



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA Y BÚSQUEDA DEL
BIFLAVONOIDE ROBUSTAFLAVONA EN DOS
DIFERENTES COLECTAS DE *Selaginella lepidophylla*
(*Doradilla*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANAYELI GONZÁLEZ TORRES



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Q. Alejandrina Acosta Huerta
Secretario	Dra. Isabel Del Carmen Rivero Cruz
Primer Suplente	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
Segundo Suplente	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 111, del Departamento de Farmacia, Conjunto "E", División de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, Cd. Universitaria, D.F.

ASESOR:

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SUSTENTANTE:

Anayeli González Torres

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por la oportunidad de permitirme tener un futuro mejor en el ámbito profesional, y ayudarme a crecer como ser humano.

A la Facultad de Química, por otorgarme conocimientos, experiencias, amistades y perspectivas que permiten forjar una base sólida para la superación académica y personal.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el proyecto IN217914.

Al personal académico de la USAI, por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopía y espectrometría: Rosa Isela del Villar, Minerva Monroy, Alejandrina Acosta, Georgina Duarte, Marisela Gutiérrez, Margarita Guzmán.

El trabajo experimental de esta tesis no se hubiera desarrollado sin el apoyo otorgado de las siguientes personas a quienes expreso mi gratitud:

Al M. en C. Alberto Reyes Guzmán del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM, por la asesoría para la identificación del material vegetal.

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Unidad de Integración en Sistemática Vegetal y Suelo, FES Zaragoza, UNAM por la colecta del material vegetal.

A los miembros del jurado designado por la revisión del manuscrito de tesis, por sus análisis, comentarios y observaciones.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents del departamento de farmacia de la Facultad de Química, UNAM por su asesoría en la realización de la parte experimental del proyecto así como interpretación de espectro y asesoría de la escritura y corrección del presente trabajo.

DEDICATORIAS



ÍNDICE	Paginas
Lista de abreviaturas y acrónimos	7
1 INTRODUCCIÓN	8
2 ANTECEDENTES	9
2.1 Generalidades de la familia <i>Selaginellaceae</i> y de las especies <i>S. lepidophylla</i> , <i>S. nothohybrida</i> y <i>S. ribae</i>	9
2.1.1 Características botánicas del género <i>Selaginella</i>	9
2.1.2 Características botánicas de las especies <i>S. lepidophylla</i> , <i>S. nothohybrida</i> y <i>S. ribae</i>	9
2.2 Distribución geográfica	12
2.3 Antecedentes etnobotánicos de las doradillas	12
2.4 Características químicas del género	13
2.5 Flavonoides	13
2.6 Biflavonoides	14
2.7 Robustaflavona	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos particulares	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	18
4.1 Material	18
4.1.1 Material vegetal	18
4.2 Disolventes y reactivos	18
4.3 Material de laboratorio	19
4.4 Equipo	19
4.5 Metodología	19
4.5.1 Identificación botánica	19
4.5.2 Limpieza y fragmentación	21



4.5.3 Preparación del extracto total y extractos orgánicos	21
4.5.4 Procedimiento de la acetilación del α -D-glucopiranosido del ácido cafeico	23
4.5.5 Análisis por UPLC-EM de extractos y fracciones	23
5 RESULTADOS Y DISCUSION	25
5.1 Identificación botánica de las especies	25
5.1.1 Características comunes de las tres especies	25
5.2 Análisis químico de las tres colectas de <i>S. lepidophylla</i>	27
5.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del α -D-glucopiranosido del ácido caféico (1)	31
5.2.2 Obtención y elucidación estructural del derivado peracetilado del α -D-glucopiranosido del ácido caféico (2)	32
5.2.3 Aislamiento y elucidación estructural de la amentoflavona.	33
5.2.4 Aislamiento y elucidación estructural de la robustaflavona	35
6 CONCLUSIONES	40
7 BIBLIOGRAFÍA	41
8 ANEXOS	45
IR	46
RMN	49



Lista de abreviaturas y acrónimos

Abreviatura	Significado
μm	Micra
δ	Desplazamiento químico
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCP	Cromatografía en capa preparativa
cm	Centímetro
CHCl_3	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
HPLC/MS	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución–Espectrometría de Masas
Hz	Hertz
HMBC	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear a Múltiples Enlaces
HSQC	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de Correlación Simple Cuántica
IR	Espectroscopía en el infrarrojo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ppm	Partes por millón
RMN- ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
NOESY	Espectroscopía del Efecto Nuclear Overhauser
S	Singlete
UV	Espectroscopía en el Ultravioleta



1. INTRODUCCION

En México existe un amplio comercio de plantas medicinales, y en ocasiones con baja responsabilidad por parte de los comerciantes ya que se pueden expender indistintamente diferentes especies vegetales que son muy parecidas a simple vista. Las especies en cuestión pueden tener contenidos químicos distintos, y en ocasiones los comerciantes no tienen el suficiente conocimiento botánico para poder distinguir entre las diferentes especies. El presente estudio describe a la especie de *Selaginella lepidophylla*, conocida popularmente con el nombre de “doradilla”, vegetal que se encuentra dentro de las plantas medicinales de amplio uso en nuestro país. Esta especie vegetal presenta propiedades poiquilohídricas, es decir que se encuentra en equilibrio con la humedad atmosférica; cuando se deshidratan los tallos se cierran y enrollan para formar una bola de alrededor de 10 cm de diámetro (roseta) con coloración dorada, de ahí el nombre doradilla; cuando nuevamente entra en contacto con la humedad las ramas reverdecen y se vuelven a extender. Con estas características se presentan otras especies del mismo género como *S. nothohybrida* (Valdespino) y *S. ribae*, conocidas también con el nombre de “doradilla”, y se comercializan de manera indistinta con los mismos usos medicinales. Los extractos orgánicos tanto de *S. lepidophylla* como de *S. nothohybrida* (Valdespino) han demostrado poseer actividad diurética. El biflavonoide robustaflavona es uno de los principales compuestos responsables de la actividad diurética en la especie *S. nothohybrida*, sin embargo su presencia no fue detectada por análisis de cromatografía de líquidos realizados a un ejemplar de *S. lepidophylla* en el laboratorio 111 del departamento de Farmacia, por lo que en el presente estudio se pretende comprobar la presencia de este compuesto en la especie *S. lepidophylla* (como especie de mayor comercialización) mediante su aislamiento e identificación estructural utilizando tres ejemplares de diferentes colectas. Las colectas analizadas fueron procedentes de Zacatecas, de Tlaxiaco (Oaxaca) y de Atotonilco (Hidalgo), siendo parte fundamental de este estudio la identificación botánica inambigua, la cual aseguró trabajar con la especie correcta y poder confirmar la presencia del biflavonoide.



2. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

2.1 Generalidades de la familia *Selaginellaceae* y de las especies *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. ribae*

Selaginellaceae: Es una de las tres familias que componen a la división Lycophyta, por ende son un linaje muy ancestral. Pertenece al orden Selaginellaceae, clase Lycopida y está relacionada con otras plantas vasculares como Monilophytes (helechos, Equisetum y Psilotum) y de plantas de semilla (las gimnospermas y angiospermas) (Banks, 2009). El único género *Selaginella* contiene alrededor de 700 especies, que se caracterizan por ser muy aplanadas, ramas frondosas y hojas dimórficas (microfilos) (Korall y Kenrick, 2002). Tienen un ciclo de vida heterospórico (con megasporas y microsporas). Como todas las lycophytas, posee tallo con microfilos (hojas en forma de escamas que cubren al tallo) y raíces adventicias (originadas en el vástago). Tienen estructuras denominadas lígulas, que son crecimientos en forma de escama cerca de la base de la superficie de cada microfila y esporofila. Además como en la mayoría de los miembros de la división, cada microfila tiene una única traza vascular. La mayoría se encuentra en regiones tropicales, pero se reconocen dos grandes grupos, las especies isophyllous que son en su mayoría las especies secas de los estados del Norte de México y oeste de Estados Unidos y la especie anisophyllous que representa la parte más grande del género; éstas se encuentran en gran medida en bosques tropicales y húmedos. Ochenta por ciento de las especies de selaginella se encuentran en México (Mickel, 2004). La familia incluye solo al género *Selaginella* que se encuentra distribuido en todo el mundo.

2.1.1 Características botánicas del género

2.1.2 Características botánicas de las especies *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. ribae*.

Las especies *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. ribae* comparten características morfológicas similares. En los tres casos, las plantas se aprecian visualmente como rosetas doradas en estado desecado y como rosetas extendidas verdes en estado de



hidratación. Por estas características, las tres especies comparten el nombre popular de “doradillas”, entre otras que se mencionan en los siguientes párrafos (Mickel, 2004).

S. lepidophylla

Son plantas en forma de roseta, tallos no articulados, pubescentes, verdes, miden aproximadamente de 8 a 10 cm de largo, los rizóforos se encuentran en el extremo de las ramas y miden de 0.2 a 0.5 mm; tienen dos tipos de hojas: las laterales y las medias.

Distribución: Terrestre o epipétrica entre rocas en áreas secas, pendientes rocosas, y expuestas en colinas llenas de hierba, en USA y México.

S. lepidophylla se encuentra en el grupo de las especies que incluye a *S. nothohybrida*, *S. novoleonensis*, y *S. ribae*. Su hábitat natural es el desierto de Chihuahua y debido a su capacidad para soportar largos períodos de sequía en estado desecado y revivir en las condiciones de humedad, a esta especie también se le conoce como "planta de la resurrección", "flor de piedra" y "rosa de Jericó " (Aguilar *et al.*, 2008). Por otra parte, es conocida con diversos nombres según la zona geográfica de crecimiento en la República Mexicana (Páez, 2008), como se menciona a continuación: doradilla, flor de tierra, siempre viva en el Estado de México; Jod'tnborra (pima) en Sonora; Flor de piedra, Much-k'o en Yucatán; tequequetzal, yamanquitexóchitl (náhuatl) en Morelos; texochitl, yamanquitexóchitl (flor suave que nace en la piedra) en Guerrero.

Características químicas: Dentro de los metabolitos secundarios de mayor importancia que se encuentran en esta especie son la robustaflavona, amentoflavona, 2,3-dihidro-robustaflavona, 5-éter metílico de la 2,3-dihidro-robustaflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, trimetiléter de hinoquiflavona, 5',5''-dihidroxi-7',7'',4',4'''-tetrametoxi-amentoflavona (Aguilar *et al.*, 2008; Qasim *et al.*, 1985; Setyawan, 2011).

S. nothohybrida

Planta terrestre extendida llega a medir de 9 a 15 cm de diámetro. Los tallos se encuentran formando rosetas, glabros, no articulados, no flageliformes, no estoloníferos; miden entre 9-15 cm de largo, y entre 0.5-1 mm de diámetro, de 1-4



veces ramificados con tallo central en espiral compacta, donde surgen las ramas laterales, los rizóforos ventrales se encuentran en la parte proximal media de la rama y miden de 0.2 a 0.3 mm de diámetro; las hojas son amarillas, verdes y amarillo verdoso, o marrón y café cuando están viejas. Cuenta con ramas laterales a las ramas primarias ascendentes.

Es otro miembro de la serie *Circinata Spring*, un grupo de especies que se caracteriza por la formación de roseta, por lo general como hábito y para resistir periodos de sequía.

S. ribae

Mediante la identificación botánica, con ayuda del M. en C. Alberto Reyes, se observó que existen pequeñas diferencias microscópicas entre la especie *S. ribae* y *S. lepidophylla*; así mismo como se puede observar en la Figura 1, macroscópicamente tienen diferencias menores. Los tallos se encuentran formando una roseta verde a rojizo, miden aproximadamente 18 cm de largo, 0.5 – 1 mm de diámetro, no articulados, no flageliformes, no estoloníferos, tiene de 2-3 ramificaciones, rizóforos restringidos a la base de las ramas, gruesos, miden 0.3-0.5 mm de diámetro, tiene dos tipos de hojas a lo largo del tallo; hojas laterales ascendentes, ampliamente ovaladas a ovalado-deltadas; márgenes hialinos pequeños, densamente ciliados (cilios cortos), ápices redondeados o ampliamente obtusos, hojas medias similares a las laterales. Adicionalmente, *S. ribae* tiene la cara lateral de las megaesporas equinadas (en vez de reticuladas-rugosas).



Figura 1. Fotografía de las características morfológicas macroscópicas de las especies *S. nothohybrida*, *S. lepidophylla* y *S. ribae*.



2.2 Distribución Geográfica

Según Argueta *et al.* (1994), se le puede encontrar en lugares cuyo clima sea cálido, semicálido, semiseco, templado, bosques de pino-encino, bosques rocosos húmedos. Así también la distribución conocida de *S. lepidophylla* en la República Mexicana es en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Mickel y Smith, 2004) (Fig 2).

La colecta de esta planta en el estado de Tlaxcala resultó ser un nuevo registro de la distribución de la especie en México (Lara, 2014).



Figura 2. Distribución de *S. lepidophylla* (Mikel y Valdespino, 1992)

2.3 Antecedentes etnobotánicos de las doradillas

Argueta *et al.* (1994) y Aguilar *et al.* (2008), indican que la infusión o la decocción se utiliza para el tratamiento de cálculos biliares, dolor de riñón y como diuréticos. Lara menciona que la toxicidad aguda realizada al extracto acuoso de *Selaginella nothohybrida* dio como resultado la no toxicidad para roedores; lo que comprobó el uso ancestral inocuo de esta especie recomendada para padecimientos renales (Lara, 2014).



2.4 Características químicas del género

A partir de plantas del género *Selaginella* se han aislado alrededor de 130 compuestos. Los compuestos aislados pertenecen a las clases de alcaloides, aceites, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos (cromonas, cumarinas, flavonoides, lignanos, fenilpropanoides), carbohidratos (como sacarosa y trehalosa), pigmentos, compuestos quinoides y esteroides (Menchaca, 2009, Aguilar *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2013; Adams *et al.*, 1990; Martínez, 1986)

2.5 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; sus potenciales beneficios para la salud en humanos son ampliamente documentados, tales como anti-inflamatorios, antitumorales, agentes antivirales y antioxidantes, entre otros (Zheng *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2000). Además del desarrollo de fármacos, sus aplicaciones como colorantes, materiales cosméticos y suplementos dietéticos ha dado lugar a un gran interés por la elevada producción de flavonoides a través de diversas metodologías.

A este respecto, las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los flavonoides presentes en una amplia variedad de plantas, pueden representar alternativas válidas en el tratamiento de procesos inflamatorios crónicos (Cao *et al.*, 2012). Los flavonoides se producen principalmente en las frutas, verduras, semillas, flores, cortezas y están generalmente presentes en las plantas como glicósidos (Ravishankar y Rajora, 2013; Xiao y Peng, 2008), aunque los presentes en las hojas han sido los más estudiados (Richardson, 1983). Este grupo de metanolitos, se clasifica en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonoles, flavanoles y flavanonas. La Figura 3 muestra la estructura de una flavona, caracterizada por poseer un núcleo de quince carbonos con dos anillos fenólicos, con una estructura común $C_6-C_3-C_6$. Sobre este núcleo común pueden presentar distintos sustituyentes tales como grupos fenólicos y aparecer en distintas posiciones de los anillos aromáticos. Estos grupos fenólicos pueden a su vez, estar libres o bien unidos por enlace O-glicosídico a un azúcar. En ocasiones, pueden



presentarse flavonoides con azúcares generalmente simples, unidos mediante enlace carbono-carbono (C-glicósidos) (Alston, 1968)

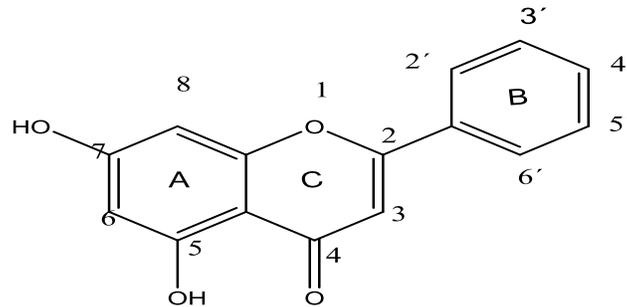


Figura 3. Estructura de una flavona.

2.6 Biflavonoides

Son moléculas polifenólicas integradas por dos unidades de flavonoide (Figura 3), las cuales pueden ser o no iguales, unidas de manera simétrica o no, por medio de un enlace C- u O- de longitud variable. Estos compuestos se encuentran en estado libre y algunas veces como O-glicósidos. Son encontrados frecuentemente en gimnospermas, pero mayoritariamente en Briofitas y Pteridofitas (Kassem *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006). La estructura general de estos compuestos es la que se muestra en la Figura 4.

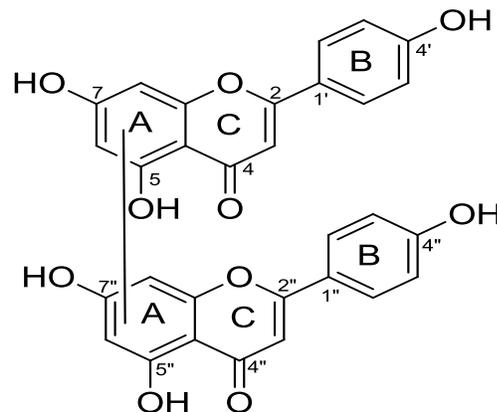
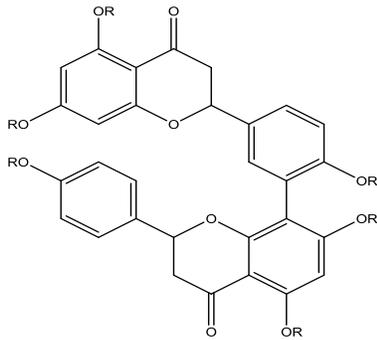
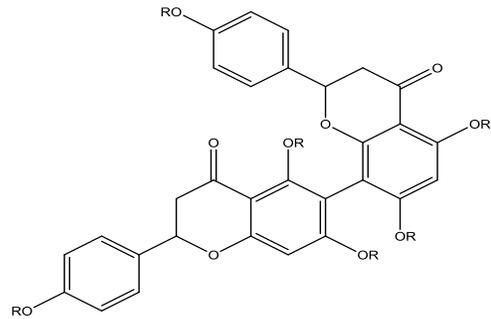


Figura 4. Estructura general de un biflavonoide.

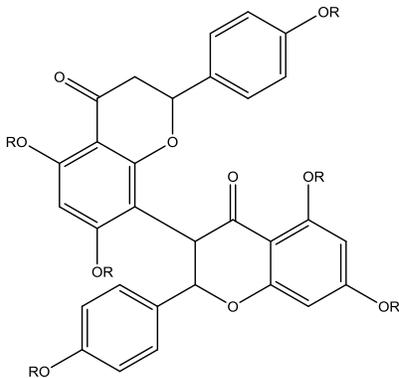
De acuerdo a la unión inter flavonoide, los biflavonoides de origen natural se clasifican en seis tipos: agatisflavona, cupresuflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, robustaflavona y garcinia. Sus estructuras se muestran en la Figura 5.



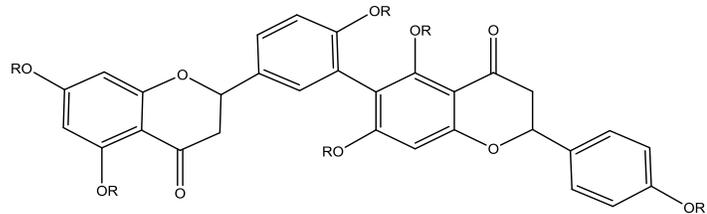
Grupo amentoflavona



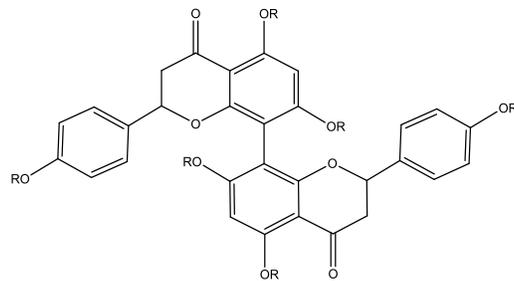
Grupo agatisflavona



Grupo garcinia



Grupo robustaflavona



Grupo cupresuflavona

Figura 5. Clasificación general de los biflavonoides



2.7 Robustaflavona

Robustaflavona, un biflavonoide de origen natural, aislado por primera vez en 1973, como el derivado *per* metilado, de extractos de hojas de *Agathis robusta*, y posteriormente en mayores cantidades del endocarpio de semillas de *Rhus succedanea*. Se le atribuyen actividades biológicas importantes tales como un agente antiviral potencial de tipo no-nucleósido contra el virus de la hepatitis B (Zembower *et al.*, 1998). Aguilar *et al* (2015) reportan su actividad diurética como parte del extracto acuoso de *Selaginella nothohybrida* y *S. lepidophylla*. A la fecha, no se ha informado la síntesis de la robustaflavona. Su estructura, está compuesta por dos unidades de flavonoide (5,7,4'-trihidroxiflavona), unidos en las posiciones C-6 y C-3 de cada unidad (Lin *et al.*, 1974b).

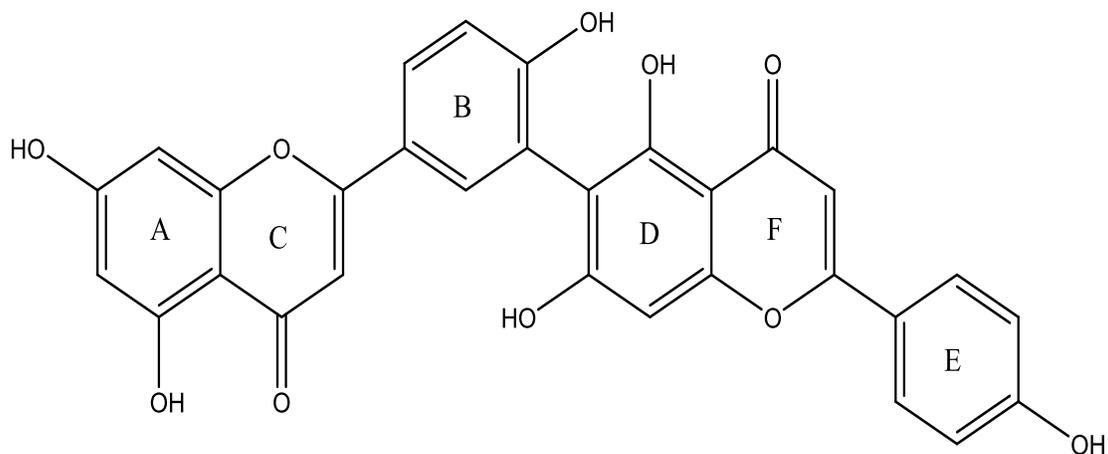


Figura 6. Estructura química de la robustaflavona



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Realizar la identificación botánica inequívoca y aislar e identificar el biflavonoide robustaflavona de tres colectas diferentes de *S. lepidophylla*

3.2 Objetivos particulares

- Obtención de las muestras vegetales de tres colectas diferentes de *S. lepidophylla*
- Confirmación de la identidad botánica de las plantas en estudio, por medio de la observación microscópica de sus partes aéreas
- Obtención de los diferentes extractos orgánicos totales
- Fraccionamiento de cada extracto total por extracción por reparto con diferentes disolventes (hexano, cloroformo y acetato de etilo)
- Fraccionamiento secundario de la fracción de acetato de etilo empleando cromatografía de exclusión en tamaño de partícula, para el aislamiento del biflavonoide robustaflavona
- Identificación por métodos espectroscópicos (UV, IR, resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C)) y espectrométricos (espectrometría de masas).



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material

4.1.1 Material vegetal

Se obtuvieron tres colectas de *Selaginella lepidophylla*, la primera procedente de Zacatecas (1217 RRG), la segunda de Tlaxiaco Oaxaca (1114RRG) y la tercera procedente de los Reyes (Atotonilco el grande, Hidalgo). Las colectas estuvieron a cargo del M. en C. Ramiro Ríos Gómez de la Unidad de Investigación en Sistemática Vegetal y Suelo FES Zaragoza, UNAM y la identificación botánica se llevó a cabo con la asesoría del M. en C. Alberto Reyes García del Herbario del Instituto de Biología de la UNAM

4.2 Disolventes y reactivos

Disolventes

*Cloroformo grado QP

*Hexano grado QP

*Metanol grado QP

*Acetato de etilo grado QP

*Acetona grado QP

*Diclorometano grado QP

Todos los disolventes fueron purificados por destilación previo a su uso

Reactivos

*Solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico 2N.

*Sephadex lipofílico LH-20, tamaño de partícula 20-100 μm



Los análisis cromatográficos cualitativos en capa delgada (CCD) se realizaron en placas de aluminio de 0.2 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Macherey-Nagel)

4.3 Material de laboratorio

Matraces bola con boca esmerilada de 24/40 (5000, 1000, 500, 250 mL); matraces Erlenmeyer (1000, 500, 250, 125 mL); embudos de vidrio, columnas de vidrio, soporte universal, frascos vial, probeta (250, 100, 50 mL); pipetas graduadas (10, 5 y 1 mL) y pipetas Pasteur.

4.4 Equipo

Para concentrar al vacío los extractos obtenidos se utilizaron rota evaporadores marca Büchi 460 y B-480. Las pesadas de los reactivos y la materia prima se hicieron en una balanza analítica marca Ohaus y una granataria marca Ohaus Scout-pro.

El análisis (HPLC/MS), se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos marca Agilent Technologies modelo serie 1200 con detector de masas de triple cuadrupolo por la técnica de ionización por ESI en modo positivo modelo 6410. La fragmentación del material vegetal se realizó con un molino de martillos IKA modelo MF- 10 B S1. Los análisis microscópicos se realizaron en un microscopio biológico CX31 marca Olympus con objetivos 4X, 10X y 40X.

4.5 Metodología

4.5.1 Identificación botánica:

La identificación botánica de las plantas “doradillas” empleadas en este trabajo (*S. lepidophylla* y *S. nothohybrida*) se realizó del siguiente modo.

- A) Observación de las características macroscópicas de la planta seca para identificar la forma de roseta y el color de la superficie de las hojas.
- B) Observación microscópica para la identificación precisa de las especies *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. ribae* y para confirmar la identidad de



S. lepidophylla, para ello las características principales se describen en la Tabla 1. La observación microscópica se llevó a cabo mediante el empleo de un microscopio biológico.

Tabla 1. Características macro y microscópicas de las doradillas

Características	<i>S. nothohybrida</i>	<i>S. lepidophylla</i>	<i>S. ribae</i>
Hojas	Medias con márgenes con cilios cortos	Medias con márgenes serrados (dientes agudos, cortos)	Medias con márgenes serrados (dientes agudos) muy cortos
Ápices de las hojas	Largo	Corto	Muy corto
Hojas axiales	Lanceoladas a ovaladas – lanceoladas	Ampliamente ovaladas a ovaladas - dentadas	Ampliamente ovaladas a ovaladas – dentadas
Base de las hojas	Usualmente curvadas con dos cordadas ciliadas	Redonda y con aurículas	Más redonda y con aurículas
Color de la superficie de la hoja	De verde amarillento, amarillo-marrón o marrón nunca rojo	Al menos una superficie es rojo vino o marrón rojizo	Al menos una superficie es rojo vino o marrón rojizo
Margen de las hojas	Margen hialino más amplio	A lo largo tiene células acroscópicas	A lo largo tiene células acroscópicas (más corto)
Tamaño de las hojas	Laterales y medias diferentes en tamaño y forma	Laterales y medias similares en tamaño y forma	Laterales y medias similares en tamaño y forma
Tallo de las ramas	Pubescente a velutinoso por encima de los cabellos conspicuos	Pubescente a velutinoso por encima de los cabellos conspicuos	Pubescente a velutinoso por encima de los cabellos conspicuo



Se seleccionó la colecta correspondiente a la especie *S. lepidophylla* de acuerdo a las características macro y microscópicas observadas y mencionadas en la Tabla 1.

4.5.2 Limpieza y Fragmentación

Para el estudio de una planta medicinal es importante un proceso de control de calidad el cual implica la limpieza de la planta para lo cual fue necesario eliminar restos de otras plantas, tierra contenida en la misma además de cualquier otro tipo de material extraño. Posteriormente, el material vegetal se fragmentó haciendo uso de un molino de martillos.

4.5.3 Preparación del extracto total y fraccionamiento en extractos orgánicos

Se extrajo cada una de las colectas de la especie de estudio por maceración exhaustiva por períodos de 24 h, empleando una mezcla de disolventes [CHCl_3 :MeOH(1:1)] repitiendo el proceso hasta que el color verde de la solución fue casi nulo.

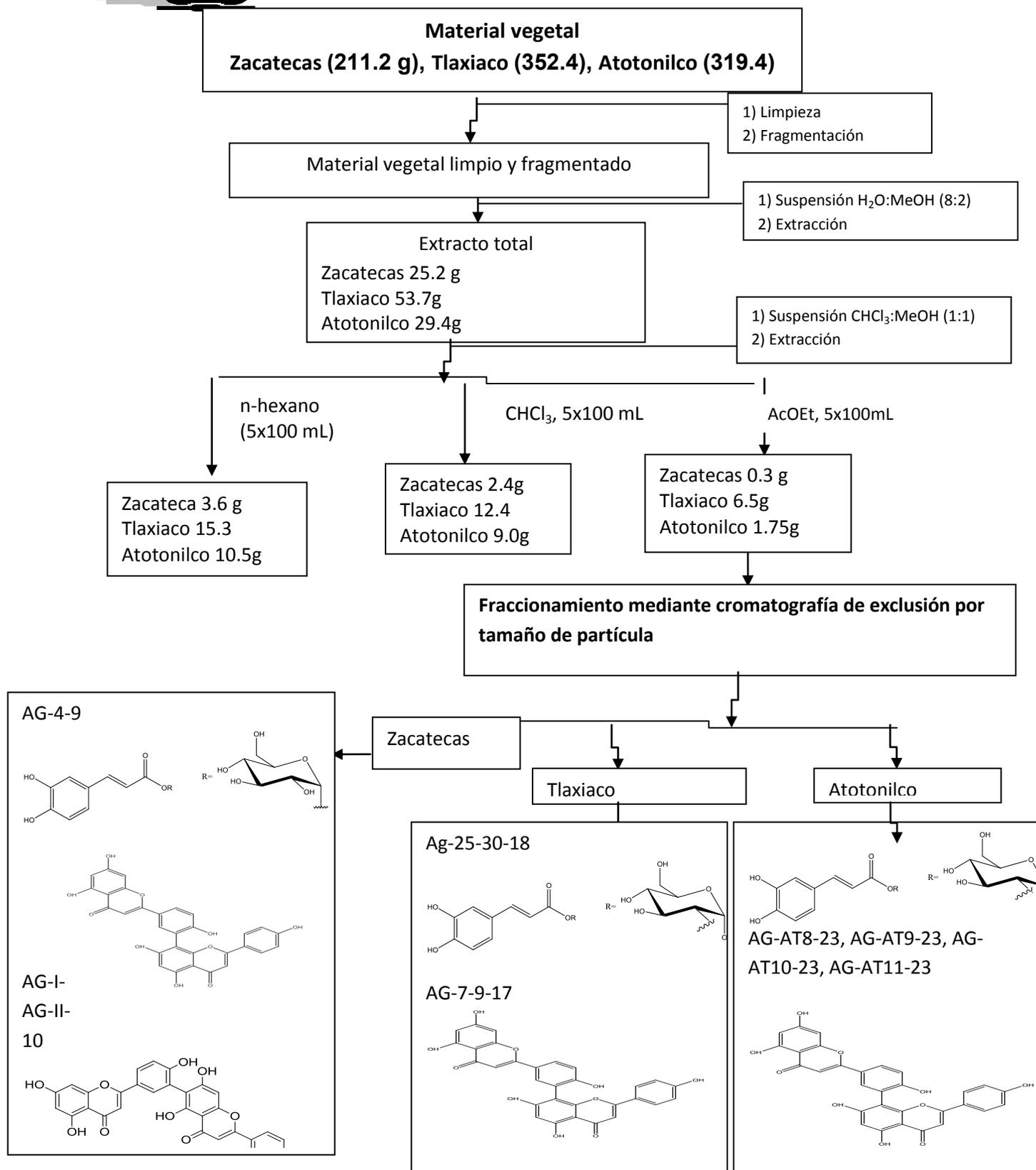
El producto de extracción fue llevado a sequedad, obteniéndose un residuo verde oscuro. El peso del extracto obtenido de cada colecta se indica en el Esquema 1.

El extracto orgánico total obtenido de cada colecta, se resuspendió en una mezcla de H_2O :MeOH (8:2) y se sometió a un fraccionamiento por reparto líquido-líquido, por separado con hexano, cloroformo y acetato de etilo como se ilustra en el Esquema 1.

Cada una de las fracciones obtenidas se analizó por CCD, observando que los compuestos de interés se encontraban en la fracción de acetato de etilo el cual se fraccionó en sus componentes por cromatografía en columna por exclusión de tamaño de partícula. La elución se hizo con metanol (eluatados de 100 mL).



PARTE EXPERIMENTAL



Esquema 1. Procedimiento general para el análisis de las colectas de *S. lepidophylla* (Zacatecas, Tlaxiaco y Atotonilco).



En las primeras fracciones de la columna con Sephadex (fracciones 3 y 4) precipitó un sólido pardo que fue posteriormente purificado mediante lavados sucesivos con acetona y CHCl_3 y por CCD de gel de sílice utilizando un sistema de elución con CHCl_3 -MeOH de polaridad creciente y fue identificado como el 1-[(*E*)-3(3,4-hidroxifenil)-2-propenoato de α -D-glucopiranosido (α -D-glucopiranosido del ácido caféico) (Esquema 1).

De las tres colectas se separó un sólido amarillo entre las fracciones 7 a 10 de la columna de Sephadex (R_f 's 0.5-0.8 en un sistema CHCl_3 / MeOH 95:5) correspondiente a los biflavonoides amentoflavona y robustaflavona que se presentan en el Esquema 1 y se describen más adelante.

La identificación estructural de todos los compuestos aislados se llevó a cabo por métodos espectroscópicos de UV, IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , y por otra parte, la determinación de los compuestos contenidos tanto en el extracto total como en las fracciones cromatográficas se visualizó por CLAE acoplada a un espectrómetro de masas.

4.5.4 Procedimiento de la acetilación del α -D-glucopiranosido del ácido caféico

La acetilación del compuesto se llevó a cabo realizando la siguiente metodología: 50 mg del compuesto se trataron con 0.5 mL de anhídrido acético y 0.15 mL de piridina, con agitación magnética y a temperatura constante durante 24 horas. Al cabo del tiempo se añadieron 2.5 g de agua/hielo y se aciduló con HCl al 10%. Se extrajo con tres porciones de 15 mL cada una de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con tres porciones de 5 mL de la solución saturada de NaHCO_3 y finalmente el producto se secó con Na_2SO_4 anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los compuestos acetilados.

4.5.5 Análisis por UPLC-EM de extractos y fracciones.

El análisis de cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC/MS), se realizó en un Espectrómetro de Masas Modelo Synapt GS-2 Marca WATERS, con tiempo de vuelo, acoplado con un Cromatógrafo de Líquidos Modelo ACQUITY, Marca WATERS. Los análisis para obtención del perfil fitoquímico se realizaron con una columna ACQUITY UPLC BEH, fase reversa C_{18} , tamaño de



partícula 1.7 μm , dimensiones: 2.1 X 100 μm . El volumen de inyección en todos los casos fue de 3 μL previamente filtrados en una membrana de 0.45 micras. La elución se realizó utilizando un sistema isocrático 60 A: 40B a un flujo de 0.3 mL/min; la fase móvil consistió de una mezcla binaria de agua MillQ (0.1% HCOOH; A) y CH₃CN (0.1% HCOOH;B). El método de ionización fue por electrospray por el mecanismo de protonación empleando las siguientes condiciones: temperatura de la cámara de ionización 100°C, voltaje del capilar 3.00 kV, analizador de tiempo de vuelo, detección de iones positivos y resolución 20,000.

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



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio está enfocado en la confirmación de la presencia de robustaflavona en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* mediante su aislamiento, identificación o detección en tres colectas de la planta. La primera parte del análisis consistió en la identificación botánica de las especies la cual fue fundamental para asegurar el trabajo con la especie adecuada. Posteriormente se realizó el análisis químico de las tres colectas, buscando primordialmente la presencia del biflavonoide robustaflavona y por último, se analizó un compuesto adicional no aislado con anterioridad en la especie en estudio: el α -D-glucopiranosido del ácido caféico.

5.1 Identificación botánica de las especies

La identificación botánica inequívoca como se mencionó anteriormente fue fundamental debido a que existen otras dos especies con características morfológicas muy similares, tal es el caso de *S. nothohybrida* y *S. ribae* que inclusive se expenden comercialmente de manera indistinta y para el mismo uso medicinal.

5.1.1 Características comunes de las tres especies

Los resultados de la observación microscópica de las características de las colectas seleccionadas fueron los siguientes:

- 1) Base de las hojas laterales: redondeada o biauriculada
- 2) Tallo de las ramas: pubescente o glabro
- 3) Color de la superficie de las hojas viejas: rojo vino, marrón-rojizo, de verde a amarillento, o marrón amarillento y presenta una banda de células acroscópicas cerca del margen o frecuentemente a lo largo.
- 4) Margen de las hojas: verde ampliamente hialino, cilios largos a cortos y fimbriante o dentado



Para la identificación botánica correcta se hizo especial énfasis en observar tanto las características comunes entre las diferentes especies de *Selaginella*, como las que las distinguen tanto macroscópica como microscópicamente. Las características observadas se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 7, que sirvieron como base para la selección entre ocho especies, las de Zacatecas, Tlaxiaco y Atotonilco.

Tabla 2. Características que diferencian a *S. lepidophylla*, *S. nothohybrida* y *S. ribae*

Características	<i>S. nothohybrida</i>	<i>S. lepidophylla</i>	<i>S. ribae</i>
Color de la superficie de la hoja	De verde amarillento, amarillo-marrón o marrón nunca rojo	Al menos una superficie es rojo vino o marrón rojizo	Al menos una superficie es rojo vino o marrón rojizo
Hojas	Medias con márgenes con cilios cortos	Medias con márgenes serrados (dientes agudos cortos)	anchas con márgenes serrados (dientes agudos muy cortos)
Ápices de las hojas	Largo	Corto	Muy corto
Margen de las hojas	Margen hialino más amplio	A lo largo tiene células acroscópicas	A lo largo tiene células acroscópicas (más corto)
Color al microscopio	Verde y amarillos verdoso	Verde con agrupaciones de pigmento rojo intenso	Verde y color marrón

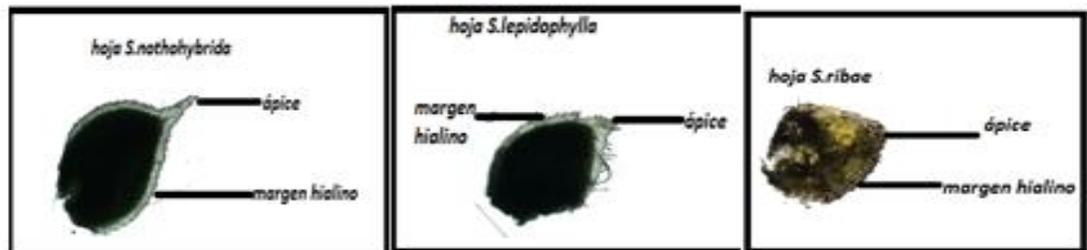


Figura 7 . Características morfológicas microscópicas de las especies *S. nothohybrida*, *S. lepidophylla* y *S. ribae*



5.2 Análisis químico de las tres colectas de *S. lepidophylla*

El Esquema 1 resume el procedimiento general para el análisis del contenido químico de las tres colectas.

5.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del α -D-glucopiranosido del ácido caféico (1).

El aislamiento de esta molécula se realizó en las primeras fracciones (2 a 5 en colecta de Zacatecas y 25 a 30 de Tlaxiaco) de la columna de Sephadex (LH-20) aislándose como un precipitado blanco el cual fue identificado por las características siguientes:

Rf de 0.3 en un sistema CHCl_3 -MeOH (95:5), visible al UV y al revelar con sulfato cérico-amoniaco como agente cromógeno. Las características espectroscópicas del compuesto (**1 Figura 10**) se resumen en las Tablas 3 y 4 .

La presencia de grupos cromofóricos importantes en este compuesto se determinó por su gran absorción a la luz ultravioleta visualizada en las longitudes de onda de 254 y 325 nm. Otros aspectos importantes para la elucidación de su estructura son los siguientes:

1. El espectro en el IR (ANEXO 1) mostró bandas de absorción para grupos oxhidrilo en 3321 cm^{-1} ; en 1693 cm^{-1} para un grupo carbonilo α,β -insaturado y en 2926 para carbono-hidrógeno saturado y dobles enlaces en 1598 , 1514 y 1446 y vibraciones para C-O en 1260 y 1021 cm^{-1} .
2. El espectro de RMN- ^1H (ANEXO 4) mostró un grupo de señales de δ_{H} 3.53 a 5.45 para 7 hidrógenos alifáticos en carbonos base de oxígeno correspondientes a 5 metinos y un metileno, observados en el espectro de carbono-13 (ANEXO 5), en su modalidad HSQC (ANEXO 8); estas señales se asignaron a un azúcar de seis miembros de tipo glucopiranososa.
3. Dos señales en el espectro de RMN- ^1H que se observan como un doblete en δ_{H} 5.28, asignado a un hidrógeno anomérico orientado en posición β de acuerdo a la constante



de acoplamiento de 3.7 Hz. Por otra parte, el hidrógeno de uno de los metinos se observó como una señal doble de dobles en δ_H 4.76, desplazada a campo bajo (por la presencia de un sustituyente de tipo oxicarbonilo en esa posición), asignado a H-2', de acuerdo a su correlación con H-1' en el espectro COSY (ANEXO 6).

3. En δ_H 4.01 se observa un doblete de dobles que integró para un protón asignado al hidrógeno 3' de acuerdo a su correlación con H-2' en el espectro COSY.

4. En δ_H 3.8 se observó un multiplete que integra para un protón asignado a H-5' de acuerdo a su correlación con H-4' en el espectro COSY.

5. En δ_H 3.52 a 3.65 se observó una señal múltiple asignada a los hidrógenos H-4' y H-6' de acuerdo a las correlaciones observadas en el espectro COSY.

6. En δ_H 6.35 y 7.63 se observaron dos pares de dobletes (que integraron cada uno para un hidrógeno) asignados a dos hidrógenos vinílicos en disposición *trans* de acuerdo a la constante de acoplamiento de 15.9 Hz. Por el desplazamiento a campo bajo con respecto al otro doblete, la señal en δ_H 7.63 debe corresponder a un hidrógeno vinílico conjugado a un carboxilo, mismo que se evidenció en el espectro IR.

7. En δ_H 7.10 (doblete, $J = 2.4$ Hz), 7.0 (doblete de dobles, $J = 8.2, 2.3$ Hz) y 6.80 ppm (doblete, $J = 8.2$) se observaron tres grupos de señales de un sistema ABX asignadas a un anillo bencénico trisustituido con dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 4, unido en la posición 1 a la β de un grupo propenoato.

La estructura propuesta para este compuesto fue la del α -D-glucopiranosido del ácido caféico (**1 Figura 10**) la cual fue confirmada mediante la obtención de su derivado peracetilado (**2 Figura. 11**). Como se indicó en párrafos anteriores, la unión del propenoato se estableció en el carbono número 2 del azúcar, de acuerdo al desplazamiento a campo bajo de su hidrógeno (δ_H 4.77). Todas las asignaciones para las señales de los carbonos e hidrógenos de la molécula fueron confirmadas por las correlaciones observadas en el espectro HMBC (ANEXO 7) y se muestran en la Figura 9.

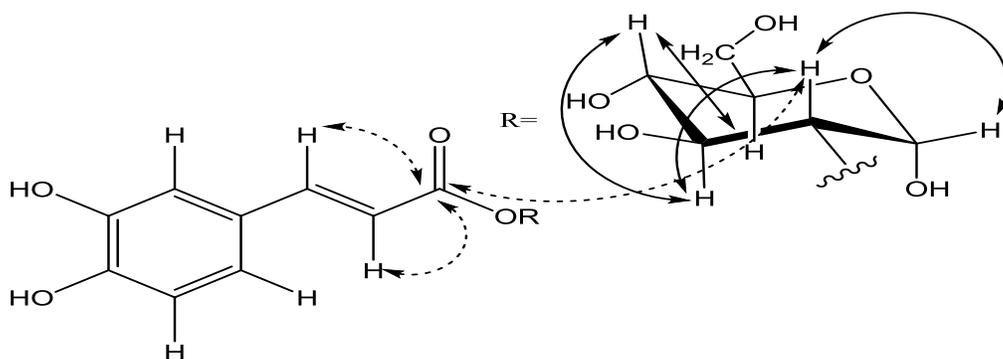


Figura 9. Correlaciones HMBC para las señales de los carbonos e hidrógenos en el α -D-glucopiranosido del ácido cafeico.

Figura 10. Estructura del compuesto 1 α -D-glicopiranosido del ácido cafeico

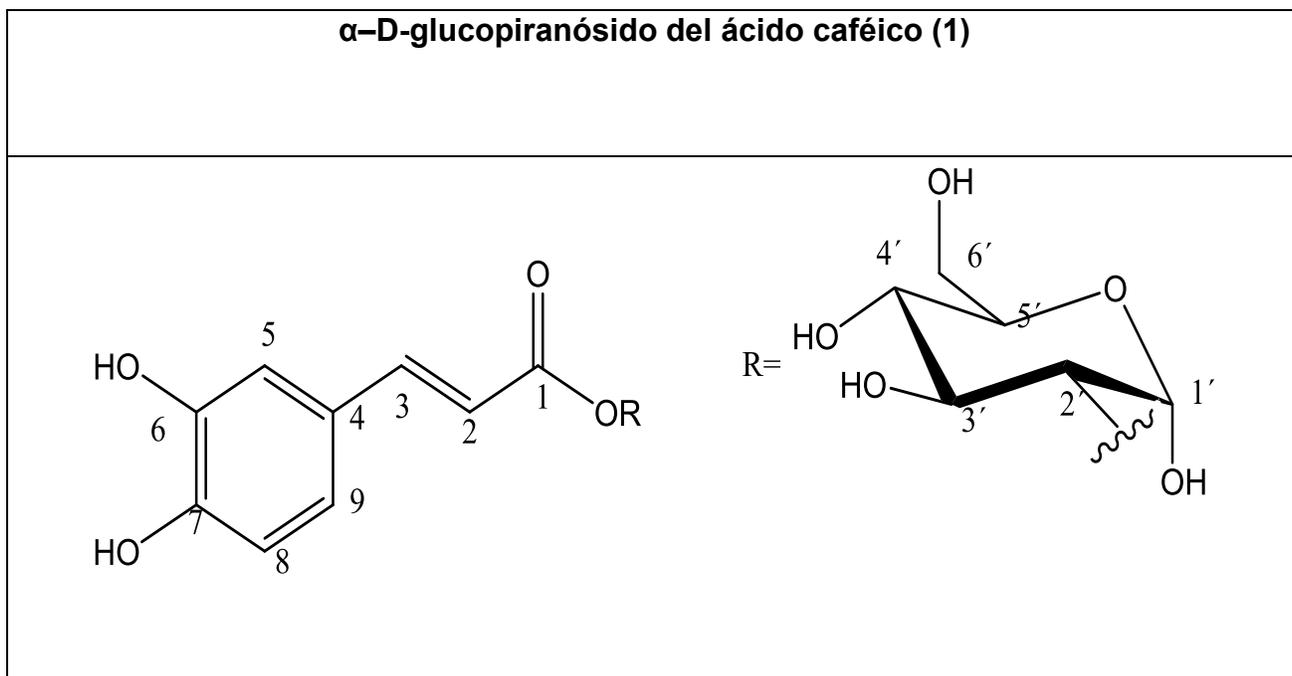




Tabla 3 Constantes de acoplamiento de H¹ de α-D-glucopiranosido del ácido caféico (1)

Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
H-2	7.63(1H)	d, J=16.3
H-3	6.35 (1H)	d, J=15.9
H-5	7.10 (1H)	d, J=2.4
H-8	6.80 (1H)	d, J=8.2
H-9	7.00 (1H)	dd, J=8.2, 2.3
H-1'	5.45 (1H)	d, J=3.76
H-2'	4.76 (1H)	dd, J=10.12, 3.6
H-3'	4.01 (1H)	dd, J=10.1, 9.1
H-4'	Multiplete(3.65)	-----
H-5'	3.80 (1H)	dd, J=10.3, 9.9
H-6'a	3.53 (1H)	dd, J=12.16
H-6'b	3.53 (1H)	dd, J=12.2, 2.44

Tabla 4 Constantes de acoplamiento de C¹³ de α-D-glucopiranosido del ácido caféico (1)

#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
1	167.13	1'	93.35
2	146.17	2'	72.96
3	113.03	3'	70.87
4	126.37	4'	72.32
5	113.83	5'	69.20
6	148.16	6'	60.00
7	144.41		
8	115.09		
9	121.95		



5.2.2 Obtención y elucidación estructural del derivado peracetilado del α -D-glucopiranosido del ácido caféico (2).

El compuesto **1** se hizo reaccionar con anhídrido acético y piridina con agitación por una noche y después de procesar la mezcla de reacción se obtuvo un sólido blanco que fue caracterizado como el α -D-glucopiranosido del ácido caféico (**2**) del modo siguiente.

1. El espectro de RMN- ^1H (ANEXO 9) mostró señales de δ 3.89 a 4.02 para 6 hidrógenos alifáticos en carbonos base de oxígeno: 5 metinos y un metileno, también se observaron señales para un metino en forma de doblete en 5.45 ppm con constante de acoplamiento de 3.8 Hz asignado al hidrógeno anomérico de una piranosa. Las asignaciones para cada uno de los hidrógenos del azúcar se hicieron con base en las correlaciones observadas en el espectro COSY (ANEXO 11) y comparando las señales mencionadas en el punto 2 todas están desplazadas a campo más bajo con respecto al compuesto acetilado (**1**Figura 10).

2. En δ_{H} 7.72 y 6.41 se observaron dos pares de dobletes (que integraron cada uno para un hidrógeno), que fueron asignados a los hidrógenos vinílicos en disposición *trans*, de acuerdo a la constante de acoplamiento (16 Hz); asimismo, una de las señales está acoplada a un grupo carboxilo (por su desplazamiento a campo bajo en δ_{H} 7.72), parte de un residuo de propenoato.

3. En δ_{H} 7.475 (doblete, $J = 1.88$), 7.477 ppm (doblete, $J = 1.96$ Hz) y 7.50 ppm (doble de dobles, $J=8.4$ y 2.1 Hz) se presentan tres grupos de señales que representan a un sistema ABX de un anillo bencénico, estableciendo los hidrógenos 9, 5 y 8 respectivamente (Tablas 5 y 6). Este residuo bencénico está unido en la posición 1 a la 3 del propenoato, como se estableció por las correlaciones obtenidas en el espectro HMBC (ANEXO 13).

4. La unión del propenoato se estableció en la posición 2 del azúcar por medio de las correlaciones observadas en el espectro HMBC (ANEXO 13).



Este compuesto contiene 15 carbonos que se encuentran en la región entre δ_H 61.51 a 165 ppm, encontrándose el carbono anomérico en δ_H 90.7, desplazado a campo alto con respecto al compuesto no acetilado.

Figura. 11 Estructura del Peracetil derivado de α -D-glicopiranosido del ácido cafeico (2)

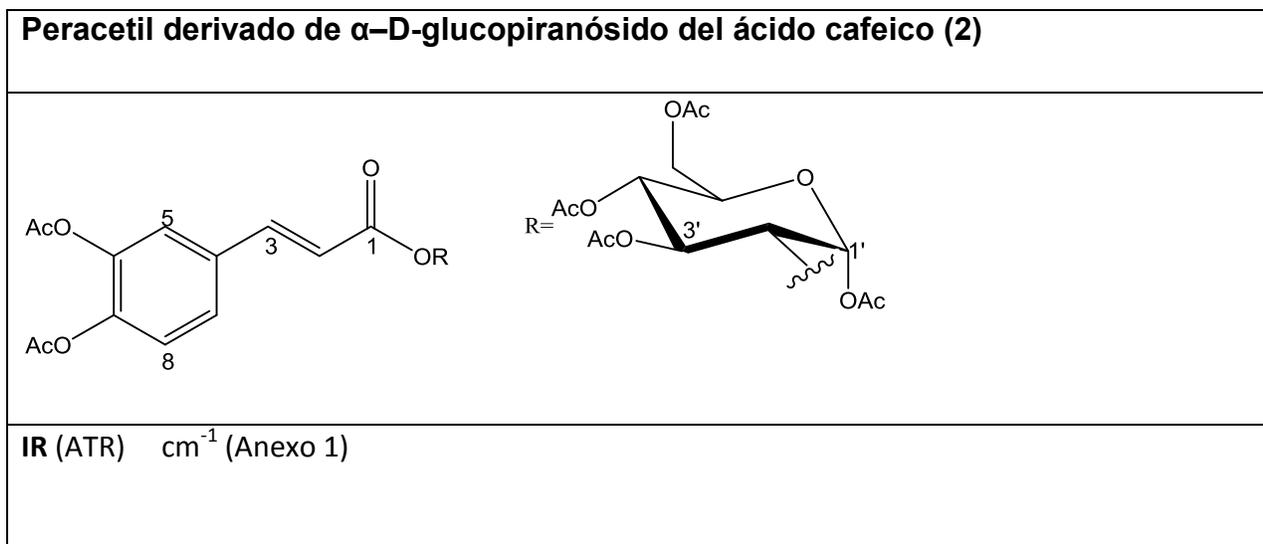


Tabla 5 Constantes de acoplamiento de H^1 del peracetil derivado α -D-glicopiranosido del ácido caféico (2)

Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
H-2	7.72 (1H)	d, $J=16$
H-3	6.41 (1H)	d, $J=16$
H-5	7.47 (1H)	d, $J=2$
H-8	7.24 (1H)	d, $J=8.3$
H-9	7.50 (1H)	dd, $J=8.4,2.1$
H-1'	5.45 (1H)	d, $J=3.92$
H-2'	5.09 (1H)	dd, $J=10.32,3.9$
H-3'	5,62 (1H)	dd, $J=9.8,9.7$
H-4'	5.01 (1H)	dd, $J=9.9,10.28$
H-5'	3.89 (1H)	ddd, $J=10.32,5.48,2.44$
H-6'a	4.02(1H)	dd, $J=5.48,12.36$
H-6'b		dd, $J=2.44,12.28$



Tabla.6 Constantes de acoplamiento de C^{13} del peracetil derivado α -D-glucopiranosido del ácido caféico (2)

#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
1	165.0	1'	90.71
2	117.38	2'	70.28
3	145.07	3'	69.77
4	132.66	4'	68.24
5	123.29	5'	68.29
6	142.65	6'	61.51
7	144.16		
8	124.11		
9	126.82		

5.2.3 Aislamiento y elucidación estructural de amentoflavona (3).

El aislamiento de esta molécula se llevó a cabo en las fracciones F7 a F9 de la columna de Sephadex (Esquema 1) como un sólido amarillo el cual fue identificado como amentoflavona por comparación de su R_f (0.53) en CCD con la de una muestra de referencia obtenida con anterioridad en el laboratorio y también por comparación de sus características espectroscópicas, mismas que se enlistan a continuación:

1. El espectro en el IR (ANEXO 2) mostró señales en 3087, 1650, 1602, 1563, 1488, 1351, 1240 y 1160 cm^{-1} correspondientes a vibraciones para grupos hidroxilo, carbonilo α,β -insaturado, C-C aromático y C-O.
2. La evidencia de que este compuesto es un biflavonoide se muestra por los 30 átomos de carbono observados en el espectro de RMN- ^{13}C (ANEXO 16), en la zona del espectro entre δ_c 94.75 y 182.98 ppm (Tabla 5).
3. El espectro de RMN- 1H (ANEXO 14) mostró señales en la zona entre δ_H 6.22 y 8.14 para hidrógenos pertenecientes a anillos aromáticos de los cuales las señales en 6.71, 6.62 y 6.42 ppm se mostraron como singuletes, asignándose a H-3, H-3'' y H-6'' respectivamente, los dobletes en 6.22 y 6.48 ppm con



- constantes de acoplamiento 1.96 y 2.0 Hz, a H-6 y H-8 dispuestos en posición meta entre sí.
- Las señales para hidrógenos aromáticos en δ_H 8.14 ppm (doblete con $J = 2.4$ Hz), 7.20 ppm (doblete, $J = 8.5$ Hz) y 7.65 (doblete de dobles, $J = 8.8, 2.4$ Hz) se asignaron al sistema ABX del anillo (B) trisustituído de una de las unidades flavonoide, para los hidrógenos H-2', H-5' y H-6'. Este anillo se une a otros dos anillos aromáticos y al anillo de pirano por los carbonos 3' y 1' como se pudo comprobar por el espectro HMBC (ANEXO 19).
 - Se observaron señales para un sistema A_2X_2 en δ_H 7.65 ppm (doblete, $J = 8.8$ Hz) y 6.79 ppm (doblete $J = 8.8$ Hz) asignados a H-2'''/H-6''' y H-3'''/H-5''' respectivamente del anillo "B" de la segunda unidad flavonoide, como se observó en el espectro COSY (ANEXO 17). Las señales de los carbonos de la molécula se asignaron por las correlaciones en el espectro HSQC (ANEXO 20).
 - En δ_H 12.99 y δ_{13} 13.15 se observaron dos señales singulete para los hidrógenos de los hidroxilos en C-5 y C-5'' respectivamente según las correlaciones observadas en el espectro HMBC (ANEXO 19). Estas señales se encuentran en campo bajo debido a los puentes de hidrógeno que forman con el oxígeno del carbonilo (C-4) en los anillos aromáticos vecinos. Las señales de RMN de hidrógeno se muestran en la Tabla 7).

Figura 12 Estructura de la Amentoflavona (3)

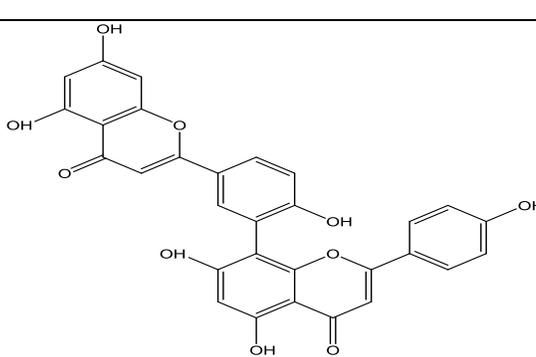
Amentoflavona (3)	
	
IR (ATR)	cm^{-1} (Anexo 1)



Tabla.7 Constantes de acoplamiento de H¹ de la amentoflavona

Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	6.71 (1H)	s
H-6	6.22 (1H)	d, J=1.96
H-8	6.46 (1H)	d, J=2.0
H-2'	8.14 (1H)	d, J=2.44
H-5'	7.20 (1H)	d, J=8.54
H-6'	7.97 (1H)	dd, J=2.44,8.64
H-3''	6.62 (1H)	s
H-6''	6.42 (1H)	s
H-2'''/H-6'''	7.65 (1H)	d, J=8.84
H-3'''/ H-5'''	6.79 (1H)	d, J=8.80
OH-5	12.99	s
OH-5''	13.15	s

Tabla 8 Constantes de acoplamiento de C¹³ de la amentoflavona

#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
2	164.91	1'	122.19	2''	164.83	1'''	123.12
3	103.43	2'	132.43	3''	103.32	2'''	129.13
4	182.98	3'	121.90	4''	183.30	3'''	116.40
5	163.14	4'	161.65	5''	162.49	4'''	161.89
6	99.71	5'	116.65	6''	103.94	5'''	116.40
7	164.88	6'	128.29	7''	164.84	6'''	129.13
8	94.75			8''	105.58		
9	158.79			9''	156.14		
10	105.11			10''	104.77		

5.2.4 Aislamiento y elucidación estructural de la robustaflavona (4)

El aislamiento de este producto, se llevó a cabo de las fracciones F10 a F11 de la columna de Sephadex (Esquema 1), como un sólido amarillo-naranja, el cual, fue identificado como la robustaflavona por comparación de su R_f (0.51) en CCD, con el de una muestra de referencia obtenida anteriormente en el laboratorio, la robustaflavona



se obtuvo en las fracciones posteriores a las de la amentoflavona y el biflavonoide fue identificado por las siguientes características espectroscópicas (Tablas 9 y 10):

1. El espectro en el IR (ANEXO 3) mostró señales en 3192, 1652, 1605, 1564, 1440, 1364, 1242 y 1163 cm^{-1} correspondientes a vibraciones para grupos hidroxilo, carbonilo α,β -insaturado, C-C aromático y C-O.
2. La evidencia clara de que se trata de un biflavonoide se observó por las 30 señales para carbonos de esta molécula, en el espectro de RMN de carbono-13 (ANEXO 23), los cuales se encuentran en la región entre δ_c 94.7 y 182.6.
3. El espectro de RMN- ^1H (ANEXO 21) mostró señales entre δ_H 6.24 y 7.98 para los hidrógenos pertenecientes a los anillos aromáticos que se encuentran formando las dos unidades flavonoide (H-6, H-8, H-2', H-5', H-6', H-8'', H-2''', 6''' y H-3''', 5''') y a H-3 y H-3'' de los anillos de pirano (ANEXO 21).
4. Como en el caso de las señales correspondientes a la amentoflavona, en la robustaflavona también se agruparon como
 - a) un sistema AB para dos protones aromáticos, en posición *meta* en δ_H 6.22 (doblete $J = 1.96$ Hz) y 6.46 (doblete $J = 2.0$ Hz) asignados a H-6 y H-8 (anillo A, unidad I)
 - b) un sistema ABX para tres protones, en δ_H 7.98 (singulete), 7.96 (doblete, $J = 8$ Hz) y 7.93 (doblete de dobles, 8.7 y 2.5Hz), asignados a H-2', H-5' y H-6' (anillo B, unidad I). Este anillo bencénico se une a un segundo flavonoide en la posición 3' de la unidad I y C-6' de la unidad II. Estos datos comparados con los de amentoflavona, presentan una diferencia significativa ya que se encuentran a campo más bajo.
 - c) un sistema A_2X_2 en δ_H 7.12 (doblete, $J = 8$ Hz) y 7.05 (doblete, $J = 8$ Hz) asignados a H-2''' y H-6''' y a H-3''' y 5''' respectivamente. Es de notarse que en este caso, los desplazamientos para H-2''' y H-6''' se encuentran a campo mucho más bajo que los correspondientes a la amentoflavona.
 - d) tres señales singulete en δ_H 6.71, 6.71 y 6.67 asignados a los protones H-3, H-3'' y H-8''.
 - e) en 13.05 y 13.48 ppm aparecen señales para hidrógenos de hidroxilo que se observan como singuletes en campo bajo debido a los puentes de hidrogeno



que forman con el oxígeno del carbonilo en C-4. Estas señales fueron asignadas a los hidroxilos en C-5 y C-5'' respectivamente, según las correlaciones observadas en el espectro HMBC (ANEXO 25)

Figura 13. Estructura del compuesto 4. Robustaflavona

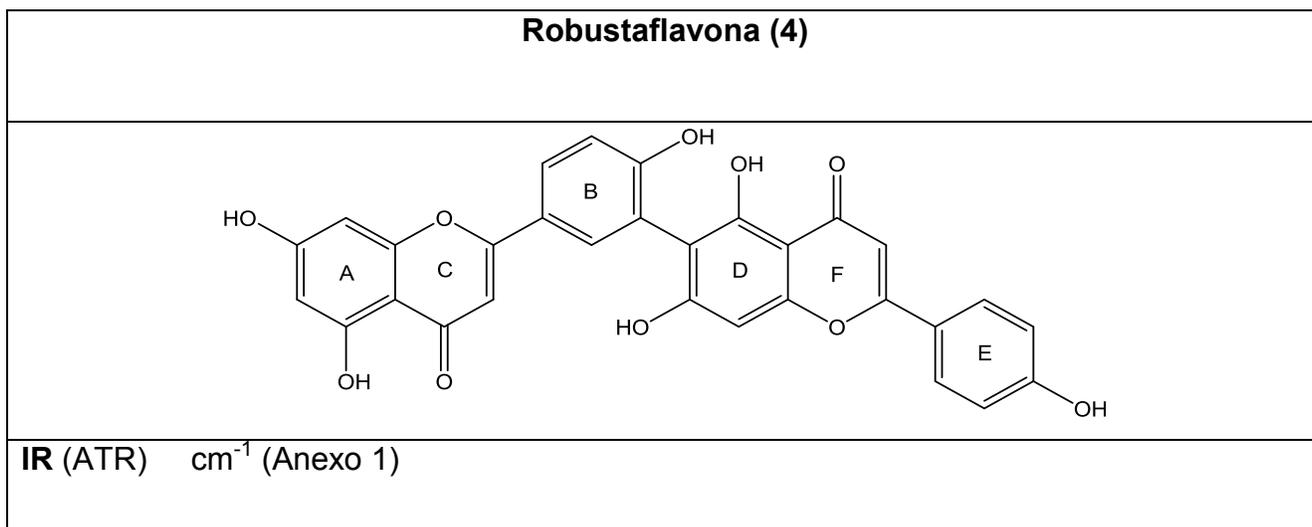


Tabla 9 Constantes de acoplamiento de H^1 de Robustaflavona (4)

Asignación	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	6.71 (1H)	S
H-6	6.24 (1H)	d, $J= 2.2$
H-8	6.55 (1H)	d, $J=2.2$
H-2'	7.98 (1H)	S
H-5'	7.96 (1H)	d, $J=8.7$
H-6'	7.93 (1H)	dd, $J=8.7,2.5$
H-3''	6.71 (H)	S
H-8''	6.67 (H)	S
H-2'''/H-6'''	7.12 (1H)	d, $J=8.6$
H-3'''/ H-5'''	7.05 (1H)	d, $J= 8.7$
OH-5	13.05	S
OH-5''	13.48	s

**Tabla 10** Constantes de acoplamiento de C¹³ de Robustaflavona(4)

#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)	#C	δ (ppm)
2	163.65	1'	123.38	2''	164.65	1'''	123.18
3	104.07	2'	132.30	3''	104.02	2'''	129.19
4	182.68	3'	122.90	4''	183.14	3'''	116.79
5	157.92	4'	154.13	5''	158.51	4'''	161.88
6	99.64	5'	125.70	6''	104.94	5'''	116.79
7	151.83	6'	126.06	7''	151.61	6'''	129.19
8	94.76			8''	94.76		
9	158.65			9''	158.75		
10	105.23			10''	105.42		

Cabe mencionar que, sólo se pudo evidenciar de manera contundente la presencia de robustaflavona (**Figura 13**) en la colecta de Zacatecas, por los análisis mencionados con anterioridad y para las otras dos colectas no se identificó al biflavonoide. La presencia de este compuesto en las colectas de Tlaxiaco y Atotonilco se presume, ya que al realizar el análisis UPLC/MS del extracto total de cada una de esas colectas, los resultados muestran dos compuestos con diferentes tiempos de retención (Zacatecas 4.129 – 4.687; Tlaxiaco 4.183 y 4.473 y Atotonilco 14.986 y 15.300) pero con el mismo peso molecular (539 uma) pudiendo ser uno de ellos la amentoflavona y el otro robustaflavona y además, porque se observa que de la columna de Sephadex, para el fraccionamiento de la fracción de acetato de etilo de la colecta de Zacatecas, en fracciones posteriores a las que contenían amentoflavona (fueron analizadas también por la técnica UPLC-MS) se encontró una banda que puede ser robustaflavona con mayor tiempo de retención y que pudiera estar en las fracciones obtenidas de la columna Sephadex en forma de trazas. Lo mencionado con anterioridad se puede justificar por diferentes razones, como son que las colectas que provienen de diferentes lugares, tienen componentes en diferentes concentraciones y además que influyen otros factores tales como el clima y la época de recolección de cada una de las muestras para la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios estudiados.

Un punto importante a tratar es la presencia de un pigmento rojizo, el cual, no se observó su presencia en estudios anteriores en el laboratorio 111 del departamento de



Farmacina, ni tampoco se describe en la literatura para esta especie en específico. Esto es importante porque este pigmento sería un marcador para esta especie y una manera de distinguir *S. nothohybrida* de *S. lepidophylla*.

De las tres colectas se aislaron metabolitos adicionales a la robustaflavona, tales como el α -D-glucopiranosido del ácido caféico, no encontrado anteriormente en esta especie y la amentoflavona que también es considerada como un compuesto marcador de esta especie. La elucidación estructural de los tres compuestos aislados se llevó a cabo mediante la correlación de las señales observadas en los espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMBC, HSQC y COSY.



6 CONCLUSIONES

1. La metodología por microscopía aplicada para la identificación botánica de *S. lepidophylla* aseguró trabajar en las tres muestras con la especie adecuada.
2. Se detectó la presencia de un pigmento rojizo no encontrado en experimentos anteriores en el laboratorio y que pareciera distintivo de colectas de la especie *S. lepidophylla*.
3. Mediante el estudio fitoquímico de las fracciones de acetato de etilo de *S. lepidophylla* se logró el objetivo del trabajo por el aislamiento del biflavonoide robustaflavona, adicionalmente al de la amentoflavona y del α -D-glucopiranosido del ácido caféico que es un compuesto no reportado con anterioridad para esta especie.
4. El método UPLC/MS utilizado para el análisis de las tres colectas de *S. lepidophylla* fue muy útil para confirmar la presencia de la robustaflavona en la especie, aunque en dos de ellas se encuentra en trazas y que por los métodos cromatográficos no se pudo aislar.



7 BIBLIOGRAFÍA

Adams R. P., Kendall, E., Kartha, K. (1990) Comparison of Free Sugars in Growing and Desiccated Plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18, 107-110.

Aguilar, M. I., Romero, M. G., Chávez, I., Lotina-Hennsen, B., King-Díaz, B. (2008) Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis on spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6994-7000.

Aguilar, M. I., Mejía, I. A., Menchaca, C., Vázquez, I., Navarrete, A., Chávez, M. I., Reyes-García, A., Ríos-Gómez, R (2013) Determination of Biflavonoids in Four Mexican Medicinal Species of *Selaginella* by HPLC. *Journal of AOAC International* 96, 712-716

Argueta, A., Cano, L.A., Rodarte, M.E. (1994) Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, 575-576.

Banks, J.A. (2009) *Selaginella* and 400 million years of separation. *Annual Reviews Plant Biology* 60, 223-238.

Colín Ruiz A. (2010) Estudio comparativo sobre los efectos diuréticos y de tránsito intestinal de extractos acuosos de *Selaginella nothohybrida* Valdespino y *Selaginella lepidophylla* (Hook et Grev.) Spring. Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cao, J.G., Cao, X., Xia, X. F., Chen, J.B., Xiao, Q. X., Wang, G. (2012) Flavonoids contents, antioxidant and anticancer activities of 78 species of ferns from China. *Biomedical Paper*, 156 (S1) S33.

Chang, C.Y., Chen, X. D., Xiao, X. Y., Lin, R. C. (2000) Studies on micromorphology and its significance in anatomy and identification of *Selaginella*. *Journal of Medication Analysis*, 20, 75-78.



Ferreira, D., Slade, D., Marais, J. P., (2006) Bi, Tri, Tetra, Penta and Hexaflavonoids. Andersen, OM and Markham, KR (eds.), Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton, CRC Taylor & Francis, 1101-1118.

Kassem, M. E., El-Desoky, S. K., Sharaf, M. (2004) Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. Chemistry of Natural Compounds, 40, 447-450.

Korall P., Kenrick P. (2002) Phylogenetic relationships in Selaginellaceae based on RBCL sequences. American Journal of Botany. 89, 506-517.

Lara Almazán, N. (2014) Estudio fitoquímico y analítico comparativo por UPLC/MS de cuatro especies medicinales del género Selaginella. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.

Lin, Y. M., Chen, F. C. (1974b) Agathisflavone from the drupes of *Rhus succedanea*. Phytochemistry 13, 657–658.

Martínez, M., (1996) Las Plantas Medicinales de México. 6ª. Ed. Editorial Botas, México, pp. 124-125.

Menchaca Márquez, C. (2009) Aislamiento e identificación estructural de biflavonoides adicionales contenidos en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* Spring (Selaginellaceae). Tesis de licenciatura en QFB. Facultad de Química, UNAM.

Mickel, J.T., Smith, A. (2004) The pteridophytes of Mexico. Memoirs, of the New York Botanical Garden, The Botanical Research Institute of Texas, Inc. 576-577.

Mickel, J. T., Smith, A. R. (2004) The pteridophytes of Mexico. Part I (description and maps). Memoirs of the New York Botanical Garden, 88(I), 550-602.



Mickel, J. T., Valdespino, I. A. (1992) Five new species of Pteridophytes from Oaxaca, México. *Brittonia*, 44, 312-321.

Páez, A. V. (2008) *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27, 2010.

Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2006) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29–36.

Qasim M., Roy S., Kmail M., Ilyas M. (1985) Phenolic constituents of *Selaginellaceae*. *Indian Journal of Chemistry*, 69, 149-152.

Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., Osborn, H. M. I. (2013) Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45, 2821-2831.

Richardson, P. M. (1992) Structure, biosynthesis, evolution and physiological and ecological roles of plant flavonoids and related compounds important in chemoprevention. *Cancer Chemo Reviews*, 353-360.

Richardson, P. M. 1983. *Flavonoids and Phylogenetic Systematics*. N. J. Platnick & VA. Funk (bis.): *Advance in Cladistics* (vol. 2). Columbia Univ. Press. New York.

Xiao, Z.P., Peng, Z.Y., Yan, M. J., Ouyang, W. B., Zhu, Y. Z., (2008) Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 169-177.

Setyawan, A. D. (2011) Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Bioscience*, 3, 44-58.

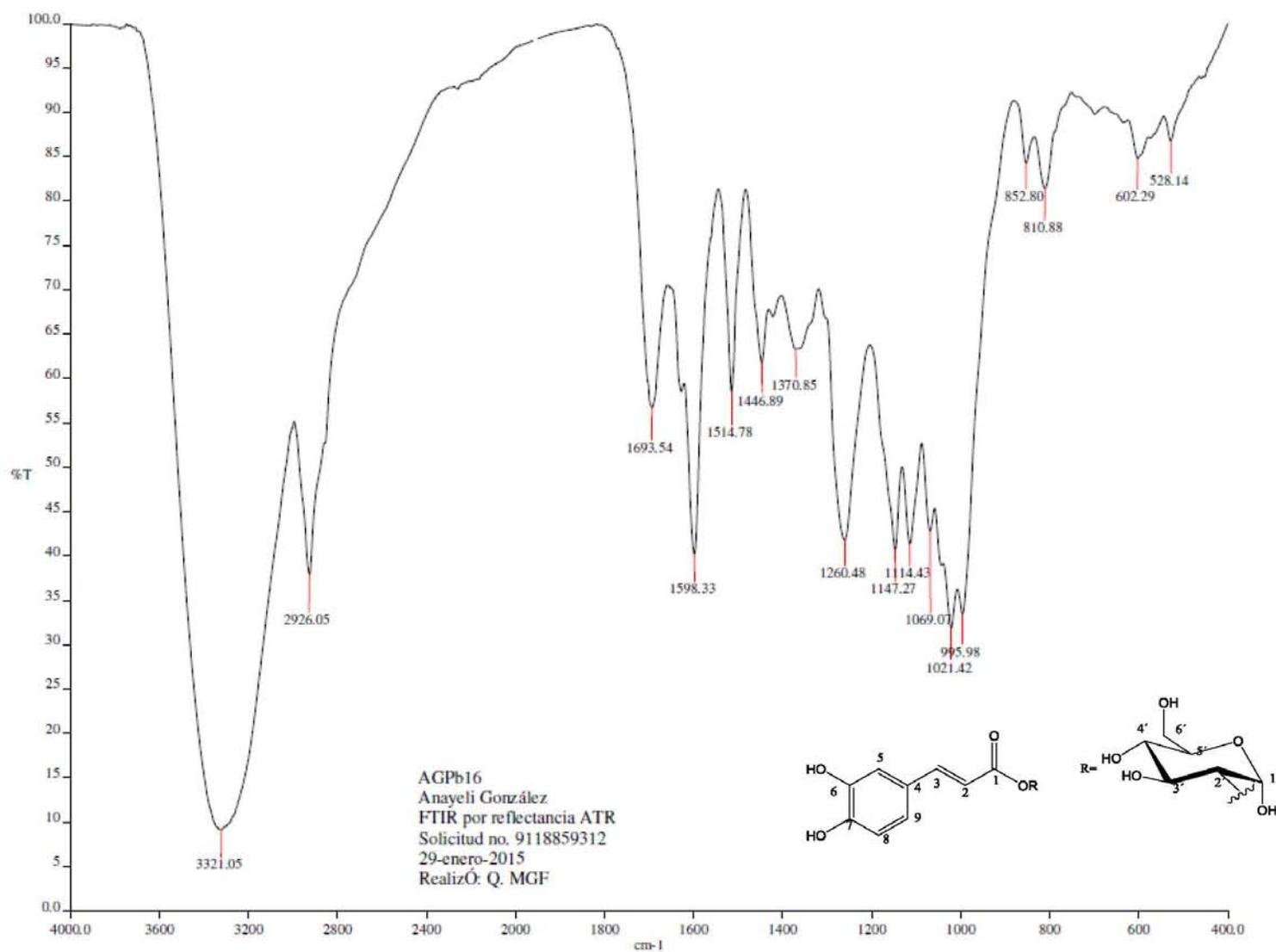
Zembower, D.E., Lin, Y., Flavin, M.T., Chen, F., Korba, B.E. (1998) Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Research* 39, 81-88.



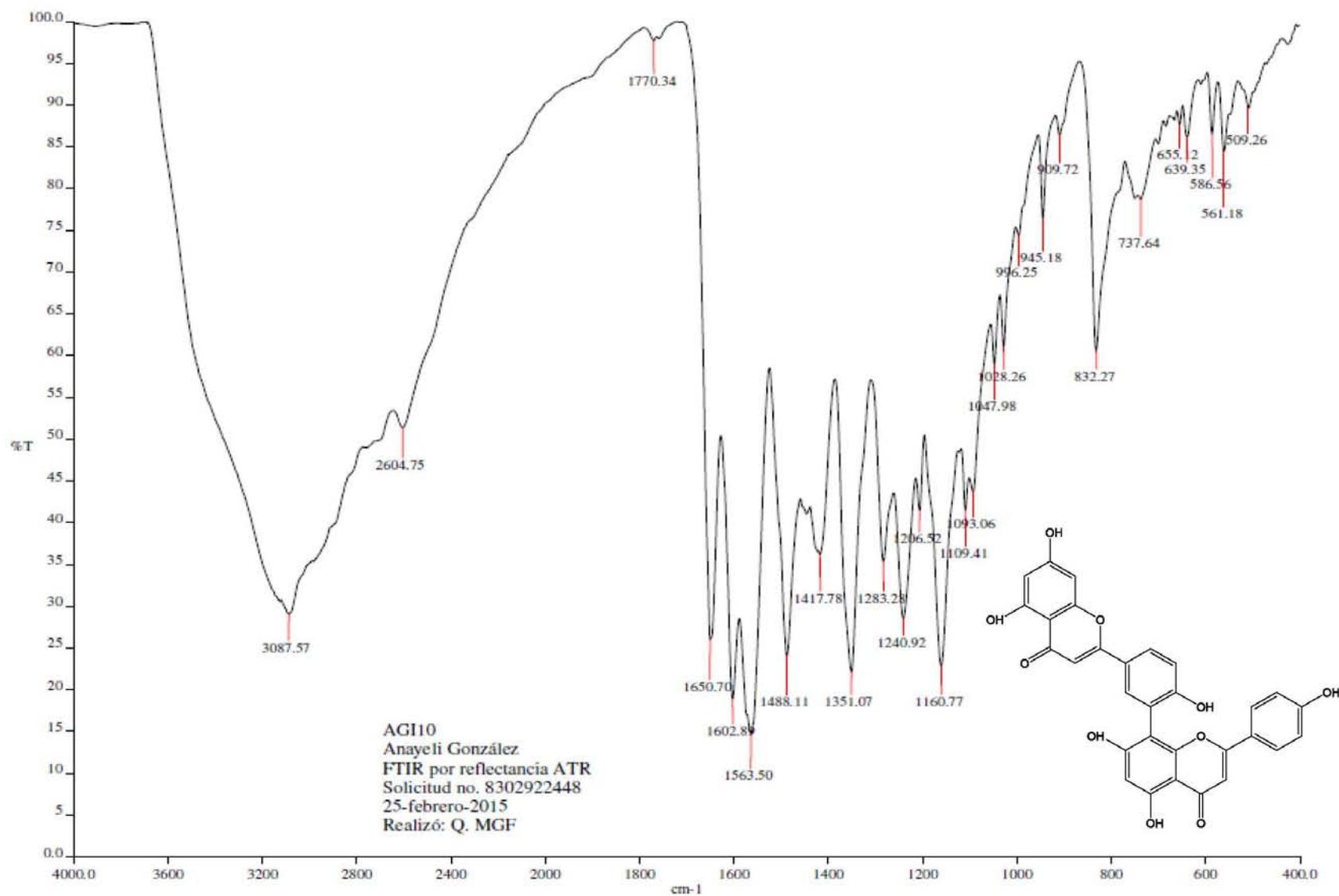
Zheng, X. K, Li, Y. J., Zhang, L., Jia, D., Fei, X., Luo, X., Yang Z. (2009) An assessment of the genetic diversity within Ganoderma strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiology Research*, 164, 312–21



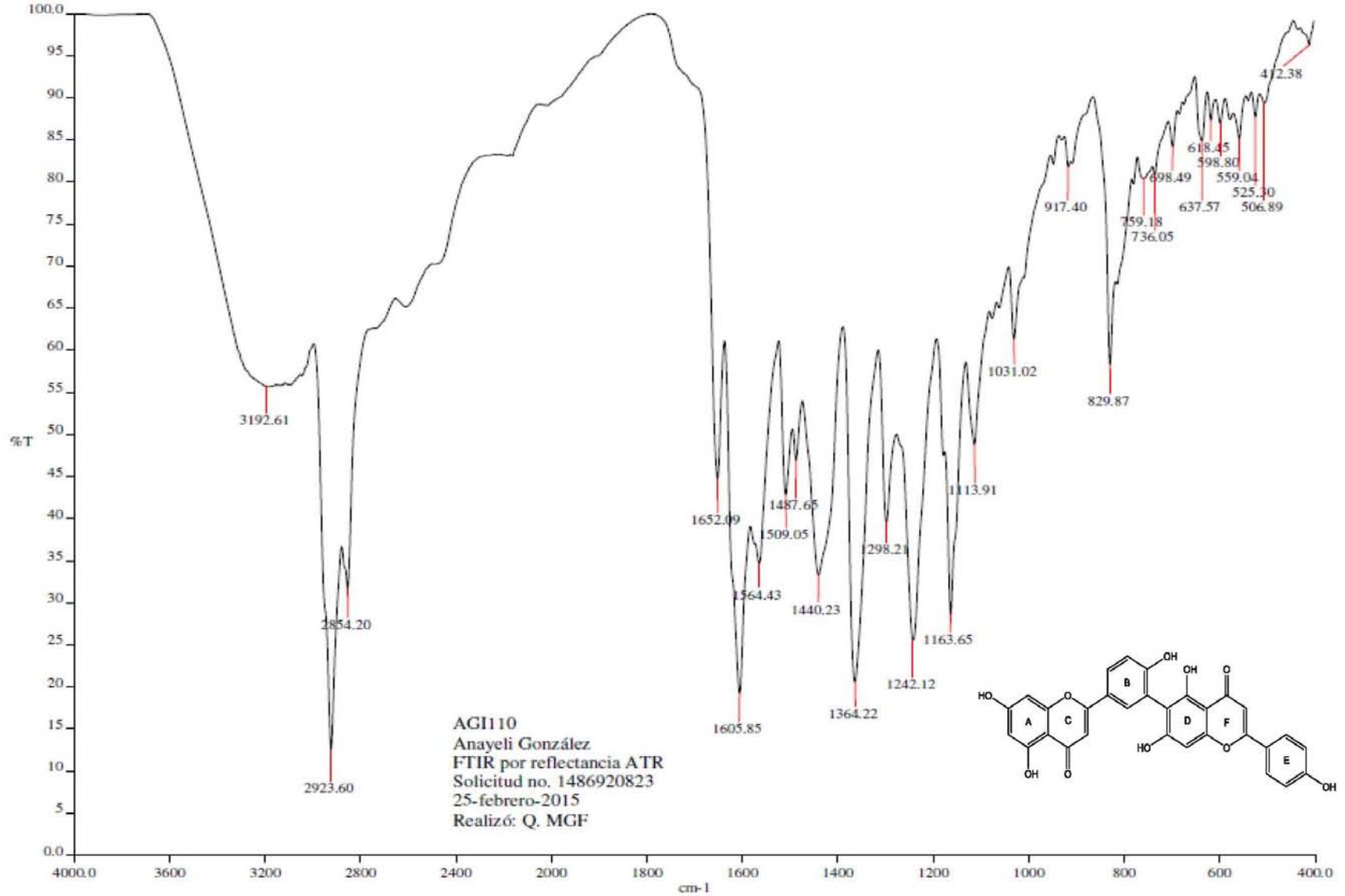
7. ANEXO



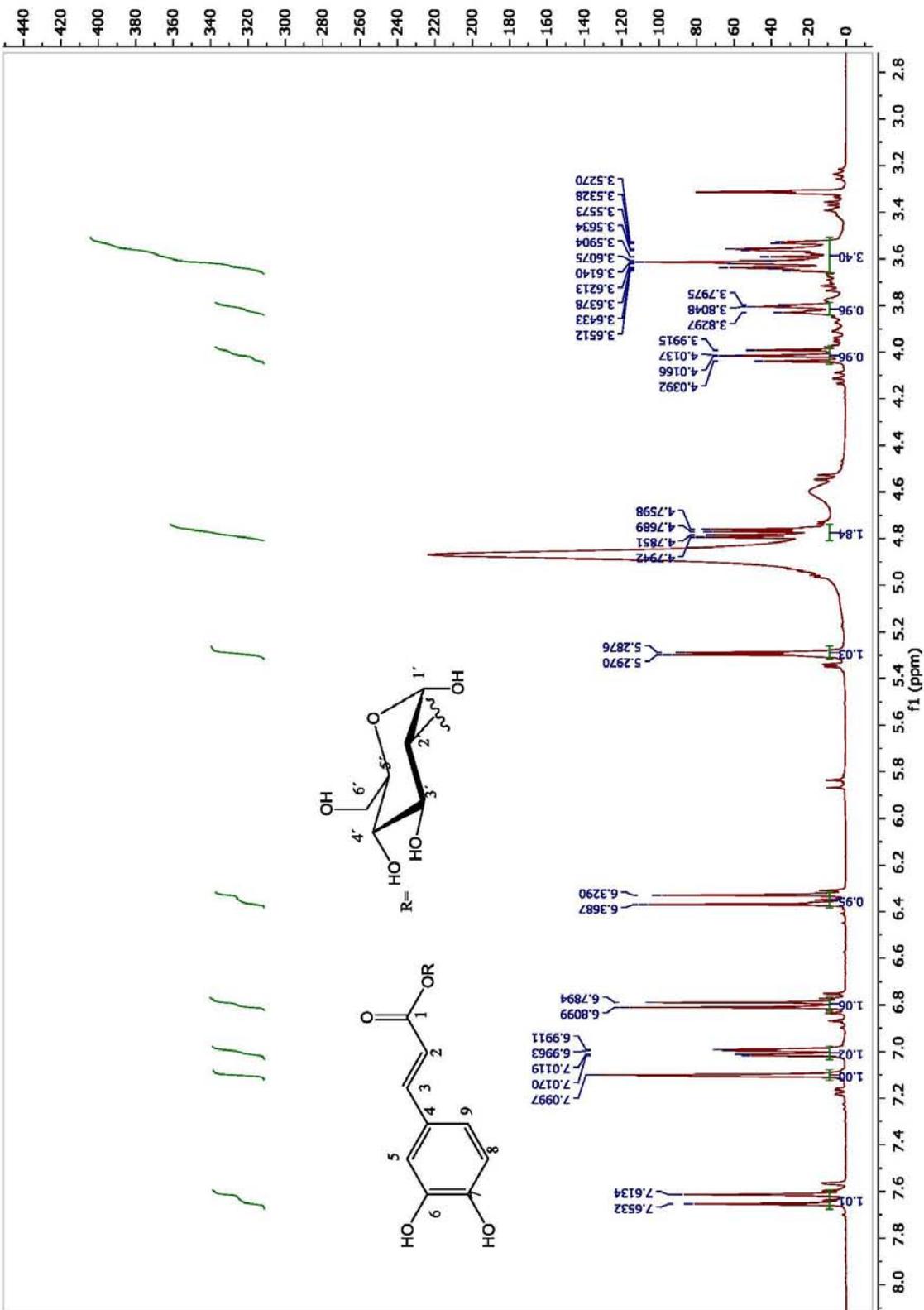
ANEXO 1. IR de α -D-glucopiranosido del ácido caféico, por reflectancia ATR

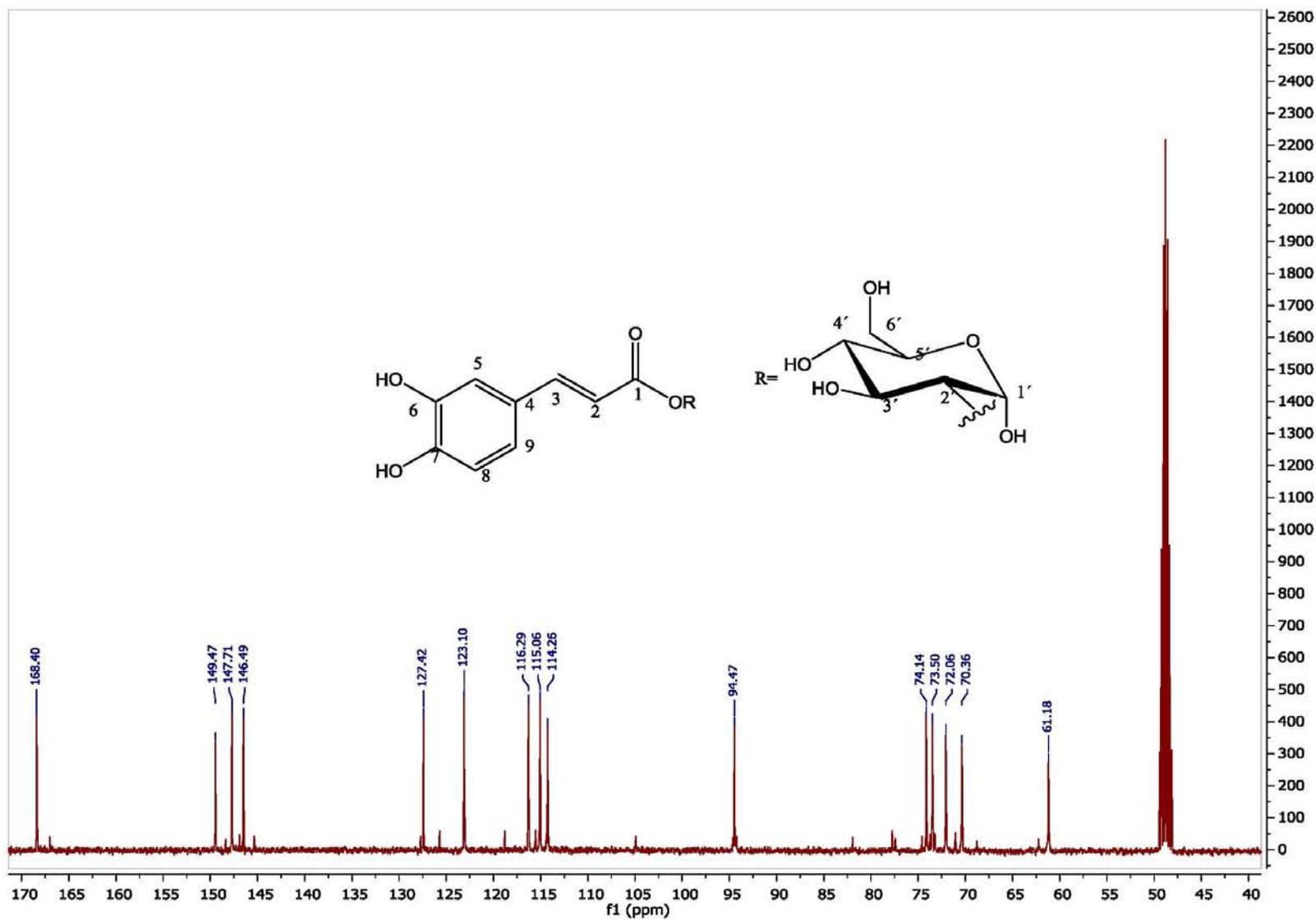


ANEXO 2. IR de **amentoflavona**, por reflectancia ATR

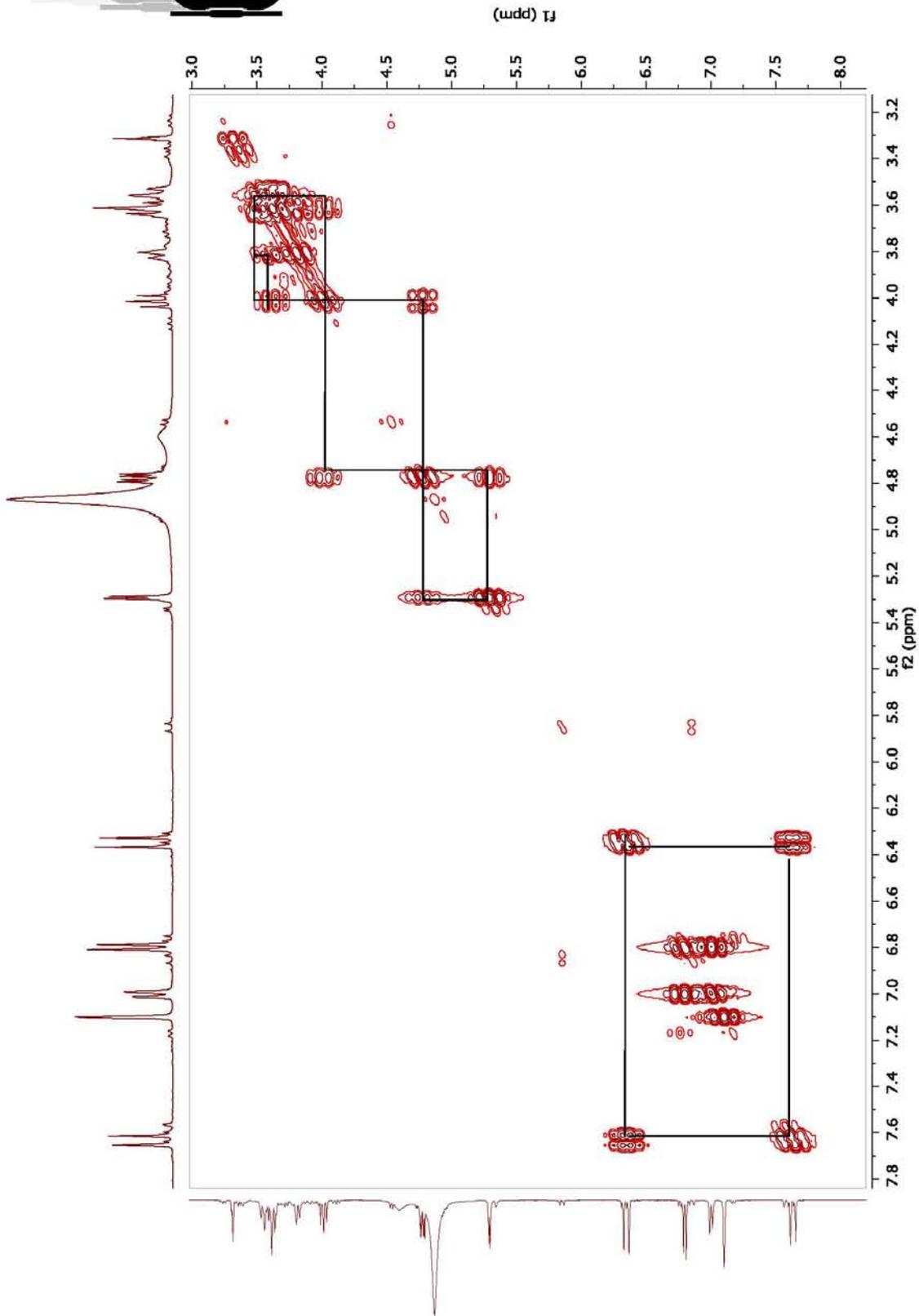


ANEXO 3. IR de **robustaflavona**, por reflectancia ATR

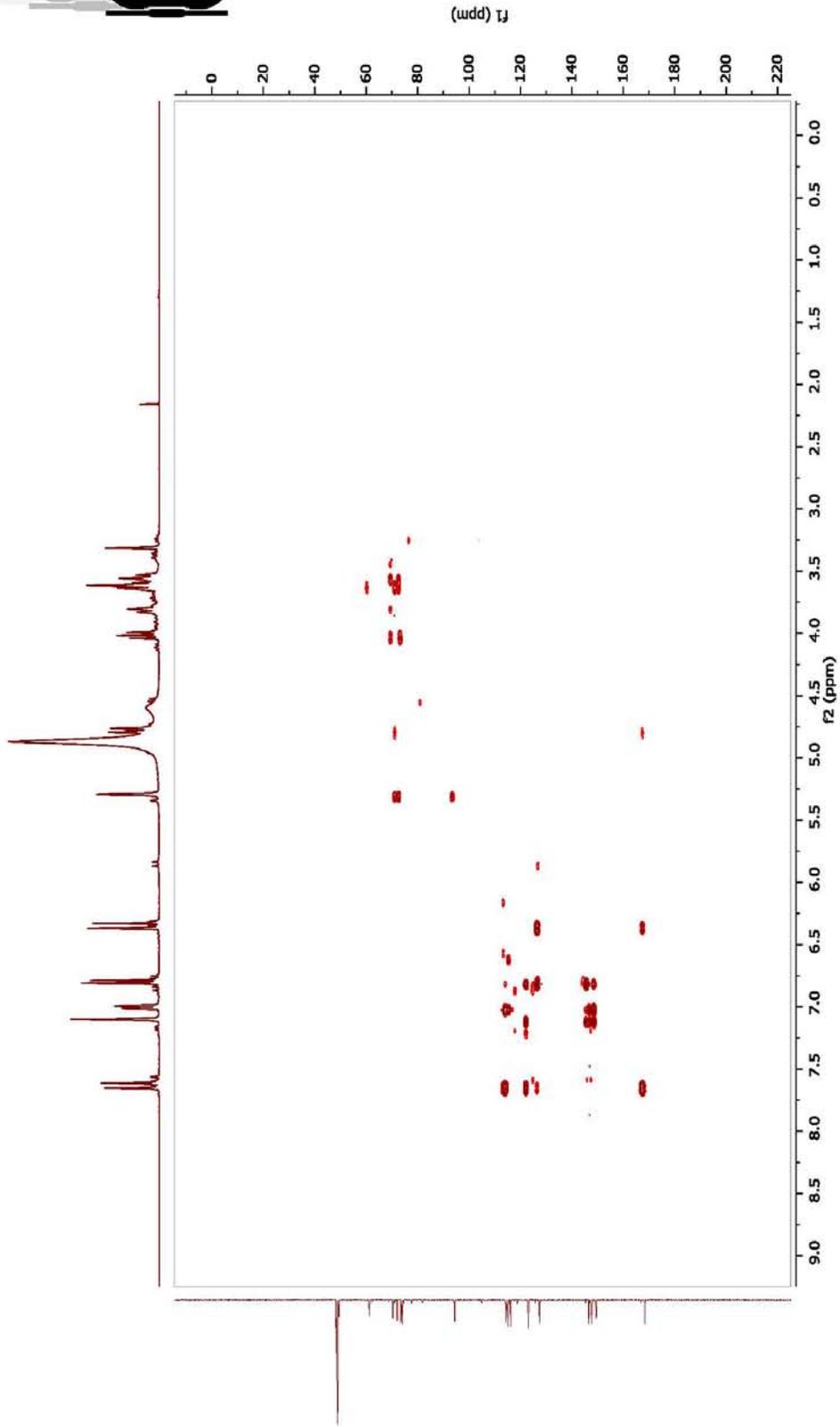
ANEXO 4. RMN- ^1H de α -D-glucopiranosido del ácido cafeico (400 MHz, metanol- d_4)



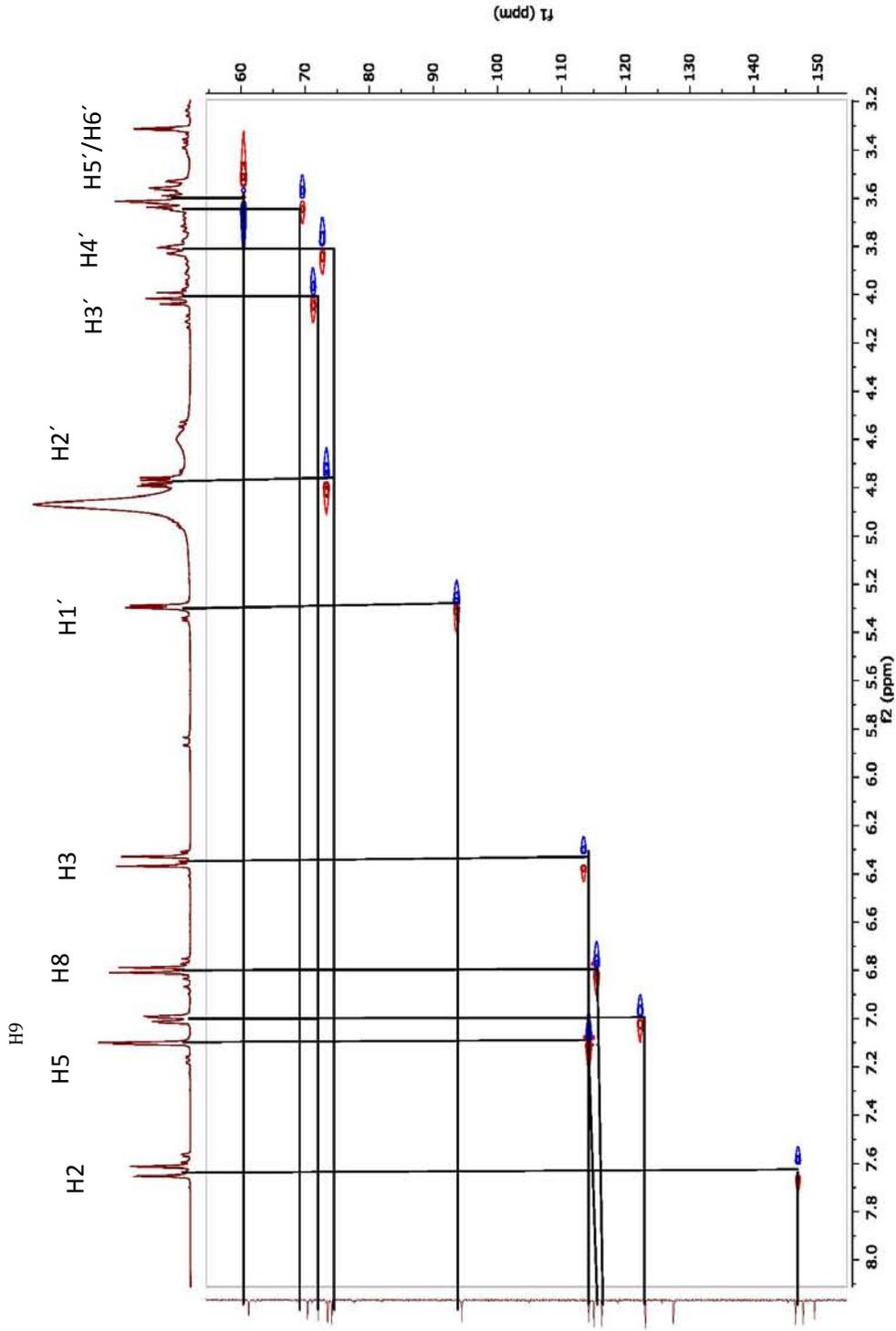
ANEXO 5.RMN- ^{13}C de $\alpha\text{-D-glucopiranosido}$ del cido cafeico (400 MHz,metanol- d_4)



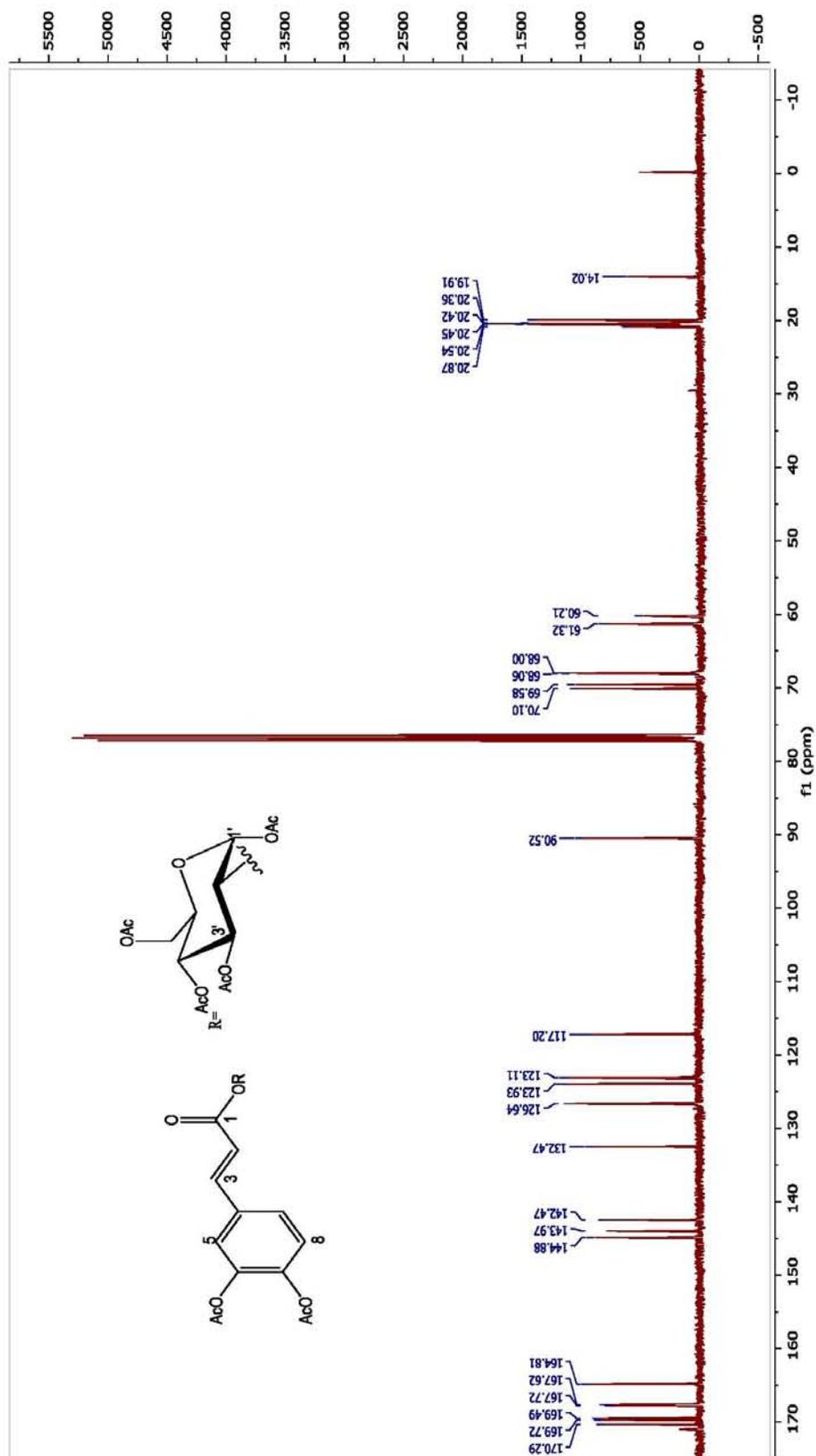
ANEXO 6. RNM modalidad COSY dea-D-glucopiranosido del ácido cafeico (400 MHz, metanol-d₄)

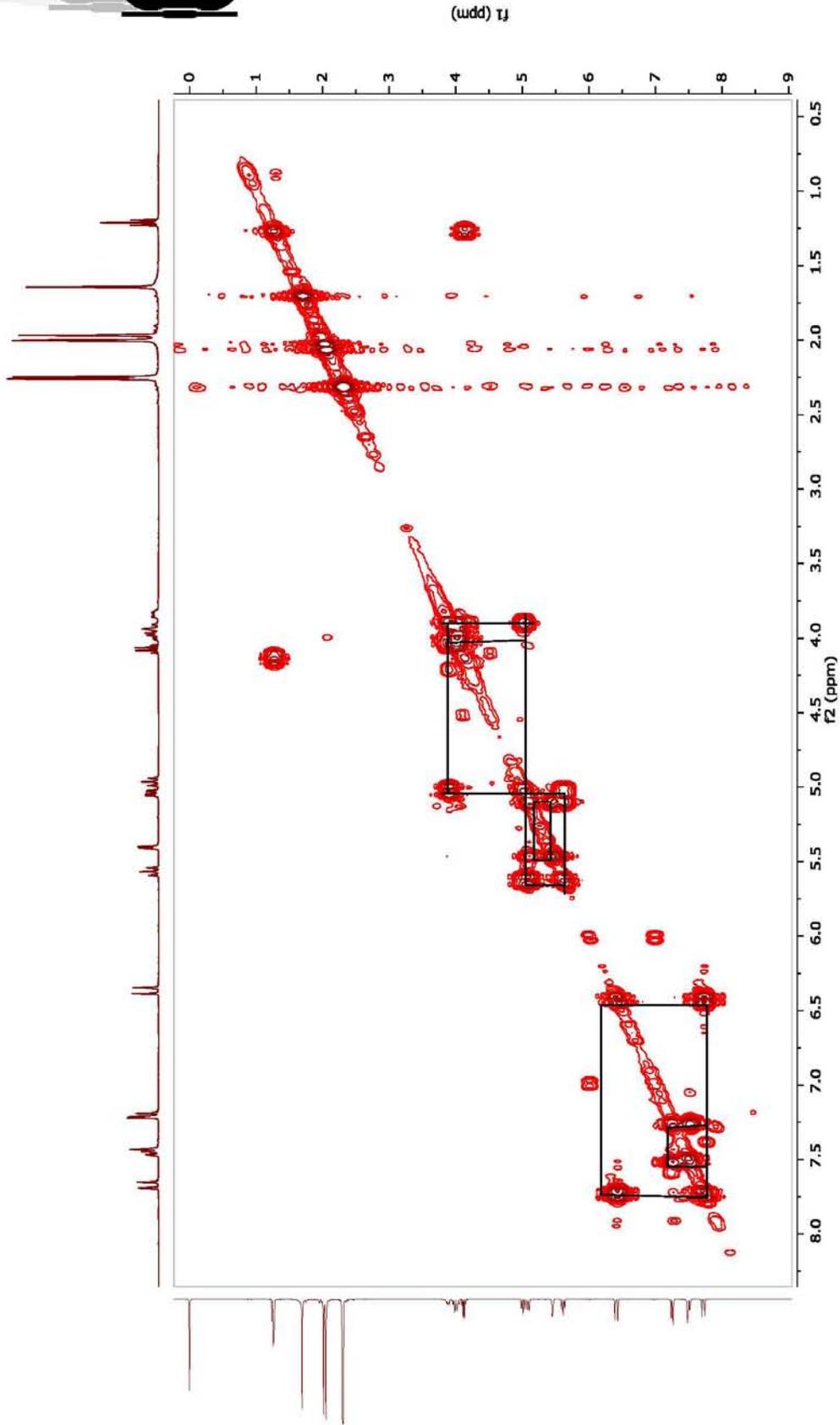


ANEXO 7. RMN modalidad HMBC de α -D-glucopiranosido del ácido cafeico (400 MHz, metanol-d₄)

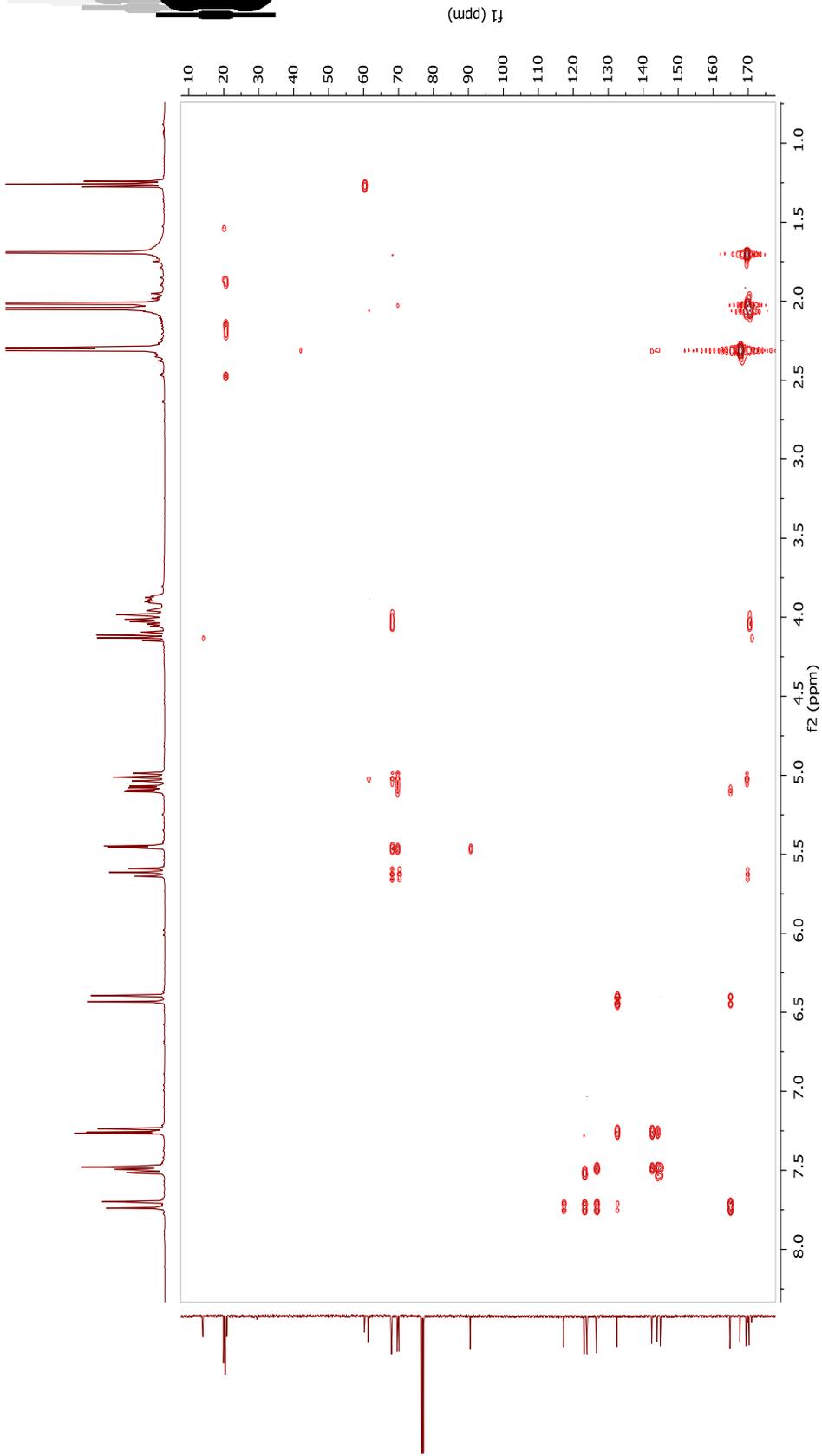


ANEXO 8. RMN modalidad HSQC de α -D-glucopiranosido del ácido cafeico (400 MHz, metanol- d_4)

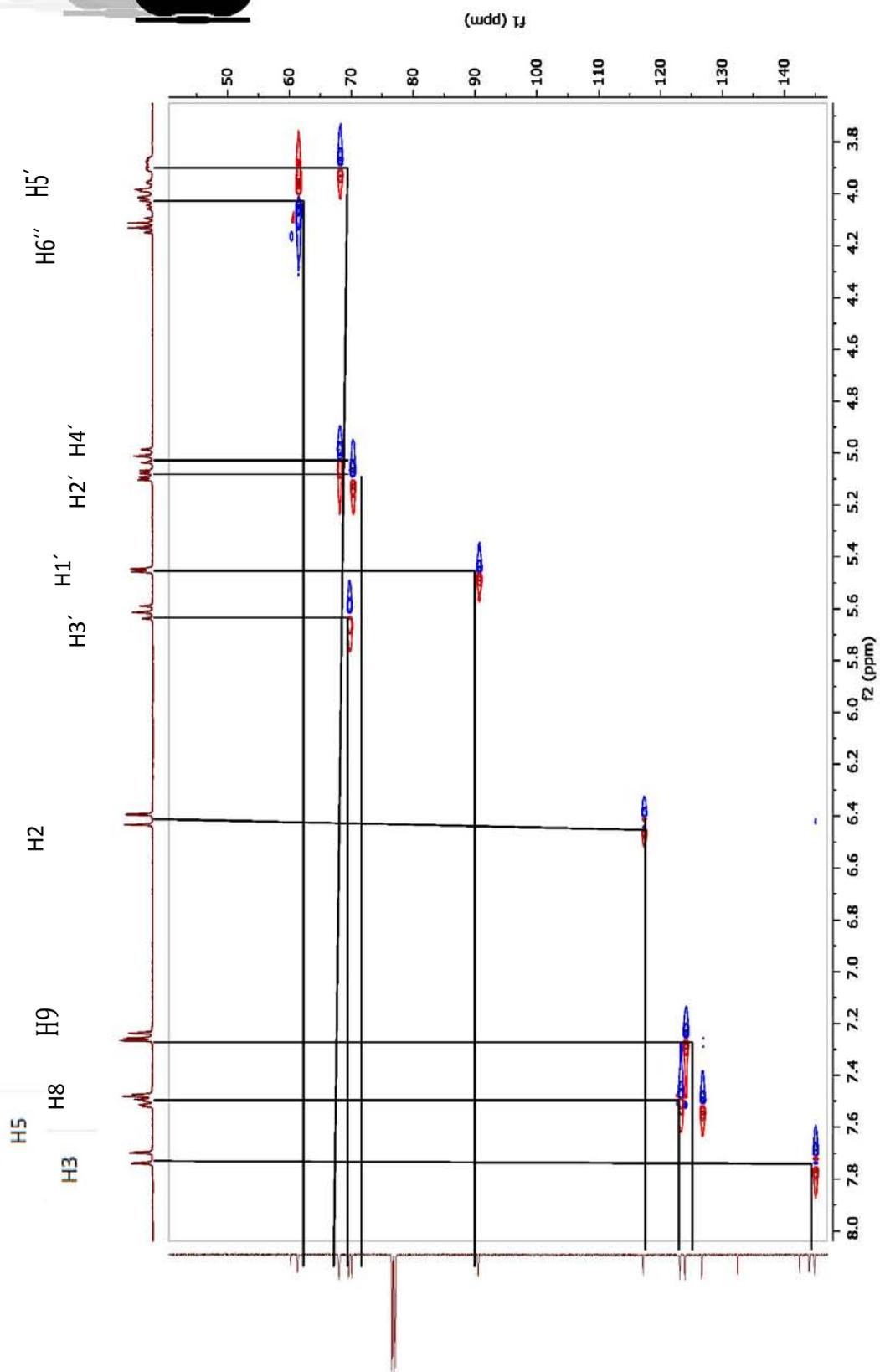
ANEXO 10. RMN- ^{13}C de α -D-glucopiranosido del ácido caféico peracetilado (400 MHz, metanol- d_4)



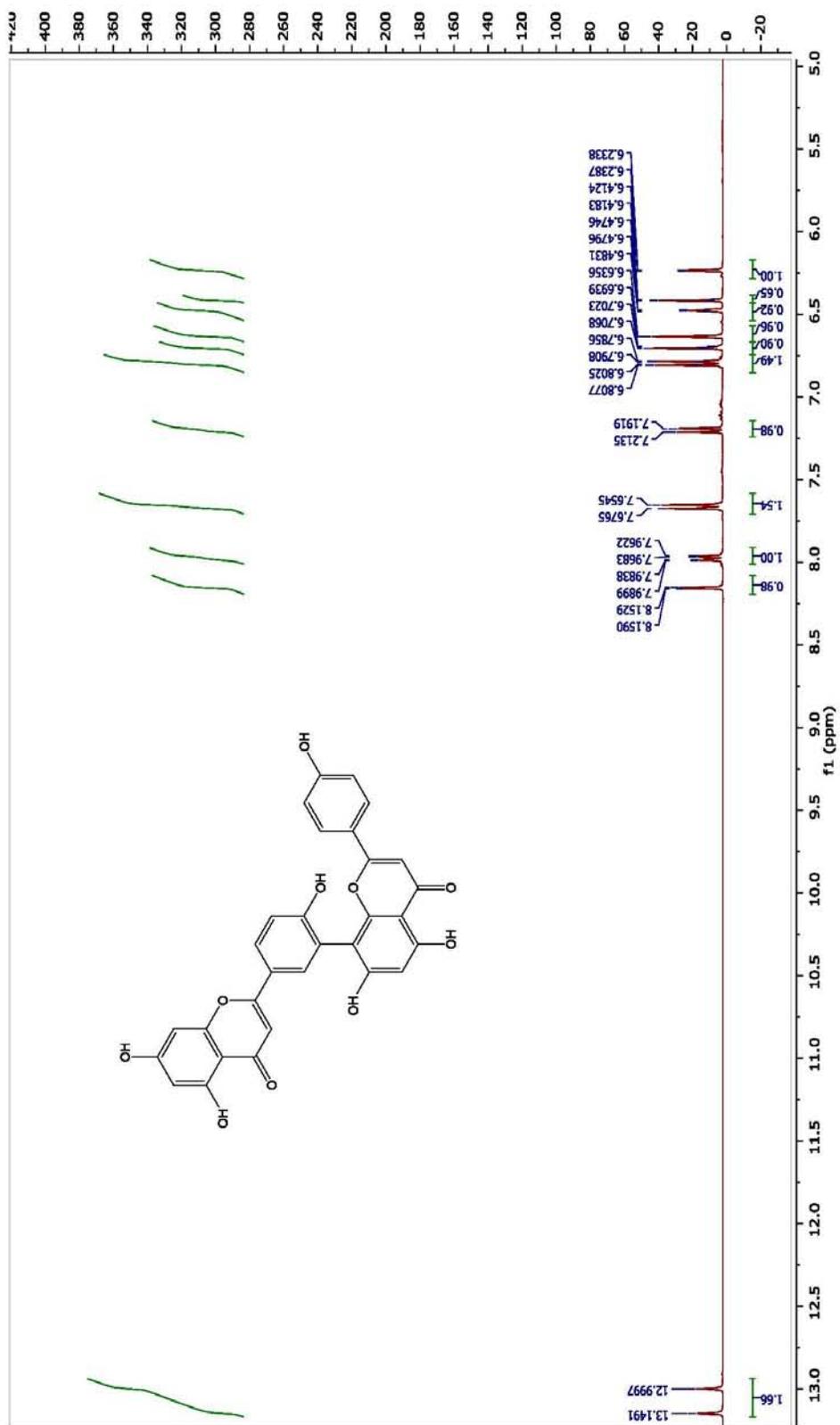
ANEXO 11. RNM modalidad COSY deperacetil- α -D-glucopiranosido del ácido cafeico (400 MHz, metanol-d₄)

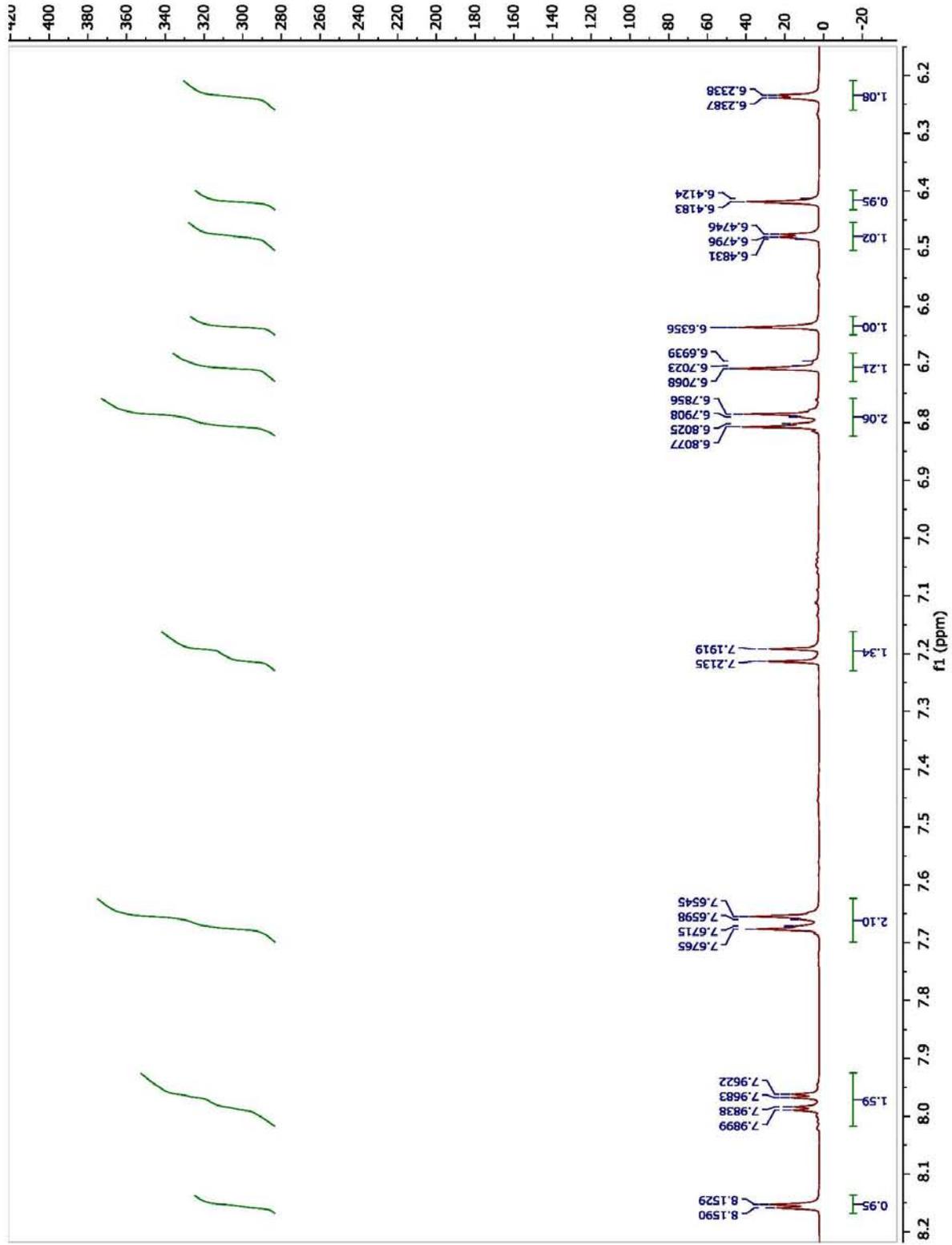


ANEXO 12. RMN modalidad HMBC de peracetil- α -D-glucopiranosido del ácido caféico (400 MHz, metanol-d₄)

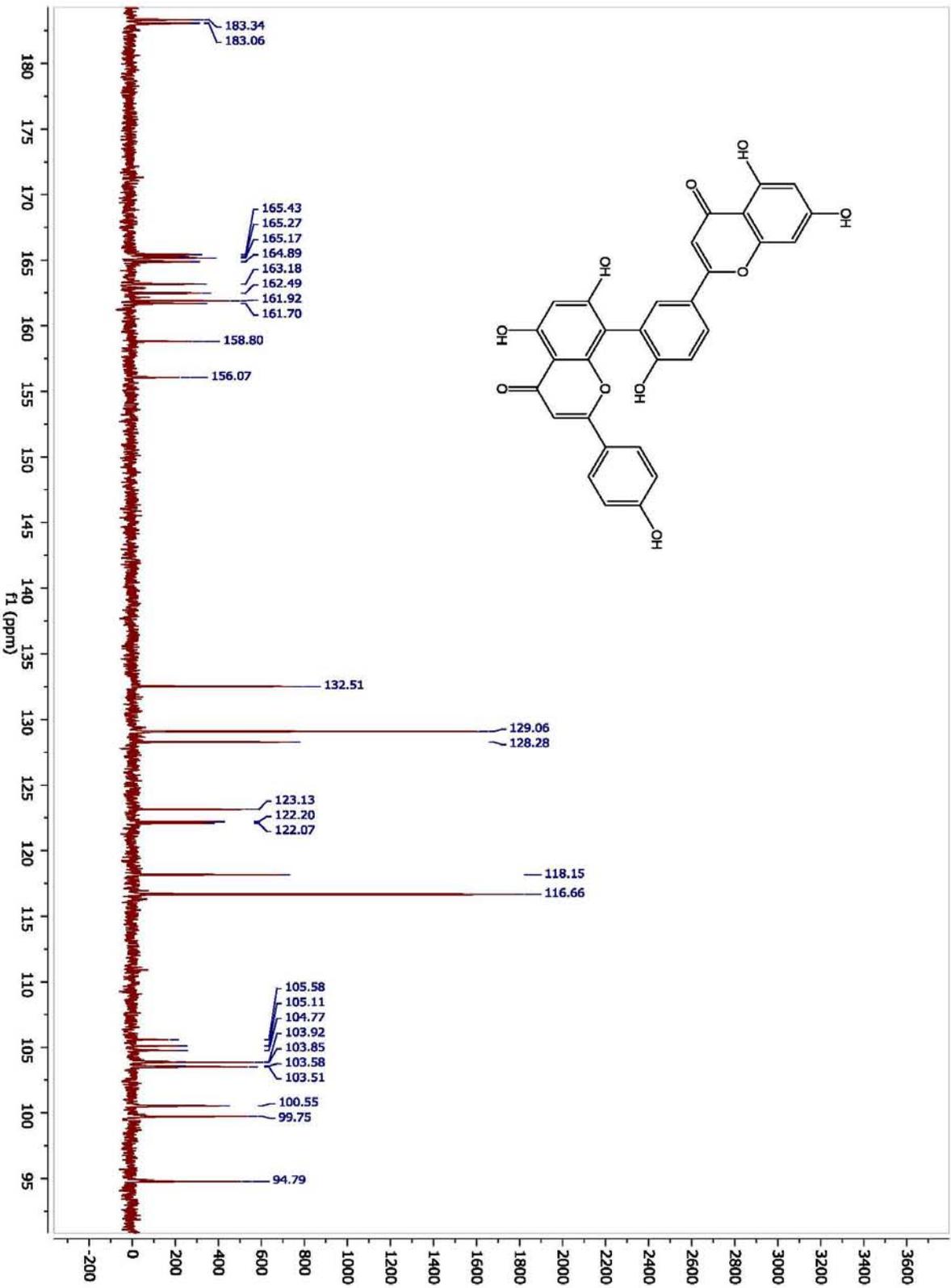


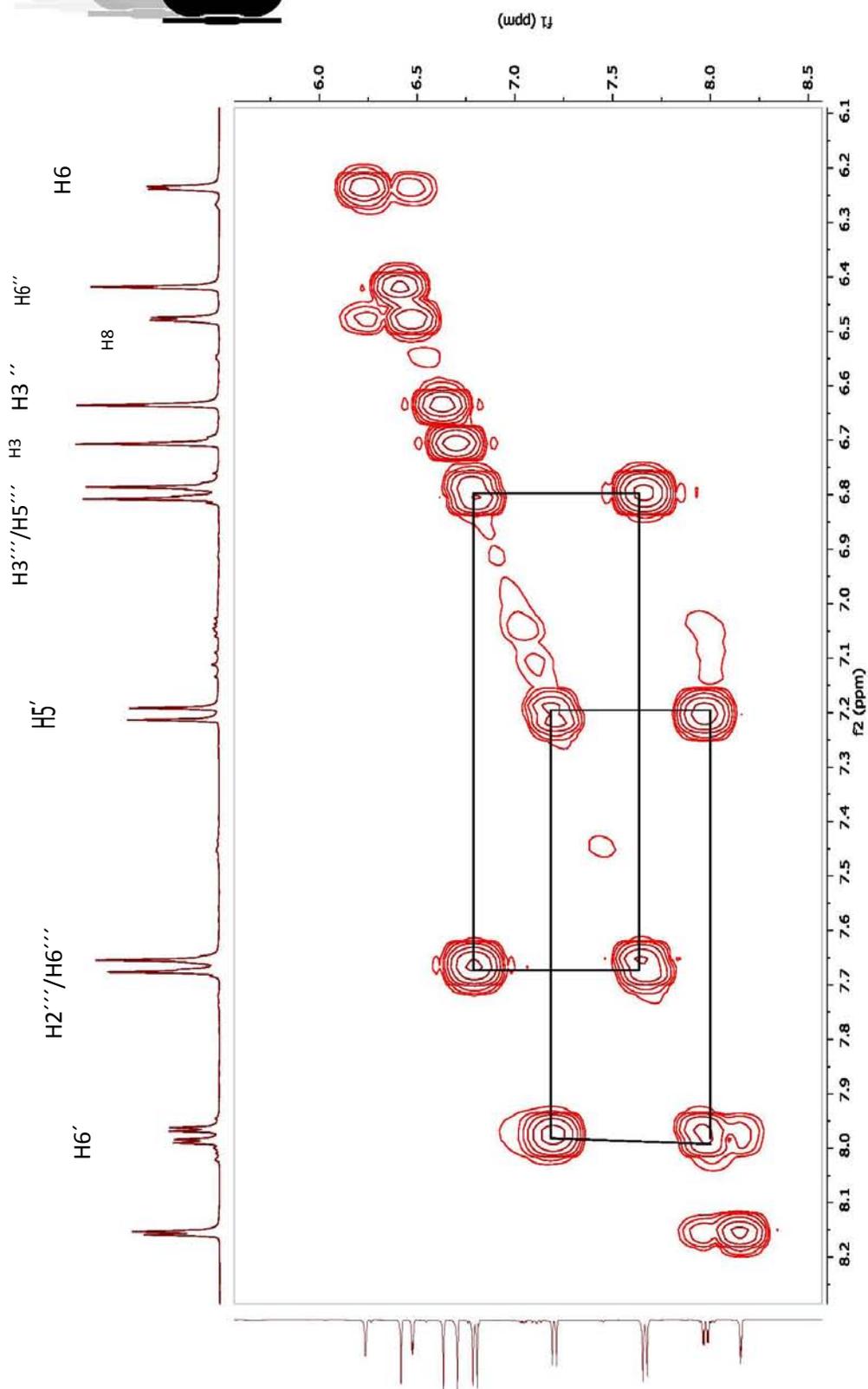
ANEXO 13. RMN modalidad HSQC de peracetil- α -D-glucopiranosido del **ácido cafeico** (400 MHz, metanol- d_4) (ampliación)

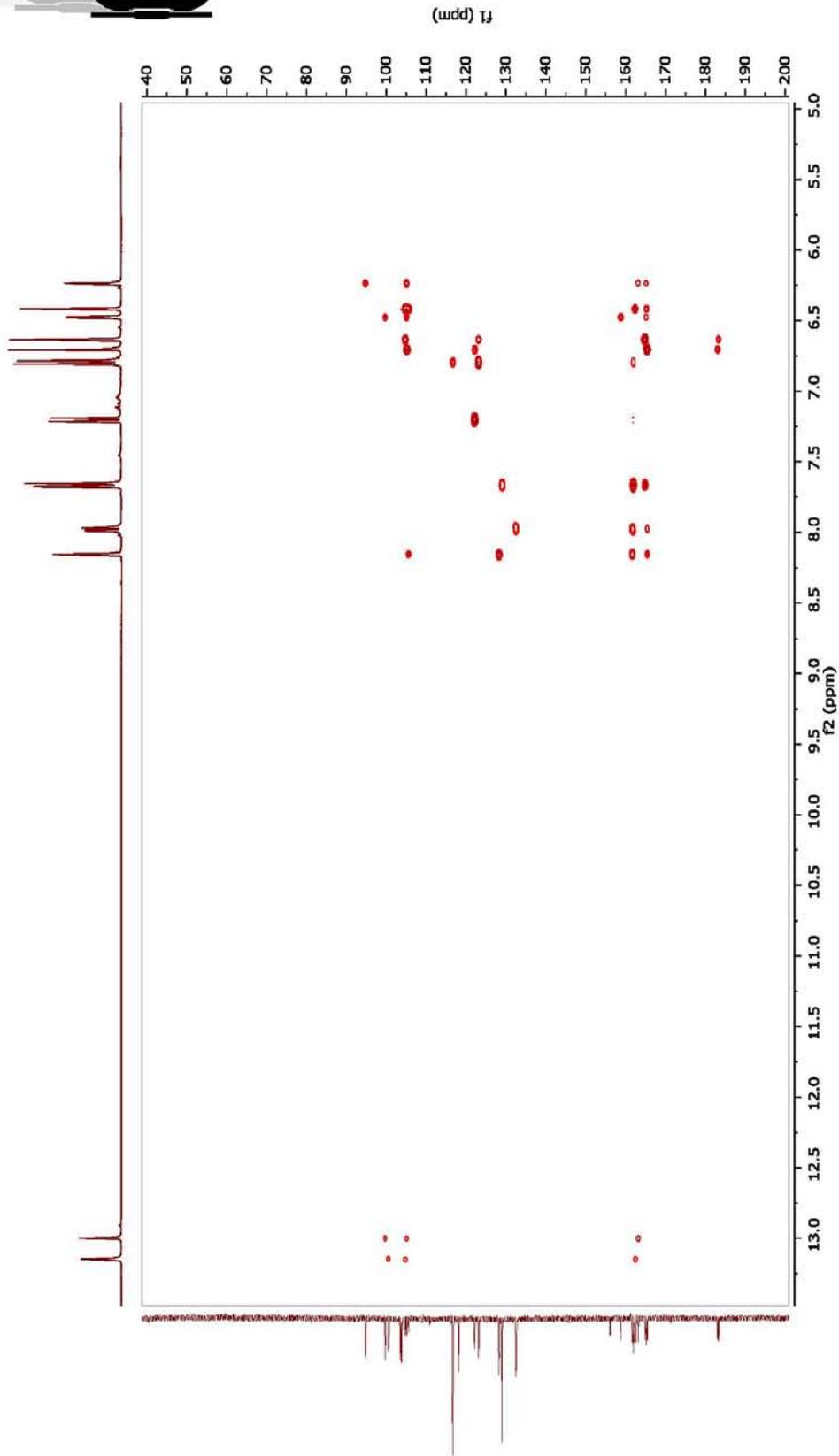
ANEXO 14. RMN-¹H de amentoflavona (400 MHz, acetona-d₆)



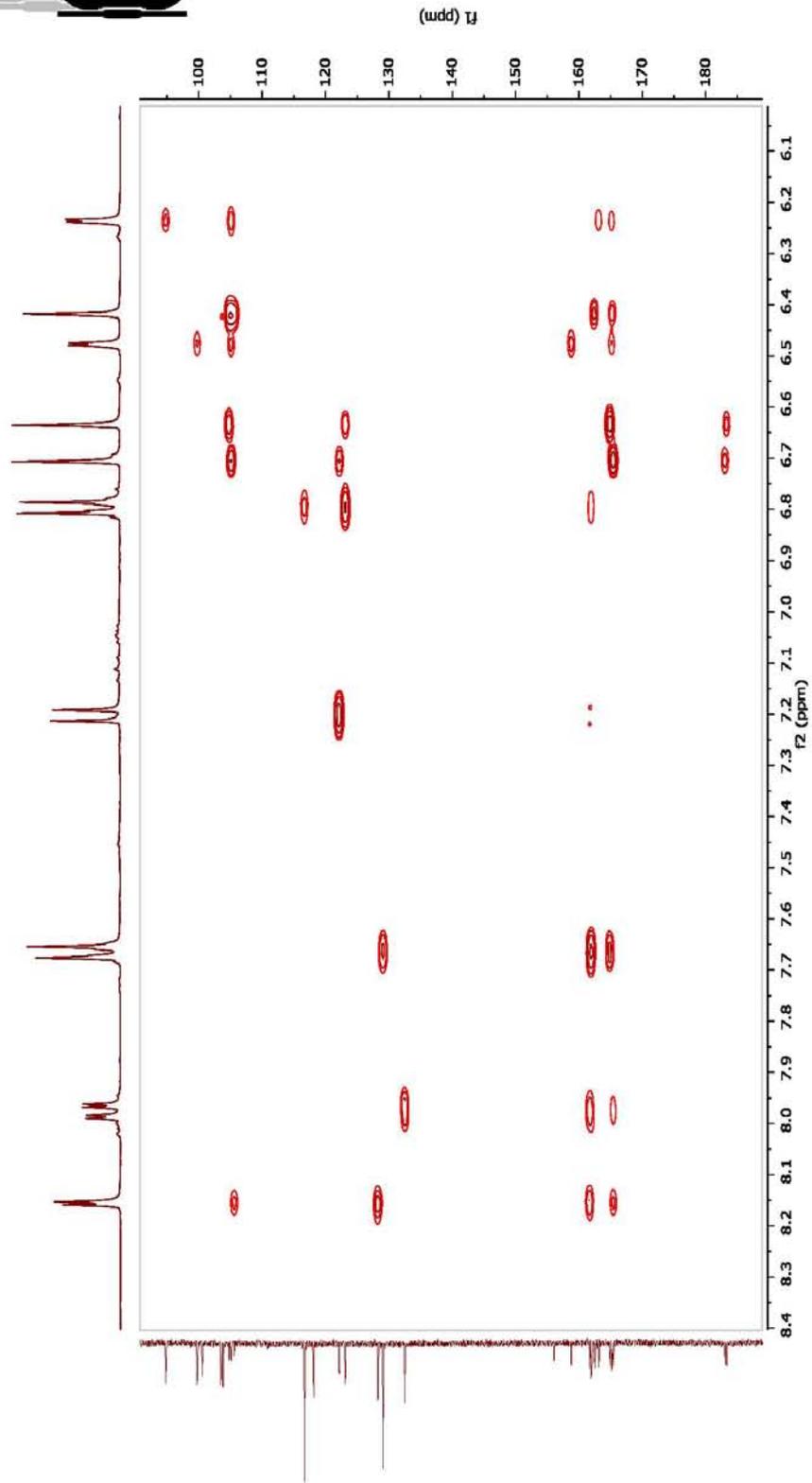
ANEXO 15. RMN-¹H de amentoflavona (400 MHz, acetona-d₆) expansión 6.2 a 8.2



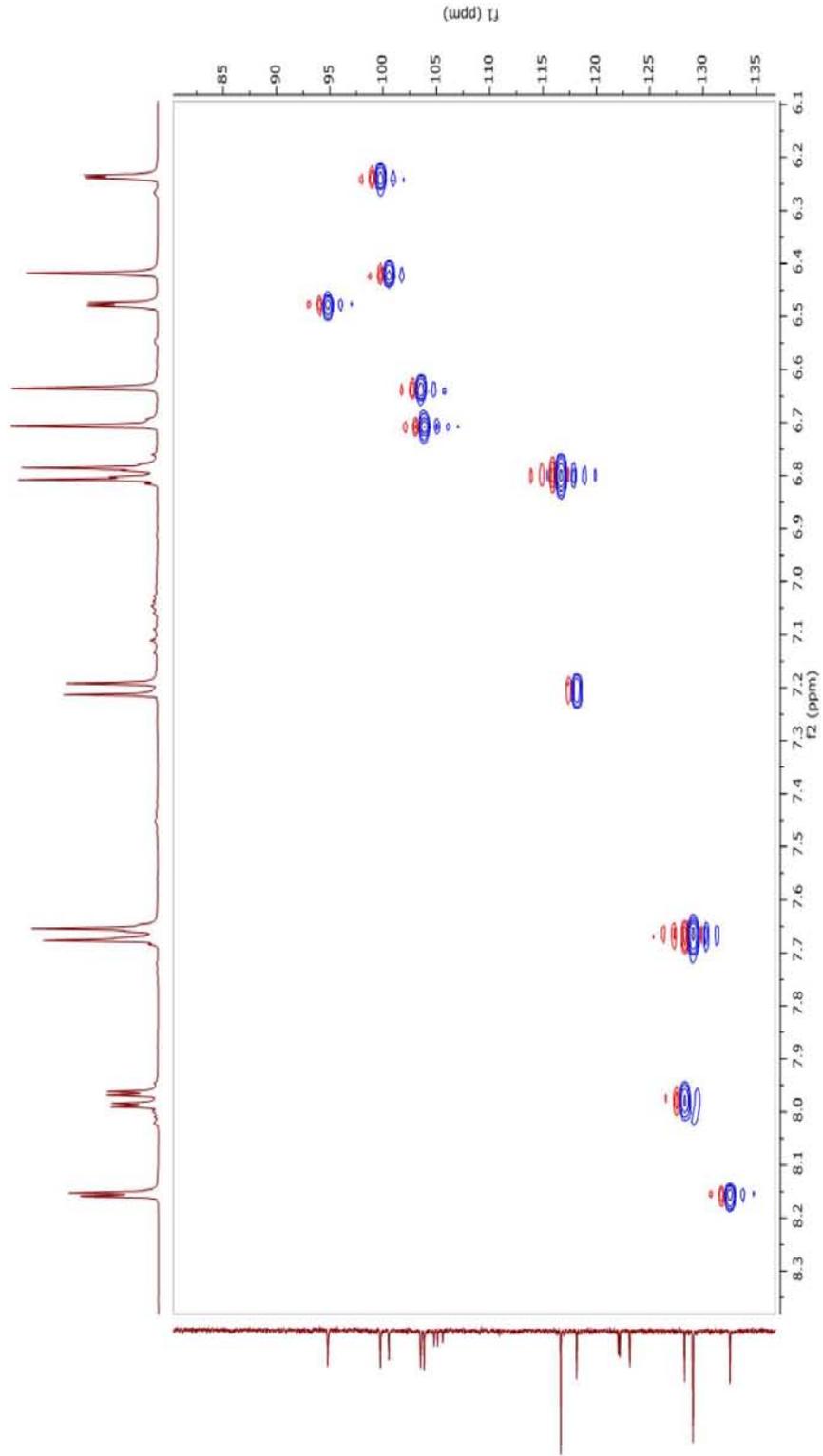
ANEXO 17. RNM modalidad COSY deamentoflavona (400 MHz, acetona-d₆) expansión 6.1 a 8.2



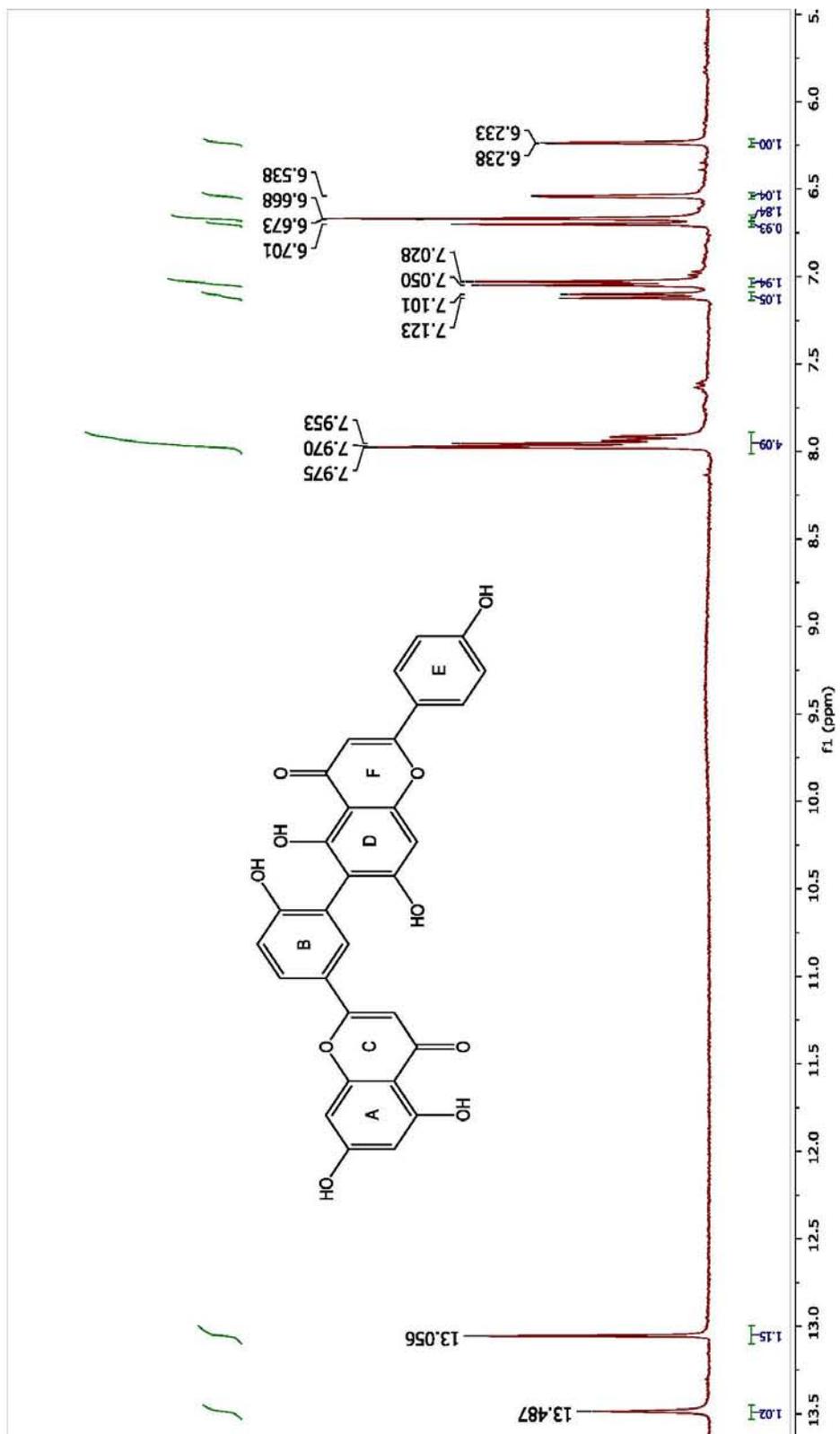
ANEXO 18. RMN modalidad HMBC de amentoflavona (400 MHz, acetona- d_6)

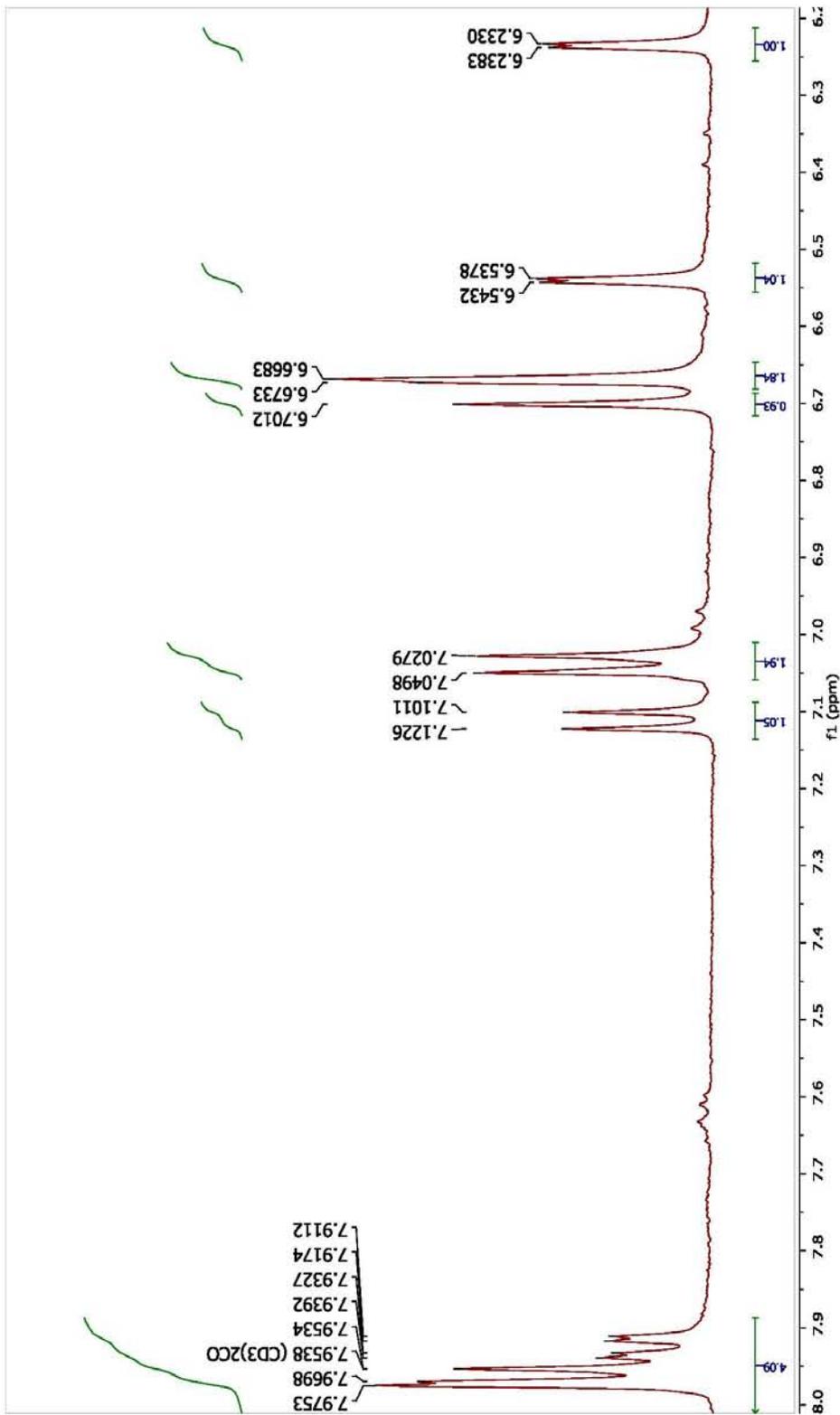


ANEXO 19. RMN modalidad HMBC de amentoflavona (400 MHz, acetona- d_6) expansión de 6.1 a 8.3

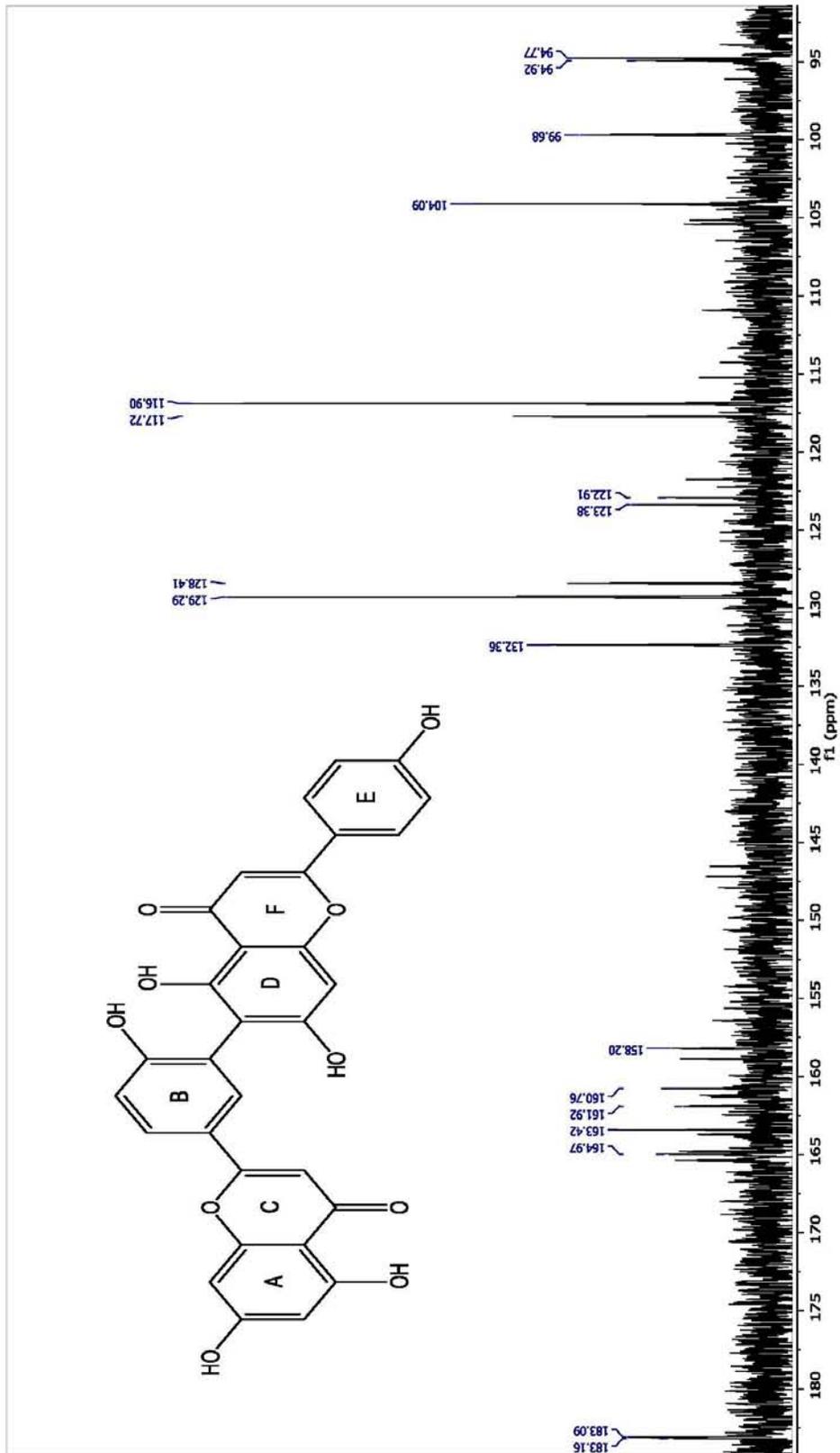


ANEXO 20. RMN modalidad HSQC de amentoflavona (400 MHz, acetona-d₆) ampliación 6.1 a 8.3

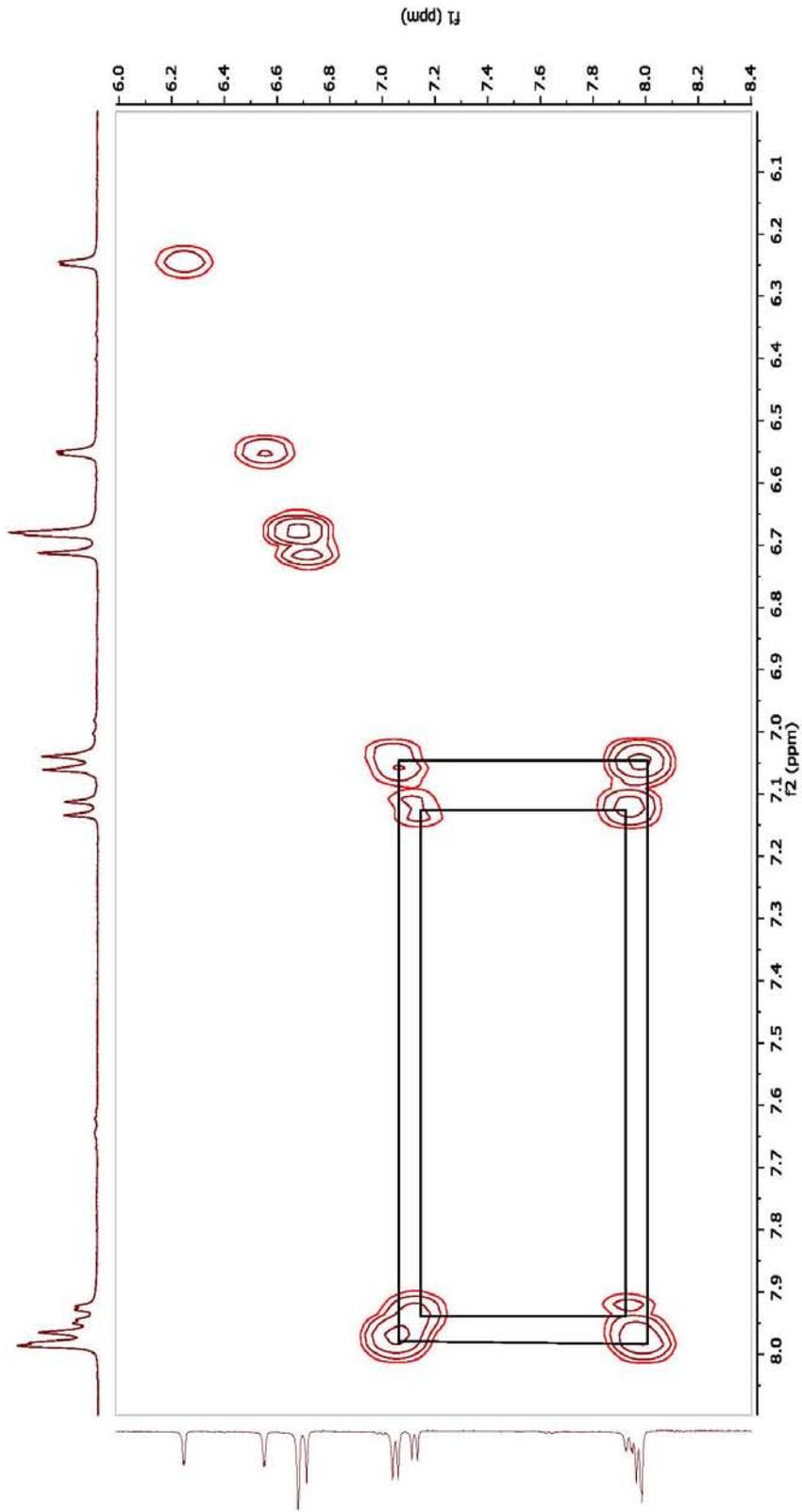
ANEXO 21. RMN- ^1H de robustaflavona (400 MHz, acetona- d_6)



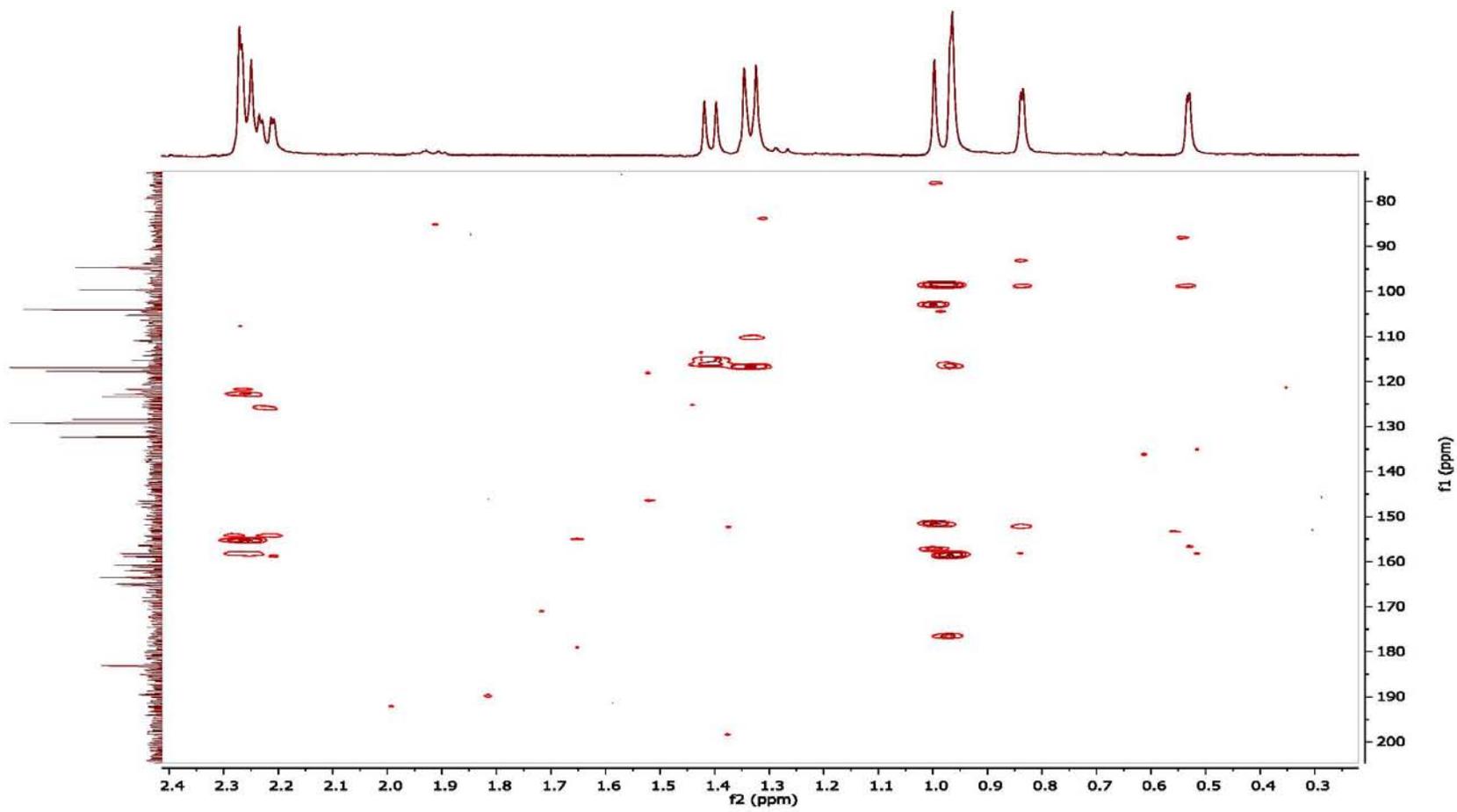
ANEXO 22. RMN-¹H de robustaflavona(400 MHz, acetona-d₆)



ANEXO 23. RMN- ^{13}C de robustaflavona (400 MHz, acetona- d_6)

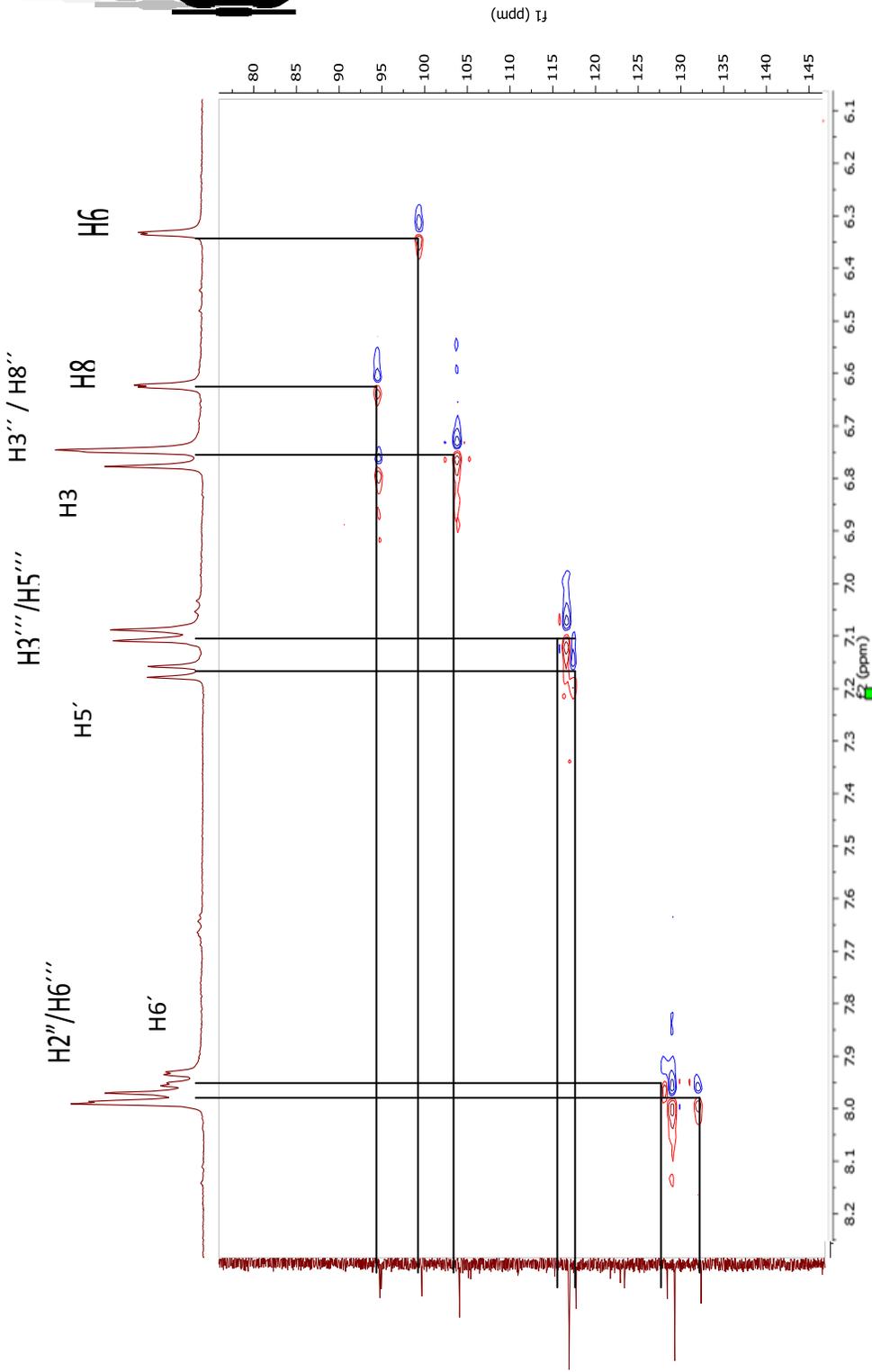


ANEXO 24. RNM modalidad COSY de **robustaflavona** (400 MHz, acetona-d6)



ANEXO 25. RMN modalidad HMBC de **robustaflavona** (400 MHz, metanol-d4) expansión de 6.1 a 8.3





ANEXO 26. RMN modalidad HSQC de **robustaflovona** (400 MHz, metanol-d4) ampliación 6.1 a 8.2