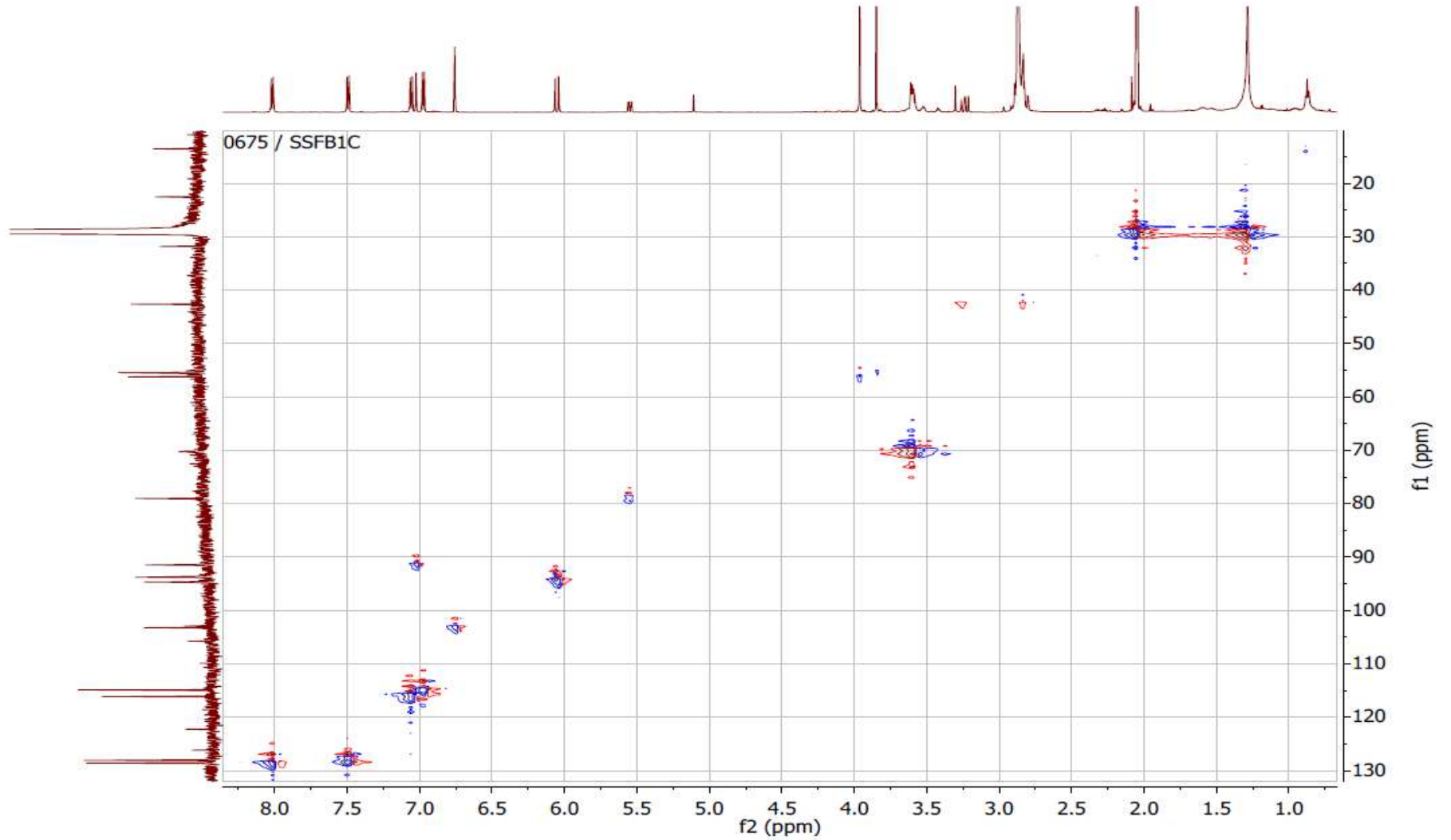


Espectro 4: Espectro COSY del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihiroisocriptomerina (1).



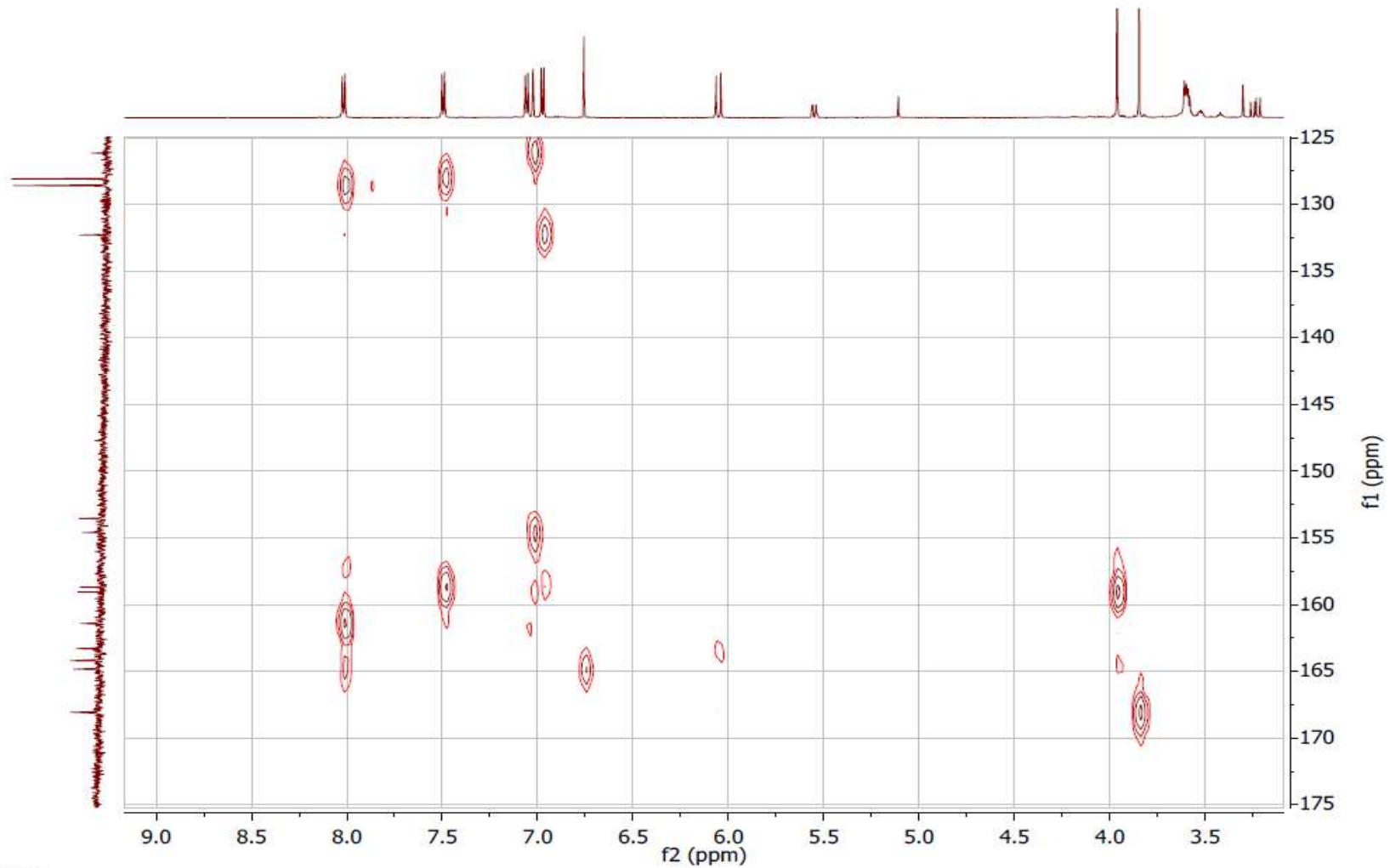


Espectro 5: Espectro HSQC del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).





Espectro 6: Espectro HMBC del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).

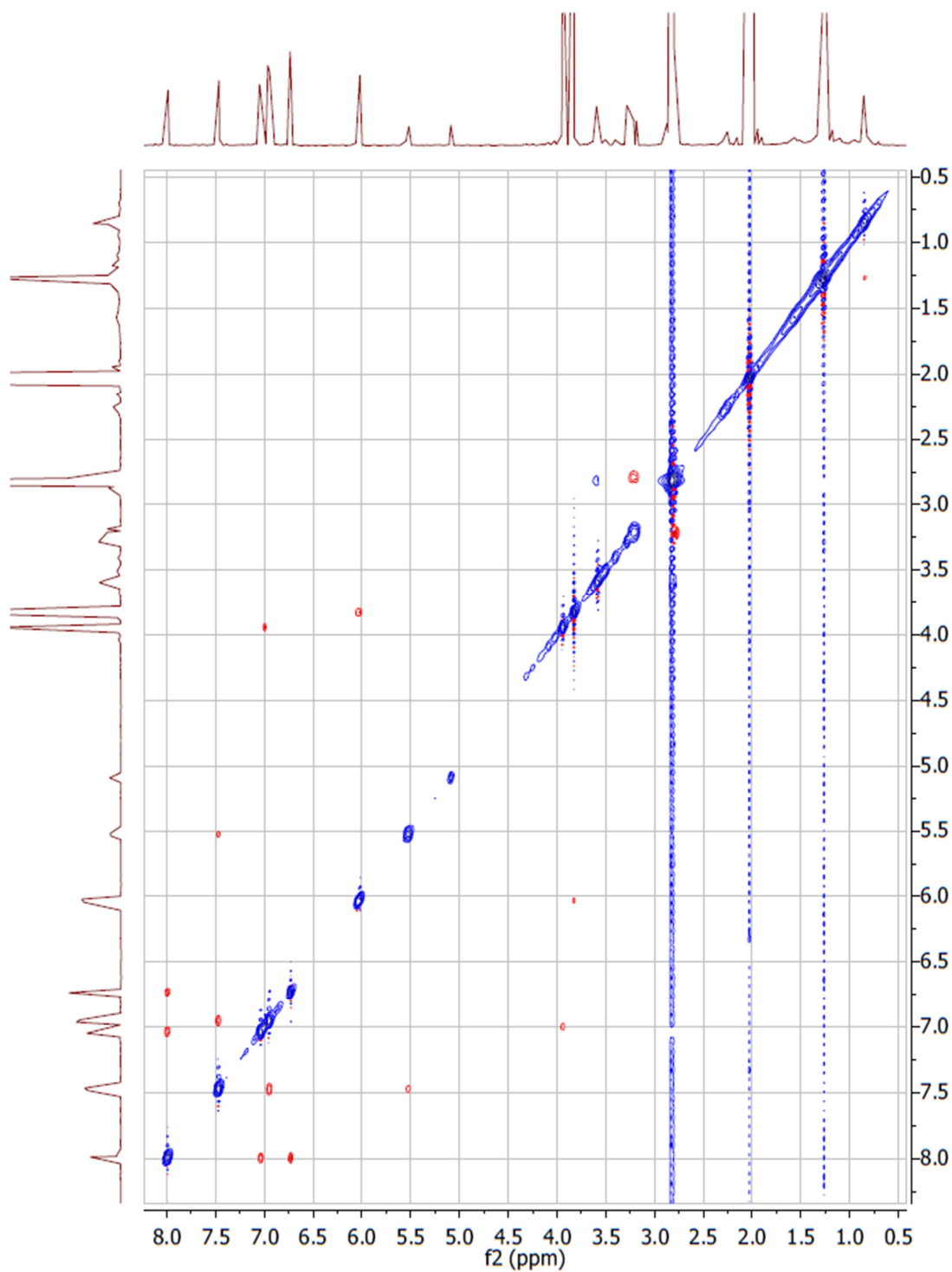


0675 / SSFB1C —



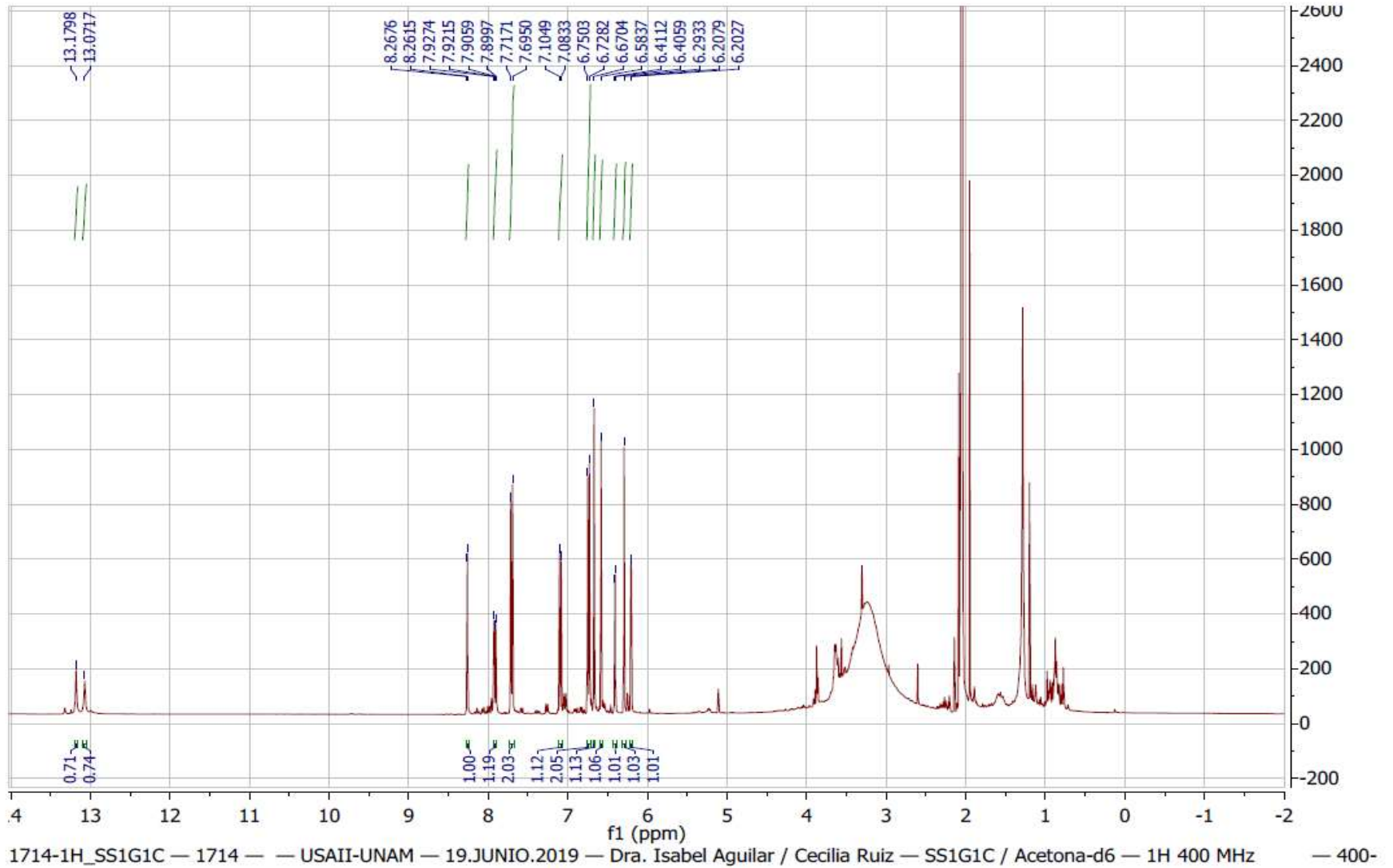


Espectro 7: Espectro NOESY del compuesto 7-O-metil 2'',3''-dihidroisocriptomerina (1).



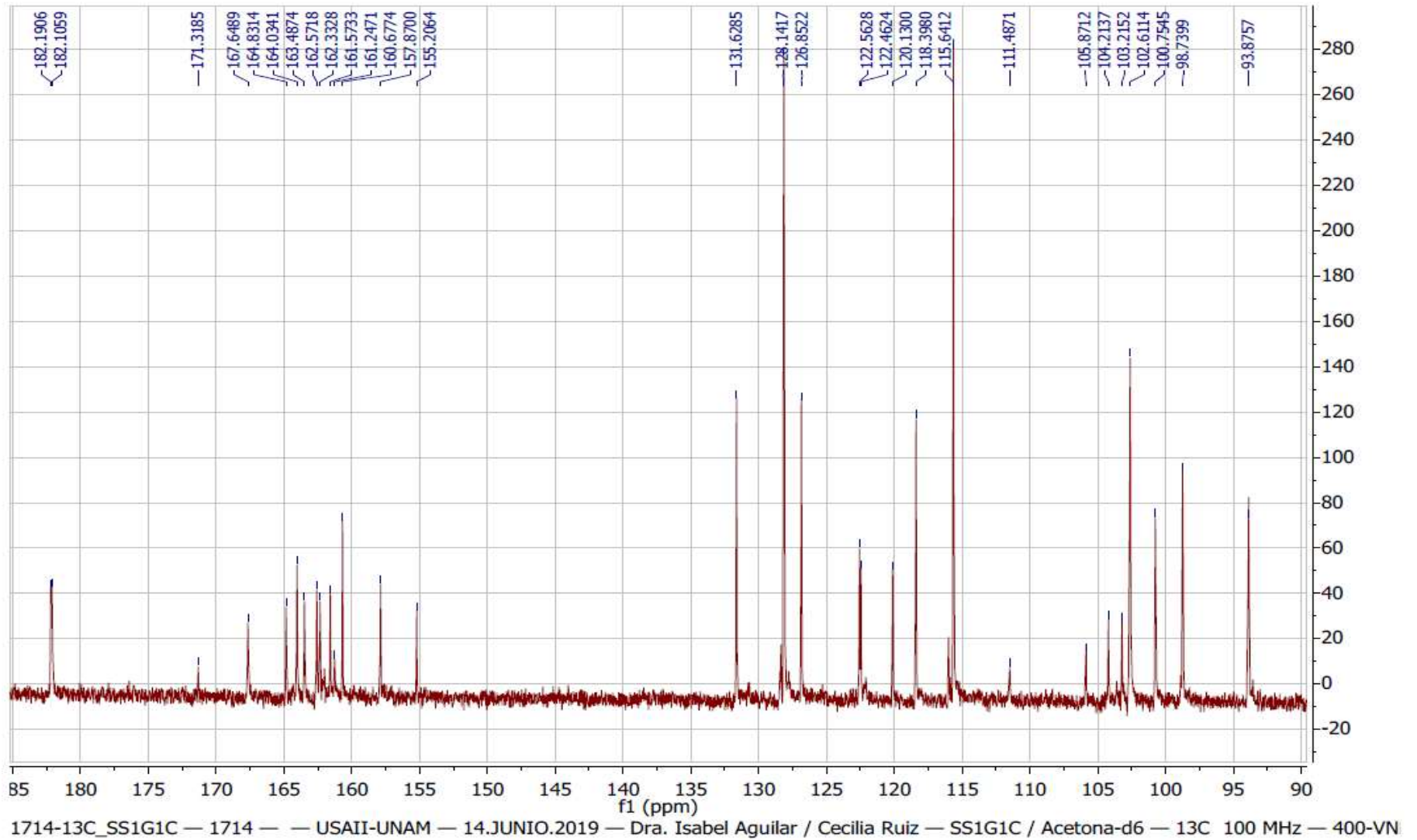


Espectro 8: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la amentoflavona (2).



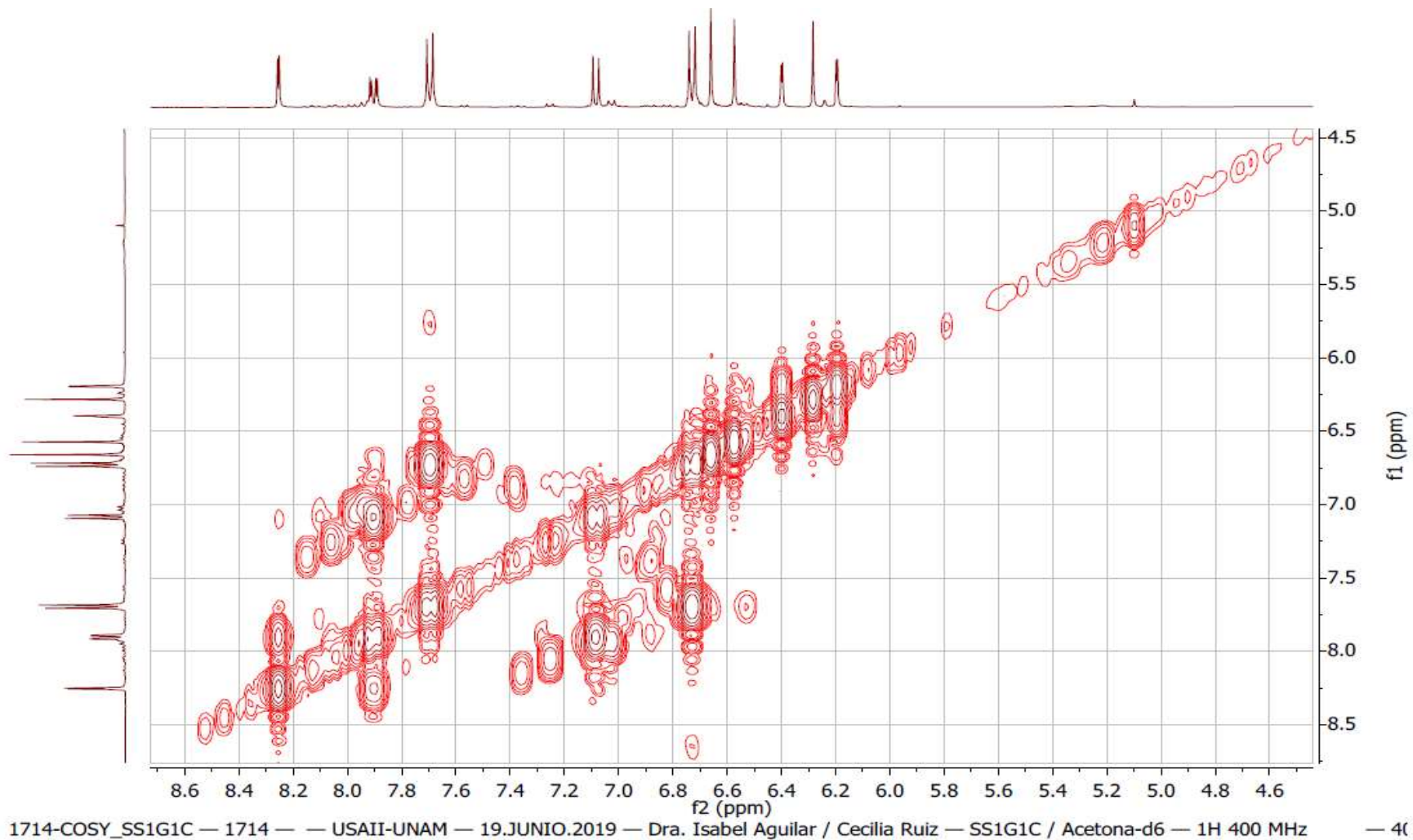


Espectro 9: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la amentoflavona (2).



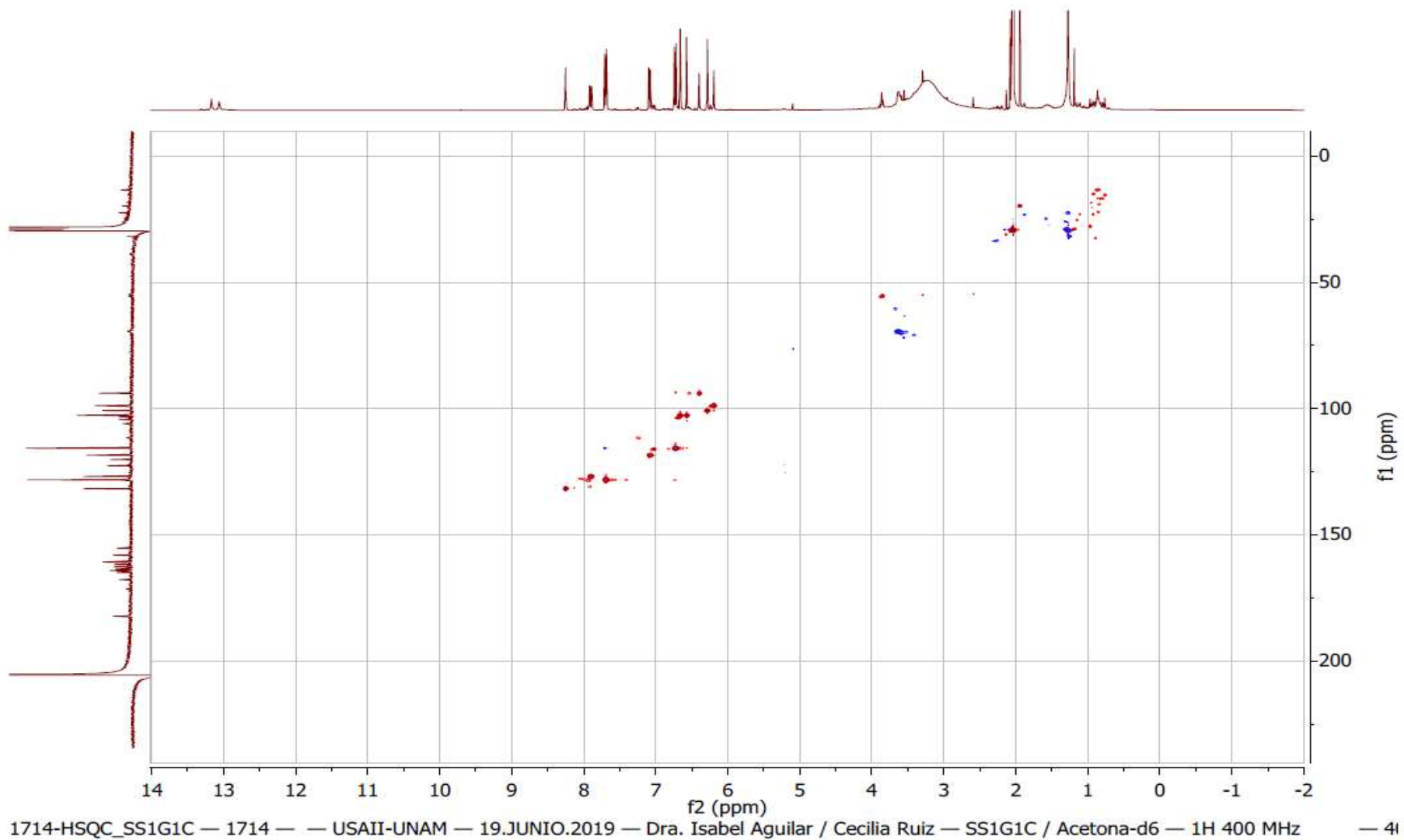


Espectro 10: Espectro COSY de la amentoflavona (2).



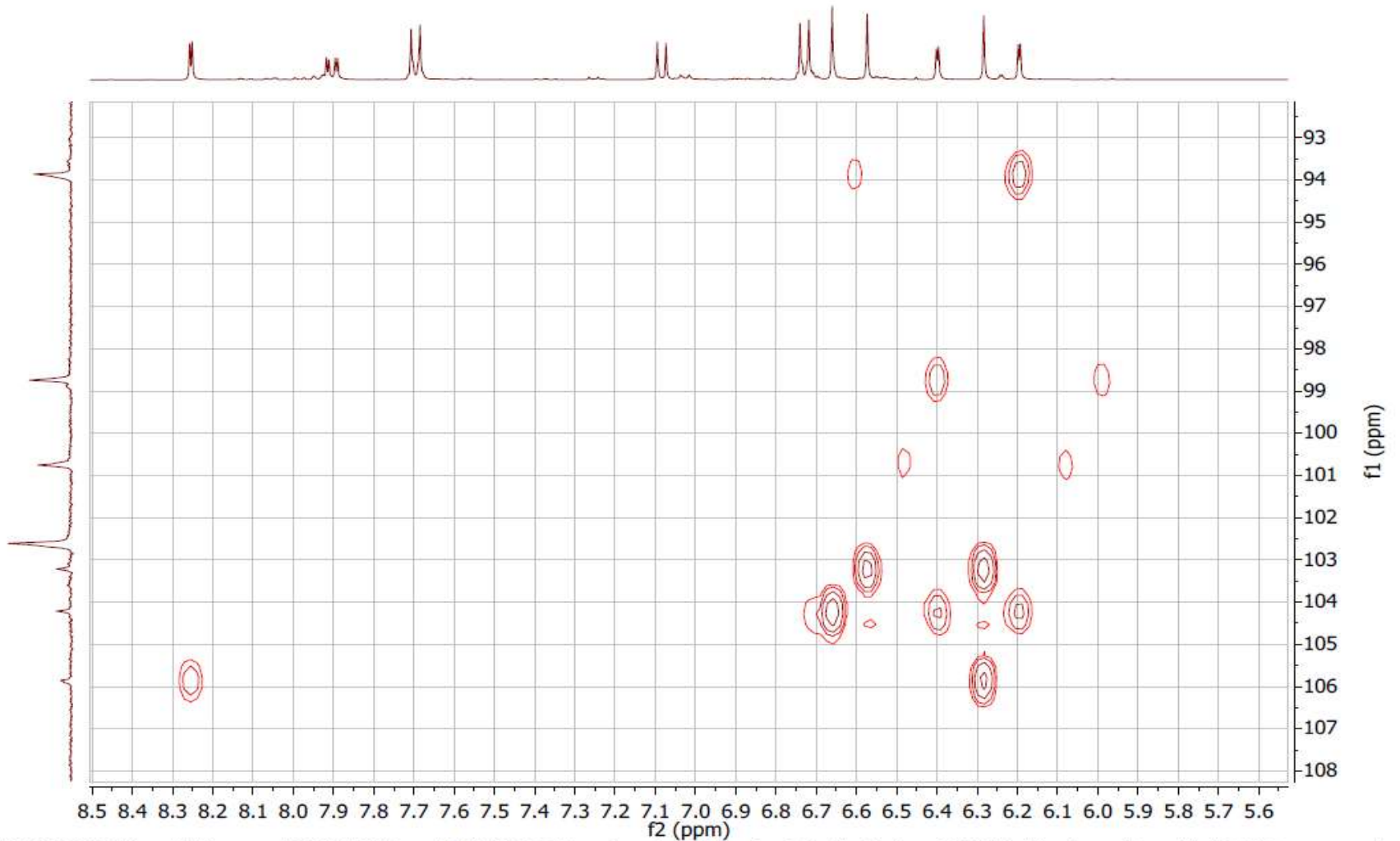


Espectro 11: Espectro HSQC de la amentoflavona (2).



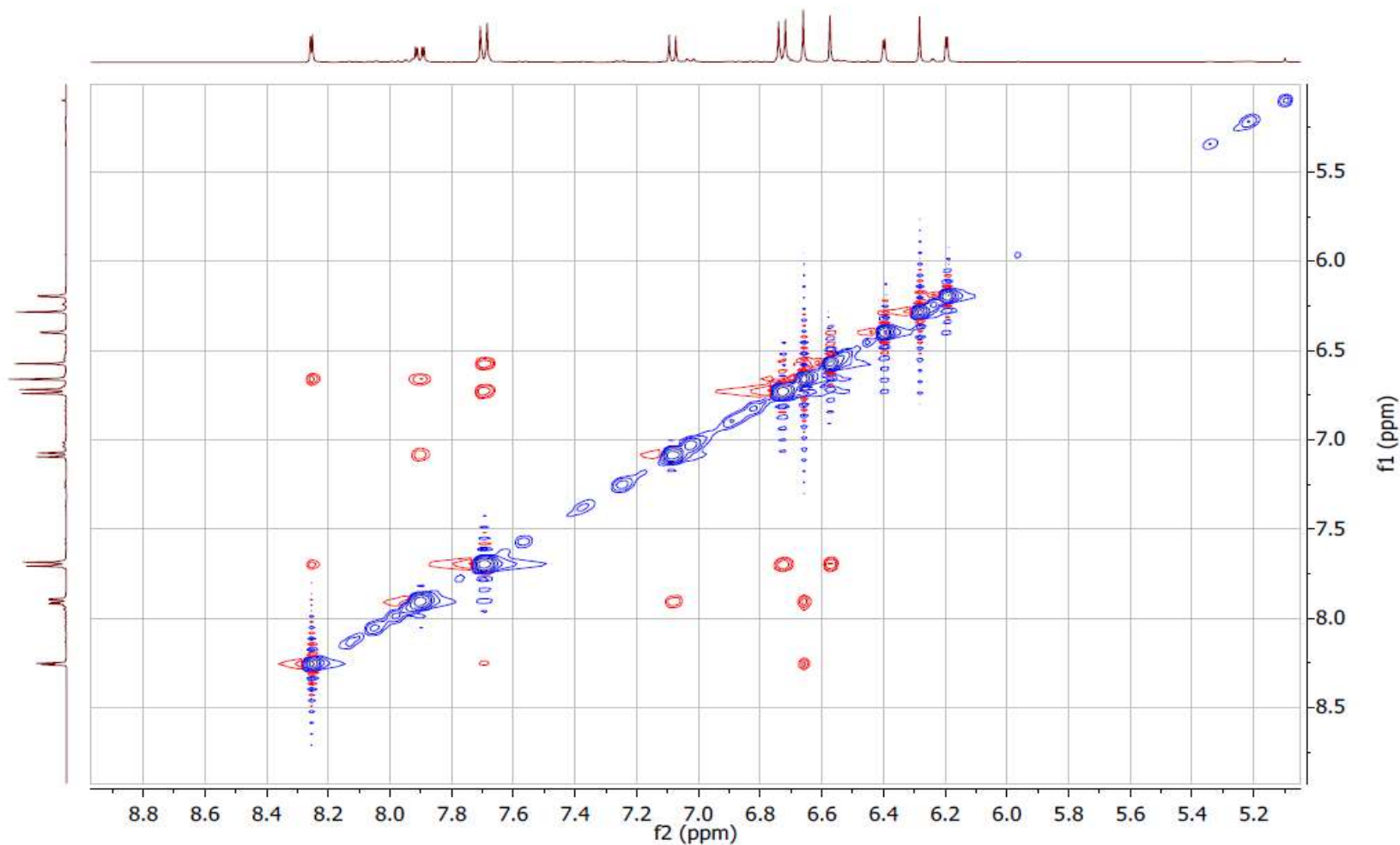


Espectro 12: Espectro HMBC de la amentoflavona (2).





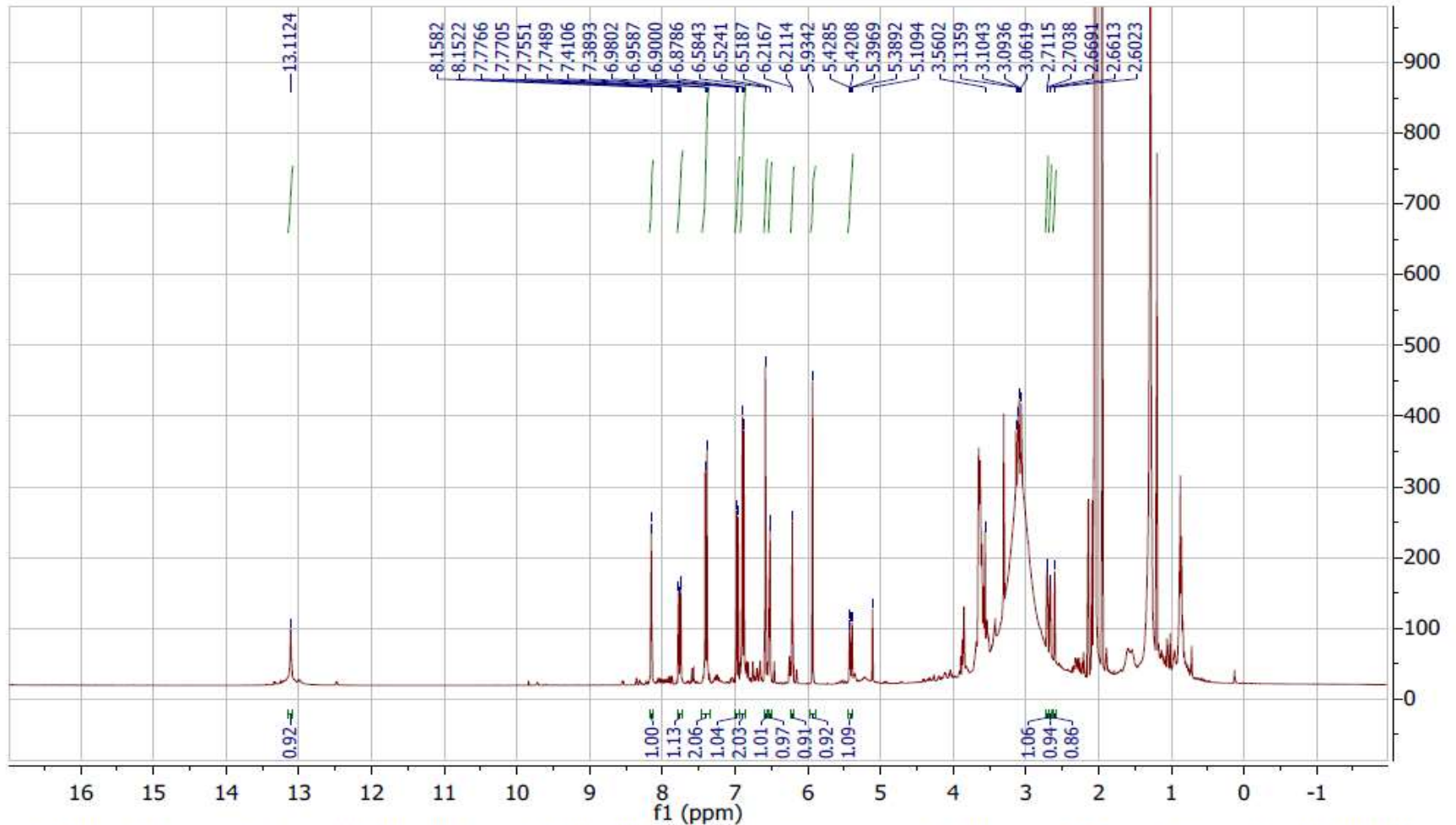
Espectro 13: Espectro NOESY de la amentoflavona (2).



1714-NOESY\_SS1G1C — 1714 — — USAII-UNAM — 19.JUNIO.2019 — Dra. Isabel Aguilar / Cecilia Ruiz — SS1G1C / Acetona-d6 — 1H 400 MHz



Espectro 14: Espectro del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

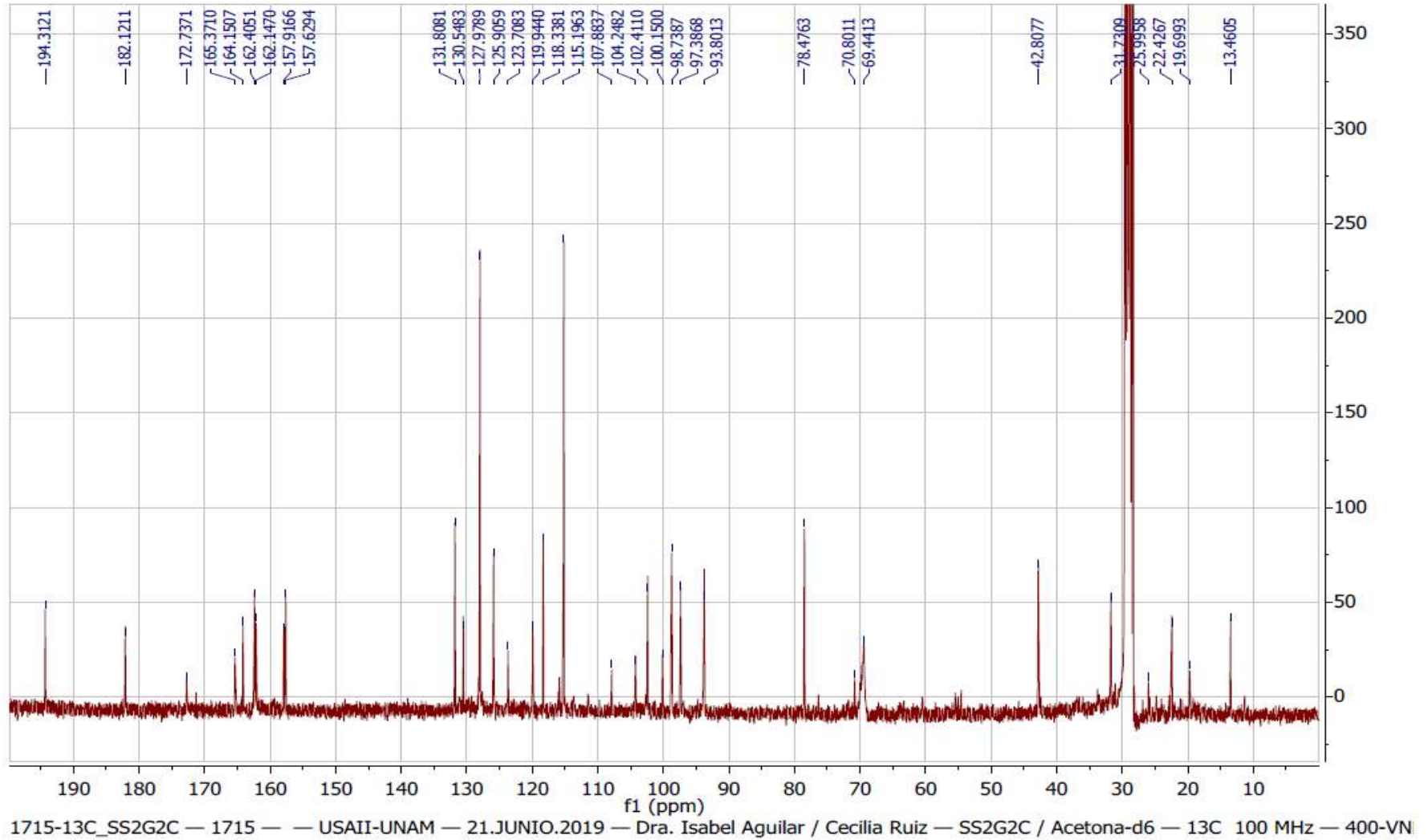


1715-1H\_SS2G2C — 1715 — — USAII-UNAM — 25.JUNIO.2019 — Dra. Isabel Aguilar / Cecilia Ruiz — SS2G2C / Acetona-d6 — 1H 400 MHz



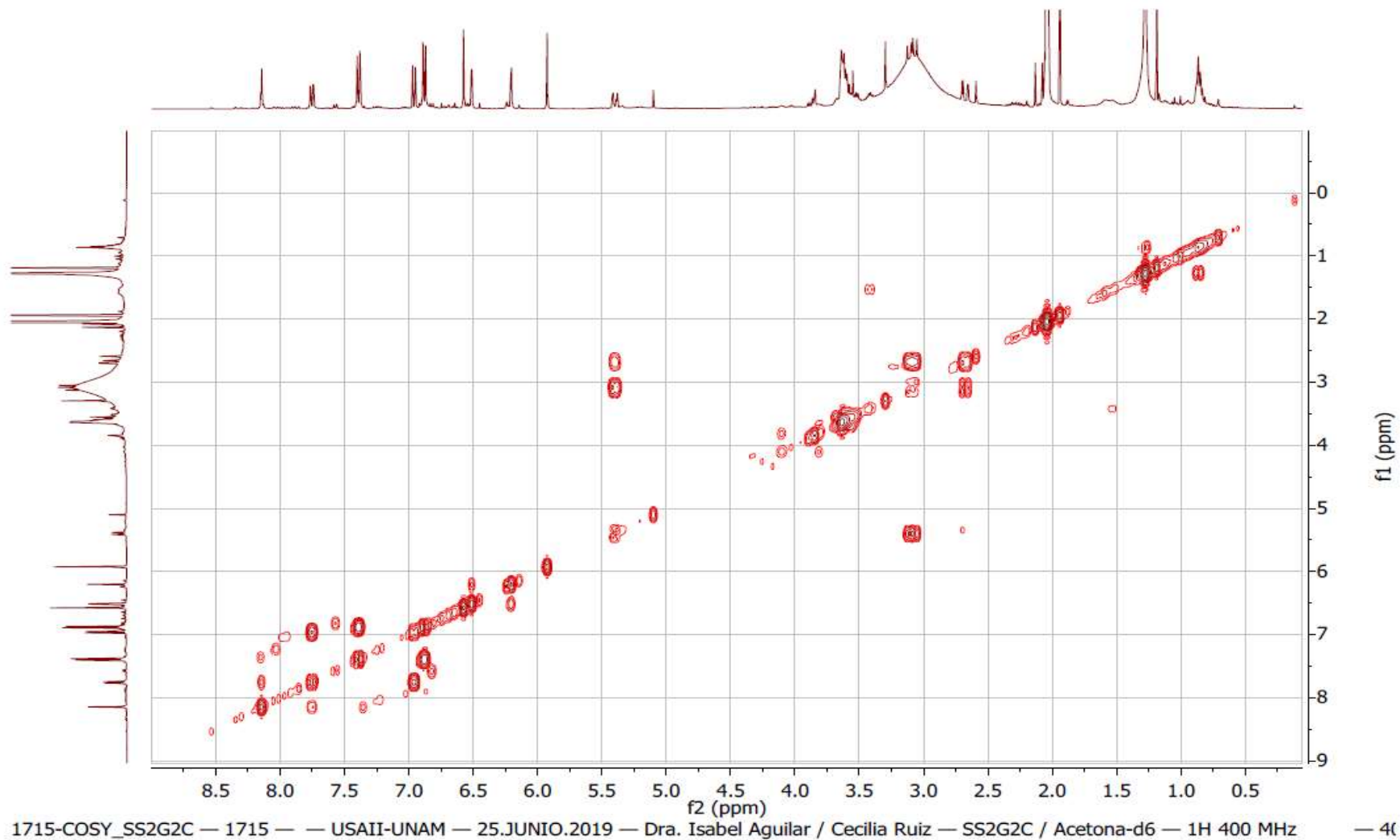


Espectro 15: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).



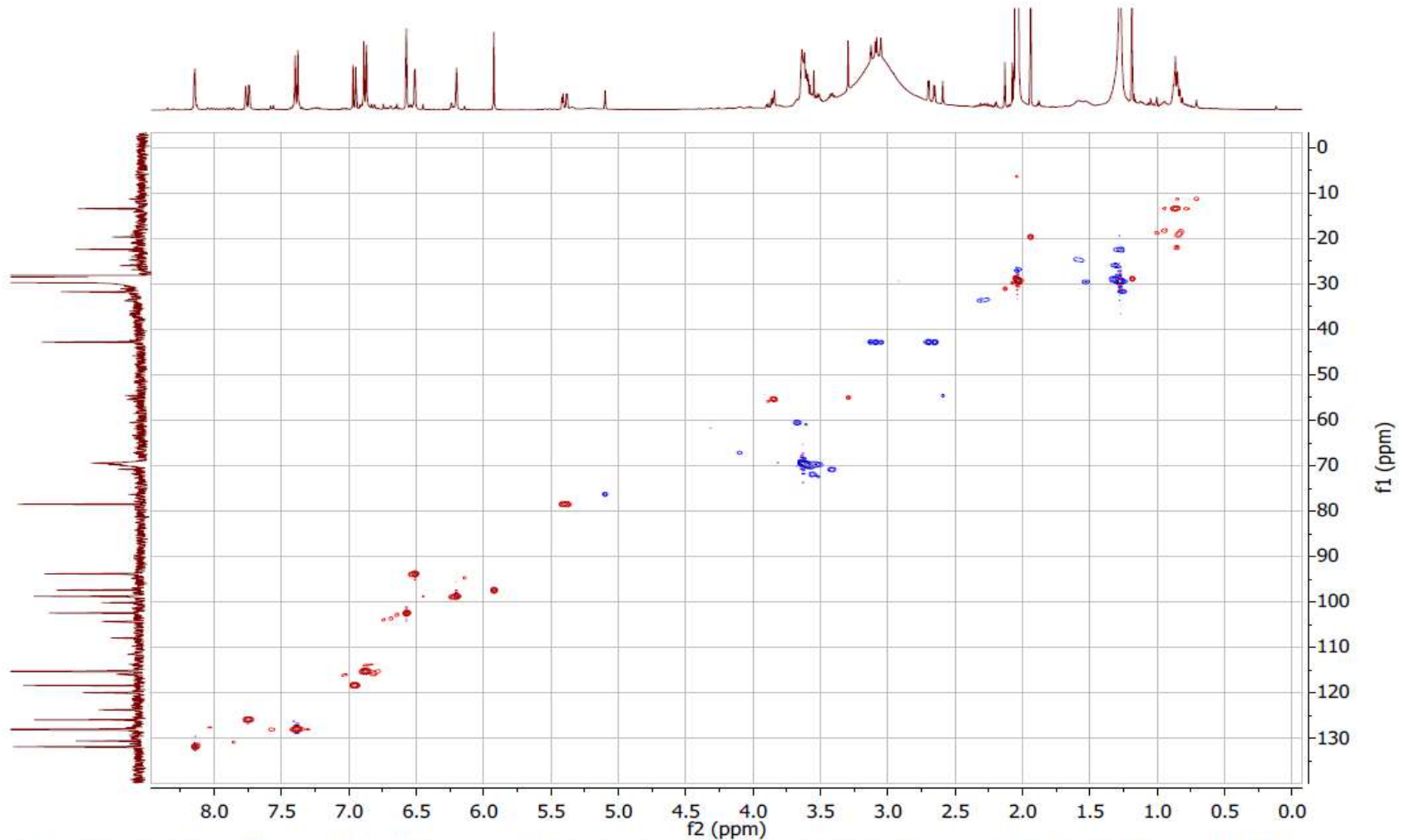


Espectro 16: Espectro COSY del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).





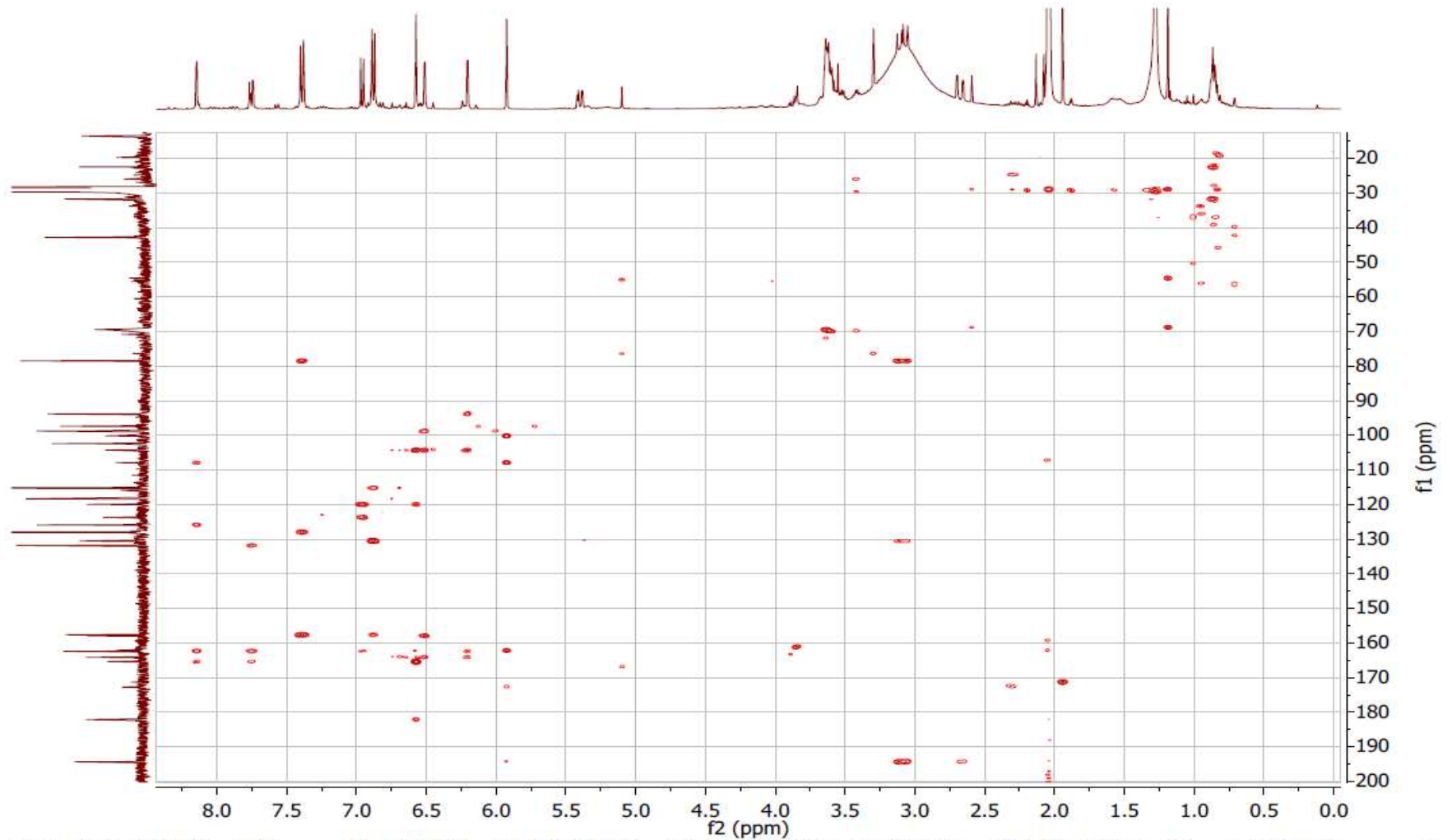
Espectro 17: Espectro HSQC del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).



1715-HSQC\_SS2G2C — 1715 — — USAII-UNAM — 25.JUNIO.2019 — Dra. Isabel Aguilar / Cecilia Ruiz — SS2G2C / Acetona-d6 — 1H 400 MHz — 41



Fracción 18: Espectro HMBC del compuesto 2'',3''-dihydroamentoflavona (3).





Espectro 19: Espectro NOESY del compuesto 2'',3''-dihidroamentoflavona (3).

