



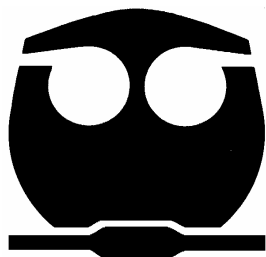
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y
BIOLÓGICA DE BIFLAVONOIDES
DE *Selaginella lepidophylla* SPRING

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
MARYOSAWA GUEVARA ROMERO



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Blas Lotina Hennsen
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. Suplente	Dr. Javier Andrés Juárez Díaz
2do. Suplente	M. en C. Selene Fragoso Iñiguez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia y Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, conjunto "E", Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria.

Asesor:

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Supervisor Técnico:

M. en C. Beatriz King Díaz

Sustentante:

Maryosawa Guevara Romero

A mamá:

Por el interminable amor que me ha brindado desde que me dio la vida, por sus sacrificios y su apoyo, por alentarme a cumplir mis sueños a pesar de las adversidades y ayudarme a culminar esta etapa, por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo se puede alcanzar en esta vida, y principalmente porque es una mujer admirable.

A Getse:

Por ser una linda hermana, de gran corazón y espíritu noble, por convertirse en mi cómplice y confidente, gracias por sus geniales ocurrencias, por darme comprensión, compañía, apoyo incondicional e iluminarme con su tierna sonrisa.

A Julio César:

Porque ha llenado mi vida de hermosos momentos, por quererme no con expectación sino con esperanza, bondad y dedicación, por alentarme y acompañarme mientras persigo mis sueños, gracias por procurarme, por abrir su corazón y en especial por hacerme sentir amor.

A Pily:

Porque más que una tía, ha sido como una hermana, por darme tanto cariño y apoyarme en toda decisión, por cada palabra de aliento, gracias por escucharme y enseñarme a disfrutar cada instante porque el tiempo no se detiene ni retrocede.

A la memoria de mis abuelos:

A mi abuelita Guille, a quien no tuve la fortuna de conocer pero que en sueños me ha motivado a continuar mi camino. A mi querido abuelito Pablo, quien solo estuvo en mis primeros años pero dejó una huella imborrable en mi corazón, basta con recordar el brillo de sus ojos para avivar mi espíritu.

A Nidia:

Porque soy muy afortunada al tenerla como amiga, por ser tan linda y comprensiva, gracias por todo lo que hemos compartido

A los que me han apoyado en diversas etapas:

Mis tíos: Eduardo, Sol y Arturo por su cariño. Los peques: Regina, Dieguito, Aby, Sebastián, Jazmín y Estefanía por sus sonrisas, detalles y la inocencia que los caracteriza. A Noemí, Marco, Marino, Keno, Ceci, Julio Gabriel y Rafa porque me han dado su ayuda. A Motita por los espacios y por alegrar mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de pertenecer a la “máxima casa de estudios” y porque a través de la Facultad de Química me ha otorgado innumerables conocimientos y vivencias que me permiten, no sólo cumplir una de mis metas, sino que también me dan los cimientos para forjar un mejor futuro.

A la DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN211807.

Dra. Rachel Mata Essayag, por la tan acertada sugerencia para el estudio de la planta medicinal *Selaginella lepidophylla*.

Dr. Robert Bye del Jardín botánico del Instituto de Biología, UNAM, por la identificación botánica del material vegetal.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por sus valiosos comentarios y observaciones durante el desarrollo de esta tesis.

Dra. Mabel Fragoso, por la orientación y apoyo para la realización de las pruebas de citotoxicidad.

M. en C. Víctor Manuel Navarro, del Centro de Investigaciones Biomédicas de Sur, IMSS, por la realización de las pruebas antimicrobianas.

M. en C. Beatriz King Díaz, por la supervisión de este trabajo, por el apoyo, orientación y paciencia para el desarrollo de la parte bioquímica.

Al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI): M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, Q.F.B. Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta y M. en C. Yolanda González Quezada, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

A la Dra. María Isabel Chávez Uribe por la asesoría y apoyo en la parte de elucidación estructural.

A los miembros del jurado designado, por la revisión del manuscrito de tesis.

Al Q. Pedro Villanueva por su apoyo, por los consejos y motivación que siempre me dio y por contribuir enormemente en mi formación académica y personal.

Por último, un agradecimiento muy especial a la Dra. Isabel Aguilar por la oportunidad de realizar este trabajo de tesis bajo su dirección, por estar siempre al pendiente, por su orientación, paciencia y enseñanzas, por el tiempo que me dedicó y preocuparse por mi, por hacer que el trabajo tuviera un valor más que académico, por los consejos y el ánimo que en todo momento me brindó y por ser una persona excepcional.



ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tablas.....	xiii
Lista de Espectros	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	1
Objetivo General	2
Objetivos Específicos.....	2
I. GENERALIDADES	3
A. Familia <i>Selaginellaceae</i>	3
B. Género <i>Selaginella</i>	4
C. Características de <i>Selaginella lepidophylla</i>	4
1. Nombres comunes	4
2. Clasificación taxonómica.....	6
3. Características botánicas	6
4. Distribución	8
5. Propiedades medicinales	9
6. Antecedentes fitoquímicos	9
D. Flavonoides y biflavonoides.....	10
1. Estructura química	10
2. Clasificación de los flavonoides	11
3. Propiedades físicas.....	12
4. Biosíntesis.....	13
5. Función en las plantas	15
6. Biflavonoides.....	16
7. Aplicaciones	19
E. Alelopatía.....	20



F. Herbicidas.....	21
G. Fotosíntesis	22
1. Reacción de Hill	23
2. Transporte de electrones	23
a. Fotosistema II	24
b. Fotosistema I	25
c. Fotofosforilación	26
3. Inhibidores del transporte de electrones	26
4. Inhibidores de la transferencia de energía	26
5. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	27
II. METODOLOGÍA	29
A. Material vegetal	29
B. Ensayos biológicos.....	29
1. Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
2. Determinación de la actividad citotóxica	30
3. Determinación de la actividad antimicrobiana	31
a. Difusión en agar	31
b. Dilución en agar	31
4. Determinación del efecto fotosintético	32
a. Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila	32
b. Determinación de la síntesis de ATP	33
c. Determinación del transporte de electrones	34
d. Determinación del transporte de electrones de los fotosistemas	36
e. Reacciones parciales del fotosistema II	37
f. Reacciones parciales del fotosistema I	38
g. Actividad de Mg ²⁺ -ATPasa	38
h. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	39
C. Estudio fitoquímico	40
1. Métodos cromatográficos	40
2. Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	41



3. Reacción general de acetilación	41
4. Extracción y fraccionamiento preliminar	42
5. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo	42
6. Aislamiento de los biflavonoides	44
7. Aislamiento de un azúcar peracetilado	44
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
A. Obtención de los extractos	45
B. Ensayos biológicos	46
1. Determinación de la toxicidad de extractos y fracciones contra <i>Artemia salina</i>	46
2. Determinación de la actividad citotóxica	46
3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos	47
4. Determinación del efecto fotosintético	50
a. Inhibición de la síntesis de ATP	50
b. Efecto de los biflavonoides sobre la velocidad del transporte de electrones..	53
c. Localización de los sitios de interacción en el transporte de electrones	56
d. Inducción de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	57
e. Efecto de los biflavonoides en la actividad de la Mg ²⁺ -ATPasa	62
C. Fraccionamiento del extracto más activo.....	64
D. Aislamiento de los biflavonoides.....	64
E. Identificación estructural de los biflavonoides 6d3 , 6b2C y 5e	65
1. Elucidación estructural de robustaflavona (6d3)	69
2. Elucidación estructural de 2,3-dihidro-robustaflavona (5e) y de 2,3-dihidro-5- metoxi-robustaflavona (6b2C)	71
F. Aislamiento de peracetil α -D-glucopiranososa (RIAc).....	76
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	79
REFERENCIAS	80
ANEXO	86



Lista de Abreviaturas

A ₀	Aceptor de electrones primario del fotosistema II
ABS/CS	Tamaño de la antena por sección transversal
AcOEt	Acetato de Etilo
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CoA	Coenzima A
ccf	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ COCD ₃	Acetona deuterada
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CF ₀	Parte lipofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
CF ₁	Parte hidrofílica del complejo CF ₁ CF ₀ –ATPasa
CHCl ₃	Cloroformo
Chl	Clorofila
CL ₅₀	Concentración letal media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear
Cit <i>b₆/f</i>	Complejo citocromo <i>b₆/f</i>
d	doblete
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DC	Dicroísmo Circular
DCMU	3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-dicloro fenol indofenol
dd	Doble de dobles
DEPT	Prueba de desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno
DI	Energía disipada
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPC	Difenilcarbazida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético



EPR	Resonancia electroparamagnética
ET	Transporte de electrones
F ₀	Fluorescencia inicial
FAB ⁺	Bombardeo rápido de átomos
Fd	Ferredoxina
Fm	Fluorescencia máxima
FM	Fórmula molecular
F _x	Ferredoxina tipo x
Fv	Fluorescencia variable
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear de múltiples ligaduras
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de carbono-hidrógeno
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kn	Constante de la energía de excitación vía no fotoquímica
Kp	Constante de la energía de excitación vía fotoquímica
λ	Longitud de onda
M ₀	Medida relativa de la actividad fotoquímica primaria
M ⁺	Ion molecular
MeOH	Metanol
MV	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridinio dicloro "Metilviológeno"
<i>m/z</i>	relación masa-carga
N	Número de veces que Q _A se ha reducido
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP ⁺	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
NOESY	Espectroscopía bidimensional incrementada por efecto nuclear de Overhauser



NOESY-1D	Espectroscopía por efecto nuclear de Overhauser en una dimensión
OEC	Complejo productor de oxígeno
P ₆₈₀	Centro de reacción del PSII
P ₇₀₀	Centro de reacción del PSI
PC	Plastocianina
p.f.	Punto de fusión
Pheo <i>a</i>	Feofitina <i>a</i>
P _i	Fosfato inorgánico
PMS	Fenil metasulfato
Q	Plastoquinona
Q _A	Aceptor de electrones primario del Fotosistema II
Q _A ⁻	Aceptor de electrones primario reducido del Fotosistema II
RC	Centro de reacción
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singulete
sa	Singulete ancho
SiMo	Silicomolibdato de sodio
Sm	Múltiples reducciones de Q _A
TMQH ₂	Tetrametil- <i>p</i> -benzoquinona reducida
TMS	tetrametilsilano
TR	Energía atrapada
Tricina	N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta
V(t)	Fluorescencia variable relativa
δ	Desplazamiento químico
φ _{E0}	Eficiencia del transporte de electrones
φ _{P0}	Eficiencia de las reacciones lumínicas
ψ ₀	Eficiencia con la que un excitón puede mover un electrón más allá de Q _A ⁻



Lista de Figuras

Figura 1.	<i>Selaginella lepidophylla</i>	7
Figura 2.	Planta deshidratada	7
Figura 3.	Distribución en México	8
Figura 4.	Estructura C ₆ -C ₃ -C ₆	10
Figura 5.	Numeración.....	11
Figura 6.	Estructuras básicas de varios tipos de flavonoides.....	11
Figura 7.	Biogénesis de flavonoides	14
Figura 8.	Biosíntesis de biflavonoides	17
Figura 9.	Biflavonoides tipo I	18
Figura 10.	Biflavonoides tipo II	18
Figura 11.	Transporte electrónico de la membrana tilacoidal.....	23
Figura 12.	Esquema Z de la fotosíntesis.....	24
Figura 13.	Curva de inducción de la fluorescencia.....	28
Figura 14.	Reacciones parciales de la cadena transportadora de electrones.....	35
Figura 15.	Extracción y fraccionamiento de <i>Selaginella lepidophylla</i>	43
Figura 16.	Efecto de las fracciones primarias sobre la síntesis de ATP.....	51
Figura 17.	Valores de I ₅₀ de las fracciones primarias.....	51
Figura 18.	Valores de I ₅₀ de las fracciones secundarias	52
Figura 19.	Efecto inhibitorio de los biflavonoides sobre la síntesis de ATP	53
Figura 20.	Efecto de robustaflavona (6d3) sobre el transporte de electrones.....	54
Figura 21.	Efecto de 2,3-dihidro-robustaflavona (5e) sobre el flujo de electrones	55
Figura 22.	Efecto de 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (6b2C) sobre el transporte.....	55
Figura 23.	Curvas de inducción de la fluorescencia para robustaflavona (6d3).....	58
Figura 24.	Efecto de robustaflavona (6d3) sobre los parámetros de la fluorescencia.....	60
Figura 25.	Estructura básica tipo biflavonoide.....	68
Figura 26.	Robustaflavona (6d3).....	71
Figura 27.	(2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (5e)	74
Figura 28.	(2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (6b2C).....	75
Figura 29.	Peracetil- α -D-glucopiranososa	76



Lista de Tablas

Tabla 1.	Estudios fitoquímicos en especies del género <i>Selaginella</i>	5
Tabla 2.	Clasificación taxonómica.....	6
Tabla 3.	Primer fraccionamiento	43
Tabla 4.	Segundo fraccionamiento	44
Tabla 5.	Actividad antimicrobiana por difusión en agar.....	48
Tabla 6.	Actividad antimicrobiana por dilución en agar.....	49
Tabla 7.	Efecto de los extractos sobre la síntesis de ATP	50
Tabla 8.	Efecto de los biflavonoides sobre la velocidad del transporte de electrones del FSII, FSI y sus reacciones parciales	56
Tabla 9.	Efecto de los biflavonoides sobre la actividad Mg ²⁺ -ATPasa	63
Tabla 10.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de 6d3	69
Tabla 11.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de 5e y 6b2C	72
Tabla 12.	Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C de 5e y 6b2C	73



Lista de Espectros

Espectro 1.	Espectro en el UV de robustaflavona	87
Espectro 2.	Espectro en el IR de robustaflavona	88
Espectro 3.	Espectro de RMN ¹ H de robustaflavona.....	89
Espectro 4.	Espectro de RMN ¹³ C de robustaflavona	90
Espectro 5.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HSQC de robustaflavona.....	91
Espectro 6.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HMBC de robustaflavona.....	92
Espectro 7.	Espectro de RMN ¹ H modalidad COSY de robustaflavona	93
Espectro 8.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de robustaflavona	94
Espectro 9.	Espectro en el UV de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona.....	95
Espectro 10.	Espectro en el IR de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona	96
Espectro 11.	Espectro de RMN ¹ H de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona.....	97
Espectro 12.	Espectro de RMN ¹³ C de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona	98
Espectro 13.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HSQC de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona.....	99
Espectro 14.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HMBC de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona.....	100
Espectro 15.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HMBC de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona.....	101
Espectro 16.	Espectro de DC de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona	102
Espectro 17.	Espectro en el UV de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona	103
Espectro 18.	Espectro en el IR de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona	104
Espectro 19.	Espectro de RMN ¹ H de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona....	105
Espectro 20.	Espectro de RMN ¹³ C de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona ..	106
Espectro 21.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HSQC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	107
Espectro 22.	Espectro de RMN ¹ H modalidad HMBC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	108
Espectro 23.	Espectro de RMN ¹ H modalidad COSY de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	109



Espectro 24. Espectro de RMN ^1H modalidad NOESY de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	110
Espectro 25. Espectro de RMN ^1H modalidad NOESY-1D de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	111
Espectro 26. Espectro de masas modalidad FAB $^+$ de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	112
Espectro 27. Espectro de DC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona.....	113
Espectro 28. Espectro de RMN ^1H de peracetil α -D-glucopiranososa	114
Espectro 29. Espectro de RMN ^{13}C de peracetil α -D-glucopiranososa.....	115
Espectro 30. Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT de peracetil α -D-glucopiranososa	116
Espectro 31. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de peracetil α -D-glucopiranososa	117
Espectro 32. Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de peracetil α -D-glucopiranososa	118
Espectro 33. Espectro de masas modalidad IE $^+$ de peracetil α -D-glucopiranososa ...	119



INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de los recursos vegetales ha sido objeto de múltiples observaciones y numerosas experiencias acumuladas por diversos grupos étnicos a través del mundo. Aunque no existen datos que aseguren el valor y extensión del uso de las plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud ha calculado que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso en alguna medida de éstas para resolver sus necesidades de atención primaria de salud, ya sea como único medio de curación o como medio alternativo. Por lo tanto, el estudio químico y biológico de los recursos vegetales permite el descubrimiento de principios activos con acción terapéutica que validan el uso definido de una planta en la medicina tradicional. Estos principios también pueden constituir nuevas fuentes de materias primas que contribuyan al desarrollo de la medicina actual.

Dado el bajo porcentaje de estudios fitoquímicos integrados a estudios biológicos realizados en las plantas mexicanas, en los últimos años se ha intentado revalorar y fomentar los recursos naturales de México, que debido a la diversidad climática, permiten una gran riqueza florística que incluye plantas con propiedades cuyo estudio permitirá un mejor aprovechamiento de los productos naturales.

Justificación

El género *Selaginella* contiene plantas con antecedentes de usos biológicos muy diversos. En México *S. lepidophylla* es de gran utilidad en tratamientos tradicionales, por lo que un estudio químico-biológico de esta planta podrá aportar información sobre su contenido metabólico, y cierto tipo de respuestas biológicas en determinados ensayos biológicos. Con lo anterior se podrá contribuir al conocimiento quimiotaxonómico de esta planta perteneciente a la flora mexicana, validar en su caso el uso tradicional de la planta y en otros casos, aportar información sobre actividades



biológicas útiles de la planta en modelos biológicos no reportados a la fecha para esta especie.

Objetivo General

Contribuir al conocimiento e información del contenido metabólico secundario, así como de las propiedades químicas, citotóxicas, antimicrobianas y de inhibición de crecimiento vegetal por parte de los extractos y metabolitos secundarios contenidos en la especie *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring.

Objetivos Específicos

1. Recopilar la información bibliográfica sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los componentes de *Selaginella lepidophylla* y de otras especies que pertenecen al género *Selaginella*.
2. Obtener el extracto CHCl₃:MeOH y por partición de éste, el extracto hexánico, el de acetato de etilo y el *n*-butanólico de la planta entera.
3. Realizar las pruebas de actividad de los extractos en los diferentes modelos biológicos propuestos en el objetivo general.
4. Fraccionar los extractos que presenten actividad, mediante métodos cromatográficos.
5. Aislar y purificar los metabolitos secundarios de las fracciones activas.
6. Evaluar el potencial biológico de las fracciones y metabolitos secundarios de *S. lepidophylla* mediante pruebas de toxicidad para *Artemia salina*, la capacidad citotóxica en las líneas celulares KB y HEP-2, pruebas antimicrobianas y pruebas de inhibición de crecimiento vegetal.
7. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios por métodos espectroscópicos y espectrométricos.



I. GENERALIDADES

A. Familia *Selaginellaceae*

La familia *Selaginellaceae* consiste de un solo género, *Selaginella*. Se encuentra en el grupo de plantas criptógamas vasculares y se les conoce como “licopodios pequeños” debido a la similitud morfológica con las plantas *Lycopodiales*. Esta familia es el único miembro dentro del orden *Selaginellales*; junto con las plantas *Lycopodiales*, *Lipodendrales* y las *Isoetales* conforman la clase *Lycopodiopsida*. Según el sistema de clasificación de Engler, la clase mencionada pertenece a la división *Pteridophyta*, sin embargo, en recientes clasificaciones la dicha clase pertenece a la división *Lycopodiophyta* o también denominada *Tracheophyta*.¹

Dentro de la familia, unas especies poseen tallos postrados y otras los tienen erguidos y delgados. El sistema vascular de los tallos se constituye por una o varias ramificaciones con bifurcaciones desiguales y sin crecimiento en el espesor. El tallo se encuentra recubierto por hojas pequeñas en cuatro hileras longitudinales, pueden estar dispuestas en forma helicoidal o con frecuencia se encuentran decusadas. Las hojas se caracterizan por la presencia de una pequeña lígula a la base del haz y es de consistencia membranosa; éste órgano se encarga de captar el agua y facilita la rápida absorción de las gotas de lluvia.²

Las selaginelas son plantas heterospóricas, es decir, que son capaces de producir dos tipos de esporas; además, tienen protalos (gametofitos) extraordinariamente pequeños. Los órganos que contienen las esporas, denominados esporofilos, se encuentran en la extremidad de las ramas en forma de flores apicales. Cada esporofilo lleva sólo un microsporangio o un macrosporangio que nace del tallo

¹ Nason. 1980. *Biología*, pp. 323, 347. Bases de datos: ITIS (Integrated Taxonomic Information System) <<http://www.itis.gov>> y USDA (United States Department of Agriculture), natural resources conservation source <<http://plants.usda.gov>>

² Rost, et al. 1985. *Botánica: Introducción a la Biología Vegetal*, pp. 338, 339.



por encima de la base de la hoja, y aunque están separados, se encuentran en la misma planta; cada protalo femenino forma cuatro esporas grandes (macrosporas) y el masculino origina muchas esporas pequeñas (microsporas).³

B. Género *Selaginella*

Las plantas herbáceas del género *Selaginella* varían de tamaño pequeño a moderado, son más de 700 especies las que conforman el género y están ampliamente distribuidas en el mundo, pero abundan en las zonas tropicales y unas cuantas se extienden en las altas latitudes del norte y del sur. Algunas especies están adaptadas a soportar ciertos periodos de sequía, por lo que pueden crecer sin problema, en lugares relativamente secos.⁴

Algunas especies se cultivan en invernaderos como plantas ornamentales, pero la principal utilidad está en la medicina tradicional. Se ha reportado su uso en el tratamiento de diversos padecimientos como: diabetes, gastritis, cáncer, problemas cardiovasculares, hepatitis, enfermedades de piel, infecciones del tracto urinario y se han utilizado como antiinflamatorios. En su composición química, estas plantas tienen compuestos tales como glucósidos, alcaloides, lignanos y son ricos en flavonoides. En la Tabla 1 se muestran algunas de las especies investigadas fitoquímicamente.

C. Características de *Selaginella lepidophylla*

1. Nombres comunes

En México, la planta *Selaginella lepidophylla* Spring recibe otros nombres comunes, tales como: doradilla, coralilla, flor de piedra, flor de peña, Flor de tierra y siempreviva. En la lengua náhuatl: yamanquitexóchitl, tequequetzal (Morelos), texochitl (Guerrero) y much-k'ok (Michoacán y Yucatán), jodt'nborra y te'tesawam

³ Strasburger, et al. 1953. *Tratado de Botánica*, p. 395, 396.

⁴ Rost, *op. cit.*, p. 338.



(Sonora), donido (Hidalgo), ndoto kuu (Oaxaca).⁵ Y en inglés, la especie es denominada: *flower of stone*, *rose of Jericho* o *resurrection plant*.⁶

Especie	Metabolitos secundarios	Usos y/o Actividad	Referencias
<i>Selaginella bryopteris</i>	Amentoflavona, hinoquiflavona, bilobetina, sequiaflavona, heveaflavona, neocriptomerina, derivados de dihidrohinoquiflavona y de dihidroamentoflavona.	Regeneración de energía y vitalidad.	Swamy, <i>et al.</i> 2006.
<i>Selaginella chrysocaulos</i>	Amentoflavona, 3',3'-binaringenina, 5'',7''-dihidroxi-2''-fenoxicromonil-(3''',4''')-naringenina, naringeninil-(4''''-O-3)-kamferol, 8''-metilnaringeninil-(4''''-O-3)-kamferol.	Regeneración de energía y vitalidad.	Swamy, <i>et al.</i> 2006.
<i>Selaginella delicatula</i>	Robustaflavona, amentoflavona, ácidos cafeoilquínicos, derivados metoxilados de: robustaflavona y de 2'',3''-dihidrorobustaflavona.	Actividad citotóxica.	Lin, <i>et al.</i> 2000.
<i>Selaginella denticulada</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona.	Para epilepsia. De efecto narcótico. Antihelmíntico, antiespasmódico	Lopez Saez, <i>et al.</i> 1995.
<i>Selaginella doederleinii</i>	Ácido siquímico, fenilpropanonas, alcaloides glicosídicos de tipo hordenina; lignanos: (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B, (+)-wikstromol, (-)-nortraquelosido, (+)-matairesinol A; amentoflavona, heveaflavona y derivados metoxilados de amentoflavona	Para enfermedades cardiovasculares, bactericida. Fuerte actividad citotóxica <i>in vitro</i> . Antimutagénico contra mutaciones en <i>Salmonella typhimurium</i> . Antitumoral en ratones	Lin, <i>et al.</i> 1987. Lin, <i>et al.</i> 1993. Sun, <i>et al.</i> 1997.
<i>Selaginella lepidophylla</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, trimetileter de hinoquiflavona, 5',5''-dihidroxi-7,7'',4',4''''-tetrametoxiamentoflavona.	Enfermedades urinarias, diarrea, malestares hepáticos.	Qasim, <i>et al.</i> 1985.
<i>Selaginella moellendirffii</i>	Amentoflavona, ginkgetina, podocarpusflavona A, kayaflavona, 7,4',7'',4''''-tetrametoxiamentoflavona. β -sitosterol, isopimpelina	Para gonorrea, hemorragias, hepatitis agudas. Actividad citotóxica contra adenocarcinoma ovárico.	Sun, <i>et al.</i> 1997. Evans & Raffauf. 1990.
<i>Selaginella selaginoides</i>	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona.	Para tratar epilepsia. Antiespasmódico.	Lopez Saez, <i>et al.</i> 1995.
<i>Selaginella tamariscina</i>	Amentoflavona, sotetsuflavona, isocriptomerina, hinoquiflavona.	Promueve la circulación y estimula la descarga menstrual. Antineoplásico.	Swamy, <i>et al.</i> 2006. Sun, <i>et al.</i> 1997.
<i>Selaginella willdenowii</i>	Isocriptomerina, tetracetil isocriptomerina, robustaflavona, bilobetina, 2'',3''-dihidroisocriptomerina, 4',7''-di-O-metilamentoflavona, 7''-O-metilrobustaflavona.	Actividad citotóxica en células de colon Col 2	Silva, <i>et al.</i> 1995.

⁵ Argueta, *et al.* 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, p. 575 e Instituto Nacional Indigenista. 1994. *Flora Medicinal Indígena de México*, pp. 113, 186, 794, 1396.

⁶ Quattrocchi. 2000. *CRC World Dictionary of Plant Names. Common names, scientific names, eponyms, synonyms and etymology*, p. 2451.



2. Clasificación taxonómica

Como se mencionó, con base en los recientes sistemas de clasificación taxonómica, las plantas selaginelas ya no forman parte del conocido grupo de plantas pteridofitas, sino que se encuentran dentro de las traqueofitas.⁷ A continuación, en la Tabla 2 se detalla la clasificación taxonómica de la especie *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring, de acuerdo con Adolf Engler, en su libro *Syllabus der Pflanzenfamilien* (1924), y a las recientes clasificaciones.

	Adolf Engler	ITIS^a
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Embryophyta asiphonogama</i>	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Pteridophyta</i>	<i>Lycopodiophyta</i>
Clase	<i>Lycopodiopsida</i>	<i>Lycopodiopsida</i>
Orden	<i>Selaginellales</i>	<i>Selaginellales</i>
Familia	<i>Selaginellaceae</i>	<i>Selaginellaceae</i>
Género	<i>Selaginella</i>	<i>Selaginella</i> Beauv.
Especie	<i>Selaginella lepidophylla</i>	<i>Selaginella lepidophylla</i>

^a Base de datos: ITIS (Integrated Taxonomic Information System) <<http://www.itis.gov>>

3. Características botánicas

Selaginella lepidophylla Spring (Figura 1) es una planta herbácea de tamaño pequeño, de raíz fibrosa y pese a que en apariencia no tiene tallo, los presenta en manojos duros, por lo regular, miden de 10 a 12 cm de largo y de 0.5 a 1 cm de ancho. Tiene frondas verdes muy divididas y dispuestas en rosetas. Los tallos están cubiertos por dos hileras de hojas grandes y dos de hojas pequeñas, son fuertes, densamente imbricadas, escariosas en sus márgenes y es de color verde claro por el revés.⁸

⁷ Nason, *op. cit.*, pp. 323, 341, 343.

⁸ Sánchez Sánchez. 1958. *Las Excursiones Botánicas en el Distrito Federal*, p. 66. y M. Martínez. 1979. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*, p. 317.



Figura 1. *Selaginella lepidophylla*

Este vegetal al igual que todas las plantas reviviscentes, presenta propiedades poikilohídricas, es decir, que se encuentra en equilibrio con la humedad atmosférica; cuando se deshidrata, en los periodos de sequía, como se observa en la Figura 2, los tallos se cierran y enrollan para formar una bola de alrededor de 10 cm de diámetro, con apariencia dorada, de ahí el nombre común de Doradilla; y cuando nuevamente tiene contacto con la humedad, las ramas reverdecen y se vuelven a extender. Por lo tanto, puede permanecer varios años en estado latente por desecación extrema y al disponer de agua, además de recobrar su apariencia herbácea, también reanuda sus funciones normales.



Figura 2. Planta deshidratada



4. Distribución

El origen de *Selaginella lepidophylla* es desconocido, los primeros reportes en México, aparecen en el siglo XVI, Martín de la Cruz la indica para la contracción de la rodilla y en el Códice Florentino se menciona sin informar el uso. La planta habita donde hay climas cálido, semicálido, seco, semiseco y templado, desde los 600 y hasta 2800 m sobre el nivel del mar. Crece en lugares pedregosos, sobre las peñas y en las oquedades que quedan entre las rocas, está asociada a bosques tropicales, a matorral xerófilo, a bosques de encino, de pino y mixtos.⁹

De acuerdo a la literatura, la especie se localiza en gran parte del territorio nacional (Figura 3); Mickel y Smith (2004)¹⁰ mencionan que la distribución es conocida en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Sinaloa, Durango, Jalisco, Nayarit, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Zacatecas, Guerrero, Distrito Federal y en el mismo año, mediante un estudio etnobotánico¹¹ se logró el registro de la especie en Tlaxcala. La planta también se encuentra distribuida en los estados de Aguascalientes, Michoacán, Guanajuato, Hidalgo, Morelos, Oaxaca y Veracruz.¹²



Figura 3. Distribución en México

⁹ Argueta, *loc. cit.*

¹⁰ Citado en: Vázquez, *et al.* 2005. *Polibotánica*, p. 108.

¹¹ Vázquez, *op. cit.*, p. 114.

¹² Marquez, *et al.* 1999. *Plantas Medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica*, p. 69.



Cerca del territorio nacional, la planta habita en Texas, y en el continente asiático se localiza en la India y en China.

5. Propiedades medicinales

La Doradilla se utiliza para el tratamiento de varios males populares. En Baja California para el “mal de orín”. En Oaxaca, para la “enfermedad del nahual”, descrita como el dolor de rayo o espanto de lluvia, el enfermo presenta dolor del cuerpo, cansancio y dolor de cabeza. En el siglo XVII, Juan de Esteyneffer la indicó contra “el vahido, la destemplanza del hígado, obstrucción hepática, melancolía hipocondriaca, para el tratamiento de las coartanas y en el morbo gálico”. En Veracruz, se usa para la “quemazón”, referida como enfermedad en los niños, que se caracteriza por diarreas que pueden durar un mes, el niño se hincha y aparecen manchas moradas.¹³

En general, es útil como antirrenopático y diurético en caso de riñones inflamados, cistitis, cálculos renales, dolor de cintura, de espalda, cuando hay obstrucción de orina e irritación de los riñones. Ayuda en trastornos digestivos como inflamación de estómago, úlcera, dispepsia, irritación del hígado, corajes, espanto, cálculos biliares. También se indica para la tos, bronquitis, tosferina, para expulsar la placenta, reumas, corazón, purificar la sangre, contra parasitosis, tirisia negra. En Sonora se usa como anticonceptivo¹⁴ y para interrumpir la menstruación durante dos o tres meses. Sin embargo, la Sociedad Farmacéutica de México indica el uso de la planta como deterativo, eupéptico, diurético, en padecimientos hepáticos y en caso de dolor en los riñones.¹⁵

6. Antecedentes fitoquímicos

Los estudios que se refieren a la composición química de *S. lepidophylla* son escasos. Luis de Escurdia menciona en su composición: aceite fijo, ácido orgánico, clorofila, glucosa, goma, albúmina, materia colorante, ácido carbónico, ácido salicílico,

¹³ Argueta, *loc. cit.*

¹⁴ Instituto Nacional Indigenista. *op. cit.*, p. 186.

¹⁵ Argueta. *loc. cit.*



sulfúrico, clorhídrico y fosfórico, sosa, potasa, cal, magnesia y fierro.¹⁶ También se han aislado otros metabolitos secundarios: sacáridos, tetrahidrofurano y se han identificado por cromatografía en capa fina los flavonoides: amentoflavona, robustaflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, trimetileter de hinoquiflavona y 5',5''-dihidroxi-7,7'',4',4''''-tetrametoxiamentoflavona.¹⁷

La investigación farmacológica de la planta sólo ha podido comprobar que tiene poca actividad inhibidora de la respuesta contráctil de útero, íleon y duodeno de rata.¹⁸ También se observó la ausencia de actividad antibiótica del extracto etanólico de la planta completa sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.¹⁹

D. Flavonoides y biflavonoides

1. Estructura química

Dentro de los metabolitos secundarios de las plantas se encuentra un grupo de compuestos polifenólicos, denominados flavonoides, la palabra proviene del latín *flavus*, amarillo, y aunque la mayoría de los compuestos son de color amarillo, también los hay incoloros, de color rojo, violeta o azul. En la Figura 4 se muestra la estructura base, como un esqueleto del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos, A y B, unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono. Como se observa en la Figura 5, la numeración de la estructura comienza en el oxígeno del anillo C.

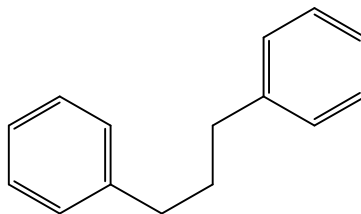


Figura 4. Estructura C₆-C₃-C₆

¹⁶ Martínez. 1989. *Las plantas Medicinales de México*, pp. 124-125.

¹⁷ Qasim. 1985. *Indian Journal of Chemistry*, p. 85.

¹⁸ Márquez, *loc. cit.*

¹⁹ Argueta, *op. cit.*, p. 576.

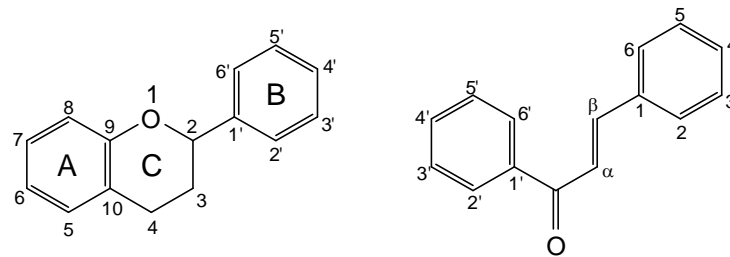


Figura 5. Numeración

2. Clasificación de los flavonoides²⁰

Los flavonoides naturales que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃, las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados. Entre los principales grupos están las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavandioles, antocianidinas, auronas, chalconas, catequinas y epicatequinas, los cuales se observan en la Figura 6.

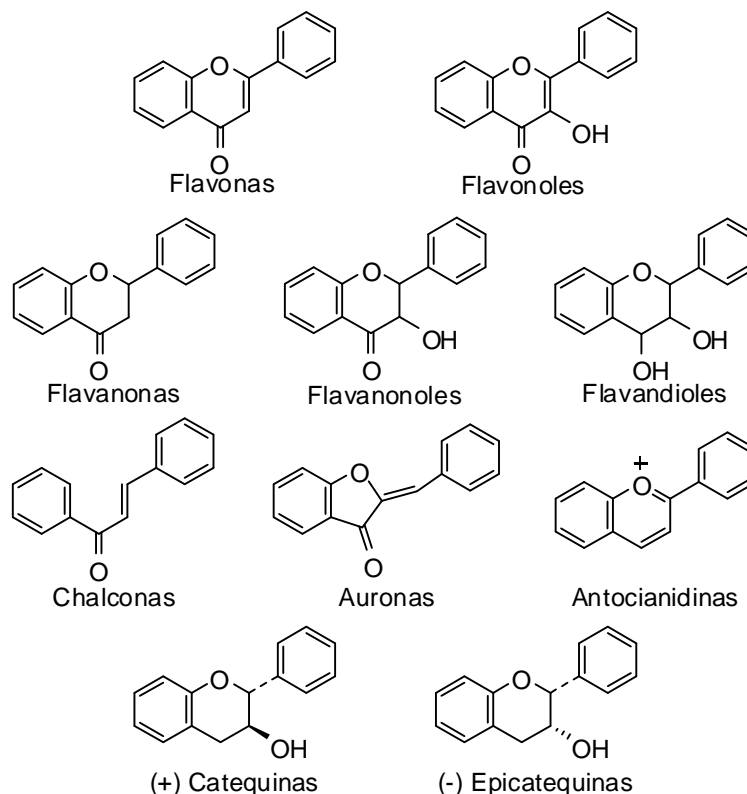


Figura 6. Estructuras básicas de varios tipos de flavonoides

²⁰ Harborne, et al. (eds). 1975. *The Flavonoids*.



En las plantas, se ha demostrado que los flavonoides se encuentran ligados a otro tipo de moléculas. La combinación núcleo flavonoide básico más una o más unidades de carbohidratos, se denomina glicósido, la composición flavonoide-lignano se llama flavonolignano y cuando no están unidos a carbohidratos se les denomina agliconas flavonoides.

3. Propiedades físicas

Los flavonoides en las plantas se encuentran en forma libre, como glicósidos, sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) como *O*-glicósidos; o con los carbohidratos ligados mediante enlaces C-C, es decir como *C*-glicósidos. Las antocianidinas se encuentran como sales con diferentes coloraciones. Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide y su forma (libre, glicósido o sulfato). Por ejemplo, las flavonas, flavonoles y auronas, debido a su sistema conjugado, son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles presentan rotación óptica debido al carbono quiral C-2. Los glicósidos son en general, sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los flavonoides altamente metoxilados son cristalinos.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren, del número y clase de los sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y *n*-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en disolventes del tipo éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides muy metoxiladas son solubles en disolventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que anteriormente se ha utilizado para su elucidación estructural.

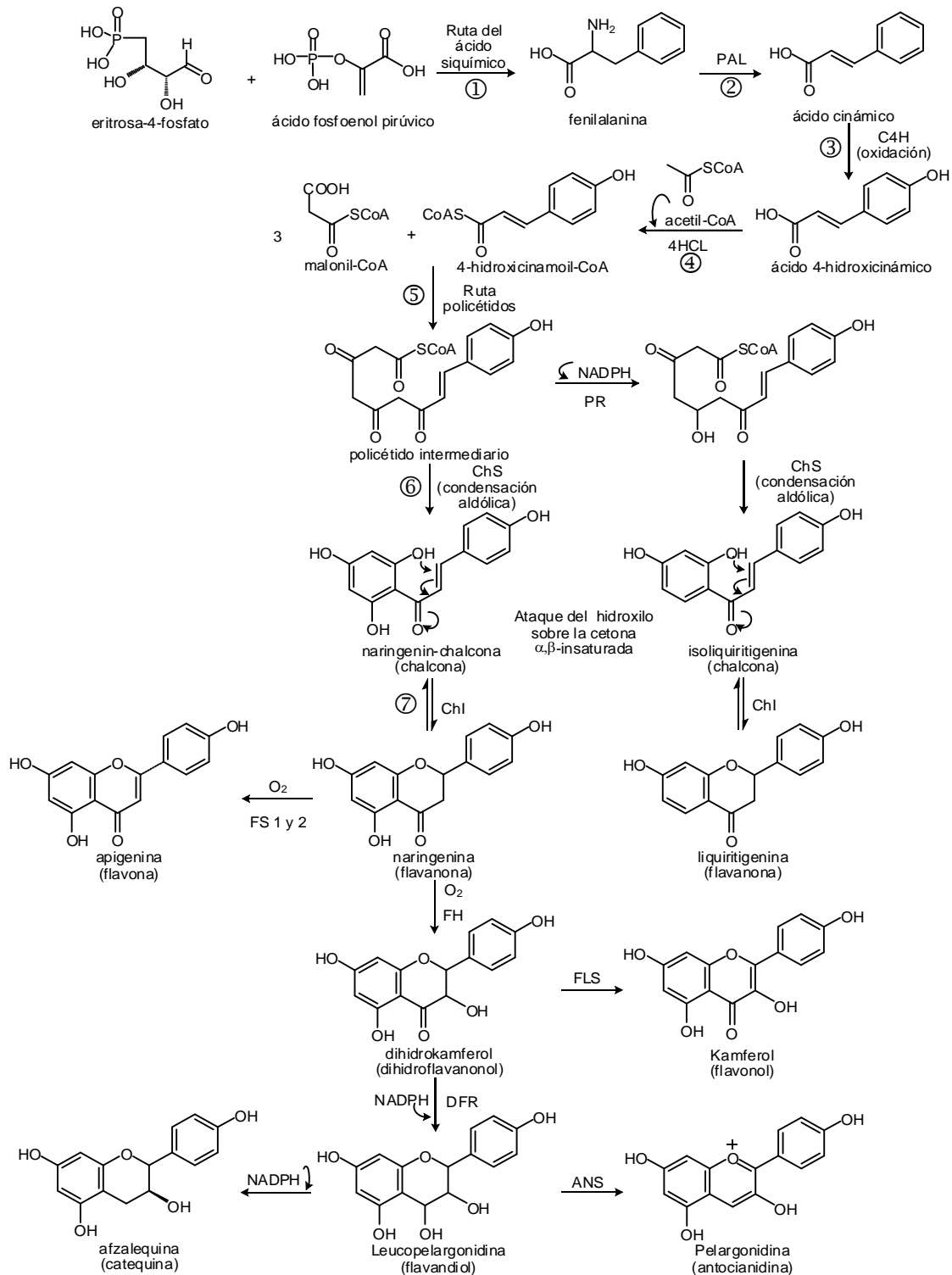


4. Biosíntesis²¹

Los flavonoides son de biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C₃ se originan de la ruta del ácido siquímico. En la Figura 7, se esquematizan los siguientes pasos:

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

²¹ Dewick. 2002. *Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach*, pp. 121-152.



PAL: fenilalanina amonioliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4HCL: 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa, PR: policétido reductasa, ChS: chalcona sintetasa, ChI: chalcona isomerasa, FS 1 y 2: flavona sintetasa 1 y 2, FH: flavanona 3-hidroxilasa, FLS: flavonol sintetasa, DFR: dihidroxi flavonol 4-reductasa, ANS: antocianidina sintetasa.

Figura 7. Biogénesis de flavonoides



Las chalconas pueden dar lugar a las auronas y a las flavanonas, y a partir de éstas, mediante la acción de diversas enzimas, se originan otros tipos de flavonoides (Figura 7). El número de flavonoides diferentes es elevado si se considera que diez de los carbonos del esqueleto pueden ser sustituidos por una variedad de grupos, que a su vez pueden ser hidroxilados, metoxilados, metilados, isoprenilados, benzilados etc.

5. Función en las plantas

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

Las chalconas intervienen en la estimulación de la polinización porque inducen el desarrollo de colores en el espectro visible y UV al atraer insectos. Las flavonas son amarillas y pueden estar en flores, dan color amarillo a los pétalos, o frutos, como en la piel de las uvas, son responsables del color amarillento de los vinos blancos. Los flavonoles suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en hojas y flores, un ejemplo es el kamferol, que protege a la planta de la luz UV. Las antocianidinas, pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolar de las células, son responsables de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas, también contribuyen al sabor astringente del té.

En general, entre las funciones más importantes de los flavonoides en las plantas, se encuentran:



- ★ Protección ante la luz UV. Los flavonoides incoloros suelen acumularse en las capas más superficiales de las plantas y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, así impiden los efectos nocivos de éstas en los tejidos internos.
- ★ Defensa contra herbívoros. Algunas antocianidinas, protegen a las plantas al generar sabores o texturas desagradables para los herbívoros.
- ★ Atracción de animales polinizadores. Muchos flavonoides son componentes de los pigmentos de las flores y hojas que confieren coloraciones atrayentes de insectos, por lo que atraen a los polinizadores hacia las flores y con esto, la preservación de especies vegetales.
- ★ Atracción de presas. Las plantas carnívoras, como la *Drosera* y la *Dionea*, poseen antocianidinas en sus flores y hojas, que cumplen una función de atracción de los insectos que les sirven de alimento.
- ★ Atracción de animales dispersores de semillas y frutos. Algunos flavonoides confieren aromas y colores a los frutos que los hacen más apetecibles para los herbívoros que cumplen la función de dispersión de las semillas.

6. Biflavonoides

Estos compuestos son dímeros de flavonoides, la estructura normalmente se constituye por monómeros del mismo tipo, pero pueden ser diferentes. La formación de los biflavonoides se debe al acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y a la modificación del carbono central C₃ (Figura 8).²²

En los biflavonoides conocidos, la unión de los monómeros puede ser de dos tipos: bifenilo (I) o bifenil éter (II).²³ El tipo I incluye a los biflavonoides del grupo agatisflavona, cuya unión C-C se da entre C-6 y C-8", el grupo cupresulflavona se une

²² Harborne, *op. cit.*, part 2, pp. 693-696.

²³ *Ibid.*, pp. 159-161.



entre C-8 y C-8'', el grupo amentoflavona, en donde la unión se da entre C-3' y C-8''; los biflavonoides del grupo robustaflavona se unen en C-3' y C-6'' (Figura 9).

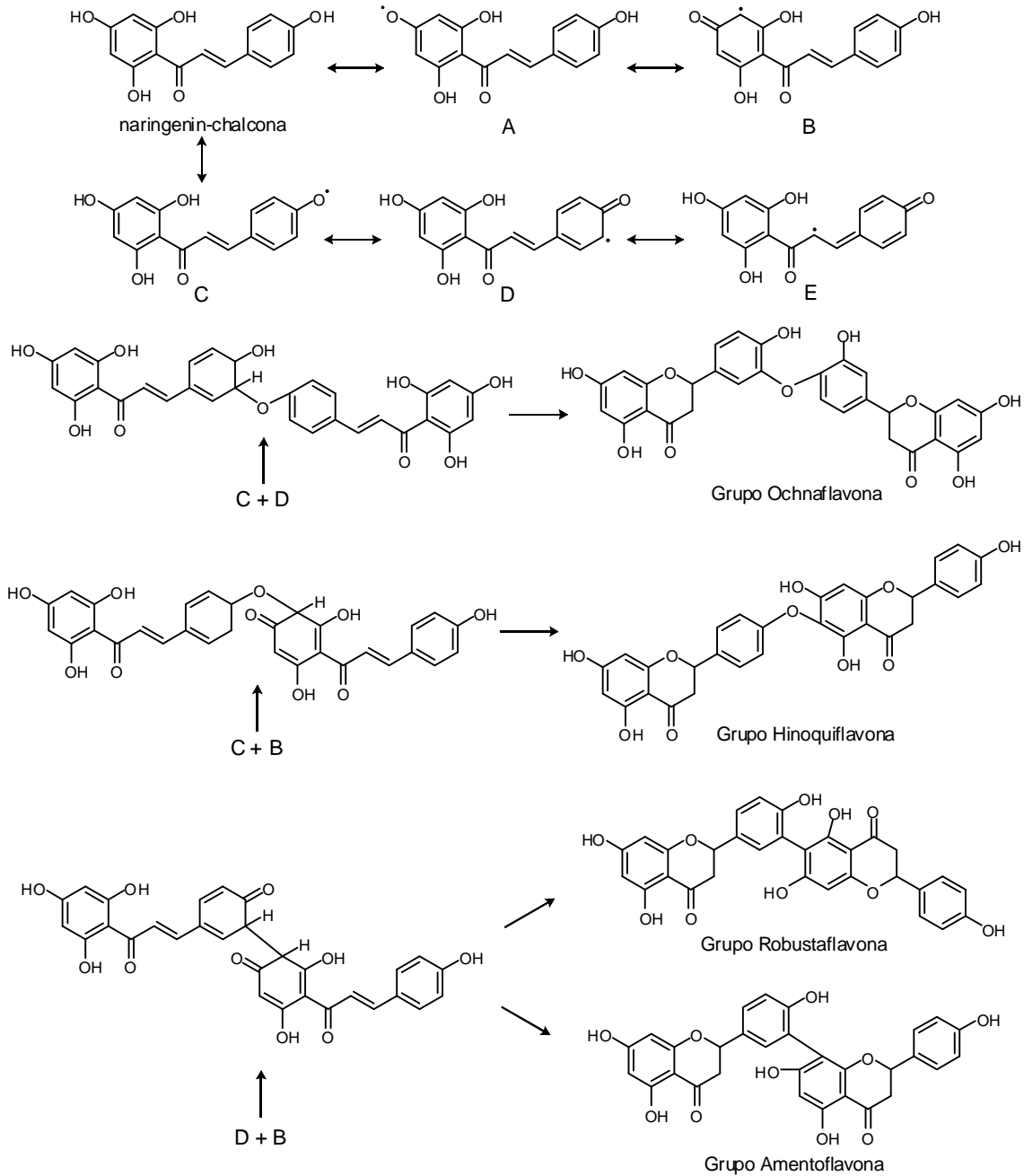


Figura 8. Biosíntesis de biflavonoides

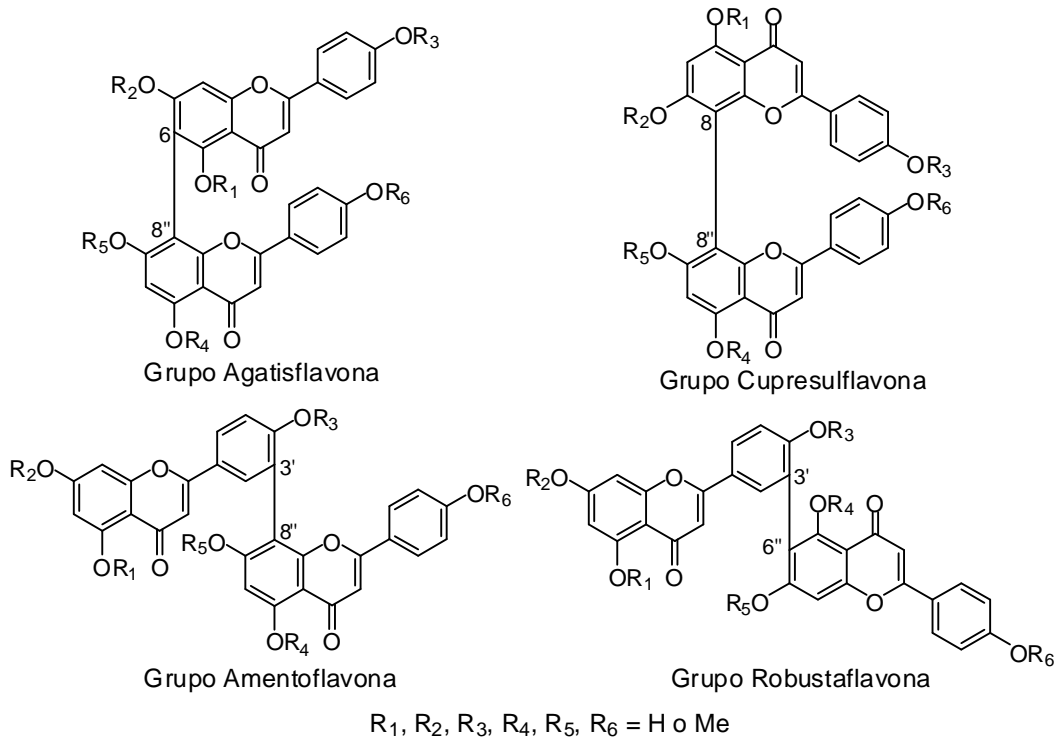


Figura 9. Biflavonoides tipo I

Entre los biflavonoides del tipo II se encuentra el grupo hinoquiflavona donde la unión C-O-C se da en C-4' - C-6'' y el grupo ochnaflavona se une entre C-4' y C-3''' (Figura 10).

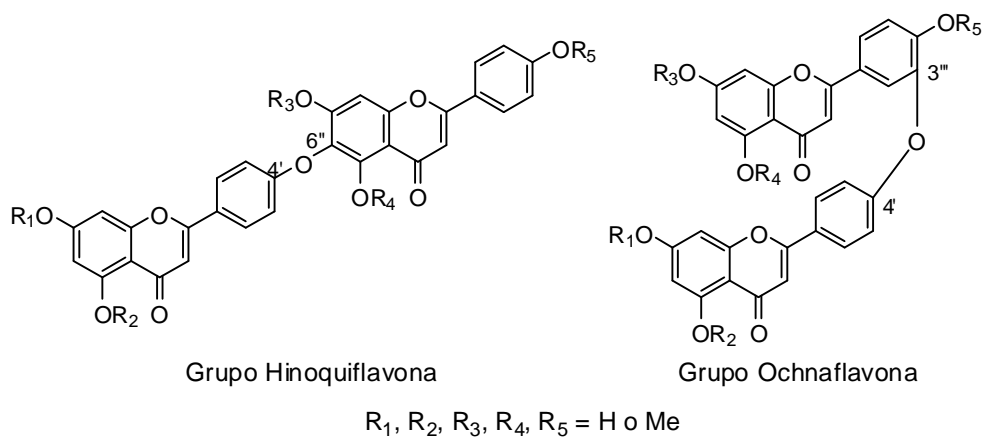


Figura 10. Biflavonoides tipo II



Los biflavonoides se acumulan en grandes cantidades en numerosas plantas, son característicos en las plantas gimnospermas, con la excepción de las panaceas y las gnetales, pero también se encuentran en varias angiospermas y en algunas de las primitivas plantas vasculares, tales como las psilotales y selaginelales.²⁴

7. Aplicaciones²⁵

Los flavonoides son protectores del daño causado por oxidantes como los rayos UV, la polución (minerales tóxicos como plomo y mercurio) y agentes químicos presentes en los alimentos (colorantes, conservadores, etc.), entre otros. Al limitar la acción de los radicales libres, reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración muscular, evitan el calor característico de la menopausia y combaten otros síntomas. Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

- ★ Propiedades anticancerosas: muchos han demostrado ser eficaces en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas.
- ★ Sistema cardiovascular: regulan la permeabilidad capilar. Muchos incrementan la resistencia de los capilares al mejorar la acción de la vitamina C, por lo que resultan adecuados para prevenir sangrados; estos efectos ayudan a proteger contra infecciones y enfermedades de los vasos sanguíneos. Los flavonoides también ejercen una acción relajante del músculo liso, lo que lleva a la disminución de la presión sanguínea y mejora la circulación del corazón. Pueden evitar la oxidación del colesterol LDL, lo que a su vez previene la formación de la placa arterioesclerótica. Algunos poseen capacidad antitrombótica.
- ★ Protección del hígado: algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado, la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis.

²⁴ Harborne. 1994. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, pp. 120-123, y Harborne, 1975, *op. cit.*, p. 727.

²⁵ Dewick, *op. cit.*, pp. 150-151.



- ★ Protección del estómago: ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kamferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.
- ★ Antiinflamatorios y analgésicos: este efecto se debe a los efectos antioxidantes y a la capacidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de los procesos inflamatorios como son las prostaglandinas y los leucotrienos.
- ★ Antimicrobianos: isoflavonoides y furanocumarinas han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

Los flavonoides también son de gran interés económico para los cultivadores de plantas ornamentales (como las orquídeas), que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de flavonoides que dan el color a las hojas y flores.

E. Alelopatía²⁶

Rice²⁷ define el término alelopatía como cualquier efecto(s): directo o indirecto, de estimulación o inhibición, mediado por un compuesto químico liberado al medio ambiente por una planta superior o microorganismo.

Las interacciones alelopáticas se basan, principalmente, en la producción de metabolitos secundarios de las plantas para crear cambios biológicos. Se han diseñado bioensayos para evaluar las diferentes interacciones, por ejemplo, ensayos de fitotoxicidad para estudiar la interacción de los metabolitos de plantas con otros vegetales, y de patogenicidad para la interacción de metabolitos microbianos con otros organismos.

Es importante estudiar los aleloquímicos porque su identificación puede ayudar a explicar las interacciones de las plantas (o microbios) en un sistema ecológico, permite evaluar su potencial como herbicidas o reguladores del crecimiento de plantas (PGR's, *Plant Growth Regulators*). También pueden desarrollarse cosechas que produzcan

²⁶ Hoagland, et al. 2004. *Allelopathy, Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*, pp. 315-328.

²⁷ Citado en: Reigosa, et al. 2006. *Allelopathy, a Physiological Process with Ecological Implications*, p. 229.



aleloquímicos que se aprovechen para suprimir el crecimiento de malezas indeseables en cultivos de interés económico o ecológico.

Los bioensayos juegan un papel significativo en la determinación de la actividad, en la selectividad de especies y en el mecanismo de acción de los compuestos en cuestión. En general, para las plantas se pueden hacer los siguientes tipos de ensayos:

- ★ Bioensayos de germinación
- ★ Estudios en los que se pruebe el crecimiento de la planta
- ★ Análisis basados en la pigmentación
- ★ Con células u organelos aislados de las plantas
- ★ Detección de la inhibición de la fotosíntesis

F. Herbicidas²⁸

Los herbicidas son productos químicos que se utilizan para alterar la fisiología de las plantas por un periodo de tiempo relativamente largo, dependiendo de la concentración, pueden afectar severamente su desarrollo u ocasionar su muerte. Los plaguicidas son productos que se utilizan para controlar las plagas, y los herbicidas son plaguicidas que se utilizan para controlar las malezas.

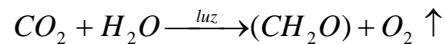
La Sociedad Norteamericana de Ciencia de las Malezas (WSSA) define a las malezas como aquellas plantas que crecen donde no son deseadas, se caracterizan por competir con los cultivos por agua, nutrientes y luz; además pueden ser hospederos de plagas y enfermedades, pueden reducir la calidad del producto que se cosecha.

²⁸ Kogan y Pérez. 2003. *Herbicidas. Fundamentos Fisiológicos y Bioquímicos del Modo de Acción*, pp. 22-31.



G. Fotosíntesis²⁹

La fotosíntesis es el proceso químico impulsado por la energía solar en el que se transforma CO₂ y H₂O en carbohidratos ricos en energía y oxígeno, se lleva a cabo en los cloroplastos de algas verdes y plantas superiores.



La fotosíntesis tiene lugar en dos etapas, las reacciones de fase luminosa, en las que la energía de la luz se utiliza para la síntesis de ATP y NADPH y se llevan a cabo en la membrana tilacoidal, por otra parte, las reacciones de fase oscura, en la que estos productos se utilizan para impulsar la síntesis de carbohidratos a partir de CO₂ y H₂O, tienen lugar en el estroma.

La clorofila es el principal foto-receptor de la fotosíntesis. Al inicio, la luz es absorbida por un sistema de antenas receptoras que constan de clorofila y pigmentos accesorios. La excitación resultante migra, por transferencia del excitón hasta alcanzar a la clorofila del centro de reacción donde resulta atrapada.

En la Figura 11 se observan las reacciones que se dan en la membrana tilacoidal, la energía de la luz es capturada por los electrones de las moléculas de clorofila. Los electrones excitados son transmitidos por medio de una serie de aceptores en la cadena de transporte electrónico. En este proceso se oxida una molécula de agua y se libera oxígeno a la atmósfera. Al mismo tiempo los protones bombeados hacia el interior de la membrana tilacoidal impulsan la producción de ATP. Los electrones excitados reducen el NADP⁺ a NADPH, y la energía almacenada se emplea para la biosíntesis de glucosa en el estroma, fuera de la membrana tilacoidal. El dióxido de carbono de la atmósfera se combina con un azúcar de cinco carbonos para producir, a través de un intermediario, dos azúcares de tres carbonos y posteriormente la molécula de glucosa de seis carbonos.³⁰

²⁹ Voet. 1992. *Bioquímica*, pp. 628-659.

³⁰ Campbell y Farell. 2004. *Bioquímica*, pp. 615-627.

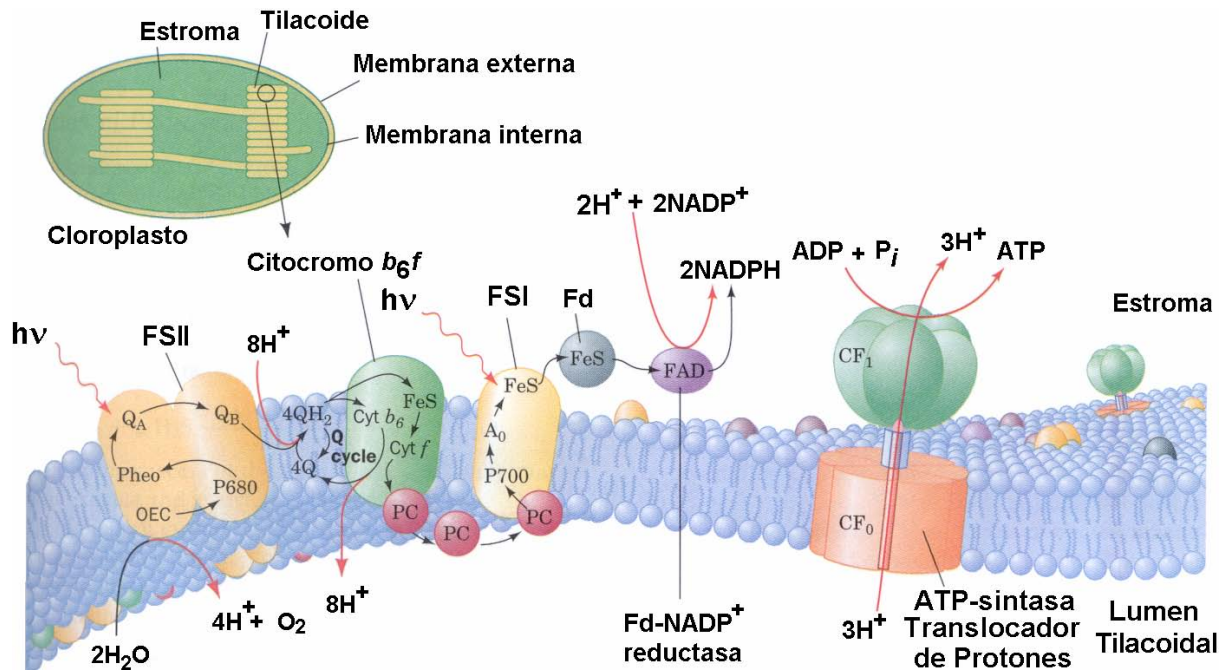
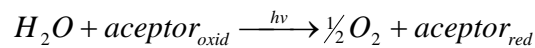


Figura 11. Transporte electrónico de la membrana tilacoidal³¹

1. Reacción de Hill

En 1937, Robert Hill descubrió que, al iluminar cloroplastos que carecen de CO₂ en presencia de un aceptor de electrones artificial, el ferricianuro, se produce O₂ con la reducción concomitante del aceptor a ferrocianuro. En esta reacción se demuestra que el CO₂ no participa directamente en la producción de O₂ al reducirse el ferrocianuro. La reacción de Hill, es la fotoreducción de un aceptor de electrones a expensas de agua.



2. Transporte de electrones

Durante la absorción de la luz participan procesos que se pueden explicar mediante un modelo denominado esquema Z (Figura 12) que postula que la fotosíntesis que produce oxígeno ocurre mediante las acciones de dos centros de

³¹ Voet, *op. cit.*, p. 643.



reacción fotosintéticos que están conectados en serie. El Fotosistema II (FSII) genera un oxidante fuerte capaz de oxidar el agua y al mismo tiempo, un reductor débil. El Fotosistema I (FSI) que forma un reductor fuerte para reducir el NADP^+ y un oxidante débil. Ambos fotosistemas interactúan para que la transferencia de electrones del H_2O al NADPH se lleve a cabo.

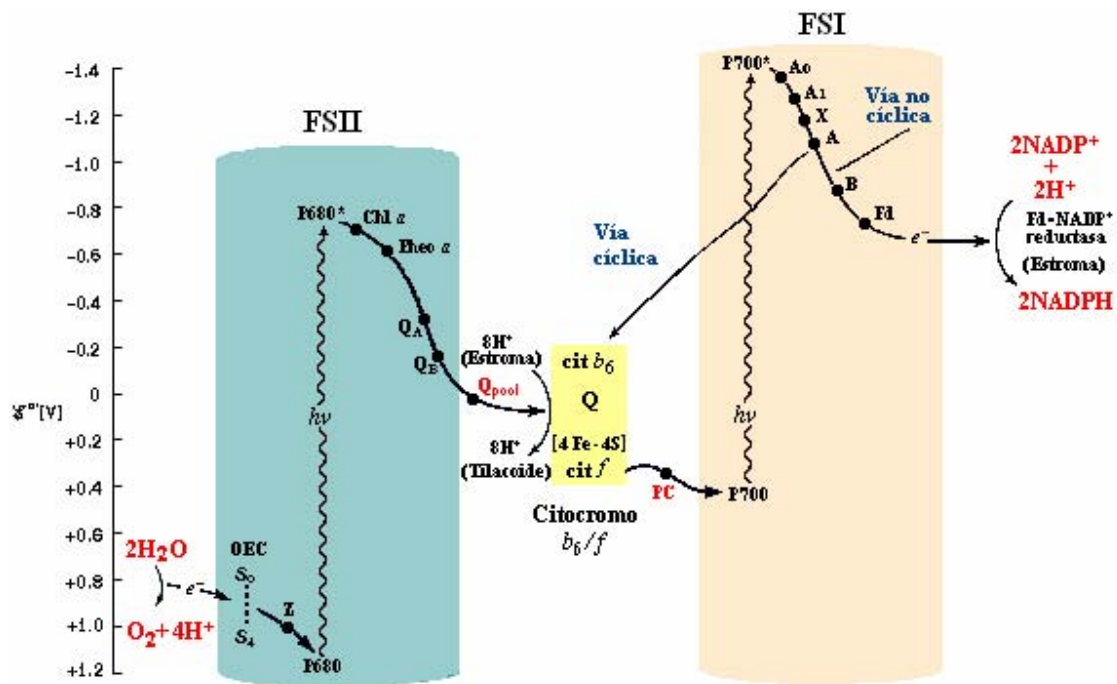


Figura 12. Esquema Z de la fotosíntesis³²

a. Fotosistema II

La oxidación de dos moléculas de H_2O para formar una molécula de O_2 requiere de cuatro electrones y libera cuatro protones del agua en el espacio interno del tilacoide. El fotosistema II contiene cuatro iones Mn unidos a una proteína, que forman un complejo con actividad catalítica, el complejo productor de oxígeno (OEC), que sigue un ciclo a través de varios estados de oxidación (estados S), mientras que al capturar protones y electrones de las dos moléculas de H_2O forman O_2 y 4H^+ . La ausencia de Ca^{2+} y Cl^- bloquea la oxidación del agua y evita la producción de oxígeno.

³² Voet, *op. cit.*, p. 644.



Una sustancia conocida como Z, se encarga del paso de los electrones del agua desde el complejo OEC al centro de reacción del FSII, en donde la especie P680, que consta de clorofila *a*, requiere de una longitud de onda menor a 680 nm para excitarse a P680*. Posteriormente, P680*, transfiere a través de una molécula de clorofila *a*, un sólo electrón a una molécula de feofitina *a* (Pheo *a*) y después a una cadena de transportadores electrónicos hacia un grupo de moléculas de plastoquinona (Q). Primeramente el electrón pasa al complejo de plastoquinona-Fe(II), designado Q_A a continuación, se transportan dos electrones, de uno en uno, a una segunda molécula de plastoquinona, Q_B, que captura dos protones del estroma y se reduce a plastoquinol, Q_BH₂, que intercambia electrones con el grupo de moléculas de plastoquinona unidas a membrana (Q_{grupo}).

Desde el grupo de plastoquinonas, los electrones se transfieren a través de un complejo, el citocromo *b*₆/*f*, que consta de una molécula de citocromo *f*, un citocromo *b*₆ con dos grupos hemo, una proteína de hierro-azufre y un plastoquinol. Este complejo también genera parte del gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. La transferencia electrónica entre el complejo del citocromo *b*₆/*f* y el FSI está mediada por una proteína de membrana, la plastocianina (PC)

b. Fotosistema I

En el centro de absorción de fotones del fotosistema I se encuentra el pigmento fotooxidado P700, que consta de un dímero de moléculas de clorofila *a*, la fotooxidación da lugar a P700*, un oxidante débil, que acepta un electrón directamente de la plastocianina, el cual pasa a una cadena de transportadores. El primero es A₀, un monómero de Chl *a*, el segundo, A₁, es la filoquinona; después, el electrón pasa a través de tres ferredoxinas unidas a membrana, las ferredoxinas X, A y B.

Los electrones que salen del FSI pueden seguir una de dos rutas alternativas. Por la ruta no cíclica, los electrones pasan a una ferredoxina soluble, Fd, en el estroma. La Fd reducida, a su vez, reduce al NADP⁺ por acción de la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa y da lugar al producto final de la reacción luminosa del



cloroplasto, el NADPH. Por la ruta cíclica los electrones vuelven desde el FSI, a través del citocromo b_6 , al grupo de plastoquinonas, y al ser independiente de la acción del FSII, no resulta en la producción de O_2 (Figura 12).

c. Fotofosforilación

Al final de la reacción de la fase luminosa, con la liberación de NADPH, el pH del espacio tilacoidal disminuye y los cloroplastos generan ATP por acoplamiento de la disipación del gradiente de protones. El complejo enzimático encargado de la producción de ATP, mediante la fosforilación de ADP es la CF_0CF_1 -ATP sintetasa, la parte CF_0 es lipofílica y CF_1 hidrofílica (Figura 12). La liberación de ATP y NADPH en el estroma, suministra energía para las reacciones en la fase oscura de la fotosíntesis.

3. Inhibidores del transporte de electrones

Son inhibidores de la reacción de Hill aquellos compuestos que en presencia o ausencia de ADP y P_i o en presencia de NH_4Cl , inhiben el transporte de electrones no cíclico, así como la síntesis de ATP. El sitio más susceptible para la acción de estos compuestos en el flujo de electrones fotosintético, asociado al lado donador o aceptor del FSII, sobre todo en el sitio Q_B . Como ejemplos de inhibidores del transporte de electrones están, la hidroxilamina, que inhibe la fotólisis del agua; el DBMIB (2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-*p*-benzoquinona), el cual evita la función de la plastoquinona y el DCMU (3-(3,4-dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea) que compite con la plastoquinona por el sitio de fijación de Q_B .

4. Inhibidores de la transferencia de energía

Los inhibidores de la transferencia de energía se unen directamente al complejo H^+ -ATPasa del cloroplasto, interfieren con la actividad de CF_1 y/o CF_0 e inhiben la fosforilación. Un ejemplo es la florizina, la cual disminuye la transferencia de energía, al interactuar con CF_1 , inhibe el flujo de electrones dependiente de la fosforilación, pero no tiene efecto sobre el transporte desacoplado, ni en condiciones no fosforilantes. La DCCD (diciclohexilcarbodiimida), inhibe al interactuar con CF_0 .



5. Fluorescencia de la clorofila a ³³

La energía luminosa es absorbida por moléculas de clorofila a y b para la fotosíntesis. Sin embargo, una porción de la luz absorbida se pierde como calor o por reemisión como fluorescencia. Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar a una molécula de clorofila a a su primer estado excitado. La molécula excitada libera la energía y regresa a su estado basal, lo que sucede en cerca de 10^{-8} s, durante este periodo ocurre una separación de carga en el centro de reacción, es decir, el electrón en el nivel de alta energía puede ser transferido a un aceptor I, para formar un aceptor reducido I⁻, lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal.

Bajo condiciones de iluminación, cerca del 97% de la luz absorbida es utilizada para realizar el trabajo fotoquímico, 2.5% es transformado en calor y 0.5% es reemitido como fluorescencia. Si todos los centros de reacción están reducidos, del 95 al 97% de la energía absorbida puede ser desactivada como calor y del 2.5 al 5% vía fluorescencia.

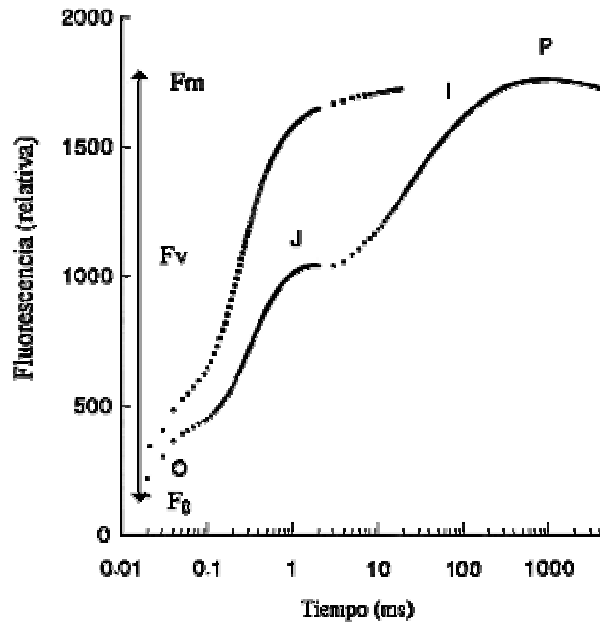
Al iluminar con luz continua las hojas adaptadas a la oscuridad o una suspensión de hojas de plantas superiores, algas o cianobacterias, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila a , a estos cambios se les denomina inducción de la fluorescencia o curva de inducción de la fluorescencia, también llamada *curva de Kaustski*.

A las diferentes fases de la curva de inducción de la fluorescencia se les denomina como O-J-I-P (Figura 13). El aumento de la fluorescencia desde O hasta P ocurre durante el primer segundo de iluminación y es llamada la fase rápida. La fase lenta es después de P y puede tomar algunos minutos antes de llegar a su fase

³³ Strasser, et al. 1997. *Photochemistry and Photobiology*, p. 33-45.



terminal. La fase rápida esta relacionada con los procesos primarios del FSII, mientras que la fase lenta está relacionada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y los procesos metabólicos en el estroma.



Cloroplastos adaptados a la oscuridad por 30 minutos. F_0 , fluorescencia inicial mínima; F_v , fluorescencia variable; F_m fluorescencia variable máxima = $F_m - F_0$. La curva inferior es el control, la superior representa a los cloroplastos dañados en el lado aceptor del FSII con $50 \mu\text{M}$ de DCMU.

Figura 13. Curva de inducción de la fluorescencia

La cinética de la curva de inducción de la fluorescencia de la fase rápida ha sido estudiada por Delosme R (1971), las características de esta fase con relación a la luz y a la temperatura, sugieren que la fase O-J está controlada por la separación de carga. La fluorescencia variable relativa en un tiempo t es definida como $V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$. Esta expresión experimental puede ser tomada como una medida de la fracción del aceptor de electrones Q_A que está en su estado reducido.

Cuando se agrega DCMU, hay un inmediato aumento de la fluorescencia en la fase rápida; la razón de que esto ocurra es debido a que el DCMU bloquea el flujo de electrones después del aceptor primario del FSII (Q_A^-), es decir, inhibe la reoxidación de Q_A^- .



II. METODOLOGÍA

A. Material vegetal

El material vegetal empleado en el desarrollo del presente trabajo (2 Kg de planta entera de *Selaginella lepidophylla* Spring), se adquirió en el anexo del Mercado de Sonora, local 173, en agosto del 2005. La identificación fue realizada por el Dr. R. Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM. Y otra muestra de 300 g se apartó para las pruebas de control de calidad.

B. Ensayos biológicos

1. Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* Leach

Los diferentes extractos y fracciones se evaluaron con el ensayo de toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach³⁴. Para el medio de cultivo se preparó una solución de agua de mar comercial con 35 g de medio salino artificial por litro de agua destilada en un recipiente de vidrio, se filtró la solución, y se burbujeó aire durante 20 min con una bomba de aire para reoxigenar el medio³⁵. Después se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* y se incubaron durante 48 horas a 28° C, mediante la aplicación de luz natural o artificial.

Las muestras por evaluar se prepararon de la siguiente manera: se pesaron 20 mg de muestra en un tubo de ensayo y se disolvieron en 2 mL del disolvente apropiado. De la solución resultante, se transfirieron alícuotas (por triplicado), de 500, 50 y 5 µl a tubos de ensayo y el disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente. Después de 48 horas de incubación, se transfirieron 10 crustáceos a cada tubo con

³⁴ Meyer, et al. 1982. *Planta Medica*, pp. 32-34, y McLaughlin, et al. 1991. *Studies in Natural Products, Chemistry*.

³⁵ Teng. 1993. *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*, p. 444.



muestra y se aforó a 5 mL con medio de cultivo (sin huevecillos, ni larvas) para obtener una concentración final de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Las larvas se incubaron durante 24 h a 28° C, se contaron los crustáceos sobrevivientes y se calculó la concentración a la cual se encuentra una mortandad del 50% de los organismos.

La concentración letal media (CL_{50}), se determinó mediante dos métodos gráficos, en uno se graficó el número de organismos (muertos y vivos acumulados en el mismo eje) vs. logaritmo de la concentración, se trazaron las curvas y cuando el número de vivos fue igual al número de muertos, el punto de intersección se extrapoló para obtener el valor de CL_{50} ; mediante otro método, se graficó el porcentaje de mortalidad vs. logaritmo de la concentración y por intersección en el 50%, se determinó el valor de CL_{50} .³⁶ El criterio de actividad indica que un extracto y/o fracción es activo cuando el valor de CL_{50} es menor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ y en el caso de compuestos puros debe ser menor a 200 $\mu\text{g/mL}$.

2. Determinación de la actividad citotóxica

El potencial citotóxico se determinó de acuerdo a procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos (EUA)³⁷ y a técnicas descritas previamente³⁸. Las líneas celulares que se utilizaron fueron KB (carcinoma nasofaríngeo), HEP-2 (carcinoma de laringe humano) y HeLa (carcinoma cervical). Las células se probaron durante la fase logarítmica de su ciclo de crecimiento, frente a diferentes concentraciones (20, 4, 0.8 y 0.16 $\mu\text{g/mL}$) de los extractos, fracciones y/o compuestos puros. El ensayo se realizó por triplicado, las células se incubaron por 72 horas a 37° C y una atmósfera con CO_2 al 5%. Como control positivo se utilizó colchicina.

La concentración final de células se determinó por análisis proteico y los resultados de la actividad se expresan como la concentración que inhibió el 50% del

³⁶ *Ibid.*, p 447.

³⁷ Anderson, *et al.* 1991. *Phytochemical Analysis*, pp. 107-111.

³⁸ Geran, *et al.* 1972. *Cancer Chemotherapy Reports*, pp. 1-17.



crecimiento celular (CE_{50}), los valores se estimaron mediante una gráfica semilogarítmica del porcentaje de células viables contra la concentración y se utilizó un programa de regresión no lineal. Los criterios basados en datos estadísticos establecen correlaciones de actividad citotóxica cuando un extracto y/o fracción presenta su CE_{50} menor a 20 $\mu\text{g/mL}$ y en compuestos puros debe ser menor a 5 $\mu\text{g/mL}$.

3. Determinación de la actividad antimicrobiana

La evaluación preliminar del potencial antibacteriano y antifúngico de los extractos se realizó mediante las técnicas microbiológicas de difusión y dilución en agar.

a. Difusión en agar³⁹

El ensayo se realizó por triplicado de acuerdo al método de Kirby-Bauer⁴⁰, se utilizaron placas con agar Müller-Hinton y se inocularon con los siguientes microorganismos (50UK): *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se colocaron discos impregnados con diferentes concentraciones (1000, 500 y 100 $\mu\text{g/mL}$) del extracto $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$, hexánico, de acetato de etilo y *n*-butanólico (disueltos en DMSO), sobre la superficie de la placa de agar y se incubaron de 24 a 48 horas a 35° C.

Visualmente, se determinó el desarrollo del microorganismo y en caso de presentarse, se valoró el diámetro del halo de inhibición y se comparó con los controles. Se utilizó DMSO como control negativo y novobiocina como control positivo.

b. Dilución en agar

Los inóculos de bacterias se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo a 37° C durante 24 horas. La levadura y hongos se desarrollaron en caldo-glucosa

³⁹ Obregón, et al. 2000. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, pp. 14-15.

⁴⁰ Bauer, et al. 1966. *American Journal of Clinical Pathology*, pp. 494-495.



Sabouraud al 2% y se incubaron a 28° C por 48 horas. Se estandarizó el número de microorganismos desarrollado en los cultivos a una concentración aproximada de 10⁶ células/mL; se empleó el patrón de turbidez #1 de McFarland (0.1 mL de BaCl₂ al 1% y 9.9 mL de H₂SO₄ al 1%), lo cual se logró al adicionar al tubo de cultivo, solución salina isotónica hasta lograr la misma turbidez.

Se evaluó la actividad del extracto CHCl₃:MeOH, hexánico, de acetato de etilo, *n*-butanólico y del residuo insoluble, frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella tiphy*; la levadura *Candida albicans* y los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. Como control positivo se utilizó para bacterias, gentamicina; para la levadura, nistatina y para los hongos miconazol. El rango de concentración probado fue de 750 a 6000 µg/mL.

La cuantificación se realizó por el método turbidimétrico. El valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se registró como la concentración más baja del extracto que inhibió visiblemente la proliferación del microorganismo probado sobre el agar.⁴¹

4. Determinación del efecto fotosintético

a. Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.), se escogieron aproximadamente 40 g de hojas frescas y turgentes, que no estuvieran maltratadas o rotas, se lavaron con cuidado, en una bandeja con agua, después se eliminó el exceso de agua y se secaron con papel absorbente. De las hojas secas se separaron la nervadura y la punta de la hoja, se fragmentaron cuidadosamente en pequeños trozos y se homogenizaron en una licuadora (Osterizer L-21) con 250 mL de medio de aislamiento de cloroplastos⁴² a 4° C, para lo cual, se enfrió en un baño de

⁴¹ Navarro, et al. 2003. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 86.

⁴² Medio de aislamiento: sacarosa 400 mM, MgCl₂·6H₂O 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM, ajustado a pH 8.0



hielo. El homogenizado se filtró a través de ocho capas de gasa y los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm a 4° C (Centrífuga Sorval Super T21, DUPONT). Después de 5 min de reposo, el sedimento se resuspendió en 1 mL del mismo medio, se resguardó de la luz, y se mantuvo a 4° C.⁴³

La cuantificación de clorofila⁴⁴ se realizó por duplicado, se tomó una alícuota de 20 µL de la suspensión de cloroplastos y se aforó a 5 mL con acetona al 80%, se incubó en la oscuridad a 4° C durante 5 min. La suspensión se centrifugó por 7 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica (Centrífuga EBA 8S, Hettich) para eliminar las membranas y proteínas precipitadas. El contenido de clorofila se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Beckman modelo DU650), al medir la absorbancia del sobrenadante a dos longitudes de onda, 663 y 645 nm. La concentración de clorofila se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$[Chl] = [8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})] \times 5$$

En donde: $[Chl]$ µg de clorofila por mililitro.
8.05 y 20.29 Coeficientes de extinción para cada longitud de onda.
 A Absorbancia a las longitudes de onda indicadas.
5 Volumen del aforo.

b. Determinación de la síntesis de ATP

En la síntesis de ATP, a pH 8.0 un protón se consume irreversiblemente, así, la formación de ATP se determinó al detectar la alcalinización del medio⁴⁵ mediante el registro de los cambios de pH entre 8.0 y 8.1 en el medio de reacción con un microelectrodo (Orion, 8103 Ross) conectado a un potenciómetro (Corning, Modelo 12) de escala expandida. El cambio de voltaje generado por los cambios de pH se transdujeron a un registrador gráfico Gilson.

⁴³ Mills, *et al.* 1980. *FEBS Letters*, p. 174.

⁴⁴ Strain, *et al.* 1971. *Methods in Enzimology*, pp. 473-474.

⁴⁵ Schwartz. 1968. *Nature*, pp. 917-918.



En la cámara de reacción se agregaron 3 mL de medio bomba⁴⁶, 30 μ L de ADP 3 mM, 30 μ L de fosfato inorgánico 3 mM (KH_2PO_4), se ajustó el pH a 8, se agregó una alícuota equivalente a 60 μ g de clorofila y otra de la muestra evaluada. Con agitación constante, se registró el cambio de pH durante un periodo de iluminación de 1 minuto, el haz luminoso se pasó a través de un filtro de 5 cm de espesor de una solución de CuSO_4 al 2%. Este es un método simple que provee una medida real de la síntesis o de hidrólisis de ATP. Por lo tanto, la velocidad de síntesis de ATP se calculó con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{a \cdot h}{C}$$

En donde: V Velocidad de la síntesis de ATP (μ moles de ATP/mg de chl·h).
 a μ moles de H^+ utilizados en la titulación.⁴⁷
 h Altura de la curva obtenida durante un minuto de iluminación (cm).
 C Concentración de clorofila (60 μ g).

En la Figura 14, se muestra el sitio de acción en la cadena transportadora de electrones de los inhibidores (líneas punteadas), donadores y aceptores de electrones (flechas), utilizados en las reacciones que a continuación se describen.

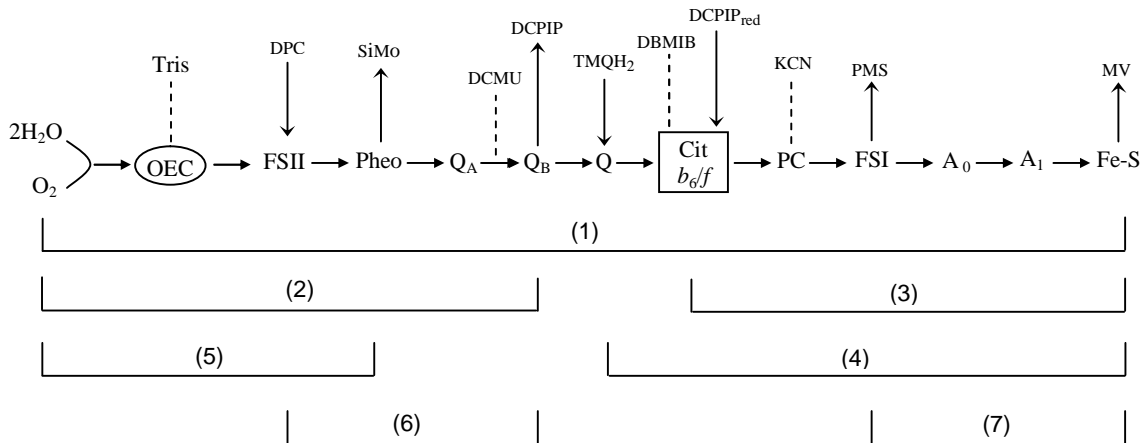
c. Determinación del transporte de electrones

El flujo de electrones fotosintético no cíclico, de agua a MV [Figura 14, (1)], se determinó de forma indirecta al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua, bajo tres condiciones experimentales: transporte basal, fosforilante y desacoplado.⁴⁸ El ensayo se realizó en presencia de MV, como aceptor artificial de electrones, la producción de oxígeno se midió con un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental) Modelo 5300, y un electrodo tipo Clark.

⁴⁶ Medio bomba: sacarosa 100mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, KCl 10mM, tricina 1 mM, KCN 0.5 mM y MV 50 μ M, pH 8.0.

⁴⁷ Mezcla de reacción con 10 μ L de KOH (0.01N), en presencia de cloroplastos sin iluminar.

⁴⁸ Saha, *et al.* 1971. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 3204-3205.



- (1) Transporte de electrones de agua a MV
 (2) Flujo de electrones del FSII de H₂O a DCPIP
 (3) Flujo de electrones del FSI de DCPIP_{red} a MV
 (4) Transporte de electrones del FSI de TMQH₂ a MV
 (5) Reacción parcial del FSII de H₂O a SiMo
 (6) Reacción parcial del FSII de DPC a DCPIP
 (7) Reacción parcial del FSI de PMS a MV

Figura 14. Reacciones parciales de la cadena transportadora de electrones

La cantidad de oxígeno que se desprende se calculó a partir de las pendientes de las gráficas obtenidas al registrarse los cambios del potencial redox. La velocidad del transporte de electrones se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{a}{X_t \cdot X_p \cdot C}$$

En donde: V Velocidad del transporte de electrones ($\mu\text{equiv de e}^- / \text{mg de chl} \cdot \text{h}$).

a 0.4 μequiv de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ utilizados en la titulación.⁴⁹

X_t Altura de la curva obtenida durante un minuto de iluminación (cm).

X_p Altura de la curva obtenida al consumirse 0.4 μequiv . $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (cm).

C Concentración de clorofila (60 μg).

Para determinar el transporte de electrones basal se agregaron a la cámara de reacción 3 mL de medio de transporte de electrones⁵⁰ y 60 μg de Chl, a diferentes concentraciones de la muestra evaluada. El medio se mantuvo en agitación constante

⁴⁹ Titulación: medio de transporte de electrones sin MV, 10 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 40 mM y 60 μg de Chl, se iluminó hasta la reducción total del ferricianuro.

⁵⁰ Medio Transporte de Electrones: sacarosa 100 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, KCl 10 mM, tricina-KOH 15 mM, KCN 0.5 mM y MV 50 μM , pH 8.0.



y se iluminó durante 3 minutos, el haz luminoso, se pasó a través de una solución de CuSO_4 , como en la determinación de la síntesis de ATP.

El transporte de electrones fosforilante se midió al iluminar los cloroplastos (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio de transporte con ADP 1 mM, KH_2PO_4 1 mM y la muestra evaluada.

El transporte desacoplado se determinó de forma similar al basal; al emplear medio de transporte de electrones, clorofila, compuesto y se adicionó NH_4Cl 6 mM, como agente desacoplante.

d. Determinación del transporte de electrones de los fotosistemas

El transporte de electrones desacoplado del FSII se midió polarográficamente de H_2O a DCPIP [Figura 14, (2)]. Se agregaron a la cámara de reacción 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV, en presencia de DBMIB 1 μM , como inhibidor del flujo de electrones hacia el FSI a nivel del complejo Cit b_6/f ; DCPIP 100 μM , que compete con Q como aceptor de electrones; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 300 μM y NH_4Cl 6 mM.⁵¹

La velocidad del flujo de electrones desacoplado del FSI, de DCPIP reducido a MV [Figura 14, (3)] se determinó de manera similar al transporte basal, con 3 mL del medio de transporte de electrones con DCMU 10 μM como inhibidor de Q_B , para impedir el flujo de electrones del FSII al FSI; DCPIP 100 μM reducido con ascorbato 300 μM , como donador artificial a nivel del complejo Cit b_6/f y NH_4Cl 6 mM. El aceptor final de electrones fue el MV.⁵²

El flujo de electrones desacoplado del FSI que incluye a la plastoquinona desde TMQH_2 a MV [Figura 14, (4)], se determinó polarográficamente. En los cloroplastos, TMQH_2 soporta la fosforilación acoplada al flujo de electrones a través del FSI hasta MV. La reacción es totalmente sensible a DBMIB, lo que indica una donación de

⁵¹ Izawa. 1980. *Methods in Enzymology*, pp. 413-420.

⁵² Allen, et al. 1986. *Photosynthesis, Energy Transduction: a Practical Approach*, pp. 103-128.



electrones de la plastoquinona a la cadena fotosintética.⁵³ El ensayo se realizó de manera similar al transporte electrónico de DCPIP_{red} a MV; se utilizó el medio de transporte de electrones con NH₄Cl 6 mM, 200 µM de TMQ reducido (TMQH₂) con ascorbato 300 µM y DCMU 10 µM.

En cada caso se iluminaron los cloroplastos (20 µg/mL) durante 3 minutos, a diferentes concentraciones de la muestra evaluada.

e. Reacciones parciales del fotosistema II

Para la reacción parcial de H₂O a SiMo [Figura 14, (5)], en la cámara de reacción se colocaron 60 µg de Chl en 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV; como agente desacoplante NH₄Cl 6 mM; se utilizó DCMU 10 µM para impedir el paso de electrones hacia el FSI⁵⁴ y SiMo 200 µM como aceptor artificial de electrones, concentraciones crecientes del compuesto a evaluar fueron ensayadas.

El transporte de electrones desacoplado de DPC a DCPIP [Figura 14, (6)] se determinó por espectrofotometría. Se emplearon cloroplastos tratados con Tris 0.8 M, pH 8.0, para inhibir la fotólisis del agua. El tratamiento de los cloroplastos se realizó en la oscuridad, se incubaron los tilacoides (300 µg/mL) en 10 mL de tris, durante 30 minutos a 4°C.⁵⁵ Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, el pellet se resuspendió con 500 µL de medio de aislamiento y se determinó el contenido de clorofila. En una celda espectrofotométrica de 3 mL se colocaron 3 mL del medio de transporte de electrones sin MV, NH₄Cl 6 mM, DPC 200 µM como donador artificial de electrones, DCPIP 100 µM como aceptor final de electrones, Chl 45 µg y el compuesto estudiado. La mezcla resultante, se agitó, se registró la absorbancia a 600 nm, se iluminó por 2 minutos, y se midió nuevamente a la misma longitud de onda. El blanco utilizado fue la misma mezcla de reacción sin DCPIP. La velocidad del transporte de electrones se determinó con la siguiente ecuación:

⁵³ Izawa, et al. 1978. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 1171.

⁵⁴ Guaiquinta, et al. 1975. *Biochemical and Biophysical Acta*, pp. 288-300.

⁵⁵ Vernon, et al. 1969. *Plant Physiology*, pp. 1645-1646.



$$V = \frac{\Delta A \cdot 1.4 \text{ eq } e^-}{1000 \cdot \varepsilon \cdot t \cdot C}$$

- En donde: V Velocidad del transporte de electrones ($\mu\text{equiv de } e^- / \text{mg de chl}\cdot\text{h}$).
- ΔA Diferencia de las absorbancias al $t=0$ y $t=2$ min.
- ε Coeficiente de extinción molar (4.6×10^{-4}).
- t Tiempo de iluminación (2 min).
- C Concentración de clorofila (45 μg).

f. Reacciones parciales del fotosistema I

La reacción parcial del FSI de P_{700} a F_x se determinó al medir el transporte de electrones desde PMS/asc a MV con cloroplastos envenenados [Figura 14, (7)]. Los cloroplastos (300 $\mu\text{g/mL}$) se incubaron en la oscuridad con KCN 30 mM (inhibidor del transporte de electrones a nivel de plastocianina, PC) en medio de transporte basal sin MV por 30 min a 4 °C.⁵⁶ Posteriormente, los cloroplastos tratados se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min, el pellet se resuspendió con medio de aislamiento y se determinó el contenido de Chl. En la cámara de reacción se colocaron 3 mL del medio de transporte de electrones más NH_4Cl 6 mM, PMS 100 μM reducido con 300 μM de ascorbato y se añadió DBMIB 1 μM como inhibidor del complejo cit b_6/f . Los estudios de resonancia electroparamagnética (EPR) han demostrado que el PMS reducido interactúa con P_{700} como donador de electrones al centro de reacción del FSI.⁵⁷

Los valores de I_{50} de cada actividad se extrapolaron con la gráfica de porcentaje de actividad contra la concentración de los compuestos. Por lo tanto, I_{50} es la concentración a la cual se produce el 50 % de inhibición de la actividad.

g. Actividad de Mg^{2+} -ATPasa

La actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa se determinó por métodos previamente descritos.⁵⁸ Los cloroplastos se obtuvieron de hojas de espinacas frescas, que fueron

⁵⁶ Ouitrakul & Izawa. 1973. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 105-106.

⁵⁷ Schwartz. 1968. *Nature*, p.915.

⁵⁸ Mills, *op. cit.* pp. 173-174.



homogenizadas durante 5 segundos con 150 mL de medio de aislamiento para ATPasa,⁵⁹ el homogenado se filtró a través de 8 capas de gasa, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos. El sedimento se lavó con 2 mL de medio de aislamiento y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min. El pellet se reconstituyó con 1 mL de medio de resuspensión⁶⁰ y se cuantificó el contenido de clorofila.

Para la activación de la enzima se adicionaron a 300 µg de Chl, 250 µL de medio de activación I y 650 µL del medio de activación II⁶¹. Posteriormente, se iluminó durante 1.5 minutos con luz actínica, bajo agitación constante. El grado de hidrólisis de ATP se determinó al mezclar 100 µL de cloroplastos activados con 900 µL del medio⁶² para determinar la actividad de la enzima Mg²⁺-ATPasa. Este proceso se realizó en absoluta oscuridad y bajo agitación.

La reacción se suspendió con la adición de 500 µL de ácido tricloroacético al 10%. Las proteínas precipitadas, se eliminaron por centrifugación durante 5 min a 2000 rpm. El fosfato se cuantificó por el método colorimétrico de Fieske Subbarow.⁶³ Se realizó una curva patrón de KH₂PO₄, los resultados del fosfato liberado al hidrolizarse el ATP se interpolaron en la curva patrón para obtener las concentraciones de Pi. La actividad de la enzima Mg²⁺-ATPasa es proporcional a la concentración de Pi liberado.

h. Fluorescencia de la clorofila *a*

La fluorescencia de la clorofila *a* se determinó a temperatura ambiente con un fluorómetro Hansatech Fluorescence Handy PEA (Plant Efficiency Analyser) en cloroplastos incubados en la oscuridad durante 5 minutos. La máxima fluorescencia alcanzada por la muestra se generó con luz roja (longitud de onda en 650 nm) de 3000 µmol/m²-s que emiten un conjunto de tres diodos. La duración del pulso fue de 2 s.

⁵⁹ Medio aislamiento para ATPasa: sorbitol 350 µM, ácido ascórbico 5 mM y MES 20 mM, a pH 6.5.

⁶⁰ Medio resuspensión: sorbitol 0.35 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, MnCl₂·4H₂O 1 mM y HEPES 50 mM, a pH 7.6.

⁶¹ Medio activación I: sorbitol 1.2 M y HEPES 15 mM, pH 8.0. Medio de activación II: MgCl₂·5 mM y HEPES 15 mM, pH 8.0

⁶² Medio de hidrólisis de ATP: KCl 50 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM y HEPES 15 mM y ATP 2.2 mM, a pH 8.0.

⁶³ Summer. 1974. *Science*, 44, p. 414.



Alícuotas con 20 μg de clorofila se transfirieron por gravedad sobre papel filtro (1 cm^2), con un aparato Dot-blot (bio-rad USA), para asegurar una distribución homogénea y reproducible de la gota en el papel. Los cloroplastos se introdujeron inmediatamente a viales que contenían 3 mL de medio de transporte de electrones con concentraciones crecientes de los compuestos evaluados. Como controles positivos, se emplearon DCMU 10 μM y cloroplastos tratados con Tris 0.8 M, pH 8.

El instrumento capta automáticamente el rendimiento de fluorescencia de la clorofila *a* mediante un diodo filtrante cada 10 μs durante los primeros 2 ms. La fluorescencia va de un valor mínimo (F_0) a un valor máximo (F_m) que es indicativo de la reducción del aceptor primario ($Q_A \rightarrow Q_A^-$) por los centros de reacción del FSII.⁶⁴

C. Estudio fitoquímico

1. Métodos cromatográficos

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, Kieselgel 60, Merck y sobre Sephadex lipofílico LH-20 100-50, tamaño de partícula 25-100 μ , Sigma-Aldrich. La separación por cromatografía en capa fina se realizó en placas de vidrio de 20x20 cm, recubiertas con sílica gel de 1 mm de espesor, DC-FERTIGPLATTEN SIL G-100 UV₂₅₄, Macherey-Nagel y la cromatografía analítica en cromatofolios de gel de sílice 60, de 0.20 mm de espesor ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c con longitud de onda de 254 y 365 nm; solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico 2 N⁶⁵ y solución de cloruro de cobalto (CoCl_2) al 2% disuelto en ácido sulfúrico 2 N.

⁶⁴ Strasser, *et al.* 1995. *Photochemistry and Photobiology*, pp. 32-45.

⁶⁵ Stahl & Schorn. 1969. *Thin Layer Chromatography-A Laboratory Handbook*, p. 384.



2. Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns y se reportan sin corregir.

Los experimentos espectroscópicos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Los espectros en el UV se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 en MeOH. Los espectros de dicroísmo circular se registraron en un polarímetro Jasco J-720, en MeOH. Los de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR de rejilla, Perkin-Elmer, modelo 1605, en pastilla de KBr o película. Los espectros de masas, modalidad FAB⁺ de baja resolución e impacto electrónico, se determinaron en un espectrómetro JEOL SX, modelo 102-A, Hewlett Packard.

Para los compuestos **6d3**, **5e** y **6b2c**, la espectroscopía de RMN se determinó a 500 MHz en ¹H y a 125 MHz en ¹³C, en un espectrómetro analítico Varian Inova. Para el compuesto **RIAc** los espectros se determinaron a 400 MHz para ¹H y a 100 MHz en ¹³C, para lo cual se utilizaron espectrómetros analíticos Varian Unity Inova. Como disolvente se empleó CDCl₃ o CD₃COCD₃ y los desplazamientos químicos se designaron en unidades δ (ppm), referidos a TMS o CDCl₃ como referencia interna.

3. Reacción general de acetilación

Para la obtención de los productos acetilados, a 100 mg del compuesto o fracción se agregaron 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina. La mezcla se dejó reaccionar con agitación magnética durante 24 horas, a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina.

Al producto de reacción se le adicionaron 5.0 g de agua-hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%. La mezcla acuosa se extrajo por triplicado con 15 mL de



acetato de etilo. La fase orgánica obtenida se extrajo con 3 porciones de 5 mL de una solución saturada de NaHCO_3 , posteriormente, se lavó con 3 porciones de 5 mL de agua. El extracto orgánico se secó con Na_2SO_4 anhidro y por evaporación, se concentró a sequedad para la obtención del producto acetilado.⁶⁶

4. Extracción y fraccionamiento preliminar

La desecación de la planta entera se logró por calor natural, a temperatura ambiente y se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Thomas-Wiley No. 4. Para la obtención del extracto total, el material vegetal (1.4 Kg) se empacó en una columna de 100 cm de longitud y 12.5 cm de diámetro y se extrajo con una mezcla de CHCl_3 :MeOH (1:1) por el método de percolación, a temperatura ambiente. El extracto resultante se concentró por evaporación al vacío en un rotaevaporador.

El extracto total (129 g) se resuspendió en una mezcla MeOH:H₂O (8:2) y se sometió a un fraccionamiento vía partición líquido-líquido, con los siguientes disolventes por separado: hexano, acetato de etilo y *n*-butanol. Durante el proceso, se obtuvo un residuo insoluble en los disolventes ya mencionados, poco soluble en metanol y soluble en DMSO (Figura 15).

5. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo

El residuo seco de la extracción con acetato de etilo (11 g) obtenido en la partición, se fraccionó por cromatografía de adsorción en columna abierta sobre gel de sílice (170 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con incrementos de polaridad [hexano:AcOEt (1:0→0:1) y CHCl_3 :MeOH (1:0→0:1)]. Se obtuvieron 50 eluatos con volumen equivalente a 500 mL y de acuerdo a su perfil en ccf, se reunieron aquellos que mostraron similitud en su composición, así; se obtuvieron 14 fracciones (Tabla 3).

⁶⁶ Shriner, et al. 1997. *Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos*, p. 269.

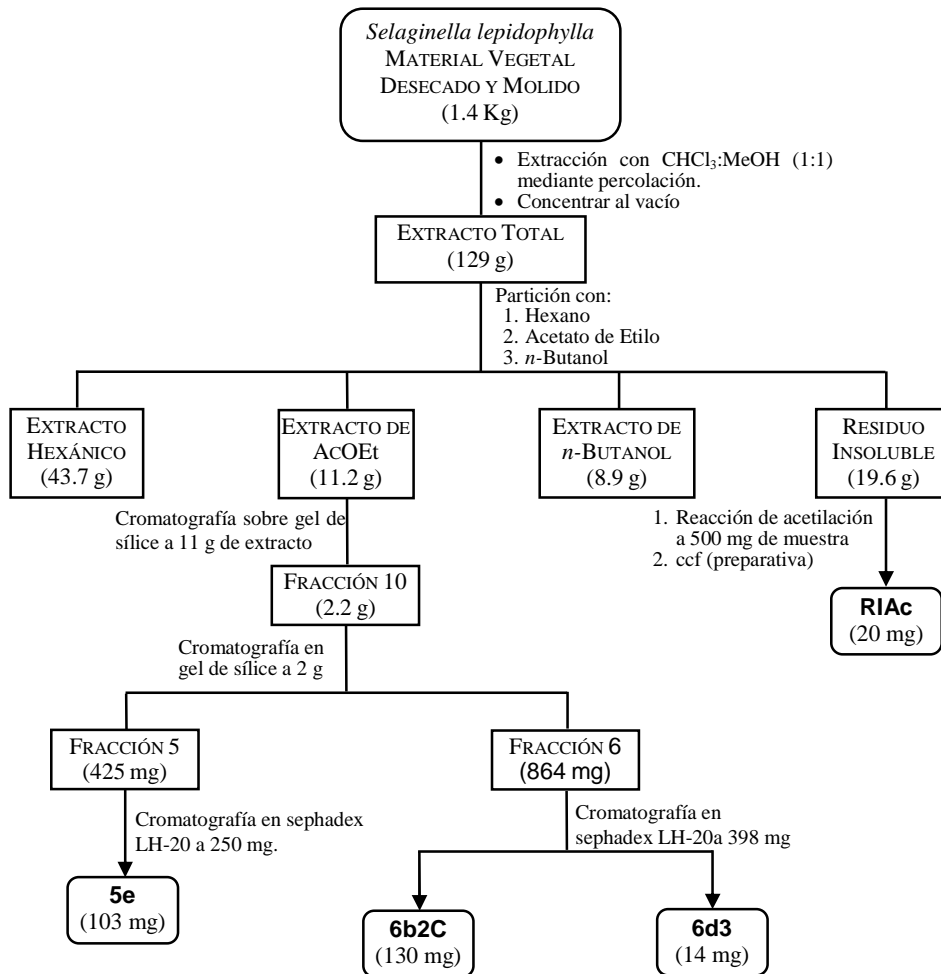


Figura 15. Extracción y fraccionamiento de *Selaginella lepidophylla*

Fracción	mg	Eluatos	Sistema de elución	Proporción (%)
F1	16	1-4	Hexano	100
F2	60	5-7	Hexano:AcOEt	98:2
F3	202	8-10	Hexano:AcOEt	95:5
F4	132	11	Hexano:AcOEt	80:20
F5	320	12-14	Hexano:AcOEt	80:20
F6	342	15	Hexano:AcOEt	50:50
F7	454	16-17	Hexano:AcOEt	50:50
F8	498	18	Hexano:AcOEt	50:50
F9	2200	19	Hexano:AcOEt	20:80
F10	2175	20-24	AcOEt	100
F11	13	25-27	CHCl ₃	100
F12	1300	28-29	CHCl ₃ :MeOH	80:20
F13	2373	30-41	CHCl ₃ :MeOH	65:35
F14	715	42-50	MeOH	50:50-100



La fracción F10 (1.9 g) se sometió a un fraccionamiento adicional por cromatografía en columna abierta sobre 40 g de gel de sílice. En el sistema de elución se usaron mezclas de CHCl_3 :MeOH, con aumento de polaridad (1:0→0:1). Se obtuvieron 140 eluatos de 50 mL, los cuales se reunieron según su similitud por ccf en un conjunto de 7 subfracciones (Tabla 4).

Fracción	mg	Eluatos	Sistema de elución	Proporción (%)
F'1	12	1-25	CHCl_3	100
F'2	273	26-35	CHCl_3 :MeOH	98:2
F'3	193	36-60	CHCl_3 :MeOH	98:2
F'4	141	61-67	CHCl_3 :MeOH	96:4
F'5	425	68-83	CHCl_3 :MeOH	90:10
F'6	864	84-126	CHCl_3 :MeOH	80:20
F'7	56	127-140	MeOH	50:50-100

6. Aislamiento de los biflavonoides

El análisis cromatográfico en capa fina de la fracción secundaria F'5, del extracto de acetato de etilo, reveló la presencia de un compuesto mayoritario, que se separó hasta su purificación por cromatografía de adsorción en columna abierta, se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y metanol como único eluyente. Así, se lograron obtener 103 mg del compuesto denominado **5e**.

El perfil en ccf de la subfracción F'6 mostró la presencia de dos compuestos mayoritarios; para su separación y aislamiento se utilizó la técnica descrita para el compuesto **5e** y se lograron purificar dos compuestos: **6d3** (130 mg) y **6b2C** (14 mg).

7. Aislamiento de un azúcar peracetilado

Una muestra de 500 mg del residuo insoluble obtenido en el proceso de partición (Figura 14), se acetiló durante 12 horas; el curso de la reacción fue monitoreado por ccf, posteriormente se separaron los productos acetilados al aplicar 160 mg (disueltos en acetona) del producto procesado de la reacción sobre dos cromatoplasmas preparativas de gel de sílice y se eluyó con una mezcla hexano:AcOEt (4:6). Así, se logró la purificación de un compuesto en forma de cristales (**RIAc**).



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de describir y discutir los resultados derivados de la presente investigación es necesario destacar que la selección del material vegetal, se hizo con base en consideraciones de tipos etnomédico y quimiotaxonómico. El criterio etnomédico se fundamenta en el hecho de que la planta *Selaginella lepidophylla* Spring (Hook & Grev), popularmente conocida como doradilla, es utilizada en diversas regiones de México por sus propiedades curativas para el alivio de malestares relacionados con los riñones y el hígado. El criterio quimiotaxonómico se basa en los antecedentes de un gran número de especies de selaginelas como una fuente valiosa de flavonoides, metabolitos secundarios con propiedades citotóxicas⁶⁷ y herbicidas⁶⁸.

A. Obtención de los extractos

El material vegetal empleado, como se mencionó en la metodología, se adquirió en un mercado de plantas (Mercado de Sonora) en el que se expenden diferentes especies con fines medicinales en nuestro país. Tras un método de percolación con CHCl_3 :MeOH de la planta completa molida, se obtuvo el extracto total de consistencia pastosa y color verde oscuro, el cual se sometió a un proceso de fraccionamiento por partición líquido-líquido con hexano, acetato de etilo y *n*-butanol, para la separación preliminar de los principios contenidos en él, según sus diferencias de polaridad.

El extracto hexánico presentó consistencia oleosa y coloración verde; la ccf indicó abundancia de clorofilas en su composición. El extracto de acetato de etilo se obtuvo en forma sólida de color café oscuro; la ccf reveló complejidad en su composición y se observaron coloraciones cafés y amarillas a simple vista. El extracto butanólico se

⁶⁷ Lin, et al. 2000. *Journal of Natural Products*, pp. 627, 629, y Silva et al. 1995. *Phytochemistry*, p. 129.

⁶⁸ Céspedes, et al. 2001. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, p. 63. y Morales Flores, et al. 2007. *Photosynthesis Research*, pp. 71-72.



obtuvo como sólido, color café; en su estudio cromatográfico se observó una mezcla muy compleja con poca separación de sus componentes al eluirlo con metanol.

Al finalizar el fraccionamiento líquido-líquido del extracto total se obtuvo un residuo sólido de color arena, poco soluble en metanol y agua, pero soluble en DMSO; en la cromatoplaqueta eluida con metanol, no se observó, bajo luz UV, desplazamiento significativo de la muestra a partir del punto de aplicación, sin embargo al revelar con sulfato cérico se presentó una banda de color negro.

B. Ensayos biológicos

1. Determinación de la toxicidad de extractos y fracciones contra *Artemia salina*

El bioensayo con *Artemia salina* aunque no es específico para detectar una actividad antitumoral definida, ha observado correlación significativa con compuestos citotóxicos.⁶⁹ De acuerdo a lo anterior y a los antecedentes en la literatura de que diversas especies del género *Selaginella* han mostrado actividad significativa en pruebas de citotoxicidad⁷⁰, se probaron los extractos obtenidos de esta planta para analizar preliminarmente su potencial citotóxico.

Los extractos total (CHCl₃-MeOH), hexánico, de acetato de etilo, butanólico y el residuo insoluble obtenido del fraccionamiento líquido-líquido no mostraron actividad tóxica al crustáceo *Artemia salina*. Sin embargo, las fracciones primarias del extracto de acetato de etilo, F2, F3, F4 y F5 obtenidas por cromatografía en columna mostraron CL₅₀'s de 20, 13, 32 y 251 ppm, respectivamente. Las fracciones de mayor polaridad que contienen biflavonoides no fueron activas.

2. Determinación de la actividad citotóxica

A pesar de no haber obtenido resultados positivos en las pruebas preliminares de toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*, se ensayaron los extractos: total, hexánico

⁶⁹ Anderson, et al. 1991. *Phytochemical Analysis*, pp. 107-108, y Meyer, et al. 1982. *Planta Medica*, p. 32.

⁷⁰ Lin, loc cit.; Silva, loc cit. y Sun, et al. 1997. *Journal of Natural Products*, p. 382, 383.



y de acetato de etilo en dos líneas celulares tumorales: KB (carcinoma nasofaríngeo) y HeLa (carcinoma cervical), y el extracto total presentó moderada actividad en la línea celular HeLa.

La fracción primaria, F10, obtenida de la cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo presentó actividad citotóxica con un valor de CE_{50} de 16.2 $\mu\text{g/mL}$ contra la línea celular KB, la fracción F5 en la línea HEP-2 con una CE_{50} de 21.8 $\mu\text{g/mL}$ y 21.0 en KB. Las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria F10 observaron una CE_{50} muy superior a 20 $\mu\text{g/mL}$ en la línea KB, salvo en el caso de F'2 y F'4 que obtuvieron valores de 12.8 y 22.1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Por otra parte, los compuestos **6b2C** y **6d3** no presentaron actividad positiva en ninguna de las líneas celulares (KB y HEP-2). En todos los casos las actividades se compararon con el control positivo colchicina, que presentó una CE_{50} alrededor de 0.0037 $\mu\text{g/mL}$.

3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos

La evaluación del potencial antimicrobiano por parte de la especie *S. lepidophylla* se basó en el uso tradicional de la planta en la medicina popular mexicana como remedio para patologías de hígado y riñón. Por lo tanto, los ensayos se enfocaron principalmente a la búsqueda de respuesta por parte de microorganismos involucrados en ese tipo de infecciones, como son: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphy* y *Candida albicans*, sin embargo, se empleó una batería de microorganismos que incluyó dos hongos dermatofitos.

El método que se utilizó para obtener la concentración mínima inhibitoria CMI se basó en los métodos de dilución descritos en la literatura; se efectuó por duplicado y las sustancias de prueba se mezclaron con un medio apropiado (agar para bacterias y sabouraud para la levadura y hongos) en el cual se inoculó previamente el organismo



de prueba. Después de la incubación, se examinó el crecimiento del microorganismo en cada tubo de muestreo, y se comparó con un control no tratado con muestra. Esto se efectuó por comparación visual o turbidimétrica. Se colocó una serie de diluciones de la muestra original en el medio de cultivo y después se inocularon con el organismo de prueba. La menor concentración de muestra requerida para la inhibición total del crecimiento se consideró como CMI.⁷¹

El estudio del efecto antimicrobiano por difusión en agar (Tabla 5) sólo indicó actividad por parte del extracto butanólico contra *Pseudomonas aeruginosa*, a una concentración de 500 µg/mL, el halo de inhibición fue de 10 mm.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana por difusión en agar					
Microorganismo	Conc. (µg/mL)	CHCl ₃ -MeOH	Hexánico	AcOEt	<i>n</i> -butanólico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	+++	+++	+++	+ 15 mm
	500	+++	+++	+++	+ 10 mm
	100	+++	+++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	1000	+++	++	+++	++
	500	+++	+++	+++	+++
	100	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	+++	++	+++	++
	500	+++	+++	+++	+++
	100	+++	+++	+++	+++

Resultados de crecimiento a las 8 horas de incubación. +++ Crecimiento abundante en toda la caja. ++ Crecimiento escaso en toda la caja, + Crecimiento con halo de inhibición definido. ---- Sin crecimiento

Los resultados del ensayo por dilución en agar (Tabla 6) revelaron que el extracto más activo fue el de acetato de etilo, el cual presentó poca inhibición del crecimiento de los organismos Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmomella tiphy* con un valor de CMI de 6000 µg/mL; se observó actividad moderada a 3000 µg/mL contra las bacterias Gram (+), *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. El extracto butanólico inhibió el crecimiento de la bacteria *S. aureus* (3000 µg/mL), y presentó

⁷¹ Pastón. 1991. Assays for Antifungal Activity in Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6, pp 33-46.



moderada actividad al inhibir el crecimiento de los dos hongos dermatofitos, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, con un valor de CMI de 3000 $\mu\text{g/mL}$; estos hongos a menudo producen “pie de atleta” e infecciones en uñas. El extracto total únicamente presentó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* con una CMI de 3000 $\mu\text{g/mL}$. El extracto hexánico reveló actividad antimicótica moderada contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. El residuo insoluble no mostró actividad.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana por dilución en agar									
Producto	Sa	Sf	Ec	Pa	Pm	St	Ca	Tm	Tr
CHCl ₃ :MeOH	3000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Hexánico	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	3000	3000
Acetato de Etilo	3000	3000	>6000	6000	>6000	6000	>6000	>6000	>6000
Butanólico	3000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	3000	3000
Residuo Insoluble	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000	>6000
Gentamicina	2	2	4	4	4	4	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	4	4
Nistatina	NP	NP	NP	NP	NP	NP	8	NP	NP

Valores de CMI en $\mu\text{g/mL}$. NP: No probado, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*, Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa* Pm: *Proteus mirabilis*, St: *Salmonella tiphy*, Ca: *Candida albicans*, Tm: *Trichophyton mentagrophytes* y Tr: *Trichophyton rubrum*.

A diferencia de lo que se esperaba, ninguno de los extractos inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, y de *P. mirabilis* como microorganismos que están involucrados en infecciones de vías urinarias. Los resultados indicaron actividad significativa contra *P. aeruginosa* por parte del extracto butanólico en el método de difusión, sin embargo, discrepan de los resultados obtenidos por el método de dilución, en el cual se ensayó a mayor rango de concentración. El extracto de acetato de etilo presentó mayor actividad antibacteriana, al inhibir el crecimiento tanto de organismos Gram (+) como Gram (-). Sólo el extracto hexánico y el butanólico mostraron actividad antimicótica.



4. Determinación del efecto fotosintético

Con la finalidad de contribuir al conocimiento general del efecto de los metabolitos secundarios obtenidos sobre las actividades fotosintéticas, se evaluó el efecto de los biflavonoides de *Selaginella lepidophylla*, sobre diversas reacciones de la cadena transportadora de electrones en cloroplastos aislados de espinaca. Para realizar el estudio, primeramente se determinó la actividad de los extractos, fracciones y compuestos sobre la inhibición de la síntesis de ATP.

a. Inhibición de la síntesis de ATP

Los resultados obtenidos en el estudio de los extractos y fracciones de *Selaginella lepidophylla* mostraron actividad inhibitoria en el ensayo de la síntesis de ATP. Como se observa en la Tabla 7, el extracto total (CHCl₃-MeOH) tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la producción de ATP (I_{50} =28 ppm) en cloroplastos aislados de espinaca, y de los extractos obtenidos por partición del mismo, el de acetato de etilo presentó mayor inhibición, con un valor de I_{50} de 38 ppm.

Extractos	I_{50} (ppm)
CHCl ₃ :MeOH	28
Hexano	68
Acetato de Etilo	38
<i>n</i> -Butanólico	72
Residuo Insoluble	SA

SA: sin actividad

Las fracciones primarias obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo se probaron en el mismo modelo biológico. El valor del control para la síntesis de ATP fue de 1433 μ M ATP /mg Chl·h. Las fracciones que resultaron más activas fueron F9 y F10, con valores de I_{50} de 33 y 38 ppm, respectivamente. Las fracciones F1-F6 no se probaron por ser insolubles en el vehículo (DMSO) y F11 no se probó por estar en mínima cantidad. La Figura 16



representa el efecto de las concentraciones en orden creciente de cada fracción sobre la síntesis de ATP.

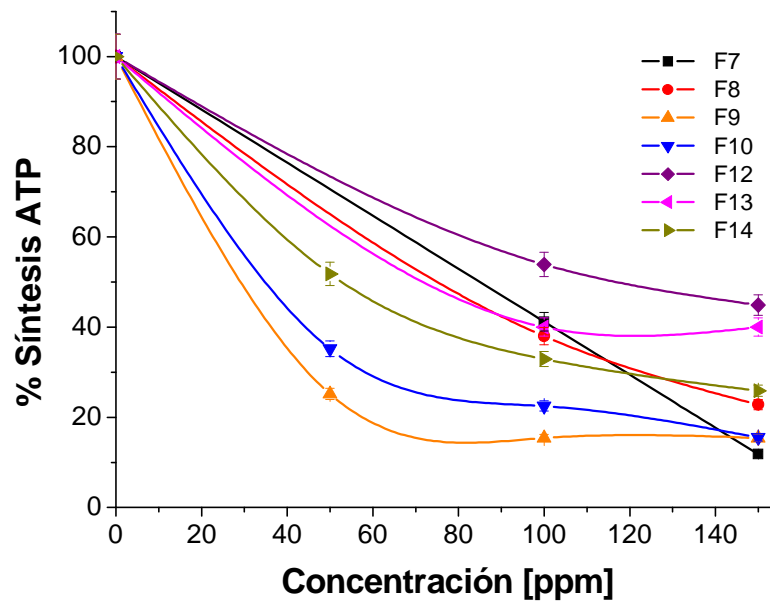


Figura 16. Efecto de las fracciones primarias sobre la síntesis de ATP

En la Figura 17 se comparan los valores obtenidos de I_{50} , es decir, la concentración a la cual se inhibió el 50% de la síntesis de ATP en tilacoides de espinacas.

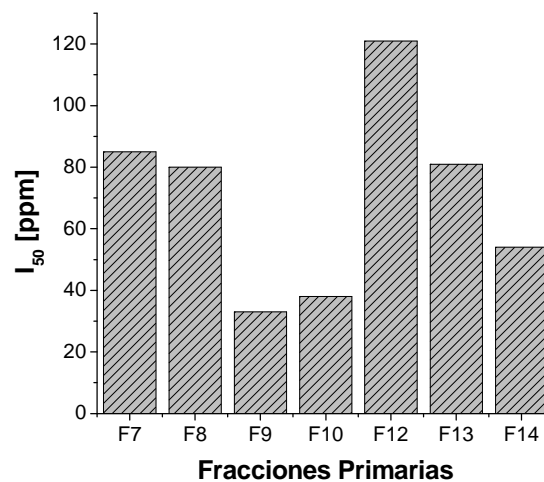


Figura 17. Valores de I_{50} de las fracciones primarias



De acuerdo a los resultados anteriores se subfraccionó F10 en sus componentes. A pesar de ser más activa F9 en este bioensayo, en las pruebas de citotoxicidad realizadas previamente, F10 resultó ser más activa y fue la que se subfraccionó; además, algunos de los metabolitos secundarios visualizados por ccf en F9 también se encuentran en F10. La fracción secundaria F'6 presentó mayor efecto al inhibir la síntesis de ATP con una I_{50} de 18 ppm, como se observa en la Figura 18, las subfracciones restantes también inhibieron la producción de ATP pero en menor proporción. El valor del control para la síntesis de ATP fue de 750 μM ATP /mg Chl·h.

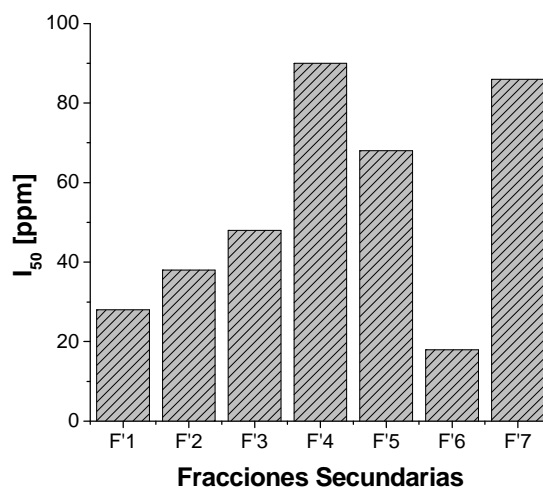
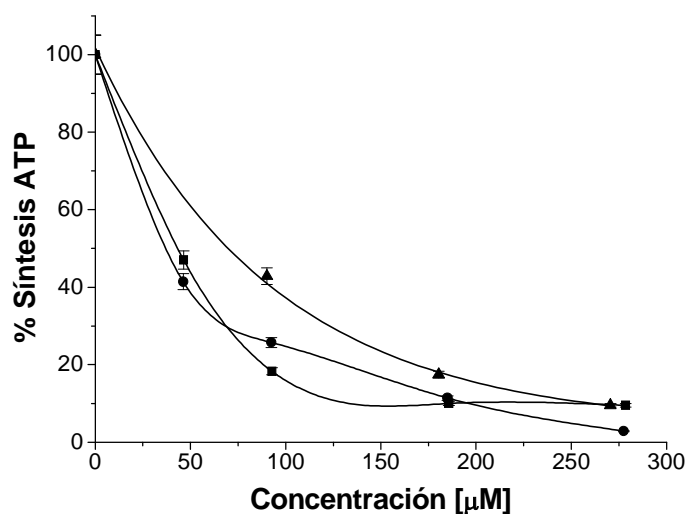


Figura 18. Valores de I_{50} de las fracciones secundarias

Para conocer a los compuestos responsables de la actividad inhibitoria sobre la síntesis de ATP, F'6 se separó en sus dos componentes mayoritarios, **6d3** y **6b2C**, y adicionalmente se obtuvo el compuesto **5e** de la subfracción F'5 (también proveniente de F10), la cual a pesar de que presentó menor efecto inhibitorio que F'6 en la síntesis de ATP, se separó por tratarse de un componente mayoritario en mezcla con trazas de impurezas. Los compuestos **6d3**, **6b2C** y **5e** también mostraron inhibición sobre la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones de agua a metilviolígeno, resultaron con mayor actividad **6b2C** y **6d3**, con valores de I_{50} = 39 y 44 μM , respectivamente; **5e** fue menos activo con I_{50} de 79 μM . En la Figura 19 se observa que la producción de ATP disminuye conforme aumenta la concentración de los compuestos.



(■) robustaflavona (**6d3**), (●) 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y (▲) 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**). El valor del control para la síntesis de ATP fue de 833 μM ATP /mg Chl·h.

Figura 19. Efecto inhibitorio de los biflavonoides sobre la síntesis de ATP

La identidad estructural de los compuestos **6d3**, **6b2C** y **5e** fue elucidada como robustaflavona, 2,3-dihidro-robustaflavona y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona, respectivamente y se describe posteriormente (apartado E de este capítulo). Todos los compuestos pertenecen al grupo de los biflavonoides.

b. Efecto de los biflavonoides sobre la velocidad del transporte de electrones

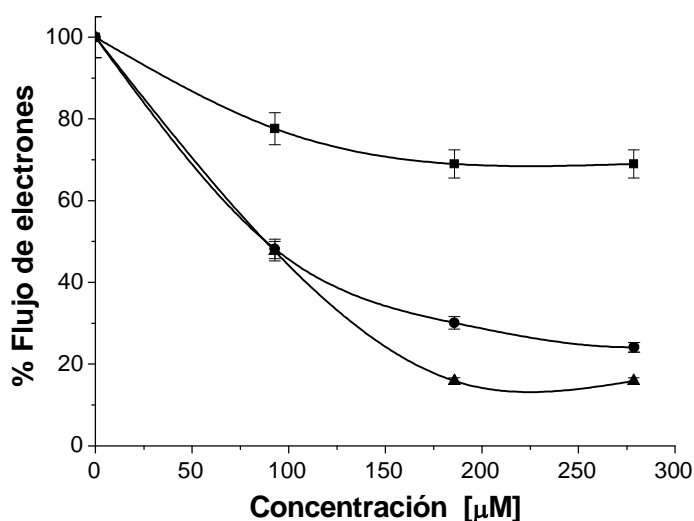
A continuación, para conocer el mecanismo de acción mediante el cual los biflavonoides inhibieron la síntesis de ATP, se evaluó el efecto *in vitro* sobre el transporte de electrones no cíclico, al emplear agua como donador natural de electrones y el metilviológeno como aceptor final de electrones. Para el ensayo se emplearon tres condiciones experimentales: basal, fosforilante y desacoplado. Por lo anterior, se exploró si la síntesis de ATP pudiera ser inhibida por el bloqueo del transporte de electrones dentro de la cadena de tilacoides, por la inhibición directa del complejo H^+ -ATPasa, o por la disipación del gradiente de protones (efecto desacoplante).⁷² Las Figuras 20, 21 y 22 muestran el efecto de robustaflavona (**6d3**), 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) sobre el transporte de electrones en cloroplastos.

⁷² Good, et al. 1981. *Current Topics in Bioenergetics* Vol. 1, pp 75-112



Los biflavonoides inhibieron parcialmente las tres condiciones de flujo de electrones, la robustaflavona (**6d3**) es el compuesto más activo como inhibidor del transporte de electrones fosforilante y desacoplado. El valor de I_{50} de robustaflavona (**6d3**) para el transporte de electrones desacoplado fue de $88 \mu\text{M}$, lo cual significa que es 50 % menos activo como inhibidor de la síntesis de ATP, por lo tanto, este compuesto podría inhibir en otro sitio.

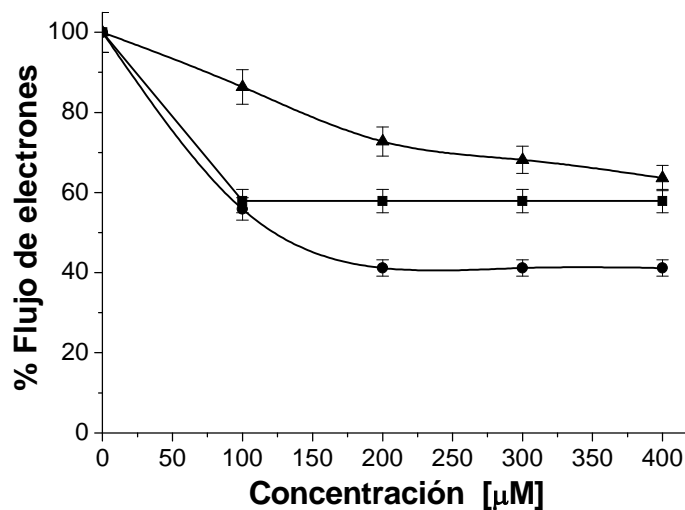
Lo anterior es indicativo de que el blanco de acción de robustaflavona (**6d3**) está expuesto cuando los tilacoides están no energizados, parcialmente energizados o en estado desacoplado, pero en condiciones basales el blanco de acción se encuentra oculto, ya que es menos afectado (Figura 20).



Transporte de electrones: (■) Basal, (●) fosforilante y (▲) desacoplado. El valor del control fue de 387, 553 y $1420 \mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl-h}$, respectivamente.

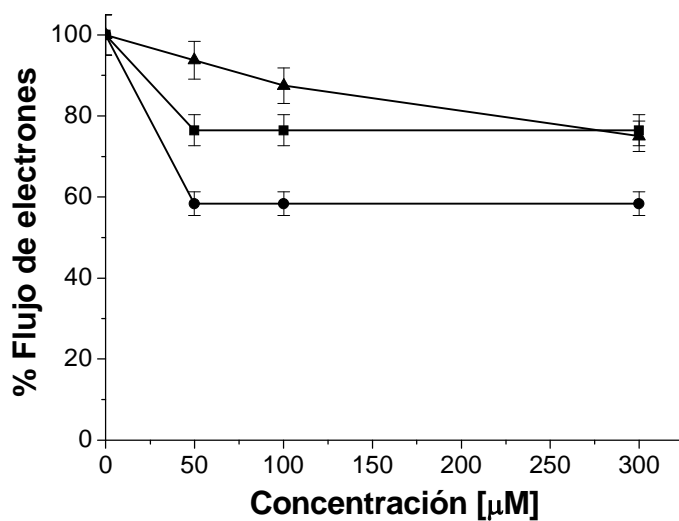
Figura 20. Efecto de robustaflavona (**6d3**) sobre el transporte de electrones

A una concentración de $300 \mu\text{M}$ los biflavonoides 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) mostraron 36 y 25 % de inhibición, respectivamente, en la velocidad en el transporte de electrones desacoplado, que son actividades menores a la de robustaflavona (**6d3**), Figuras 21 y 22.



Transporte de electrones: (■) Basal, (●) fosforilante y (▲) desacoplado. El valor del control fue de 760, 680 y 880 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$, respectivamente.

Figura 21. Efecto de 2,3-dihidro-robusflavona (**5e**) sobre el flujo de electrones



Transporte de electrones: (■) Basal, (●) fosforilante y (▲) desacoplado. El valor del control fue de 756, 533 y 356 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$, respectivamente.

Figura 22. Efecto de 2,3-dihidro-5-metoxi-robusflavona (**6b2C**) sobre el transporte

En ambos casos, el transporte de electrones fosforilante fue el más afectado, los resultados solo permitieron calcular el valor de I_{50} de la robusflavona (88 μM) y de 2,3-dihidro-robusflavona (124 μM), ya que 2,3-dihidro-5-metoxi-robusflavona sólo presentó un 42 % de inhibición del flujo de electrones.



Los resultados indican que los compuestos, robustaflavona (**6d3**), 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) actúan como inhibidores de la reacción de Hill, término definido como la fotoreducción de un aceptor de electrones a expensas de agua, que es oxidada a oxígeno.

c. Localización de los sitios de interacción en el transporte de electrones

Para localizar el sitio de acción de los biflavonoides en la cadena transportadora de electrones, se estudió su efecto en las reacciones parciales del FSII y FSI; al utilizar donadores y aceptores artificiales de electrones, así como los inhibidores apropiados.⁷³ En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto, que a continuación se discuten.

Tabla 8. Efecto de los biflavonoides sobre la velocidad del transporte de electrones del FSII, FSI y sus reacciones parciales										
Compuesto [μM]	FSII H ₂ O - DCPIP		FSII H ₂ O - SiMo		FSII DPC - DCPIP		FSI DCPIP _{red} - MV		FSI TMQH ₂ - MV	
	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>c</i>
Robustaflavona										
0	400	100	311	100	269	100	2453	100	2629	100
100	220	55	305	98	204	76	2453	100	2629	100
200	164	41	220	71	148	55	2453	100	2629	100
300	108	29	156	50	67	25	2453	100	2629	100
2,3-Dihidro-robustaflavona										
0	400	100	-	-	-	-	2453	100	2629	100
100	400	100	-	-	-	-	1973	74	2606	98
200	400	100	-	-	-	-	1766	72	1928	44
300	400	100	-	-	-	-	1766	72	1893	72
2,3-Dihidro-5-metoxi-robustaflavona										
0	400	100	-	-	-	-	2453	100	2629	100
100	400	100	-	-	-	-	2453	100	2629	100
200	400	100	-	-	-	-	2453	100	2629	100
300	400	100	-	-	-	-	2453	100	2629	100

a = $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl h}$

b = $\mu\text{M DCPIP}_{\text{red}}/\text{mg Chl h}$

c = %

⁷³ Vernon, *et al.* 1969. *Plant Physiology*, p. 1645 y González Vázquez, *et al.* 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p.1217.



La robustaflavona (**6d3**) no presentó efecto en el FSI determinado en cloroplastos de DCPIP a MV, sin embargo, inhibió el flujo de electrones del FSII de agua a DCPIP oxidado, así como en sus reacciones parciales de agua a SiMo y de DPC a DCPIP, con valores de I_{50} de 125, 279 y 229 μM , respectivamente. El efecto en la reacción parcial con SiMo como aceptor de electrones indica que robustaflavona (**6d3**) inhibió el transporte de electrones desacoplado del FSII de agua a Q_A .⁷⁴ Como la reacción parcial de DPC a DCPIP también resultó afectada, entonces el sitio de inhibición de robustaflavona (**6d3**) se localiza entre P_{680} y Q_A , en el FSII, ya que la DPC reducida dona electrones a P_{680} ⁷⁵ (Vid. Figura 14).

El biflavonoide 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) no afectó al FSII, sin embargo aunque no alcanzó a inhibir un 50 % de la velocidad del transporte de electrones, si afectó parcialmente al FSI medido de DCPIP reducido con ascorbato a MV y de TMQH_2 a MV; estos resultados indican que el sitio de acción del compuesto se localiza en el FSI. Para localizar el sitio de inhibición en el FSI, se ensayó su efecto en la reacción parcial de PMS reducido con ascorbato a MV en tilacoides tratados con KCN. Los resultados obtenidos para esta reacción no mostraron actividad a las diferentes concentraciones ensayadas, la velocidad en el transporte electrónico se mantuvo en 514 $\mu\text{equiv. e}^-/\text{mg Chl h}$; lo cual indica que el compuesto no inhibe esta reacción parcial, por lo tanto, el sitio de inhibición de la 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) se localiza en el tramo del cit b_6/f a plastocianina. Por otra parte, la 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) no tuvo efecto alguno en el FSII, el FSI medido de $\text{DCPIP}_{\text{red}}$ a MV o FSI medido de TMQH_2 a MV (Vid. Figura 14).

d. Inducción de la fluorescencia de la clorofila α

Para confirmar el efecto inhibitorio de la robustaflavona (**6d3**) en el FSII, se empleó la técnica fluorométrica basada en la fluorescencia de la clorofila α , la cual tiene un patrón de fluorescencia variable con una curva de inducción que contiene las diferentes fases del transporte de electrones del FSII. Por lo tanto, la intensidad de la

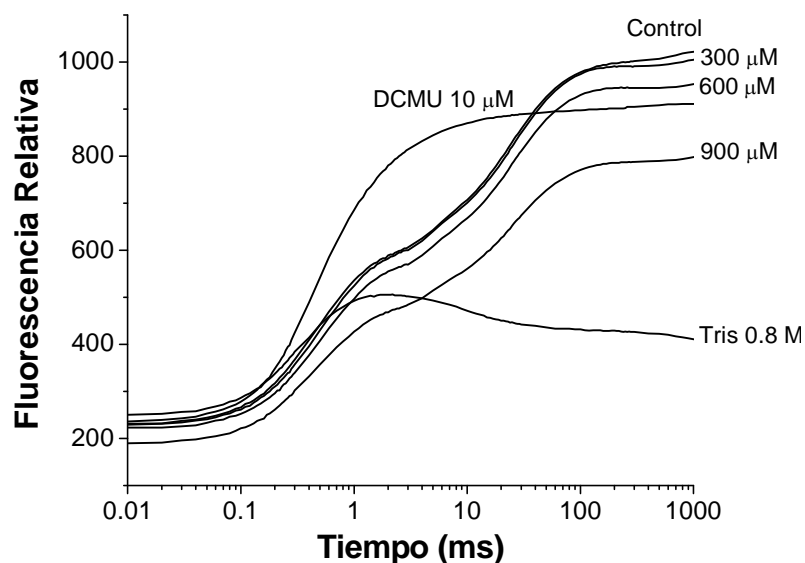
⁷⁴ Guaiquinta, et al. 1975. *Biochemical and Biophysical Acta*, pp. 288-300

⁷⁵ Vernon, *loc. cit.*



fluorescencia de la clorofila *a* puede ser considerada como una medida directa de la funcionalidad del FSII y permite detectar los posibles daños del lado donador o aceptor de dicho fotosistema.

Como se observa en la Figura 23, las curvas de inducción de fluorescencia de los tilacoides del control, mostraron un aumento polifásico con la secuencia O-J-I-P.⁷⁶ La adición del herbicida DCMU, utilizado como control positivo, promovió un aumento rápido de la fluorescencia durante los dos primeros milisegundos de iluminación, al transformar la secuencia regular O-J-I-P a una curva de tipo OJ.⁷⁷ El otro control positivo consistió de tilacoides tratados con Tris 0.8 M, que es un inhibidor del lado donador del FSII, que causa disminución en la capacidad para donar electrones y pérdida del complejo de Mn en la enzima que fotolisa el agua (OEC), a la misma velocidad a la que inhibe la producción de O₂⁷⁸; esto resulta en una reducción de la producción máxima de fluorescencia que se presenta como una disminución de la forma de la curva de inducción.



Desarrollo de fluorescencia de la clorofila *a* en cloroplastos infiltrados en concentraciones crecientes de robustaflavona (**6d3**), 10 μ M de DCMU y en tilacoides tratados con 0.8 M de Tris, a pH 8.0.

Figura 23. Curvas de inducción de la fluorescencia para robustaflavona (**6d3**)

⁷⁶ Strasser, *et al.* 1995. *Photochemistry and Photobiology*, pp. 32-45.

⁷⁷ *Idem.*

⁷⁸ Rickert, *et al.* 1991. *Biochemistry*, pp. 7888-7894.



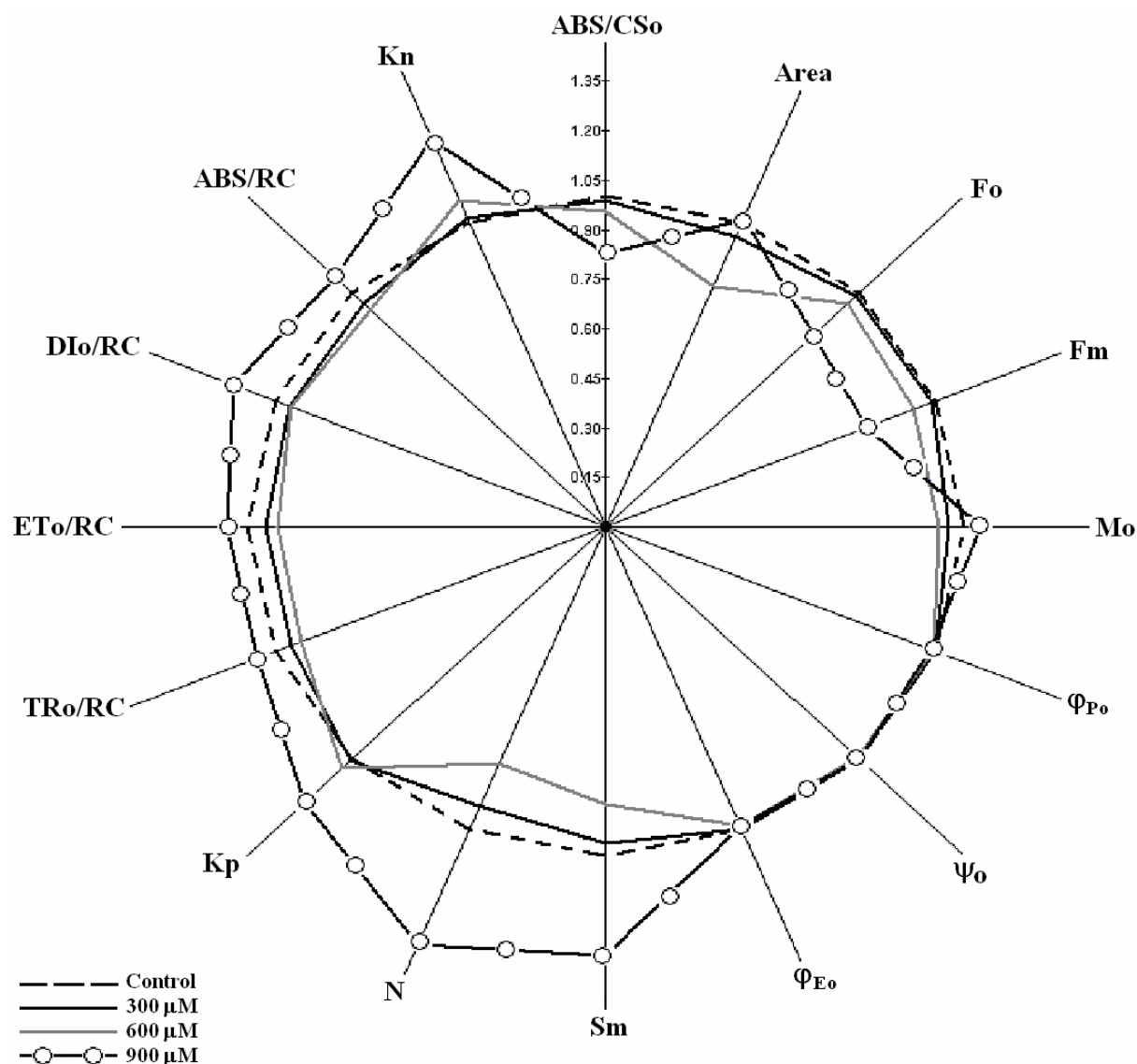
Las curvas de los tilacoides en las diferentes concentraciones de robustaflavona (**6d3**) no mostraron similitud a las curvas de los controles positivos (Figura 23), es decir no se observó tendencia a la forma de la curva de DCMU y tampoco a la del Tris. Sin embargo, se observa que el compuesto afectó considerablemente la inducción de la fluorescencia; a la máxima concentración (900 μM) hubo una disminución de los valores de F_0 y F_m , respecto al control; se presentó la secuencia regular O-J-I-P pero con un valor de fluorescencia máxima (1023) 22% menor al observado en el control ($F_m = 798$).

A partir de los datos de la cinética de inducción de fluorescencia se determinaron diferentes parámetros asociados a la actividad del FSII, los cuales se obtuvieron al considerar las ecuaciones del análisis JIP mediante el programa Biolyzer.⁷⁹ El efecto de la robustaflavona (**6d3**) sobre los diferentes parámetros se muestra en la Figura 24.

Para una clara comprensión de los parámetros determinados se deben analizar los sucesos que se llevan a cabo en la cascada de energía del FSII, desde la absorción de la luz hasta el transporte de electrones. El término ABS se refiere al flujo de los fotones capturados por los pigmentos antena (energía de absorción), lo que da lugar a la clorofila excitada (Chl^*). Parte de la energía de excitación es disipada, principalmente en forma calor (energía de disipación), en menor proporción como emisión de fluorescencia (F) y otra parte es canalizada al centro de reacción (energía atrapada, TR) para convertirse en energía redox, por la cual se reduce el aceptor de electrones Q_A a Q_A^- , el cual, posteriormente es re-oxidado a Q_A . Dicha re-oxidación causa una disminución del transporte de electrones (ET) más allá de Q_A^- y permite la fijación de CO_2 . ABS, TR, DI y ET pueden expresarse por centro de reacción del FSII (CR), son conocidos como flujos de energía específicos. o pueden expresarse por sección transversal de la muestra fotosintética, denominados flujos de energía fenomenológica.⁸⁰

⁷⁹ Panda, *et al.* 2006. *Photosynthetica*, pp. 69-75.

⁸⁰ Strasser, *et al.* 2004. In: *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, pp. 343-346.



ABS/CS₀: tamaño de la antena, Area: por arriba de la curva de fluorescencia, F₀: fluorescencia inicial, F_m: fluorescencia máxima, M₀: medida relativa de la actividad fotoquímica primaria, ψ_0 : Eficiencia con la que un excitón puede mover un electrón más allá de Q_A⁻, ϕ_{P_0} : eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria, ϕ_{E_0} : eficiencia cuántica máxima del transporte de electrones, S_m: área complementaria normalizada, N: número de veces que Q_A se ha reducido, K_p: Constante de la energía de excitación vía fotoquímica, TR₀/RC: energía capturada por centro de reacción, ET₀/RC: transporte de electrones por centro de reacción, DI₀/RC: energía disipada en forma de calor por centro de reacción, ABS/RC: absorción de la antena por centro de reacción, K_n: Constante de la energía de excitación vía no fotoquímica.

Figura 24. Efecto de robustaflavona (**6d3**) sobre los parámetros de la fluorescencia

Al analizar la Figura 24 se observa que a 600 μM se presenta una considerable disminución del Area respecto al control, lo cual es proporcional al tamaño del grupo de aceptores de electrones en el lado reductor del FSII. Conforme aumenta la



concentración de robustaflavona (**6d3**) disminuye el tamaño de la antena (ABS/CS_0), lo mismo sucede con F_0 y F_m , lo que indica que el compuesto afecta la cantidad de energía captada por los pigmentos antena cuando los centros de reacción se encuentran abiertos (F_0) y cuando están cerrados, en el caso de F_m . A 300 y 600 μM también se observa disminución del parámetro M_0 , que es proporcional al cierre de los centros de reacción en la actividad fotoquímica primaria.

En los siguientes parámetros no se observaron diferencias respecto al control: ψ_0 indica la eficiencia con la que un excitón capturado puede mover un electrón más allá de Q_A reducido (Q_A^-) dentro de la cadena transportadora de electrones, ϕ_{P_0} se refiere a la eficiencia de la energía total que es capturada por los centros de reacción del FSII y utilizada para la fotoquímica primaria, ϕ_{E_0} indica la eficiencia del transporte de electrones. Los resultados indican que cuando los centros de reacción están abiertos la robustaflavona (**6d3**) no afecta la actividad fotoquímica primaria.

Por otro lado, la disminución del número de veces que Q_A se ha reducido (N) a 300 y 600 μM demuestra que a dichas concentraciones la robustaflavona (**6d3**) forma centros de reacción silenciosos, que son centros que no pueden reducir a Q_A y que tampoco pueden regresar la energía de excitación a la antena, como si éstos fuesen centros de reacción abiertos, contrariamente, a 900 μM los valores de N aumentan, lo que indica que los eventos de reducción de Q_A no son afectados. Se observó el mismo efecto para el área complementaria normalizada, S_m , que refleja los múltiples ciclos de reducción de Q_A .

Se observó una disminución de los valores a las concentraciones de 300 y 600 μM , y un aumento considerable a 900 μM para los siguientes parámetros: el flujo de absorción por centro de reacción, el valor ABS/RC es proporcional a la absorción de las moléculas de la Chl *a* por centro de reacción; la energía atrapada por centro de reacción al tiempo cero y que resulta en la reducción de Q_A , TR_0/RC ; el transporte de electrones por centro de reacción ET_0/RC ; la energía de disipación no fotoquímica por



centro de reacción Dl_0/RC , el incremento de este parámetro a $900 \mu\text{M}$ favorece el aumento de la energía disipada por rutas no fotoquímicas y sugiere un efecto tóxico en el FSII por parte de robustaflavona (**6d3**).

Al aumentar las concentraciones de robustaflavona (**6d3**) se presentó un aumento de las constantes de la energía de excitación por actividad fotoquímica (K_p) y por actividad no fotoquímica (K_n), respecto a las del control, lo cual explica la disminución de la fluorescencia debido a la oxidación de Q_A^- y por la disipación de la energía en forma de calor.

En conjunción, los resultados confirman que el sitio de inhibición de robustaflavona (**6d3**) en el transporte de electrones se encuentra en el FSII, afectando los centros activos de reacción. Cuando los centros de reacción atrapan la energía de excitación, en lugar de almacenarla, la disipan en forma de calor y como consecuencia, se crean centros silenciosos que disminuyen la reducción de Q_A ; además el efecto observado a $900 \mu\text{M}$ sugiere que la robustaflavona (**6d3**) al mantener un estado de estrés, da lugar a modificaciones conformacionales⁸¹ que afectan al FSII, sin embargo, para corroborarlo es conveniente realizar análisis específicos a nivel de proteínas.

e. Efecto de los biflavonoides en la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa

Con la finalidad de caracterizar la actividad desacoplante de los biflavonoides, se determinó si los productos interaccionan con el complejo H^+ -ATPasa cuando inhiben la fotofosforilación. La evaluación de la capacidad de robustaflavona (**6d3**), 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) para afectar la actividad de la enzima Mg^{2+} -ATPasa membranal, se realizó de manera indirecta, monitoreando la cantidad de ATP hidrolizada en condiciones de oscuridad.

En la Tabla 9 se muestra el efecto de los metabolitos secundarios y del cloruro de amonio sobre la actividad Mg^{2+} -ATPasa. Se observa que el incremento en la

⁸¹ *Ibid.*, p. 348.



concentración del NH_4Cl incrementa la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa, de acuerdo a su efecto desacoplante, sin embargo los biflavonoides inhibieron la actividad de la enzima, la 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) fue la más activa con un 80% de inhibición a 300 μM , por otra parte, el compuesto 2,3-dihidro-robustaflavona inhibió 66% a la misma concentración y la robustaflavona (**6d3**) resultó menos activa con 24% de inhibición.

Estos resultados indican que los tres biflavonoides ensayados se comportan como inhibidores de transferencia de energía y esto explica que la 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) actúe como inhibidor en la síntesis de ATP, su débil efecto en el flujo de electrones y la ausencia de actividad en el FSII, FSI, y en las reacciones parciales.

Tabla 9. Efecto de los biflavonoides sobre la actividad Mg^{2+} -ATPasa		
Compuesto	$\mu\text{M P mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$	Actividad (%)
Robustaflavona [μM]		
0	116	100
100	88	76
200	88	76
300	88	76
2,3-Dihidro-robustaflavona [μM]		
0	116	100
100	61	53
200	54	47
300	39	34
2,3-Dihidro-5-metoxi-robustaflavona [μM]		
0	116	100
100	73	63
200	51	44
300	23	20
NH_4Cl [mM]		
0	116	100
1	239	206
3	278	240
6	144	124



C. Fraccionamiento del extracto más activo

De acuerdo a la información asentada en la literatura, respecto a que los probables compuestos biológicamente activos contenidos en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* fueran de tipo biflavonoide, y a los resultados de actividad obtenidos en los bioensayos, se decidió fraccionar el extracto de acetato de etilo por cromatografía en columna abierta de gel de sílice.

La fracción primaria F10 mostró por cromatografía en capa fina diversos constituyentes cuyas propiedades de absorción al visible (color amarillo) y al UV de onda larga (color café oscuro) en la placa cromatográfica, fueron indicativos de la presencia de probables flavonoides. Para una posterior separación de sus componentes, F10 se aplicó en una columna cromatográfica de gel de sílice, que resultó después de ser procesada, en la obtención de las fracciones secundarias F'5 y F'6, entre otras.

D. Aislamiento de los biflavonoides

La fracción secundaria F'6 estuvo constituida por dos componentes mayoritarios con gran absorción al UV y al visible, con tiempos de retención muy cercanos en cromatografía en capa fina. La fracción secundaria F'6 fue separada en sus dos componentes por cromatografía en columna con Sephadex LH-20 como fase estacionaria; ambos constituyentes se apreciaron como sólidos de color amarillo (**6d3** y **6b2C**).

La fracción secundaria F'5 presentó por ccf mayoritariamente una mezcla de constituyentes, el producto mayoritario se separó y se purificó por subsecuentes cromatografías en columna de vidrio empacada con Sephadex LH-20 y se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo intenso (compuesto **5e**).



E. Identificación estructural de los biflavonoides 6d3, 6b2C y 5e

Para la caracterización estructural de **6d3**, **6b2C** y **5e** se siguieron técnicas físicas, cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas; las constantes se resumen a continuación.

Compuesto 6d3

p.f. descompone a 210 °C.

UV λ_{max} , (MeOH): 206, 235, 268, 334 nm.; (Espectro 1).

IR ν_{max} (KBr): 3422, 2924, 1958, 1651, 1583, 1494, 1428, 1366, 1279, 1236, 1173, 1113, 915, 833 cm^{-1} ; (Espectro 2).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 6.07 (s, 1H, H-8''), 6.14 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-6), 6.28 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-8), 6.49 (s, 1H, H-3'''), 6.55 (s, 1H, H-3), 6.64 (d, $J=9$ Hz, 2H, H-3''' y H-5'''), 6.91 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-5'), 7.70 (d, $J=9$ Hz, 2H, H-2''' y H-6'''), 7.77 (dd, $J=8.5, 2.5$ Hz, 1H, H-6'), 8.32 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, H-2'); (Espectro 3).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 182.8 (C-4), 182.7 (C-4''), 173.9 (C-7''), 166.2 (C-7), 166.2 (C-2), 166.0 (C-4'), 163.7 (C-2''), 163.0 (C-5), 162.3 (C-9''), 161.6 (C-4'''), 158.8 (C-9), 156.1 (C-5''), 132.3 (C-2') 128.8 (C-2'''), 128.8 (C-6'''), 126.8 (C-6'), 125.5 (C-3'), 123.5 (C-1'''), 120.8 (C-5'), 119.2 (C-1'), 116.8 (C-3'''), 116.8 (C-5'''), 108.8 (C-6''), 104.7 (C-10), 103.4 (C-8''), 103.3 (C-3''), 102.9 (C-3), 102.8 (C-10''), 99.9 (C-6), 94.9 (C-8); (Espectro 4).

EM-FAB⁺ baja resolución m/z (%.) $[\text{M} + \text{H}]^+$: 539 (2), 506 (1), 460 (4), 444 (3), 413 (3), 391 (3), 386 (3), 329 (29), 307 (40), 289 (24), 240 (10), 192 (13), 176 (67), 154 (100), 137 (82), 136 (82), 89 (18), 65 (4); (Espectro 8).

Compuesto 5e

p.f. descompone a 240 °C.

UV λ_{max} , (MeOH): 215, 287, 333 nm: (Espectro 9).



DC (0.02 mM, MeOH); $\Delta\epsilon$ (λ , nm): 0 (260), -4.2 (287), 0 (308), +1.5 (331); (Espectro 16).

IR ν_{\max} (KBr): 3422, 1643, 1609, 1508, 1464, 1358, 1243, 1178, 1113, 1090, 913, 834 cm^{-1} ; (Espectro 10).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 2.75 (dd, $J=17, 3$ Hz, 1H, H-3ec), 3.22 (dd, $J=17, 13$ Hz, 1H, H-3ax), 5.48 (dd, $J=13, 3$ Hz, 1H, H-2), 5.93 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-6), 5.96 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-8), 6.64 (s, 1H, H-3''), 6.68 (s, 1H, H-8''), 7.00 (dd, $J=8.5, 0.5$ Hz, 1H, H-5'), 7.01 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-3''' y H-5'''), 7.38 (dd, $J=8, 2$ Hz, 1H, H-6'), 7.39 (sa, 1H, H-2'), 7.93 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-2''' y H-6'''), 12.21 (s, 1H, OH-5), 13.41 (s, 1H, OH-5''); (Espectro 11).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 197.2 (C-4), 183.2 (C-4''), 167.4 (C-7), 165.3 (C-2''), 165.0 (C-5), 164.5 (C-9), 163.0 (C-7''), 161.9 (C-4'''), 161.0 (C-5'''), 158.0 (C-9'''), 156.9 (C-4'), 132.3 (C-2'), 130.6 (C-1'), 129.2 (C-2'''), 129.2 (C-6'''), 128.4 (C-6'), 123.3 (C-1'''), 120.5 (C-3'), 117.0 (C-5'), 116.8 (C-3'''), 116.8 (C-5'''), 110.0 (C-6''), 105.3 (C-10''), 104.1 (C-3''), 103.2 (C-10), 96.8 (C-6), 95.8 (C-8), 94.7 (C-8''), 80.1 (C-2), 43.6 (C-3); (Espectro 12).

Compuesto 6b2C

p.f. descompone a 192 °C.

UV λ_{\max} , (MeOH): 209, 273, 330 nm; (Espectro 17).

DC (0.01 mM, MeOH); $\Delta\epsilon$ (λ , nm): 0 (265), -2.5 (289), 0 (312), +1.6 (330); (Espectro 27).

IR ν_{\max} (KBr): 3355, 2922, 1725, 1646, 1605, 1428, 1357, 1283, 1243, 1173, 1109, 834 cm^{-1} ; (Espectro 18).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm): 2.59 (dd, $J=16.5$ Hz, 2.5, 1H, H-3eq), 2.99 (dd, $J=16.25$ Hz, 13.25, 1H, H-3ax), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.36 (dd, $J=13$ Hz, 3, 1H, H-2), 6.04 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-8), 6.10 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-6), 6.60 (s, 1H, H-3''), 6.63 (s, 1H, H-8''), 6.96 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H-5'), 7.01 (da, $J=9$ Hz, 2H, H-3''' y H-



5'''), 7.34 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H, H-6'), 7.42 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2'), 7.92 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-2''' y H-6'''), 13.46 (s, 1H, OH-5''); (Espectro 19).

RMN¹³C (125 MHz, CD₃COCD₃) δ (ppm): 188.3 (C-4), 183.0 (C-4''), 166.0 (C-9), 165.0 (C-7), 164.7 (C-2''), 164.7 (C-7''), 163.7 (C-5), 161.8 (C-4'''), 161.6 (C-5'''), 158.0 (C-9''), 157.1 (C-4'), 132.2 (C-2'), 130.8 (C-1'), 129.2 (C-2'''), 129.2 (C-6'''), 127.9 (C-6'), 123.4 (C-1'''), 121.0 (C-3'), 117.3 (C-5'), 116.8 (C-3'''), 116.8 (C-5'''), 110.5 (C-6''), 106.2 (C-10), 104.8 (C-10''), 104.0 (C-3''), 96.7 (C-8), 95.1 (C-8''), 94.0 (C-6''), 79.9 (C-2), 56.0 (-OCH₃), 46.4 (C-3); (Espectro 20).

EM-FAB⁺ baja resolución m/z (%.) [M + H]⁺: 555 (4), 543 (15), 507 (2), 506 (2), 487 (2), 460 (4), 443 (2), 413 (4), 391 (12), 388 (2), 329 (12), 307 (44), 289 (27), 240 (27), 235 (4), 176 (35), 154 (100), 137 (86), 136 (91), 120 (22), 107 (37), 89 (30), 77 (24), 65 (9), 51 (4), 39 (3); (Espectro 26).

Los tres compuestos se presentaron como sólidos amorfos de color amarillo intenso y se visualizaron a simple vista en las correspondientes cromatoplasmas finas de gel de sílice, lo cual denota la presencia de grupos cromofóricos importantes. Asimismo, mostraron múltiples bandas de absorción en el espectro en UV (Espectros 1, 9 y 17) y en el IR (Espectros 2, 10 y 18) presentaron absorciones para grupos hidroxilo (3422 cm⁻¹), para carbono-hidrógeno aromáticos (3000 cm⁻¹); en 2924 cm⁻¹ absorciones para carbono-hidrógeno alifáticos (compuestos **5e** y **6b2C**); en los tres casos, en 1651 cm⁻¹ la absorción de un carbonilo de cetona; en 1583, 1494, 1428, 1366, 1279, cm⁻¹, bandas de absorción de carbono-carbono y carbono-hidrógeno aromáticos y alifáticos y en 1236, 1173 y 1113 cm⁻¹ de carbono-oxígeno.

Todos los compuestos mostraron similitudes en el espectro de RMN-¹³C (Espectros 4, 12 y 20), y de acuerdo al número de señales de carbonos aromáticos (aproximadamente 30), se observaron relaciones con la estructura de biflavonoides (Figura 25).

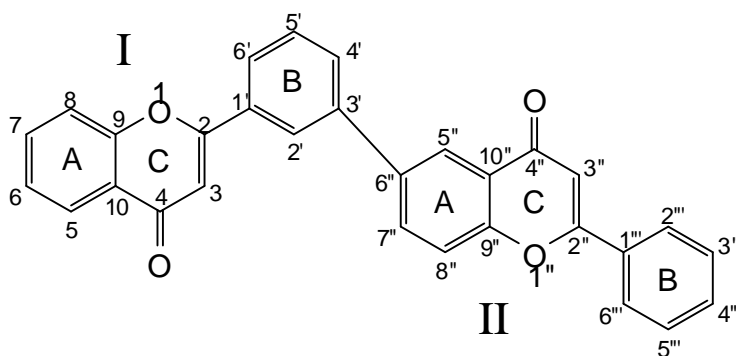


Figura 25. Estructura básica tipo biflavonoide

Fue notoria la presencia en cada compuesto de dos señales en la zona entre 197 y 182 ppm, características de carbonilos de cetona. Entre 173 y 156 ppm, se observaron nueve señales de carbono aromático cuaternario con base de oxígeno en los compuestos **5e** y **6b2C** (Espectros 12 y 20) y 10 señales en el compuesto **6d3** (Espectro 4). Para los tres casos, de 132 a 116 ppm aparecen seis señales de carbonos cuaternarios aromáticos. Entre 128.8 y 116.5 ppm, dos señales muy intensas corresponden a carbonos hidrogenados bencénicos (HSQC, Espectros 5, 13 y 21); de 108 a 110 ppm se observó una señal de carbono cuaternario bencénico para los tres compuestos; entre 104 y 94 ppm, se mostraron siete señales, cinco con correlación con hidrógeno (HSQC) y dos aromáticas cuaternarias. Los compuestos **5e** y **6b2C** mostraron dos señales, en 80 y entre 46 y 43 ppm para un metino y un metileno alifáticos. Adicionalmente, para el compuesto **6b2C** se observó una señal para un metoxilo en 56 ppm.

Los espectros de RMN de ^1H de los tres compuestos aislados (Espectros 3, 11 y 19) también mostraron similitudes entre sí, y tomando en consideración que se pudiera tratar de compuestos de tipo biflavonoide, dados los antecedentes de la literatura⁸², se describirán en principio las señales agrupadas en los esqueletos I y II de cada biflavonoide (Figura 25).

⁸² Lin, *op cit.*, p. 627, Silva, *loc cit.*, Sun, *op cit.*, p. 382 y Qasim. 1985. *Indian Journal of Chemistry*, p. 85



1. Elucidación estructural de robustaflavona (6d3)

La asignación de los desplazamientos obtenidos por RMN de ^{13}C y de ^1H , se describen a continuación (Tabla 10). En la zona de los hidrógenos aromáticos se observaron nueve grupos de señales. En el Espectro 3, la señal doble con constante de acoplamiento de 2.5 Hz se mostró acoplada con una señal doble de dobles ($J=2.5$ y 8.5 Hz), esta última acoplada con la señal doble en 6.91 ppm ($J=8.5$ Hz). Las señales anteriores se asignaron a hidrógenos dentro de un sistema ABX bencénico trisustituido.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{H}$	Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{H}$
2	166.2	–	2''	163.7	–
3	102.9	6.55 (s)	3''	103.3	6.49 (s)
4	182.8	–	4''	182.7	–
5	163.0	–	5''	156.1	–
6	99.9	6.14 (d, $J=2.0$)	6''	108.8	–
7	166.2	–	7''	174.0	–
8	94.9	6.28 (d, $J=2.0$)	8''	103.4	6.07 (s)
9	158.8	–	9''	162.3	–
10	104.7	–	10''	102.8	–
1'	119.2	–	1'''	123.5	–
2'	132.4	8.32 (d, $J=2.5$)	2'''	128.8	7.70 (d, $J=9.0$)
3'	125.5	–	3'''	116.7	6.64 (d, $J=9.0$)
4'	166.0	–	4'''	161.6	–
5'	120.8	6.91 (d, $J=8.5$)	5'''	116.7	6.64 (d, $J=9.0$)
6'	126.8	7.77 (dd, $J=8.5, 2.5$)	6'''	128.8	7.70 (d, $J=9.0$)

CD_3COCD_3 , RMN ^{13}C (125 MHz) δ :ppm, RMN ^1H (500 MHz) δ :ppm, J = Hz

Por otra parte, en 6.14 y 6.28 ppm se encuentran dos pares de dobletes con constante de acoplamiento de 2 Hz, asignados a los hidrógenos H-6 y H-8 ($\delta_{13\text{C}}$ 99.9 y 94.9 ppm) del anillo A, de acuerdo a las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Espectro 6). La señal singulete en 6.55 ppm se asignó al hidrógeno en posición 3 del heterociclo del flavonoide, de acuerdo a su correlación en el espectro HMBC tanto con el carbonilo vecino en posición 4 ($\delta_{13\text{C}}$ 182.8 ppm) como con el carbono cuaternario aromático en 104 ppm (C-10). La posición del carbono 10 en el



espectro HMBC fue también útil para asignar la posición del hidrógeno H-6, y este último junto con H-8, para asignar C-7 y C-9 (HMBC).

Otros desplazamientos químicos asignados por medio del análisis del espectro HMBC de este compuesto fueron los de los carbonos 2 y 1' a través de H-3. El sistema bencénico trisustituído forma parte del esqueleto I del biflavonoide (Figura 25), ya que las tres posiciones de sustitución pertenecen, a un esqueleto de cromona (C-1'), a un sustituyente oxhidrilo (C-4') y la tercera posición constituye el puente inter-flavonilo (C-3'). Las asignaciones tanto de los carbonos como de los hidrógenos del anillo C del esqueleto I (Tabla 10), se realizaron con base en las observaciones de los espectros HMBC y COSY (Espectro 6 y 7, respectivamente).

El esqueleto II de esta estructura presentó el puente inter-flavonilo a través del carbono 6'' como se comprobó por el desplazamiento químico de este carbono (108.8 ppm)⁸³. Esta señal dio lugar a la asignación de otras posiciones de los átomos del esqueleto II, particularmente del anillo A, por su correlación con los mismos; así, C-6'' correlaciona con H-8'' (6.07 ppm) y éste con H-7'' (δ_{13C} -174.0; 164 en la literatura⁸⁴), con 9'' y con 10'' (Espectro 6). La señal del hidrógeno en 3'' del anillo heterocíclico se localizó en 6.5 ppm, misma que correlacionó en el espectro HMBC con el carbonilo en 182.7 ppm, con C-1''' (123.5 ppm) y con C-10'' (102.8 ppm). Por otra parte, C-2'' correlacionó en el mismo experimento con H-2''' y H-6'''. El resto de señales de los espectros de RMN de hidrógeno y de carbono-13, se asignaron a las posiciones del anillo B del esqueleto II (Tabla 10, Figura 25), con ayuda de los experimentos HMBC, HSQC y COSY.

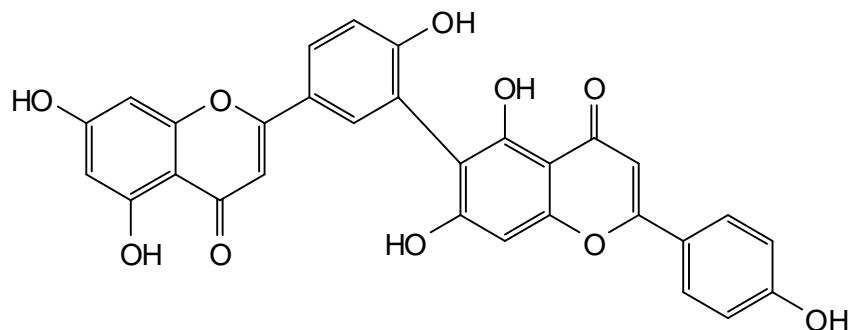
El experimento de espectroscopía de masas, modalidad FAB⁺ [M + H]⁺ mostró una señal a 539 *m/z* (Espectro 8) que concuerda con la fórmula molecular C₃₀H₁₈O₁₀. En suma, el peso molecular observado y la integración de los resultados espectroscópicos permitió la identificación del compuesto **6d3** como robustaflavona

⁸³ Markham, *et al.* 1987. *Phytochemistry*, p. 3335.

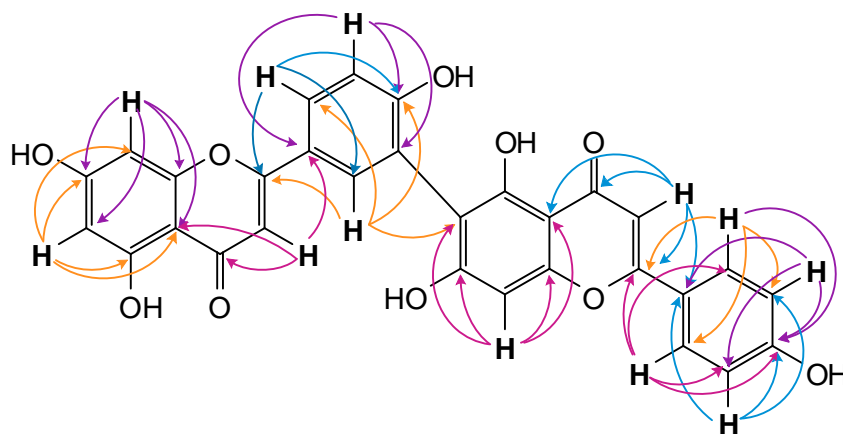
⁸⁴ Chari, *et al.* 1977. *Phytochemistry*, p. 1276 y Markham, *op. cit.*, p. 3336.



cuya estructura se esquematiza en la Figura 26 (A) y sus correlaciones en el experimento HMBC se muestran la Figura 26 (B).



(A) Fórmula estructural



(B) Correlaciones HMBC

Figura 26. Robustaflavona (**6d3**)

2. Elucidación estructural de 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y de 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**)

La elucidación estructural de estos dos compuestos se realizó espectroscópica y espectrométricamente, como en el caso de la robustaflavona (**6d3**), sin embargo, **5e** y **6b2C** presentaron como diferencia principal, la presencia de señales alifáticas y ausencia del hidrógeno en la posición 3 en el espectro de RMN-¹H (Espectros 11 y 19). Los análisis de los espectros HMBC de **5e** y **6b2C** (Espectros 14 y 22) y NOESY de **6b2C** (Espectro 24), permitieron establecer la parte alifática en el anillo C del esqueleto I en cada caso. Los dos compuestos también resultaron ser de la serie de la



robustaflavona, con enlaces inter-flavonilo C-3'-C-6'', lo que como se mencionó anteriormente, se comprueba por la presencia de la señal correspondiente en RMN ^{13}C (Espectros 12 y 20) al carbono 6'' en 110.0 y 110.5 respectivamente para **5e** y **6b2C**.

Adicionalmente, el compuesto **6b2C**, contiene un grupo metoxilo en su estructura, localizado en la posición 5 del esqueleto I, lo que se corroboró por la ausencia de la señal del hidrógeno del oxhidrilo en 5 y también por la correlación del metoxilo en esa posición con el hidrógeno H-6, mediante los experimentos NOESY y NOESY-1D (Espectros 24 y 25). El espectro de masas (Espectro 26) confirmó el peso molecular esperado. Las Tablas 11 y 12 contienen los desplazamientos químicos de las señales de RMN de hidrógeno y de carbono-13 para **5e** y **6b2C**.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN ^1H de 5e y 6b2C					
Posición	5e	6b2C	Posición	5e	6b2C
2	5.48 (dd, $J=13.0, 3.0$)	5.36 (dd, $J=13.0, 3.0$)	2''	–	–
3	2.75 (dd, $J=17.0, 3.0, H_{ax}$)	2.59 (dd, $J=16.5, 2.5, H_{ec}$)	3''	6.64 (s)	6.61 (s)
	3.22 (dd, $J=17.0, 13.0, H_{ax}$)	2.99 (dd, $J=16.2, 13.2, H_{ax}$)	6''	–	–
6	5.96 (d, $J=2.0$)	6.10 (d, $J=2.0$)	8''	6.68 (s)	6.64 (s)
8	5.93 (d, $J=2.0$)	6.04 (d, $J=2.0$)	2'''	7.93 (d, $J=8.5$)	7.92 (d, $J=9.0$)
2'	7.39 (sa)	7.43 (d, $J=2.5$)	3'''	7.01 (d, $J=8.5$)	7.01 (d, $J=9.0$)
3'	7.00 (dd, $J=8.0, 0.5$)	6.97 (d, $J=8.5$)	5'''	7.01 (d, $J=8.5$)	7.01 (d, $J=9.0$)
5'	7.38 (dd, $J=8.0, 2.0$)	7.35 (dd, $J=8.5, 2.5$)	6'''	7.93 (d, $J=8.5$)	7.92 (d, $J=9.0$)
6'	5.96 (d, $J=2.0$)	6.10 (d, $J=2.0$)	5''-OH	13.41 (s)	13.46 (s)
5-OH	12.21 (s)	–			

CD_3COCD_3 , δ :ppm, J = Hz (500 MHz)

En el caso del compuesto metoxilado, **6b2C**, el experimento de espectrometría de masas, modalidad FAB^+ $[\text{M} + \text{H}]^+$ mostró una señal a 555 m/z (Espectro 26) de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$.



Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de **5e** y **6b2C**

Posición	5e	6b2C	Posición	5e	6b2C
2	80.1	79.9	2''	165.3	164.7
3	46.6	46.5	3''	104.1	104.0
4	197.3	188.3	4''	183.2	183.0
5	165.0	163.7	5''	161.0	161.6
6	96.8	94.0	6''	110.0	110.5
7	167.4	165.0	7''	163.0	164.7
8	95.8	96.7	8''	94.7	95.1
9	164.5	166.0	9''	158.0	158.0
10	103.2	106.2	10''	105.3	104.8
1'	130.6	130.8	1'''	123.3	123.4
2'	132.3	132.2	2'''	129.2	129.2
3'	120.5	121.0	3'''	116.9	116.8
4'	156.9	157.1	4'''	161.9	161.8
5'	117.0	117.3	5'''	116.9	116.8
6'	128.4	127.9	6'''	129.2	129.2
5-OMe	—	56.0			

CD_3COCD_3 , δ :ppm (125 MHz)

En ambos productos se identificó un átomo de carbono estereogénico, C-2, que indica la presencia de isómeros configuracionales; para determinar el orden de prioridad de los grupos unidos al centro quiral se realizó el experimento espectroscópico de dicroísmo circular (Espectros 16 y 27). Los resultados indicaron un efecto Cotton con signo negativo para la transición de 260 a 287 nm en **5e** y de 265 a 289 nm en **6b2C**; y positivo para la transición de 308 a 331 (**5e**) y de 312 a 330 nm (**6b2C**), por lo tanto, ambos compuestos presentan configuración *S*. La integración de los resultados espectroscópicos permitió la identificación del producto **5e** como (2*S*)-2,3-dihidro-robustaflavona y de **6b2C** como la (2*S*)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona, cuyas estructuras y correlaciones se esquematizan en las Figuras 27 y 28.

La robustaflavona (**6d3**) es un biflavonoide reportado previamente en la literatura⁸⁵; sin embargo, la descripción de las asignaciones de los átomos no es lo

⁸⁵ Chari, *op. cit.*, pp. 1273-1278 y Markham, *op. cit.*, pp. 3335-3337.



suficientemente precisa en sus experimentos de RMN de hidrógeno y de carbono trece, que fueron realizados con metanol o dimetilsulfóxido deuterados. Aunque también existe un reporte en la literatura de la (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**), se considera que las características espectroscópicas del compuesto que describen los autores⁸⁶ se refieren a otro biflavonoide, ésto con base en las discrepancias observadas en el desplazamiento químico del carbono correspondiente al enlace interflavonilo C-6'' (95.7 ó 99.5 vs. 110.0) y también por la falta de correlación entre H-2' y C-6'', que en el presente trabajo se logró determinar (Figura 27, B).

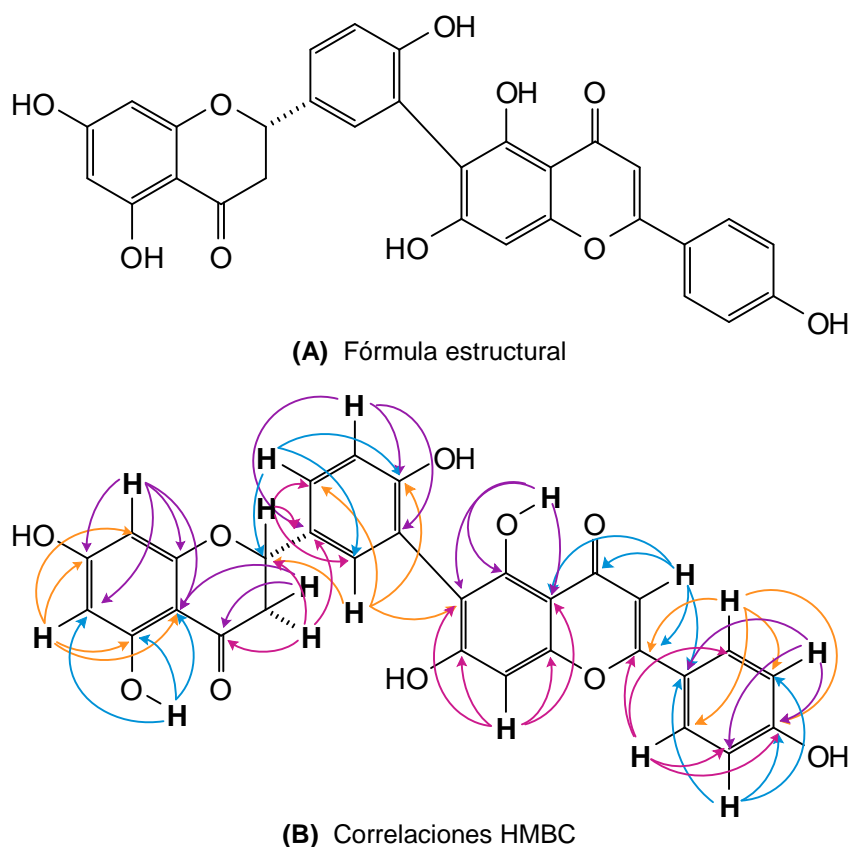
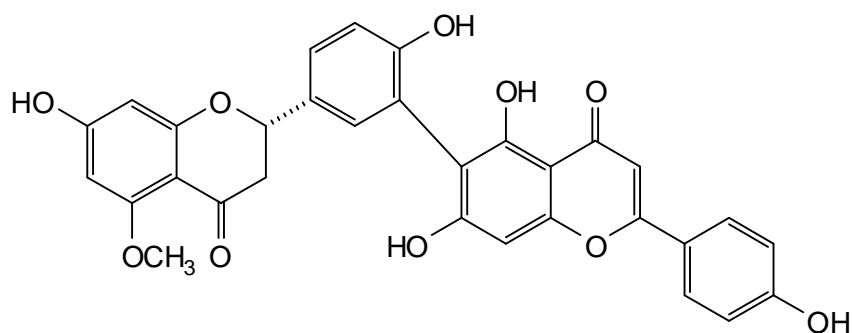
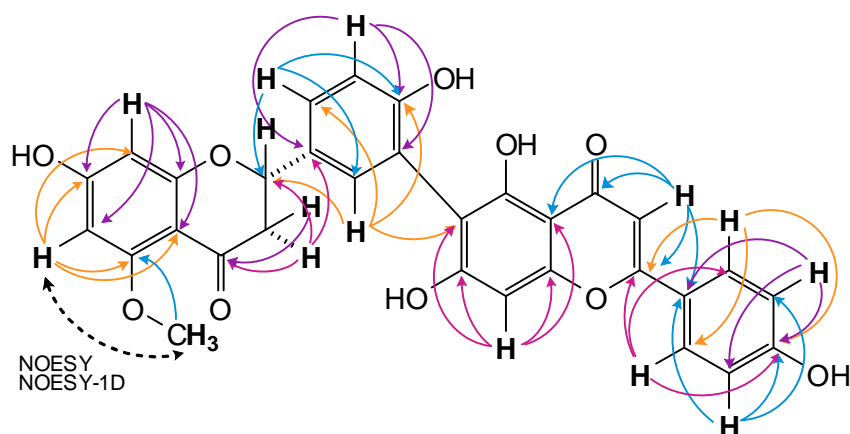


Figura 27. (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**)

⁸⁶ Bahia, et al. 2005. *Journal of Brazilian Chemical Society*, pp. 1402-1405.



(A) Fórmula estructural



(B) Correlaciones HMBC

Figura 28. (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**)

El empleo de acetona deuterada permitió en los experimentos de RMN, la separación y resolución de señales, y con la aplicación de las técnicas NOESY, HMBC y NOESY-1D se logró dar una correcta asignación a las posiciones para cada uno de los átomos de los biflavonoides. Particularmente en el caso de la robustaflavona (**6d3**) para el cual Chari⁸⁷ registra un desplazamiento en RMN de carbono trece de 163 ppm para el carbono 7'', hay discrepancia con el resultado obtenido en este trabajo (173.9 ppm), sin embargo, como se mencionó en párrafos anteriores este dato fue comprobado. Por otra parte, en la revisión de los trabajos relacionados con experimentos de RMN en biflavonoides realizada por Markham⁸⁸ se muestran asignaciones intercambiables, que en el presente trabajo se lograron definir sin ambigüedad.

⁸⁷ Chari, *op. cit.*, p. 1276.

⁸⁸ Markham, *op. cit.*, p. 3336.



F. Aislamiento de peracetil α -D-glucopiranososa (RIAc)

Del residuo acuoso en el procedimiento de partición del extracto total se aisló un polvo de color arena, insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos el cual fue sometido al procedimiento de acetilación. Después de purificar por cromatografía preparativa en placa, el producto de acetilación (**RIAc**) se presentó como un sólido color blanco. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se presentan a continuación:

p.f. 92-109 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.1 (m, 12H, $-\text{CH}_3$), 4.01 (dd, $J= 12, 2$ Hz, 1H, H-6b), 4.06 (ddd, $J= 10.2, 5.6, 2$ Hz, 1H, H-5), 4.27 (dd, $J= 12, 5.6$ Hz, 1H, H-6a), 5.04 (dd, $J= 10.4, 4$ Hz, 1H, H-2), 5.05 (dd, $J= 10, 9.8$ Hz, 1H, H-4), 5.29 (d, $J= 4$ Hz, 1H, H-1), 5.51 (dd, $J= 10.4, 9.8$ Hz, 1H, H-3); (Espectro 28).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.6 (C=O), 169.9 (C=O), 169.6 (C=O), 169.5 (C=O), 92.2 (C-1), 69.9 (C-3), 69.8 (C-2), 68.5 (C-4), 68.1 (C-5), 61.7 (C-6), 20.7 ($-\text{OCH}_3$), 20.6 ($-\text{OCH}_3$), 20.5 ($-\text{OCH}_3$); (Espectro 29).

EM-EI m/z : (%): 331 (46), 271 (5), 242 (2), 229 (3), 211 (4), 187 (3), 169 (100), 145 (3), 139 (7), 127 (12), 115 (9), 109 (43), 103 (4), 97 (5), 81 (3), 43 (24); (Espectro 33).

Las características espectroscópicas del producto **RIAc** correlacionaron para el azúcar α -D-glucopiranososa en forma acetilada (Espectros 28-33).

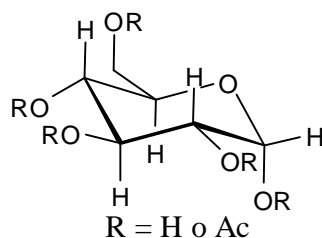


Figura 29. Peracetil- α -D-glucopiranososa



CONCLUSIONES

1. El estudio químico biodirigido de la especie *Selaginella lepidophylla* Spring, permitió el aislamiento de tres productos naturales, que corresponden a la misma serie de biflavonoides: la robustaflavona (**6d3**) como metabolito secundario previamente identificado en la especie y dos productos más de carácter novedoso, la (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) y la (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona, (**6b2C**) con lo cual se contribuye al conocimiento del contenido metabólico de la especie. Se logró hacer la asignación precisa de las señales en RMN para los tres biflavonoides aislados, mediante el uso de acetona deuterada.
2. La actividad nula de los extractos contra *A. salina* no descarta la actividad citotóxica, debido a que las fracciones F2-F5 del extracto de acetato de etilo presentaron actividad en el modelo mencionado, lo que indica que pudiera existir algún metabolito minoritario activo que no se detectó en el extracto total.
3. No se encontró actividad significativa por parte de los extractos, fracciones y biflavonoides obtenidos, en las pruebas de citotoxicidad contra las líneas celulares KB y HEP-2. A pesar de los resultados, no se puede descartar el potencial citotóxico de la especie, pues las líneas celulares utilizadas (carcinoma nasofaríngeo, de laringe y cervical) no se relacionan con el uso medicinal de la doradilla, sobre hígado y riñón.
4. Al probar los extractos en una batería de microorganismos relacionados al uso tradicional de la planta, no se encontró potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Candida albicans* que son representativos en infecciones urinarias. Sin embargo, se observó actividad por parte del extracto de acetato de etilo contra un mayor número de agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella tiphy*, lo que pudiera justificar el uso medicinal tradicional conferido a la planta. El extracto total, el *n*-



butanólico y el hexánico presentaron actividad moderada contra *S. aureus*; y sólo los dos últimos indicaron también, moderada actividad antimicótica contra los hongos dermatofitos *Tricophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*.

5. El estudio del efecto de los biflavonoides sobre el proceso de fotofosforilación permite comprobar que estos productos inhiben la síntesis de ATP en cloroplastos aislados de espinacas. La evidencia experimental permitió establecer que los tres productos naturales actúan como inhibidores de la reacción de Hill y de la transferencia de energía. La robustaflavona (**6d3**) inhibe el transporte de electrones del FSII, tanto en el lado donador en la enzima que fotolisa el agua (OEC), como en el lado aceptor del fragmento entre P_{680} y Q_A ; afecta a nivel de los centros de reacción del fotosistema II. La interacción de la 2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**) se localiza en el tramo del cit b_6/f a plastocianina, en el transporte de electrones de fotosistema I. El efecto inhibitorio de 2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona (**6b2C**) en la síntesis de ATP se debe a su fuerte efecto inhibitorio en la transferencia de energía.
6. Este trabajo constituye una aportación adicional al conocimiento de la flora tradicional mexicana por ser el primer estudio químico-biológico realizado a la especie *Selaginella lepidophylla* y al campo de los biflavonoides con potencial herbicida.



PERSPECTIVAS

1. Los resultados obtenidos del presente trabajo, eventualmente, se podrían integrar dentro de una monografía de la especie *Selaginella lepidophylla*, dentro de las pruebas de identidad y de composición.
2. El contenido metabólico de biflavonoides de la planta demostró ser abundante por cromatografía, por lo que será pertinente analizar aquellas fracciones que no se examinaron en este trabajo.
3. Se requieren hacer pruebas *in vivo* en plantas crecidas, en plantas de malezas y de cultivos para determinar si el biflavonoide robustaflavona (**6d3**) podría ser empleado como herbicida postemergente.



REFERENCIAS

- Allen, J. F. & Holmes, N. G. (1986). "Electron transport partial reactions". In M. F., Hipkins, N. R., Baker (Eds.), *Photosynthesis, Energy Transduction: A Practical Approach* (Chapter 5: pp. 103-141). United Kingdom, Oxford: IRL Press.
- Anderson, J. E., Goetz, C. M., McLaughlin, J. L. & Suffnes, M. (1991). "A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens". *Phytochemical Analysis*, **2**: 107-111.
- Argueta, A., Cano, L. M. & Rodarte, E. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista. pp. 575-576.
- Bahia, M. V., Dos Santos, J. B., David, J. P. & David, J. M. (2005). "Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae)". *Journal of Brazilian Chemical Society*, **16** B: 1402-1405.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". *American Journal of Clinical Pathology*, **45**: 493-496.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. (2004). *Bioquímica*. Australia: Internacional Thompson. pp. 615-627.
- Céspedes, C. L., Achnine, L., Lotina, H., B., Salazar, J. R., Gómez, G., F. & Calderón, J. S. (2001). "Inhibition of photophosphorylation and electron transport by flavonoids and biflavonoids from endemic *Tephrosia* spp. of Mexico". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **69**: 63-76.
- Chari, V. M., Ilyas, M., Wagner, H., Neszmélyi, A., Chen, F. C., Chen, L. K., Lin, Y. C. & Lin, Y. M. (1977). "¹³C NMR spectroscopy of biflavonoids". *Phytochemistry*, **16**: 1273-1278.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach* (2nd ed.). England: John Wiley & Sons Ltd.
- Dilley, R. (1972). "Ion transport (H⁺, K⁺, Mg²⁺ exchange phenomena)". *Methods in Enzymology*, **24**: 68-74.



- Evans, R. & Raffauf, R. F. (1990). *The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. Oregon: Dioscorides Press. p. 415.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H.; Mc Donald, M. M., Schumacher, A. M. & Abbott, B. J. (1972). "Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems". *Cancer Chemotherapy Reports*, **3**: 1-17.
- González-Vázquez, R., King Díaz, B., Aguilar, M. I., Diego, N. & Lotina Henssen, B. 2006. "Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 1217-1221.
- Good, N. E., Izawa, S. & Hind, G. (1981). "Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation" In: D. R., Sanadi (Ed), *Current Topics in Bioenergetics* (Vol. 1, pp 75-112). New York: Academic Press.
- Guiaquinta, R. T. & Dilley, R. A. (1975). "A partial reaction in photosystem II: reduction of silicomolybdate prior to the site of dichlorophenyldimethyl-urea inhibition". *Biochemical and Biophysical Acta*, **387**: 288-305.
- Harborne, J. B. Ed. (1994). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Great Britain: Chapman & Hall
- Harborne, J. B., Mabry, T. J. & Mabry, H. (Eds.) (1975). *The Flavonoids*. (2 parts). New York: Academic Press.
- Hauska, G. & Trebs, A. (1977). "Artificial acceptors and donors". In: A., Trebs & M., Avron (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology: New Series* (Vol. 5, pp. 226-282). New York: Sringer-Verlag.
- Hoagland, R. E. & Williams, R. D. (2004) "Bioassays-useful tools for the study of allelopathy" In Macías, F. A., Galindo, J. C. G., Molinillo, J. M. G. & Cutler, H. G. (Eds.), *Allelopathy, Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals* (Chapter 16, pp. 315-352). USA: CRC Press LLC.
- Instituto Nacional Indigenista. (1994). *Flora Medicinal Indígena de México*. (3 vols.) México.



- Izawa, S. (1977). "Inhibitors of electron transport". In: A., Trebs & M., Avron (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology: New Series* (Vol. 5, pp. 226-282). New York: Springer-Verlag.
- Izawa, S. (1980). "Acceptors and donors for chloroplasts electron transport". *Methods in Enzymology*, **69**: 413-433.
- Izawa, S., Kraayenhof, R., Ruuge, E. K. & Devault D. (1973). "The site of KCN inhibition in the photosynthetic electron transport pathway". *Biochimica et Biophysica Acta*, **314**: 328-339.
- Izawa, S. & Pan, R.L. (1978) "Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **83**: 1171-1177.
- Kogan, M. A. & Pérez, A. J. (2003). *Herbicidas. Fundamentos Fisiológicos y Bioquímicos del Modo de Acción*. Santiago de Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. pp. 22-31.
- Lin, L. C., Kuo, Y. C. & Chou, C. J. (2000) "Citotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*". *Journal of Natural Products*, **63**: 627-630.
- Lin, L. R., Seguin, E., Tillequin, F. & Koch, M. (1987). "New glycosides from *Selaginella doederleinii*". *Journal of Natural Products*, **60**: 422-427.
- Lin, L. R., Skaltsounis, A. L., Seguin, E., Tillequin, F. & Koch, M. (1994). "Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*". *Planta Medica*, **60**: 168-170.
- Lin, L. C., Kuo, Y. C. & Chou, C. J. (2000). "Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*". *Journal of Natural Products*, **63**: 627-630.
- Lopez Saez, J. A., Perez Alonso, M. J. & Velasco Negueruela, A. (1995). "Flavonoids of *Selaginella denticulata* and *S. selaginoides*". *Fitoterapia*, **66**: 188-189.
- Markham, K. R., Sheppard, C. & Geiger, H. (1987). "¹³C NMR of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids". *Phytochemistry*, **26**: 3335-3337.
- Marquez, C. A., Lara, O. F., Esquivel, R. B. & Mata, E. R. (1999). *Plantas Medicinales de México II. Composición, Usos y Actividad Biológica*. México: UNAM.
- Martínez, Maximino. (1979). *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica. pp. 317,1176.



- Martínez, Maximino. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*. (6ª ed.). México: Ediciones Botas. pp. 124-125.
- McLaughlin, J., Chang, C. & Smith, D. (1991). <"Bench top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update>. In: A. U., Raman (Ed), *Studies in Natural Products, Chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J.E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. & McLaughlin, J. L. (1982). "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". *Planta Medica*, **45**: 31-34.
- Mills, J. D., Mitchell, P., & Shürmann, P. (1980). "Modulation of coupling ATPase activity in coupling chloroplasts, the role of the thioredoxin system". *FEBS Letters*, **112**: 173-177.
- Morales-Flores, F., Aguilar, M. I., King-Díaz, B., Santiago-Gómez, J. R. de & Lotina-Hennsen, B. 2007. "Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts". *Photosynthesis Research*, **91**: 71-80.
- Nason, Alvin. (1980). *Biología*. (18a. reimpresión, 1965, 1ª ed.). México, DF: Trillas.
- Navarro, G. V., González, A., Fuentes, M. Aviles, M. Rios, M. Y., Zepeda, G. & Rojas, M. G. (2003). "Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants". *Journal of Ethnopharmacology*, **87**: 85-88.
- Obregón, G. B. y Zabaleta, A. M. (2000). "Control de calidad de discos de sensibilidad antibiótica comercializados en el mercado peruano (1998-1999)". *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, **17**: 14-20.
- Quitrakul, R. & Izawa, S. (1973). "Electron transport and photophosphorylation in chloroplast a function of the electron-acceptor. II. Acceptor-specific inhibition by KCN". *Biochimica et Biophysica Acta*, **305**: 105-118
- Panda, D., Rao, D. N., Sharma, S.G., Strasser, R. J. & Sarkar, R. K. (2006). "Subemergence effects on rice genotypes during seedling stage: Probing of subemergence driven changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients". *Photosynthetica* **44**:69-75.
- Paxton, J. D. (1991). *Assays for Antifungal Activity in Methods in Plant Biochemistry*. (Hostettmann Ed), Vol. 6, pp 33-46. New York: Academic press.

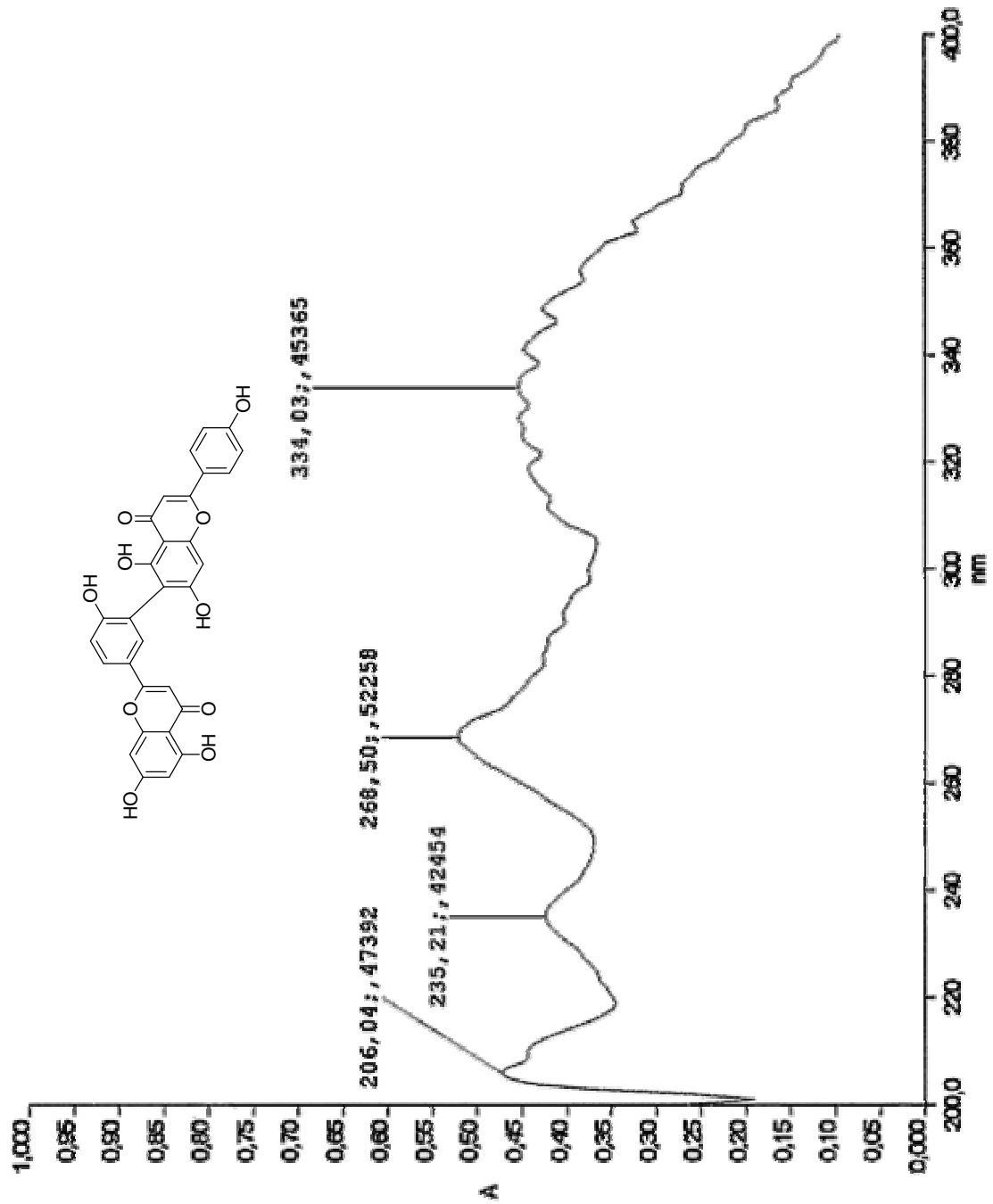


- Qasim, M. A., Roy, S. K., Kamil, M. & Ilyas M. (1985) "Phenolic constituents of *Selaginellaceae*". *Indian Journal of Chemistry*, **24** B: 220.
- Quattrocchi, Umberto. (2000). *CRC World Dictionary of Plant Names. Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology*, (4 Vols.). USA: CRC Press.
- Reigosa, M. J., Pedrol, N. & González, L. Eds. (2006). *Allelopathy, a Physiological Process with Ecological Implications*. Netherlands: Springer.
- Rickert, K. W., Sears, J., Beck, W. F. & Brudvig, G. W. (1991). <Mechanism of irreversible inhibition of O₂ evolution in photosystem II by Tris (hydroxymethyl)aminomethane>. In: *Biochemistry*. (Chapter 30, 7888–7894).
- Rost, T. L., Barbour, Michael G., Thornton, R. M., Weier, T. E. & Stocking, C. R.. (1985). *Botánica: Introducción a la Biología Vegetal*. México, DF: Limusa.
- Saha, S., Ouitrakul, R., Izawa, S. & Good, N. (1971). "Electron transport and phosphorylation in chloroplast as a function of the electron acceptor". *Journal of Biological Chemistry*, **246**: 3204-3209.
- Sánchez Sánchez, O. (1958). *Las Excursiones Botánicas en el Distrito Federal*. Tesis, Escuela Normal Superior, Secretaría de Educación Pública. México.
- Schwartz, M. (1968). "Light induced proton gradient links electron transport and phosphorylation". *Nature*, **219**: 915-919.
- Shriner, R., Fuson, R. & Curtin, D. (1997). *Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos*. México: Limusa.
- Silva, G. L., Chai, H., Gupta, M. P., Fransworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. Beecher, W. W. & Kinghorn, A. D. (1995). "Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*". *Phytochemistry*, **40** : 129-134.
- Stahl, E. & Schorn P. J. (1969). *Thin Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Berlin: E. Stahl.
- Strain, H. H., Cope, T. & Svec, W. A. (1971). "Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls". *Methods in Enzymology*, **23**: 452-476.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. y Schimper, A. F. W. (1953). *Tratado de Botánica*. (4^a ed.) España, Barcelona: Manuel & Cia; editores.

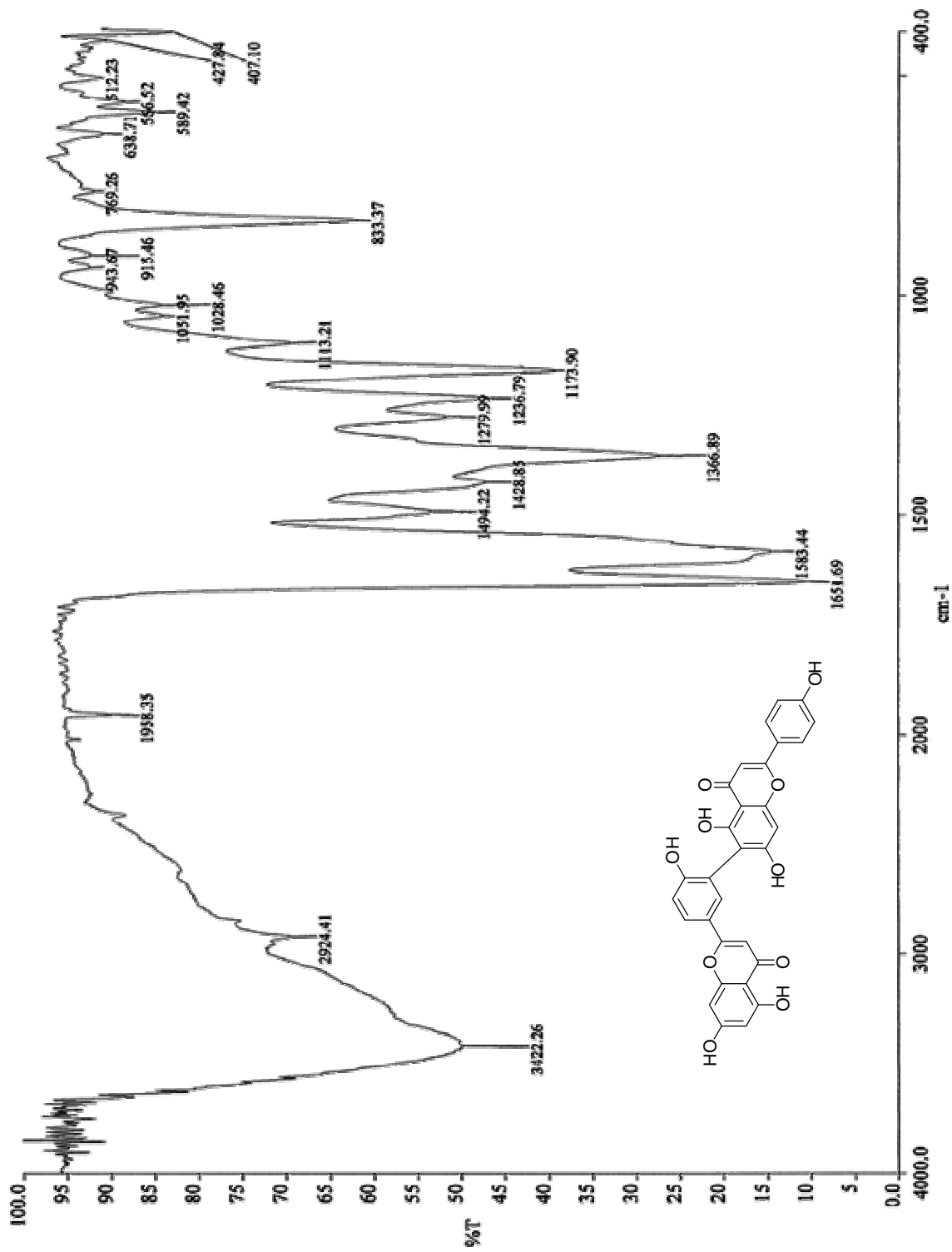


- Strasser, R. J., Srivastava, A & Govindjee. (1995). "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria". *Photochemistry and Photobiology*, **61**: 32-42.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael, M. & Srivastava, A. (2004). <Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient> In: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (Chapter 12: pp. 321-362). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sumner, J. B. (1974). "Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorous". *Science*, **100**: 413-415.
- Sun, C. M., Syu, W. Jr., Huang, Y. T., Chen, C. C. & Ou J. C. (1997). "Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*". *Journal of Natural Products*, **60**: 382-384.
- Swamy, R. C., Kunert, O., Schühly, W., Bucar, F., Ferreira, D., Rani, V. S., Kumar, B. R. & Narasimha Appa Rao, A. V. 2006. "Structurally unique biflavonoids from *Selaginella chrysochaetos* and *Selaginella bryopteris*". *Chemistry and Biodiversity*, **3**: 405-413
- Teng, W. S. (1993). "Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*". In: S. M., Colegate & R. J., Molyneux (Eds.), *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination* (Chap. 18, pp. 441-451). London: CRC Press.
- Trebst, A. (1972). "Measurement of Hill reactions and photoreduction". *Methods in Enzymology*, **24**: 146-165.
- Vernon, L. P. & Shawn, E. R. (1969). "Photoreduction of 2, 6-dichlorophenol-indophenol by diphenylcarbazide: a photosystem II Z reaction catalyzed by tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments". *Plant Physiology*, **44**: 1645-1649.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1992) *Bioquímica*. Barcelona: John Wiley & Sons.

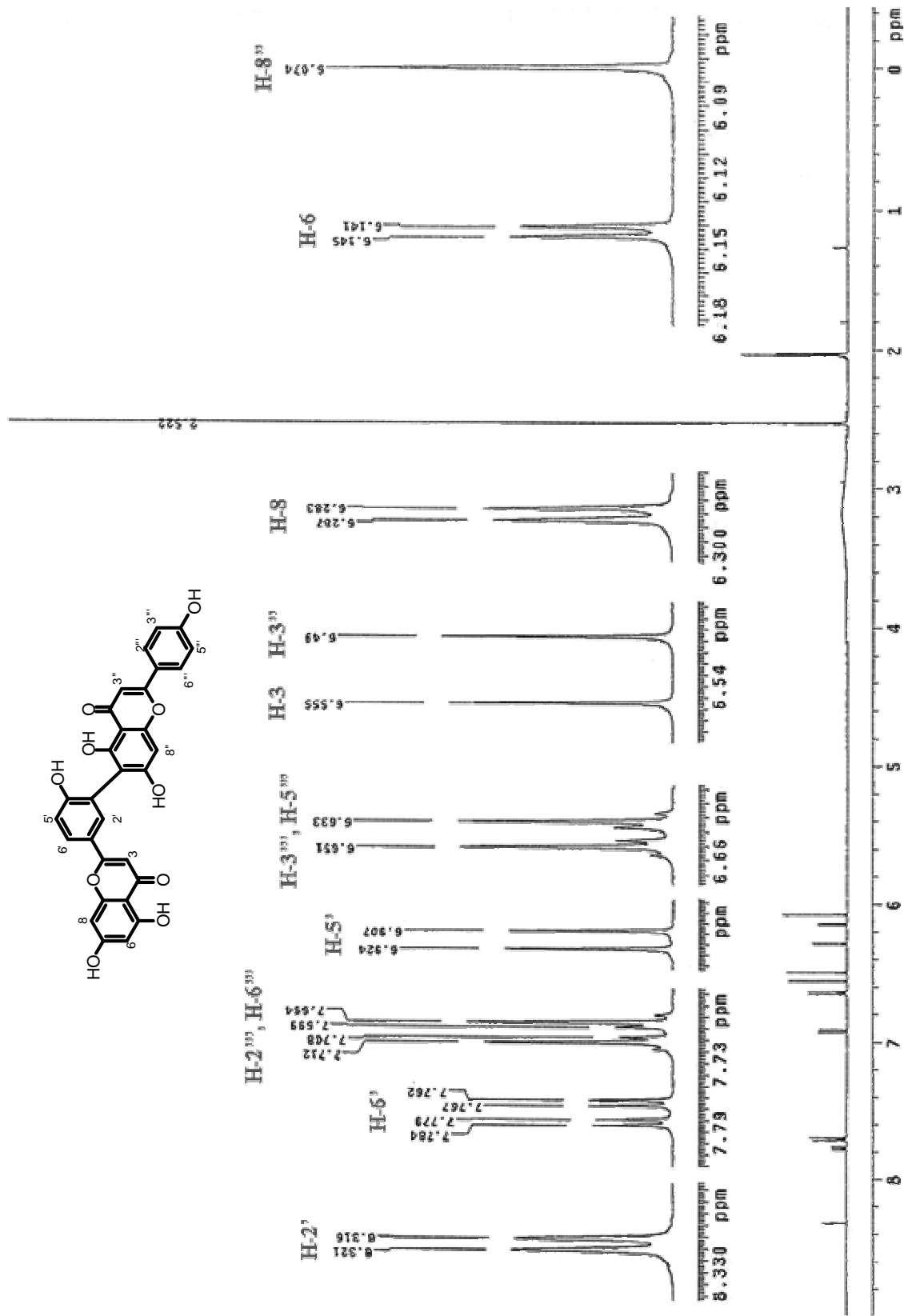
ANEXO
ESPECTROS



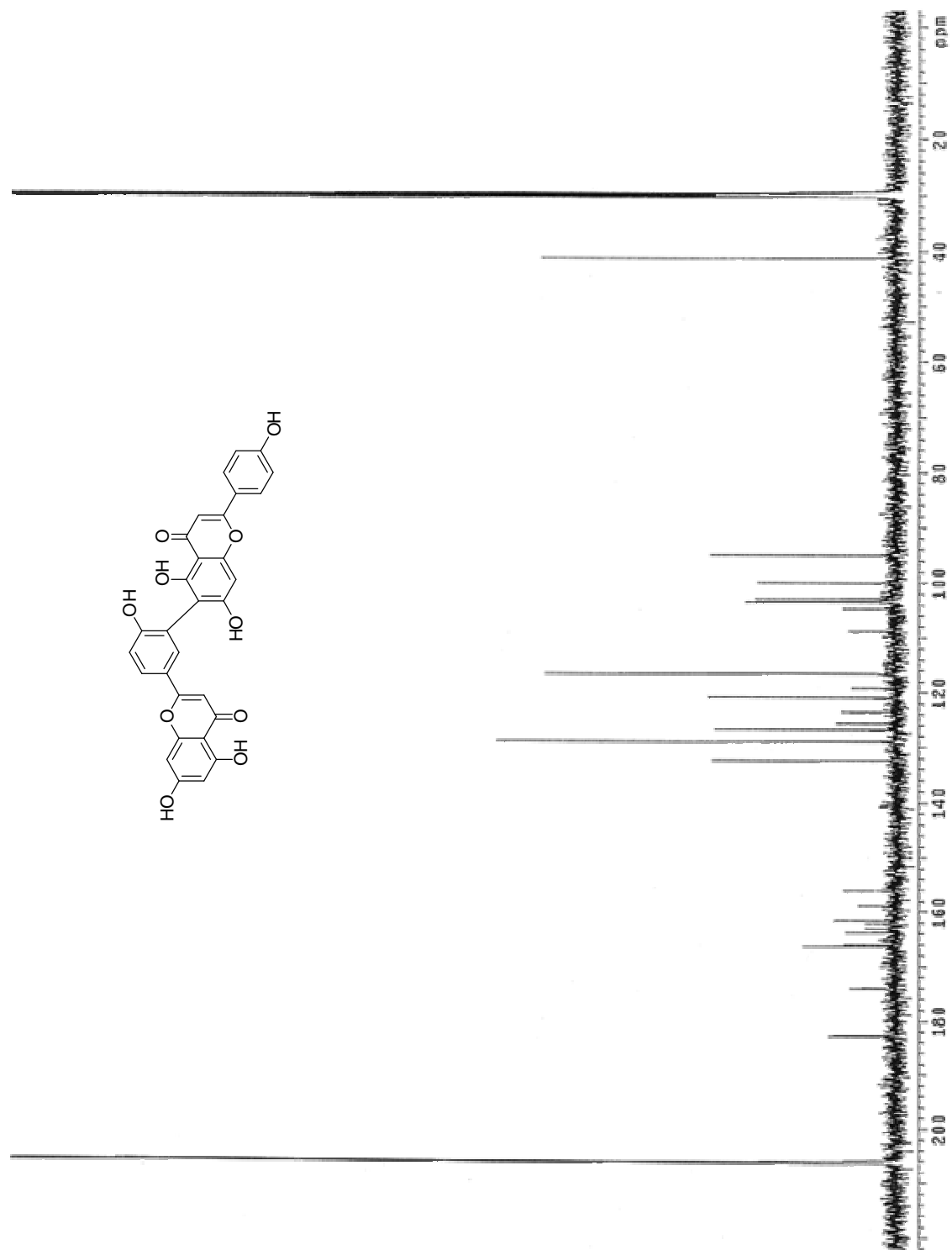
Espectro 1. Espectro en el UV de robustaflavona



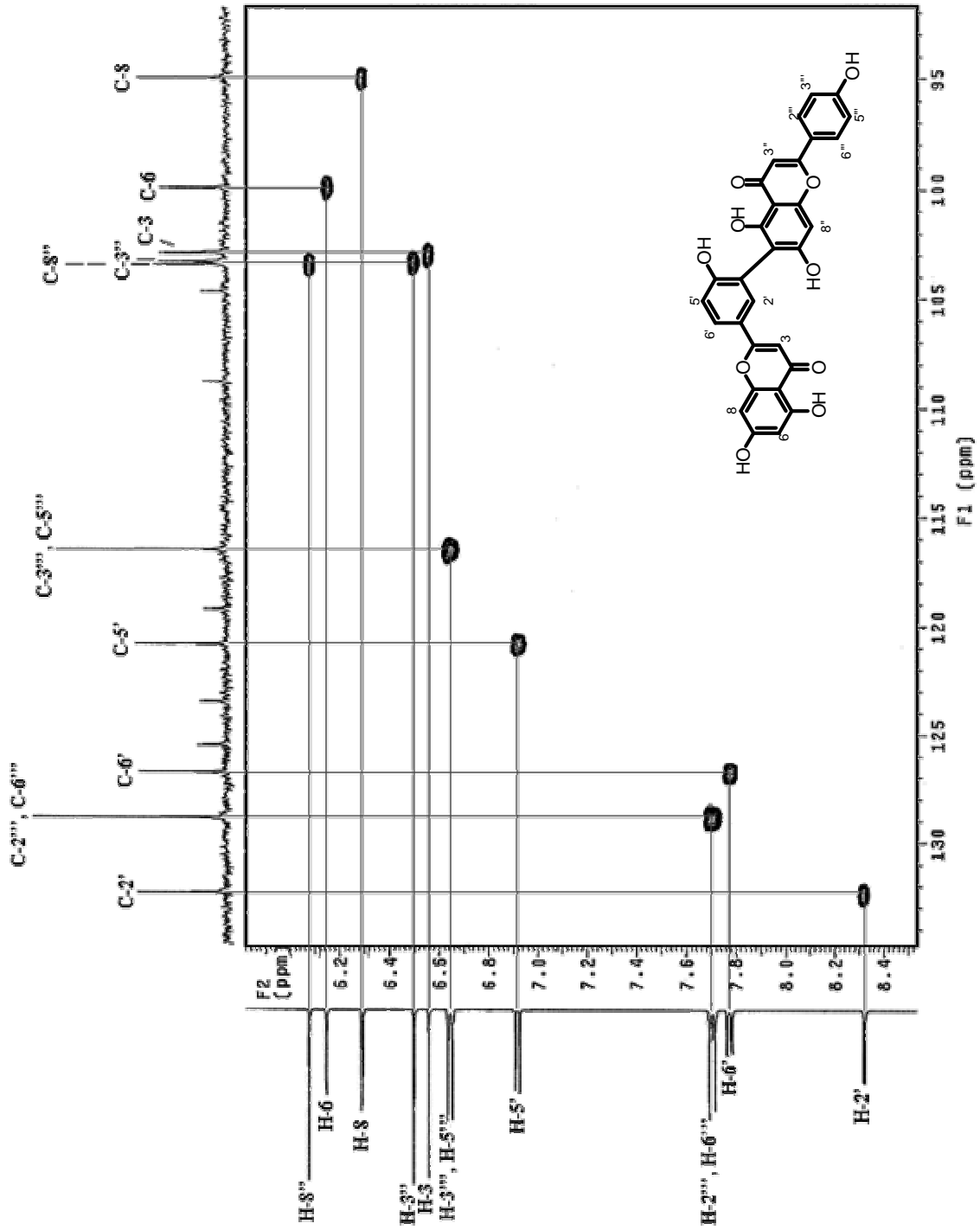
Espectro 2. Espectro en el IR de robustaflavona



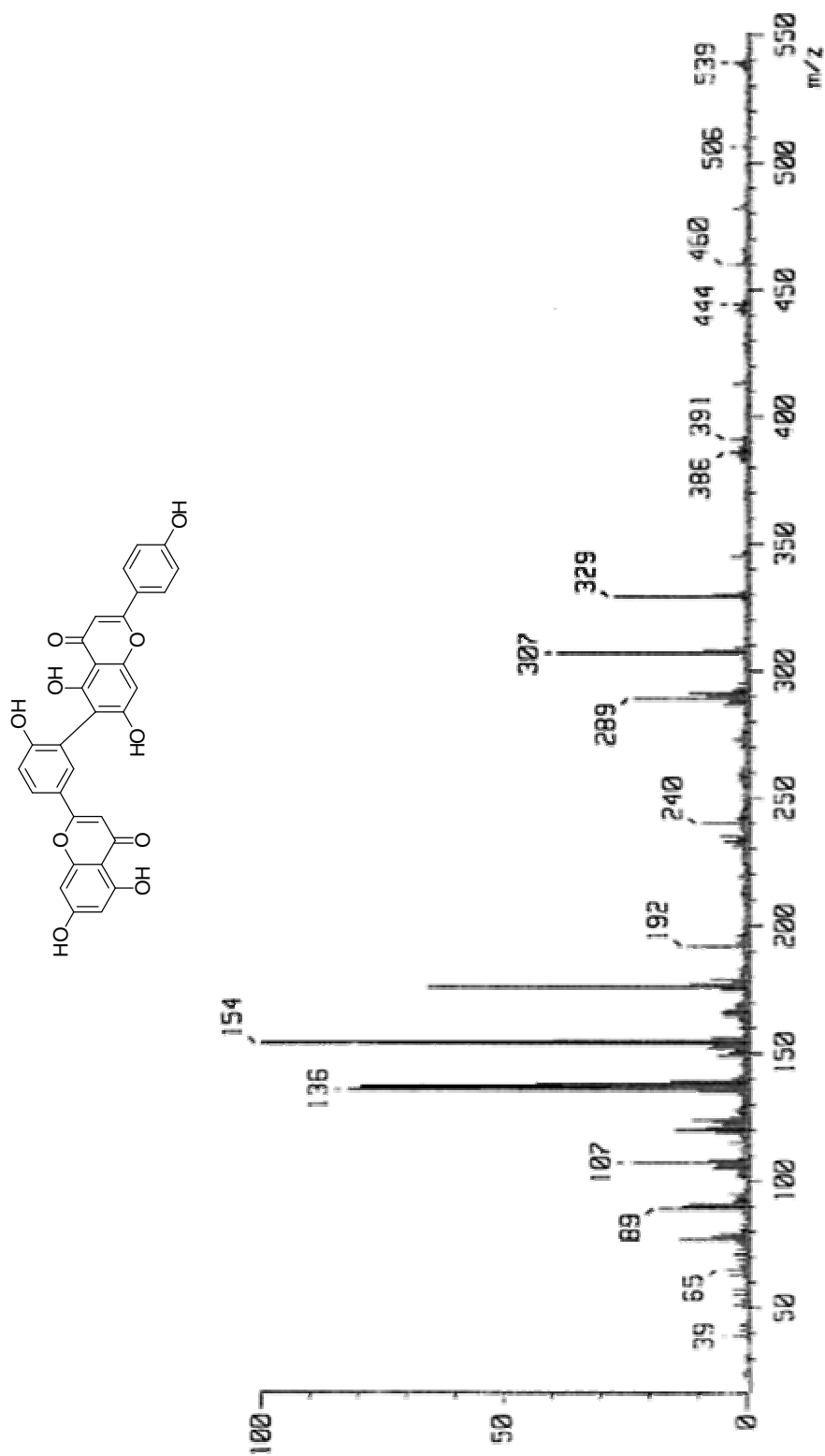
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H de robustaflavona



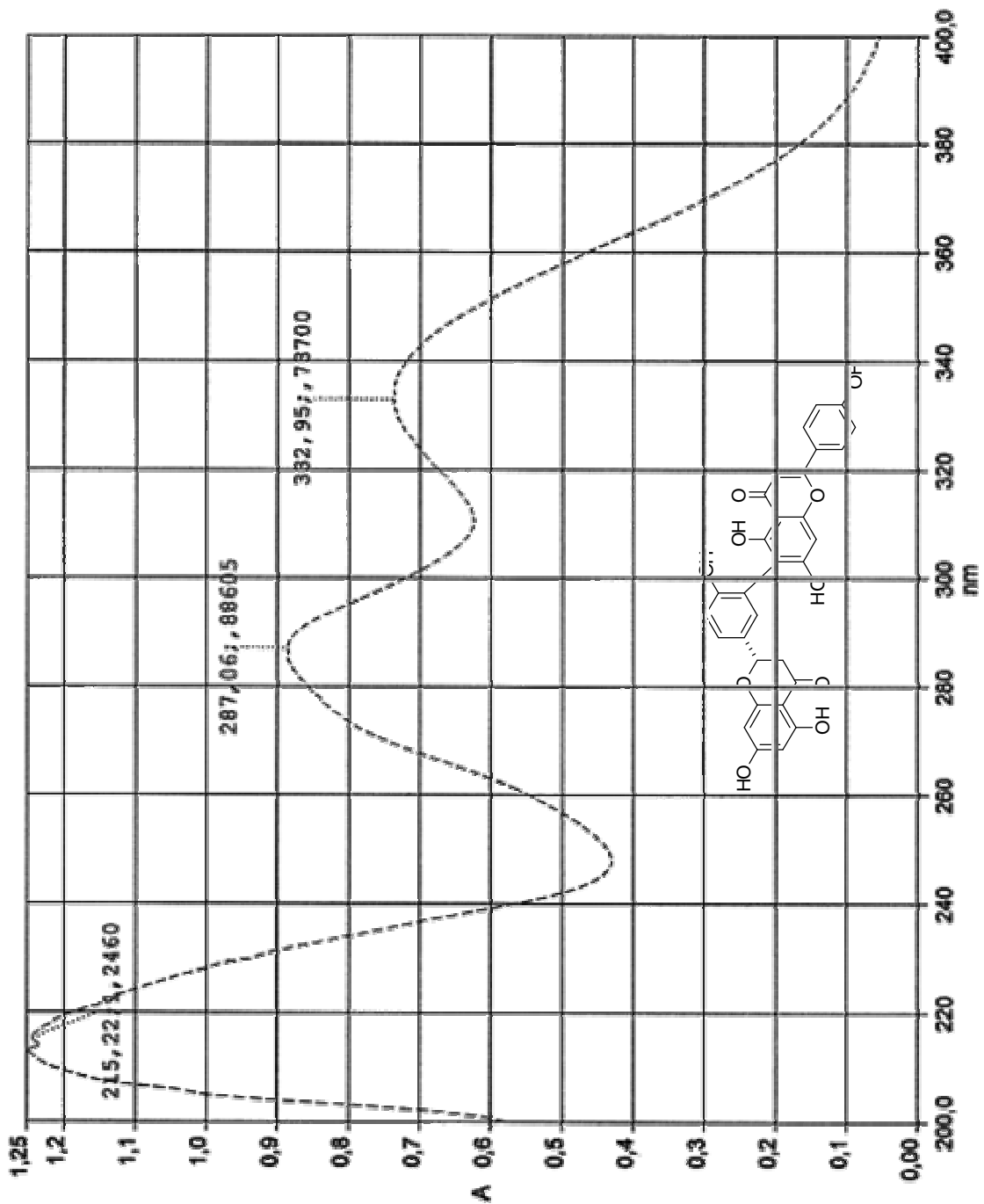
Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C de robustaflavona



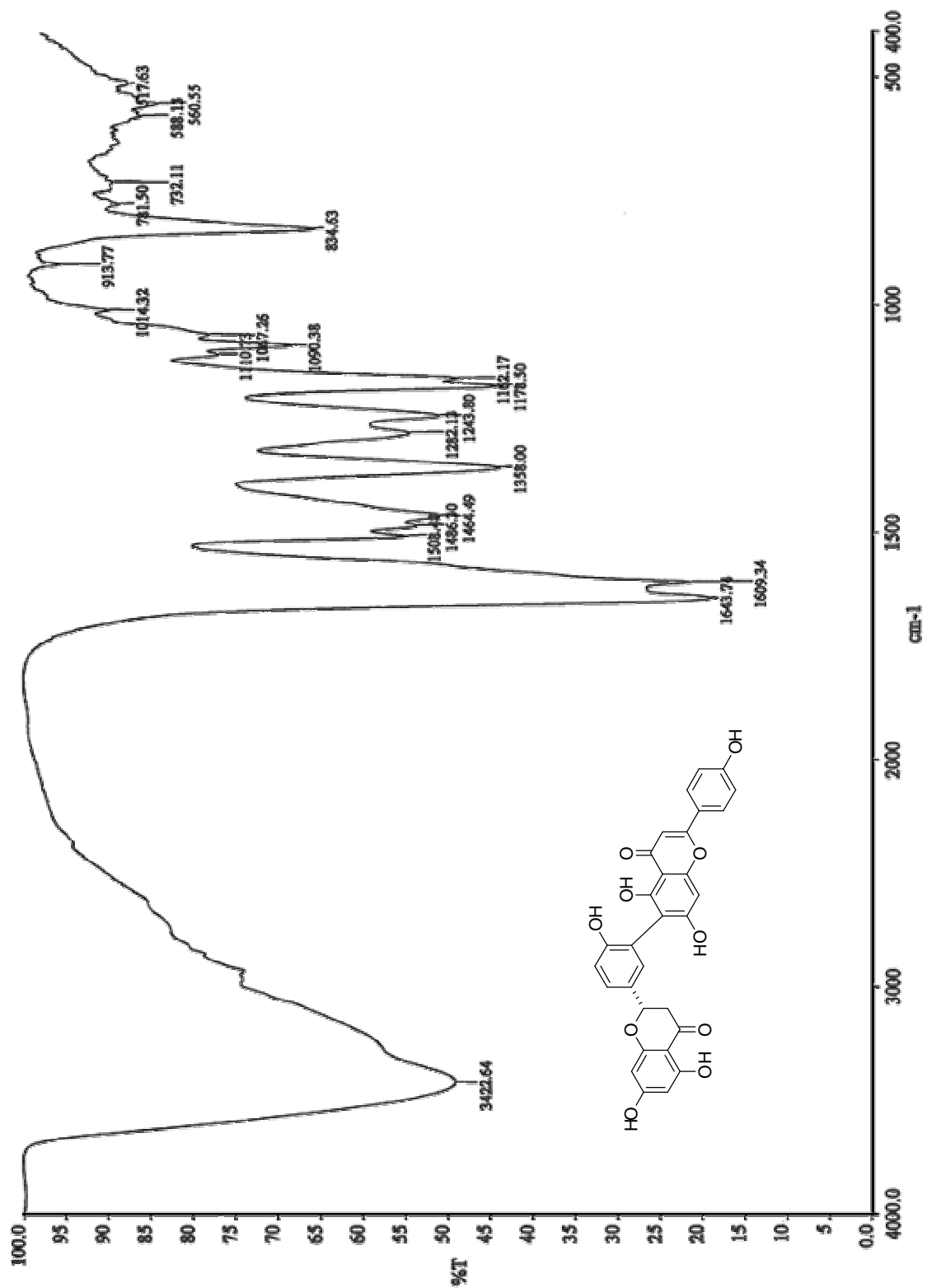
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de robustaflavona



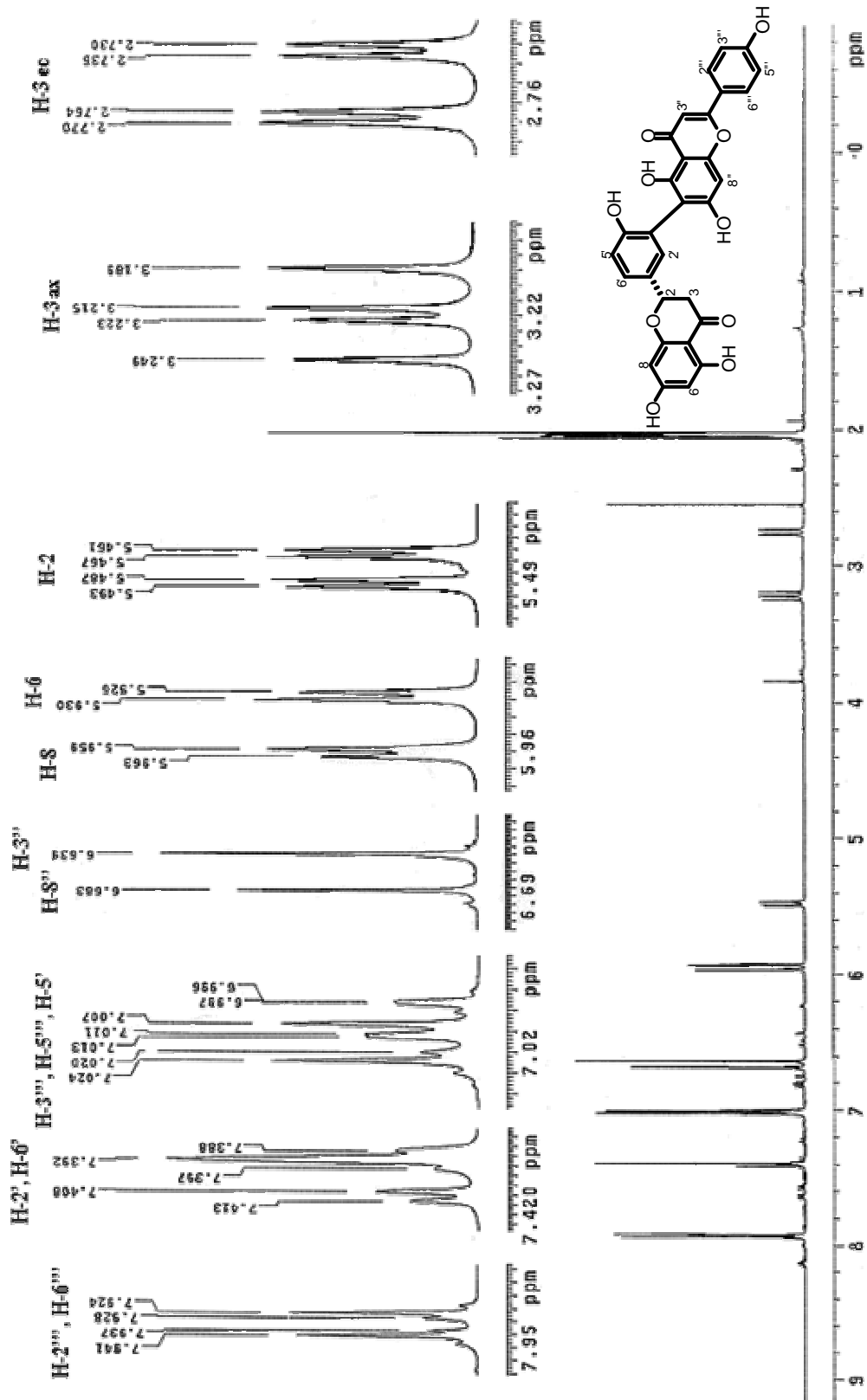
Espectro 8. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de robustaflavona



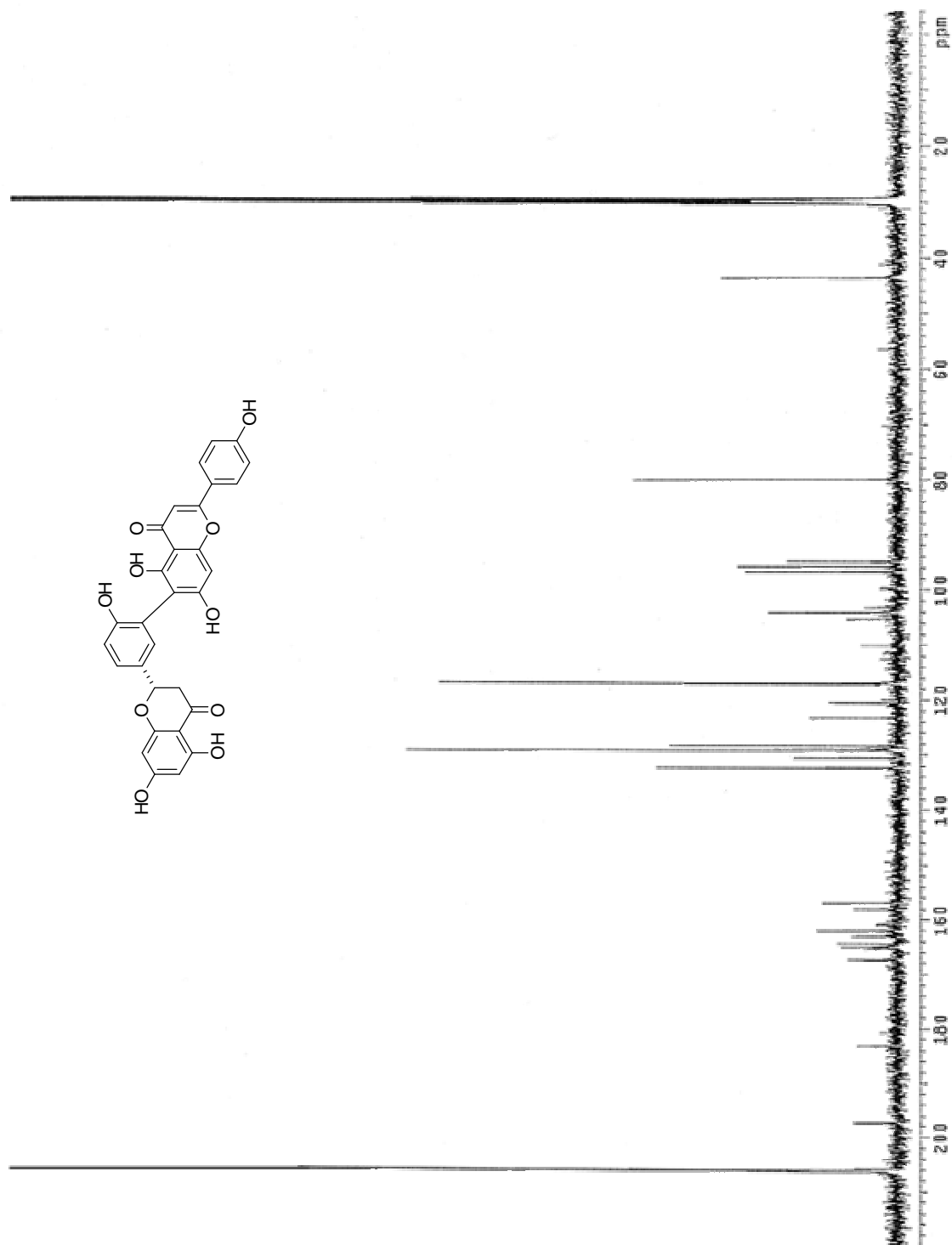
Espectro 9. Espectro en el UV de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona



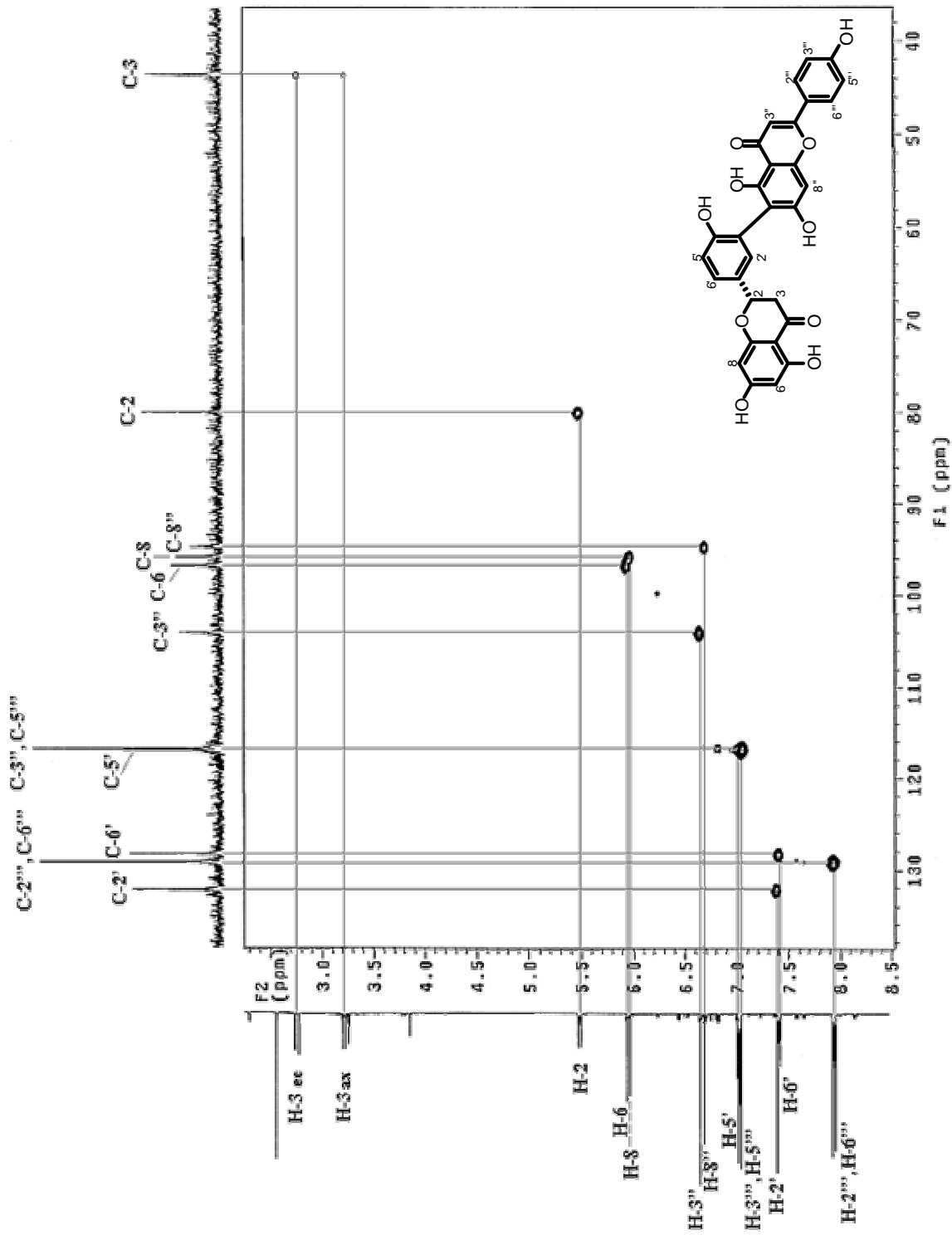
Espectro 10. Espectro en el IR de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona



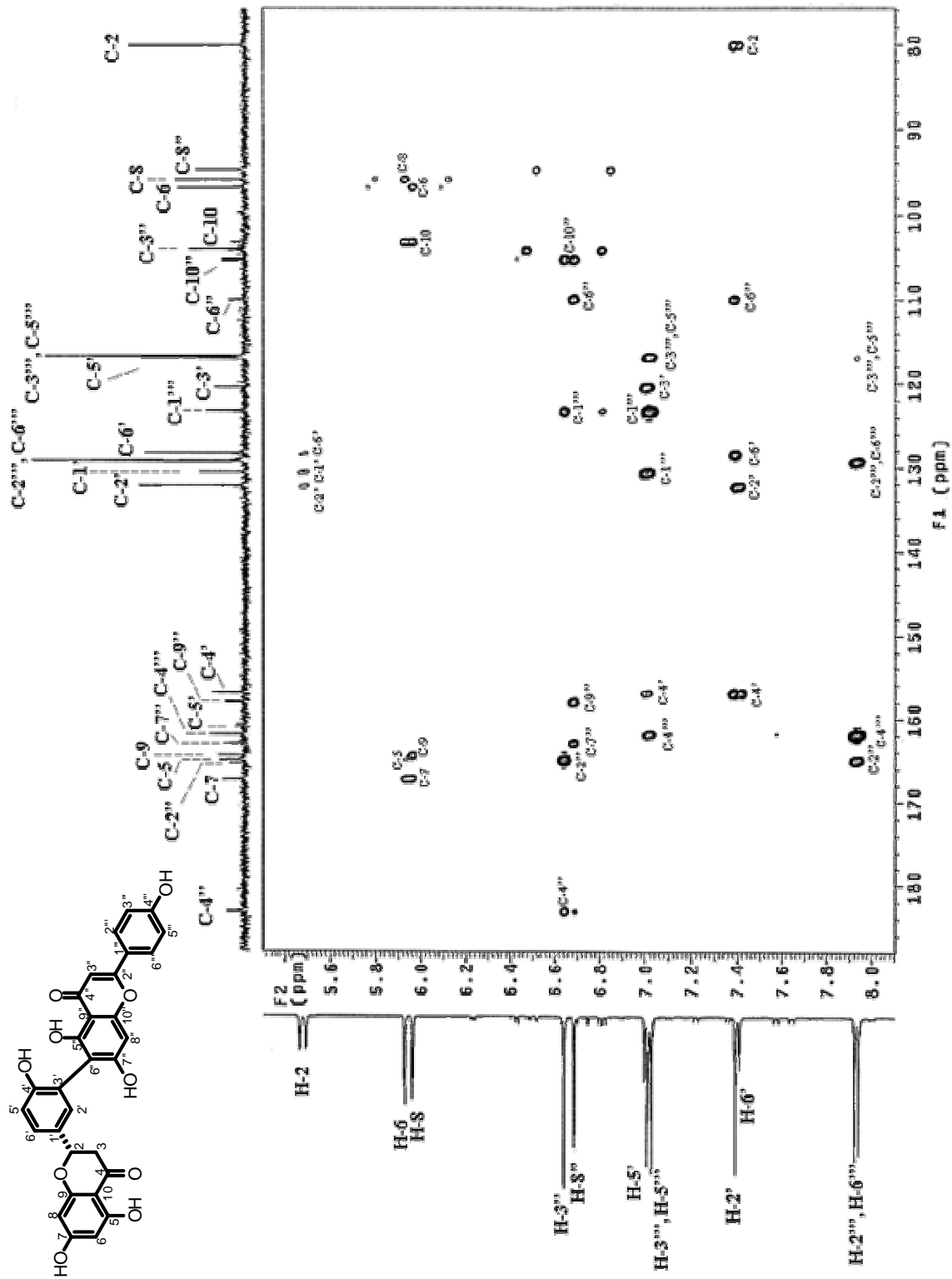
Espectro 11. Espectro de RMN ¹H de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona



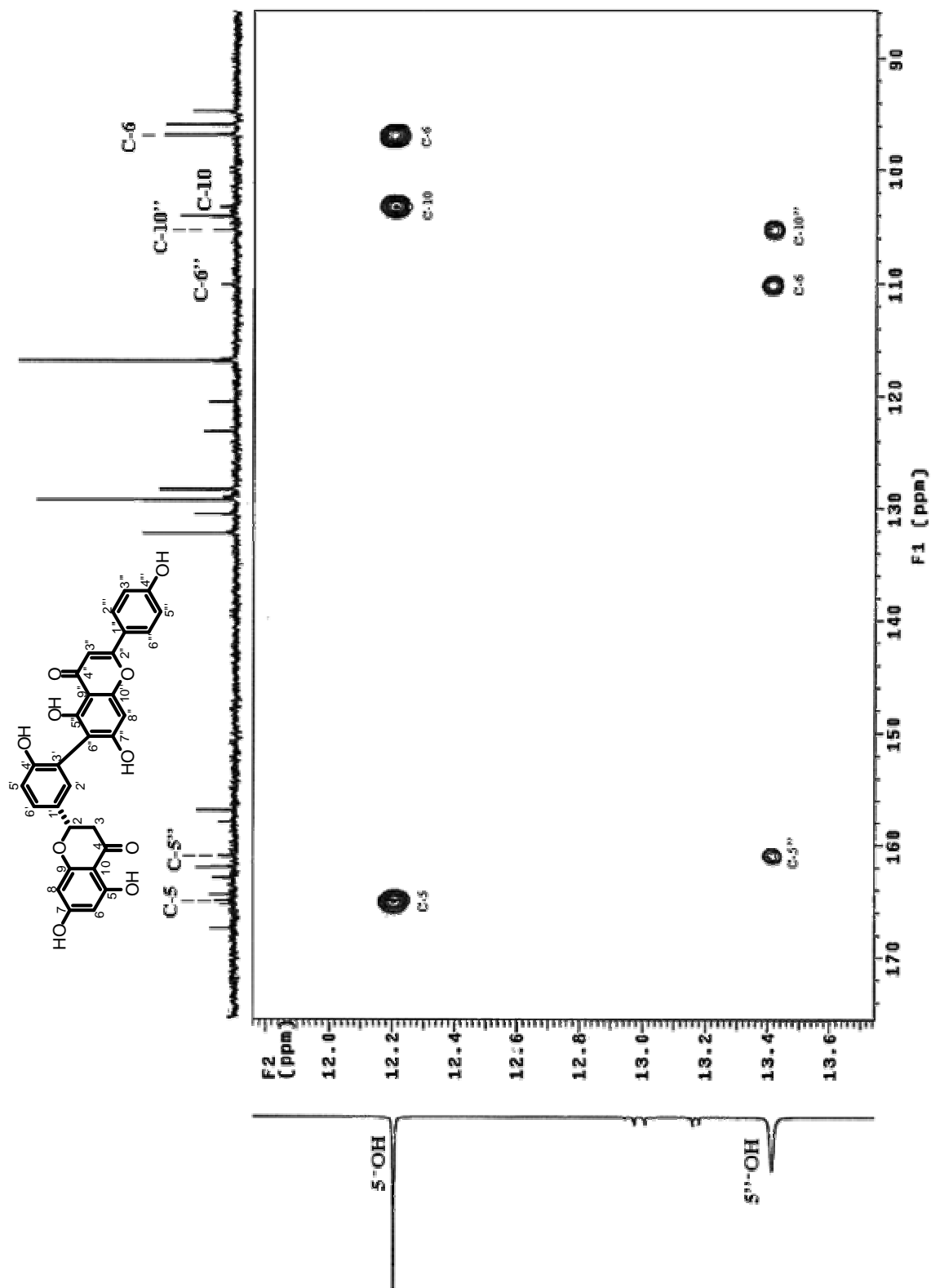
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona



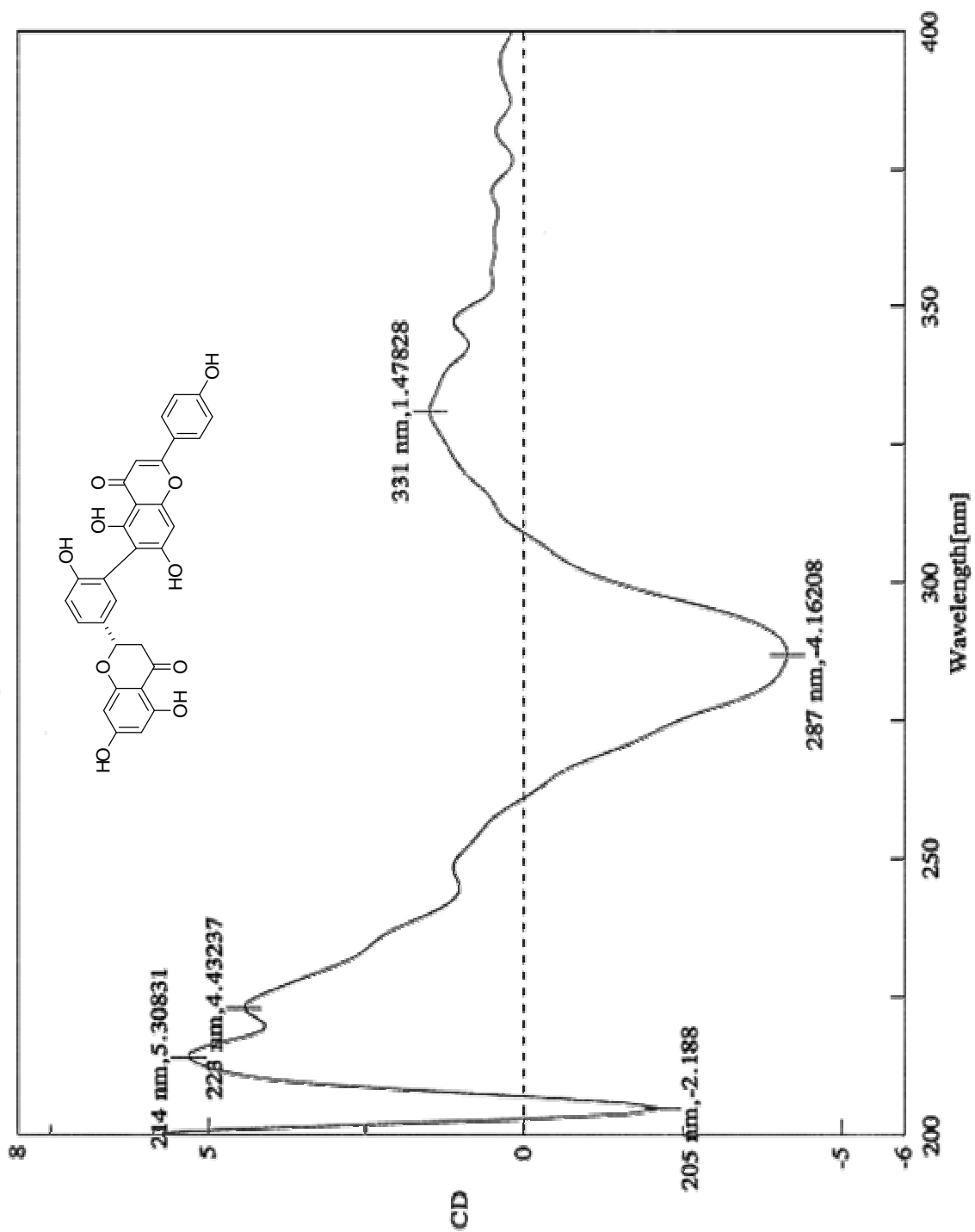
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de (2S)-2,3-dihidro-roboflavona



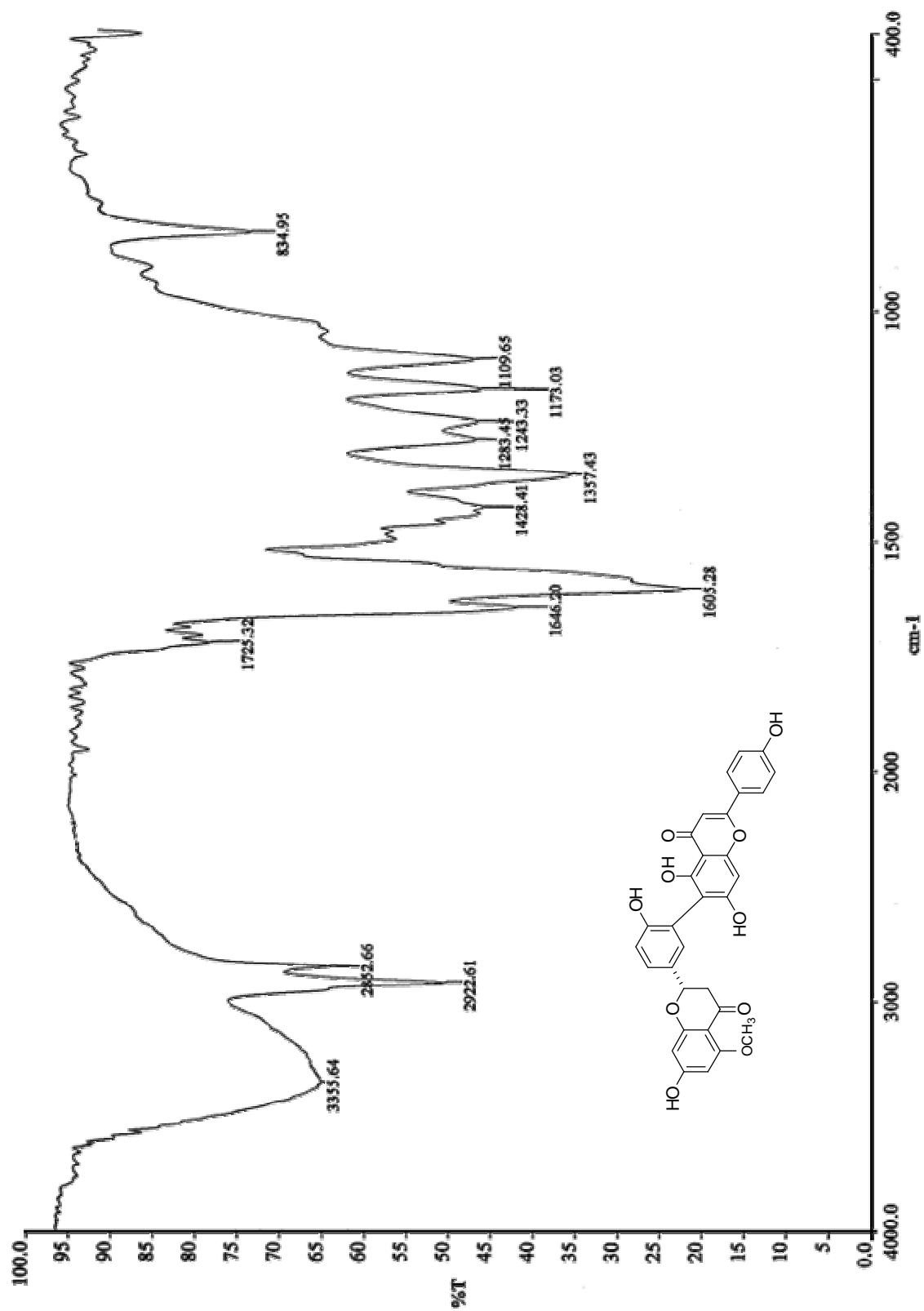
Espectro 14. Espectro de RMN ^1H modalidad HMBC de (2S)-2,3-dihidro-robusstaflovona



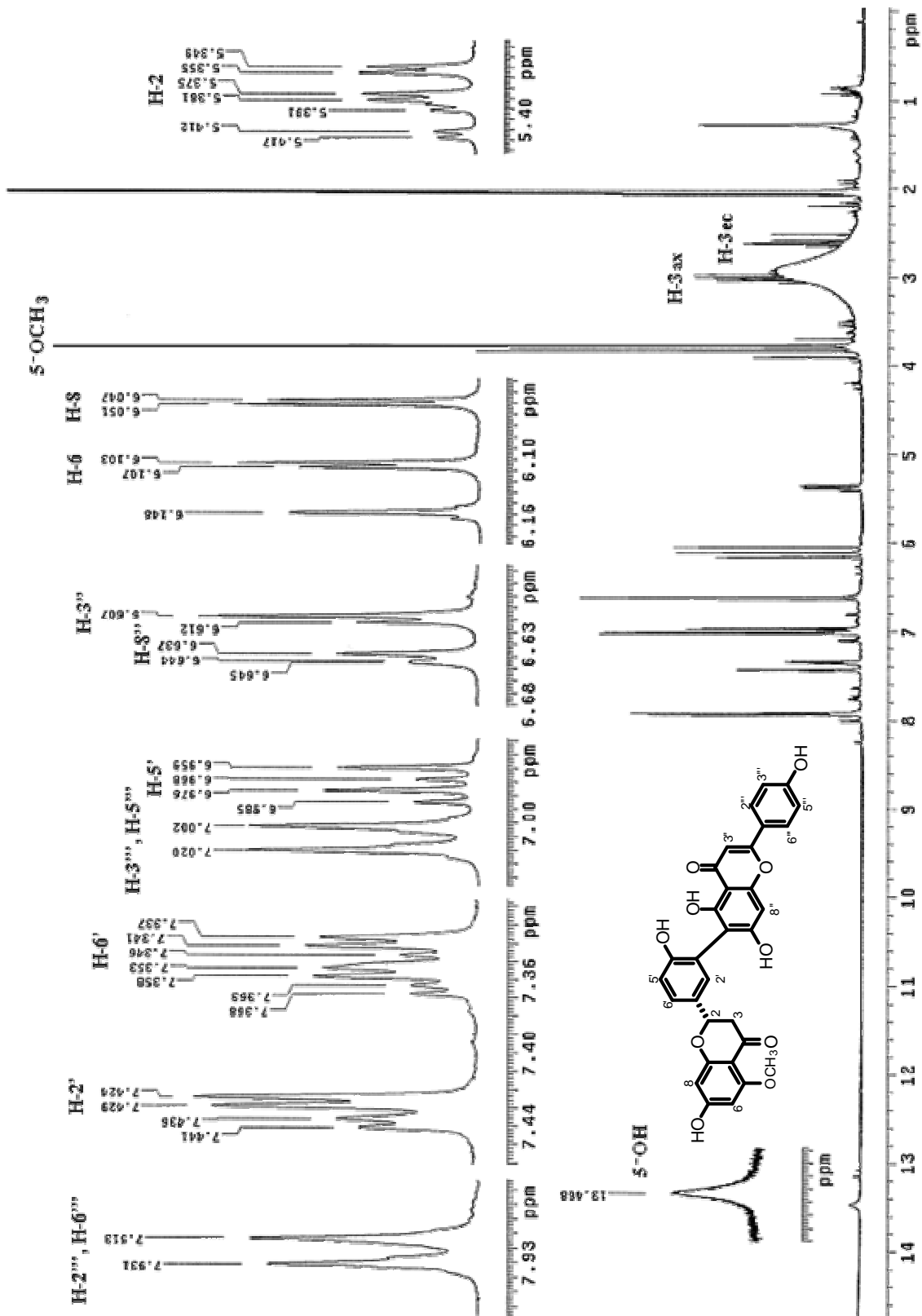
Espectro 15. Espectro de RMN ¹H modalidad HMBC de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona

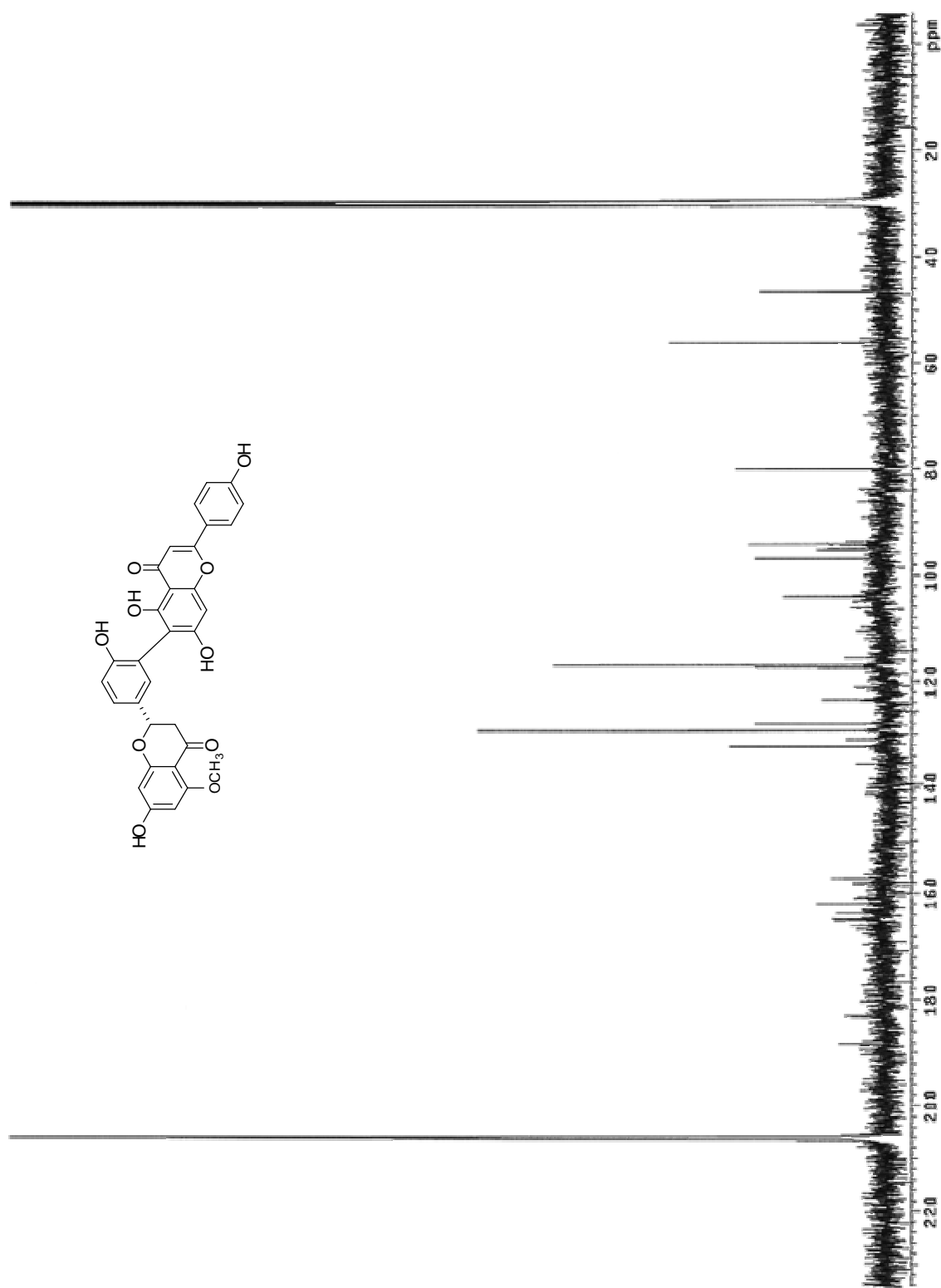


Espectro 16. Espectro de DC de (2S)-2,3-dihidro-robusstaflavona

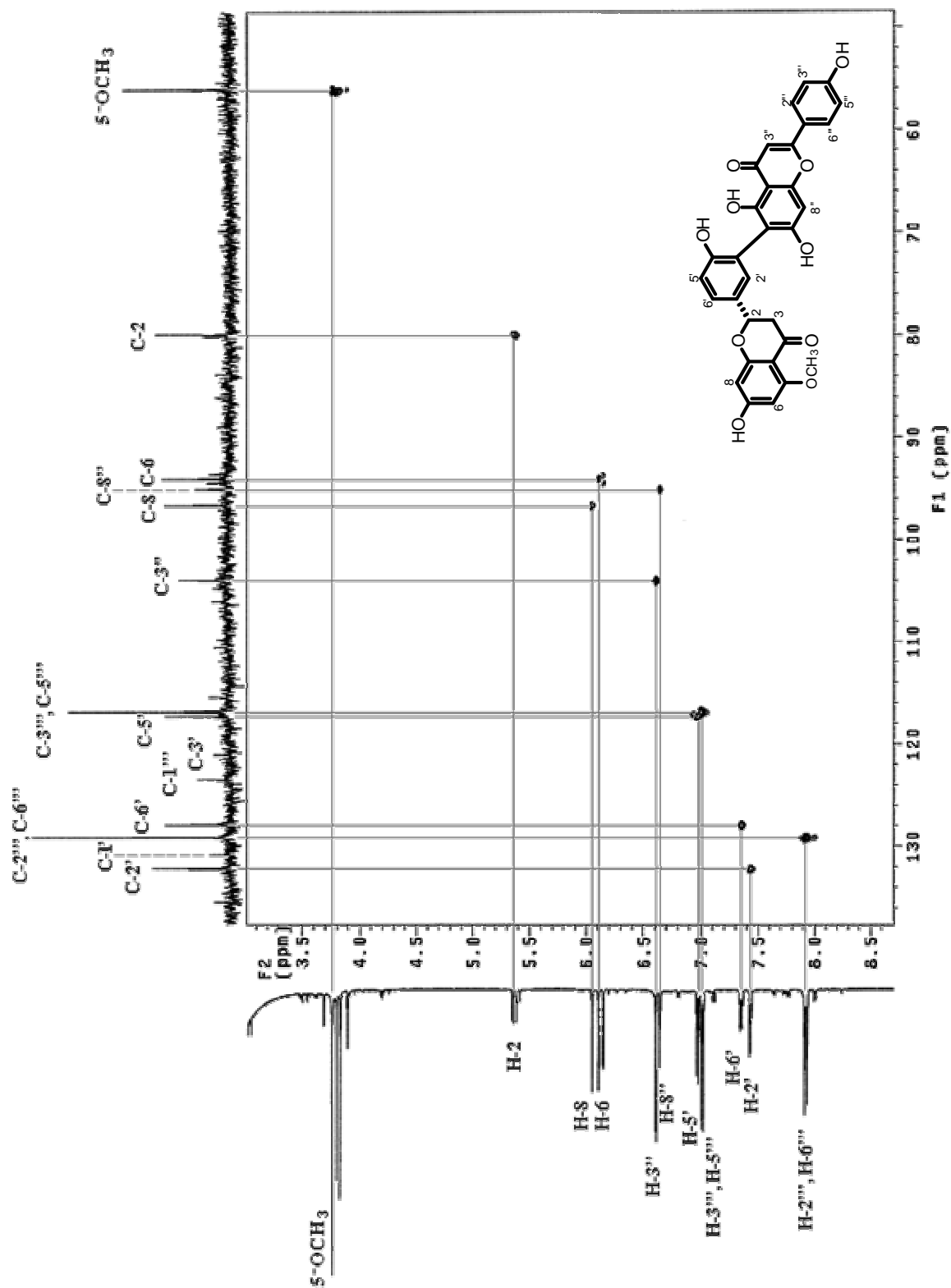


Espectro 18. Espectro en el IR de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona

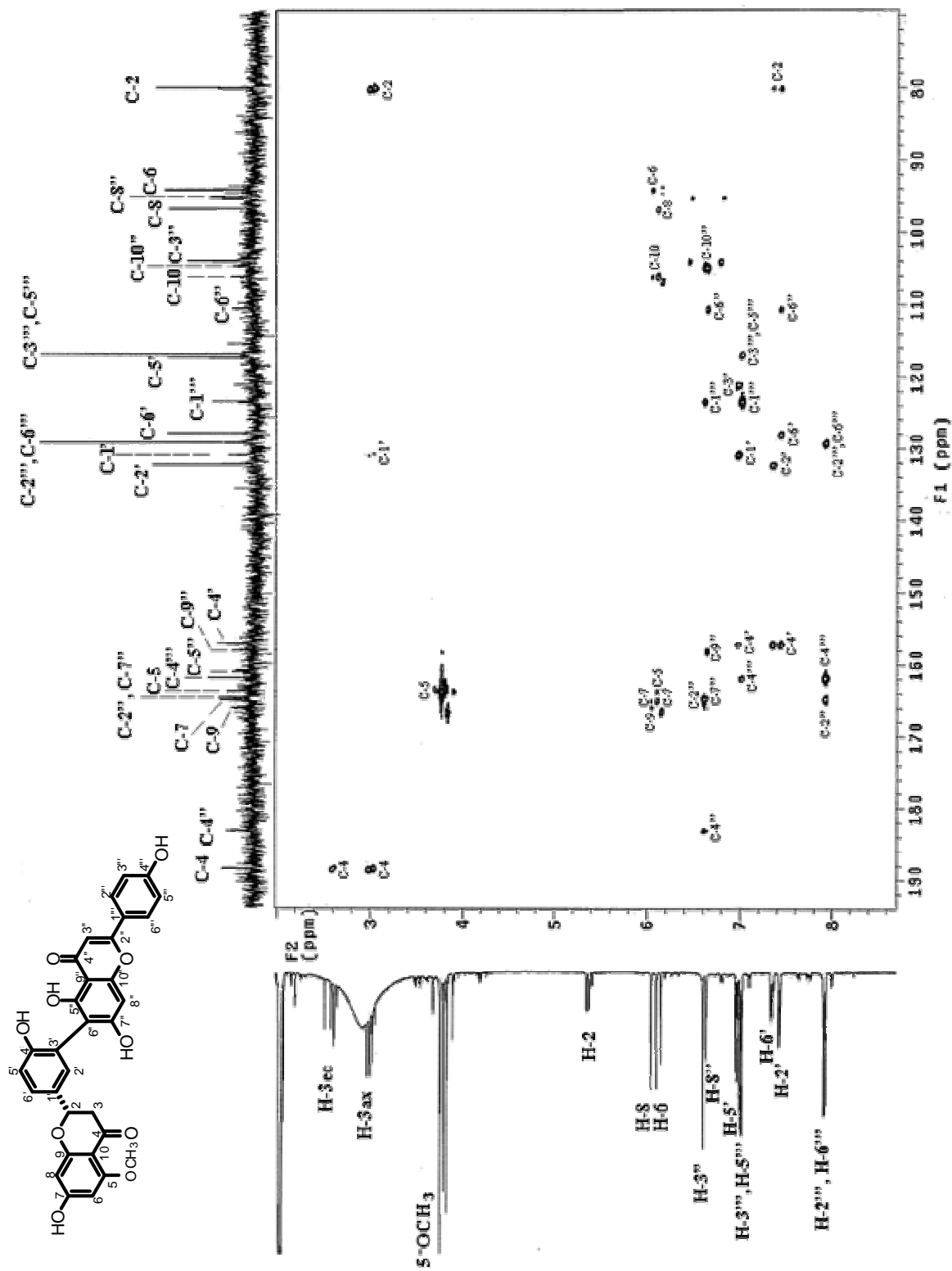
Espectro 19. Espectro de RMN ¹H de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona



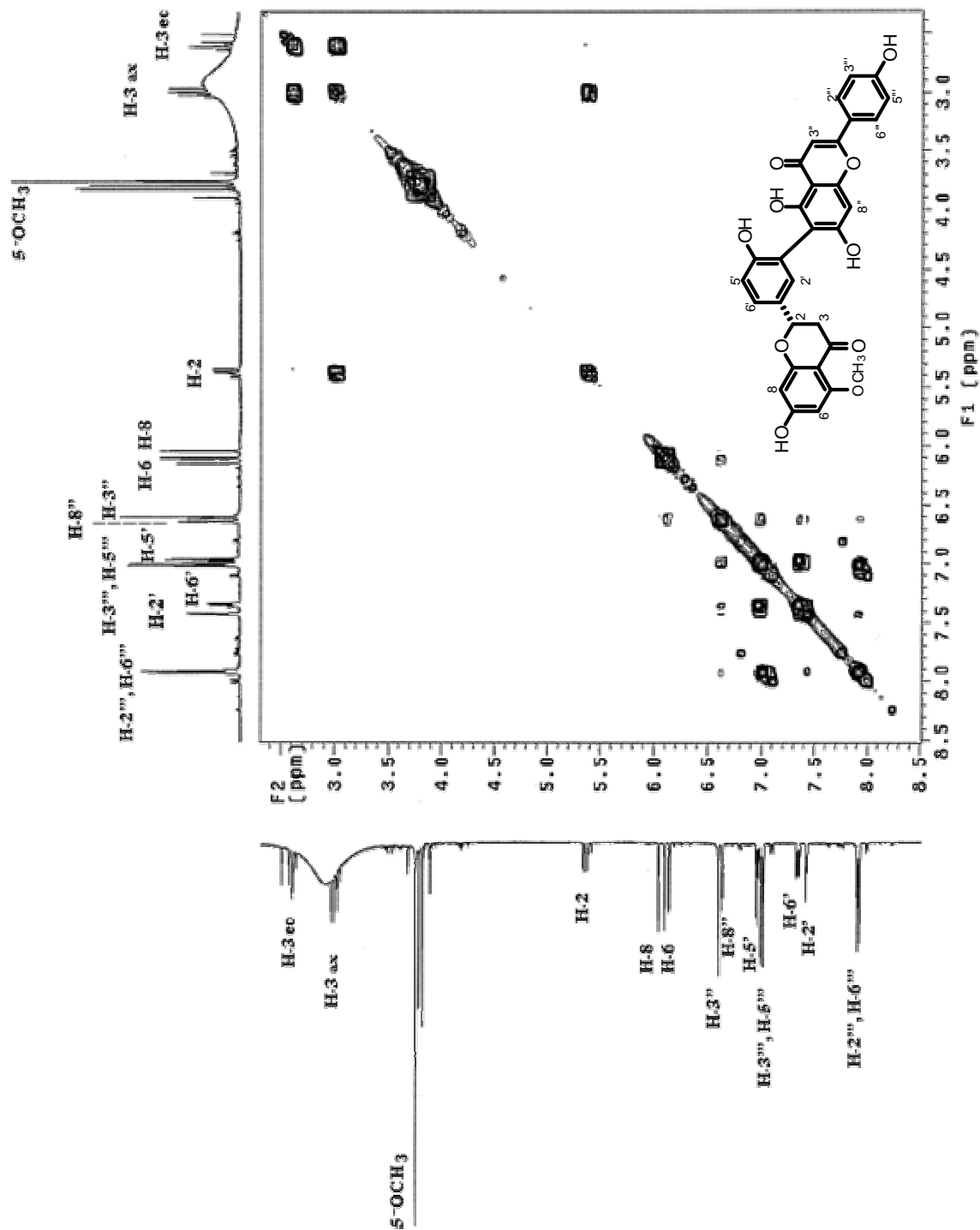
Espectro 20. Espectro de RMN ¹³C de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona

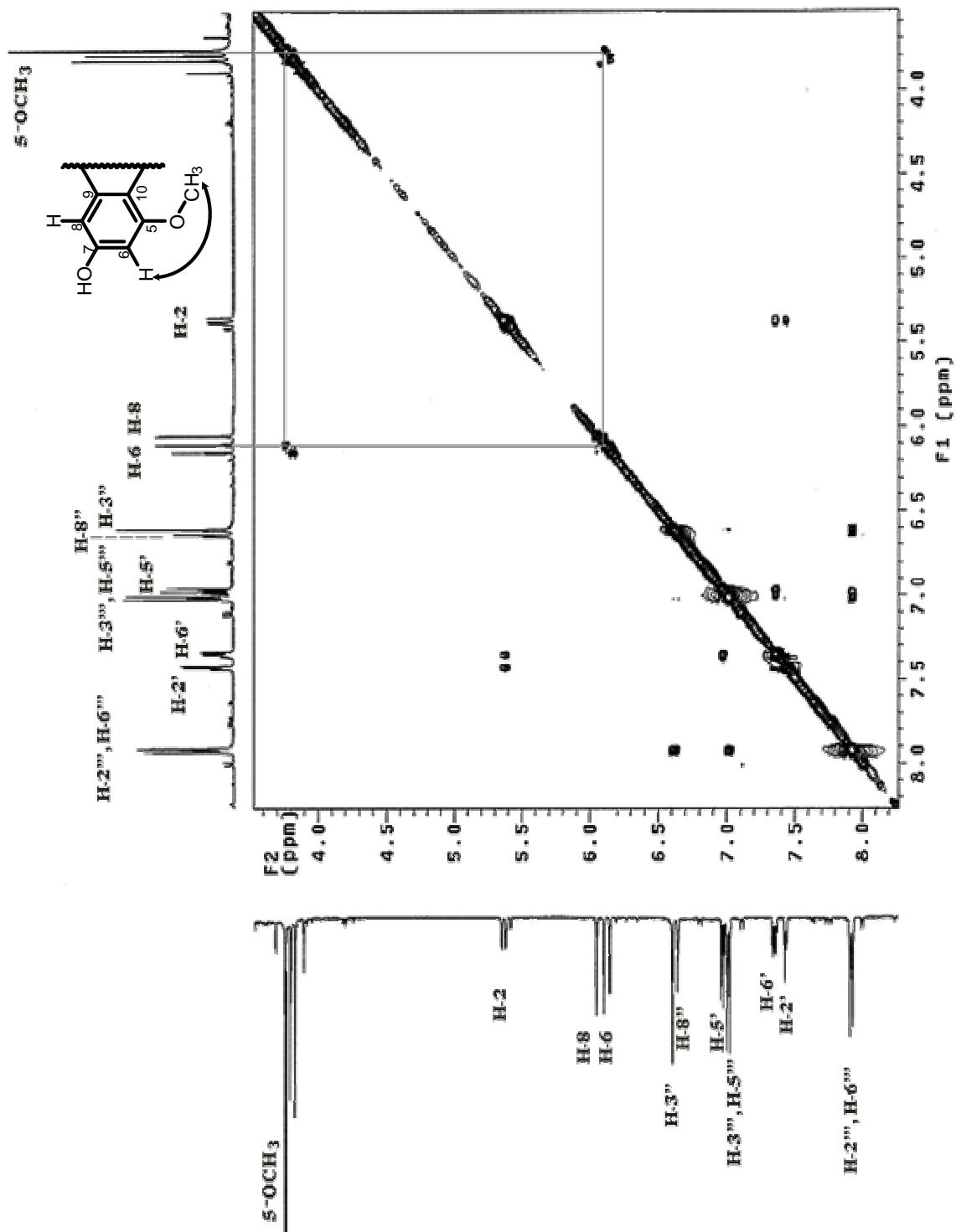


Espectro 21. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robusflavona

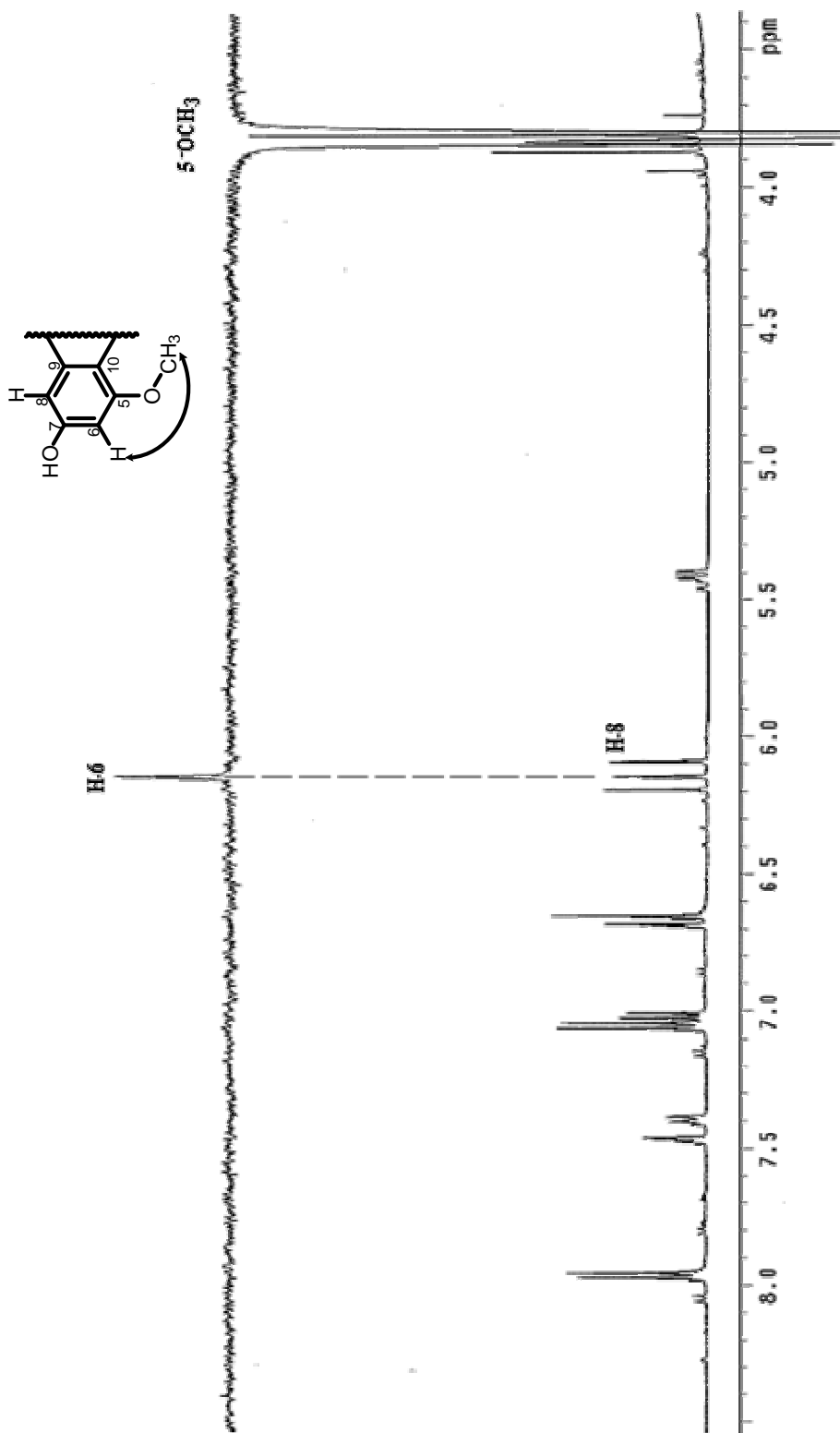


Espectro 22. Espectro de RMN ^1H modalidad HMBSC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona

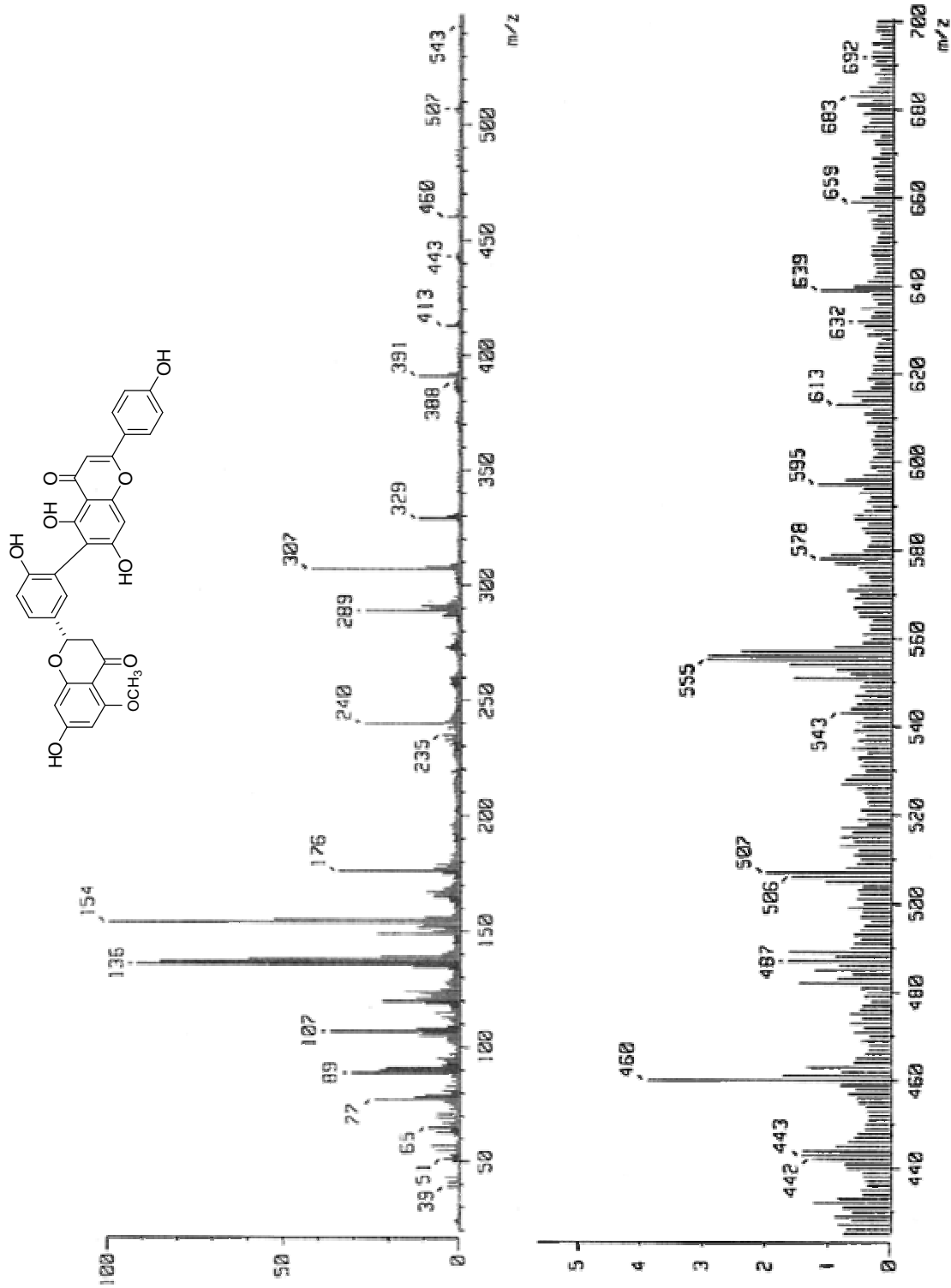




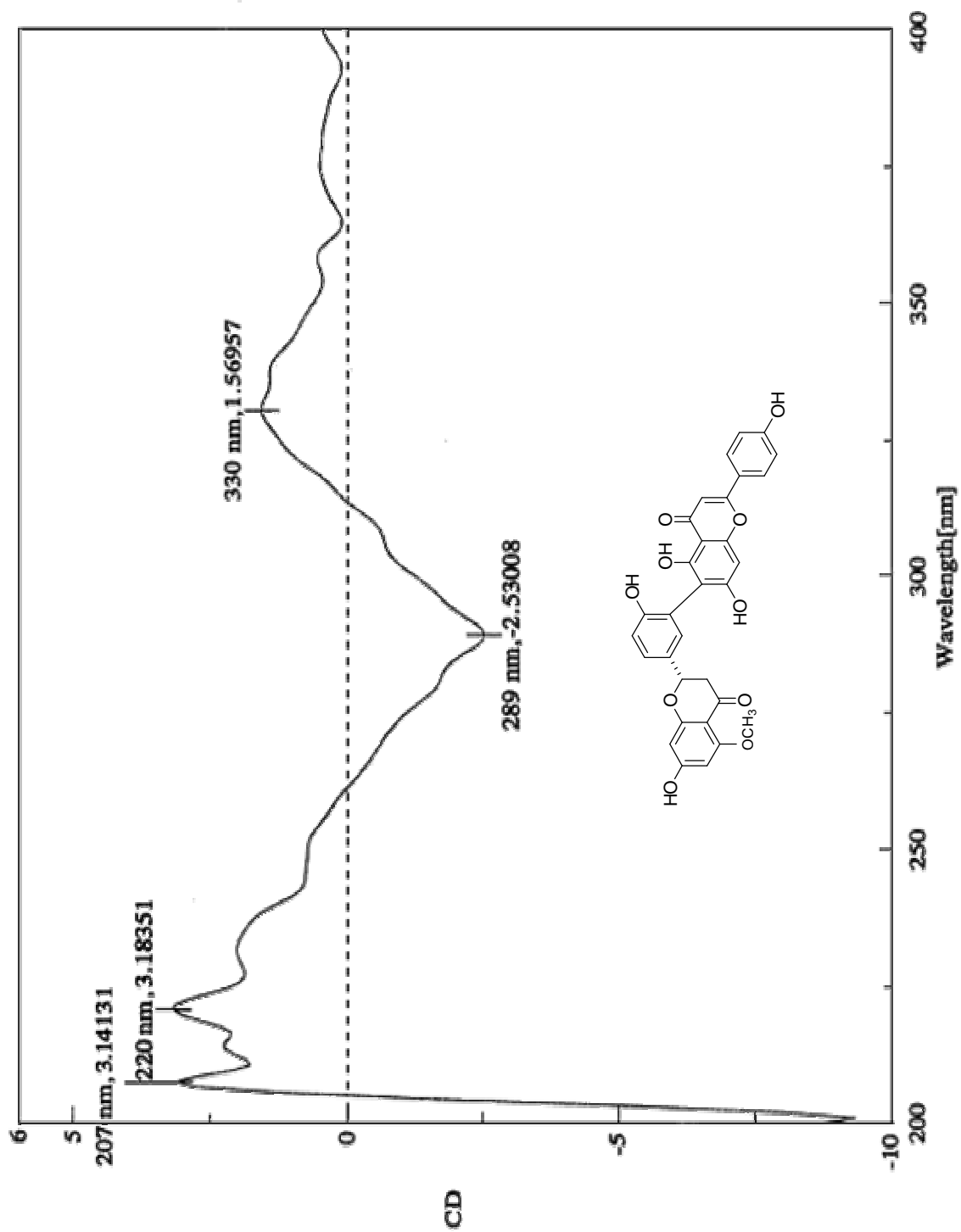
Espectro 24. Espectro de RMN ¹H modalidad NOESY de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona



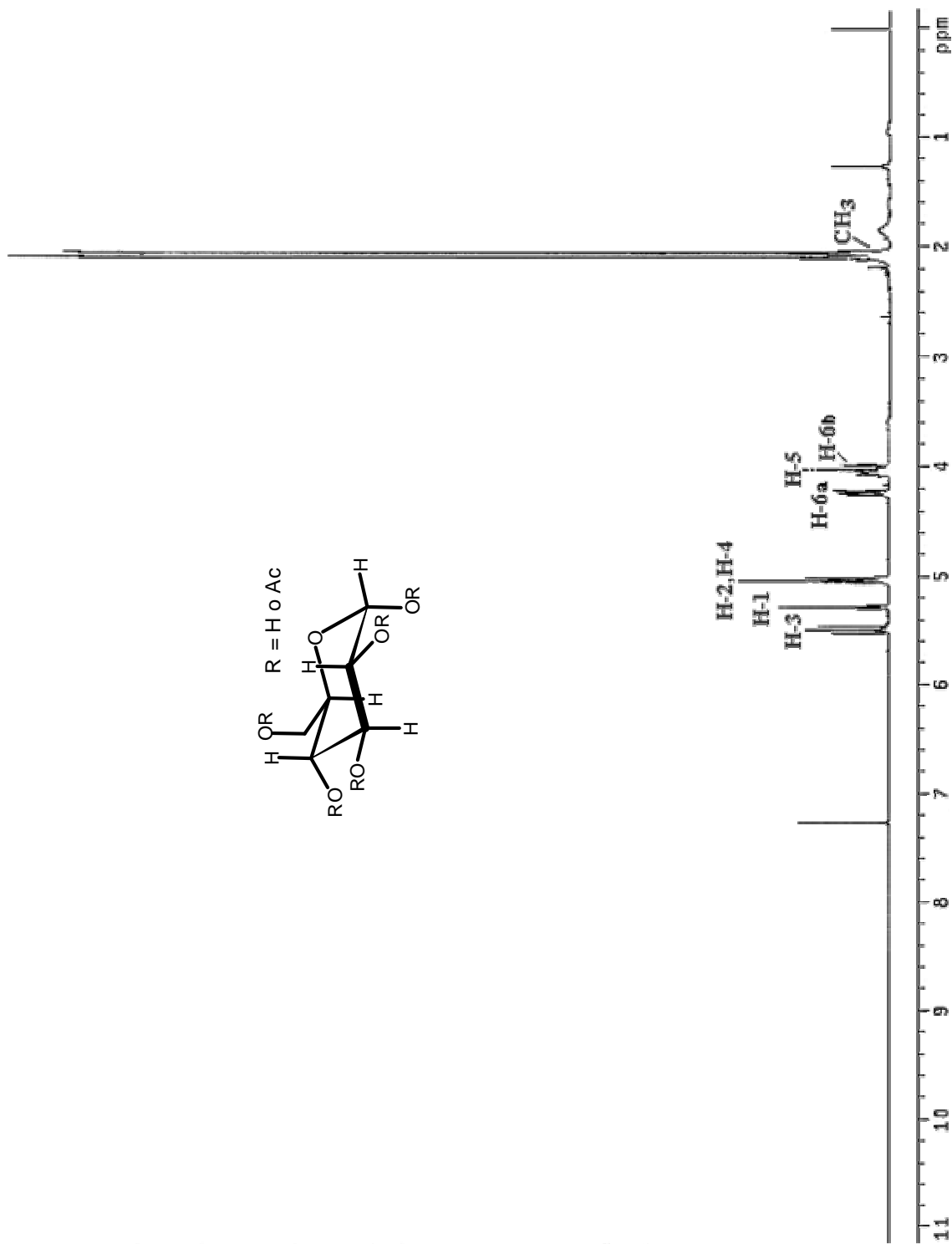
Espectro 25. Espectro de RMN ¹H modalidad NOESY1D de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona



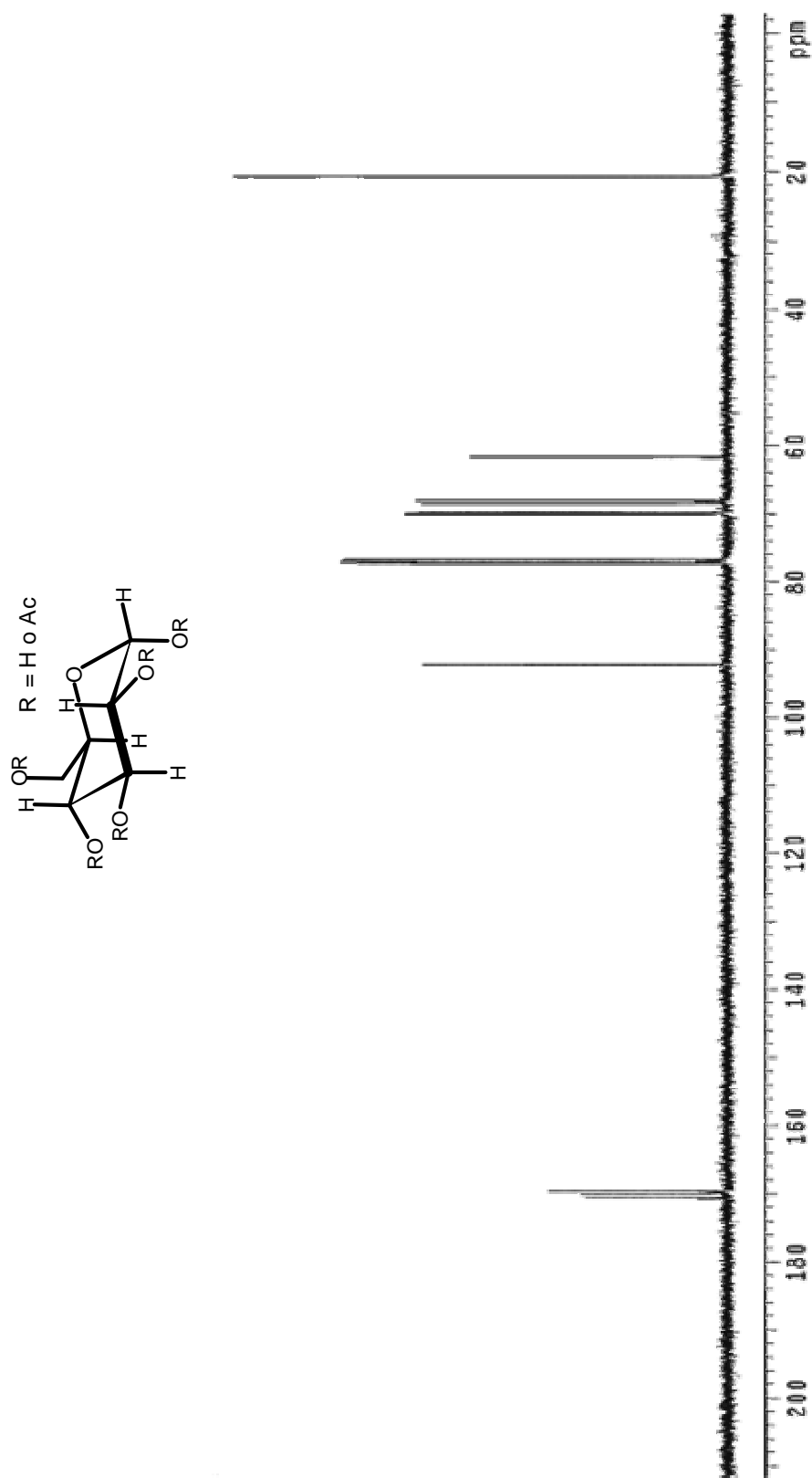
Espectro 26. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona



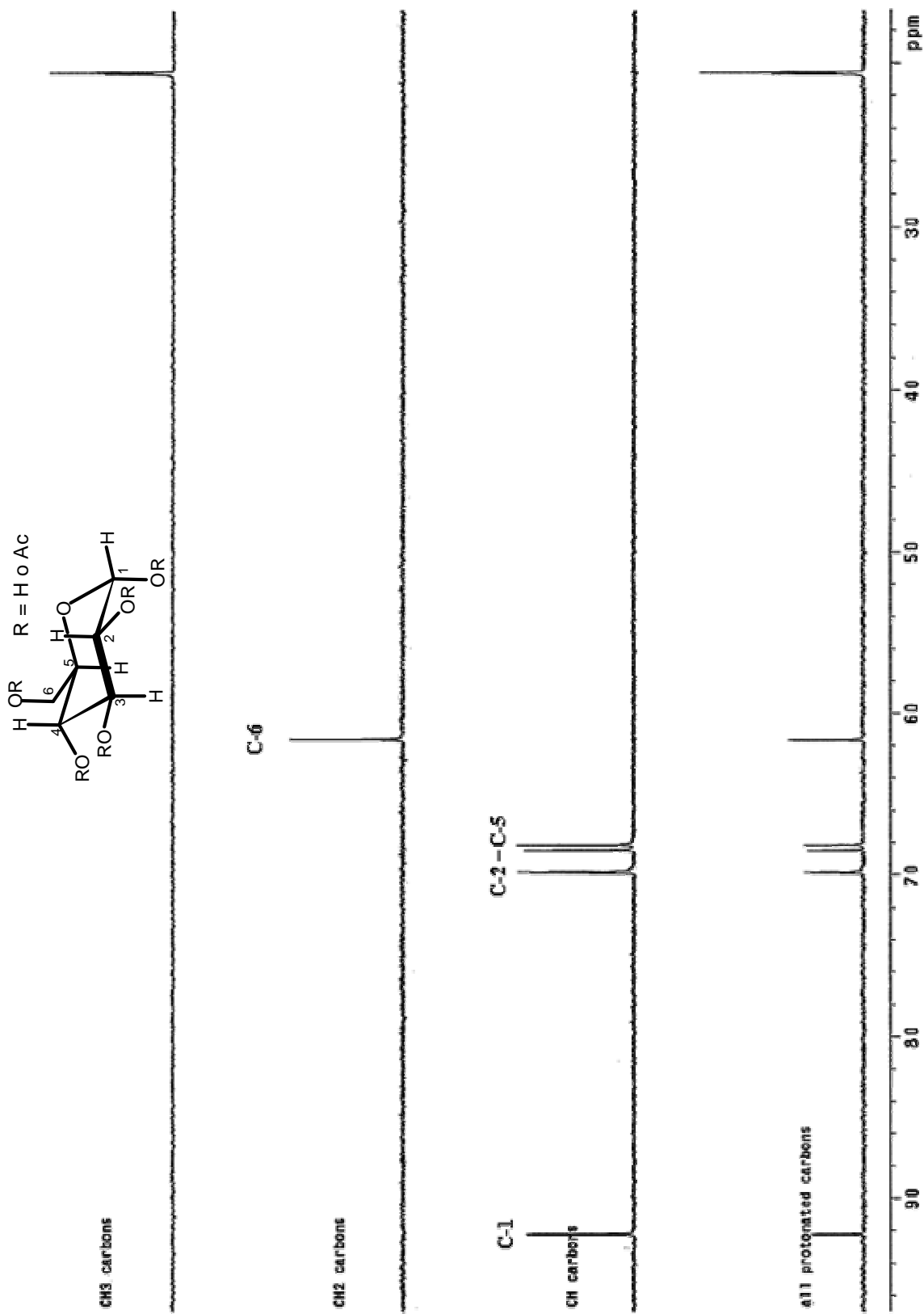
Espectro 27. Espectro de DC de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona



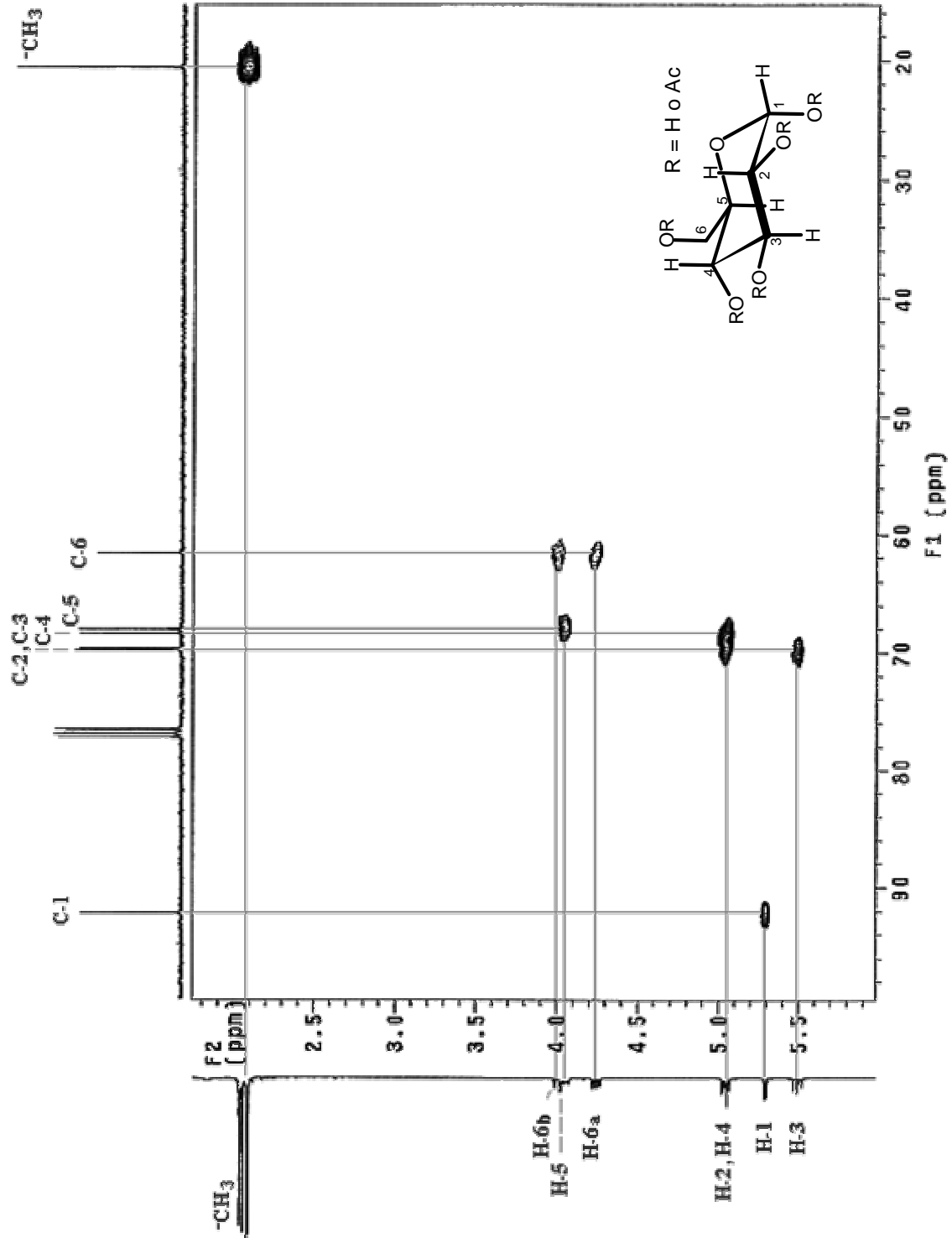
Espectro 28. Espectro de RMN ^1H de peracetil α -D-glucopiranososa



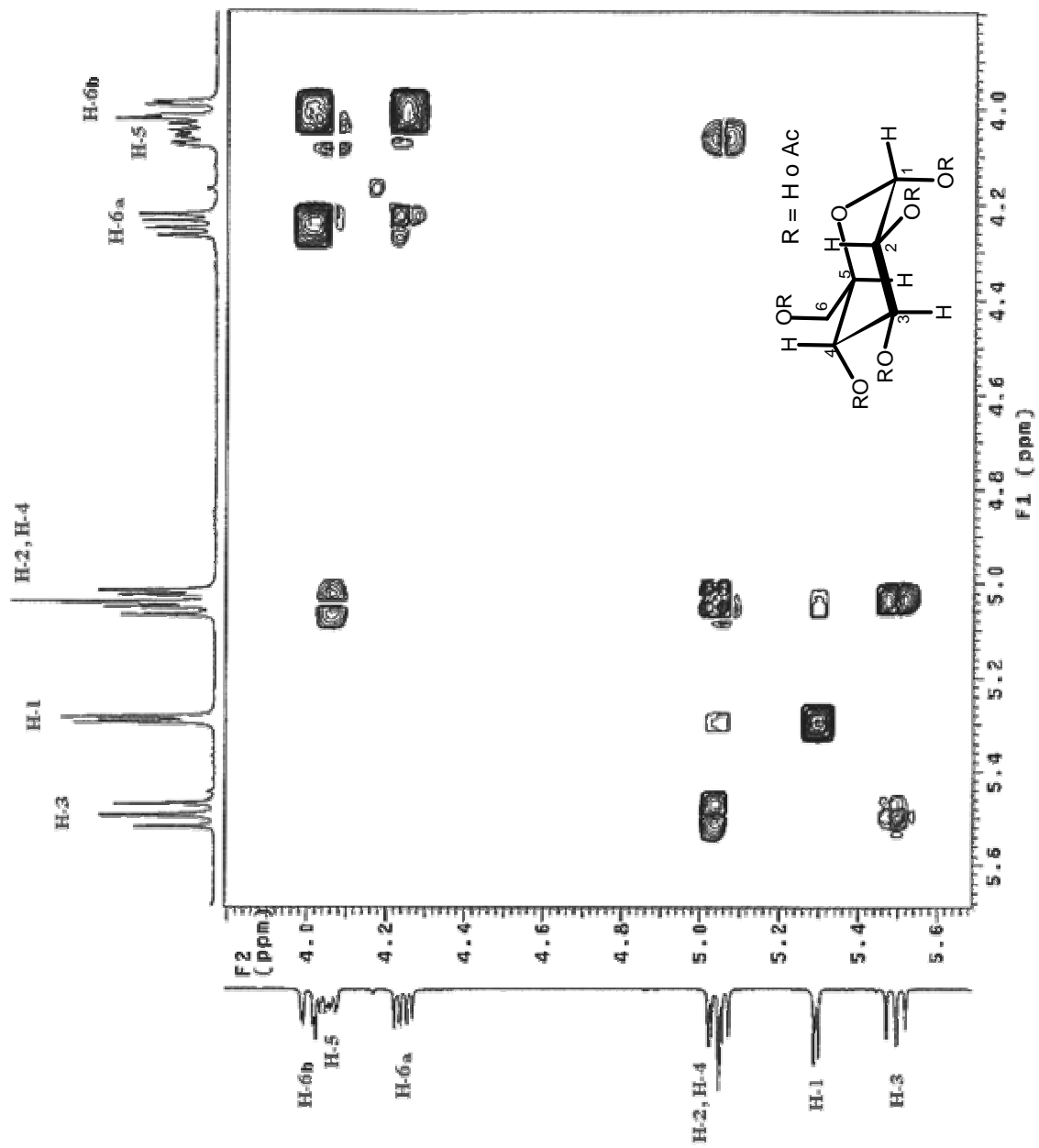
Espectro 29. Espectro de RMN ^{13}C de peracetil α -D-glucopiranososa



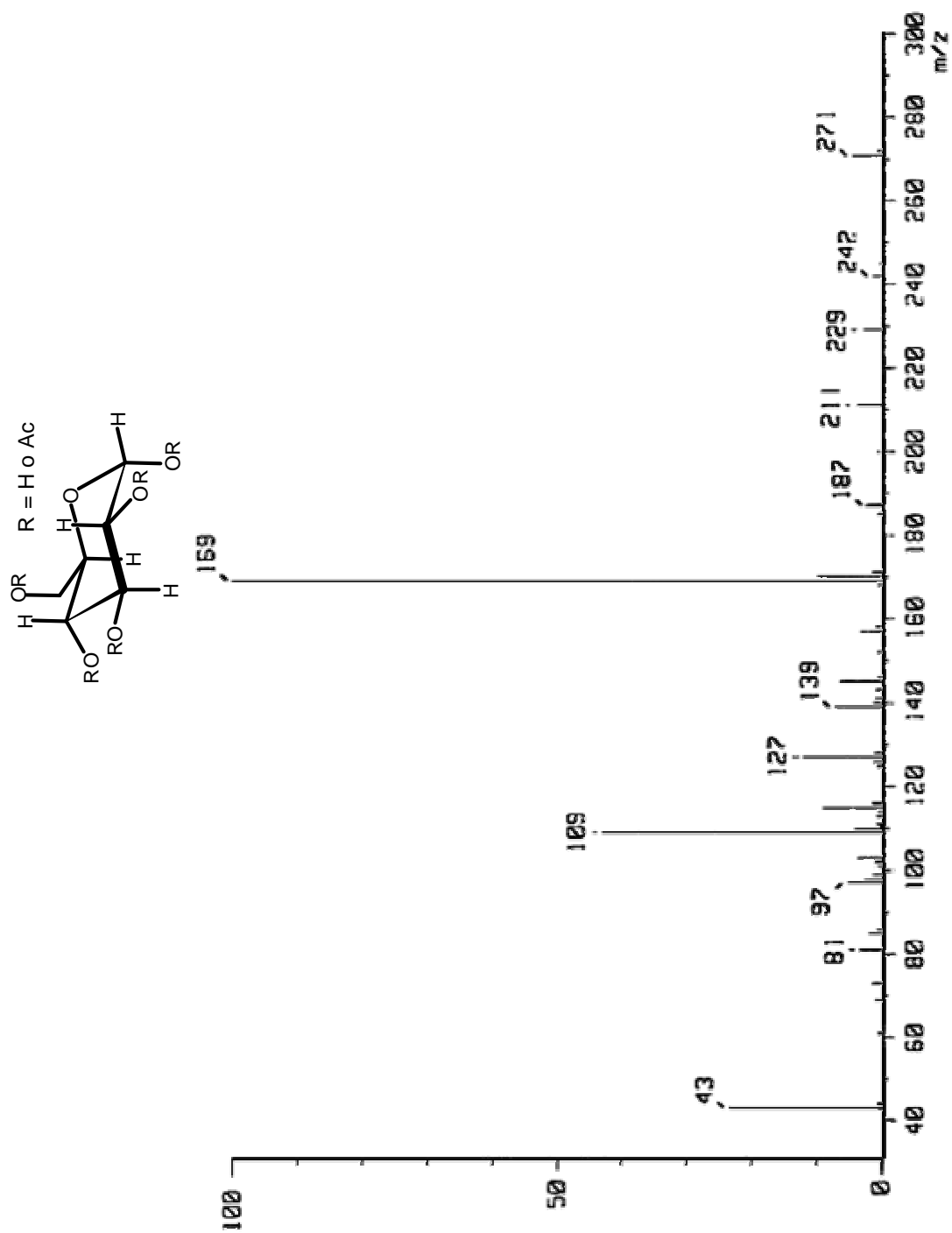
Espectro 30. Espectro de RMN ^{13}C modalidad DEPT de peracetil α -D-glucopiranososa



Espectro 31. Espectro de RMN ^1H modalidad HSQC de peracetil α -D-glucopiranososa



Espectro 32. Espectro de RMN ^1H modalidad COSY de peracetil α -D-glucopiranososa



Espectro 33. Espectro de masas modalidad IE^+ de peracetil α -D-glucopiranososa