UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL I

* 5 3 0 9 5 4 1 6 5 0 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FLAVONOIDES EN BARTRAMIACEAE SCHWAEGR. (MUSCI, BRYOPHYTA): ASPECTOS QUIMIOSISTEMATICOS Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

TESIS DOCTORAL

Autor:
JOSE ANTONIO LOPEZ SAEZ

DIRECTORA
María José Pérez Alonso

DIRECTOR
Arturo Velasco Negueruela

V°B° Directora

V°B° Director

Madrid 1994

Dulzura de felicidad y fantasía
estallido de verata y de sopa de tomate.
A esos ojos de refrán azul, de amor infinito.
A tí abuela Nasta debo mi vida
mi carácter y mi ilusión.
No nos dejarás nunca!,
pues siempre estarás a nuestro lado.

(José Antonio López Sáez)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Profª. Dra. María José Pérez Alonso y al Prof. Dr. Arturo Velasco Negueruela, directores de esta Memoria Doctoral, su amistad y múltiples enseñanzas, así como la constante supervisión de mi trabajo.

Así mismo, quisiera agradecer a la Profª. Dra. Eugenia Ron Alvarez, el haberme introducido en este "mundo de la investigación" y aconsejado en todo momento.

Al Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba, Director del Departamento de Biología Vegetal I de la Universidad Complutense de Madrid, por acogerme y permitirme el uso del material e instalaciones del mismo.

Al Departamento de Celulosas del I.N.I.A., Madrid, (Dra. Concepción García Vallejo, Elvira y Estrella), al Dr. Jesús Sanz Perucha del Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C.), y a la Dra. Ana San Felix del Instituto de Química Médica (C.S.I.C.) por su imprescindible colaboración en la metodología empleada.

Al Prof. Dr. H.D. Zinsmeister, Director del Departamento de Botánica de la Universidad de Saarlandes, Saarbrücken (Alemania) por permitirme la estancia en su Laboratorio durante tres meses, así como al resto del Equipo de Investigación Interdepartamental de la Universidad de Saarlandes, en particular al Prof. Dr. H. Geiger, supervisor de mi trabajo y amigo, y a mis compañeros Ariane, Rüdi, Michaela, Judith, Marion, Ludwig, Ralph, Hannelore, Andrea K., Andrea S., Cristina y Ursula. A los Prof. Dr. R. Mües, Prof. Dr. T. Eicher y Prof. Dr. H. Becker, de la misma Universidad, por su simpatía, ayuda y enseñanzas. A Miguel Cunat-Walter (Departamento de Química-Física, Universität des Saarlandes), amigo y barcelonista acérrimo, traductor inesperado. A Ivan A. Valdespino (The New York Botanical Garden, U.S.A.) por sus comentarios, consejos y material facilitado.

A los Drs. M. Onraedt (Malonne, Bélgica), Dr. Jinwoong Kim (Seoul National University, College of Pharmacy, Seoul, Korea) y Dr. E. Hegewald (Forschungszentrum Jülich, Alemania) en agradecimiento por las muestras vegetales y patrones químicos enviados.

A los Drs. K.H. Lee (The University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Dr. Carlos Vicente Córdoba (Departamento de Biología Vegetal I-Fisiología, Universidad Complutense, Madrid), Dr. Richard Spjut (World Botanical Associates, Laurel, Maryland, USA), Drs. Gordon Cragg y Anthony B. Mauger (Department of Health & Human Services, National Cancer Institute, N.C.I., USA), Dra. Rosa Castaldo Cobianchi (Dipartamento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Italia), Dra. Itziar Aguinagalde (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica, Madrid) y al Dr. Vanden Berghe (Universiteit Antwerpen, Bélgica) por realizar los ensayos anti-VIH, antitumorales y antimicrobianos así como diferentes bioensayos acerca de las propiedades antibióticas de los flavonoides identificados en la presente Memoria Doctoral.

A mis compañeros del Departamento de Biología Vegetal I, en especial a Belén, Elena, Ascen, Luis, Miguel, Arancha, Marta (y Javi), Graciela y María, y profesores del mismo, por su interés y amistad.

A Milagros, Paco, Roge y Laura, por su cariño y por soportarme en las mil salidas al campo

y venir conmigo al "fin del mundo". Un recuerdo especial a Pedro y Raquel.

Al Prof. Enrique Pandolfi (Universidad de Montevideo, Uruguay) y su familia, Lydia y Juanpi, por su impagable compañía y conversación, y por compartir la soledad de la gran "urbe china".

Agradezco así mismo a la Comunidad Autónoma de Madrid el haberme concedido una Beca Predoctoral, así como una Ayuda para Estancias Breves en Centros de Investigación en el Extranjero, sin las cuales, difícilmente podría haber salido hacia delante este trabajo.

A mi familia, a mis padres, hermano y ambas abuelas. A "Raqui", "Manchi" y "Humprey". A "Chacal", "Galgo", "Tigre", "Cris", "Rascallús" y tantos otros, por su soledad.

A todos ellos les agradezco profundamente su ilusión y confianza.

Finalmente, no debo olvidarme y jamás lo haré, de mi difunto "Ford Fiesta" (M-5561-JN), santo y seña de mis salidas al campo, hotel improvisado de musgos, hepáticas, aromáticas y demás seres vivientes. Quedó exhausto en mitad del camino, allí donde ya se huele Alemania, pero por desgracia no la llegó a conocer. En su honor y por su recuerdo, me propuse olvidarme de mis miedos y cobardías: «hablé alemán sin saberlo y entendí inglés sin saber cómo, olvidé y sigo olvidando». Sin tí esta Tesis sería nada y "tú" lo fuíste todo.

INDICE

1. INTRODUCCION 1
2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO 6
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS 7
3.1. La familia *Bartramiaceae* Schwaegr. 7
3.1.1. Subfamilias de *Bartramiaceae* Schwaegr. 9
3.1.2. Las especies ibéricas del género *Bartramia* Hedw. 14
3.1.2.1. *Bartramia halleriana* Hedw. 16
3.1.2.2. *Bartramia ithyphylla* Brid. 17
3.1.2.3. *Bartramia pomiformis* Hedw. 18
3.1.2.4. *Bartramia stricta* Brid. 19
3.2. Flavonoides 21
3.2.1. Flavonoides en musgos 24
3.2.2. Relaciones entre la composición flavonoídica de *Musci* y otros taxones 38
3.3. Actividad Biológica 43
3.3.1. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida 50
4. MATERIAL Y METODOS 58
4.1. Material biológico 58
4.2. Flavonoides 69
4.2.1. Extracción 69
4.2.1.1. Metodología auxiliar 69
4.2.1.2. Metodología general 71
4.2.2. Técnicas analíticas 75
4.2.2.1. Cromatografía 75
4.2.2.2. Espectrofotometría de ultravioleta 90
4.2.2.3. Resonancia Magnética Nuclear 93
4.2.2.4. Espectrometría de Masas 98
4.2.2.5. Hidrólisis ácida 100
4.3. Actividad Biológica 101
5. RESULTADOS 107
5.1. Flavonoides 107
5.1.1. Análisis mediante TLC de la familia *Bartramiaceae* Schwaegr. 108
5.1.2. Resultados cromatográficos de las especies centrales de la Memoria Doctoral 136
5.1.2.1. *Bartramia halleriana* Hedw. 136
5.1.2.2. *Bartramia ithyphylla* Brid. 137
5.1.2.3. *Bartramia pomiformis* Hedw. 139
5.1.2.4. *Bartramia stricta* Brid. 142
5.1.2.5. *Dicranum scoparium* Hedw. 145
5.1.3. Resultados analíticos de los compuestos identificados 148
5.1.3.1. Compuesto I 148
5.1.3.2. Compuesto II 153
5.1.3.3. Compuesto III 158
5.1.3.4. Compuesto IV 163
5.1.3.5. Compuesto V 168
5.1.3.6. Compuesto VI 173
5.1.3.7. Compuesto VI 179
5.1.3.8. Compuesto VIII 184
5.1.3.9. Compuesto IX 189
5.1.3.10. Compuesto X 194
5.1.3.11. Compuesto XI 200
5.1.3.12. Compuesto XII 205
5.1.3.13. Compuesto XIII 211
5.1.3.14. Compuesto XIV 213
5.1.3.15. Compuesto XV 215
5.2. Actividad Biológica: anti-VIH 217

6. DISCUSION 220
6.1. Flavonoides 221
6.1.1. Identificación de compuestos 221
6.1.1.1. 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona (Compuesto I) 221
6.1.1.2. 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona (Compuesto II) 226
6.1.1.3. *Filonotisflavona (Compuesto III)* 232
6.1.1.4. 2,3-dihidro-filonotisflavona (Compuesto IV) 237
6.1.1.5. Dicranolomina (Compuesto V) 242
6.1.1.6. Bartramiaflavona (Compuesto VI) 247
6.1.1.7. Anhidro-Bartramiaflavona (Compuesto VII) 255
6.1.1.8. Bartramia-Triluteolina (Compuesto VIII) 259
6.1.1.9. Epi-Bartramia-Triluteolina (Compuesto IX) 262
6.1.1.10. Ciclo-Triluteolina (Compuesto X) 268
6.1.1.11. 5'-hidroxi-amentoflavona (Compuesto XI) 274
6.1.1.12. Acido Bartrámico (Compuesto XII) 280
6.1.1.13. Diosmetina-7-O-triglicósido (Compuesto XIII) 284
6.1.1.14. Apigenina-7-O-triglicósido (Compuesto XIV) 285
6.1.1.15. Luteolina-7-O-neohesperidósido (Compuesto XV) 286
6.1.1.16. Otros compuestos fenólicos: ácidos fenólicos y cumarinas 287
6.1.2. Flavonoides en *Bartramiaceae* Schwaegr. y *Dicranaceae* Schimp. 288
6.1.2.1. Distribución de flavonoides en *Bartramiaceae* Schwaegr. 288
6.1.2.2. Flavonoides y estatus taxonómico 298
6.1.2.3. Flavonoides en *Dicranaceae* Schimp. 302
6.1.2.4. Variación fenológica de la composición flavonoídica 302
6.1.2.5. Variación de la composición flavonoídica según la localización geográfica 304
6.2. Actividad Biológica 305
7. RESUMEN Y CONCLUSIONES 309
8. BIBLIOGRAFIA 313
ANEXOS 340

1. INTRODUCCION

El trabajo de investigación que se presenta se engloba dentro del Proyecto de Investigación PB88-0133, subvencionado por la D.G.I.C.Y.T., titulado "Estudio de la capacidad de síntesis de flavonoides en musgos (*Bryopsida*) en relación con el nivel de organización anatómica y los patrones de desarrollo protonemático", como consecuencia del cual, se ha llevado a cabo la presentación de distintos trabajos y comunicaciones a congresos fruto de las investigaciones realizadas acerca de la composición flavonoídica de diversas especies de musgos (Cordero, 1990; Estébanez, 1991; López-Sáez, 1992; Ron & col., 1990 y 1992; Geiger & col., 1993b). En la presente Memoria Doctoral nos hemos centrado particularmente en el **Estudio Quimiosistemático y de Actividad Biológica** de los **Compuestos Flavonoídicos** aislados e identificados en la familia ***Bartramiaceae*** Schwaegr.

Una gran variedad de sustancias químicas han sido utilizadas en la Sistemática Vegetal. Ésta incluyó primeramente moléculas y metabolitos como el ADN (ácido desoxirribonucleico), las proteínas o los lípidos, y posteriormente los llamados "**metabolitos secundarios**", como los alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos entre los que se incluyen los flavonoides. Dichos metabolitos secundarios muestran una distribución más restringida que los metabolitos primarios. A su presencia limitada a determinados taxones, y su aparición, muy probablemente deban ese significado ecológico, sistemático y filogenético tan importante que permite usarlos como trazadores quimiosistemáticos (Bell & Charlwood, 1980; Swain, 1980; Seigler, 1981; Zinsmeister & Mües, 1990). Además, como señalaba Erdtman (1956), desde un punto de vista taxonómico, las sustancias de mayor valor parecen ser aquellas que no intervienen directamente en las vías metabólicas principales, a las cuales denominó **metabolitos secundarios**. La mayoría de los conocidos son de origen vegetal (Bell & Charlwood, 1980; Gibbs, 1974; Hegnauer, 1962-86), aunque muchos de ellos han sido identificados en hongos, bacterias o animales marinos sésiles (De Ley & Kersters, 1975; Scheuer, 1973; Turner, 1971).

¿Cúal es el valor que posee esa gran variedad de productos del metabolismo secundario con que cuenta el Reino Vegetal?. ¿Es acaso un "capricho" de la evolución, una diversidad innecesaria? (Swain, 1977a). Difícil contestación se puede ofrecer a estas preguntas si aún no conocemos una gran parte de los metabolitos secundarios y, en muchos casos, se desconoce por completo su actividad biológica. Surge pues, necesariamente, la obligatoriedad de realizar trabajos de investigación en **ambos sentidos** que nos permitan no sólo elucidar estructuras químicas y llegar a conclusiones sistemáticas, sino también conocer el modo de acción de dichos compuestos y el porqué de su presencia en los vegetales. Con seguridad, el papel desempeñado por dichos metabolitos secundarios supondrá una importante función en el vegetal, relacionada posible y directamente con su propia evolución (Swain, 1974, 1975, 1977b y 1980).

La evolución y origen de los briófitos todavía permanece oscura en cuanto al eslabón directo que los relaciona con su antepasado (Smith, 1986). Su problemática evolutiva supone un reto tanto para los investigadores en Sistemática Vegetal como para los paleobotánicos (Mües, 1989; Herout, 1990; Seeligmann, 1990). Hoy en día, aún podemos preguntarnos cuál es el origen de las plantas

verdes (espermatófitas), briófitos y pteridófitos, cómo se han desarrollado y diferenciado. Los botánicos han considerado estas cuestiones desde distintos puntos de vista: citológico, ecológico, morfológico y paleontológico.

Tradicionalmente han sido consideradas básicamente dos hipótesis acerca de la evolución de los briófitos. La primera es la "Teoría progresiva", donde se supone que los briófitos tienen su origen en las algas verdes y que los pteridófitos derivan a su vez de éstos. La segunda hipótesis, la "Teoría reducionista", considera que las algas verdes han sido el antepasado de *Rhyniophyta*, a partir de las cuales han evolucionado briófitos y pteridófitos. Ambas hipótesis han sido ampliamente discutidas y ambas tienen defensores y detractores (Asakawa, 1986). Dichas cuestiones se complican aún más si consideramos particularmente el posible origen mono- o polifilético dentro de los propios briófitos (Smith, 1986).

Las características bioquímicas, en cambio, no han sido debidamente consideradas o se las ha prestado poca atención, a la hora de estudiar las interrelaciones entre algas, briófitos y pteridófitos, cuando, en cambio, poseen un alto interés quimiosistemático y filogenético, fruto de los propios resultados obtenidos (Swain, 1980).

Durante los últimos 25 años, los estudios fitoquímicos de briófitos han agregado una serie de nuevas características, con la ayuda de criterios adicionales, en la clasificación de dichos vegetales. En este sentido se ha ampliado notablemente el campo de estudio, sobre todo en cuanto a metabolitos secundarios se refiere. Terpenos, flavonoides y lípidos, durante estos últimos años, han sido la base de numerosas investigaciones sobre la fitoquímica de briófitos, tanto desde el punto de vista de su composición química, su fisiología, propiedades antibióticas, como su quimiosistemática. Terpenos y compuestos fenólicos han sido, y son en la actualidad, los metabolitos secundarios más investigados en *Bryophyta* (Mües, 1989 y 1990).

No obstante, el número de trabajos relativos a la química de briófitos a pesar de su rápido incremento en este último cuarto de siglo, no pasa de los 700, de ahí que surjan inexcusables dificultades, de gran índole, a la hora de evaluar los datos químicos de que se disponen, tanto por fitoquímicos como por taxónomos (Mües, 1985).

La primera publicación sobre la química de los briófitos se debe a Lohmann (1903), quien reconoce la presencia de aceites esenciales en los cuerpos oleíferos de ciertas hepáticas que actúan como inhibidores de la depredación por caracoles. Dos años después, Müller (1905) publica un trabajo acerca de los aceites esenciales de cuatro nuevas hepáticas. Después de un periodo cercano a los 60 años, durante los cuales únicamente aparecen algunas nuevas investigaciones concernientes a la química de musgos y hepáticas (Molisch, 1911; Kozlowski, 1921), es a partir de 1956 cuando se produce el primer realzamiento de dichos estudios. Un equipo japonés (Fujita & col., 1956), comienza la investigación sobre los aceites esenciales en hepáticas mientras que un equipo sueco (Bendz & col., 1962), aporta la primera estructura completa de un flavonoide para varias especies del género *Bryum* Hedw. Así mismo, se inician en 1963 los importantes trabajos de Huneck (1963, 1967, 1969 y 1983) sobre la química de briófitos. Posteriormente, y de manera constante, se ha ido incrementando el número de trabajos publicados al respecto. Markham & Porter (1978a) discuten el significado de los compuestos químicos en la evolución y sistemática de briófitos. Asakawa (1981 y 1982) enfatiza la importancia quimiotaxonómica de terpenoides y aromáticos lipofílicos en hepáticas;

mientras que Huneck (1983) menciona en su profunda revisión bibliográfica, la importancia de terpenoides y compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, en la clasificación de los briófitos. Finalmente, Suire (1975), Suire & Asakawa (1979 y 1982) y Zinsmeister & col. (1991), realizan una extensa recopilación sobre diversos metabolitos primarios y secundarios de briófitos, donde ponen de manifiesto su importante actividad biológica.

Lo que al fin y al cabo queda claramente puesto de manifiesto es que, distintos metabolitos, tanto del metabolismo primario como secundario, pueden ser utilizados sin discusión como importantes marcadores quimiosistemáticos (Anderson & col., 1974; Asakawa, 1986; Asakawa & col., 1979a; Beutelmann & col., 1992; Cody & col., 1986; Harborne, 1975 y 1993; Huneck, 1983; Mües, 1989; Seigler, 1981; Zinsmeister & col., 1991; López-Sáez, 1992).

Así mismo, la actividad biológica que muestran muchos de estos compuestos, sobre todo sus propiedades antibióticas (Asakawa & col., 1978 y 1980b; Becker, 1989; Benesová & Herout, 1972; McCleary & col., 1960; McCleary & Walkington, 1966; McClure, 1986; Van Hoof & col., 1981; Wolters, 1964a y b; Zinsmeister & Mües, 1987; Zinsmeister & col., 1987 y 1991), ofrece un campo de investigación novedoso y amplio, cuyos resultados pueden ser sumamente interesantes, de ahí que a través de nuestro trabajo hayamos querido refrendarlos. Entre ellos y durante las dos últimas décadas, se ha acumulado mucha información sobre los lípidos y ácidos grasos de musgos (Al-Hasan & col., 1989, 1990 y 1991; Gellerman & col., 1975; Hartmann & col., 1986; Grimsley & col., 1981; Koskimies-Soininen & Nyberg, 1987; Marsili & col., 1972; Radwan 1975; Sievers, 1992; Solberg, 1983; Somersalo & col., 1986; Vandekerkhove & col., 1984) así como sobre el significado quimiosistemático de éstos (Beutelmann & col., 1992; Kohn & col., 1987).

En cuanto a terpenoides, desde hace bastante tiempo, se conoce que los musgos no producen ni forman "cuerpos oleíferos" y, consecuentemente, se ha considerado que carecen de terpenos y otros variados compuestos lipofílicos, sí presentes en hepáticas (Mües, 1990). En cambio, sí parece haber quedado demostrado, a la vista de las numerosas investigaciones realizadas, que la mayoría de las hepáticas cuentan principalmente con los terpenoides y otros compuestos aromáticos lipofílicos, como los elementos constituyentes de los cuerpos oleíferos (Asakawa, 1990). No obstante, la ausencia de cuerpos oleíferos en musgos, no es óbice para que éstos sí puedan sintetizar otro tipo de terpenoides, que no forman parte de los denominados "aceites esenciales". Así lo ponen de manifiesto Zinsmeister & col. (1991), quienes citan en su trabajo de recopilación, la presencia en musgos de monoterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Al contrario que mono- y sesquiterpenos, los diterpenos aparecen comúnmente tanto en musgos como en hepáticas, aunque más frecuentemente en las últimas (Herout, 1990; Huneck, 1983).

Hasta el presente, más de 200 nuevos compuestos correspondientes a terpenoides, han sido aislados y sus estructuras elucidadas en *Hepaticae* (Huneck, 1983). Asakawa (1990) realiza una excelente revisión de éstos, que incluye básicamente los típicos esqueletos sesqui- y diterpénicos que aparecen en hepáticas. Así mismo, afirma, al igual que Huneck (1983), la ausencia de mono- y sesquiterpenos en las clases *Musci* y *Anthocerotae*. Una recopilación de las propiedades farmacológicas de éstos y otros compuestos de briófitos es expuesta por el mismo autor y Marsili & col. (1972).

A los esqueletos monoterpénicos se debe generalmente el fuerte olor que desprenden algunas

hepáticas (Zinsmeister & col., 1991). Todos los monoterpenos conocidos de hepáticas corresponden, casi enteramente, a compuestos ya conocidos en las plantas vasculares (Connolly, 1990). En cambio, de los sesquiterpenos se conocen aproximadamente 50 estructuras diferentes, únicamente aisladas en hepáticas (Zinsmeister & col., 1991). Entre ellas se incluyen los barbatanos (gimnomitranos), pinguisanos, 2,3-seco-aromadendrenos, miltailanos y vitranos (Connolly, 1990; Huneck, 1983; Zinsmeister & col., 1991; Asakawa, 1982).

En musgos han sido identificados diterpenoides de cadena abierta tales como el fitol en *Dicranum elongatum* Scheleich. (Ekman & Karunen, 1980), y genaril-geraniol (hexadehidro derivado diterpénico) en esporas de *Polytrichum commune* Hedw. (Liljenberg & Karunen, 1978); así como otros diterpenos en *Saelania glaucescens* (Hedw.) Broth.: ent-kaurenoides (diterpenoides tetracarbocíclicos) (Nilsson & Martensson, 1971).

Los derivados isoprenoides de 30 átomos de carbono (triterpenos) son mucho más raros en briófitos que sus homólogos mono-, sesqui- y diterpenos (Herout, 1990). Huneck (1983) recoje un total de 15 triterpenos identificados en musgos. Estos compuestos, en musgos, son básicamente del tipo fernano, tales como el ácido ursólico, y compuestos intermediarios entre triterpenoides y esteroides (Asakawa & col., 1979a). Entre ellos podemos citar al escualeno, identificado en *Mnium cuspidatum* Hedw. y *Mnium medium* B.S.G. (Gellerman & col., 1972 y 1975), y diversos derivados del hopano (Asakawa & col., 1979a; Marsili & Morelli, 1968 y 1970; Marsili & col., 1971), como los más representativos. Los triterpenos derivados de los tipos fernano y hopano no han sido identificados hasta el momento en algas ni hepáticas, de ahí que posean un significado quimiosistemático relevante (Asakawa & col., 1979a y b, 1980a).

En contra de lo expuesto por Asakawa (1990), Koponen & col. (1990) ponen de manifiesto la presencia de monoterpenos, en diversas especies de *Splachnaceae* Grev. & Arnott, familia que peculiarmente engloba distintas especies cuya dispersión esporal se realiza por insectos, de ahí que exhiban un olor de atracción característico. Entre ellos, deben destacarse el α-felandreno y β-felandreno en *Splachnum luteum* Hedw. y *Splachnum rubrum* Hedw., así como el α-pineno en la última especie.

Finalmente, debemos citar la presencia de una lactona sesquiterpénica, la 15-metoxiansamitocina P-3, en dos especies de musgos (Sakai & col., 1988), que muestra una importante actividad antitumoral.

En *Bartramiaceae* no se ha conocido hasta hace poco, ningún trabajo relativo al componente terpenoídico. Las únicas referencias son la de Strain (1958) sobre los carotenoides de *Philonotis fontana* (Hedw.) Brid. y la de López-Sáez (1992) sobre los terpenoides y otros compuestos volátiles del género *Bartramia* Hedw.

No obstante, tanto la química de **lípidos** como de compuestos **terpenoídicos** jugará un papel fundamental en trabajos futuros sobre la química y sistemática de musgos (López-Sáez, 1992; Zapp, 1992; Sievers, 1992). Hecho similar puede afirmarse de **cumarinas** y **ácidos fenólicos** (Anhut, 1992; Kinzel & Walland, 1966; Jung, 1993-94; Salm, 1994; Gross, 1981; Davidson & col., 1989; Trennheuser, 1992), **esteroles** (Chiu & col., 1985), así como de los **alcaloides** del tipo alantoina principalmente (Anhut, 1992).

Sin lugar a dudas, y tal y como se revela en la actualidad, son los compuestos fenólicos,

principalmente **flavonoides**, los que acaparan la mayoría de trabajos sobre quimiosistemática y filogenia, ya no sólo de gimnospermas (Niemann & Van Genderen, 1980; Quinn & Gadek, 1981), y angiospermas (Bate-Smith, 1963; Harborne, 1977; Crawford, 1978; Gornall & col., 1979; Gershenzon & Mabry, 1983; Kubitzki & Gottlieb, 1984; Seeligmann, 1990; Harborne & Turner, 1984; Greger, 1985; Hegnauer, 1986), sino también de pteridófitos (Cooper-Driver, 1980; Markham & Moore, 1980; Cooper-Driver & Haufler, 1983; Wollenweber, 1981 y 1982) y hepáticas (Campbell & col., 1979; Markham & col., 1977). En musgos, dichos estudios quimiosistemáticos están aún iniciándose, a pesar de que el número de trabajos aumenta constantemente. Basta con comparar los datos expuestos por Mües & Zinsmeister (1988), con los de Mües (1990), entre los que se puede observar un incremento notable en el número de especies estudiadas y compuestos cuya estructura ha sido elucidada.

Los constituyentes fenólicos de briófitos se pueden dividir en dos grupos: los que poseen un solo anillo aromático y, los que poseen dos o más. Los compuestos del primer grupo (alquilfenoles, éteres y glicósidos fenólicos, ésteres y ácidos fenólicos) son muy comunes en hepáticas, y pocas veces se han detectado en musgos (Mües & Zinsmeister, 1988). Los compuestos del segundo grupo se subdividen a su vez en ésteres, bibenzilos, bisbibenzilos, flavonoides y otras estructuras variadas aromáticas. Todos ellos, excepto flavonoides y esfagnorrubinas se conocen únicamente en hepáticas.

Los flavonoides se han utilizado profusamente como marcadores en taxonomía vegetal (Bate-Smith, 1963; Cody & col., 1986; Harborne, 1975, 1984 y 1993; Seeligmann, 1990; Swain, 1980). Existe en general una tendencia evolutiva de incrementar la complejidad estructural de los flavonoides desde la línea algal hasta las angiospermas (Harborne, 1967; Swain, 1986). De hecho se conoce la existencia de flavonoides estructuralmente sencillos en algas (Markham & Porter, 1969), de ahí que amparados en el postulado anterior sea fácil imaginar una linea evolutiva que relacione directamente algas con musgos. Generalmente se ha supuesto la presencia de compuestos primitivos de baja complejidad estructural en plantas igualmente primitivas (Richardson, 1983), o lo que es lo mismo, "*cuanto más elevado es el nivel de organización de un vegetal, tanto más compleja es su capacidad biosintética*" (McNair, 1935; Erdtmann, 1956; Seeligmann, 1990). No obstante, esta llamada "Doctrina de correlación" guarda numerosas dificultades en base al uso de tal generalización. Así por ejemplo, las 3-deoxiantocianinas fueron consideradas bajo el apelativo de "compuestos primitivos" tras ponerse de manifiesto su presencia en helechos, aunque investigaciones posteriores mostraron su también igual presencia en angiospermas (Gornall & col., 1979). Hecho semejante puede afirmarse de la presencia de auronas en algunas familias de angiospermas así como en briófitos, lo que podría sugerir una evolución paralela (Markham & Porter, 1978b).

Bajo este punto de vista, con perspectivas, por un lado, de contribuir a un mejor conocimiento de los caracteres químicos de este grupo botánico que son los musgos y, en cierta manera, como una contribución más para poder aclarar su confuso y oscuro origen filogenético, presentamos nuestro trabajo, que nos permitirá, en un futuro, aproximarnos a las relaciones de parentesco que existen entre el rango taxonómico elegido y otros cercanos a él. Así mismo, no hemos querido dejar pasar la oportunidad de realizar pruebas de actividad biológica de los flavonoides aislados e identificados en *Bartramiaceae* Schwaegr. y *Dicranaceae* Schimp., pues como la bibliografía así lo atestigua, los resultados esperados en un principio debían ser sumamente interesantes, esperanzadores y novedosos.

2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El confuso origen filogenético de los musgos, la posibilidad de utilizar ciertos compuestos de ellos aislados, por su actividad biológica, como puede ser antibiótica o antitumoral, y la escasez de estudios quimiosistemáticos para este grupo botánico, constituyen la razón que nos llevó a realizar y presentar nuestro trabajo.

El porqué de la elección de los **flavonoides** como trazadores quimiosistemáticos objeto de la presente Memoria Doctoral, creemos que ha quedado suficientemente contrastado en los comentarios aportados en el apartado anterior.

Ante todo, nos hemos centrado en el estudio de los flavonoides, por ser éstos los trazadores quimiosistemáticos mayormente estudiados en musgos. No obstante, en un trabajo anterior (Memoria de Licenciatura) ya realizamos un ensayo preliminar para detectar la presencia de otros trazadores del metabolismo secundario (terpenoides) y primario (lípidos), en base a la relevancia que están adquiriendo dichos compuestos en estos últimos años en la química de musgos.

La elección del material biológico recayó en la familia ***Bartramiaceae*** Schwaegr. por no haber sido apenas estudiada en este sentido y por reunir una serie de requisitos imprescindibles, tales como la importancia de los datos hasta ahora aportados: presencia de biflavonoides y macrociclos con posible interés antibiótico, triflavonoides y ácidos flavonoídicos.

Así mismo, y en referencia a las cuatro especies ibéricas del género ***Bartramia***, objeto de nuestra Memoria Doctoral, debemos decir que de acuerdo a la bibliografía, todas ellas se citaban como localizadas en la provincia de Madrid (Acón, 1988), lo que facilitó enormemente la elección del material biológico objeto de nuestra investigación. No obstante, debemos dudar de la cita de Cillero (1944) para *B. halleriana* Hedw. por la inexistencia de pliego testigo y tratarse de una especie de óptimo pirenaico-cantábrico (Casas & col., 1985-1992).

También se llevo a cabo el estudio de la composición flavonoídica de *Dicranum scoparium* Hedw., en base a la identificación en un ensayo previo de un nuevo biflavonoide hasta el momento no descrito, que a su vez nos sirvió como fuente de patrones químicos.

En cuanto a las investigaciones emprendidas acerca de la actividad biológica de los flavonoides aislados e identificados, éstas se llevaron a cabo dada la importancia actual, en el camino de estudiar la posible utilización de los flavonoides de musgos frente al **virus del sida**, ya que la importancia médica y social derivada de dichos estudios, podría en principio ser de más valor que otros ensayos de bioactividad.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

3.1. La familia *Bartramiaceae* Schwaegr.

La familia *Bartramiaceae* Schwaegr. es una de las más distintivas familias de musgos, fácilmente reconocibles por sus globosas y a menudo asurcadas cápsulas (Griffin III & Buck, 1989). De hecho, fue gracias a la morfología de la cápsula, cuando se puso más énfasis en el estudio de la familia y se describió ésta por primera vez (Schwaegrinchen, 1830).

Las especies de la familia *Bartramiaceae* quedan definidas por tratarse de especies típicamente erectas u ocasionalmente decumbentes, en ocasiones de tamaño pequeño pero robustas. Los caulidios son normalmente simples, fastigiados o irregularmente pinnados, y ocasionalmente pueden presentar innovaciones "subflorales" en las ramas a menudo puestas de manifiesto por un color rojizo y aparentemente tomentosas (Griffin III & Buck, 1989). Los filidios más comunes en la familia son de morfología lanceolada-acuminada, ovado-lanceolada y ovado-elíptica, imbricados y anchos, con base abrazadora, extrechos u ocasionalmente crispados, secundos o circinados en sequedad, y algunas veces más o menos falcados en los ápices de las ramas, longitudinalmente estriados a lisos, generalmente engrosados. Pelos axilares de morfología variable, algunos de 2 células, otros de 1-2 (-4) células basales a menudo pigmentadas, y otras veces con pigmentos confinados únicamente a las paredes transversales de las células intercalares, con células terminales hialinas más o menos globosas y algo elongadas, con o sin pared apical normalmente estrechada. Los pelos axilares han sido utilizados por Griffin III & Buck (1989) en la separación taxonómica de las distintas subfamilias de *Bartramiaceae*. Los gametófitos pueden ser monoicos (autoicos o sinoicos) y dioicos. La seta es frecuentemente elongada, más bien extrecha y raramente flexuosa a arqueada, y ocasionalmente muy corta con la cápsula inmersa no visible. Las cápsulas están ligeramente inclinadas o son horizontales, raramente erectas o péndulas, subglobosas u ovoides, raramente cilíndricas. Son generalmente estegocárpicas o raramente cleistocárpicas. Existen cápsulas simétricas según su apertura o asimétricas con apertura oblicua. Opérculo típicamente aplanado y umbonado, a menudo cortamente cónico o rostrado. El perístoma puede ser doble o simple o estar incluso ausente, existiendo por lo general en la familia una tendencia a su reducción, que normalmente va acompañada de cápsulas erectas o inmersas (Griffin III & Buck, 1989). Más información acerca de sus caracteres microscópicos (SEM) pueden ser consultados en Shaw (1985). Las esporas a menudo papilosas, son globosas, ovoides o reniformes, nunca apendiculadas. La caliptra es pequeña, cuculada y glabra. Kabiersch (1937) proporciona una ingente sumario sobre la diversidad morfológica de la familia.

Distintos conceptos han sido utilizados en un intento de establecer la filogenia y sistemática de la familia: ornamentación de los rizoides (Hirohama & Iwatsuki, 1980), anatomía del caulidio (Haberlandt, 1886; Kawai, 1982 y 1989; Ron & col., 1992; Velasco & col., 1991), morfología de los pelos axilares (Griffin III, 1990; Griffin III & Buck, 1989), ornamentación esporal (Griffin III & Acuña, 1983; Hirohama, 1977; Estébanez & col., 1992), desarrollo protonemático (Alcalde, 1994; Abella & col., 1992; Saito, 1959; Nishida, 1978; Nehira, 1983; Matteri, 1968), fitoquímica (Ron & col., 1992; Taylor & col., 1970; Velasco & col., 1991) y número cromosomático (Fritsch, 1982).

Debemos así mismo destacar los trabajos de Kabiersch (1936) sobre la filogenia de *Bartramiaceae* en relación con las *Mniaceae* Schwaegr.

La familia *Bartramiaceae* se subdivide en tres subfamilias (Griffin III & Buck, 1989), y agrupa unas 425 especies (Augier, 1966), bien diferenciadas, propias de las regiones tropicales del globo, siendo algunas especialmente abundantes en el Hemisferio Sur (Hirohama & Iwatsuki, 1980). En la clave que se acompaña a continuación se establece la separación en las 3 subfamilias de *Bartramiaceae*, y se aporta además una clave anexa para sus 11 géneros.

Clave taxonómica de las subfamilias y géneros de *Bartramiaceae*.

1. Filidios gruesos dispuestos en 5 filas, células de los filidios mamilosas, rizoides lisos, opérculo rostrado, pelos axilares de morfología intermedia entre las otras dos subfamilias .. Subfam. ***Conostomoideae***..... ***Conostomum***.
1. Filidios nunca dispuestos en 5 filas, células papilosas o lisas, rizoides papilosos, opérculo cónico a umbonado **2**
2. Plantas con innovaciones subflorales, pelos axilares cortos con células también cortas terminados en una célula globosa, esporas usualmente ornamentadas y espinosas ..... Subfam. ***Breutelioideae***.... **3**
2. Plantas sin innovaciones subflorales, pelos axilares largos de células elongadas y con una célula terminal no inflada, esporas por lo general sólo papilosas ..... Subfam. ***Bartramioideae*** ... **7**
3. Plantas normalmente robustas, filidios aplicados, con células alares diferenciadas ..... ***Breutelia***.
3. Plantas pequeñas, filidios no aplicados, sin células alares diferenciadas .. **4**
4. Caulidios foliáceos, filidios ovados muy rudimentarios con células lisas .....***Quathlamba***.
4. Caulidios con filidios extendidos, en su gran mayoría lanceolados, con células papilosas **5**
5. Células de los filidios con una única papila diminuta, célula apical de los pelos axilares colapsada, cápsulas lisas y cilíndricas con el cuello bien diferenciado ..... ***Fleischerobryum***.
5. Células de los filidios con papilas prominentes, célula apical de los pelos axilares globosa, cápsulas asurcadas o sólo arrugadas, sin cuello **6**
6. Caudilidos sin hialodermis, seta corta de 2-3 mm de largo, número cromosomático n= 7,8 ..... ***Anacolia***.
6. Caulidios con hialodermis, seta elongada, número cromosomático n= 6, 12 ..... ***Philonotis***.
7. Filidios no dispuestos en filas, células de los filidios papilosas, pelos axilares sin una célula terminal engrosada en su ápice **8**
7. Filidios dispuestos en 3 filas (trísticos), células de los filidios no papilosas, pelos axilares con una célula terminal engrosada en su ápice **10**
8. Células de los filidios papilosas sobre la luz, pelos axilares con células basales oscuras y el resto hialinas ..... ***Flowersia***.
8. Células de los filidios papilosas por proyección de las células terminales, pelos axilares con paredes oscuras entre las células pero éstas siempre hialinas **9**
9. Cápsulas exertas, caulidios con hialodermis ..... ***Bartramia***.
9. Cápsulas inmersas, caulidios sin hialodermis ..... ***Leiomela***.
10. Cápsulas pequeñas, oscuras y lisas, endostoma ausente ..... ***Catoscopium***.
10. Cápsulas grandes, no oscuras ni lisas, endostoma presente ..... ***Plagiopus***.

3.1.1. Subfamilias de *Bartramiaceae* Schwaegr.

1. Subfamilia *Bartramioideae*, en la que se incluyen los géneros *Bartramia* Hedw., *Catoscopium* Brid., *Leiomela* (Mitt.) Broth., *Plagiopus* Brid., y *Flowersia* Griffin & Buck.

1a. La familia *Catoscopiaceae* Brid. que incluye el género *Catoscopium* es en la actualidad considerada sinónima de *Bartramiaceae* (Griffin III & Buck, 1989), de tal manera que así la trataremos en esta Tesis, aunque floras menos recientes como las de Engler (1924), Herzog (1909 y 1926) y Augier (1966) consideren ambas familias por separado. Flowers (1935) y Lindberg (1879) ya tomaban en consideración las mismas conclusiones de Griffin III & Buck (1989). Adicionalmente, el género ha sido también ubicado dentro de la familia *Meesiaceae* Schimp., por Limpricht (1893) y Schimper (1855). El género *Catoscopium* cuenta con una única especie en el mundo, *C. nigritum* (Hedw.) Brid., la cual tiene importantes relaciones morfológicas con otro género de la subfamilia, *Plagiopus*, de ahí que se le incluya dentro de *Bartramioideae*. En ambos géneros, los filidios están dispuestos en tres filas, aunque más fuertemente en *Plagiopus*.

1b. El género *Bartramia* consta aproximadamente de unas 100-110 especies (Augier, 1966; Hirohama & Iwatsuki, 1980), siendo junto con *Philonotis* el género más numeroso de la familia. Cuatro de ellas se distribuyen por la Península Ibérica y son objeto central de esta Memoria Doctoral. Corley & col. (1981) proponen tres secciones en la sistemática del género:

1b.1.- Sección *Bartramia* (sección *Eubartramia* C. Müll., según Engler, 1924 y Herzog, 1926), que engloba aproximadamente unas 11 especies y que incluye a las especies europeas e ibéricas *B. halleriana* Hedw. (= *B. norvegica* Lindb.), y *B. pomiformis* Hedw. (=*Bryum pomiforme* L.), que también viven en Asia (Engler, 1924), y en el caso de *B. pomiformis* también en Norteamérica; así como *B. mossmanniana* C. Müll., que vive en Tasmania y Patagonia, y a otras especies que se distribuyen por Japón y Corea (*B. crispata* Schimp., *B. hakonensis* Besch., *B. stenophylla* Card., etc.).

1b.2.- Sección *Ithyphyllae* Kindb. (sección *Vaginella* C.Müll. según Engler, 1924 y Herzog, 1926), que engloba unas 79 especies que se distribuyen por Sudáfrica (*B. hampeana* C. Müll., y *B. asperrima* (Hamp.) C. Müll), Africa Oriental (*B. ruwenzoriensis* Broth.), Sudamérica y Centroamérica (*B. humilis* Mitt., *B. costaricensis* C. Müll., *B. microstoma* Mitt.), Himalaya (*B. leptodonta* Wils., y *B. subpellucida* Mitt.) y Europa (*B. ithyphylla* Brid. (= *B. breviseta* Lindb.) y *B.subulata* B.,S. & C.).

1b.3.- Sección *Strictidium* C. Müll. (sección *Strictidium* C. Müll., según Engler, 1924 y Herzog, 1926), con unas 19 especies, dentro de las que se incluye *B.stricta* Brid., que se distribuye por la Región Mediterránea y Macaronésica (López-Sáez, 1992), llegando incluso a Inglaterra y California (Engler, 1924; Herzog, 1926); *B. ambigua* Mont., que vive en Perú, Bolivia y Chile (Engler, 1924);

B. substricta Schimp., y *B. afro-stricta* C. Müll., que se distribuyen por Sudáfrica (Herzog, 1926), y *B. strictula* C. Müll., del Kilimanjaro (Engler, 1924). Las especies de esta sección se distribuyen principalmente por Sudamérica y Sudáfrica, excepto *B. stricta* que alcanza incluso la Europa mediterránea.

1c. El género *Leiomela* está contituído por 16 especies (Hirohama & Iwatsuki, 1980), estando la gran mayoría de ellas distribuídas por Sudamérica, como por ejemplo *L. aristata* (Mitt.) Broth., y *L. lutescens* (Hamp.) Broth., excepto *L. javanica* (Ren. et Card.) Broth., que vive en Java (Engler, 1924).

1d. El género *Plagiopus* es un pequeño género con únicamente 3 especies en el mundo (Hirohama & Iwatsuki, 1980), siendo la especie más conocida *P. oederiana* (Sw.) Crum & Anderson (= *P. oederi* (Gunn.) Limpr.), que vive en la Península Ibérica, además de en Asia Central e Himalaya, Japón y Norteamérica. Las otras dos especies son *P. crassinervis* Mitt., y *P. javanicus* (Doz. et Molk.) Fleish., de Java.

1e. El género *Flowersia* de reciente creación por Griffin III & Buck (1989) está muy cercano y se ha segregado de *Anacolia*, y de hecho varias especies de este último género hoy pertenecen a *Flowersia*, caso de *A. campylopus* (Schimp. ex C. Müll.) Fransén, que hoy es *F. campylopus* (Schimp. ex C. Müll.) Griffin & Buck. El género fue nombrado en honor de Seville Flowers (1900-1968), toda una autoridad en la familia *Bartramiaceae*.

2. Subfamilia *Breutelioideae* Griffin & Buck, que engloba los géneros *Breutelia* Schimp., *Philonotis* Brid., *Anacolia* Schimp., *Fleischerobryum* Loeske y *Quathlamba* Magill.

2a. El género *Breutelia* que da nombre a la subfamilia, es otro de los géneros más numerosos de la familia, con cerca de 100-104 especies (Augier, 1966; Hirohama & Iwatsuki, 1980), muchas de las cuales se han diferenciado en la región tropical del Hemisferio Sur.

Breutelia es probablemente el género más avanzado de la subfamilia. Su gran tamaño y sus caulidios a menudo divididos contrastan con *Philonotis* y géneros cercanos. Una de las especializaciones de *Breutelia* son precisamente sus filidios aplicados, en los cuales se diferencian células alares y células intercalares en los pelos axilares. Así mismo, la ornamentación esporal ofrece una sensible diferenciación respecto *Philonotis*, pues en *Breutelia* las esporas son mucho más papilosas a espinosas.

En base al gran número de especies del género, Griffin III & Buck (1989) diferenciaron dentro de él 5 secciones, que además tipificaron:

2a.1.- Sección *Breutelia* (sección *Eubreutelia* Broth., de acuerdo a Engler, 1924 y Herzog, 1926), tipificada por *B. arcuata* (Sw.) Schimp. Esta especie es considerada hoy como sinónima de *B. chrysocoma* (Hedw.) Lindb., la única especie del género que vive en Europa. Engloba especies sudamericanas como *B. subtomentosa* (Hamp.) Jaeg., de Brasil, africanas como *B. diffracta* Mitt.,

de Camerún o *B. kilimandscharica* (C. Müll.) Par., del Kilimanjaro, o de Java y Filipinas como *B. arundinifolia* (Dub.) Fleisch.

2a.2.- Sección *Anacoliopsis* (C. Müll.) Broth. Fue descrita inicialmente por Müller (1901) como una sección del género *Bartramia*. La especie que tipifica la sección es *B. affinis* (Hook.) Mitt., frecuente en territorio australiano.

2a.3.- Sección *Polyptychium* (C. Müll.) Broth., descrita también inicialmente como una sección de *Bartramia* por Müller (1874). Tipificada por la especie peruana *B. polygastrica* C. Müll. Todas sus especies son de distribución sudamericana.

2a.4.- Sección *Acoleus* (C. Müll.) Broth., que inicialmente fue descrita como una sección de *Bartramia* por Müller (1901). La especie tipo es *B. chrysea* (C. Müll.) Jaeg. En ocasiones es posible que nos encontremos con la denominación *Acoleos* para la sección, ya que este nombre fue el que usó por primera vez Müller (1874), pero no quedó validado nomenclaturalmente. Ya en 1901, Müller utilizaba la correcta denominación *Acoleus*. La sección engloba especies de distribución principalmente sudamericana y caribeña (Engler, 1924).

2a.5.- Sección *Lycopodiobryum* (C. Müll.) Broth., también originalmente descrita por Müller (1901), como una sección dentro de *Bartramia*. Griffin III & Buck (1989) consideran que la especie *B. elongata* (Hook.f. & Wils.) Mitt., incluída en esta sección por Engler (1924), debe ser transferida a la sección *Acoleus*.

2b. El género *Philonotis* es el más numeroso de toda la familia *Bartramiaceae*, ya que cuenta con más de 150-174 especies, de ecología muy variada (Augier, 1966; Hirohama & Iwatsuki, 1980).
De acuerdo a Engler (1924) y Griffin III & Buck (1989), el género consta de 6 secciones:

2b.1.- Sección *Philonotula* (B.S.G.) Jaeg., de especies todas ellas autoicas o dioicas pero ninguna sinoica. Engloba especies de distribución europea y macaronésica (*P. rigida* Brid.), Japón (*P. savatieri* Besch.), Sudamérica (*P. curvata* (Hamp.) Jaeg., *P. platensis* Par.), Africa (*P. flavinervis* (C. Müll.) Par., *P. strictula* Card.) y Asia (*P. palustris* Mitt., *P. radicalis* (Palis.) Brid.).

2b.2.- Sección *Catenularia* (C. Müll.) Par. Las especies más conocidas son *P. scabrifolia* (Hook. f. & Wils.) Braithw., y *P. yezoana* Besch. & Card. La primera es abundante en Sudáfrica y Ecuador, llegando ingluso a Oceanía.

2b.3.- Sección *Leiocarpus* Broth., que engloba especies caracterizadas por ser erectas y de cápsulas simétricas, con esporófitos provistos de un perístoma simple. Sus especies se distribuyen por el Kilimanjaro africano caso de *P. schröderi* Broth., Africa occidental (*P. calomicra* Broth.), Java (*P. tjibodensis* (Fleisch.) Broth., Hawaii (*P. hawaiica* C. Müll.) o Tahití (*P. runcinata* C. Müll.).

2b.4.- Sección *Euphilonotis* Limpr., constituída por especies dioicas. Agrupa especies de amplia distribución como *P. marchica* (Willd.) Brid., que vive en Europa y Córcega, Argelia, Corea y Norteamérica; *P. leptocarpa* Mitt. del Himalaya; *P. turneriana* (Schwaegr.) Mitt., que vive además del Himalaya en Java, Japón, China y en el archipiélago de las islas Sandwich; *P. falcata* (Hook.) Mitt., del Tibet, India, China, Japón e India; *P. andina* Brid., de Ecuador; *P. gourdonii* Card., de la Antártida; y otras especies de distribución básicamente europea como *P. caespitosa* Wills., *P. calcarea* (Bryol.) Schimp., y *P. fontana* (L.) Brid., la especie posiblemente más abundante y mejor conocida, de la que además se conoce el contenido biflavonoídico (ver Anexos 1 y 2).

2b.5.- Sección *Pseudo-Mniobryum* Broth., con especies también en su mayoría dioicas. La especie tipo y la única que compone la sección es *P. vagans* (Hook. f. & Wils.) Mitt., que se distribuye por Sudamérica (Chile y Patagonia).

2b.6.- Sección *Pseudo-Philonotis* Fleisch., que consta únicamente de 3 especies: *P. longicollis* (Hamp.) Mitt., de Java e Himalaya, *P. eurybrochis* Ren. et Card., también de Java y *P. wallisii* (C. Müll.) Jaeg., de las Islas Filipinas.

El antigüo género *Bartramidula*, que englobaba unas 20 especies (Engler, 1924; Hirohama & Iwatsuki, 1980), fue descrito originalmente por Schimper (in Bruch & col., 1836-1855) en *Bryologia Europaea* (4, fasc. 29/30, monogr. 1, pp. 55, 1846), tomando como especie tipo *B. wilsonii* B.S.G. En la actualidad ha sido considerado como una variante polifilética de *Philonotis* e incluído dentro de este género (Griffin III & Buck, 1989). Después de su inicial descripción hace más de 150 años, más de 40 especies que pertenecieron a *Bartramidula*, han sido posteriormente transferidas a los géneros *Bartramia*, *Breutelia* y *Philonotis*.

2c. El género *Anacolia* cuenta con unas 7 especies en el mundo (Hirohama & Iwatsuki, 1980), que se distribuyen por Sudamérica (*A. setifolia* (Hook & Arnott) Jaeg., *A. subsessilis* (Tayl.) Broth.), Centroamérica (*A. intertexta* (Schimp.) Jaeg.), Europa y Región Macaronésica (*A. webbii* (Mont.) Schimp.), Norteamérica hasta Alaska (*A. menziesii* (Turn.) Par., y *A. baueri* (Hamp.) Par.) y Africa (*A. abyssinica* (C. Müll.) Flowers) (Engler, 1924). Tanto *A. setifolia* como *A. abyssinica* han sido incluídas en el género *Flowersia* (Griffin III & Buck, 1989).

Griffin III & Buck (1989) consideran al género *Anacolia* como el menos evolucionado de la subfamilia, por su aspecto típico de *Bartramia* y por su plesiomórfico número cromosomático n= 7,8; aunque le incluyen dentro de la subfam. *Breutelioideae* por la presencia cualificada de innovaciones subflorales, de pelos axilares bicelulares, y por la especial morfología de la cápsula y esporas.

2d. El género *Fleischerobryum* es un pequeño género con sólo 4 especies que se distribuyen principalmente en Asia tropical (Hirohama & Iwatsuki, 1980). Sus hábitats son similares a los de *Philonotis*, aunque no poseen tanta amplitud ecológica, y existen notables diferencias en la morfología de los pelos axilares (ver clave anexa).

2e. El género *Quathlamba* fue recientemente descrito por Magill (1987), a partir de una única especie surafricana (*Q. debilicostata* Magill). Gametofíticamente se trata de un género único dentro de la familia *Bartramiaceae* debido a la morfología foliácea de su caulidio así como a los filidios más o menos ovados y rudimentarios de células lisas. Sin embargo, el esporófito es similar al antiguo género *Bartramidula* que ha sido recientemente sinonimizado con *Philonotis* (Griffin III & Buck, 1989).

3. Subfamilia *Conostomoideae* Griffin & Buck, monotípica pues incluye únicamente al género *Conostomum* Sw. Este género consta aproximadamente de unas 14 especies (Hirohama & Iwatsuki, 1980), muchas de las cuales viven en el Hemisferio Sur.

Griffin III & Buck (1989), consideran a este género el menos especializado de la familia *Bartramiaceae*, aunque no se pueda decir que no tengan ninguna especialización concreta sino más bien lo contrario, ya que conducirían a toda una serie de caracteres plesiomórficos definidos. Presenta filidios dispuestos en 5 filas, rizoides completamente lisos (Hirohama & Iwatsuki, 1980), pelos axilares formados de 3 células todas ellas de aproximadamente el mismo tamaño, con la célula basal solamente algunas veces de color marrón oscuro, células del filidio mamilosas y raramente papilosas y opérculo rostrado a umbonado cónico, con número cromosomático n= 8. Los pelos axilares son los menos especializados de toda la familia (Griffin III & Buck, 1989), correspondiendo al denominado tipo "bryoide". El número cromosomático de n= 8 es considerado de manera generalizada como un carácter plesiocárpico. Engler (1924) reconoce 3 secciones dentro del género *Conostomum*:

3a.1.- sección *Cleistocarpidium* Broth., a la que pertenece la especie sudamericana *C. cleistocarpum* Herz.

3a.2.- sección *Pseudo-Bartramidula* Broth., monotípica como la anterior, con una única especie *C. curvirostre* Mitt., de distribución austral.

3a.3.- sección *Eu-Conostomum* Broth., que engloba unas 10 especies de distribución principalmente austral, bien sudamericana como *C. aequinoctiale* Schimp., y *C. macrotheca* Herz., o europea (*C. tetragonum* (Dicks.) Lindb., y *C. boreale* Sw.).

3.1.2. Las especies ibéricas del género *Bartramia* Hedw.

En la Península Ibérica la familia *Bartramiaceae* está representada por siete géneros (Casas, 1991): *Plagiopus*, con una sola especie, *P. oederiana* (Sw.) Crum & Anderson; los géneros también monoespecíficos *Conostomum*, *Breutelia* y *Anacolia*, cuyas especies representadas son *C. tetragonum* (Hedw.) Lindb., *B. chrysocoma* (Hedw.) Lindb., y *A. webbii* (Mont.) Schimp. (endemismo de las regiones mediterránea y macaronésica); el género *Philonotis*, el más numeroso con nueve especies: *P. calcarea* (B. & S.) Schimp., *P. fontana* (Hedw.) Brid., *P. hastata* (Duby) Wijk & Marg., *P. marchica* (Hedw.) Brid., *P. rigida* Brid., *P. seriata* Mitt., *P. tomentella* Mol., *P. arnelli* Husn., y *P. caespitosa* Jur.

El género *Catoscopium* es incluído fuera de la familia *Bartramiaceae* como integrante único de la familia *Catoscopiaceae* por Casas (1991), aunque en la presente Memoria Doctoral lo incluiremos dentro de *Bartramiaceae*, subfamilia *Bartramioideae*, de acuerdo a Griffin III & Buck (1989). Su única especie ibérica es *C. nigritum* (Hedw.) Brid., de la que apenas se conocen dos localidades ibéricas en el Pirineo (Casas & col., 1985-1992).

Finalmente, el género *Bartramia* Hedw., objeto central de la presente Tesis, en la Península Ibérica consta de cuatro especies, según la reciente revisión de Casas (1991): *Bartramia halleriana* Hedw., *Bartramia ithyphylla* Brid., *Bartramia pomiformis* Hedw., con dos variedades: var. *elongata* Turn., y var. *pomiformis*, y *Bartramia stricta* Brid.

La determinación del material biológico, se realizó de acuerdo a la siguiente clave analítica, para las cuatro especies ibéricas del género *Bartramia*, elaborada a partir de Smith (1980) y Crum & Anderson (1981), así como con otras anotaciones propias (López-Sáez, 1992) (Fig. 3.1.):

1- Filidios de base ensanchada, blanquecina y laminar: *B. ithyphylla* Brid.

1- Filidios sin las características anteriores 2

2- Células rectangulares o casi rectangulares en todo el filidio, células opacas, cápsula simétrica de dehiscencia apical, perístoma simple: *B. stricta* Brid.

2- Células basales del filidio rectangulares, células de la zona media del filidio cuadrangulares a rectangulares, células no opacas, traslúcidas, perístoma doble, cápsula asimétrica de dehiscencia oblicua 3

3- Plantas verde glauco, seta de 5-20 mm de longitud, cápsula exerta: *B. pomiformis* Hedw.

3- Plantas verdes a verde parduzco ceniciento, seta curvada de 2-3 mm de longitud, apenas visible, usualmente inmersa entre los filidios: *B. halleriana* Hedw.

A continuación, se aportan algunos datos sobre la biología, ecología y corología de las cuatro especies ibéricas del género, para lo cual seguiremos básicamente a Casas & col. (1985-1992) y Smith (1980) junto a algunos apuntes particulares. Los mapas de distribución que se adjuntan (Figs. 3.2.-3.5.) se han tomado de Casas & col. (1985-1992).

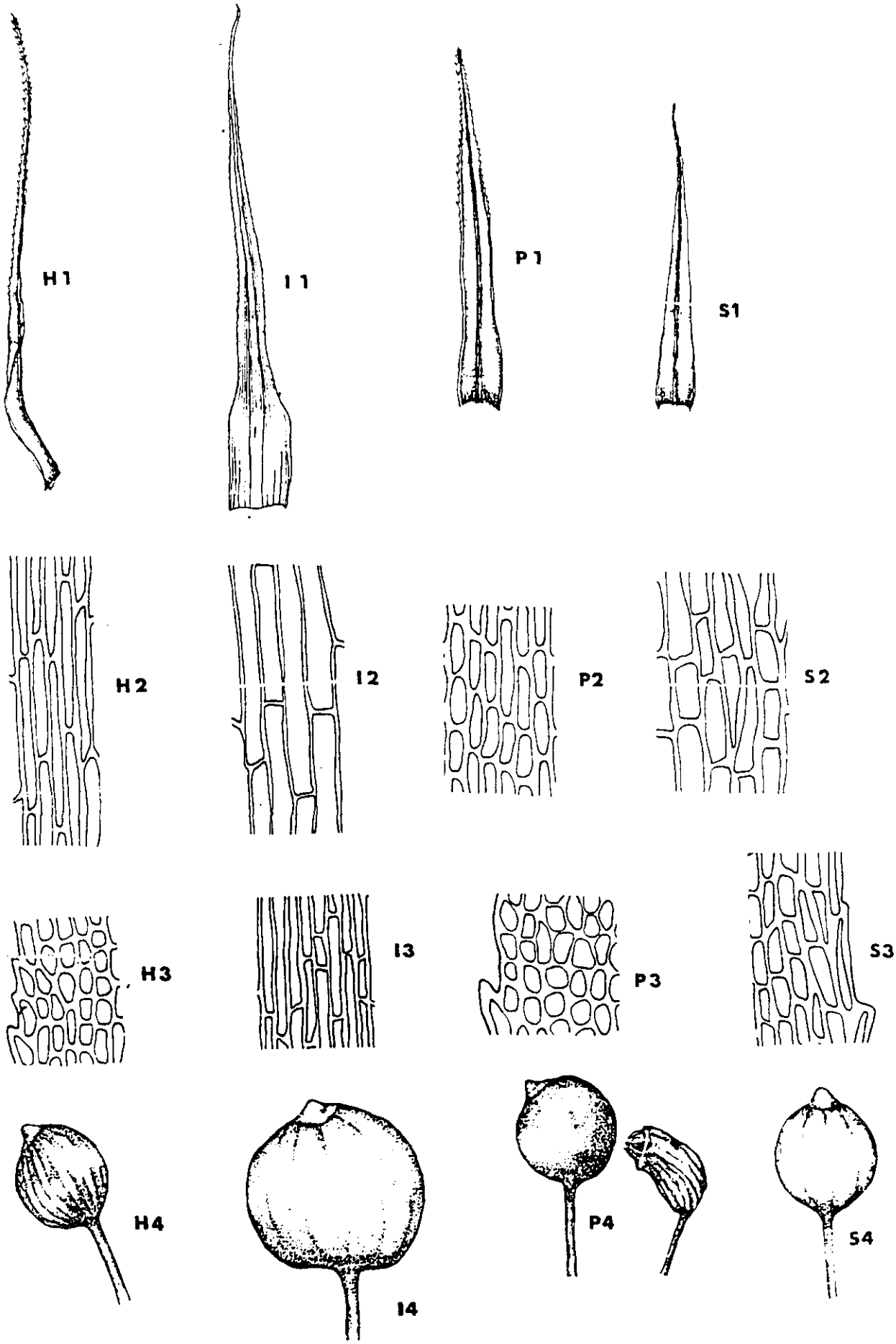


Fig. 3.1.: 1, Filidios; **2,** células basales; **3,** células de la zona media del filidio; **4,** cápsulas; **H,** *B.halleriana*; **I,** *B.ithyphylla*; **P,** *B.pomiformis*; **S,** *B.stricta*.

3.1.2.1. ***Bartramia halleriana*** *Hedw.*, Spec. Musc.: 164 (1801).

Planta de hasta 15 cm de caulidio tomentoso principalmente en su base que forma céspedes de color verde oscuro a pardo-verdosos. Se trata de una especie monoica (autoica o sinoica), con los filidios superiores a menudo crispados en sequedad, o bien erecto-patentes cuando hay humedad, en ocasiones subsecundos, de morfología más o menos lanceolada y subulados, con el margen recurvado en la zona de inserción al caulidio y dentado desde la mitad del filidio hasta el ápice. Nervio excurrente. Células de la parte basal rectangulares y células de la zona media del filidio cuadrado-rectangulares, pelúcidas y mamilosas. Seta curvada y corta de no más de 2-3 mm de longitud, y que por lo general es poco visible quedando inmersa entre los filidios. La cápsula es similar a la de *B. pomiformis* aunque algo más ancha en sequedad. Esporas de 20-24 μm, tipificadas por Estébanez & col. (1992). Rizoides papilosos (Hirohama & Iwatsuki, 1980). Caulidio perteneciente al tipo anatómico IV (Velasco & col., 1991), diferenciado en epidermis, parénquima, endodermis e hidroma.

Especie rara, propia de la base y grietas de rocas graníticas de la mitad norte de la Península Ibérica, principalmente del pre y Pirineo y Cordillera Cantábrica (Fig. 3.2.). De lugares húmedos y sombreados en el piso del haya y del pino. De ecología mesófila, esciófila, humícola y terrícola, indiferente con preferencia por sustratos silíceos. Acompaña entre otras a *Webera cruda* (L.) Bruch. y *Amphidium mougeotii* Schpr.

Distribución general mesotérmica cosmopolita, encontrándose en Europa, Asia (Caúcaso, Himalaya, Tibet, China), Africa (Kilimanjaro), Norteamérica incluyendo Hawaii, Sudámerica, Australia y Nueva Zelanda.

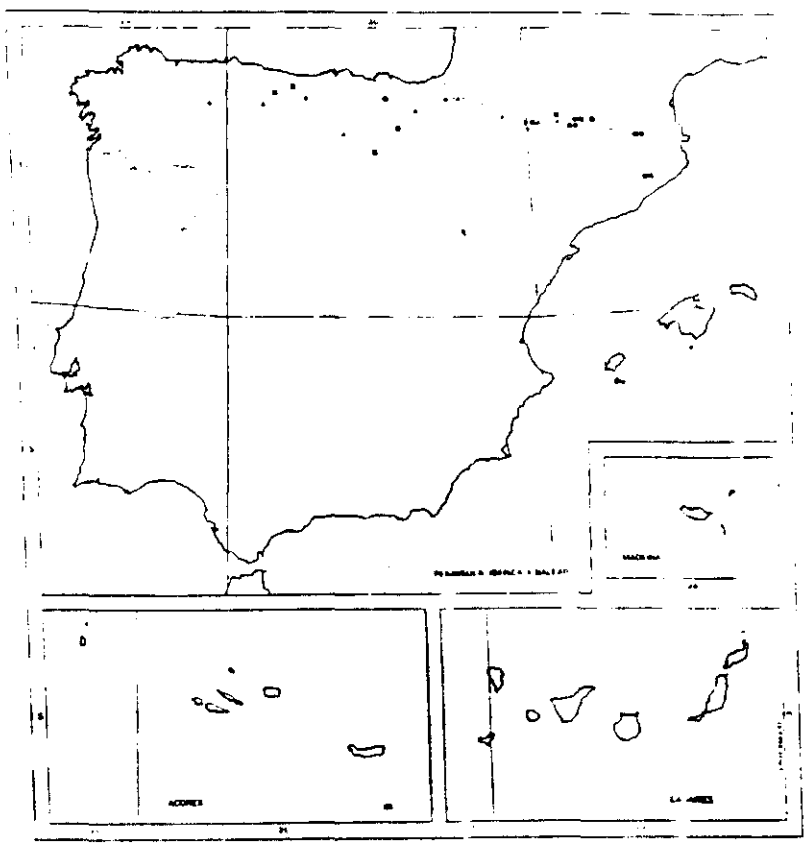


Fig. 3.2.: Mapa de distribución de *B. halleriana* Hedw. en España y Portugal.

3.1.2.2. ***Bartramia ithyphylla*** Brid., Musc. Rec. 2 (3): 132 (1803).

Planta sinoica de caulidio tomentoso en su parte inferior y de tamaño no superior a 0.5-4.0 cm que forma céspedes laxos de color verde claro a verde-amarillento. Los filidios son erectos, rígidos a flexuosos o crispados en sequedad, más o menos lanceolados, subulados a rectangulares y blanquecinos. La base del filidio es esta especie es muy peculiar ya que está muy ensanchada en forma de hombro hialino y de ella parte el resto del filidio hasta el ápice muy adelgazado. El margen es plano o ligeramente serrulado y el nervio excurrente. Las células basales del filidio son claramente rectangulares y grandes además de hialinas, mientras que las de la zona media son rectangulares pero más delgadas, opacas y mamilosas. La seta es estrecha y mide entre 1-3 cm. La cápsula es como la de *B. pomiformis* aunque en ocasiones más ancha, sobre todo en humedad. Las esporas son reniformes y papilosas, de 29-40 μm y fueron tipificadas por Estébanez & col. (1992). Rizoides papilosos (Hirohama & Iwatsuki, 1980). Caulidio de tipo anatómico IV (Velasco & col., 1991), diferenciado en epidermis, parénquima, endodermis e hidroma. Número cromosomático n= 12, 12 (10 + 2m) ó 6 (5 + m).

Forma céspedes fértiles, más o menos altos, generalmente finos, que llegan a los 6 cm. Es común en grietas de rocas silíceas y suelos húmicos, en prados y grietas de rocas graníticas, así como en suelos descalcificados de las montañas calcáreas, principalmente en la media y alta montaña (pisos del pino y del haya), en los pisos subalpino y alpino ibéricos, sobre los 3000 m de altitud. Rara en el piso montano puede llegar a encontrarse a los 1000 m. De ecología mesófila, fotófila, humícola, terrícola-saxícola, calcífuga y tolerante. En la Península Ibérica es bastante común, sobre todo en zonas montañosas, no conociéndose localidades canarias. Poco frecuente en Portugal, está ausente en Madeira y Azores (Fig. 3.3.). Acompaña formando céspedes esciófilos a *Aulacomnium androgynum* (Hedw.) Schwaegr., *Tortula subulata* Hedw., *Bryum capillare* Hedw. y *Eurhynchium praelongum* (Hedw) B.,S. & G. Especie de distribución mesotérmica boreal, vive en Europa desde Rusia a las Islas Británicas, Islas Feroes, Islandia, Centro y Norte de Asia, China, Norte y Este de Africa, Norteamérica, Méjico y Patagonia. Todos los ejemplares ibéricos revisados por Casas & col. (1985-1992) y los recolectados por nosotros pertenecen a la variedad *ithyphylla*.

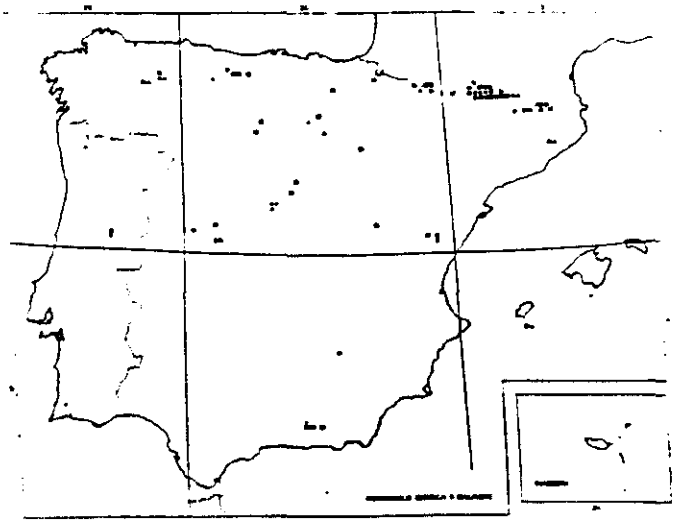


Fig. 3.3.: Mapa de distribución de *B. ithyphylla* Brid. en la España y Portugal.

3.1.2.3. ***Bartramia pomiformis*** *Hedw.*, Ann. Bot. 1: 527 (1805).

Planta monoica (autoica o sinoica) de 0.5-8.0 cm, verde clara a verde amarillenta. Forma céspedes convexos, densos y amplios, a veces pulvinulares y siempre copiosamente fructificados. Los caulidios de 10-100 mm son muy tomentosos en la base. Filidios de lineado a lanceolados, densos, finos y flexuosos. Su margen está fuertemente dentado en la parte superior. El nervio es dentado al dorso, excurrente y las células son papilosas. Las células basales son rectangulares o cuadrado-rectangulares, y las células de la zona media del filidio son aovado-cuadrangulares. Seta larga y estrecha que mide entre 5-25 mm, y que sostiene una cápsula globosa, estriada y asimétrica, curvada al secarse. Esporas papilosas, de morfología esférica a elipsoidal, de color pardo, que miden de 20 a 26 μm. Su tipificación fue llevada a cabo por Estébanez & col. (1992). Rizoides papilosos (Hirohama & Iwatsuki, 1980). Número cromosomático n= 9 (8 + m), 8 ó 8 (7 + m). Caulidio diferenciado en cuatro tejidos (epidermis, parénquima, endodermis e hidroides), perteneciente al tipo anatómico IV (Kawai, 1989; Ron & col., 1992; Velasco & col., 1991).

Crece en sustratos ácidos y descalcificados, tales como taludes húmedos o humus, fisuras de rocas, en bordes de caminos, paredes rocosas, generalmente en lugares umbrosos y silíceos. Tiene preferencia por el piso montano superior llegando al subalpino. Aparece en pinares, robledales, hayedos, encinares y en el sur en los pinsapares, entre los 700 y 1300 m de altitud, aunque en la región Mediterránea llega a descender a los 150 m. Es rara en Canarias, donde sí es abundante *Bartramia stricta*. También rara en Madeira y Azores. En la Península Ibérica es la especie más abundante de la familia (Fig. 3.4.), mucho más que *Bartramia ithyphylla*. Lloret (1986) refiere que esta especie está ligada a un cierto intervalo de alturas, generalmente a cotas más elevadas donde suele poseer índices de ocupación más altos entre los 1400 y 1700 m.

Podríamos definirla como una especie de ecología terrícola y rupícola, preferentemente esciófila, y con preferencia por bordes húmedos o cercanías de fuentes y arroyos, mesófila y calcífuga. Suele acompañar entre otros a *Polytrichum formosum* Hedw., *Pogonatum aloides* (Hedw.) P. Beauv., *Fissidens bryoides* Hedw., *Tortula subulata* Hedw., *Polytrichum juniperinum* Hedw., *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Eurhynchium pulchellum* (Hedw.) Jenn., *Dicranum scoparium* Hedw., y *Bartramia ithyphylla* Brid.

Distribución general mesotérmica cosmopolita, boreal-montana. Se distribuye por Gran Bretaña, Islas Feroes y Europa Central, Caúcaso, Norte y Centro de Asia, Himalaya, China, Japón, Madeira, Norteamérica, Tierra del Fuego y Nueva Zelanda.

Respecto a su fenología en la Península Ibérica disponemos de los datos de Lloret (1987), para el Pirineo Central, que sustentan que la maduración de los gametangios se produce entre junio y julio y la dehiscencia (arquegonios de color marrón, anteridios vacíos) entre julio y agosto. Dicha fenología concuerda con la que presenta *Bartramia ithyphylla*. El esporófito posee la seta ya formada entre abril y mayo en ambas especies, siendo tal maduración más tardía a mayor altitud. En general, y durante el invierno, el musgo se encuentra en fase de elongación de seta, siendo en primavera, una vez formada ésta, cuando se produce la meiosis, liberándose la esporas durante el verano.

Frecuentemente se encuentra, a parte de la variedad tipo *pomiformis*, la var. *elongata* Turn.

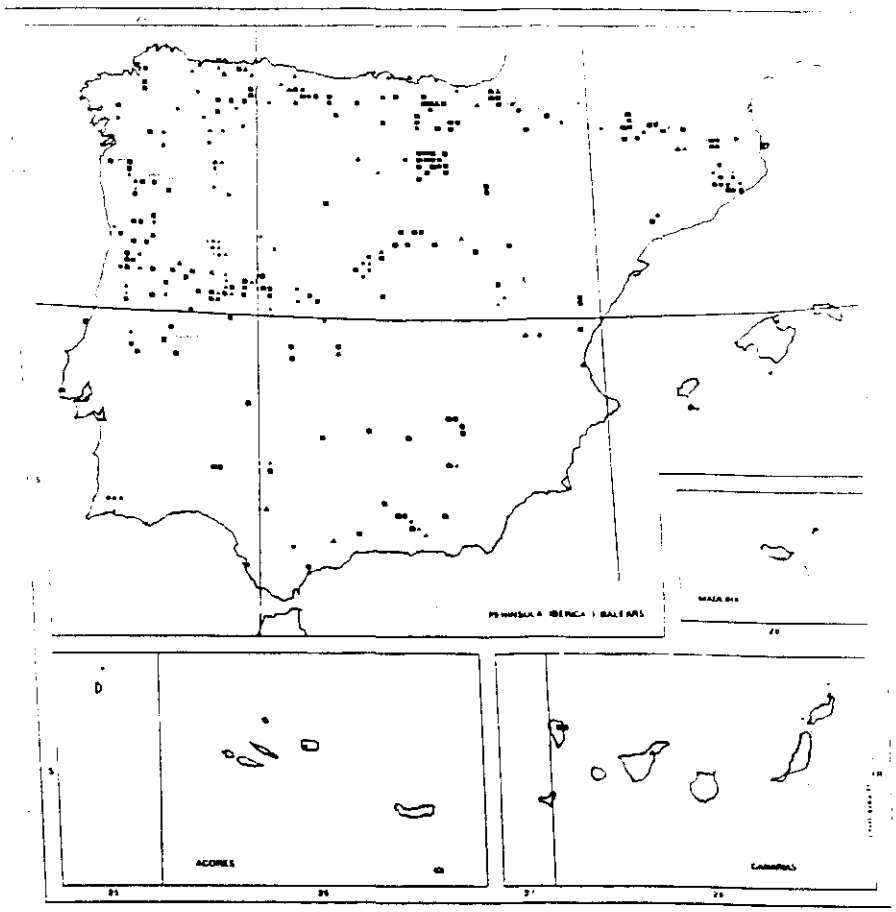


Fig. 3.4.: Mapa de distribución de *B. pomiformis* Hedw. en España y Portugal.

3.1.2.4. ***Bartramia stricta*** Brid., Musc. Rec. 2 (3): 132 (1803).

Planta sinoica de hasta 3 cm y por lo general de pequeño tamaño, de caulidio tomentoso. Los filidios son erectos, muy rígidos en sequedad, lanceolados y acuminados, con base que no abraza al caulidio como ocurre en *B. ithyphylla* y *B. halleriana*, de margen plano o escasamente recurvado en su parte inferior y nervio excurrente. Tanto las células basales del filidio como las de la zona media son siempre cuadrangulares y muy opacas, lo que diferencia muy bien esta especie de *B. pomiformis*. La seta es estrecha y globosa de casi 1 cm, y la cápsula es globosa, y por lo general es la de menor tamaño de todas las especies ibéricas. A diferencia de *B. pomiformis*, la cápsula es simétrica con abertura apical y no ladeada. Las esporas son papilosas de 26-32 μm y han sido tipificadas por Estébanez & col. (1992). Rizoides papilosos (Hirohama & Iwatsuki, 1980). Caulidio perteneciente al tipo anatómico IV (Velasco & col., 1991), diferenciado en epidermis, parénquima, endodermis e hidroma.

Abundante y siempre fértil, forma pulvínulos o céspedes densos de color verde glauco o pardo en taludes arcillosos o pobres en cal, en suelos esqueléticos de rocas graníticas, gneis, rocas basálticas, etc, pero muestra preferencia por los esquistos. Se encuentra en toda la región Mediterránea, en el dominio del *Quercion*. Predomina entre los 200-700 m, pero también se encuentra a los 1700 m. Muy común en las Islas Canarias, en altitudes comprendidas entre los 200 y 1550 m.

Más rara en Azores y Madeira. Saxícola en zonas elevadas y terrícola en zonas xéricas generalmente soleadas. Mesófila y silicícola. Vive formando céspedes apretados con *Polytrichum juniperinum* Hedw. y suele acompañar a *Hypnum cupressiforme* Hedw. Más frecuente en el occidente peninsular sobre todo en la provincia corológica Luso-Extremadurense. Distribución general en España por la Región Mediterránea y Macaronesia (Fig. 3.5.).

Especie sumamente interesante, por ser únicamente abundante en cantidades suficientes, como para realizar un estudio químico profundo sobre su contenido flavonoídico, en la Península Ibérica e Islas Canarias, estando mínimamente representada en Gran Bretaña y Centroeuropa.

De distribución suboceánica-mediterránea, vive en Europa y Macaronesia, Siria, Libia, Argelia, Camerún, Norteamérica, Australia y Tasmania.

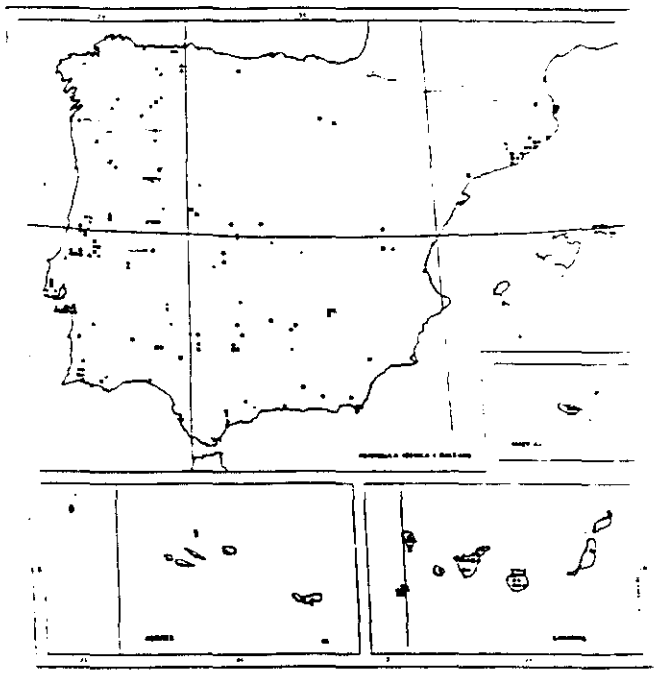


Fig. 3.5.: Mapa de distribución de *B. stricta* Brid. en España y Portugal.

3.2. Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles naturales que se encuentran muy extendidos en el Reino Vegetal, cuya presencia es posible en todas las partes de la planta (hojas, raíces, polen, néctar, flores, frutos, semillas y madera) aunque los presentes en las hojas han sido los más analizados (Richardson, 1983). Forman un grupo de compuestos fenólicos caracterizados por poseer un núcleo de quince carbonos con dos anillos fenólicos, con una estructura común C6-C3-C6 en la que dos anillos de benceno están unidos por un elemento de tres carbonos (Fig. 3.6.), distinto según la naturaleza del flavonoide (Fig. 3.7). Sobre este núcleo común pueden presentar distintos sustituyentes. Grupos hidroxílicos aparecen en distintas posiciones de los anillos aromáticos. Estos grupos hidroxilos pueden a su vez, estar libres o bien unidos por enlace O-glicosídico a un azúcar (mono-, di- o trisacárido). En ocasiones, pueden presentarse flavonoides con azúcares generalmente simples, unidos mediante enlace carbono-carbono (C-glicósidos) (Alston, 1968).

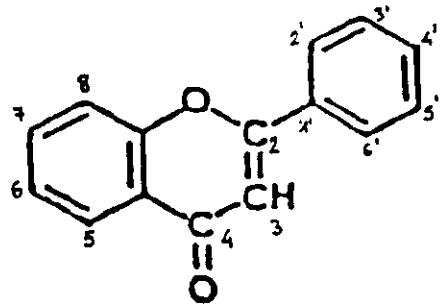
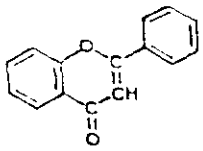


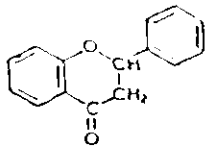
Fig. 3.6.: Estructura general del esqueleto de flavona.

Los primeros flavonoides fueron identificados en el siglo XIX como recoge Richardson (1983). Hacia 1975 cerca de 1300 compuestos flavonoídicos habían sido ya caracterizados (Harborne & col., 1975), aunque en la actualidad el número de flavonoides identificados únicamente en plantas vasculares sobrepasa ya los 4000 (Harborne, 1988a). Cerca del 2% del total de carbonos fotosintetizados por las plantas son convertidos en flavonoides, o compuestos relacionados como los taninos (Das & Law, 1990; Markham, 1982).

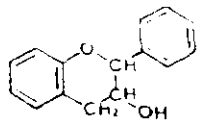
Considerada la colonización del medio terrestre por los vegetales, como el posible origen de los briófitos, el reforzamiento de sus paredes celulares tuvo que jugar un papel sumamente importante en dicha conquista. Es por ello que trabajos pioneros en la química de briófitos, así como de su ontogenia, se centraban en la posible presencia de **lignina** en tales organismos. Bland & col. (1968), Farmer (1953) y Farmer & Morrison (1964), en *Sphagnum* L. y Siegel (1962 y 1969) sobre *Polytrichales* admiten la presencia de lignina. Erickson & Miksche (1974) en cambio, en dos especies de politricáceas y una de esfagnáceas, ofrecían resultados totalmente opuestos. A tal respecto, Hébant (1974) apuntaba la posible contaminación de lignina procedente del humus en los musgos australianos



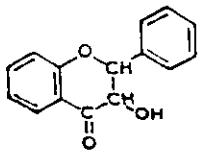
FLAVONA



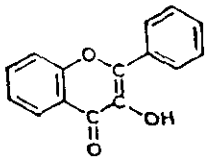
FLAVANONA
(Dihidroflavona)



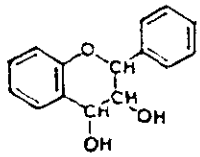
FLAVAN-3-OL
(Catequina)



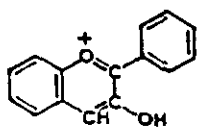
FLAVANONOL
(Dihidroflavonol)



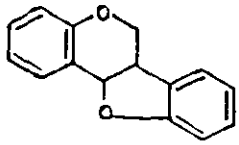
FLAVONOL



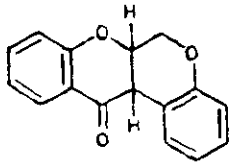
FLAVAN-3,4-DIOL
(Leucoantocianidina)



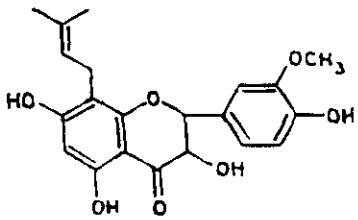
ANTOCIANIDINA



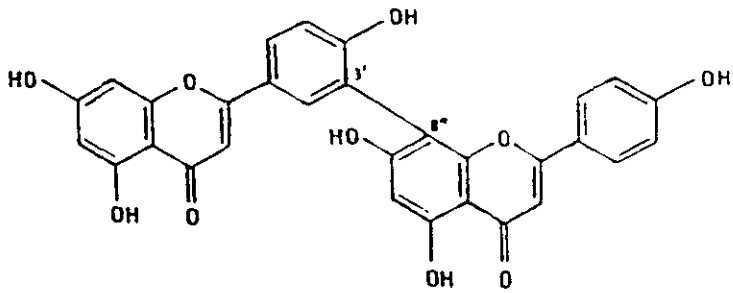
Pterocarpanos



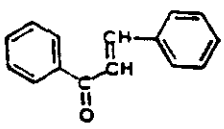
Rotenoides



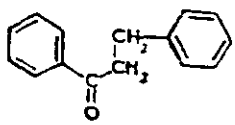
Flavonoides
prenilados



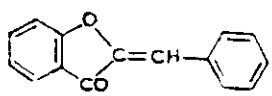
BIFLAVONOIDES
(Amentoflavona)



CHALCONAS



DIHIDROCHALCONAS



AURONAS

Fig. 3.7.: Estructura de los principales tipos flavonoídicos.

gigantes de *Polytrichales* estudiados por Siegel. Las nuevas investigaciones de Miksche & Yashuda (1978) sobre el mismo material vegetal, concluyen la **ausencia** definitiva **de lignina**. No obstante, el gran número de estudios posteriores realizados sobre el tema, han concluído la sí existencia de "compuestos lignoides" (Giannasi & Crawford, 1986; Lewis & Yamamoto, 1990; Wilson & col., 1989) en musgos, aunque como tal se refieren a C-glicoflavonas, biflavonoides y ácidos fenólicos. De esta manera, y en la actualidad, se podría afirmar que los briófitos no han sido capaces de sintetizar lignina, aunque por contra, sí sintetizan otra gran y variada gama de compuestos fenólicos, básicamente flavonoides, que comparten la ruta biosintética de la lignina, y a los que ya Czapek (1899), auguraba esa posible función como compuestos que refuerzan la pared celular. Es por ello, que los flavonoides entrañan una importancia primordial, aún no desvelada, en la supervivencia de los briófitos a lo largo de la historia geológica y climática de La Tierra que, con seguridad, habrá supuesto la diversificación en los distintos tipos flavonoídicos, como consecuencia de las adaptaciones de tales vegetales al medio y, por tanto, permite en la actualidad utilizarlos como "fuente de información" taxonómica (Herzfelder, 1921; Crosby & Magill, 1981). Markham (1988 y 1990), Swain (1974 y 1977a), Lowry & col. (1983) y Brehm & Krell (1975) ya refieren la posible función y produción de los flavonoides por las "plantas verdes", en su colonización del medio terrestre, como protección contra la luz ultravioleta, cuya incidencia podría haber sido 10 veces más intensa en esa época de lo que es en la actualidad. No se sabe, con certeza, la extensión de la capa de ozono en la atmósfera terrestre en el momento en que surgieron las plantas vasculares. Lo que parece evidente es que la ausencia total o parcial de ésta, permitiría el acceso de parte de la radiación ultravioleta del sol que dañaría a los vegetales que crecían en estos medios primogenios. De ahí, que los vegetales tuvieran necesidad de disponer de unas sustancias que actuaran como "filtros" frente a dicha radiación. Esta fue, probablemente, la función primitiva de los flavonoides y otros compuestos de tipo fenilpropanoide (Kubitzki, 1987). Mezclas de flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles y flavonoles en las vacuolas de las células epidérmicas de las hojas sirven como filtros, reduciendo la radiación UV-B y UV-A que atraviesa la capa de ozono de la atmósfera terrestre. Se ha demostrado que la capa de células epidérmicas en las que se acumulan los flavonoides, protegen a las capas inferiores de células mesofílicas, absorbiendo un 90% de la radiación UV-B (Robberecht & Caldwell, 1978). Wilson & col. (1989) postulan que la rigidez que poseen los musgos puede ser debida a la existencia de taninos o polímeros de hidroxibenzofurano, con una función fisiológica semejante a la de la lignina. McClure (1986) insiste incluso en la compartimentalización de los flavonoides en tejidos diferenciados, como por ejemplo la **epidermis**, que explicaría claramente la localización y función de este tipo de compuestos en los briófitos.

Este tipo de compuestos fenólicos constituye además y, como ya se ha expuesto con anterioridad, una base muy importante en la química de musgos y hepáticas (Huneck, 1983).

3.2.1. Flavonoides en Musgos.

Durante bastantes años se cuestionó la presencia de flavonoides en briófitos. La primera cita en la literatura sobre flavonoides en briófitos corresponde a Molisch (1911), aunque la estructura de dicho compuesto, referida a la saponarina, no fue elucidada hasta 50 años más tarde como recoge Markham (1990). Paul (1908) ya citaba antocianinas en *Sphagnum* spp. No obstante, son Bendz & col. (1962) quienes aislan e identifican por primera vez flavonoides en briófitos: dos glucósidos de una antocianidina poco común, la luteolinidina, en *Bryum cryophilum* Mart. De las tres subclases de musgos consideradas por Vitt (1984), dentro de la clase *Bryopsida*, ni en *Sphagnidae* ni *Andreaeidae* se han aislado o identificado flavonoides, excepto esfagnorrubinas (Mües, 1990). Unicamente, se conocen flavonoides como tales en *Bryidae*, aunque trabajos recientes están poniendo de manifiesto la posible síntesis de flavonoides por especies de *Andreaeidae* (Becker, 1986; Seeger, 1992).

Después del trabajo pionero de McClure & Miller (1967) en quimiotaxonomía de musgos, surgieron nuevas investigaciones sobre el tema, que arrojaron resultados sumamente interesantes: aislamiento de un glicósido de 5-deoxidihidroflavonol en *Georgia pellucida* (L.) Rabh. (Vandekerkhove, 1977a); 7-ramnoglucósido de apigenina (5,7,3'-triOH-flavona) en *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S. & G. (Vanderkerkhove, 1977b); apigenina y 7-ramnósido de apigenina en *Pleurozium schreberi* (Willd.) Mitt. (Vanderkerkhove, 1980); saponarósido, schaftósido, isoschaftósido, neoschaftósido, isoneoshaftósido, vicenina-2, crisoeriol y diversos 6,8-di-C-glicósidos en *Plagiomnium undulatum* (Hedw.) T.Kop., y saponarósido, en *Plagiomnium cuspidatum* (Hedw.) T. Kop. (Freitag & col., 1986; Vandekerkhove, 1978a); diversos glicósidos de luteolina (5,7,3',4'-tetraOH-flavona), apigenina y diosmetina, así como una biflavona de la luteolina (**5',8''-biluteolina**) en *Dicranum scoparium* Hedw. (Österdahl, 1979a y b); isoflavonas en *Bryum capillare* Hedw. (Anhut & col., 1984); glucurónidos aislados por primera vez en musgos (Mües & col., 1986), etc. Todos estos trabajos en relación a los compuestos identificados, y las especies de las que se aislaron, quedan expuestos en los Anexos 1 y 2.

En base a toda esta información, y si le añadimos la presencia de auronas (Weitz & Ikan, 1977), de 3-deoxiantocianidinas (Bendz & col., 1962), de biflavonoides macrocíclicos (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Salm, 1992; Seeger & col., 1991; Salm & col., 1993), de triflavonoides (Seeger & col., 1992b; Seeger, 1992), así como de hipnogenoles y otros dihidroflavonoles (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992), en distintas especies de musgos, se apoya la propuesta de que los musgos no son embriobiontes primitivos y, de que comparten una fuerte afinidad con las plantas vasculares habiendo ido bioquímicamente hablando, muy paralelos en su evolución (Ron & col., 1990; López-Sáez, 1992).

Posteriormente, otro gran número de nuevos compuestos flavonoídicos han sido aislados también en briófitos, muy especialmente por Markham & Porter (1978a), quienes realizan una excelente revisión. Dos años después Zinsmeister & Mües (1980), ofrecen una nueva recopilación de todos los conocimientos existentes sobre los flavonoides en briófitos. Ternai & Markham (1976), Markham & col. (1987), Pelter & col. (1976), Nilsson (1973) y Agrawal (1989), publican así mismo algunos trabajos sobre ^{13}C RMN y ^{1}H RMN de flavonoides. No debemos olvidar el excelente trabajo

de Mabry & col. (1970), de consulta necesaria para la identificación sistemática de los flavonoides. Las sucesivas recopilaciones de Harborne & col.(1975), Harborne & Mabry (1982), Harborne (1988a) y Harborne (1993), recogen todos los conocimientos y trabajos relativos a flavonoides, entre los que se encuentran incluídos aquellos referidos a nuevos compuestos flavonoídicos identificados en briófitos (Markham, 1988).

No obstante, la función que muchos flavonoides realizan en las plantas en general (Wollenweber & Dietz, 1981; Bruneton, 1991; Harborne & col., 1975) y, en los briófitos en particular, no está aún bien comprendida, lo que aumenta si cabe, no sólo el interés por identificar nuevos compuestos flavonoídicos en briófitos, sino también, por conocer que función cumplen y cual es el significado fisiológico y filogenético de su presencia en musgos y hepáticas. Hay que tener en cuenta que de las 10.000 especies y 700 géneros estimados de musgos (Schofield, 1985), sólo cerca de 320 especies (3.2 %) y 120 géneros (17%) han sido químicamente estudiadas, respecto a algún tipo de compuesto orgánico o inorgánico (Mües, 1990). De éstas, en 160 (1,6%) especies y 73 (10,4%) géneros se ha realizado el ensayo preliminar flavonoídico (Mües, 1990; Mües & Zinsmeister, 1988); de los cuales, han sido elucidadas 239 estructuras químicas correspondientes a flavonoides: 177 flavonoides para hepáticas (116 estructuras completamente identificadas y las otras 61 parcialmente) y 62 en musgos (51 completas y 11 parcialmente identificadas). Sólo de 21 especies de musgos (0,2%) han sido aislados e identificados algún flavonoide (Mües, 1990). Lo que sí parece quedar claro tras estos estudios, es una clara diferenciación entre la química flavonoídica de hepáticas y musgos, ya que sólo el 6% (Mües & Zinsmeister, 1988), de los estructuras conocidas son comunes a ambos. Es bien conocido que, en muchos casos de hepáticas y algunos de musgos (p.e. Mües & col., 1986), el patrón flavonoídico es un excelente marcador en la delimitación de las especies de briófitos. De manera semejante, pero a un nivel superior, se puede aceptar la existencia de marcadores específicos en hepáticas (tricetina: flavona-di-C-glicósido) y musgos (biflavonas) (Mües, 1990).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el interés por estudiar nuevas especies e identificar nuevos compuestos aumenta más, si cabe, ante las cifras tan bajas que barajamos. Se abre así un campo de investigación realmente importante, que reviste mayor interés, y con seguridad tomará mayor relevancia cuando el número de trabajos y especies estudiadas sea mucho más alto; de tal manera que, al menos, se puedan establecer las pautas que siguen las relaciones filogenéticas entre los distintos rangos taxonómicos.

En resumen, los musgos exhiben una gran variedad de tipos flavonoídicos (ver Anexos 1 y 2), que incluye flavonas C- y O-glicósidos, auronas, isoflavonas, biflavonoides, triflavonoides, 3-deoxiantocianidinas y otras variadas estructuras de esqueleto flavonoídico (ver Fig.3.7 pp. 22). Sin embargo, mientras que la presencia de flavonoles y dihidroflavonoles ha sido dudosa hasta los trabajos de Sievers (1992) y Sievers & col. (1992), únicas citas existentes sobre la identificación de este tipo de compuestos en musgos, no puede decirse lo mismo de proantocianidinas y 3-hidroxiantocianidinas cuya identificación no puede ser considerada como clara y convincente (ver Anexo 2). Esto puede indicar que la ruta biosintética que conduce a tales compuestos es esencialmente inoperativa en musgos (Markham, 1990).

Sin lugar a dudas, de los compuestos fenólicos identificados en musgos, son los **biflavonoides** y los **triflavonoides** los que revisten un mayor interés, también para nosotros, por ser específicos de

musgos, estando ausentes en hepáticas y antocerotas (Geiger, 1990), y en base a los resultados de nuestro trabajo (identificación en *Bartramiaceae* Schwaegr.) y al hecho de que, hasta el momento, la mayor parte de los flavonoides identificados en la familia *Bartramiaceae* han sido precisamente biflavonoides junto a un triflavonoide y un ácido flavonoídico (ver Anexo 2).

Los biflavonoides son dímeros de flavonoides, cuya presencia es constante en *Psilotales*, *Selaginellales* y Gimnospermas, con excepción de *Gnetales* y Pináceas (Geiger, 1990). La química y quimiotaxonomía de estos compuestos ha sido revisada regularmente por Baker & Ollis (1961), Baker & col. (1963), Geiger & Quinn (1975, 1982, 1988) y Geiger (1990). Mientras que en plantas vasculares, la mayoría de las biflavonas aisladas están basadas en la flavona apigenina y sus derivados metiléter, las identificadas en musgos lo están respecto de la luteolina (comúnmente dímeros de luteolina) sin metilar, sobre todo derivados hidroxilados (2,3- ó 2'',3''-dihidro-derivados) (Seeger & col., 1990). Muy recientemente se han identificado en musgos algunos biflavonoides derivados de la apigenina (Seeger & col., 1992a y 1993b), lo que abre aún más la gran variabilidad de los biflavonoides de musgos.

En general, los monómeros flavonoídicos implicados en el biflavonoide suelen ser flavonas y flavanonas, con un patrón de oxigenación muy simple: 5,7,4' y ocasionalmente 5,7,3',4' (Markham, 1982). La unión de ambas unidades suele estar constituída por un enlace carbono-carbono, aunque ocasionalmente se dan los enlaces tipo éter (Geiger & Quinn, 1975). Dentro de los tipos más comunes para los enlaces C-C se incluyen: enlace 6,8'' apigenina-apigenina (grupo de la agatisflavona), enlace 8,8'' apigenina-apigenina (grupo de la cupresoflavona), enlace 3',8'' apigenina-apigenina (tipo amentoflavona), enlace 6,3''' apigenina-apigenina (tipo robustaflavona) y enlaces 3,8''entre diversas flavonas y flavanonas. Los enlaces tipo éter incluyen básicamente los tipos hinokiflavona (enlace interflavonoídico en 6,4''') y ochnaflavona (enlace en 3',4''').

En musgos, la gran mayoría de los biflavonoides son tipo C-C, conociéndose únicamente biflavonoides con enlaces tipo éter entre ambos monómeros en *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992), lo que abre un nuevo abanico de posibilidades, si cabe, a la química biflavonoídica de musgos.

La ocurrencia de biflavonoides glicosilados es muy rara y restringida en general a gimnospermas (Alston, 1968; Markham, 1982; Geiger & Quinn, 1975), no habiéndose detectado por el momento en musgos (Anexo 2).

Los primeros biflavonoides aislados en musgos se identificaron en *Dicranum scoparium* (Lindberg & col., 1974), representando la primera cita de este tipo de compuestos fuera de las plantas vasculares. Dímeros de isoflavona-flavona fueron identificados respectivamente como bryoflavona y heterobryoflavona en *Bryum capillare* (Geiger & col., 1987). Este tipo de biflavonoides nunca antes había sido puesto de manifiesto, si bien sí se conocían dímeros isoflavona-isoflavano en leguminosas. Posteriormente, y muy recientemente, se han ido identificando un variado número de estructuras biflavonoídicas, siendo la de mayor relevancia la bartramiaflavona, aislada en *Bartramia pomiformis* (Seeger & col., 1991; Seeger, 1992; López-Sáez, 1992), y *Bartramia halleriana* (Salm, 1992; Salm & col., 1993), por tratarse de un biflavonoide macrocíclico.

Finalmente queremos destacar la identificación de dos nuevos tipos flavonoídicos en musgos: los triflavonoides y los ácidos fenólicos, por presentarse ambos en la familia botánica objeto de

nuestro estudio (Seeger & col., 1992b; Seeger, 1992).

En cuanto a su localización celular y subcelular, ésta apenas ha sido estudiada. Gadek & col. (1984) demuestran la presencia de biflavonoides en las cutículas foliares, lo que sugiere una función protectora frente a la depredación, que igualmente podrían desempeñar en musgos (Ron & col., 1992). De acuerdo a lo expuesto por Gadek & col. (1984), Geiger & Quinn (1988), postulan posteriormente que los biflavonoides de musgos pueden realizar, al igual que los presentes en las superficies foliares de plantas vasculares, una importante función en los mecanismos de defensa contra invasiones fúngicas o depredación de insectos. Las referencias de Czapek (1899) respecto a la presencia de compuestos fenólicos en las paredes celulares de un largo número de briófitos y, las afirmaciones de Geiger (1990) acerca de esa posible localización de los biflavonoides de musgos, van precisamente en el camino de admitir la fisiología supuesta anteriormente. La compartimentalización en tejidos diferenciados, caso de la epidermis, de los compuestos flavonoídicos apoyaría aún más las suposiciones antes expuestas. El **poder antibiótico** de estos compuestos (Cody & col., 1986; Van Hoof & col., 1981; Zinsmeister & col., 1987 y 1991; Zinsmeister & Mües, 1987), apoya igualmente esta idea. Todos los comentarios anteriores vienen además refrendados por el hecho de que especímenes de herbario de más de 100 años han sido válidos para una análisis flavonoídico (Harborne, 1967), y así mismo, flavonoides han sido igualmente aislados de fósiles de 25 millones de años de antigüedad (Niklas & Gianassi, 1978).

El descubrimiento de la localización de los flavonoides en general y, de los biflavonoides en particular, en las células de los musgos, aportaría una información valiosísima sobre su funcionalidad, el porqué de su acumulación y, ofrecería además, un nuevo punto de vista en el que apoyar la filogenia de este grupo botánico que consituyen los briófitos.

En su mayoría, los biflavonoides aislados en musgos, son mucho más polares que los de otras plantas (Geiger, 1990). Esta diferente polaridad, más notable respecto a los biflavonoides de gimnospermas, podría ir relacionada con sus zonas de acumulación: en las zonas hidrofílicas de las paredes celulares, caso de los biflavonoides más polares de musgos y, en la cutina, en el caso de los biflavonoides más lipofílicos de gimnospermas.

En resumen, podríamos afirmar que la química flavonoídica es día a día más compleja, sobre todo en musgos, como lo demuestra la identificación de biflavonoides macrocíclicos (Seeger & col., 1991; Seeger, 1992; Salm, 1992; Salm & col., 1993; López-Sáez, 1992), de triflavonoides (Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b; Hahn, 1993), de hipnogenoles y otros dihidroflavonoles (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992), de dímeros flavona-aurona (Weyand, 1993; Geiger & Markham, 1992), y aurona-aurona (Hahn, 1993; Hahn & col., 1994; Geiger & col., 1993a), y finalmente, fuera de briófitos, de tetraflavonoides (Tih & col., 1992; Fig. 3.8.), espiroflavonoides (Baba & col., 1992; Fig. 3.9.), e incluso de flavonoides clorados en *Streptomyces* spp. (Anyanwutaku & col., 1992).

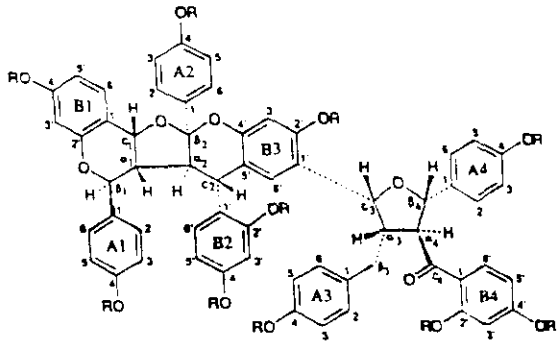


Fig. 3.8. Estructura del tetraflavonoide Lophiroflavano A.

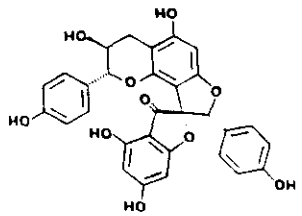


Fig. 3.9. Estructura del espiroflavonoide Genkwanol B.

La metodología usada en la actualidad, tanto en el proceso de extracción como analítica, puede explicar ese gran progreso experimentado por la química flavonoídica en general y biflavonoídica en particular de musgos, sobre todo en referencia a muchas de las especies que fueron estudiadas años atrás, particularmente por McClure & Miller (1967), que había ofrecido un resultado negativo en cuanto a la presencia de flavonoides en ellas y en la actualidad se ha demostrado la identificación de flavonoides en muchas de éstas. Es por ello, que creemos necesario acometer la revisión a través de nuevos estudios de tales especies, pues algunas de ellas están ofreciendo resultados sumamente espectaculares, caso de *Hypnum cupressiforme*, *Campylopus* spp., *Aulacomnium* spp., etc.

A. Estado actual de conocimiento.

La recopilación de los diversos tipos flavonoídicos identificados en musgos (Anexo 1), pone de manifiesto que únicamente se conocen flavonoides como tales en la subclase *Bryidae* y no en *Sphagnidae* ni en *Andreaeidae*. No obstante, debemos decir que en *Sphagnidae* se conoce la existencia de unas antocianidinas un tanto especiales, conocidas como **esfagnorrubinas**, pero en cambio no se ha detectado la presencia de ningún otro tipo flavonoídico. En *Andreaeidae,* en los últimos años se está postulando la posible existencia de flavonoides (Becker, 1986) y cabe la duda sobre si sintetizan biflavonoides (Seeger, 1992). Por el momento dichos datos quedan a la espera de su confirmación.

En resumen, la química flavonoídica de musgos parece ir encaminada a que la síntesis de flavonoides es exclusiva de la subclase considerada como más evolucionada, la subclase *Bryidae*, estando ausentes por el momento en *Sphagnidae* y *Andreaeidae*. Suire & Asakawa (1979) separan sin dificultad las tres subclases de *Musci* entre ellas y respecto a las clases *Hepaticae* y *Anthocerotae* atendiendo a la presencia del ácido lunulárico y de la D-metionina.

Los musgos de la subclase *Bryidae* exhiben una enorme variedad de tipos flavonoídicos, que incluye flavonas (agliconas, C- y O-glicosiladas), isoflavonas e isoflavonas O-glicósidos, auronas, 3-deoxiantocianidinas, chalconas, ácidos flavonoídicos, aldehidos flavonoídicos, biflavonoides y triflavonoides (ver Fig. 3.7 pp. 22).

Las flavonas que sintetizan los musgos son por lo general derivadas de la apigenina o de su hidroderivado la luteolina, tales como vitexina, crisoeriol o diosmetina. Entre las flavonas identificadas se encuentran ya no solo las propias agliconas (apigenina y luteolina), sino sus derivados glicosilados. Los azúcares pueden unirse a la molécula de flavona mediante enlaces de tipo C-, O- y O-C-. En musgos se conocen flavonas-O-glicósidos, flavonas-O-diglicósidos, así como derivados tri- y tetraglicosilados. Los azúcares más frecuentes que se unen a dichas flavonas son respectivamente la glucosa y en menor medida la ramnosa.

Los flavonoles en musgos son escasos y por lo general derivan del kaemferol (3-OH-apigenina). Se ha identificado la aglicona correspondiente así como derivados O-glicósidos y diglicósidos.

Al igual que los flavonoles, las isoflavonas se han citado pocas veces en musgos, y en concreto, exclusivamente en la familia *Bryaceae*. Por lo general, las isoflavonas de musgos son derivadas del orobol y de la pratenseina, tanto a nivel de aglicona como de O-glicósidos y O-diglicósidos.

En cuanto a los biflavonoides, son sin duda el mejor marcador flavonoídico, específicos de musgos, y que permiten diferenciar sin problemas la composición flavonoídica de éstos respecto a las hepáticas, de las cuales están ausentes. Su identificación por primera vez en *Dicranum scoparium* supuso una gran sorpresa, aunque hoy en día dichos compuestos se conocen en bastantes especies y, día a día su naturaleza es más variada. En el apartado siguiente trataremos más en profundidad los biflavonoides de musgos así como los triflavonoides.

Auronas, chalconas, ácidos flavonoídicos y aldehidos flavonoídicos tienen una representación minoritaria en la química flavonoídica de musgos. Sólo se ha identificado por el momento una aurona en la especie *Funaria hygrometrica* (*Funariaceae*) aunque se conocen biflavonoides con dos dímeros

de aureosidina. La única chalcona conocida en musgos en un derivado O-glicosilado, cuya estructura está aún por determinar en *Plagiomnium* (*Mniaceae*). Los ácidos flavonoídicos se identificaron por primera vez en *Bartramia pomiformis*, y la estructura elucidada fue denominada ácido bartrámico, que en realidad posee un monómero de luteolina sustituído en C-8 por un grupo ácido. El otro ácido flavonoídico conocido es el ácido hípnico de *Hypnum cupressiforme*, derivado de un dihidroflavonol. Es esta última especie se identificó así mismo el único aldehido flavonoídico conocido, también derivado de un dihidroflavonol.

Las antocianidinas de musgos corresponden básicamente a dos tipos de estructura. Unas derivadas de la luteolinidina, tanto O-glicósidos como O-diglicósidos, identificadas en *Bryum* spp., y *Splachnum* spp., y las otras, las esfagnorrubinas del género *Sphagnum*, tienen una estructura muy peculiar que ha hecho que ciertos autores las consideren compuestos fenólicos no flavonoídicos.

La presencia de 3-deoxiantocianidinas, de biflavonoides y triflavonoides macrocíclicos, hipnogenoles y chalconas, así como de dihidroflavonoles, viene en resumen a indicarnos, que los musgos no son embriobiontes primitivos, sino que comparten una fuerte afinidad con las plantas vasculares, por lo que bioquímicamente hablando, habrán tenido una evolución paralela.

Día a día se identifican nuevos flavonoides en musgos, e incluso algunos de ellos incluyen tipos flavonoídicos hasta ahora no descritos en musgos (chalconas, biauronas, etc.), e incluso **ciertas estructuras son completamente novedosas en la química de los productos naturales**, como lo fueron en su momento los biflavonoides macrocíclicos, y tras esta Tesis Doctoral lo son los **triflavonoides macrocíclicos**.

Si pasamos ahora a analizar la presencia de cada uno de los tipos flavonoídicos en cada uno de los taxones considerados, tendremos en cuenta que, en primer lugar, obviaremos las subclases *Sphagnidae* y *Andreaeidae* por carecer éstas de flavonoides en sentido estricto.

En 11 de los órdenes de la subclase *Bryidae* en los que se estudió la composición flavonoídica, se identificó al menos la presencia de flavonoides. Unicamente en 3 no se detectó ningún flavonoide (*Buxbamiales*, *Tetraphidales*, *Polytrichales*).

El orden *Dicranales*, considerado como el menos evolucionado de la subclase *Bryidae* de los que fueron investigados, se caracteriza por sintetizar básicamente dos tipos de flavonoides: de un lado flavonas glicosiladas y de otro biflavonoides. La presencia de agliconas flavónicas se demostró únicamente en una especie de *Ditrichaceae*, mientras que los derivados O-glicosilados se conocen únicamente en *Dicranum scoparium* de *Dicranaceae*. Los biflavonoides en el orden se identificaron en una especie de las familias *Ditrichaceae*, *Bryoxiphiaceae*, *Eustidiaceae* y *Rhabdoweisiaceae*; en dos especies de *Dycnemonaceae* y en 17 especies de *Dicranaceae*. En esta última familia, todas las especies investigadas se caracterizaron por sintetizar biflavonoides, excepto *Dicranella hochreutineri* y *Leucoloma serrulatum*, aunque dichas especies han sido únicamente estudiadas por McClure & Miller (1967), cuyo trabajo necesita una profunda revisión, como ya se ha comentado anteriormente. Unicamente en las familias *Leucobryaceae*, *Calymperaceae* y *Schistostegaceae* del orden *Dicranales* no se pudo identificar ningún flavonoide. En resumen, el orden ***Dicranales*** se caracteriza por sintetizar básicamente **biflavonoides**, excepto *Dicranum scoparium*, que también sintetiza flavonas O-glicosiladas.

El segundo orden considerado, *Fissidentales*, ha sido poco estudiado pero se ha demostrado

la existencia de biflavonoides en una única especie de *Fissidentaceae*, aunque el resto no parecen sintetizarlos. Dichos resultados estarían próximos a los del orden anterior.

En el orden *Buxbamiales* no se ha demostrado por el momento la presencia de flavonoides, por lo que debemos sospechar que carecen de ellos.

El orden *Pottiales* sigue la tónica anterior, ya que se han identificado únicamente biflavonoides en una especie de *Encalyptaceae* y cuatro de *Pottiaceae*.

En el orden *Grimmiales* se conocen sólamente biflavonoides en tres especies de *Grimmiaceae* y una de *Phychomitraceae*, y ningún otro tipo de flavonoide. De nuevo, nos encontraríamos con que estos primeros órdenes, supuestamente menos evolucionados, de la subclase *Bryidae*, se caracterizan por sintetizar casi exclusivamente biflavonoides.

En el orden *Funariales*, la situación cambia sensiblemente respecto a los órdenes anteriores, ya que a los biflavonoides identificados en dos especies de *Funariaceae* y una de *Splachnaceae*, hay que sumar otros tipos flavonoídicos tales como auronas en *Funariaceae* y antocianidinas en *Splachnaceae*. Es difícil precisar si la aparición de estos dos nuevos tipos flavonoídicos ha de considerarse o no como un carácter más evolucionado respecto a los órdenes anteriores. De hecho, se conocen antocianidinas en la subclase *Sphagnidae*, aunque de una estructura muy especial, y de la misma manera, se conocen biflavonoides formados por dímeros con aurona (incluso biauronas) en *Dicranaceae* del orden *Dicranales*. De acuerdo a lo anterior, podría postularse que la síntesis de **antocianidinas**, **auronas**, **flavonas** y **biflavonoides** ha de considerarse como un carácter **poco evolucionado** o plesiotípico en musgos.

El siguiente orden considerado, el orden *Bryales*, permite en cierta manera tomar los postulados anteriores como válidos, ya que puede servir de "**frontera**" entre los órdenes menos evolucionados y los más evolucionados de la subclase *Bryidae*. En el orden *Bryales* y más concretamente en la familia tipo, *Bryaceae*, los tipos flavonoídicos identificados son muy numerosos, ya que se conocen flavonas (3 especies), flavonas-O-glicósidos (6 especies), flavonas-C-glicósidos (3), isoflavonas (2), isoflavonas-O-glicósidos (2), antocianidinas (4), flavonoles (1), flavonoles-O-glicósidos (2) y biflavonoides (6). La síntesis de **isoflavonas** y **flavonoles**, de acuerdo a lo anterior, podría ahora considerarse como un carácter **evolucionado** en musgos, frente a los órdenes anteriores que no sintetizan dichos tipos flavonoídicos. La identificación en dicha familia *Bryaceae* de biflavonoides formadas con monómeros de isoflavona (brioflavona y heterobrioflavona) podría confirmar lo antes expuesto, y reafirmarnos en que el orden *Bryales* y más concretamente la familia *Bryaceae* servirían de frontera, entre los órdenes menos evolucionados y los más evolucionados de la subclase *Bryidae*.

Las isoflavonas y sus derivados tienen estructuras que simulan a los esteriodes (Swain, 1986), y a otros controladores del crecimiento y desarrollo de ciertos depredadores potenciales, por lo que pueden interferir en dichos procesos. Así mismo, ciertas estructuras poliméricas como proantocianidinas y biflavonoides, pueden unirse a proteínas, incluído enzimas, y a otros polímeros tales como polisacáridos y ácidos nucleicos (Swain, 1986), favoreciendo la función defensiva de las isoflavonas contra la depredación. En *Bryaceae* se sintetizan tanto isoflavonas, antocianidinas como biflavonoides, lo que sugiere que la **síntesis de isoflavonas** en la familia es una **especialización** particular frente a la depredación por insectos, ya que en ninguna otra familia ni género de musgos

se sintetizan.

En la familia *Mniaceae* del orden *Bryales* se cumplen perfectamente todos los postulados anteriores, ya que al igual que en *Bryaceae*, se reconocen biflavonoides (4 especies), flavonas-O-C-glicósidos (6 especies), flavonas-C-glicósidos (8), flavonas (6), flavonas-O-glicósidos (10), y el carácter supuestamente más evolucionado, la síntesis de flavonoles-O-glicosilados en una especie. Así mismo se identificó una **chalcona** (O-glicósido) en una única especie, cuya presencia debe considerarse así mismo como un carácter de poca evolución, ya que su síntesis apenas requiere pocos pasos metabólicos (Fig. 3.10), aunque primero se debe confirmar su estructura.

En otras seis familias del orden *Bryales*, o bien sólo se han identificado biflavonoides (*Rhizogoniaceae*, *Hypnodendraceae*, *Leptostomataceae*, *Meesiaceae*) o ni siquiera se conoce la síntesis de flavonoides (*Spiridentaceae*). En *Timmiaceae* se sabe de la síntesis de flavonoides pero no se han descrito biflavonoides.

En las dos familias restantes estudiadas en el orden *Bryales* se conoce la existencia de biflavonoides tanto en *Bartramiaceae* como en *Aulacomniaceae*, pero a diferencia de los órdenes anteriores e incluso del resto de familias de su propio orden, se han identificado en ambas **triflavonoides** e incluso en *Bartramiaceae* triflavonoides cíclicos. Así mismo, en *Bartramiaceae* se conocen **biflavonoides macrocíclicos** y **ácidos flavonoídicos**. Todos estos caracteres (ciclación molecular, adición de un tercer monómero, existencia de ácidos flavonoídicos) han de considerarse como bastante **evolucionados** respecto a los anteriores órdenes o familias de *Bryales* que no los poseen. Así mismo, la existencia de triflavonoides en *Aulacomniaceae* y en *Bartramiaceae* habla en favor de su gran parentesco filogenético.

Pasando ya a un orden supuestamente más evolucionado, el orden *Ortotrichales*, se conoce la síntesis de biflavonoides en cuatro especies de *Ortotrichaceae*, pero no de algún otro flavonoide que pudiera considerarse como un carácter de mayor evolución.

En el orden *Leucodontales* la situación es similar al orden anterior, ya que se conoce la síntesis de biflavonoides en nueve familias (*Racopilaceae*, *Neckeraceae*, *Leucodontaceae*, *Hedwigiaceae*, *Meteoriaceae*, *Ptychomniaceae*, *Cryphaceae*, *Cyrtopodaceae*, *Lepyrodontaceae*), de flavonas O- y C-glicosiladas en *Hedwigiaceae*, y en el resto de familias, o sólo se sabe que sintetizan flavonoides (*Pterobryaceae*) o que no los sintetizan (*Fontinalaceae*, *Climaciaceae*, *Anomodontaceae*, *Thamniaceae*, *Phyllogoniaceae*, *Prionodontaceae*). En resumen, se sigue observando la supuestamente poco evolucionada síntesis en musgos de biflavonoides y flavonas, sin añadir ningún carácter de mayor evolución.

En el orden *Hookeriales*, de nuevo, o bien se desconoce la existencia de flavonoides en *Hookeriaceae* o sólo se han identificado biflavonoides en *Hypopterygiaceae*.

El orden *Hypnales* va a confirmar, sin embargo, muchos de los postulados antes expuestos. En la familia menos evolucionada del orden, *Leskeaceae*, no se han identificado flavonoides al igual que en *Echinodiaceae* y *Rhytidiaceae*; mientras que en *Thuidiaceae*, *Amblystegiaceae*, *Brachyteciaceae*, *Entodontaceae*, *Plagiotheciaceae*, *Hypnaceae*, *Sematophyllaceae*, *Lembophyllaceae* e *Hylocomiaceae* se conoce la síntesis de biflavonoides. En *Amblystegiaceae* se han identificado también antocianidinas, y en *Hylocomiaceae* flavonas y flavonas-O-glicosiladas, considerados todos estos caracteres como de poca evolución, y que confirman lo hasta ahora hipotetizado. Es

precisamente en la familia tipo, en *Hypnaceae*, donde se demuestra la existencia de ciertos caracteres que permiten considerar al orden *Hypnales* como más evolucionado respecto a los anteriores. Tales caracteres son la síntesis de flavonoles, de ácidos flavonoídicos, de **aldehidos flavonoídicos** y de biflavonoides formados por dímeros de flavonol y **dihidroflavonol**. Todos estos caracteres han de considerarse en conjunto como un carácter **bastante evolucionado**, sobre todo la identificación de derivados de dihidroflavonol.

El orden *Seligerales* no añade nada nuevo a lo ya conocido, pues únicamente se sabe de la síntesis de biflavonoides en *Seligeraceae*.

Es precisamente el orden *Tetraphidales*, y su familia tipo *Tetraphidaceae*, la que viene a confirmar mediante la síntesis (al menos dudosa) de dihidroflavonoles, que éste es un carácter que supone cierta evolución con respecto a los órdenes que no sintetizan dihidroflavonol. La síntesis en *Tetraphidaceae* de dihidroflavonoles (Vandekerkhove, 1977a), ha de considerarse como un carácter apotípico que explica la posición del orden *Tetraphidales* como uno de los más evolucionados de la subclase *Bryidae* junto al orden *Hypnales*. La no síntesis de biflavonoides en *Tetraphidales* explicaría así mismo, que este orden sea ciertamente más evolucionado que *Hypnales* que sí los sintetiza.

En el último orden de la subclase, en *Polytrichales*, no se conoce la síntesis de flavonoide alguno, ni siquiera biflavonoides o flavonas, excepto los datos dudosos expuestos para *Pogonatum* spp. En cambio sí se conoce la síntesis de otros compuestos cercanos a los flavonoides como son las **cumarinas** (Jung, 1993-94), también identificadas en el orden anterior.

En resumen, las investigaciones sobre la química flavonoídica de musgos no han hecho **sino comenzar**, a pesar de los numerosos y productivos avances logrados en los últimos años. Cualquier tipo de manifestación o conclusión de índole taxonómico o sistemático que se haga a nivel global sobre la composición flavonoídica de musgos, será al menos incompleta, ya que como los resultados demuestran, los principales descubrimientos están aún por llegar. A medida que se reinvestigan aquellas especies en las que se suponía conocer la composición flavonoídica, se identifican en ellas nuevos flavonoides antes no descritos. Por todo ello, las conclusiones que antes derivaron de tales conocimientos deben revisarse y ponerse al día, sobre todo los trabajos de McClure & Miller (1967), y trás un profundo análisis poder albergar al menos, algún tipo de hipótesis preliminar sobre las relaciones filogenéticas existentes entre musgos, hepáticas y antocerotas, y entre éstos (briófitos) con las algas o con los pteridófitos.

Podríamos finalmente hipotetizar acerca de la evolución sufrida por la composición flavonoídica de musgos, de acuerdo a lo antes expuesto:

1. La síntesis de antocianidinas en la subclase *Sphagnidae* ha de considerarse como un carácter poco evolucionado, que nos permite afirmar que esta subclase es la más primitiva de musgos. Esta afirmación, sin embargo, debemos tomarla con precaución, pues si bien es cierto la presencia de antocianidinas en la subclase menos evolucionada de musgos, también lo es que la síntesis de antocianidinas requiere numerosos pasos en la ruta biosintética (Fig. 3.10), lo que de acuerdo a Swain (1986) no es típico de organismos poco evolucionados. No obstante, la particular estructura de las esfagnorrubinas de *Sphagnidae* nos permiten mantener tales postulados.

2. En la subclase *Andreaeidae* no hay antociadinidas pero sí posiblemente flavonoides, por lo que parece ser más evolucionada que la subclase anterior.

3. En la subclase *Bryidae*, la más evolucionada de todas, los órdenes más primitivos se caracterizan por sintetizar básicamente auronas, flavonas y biflavonoides, y excepcionalmente chalconas. De hecho, y como refleja la Fig. 3.10, tanto la síntesis de flavonas como de biflavonoides requiere de pocos pasos biosintéticos a partir de la flavanona mediante una flavona-sintasa. Esta poca elaboración de la ruta biosintética tanto de flavonas como de biflavonas (biluteolinas) habla en favor del carácter plesiotípico que su presencia en musgos posee. Lo mismo puede afirmarse de las chalconas, ya que constituyen la estructura básica a partir de la cual se biosintetizan el resto de flavonoides (ver Fig. 3.10). El orden *Bryales* supone la frontera entre los órdenes menos evolucionados de la subclase (con flavonas, auronas y biflavonoides) y los más evolucionados. En dicho orden se aunan caracteres considerados de poca evolución (flavonas, biflavonoides y los relictos bioquímicos de antocianidinas y chalconas) con otros que suponen un paso evolutivo notable (síntesis de flavonoles, isoflavonas, triflavonoides, ácidos flavonoídicos y ciclación molecular). A partir de dicho orden *Bryales* parece existir una tendencia a reducir la síntesis de flavonoides, aunque órdenes más evolucionados siguen presentando nuevos caracteres que suponen un nuevo paso evolutivo, como ocurre con la síntesis de dihidroflavonoles y aldehidos flavonoídicos en *Hypnales*. En particular, la síntesis de dihidroflavonoles, parece ser un paso evolutivo notable que podría culminar definitivamente la evolución de la complejidad estructural de los flavonoides de musgos. En *Tetraphidales* se mantiene la síntesis de dihidroflavonoles pero se pierde definitivamente la de biflavonoides, y así mismo se comienza la sustitución de los flavonoides por cumarinas, que se ve culminada en *Polytrichales*, el orden más evolucionado de musgos, en el cual la tendencia es a no sintetizar flavonoides y sí cumarinas.

No obstante, algunos autores como Suire & Asakawa (1979), inciden en el **origen polifilético** de las tres subclases de *Musci*, lo que permitiría explicar la presencia de antocianidinas en *Sphagnidae*.

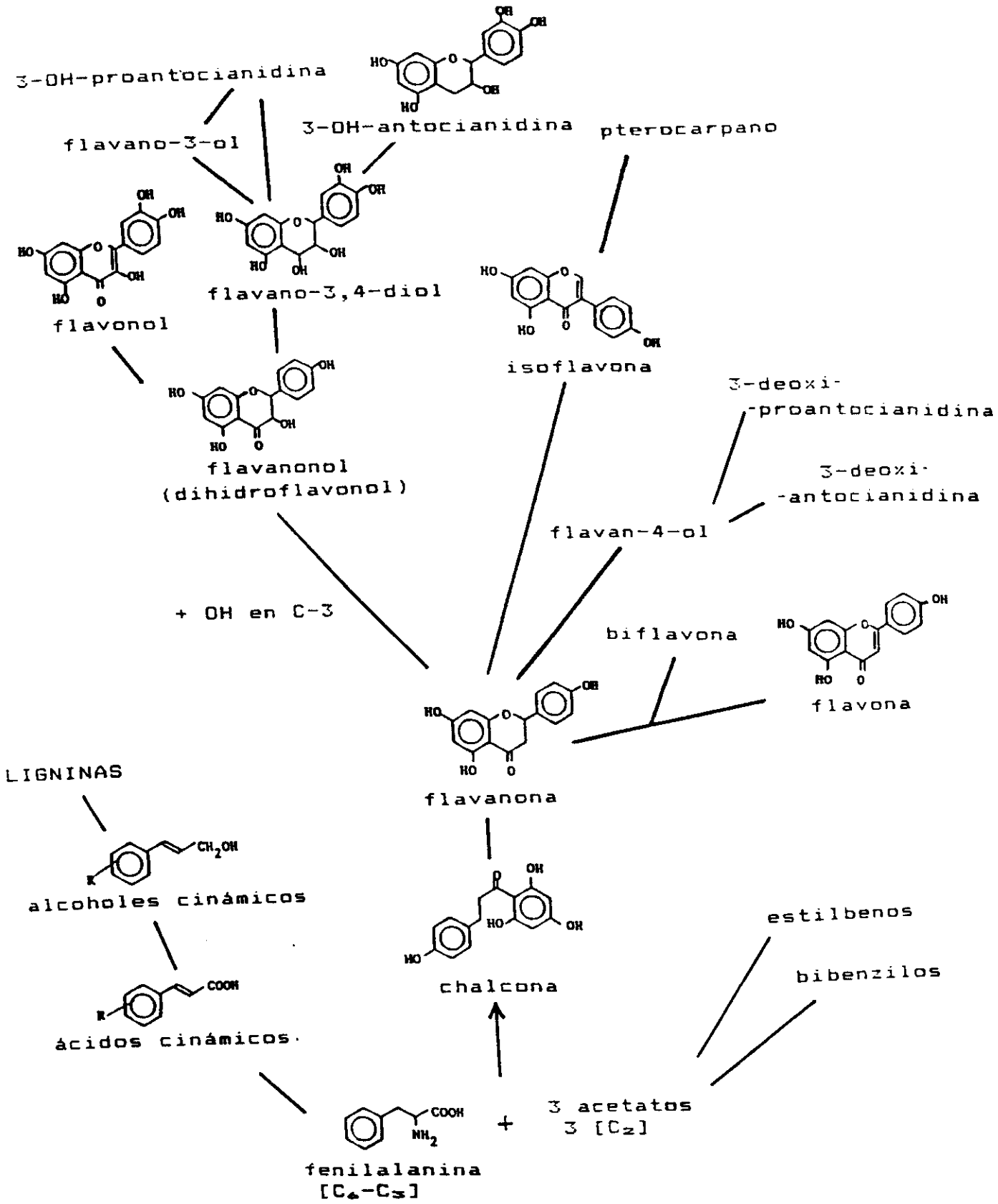


Fig. 3.10.: Esquema evolutivo de la biosíntesis de flavonoides (Swain, 1986; Stafford, 1991)

B. Biflavonoides y Triflavonoides en Musgos.

Los biflavonoides de musgos poseen una amplia variedad estructural, fundamentada no sólo en la naturaleza de los monómeros sino también en los tipos de uniones interflavonoídicas. La naturaleza de ambos monómeros en los biflavonoides de musgos es variada, aunque por regla general la mayoría derivan de la luteolina, una flavona tetrahidroxilada derivada de la apigenina. Los biflavonoides más comunes en musgos son pues las biflavonas, y más concretamente las biluteolinas, siendo el tipo de enlace la única variación más sobresaliente. Así, entre las biluteolinas más frecuentes nos encontramos con la filonotisflavona (enlace 2',8''), la dicranolomina (2',6''), 5',3'''-diOH-amentoflavona (5',8'') y 5',3'''-diOH-robustaflavona (5',6''). En los últimos años se han identificado algunas biflavonas formadas por un monómero de apigenina y otro de luteolina, tales como la 5'-OH-robustaflavona o la 5'-OH-amentoflavona. Incluso se conoce la existencia de biapigeninas en *Homalothecium lutescens* (*Brachytheciaceae*).

Se conocen así mismo dímeros de flavona-flavanona como la 2,3-dihidro-filonotisflavona o 2,3-dihidro-dicranolomina que son las más frecuentes, formadas por un monómero de luteolina y otro de eriodictiol. Menos frecuentes son los dímeros apigenina-naringenina (flavona-flavanona). En 6 familias (*Brachytheciaceae*, *Hypnaceae*, *Entodontaceae*, *Meteoriaceae*, *Amblystegiaceae*, *Thuidiaceae*) se conocen además dímeros de flavanona derivados de la naringenina (binaringeninas). Los dímeros isoflavona-flavona son exclusivos del género *Bryum* y son del tipo orobol-luteolina con enlaces 5',8'' y 5',6''.

La identificación de biflavonoides con un monómero de aurona, concretamente de aureosidina es muy cercana en el tiempo. Se conocen dímeros aurona-flavanona en tres especies del género *Campylopus* de la familia *Dicranaceae*, formados por un monómero de aureosidina (aurona) y otro de eriodictiol (flavanona) unidos mediante un enlace del tipo 5',6''. Las biauronas son exclusivas de la familia *Aulacomniaceae* y están formadas por dos monómeros de aureosidina.

Entre los biflavonoides más notables identificados, debemos destacar la bartramiaflavona y la anhidrobartramiaflavona, por ser ambos macrocíclicos y exclusivos de la familia *Bartramiaceae*, y por suponer la ciclación molecular un notable paso evolutivo en la química flavonoídica de musgos.

Hasta el momento, todos los biflavonoides nombrados poseen uniones interflavonoídicas de tipo C-C, aunque en *Hypnum cupressiforme* se conocen así mismo biflavonoides con enlaces de tipo éter. Precisamente en dicha especie se conocen los únicos biflavonoides con monómeros de dihidroflavonol y flavonol.

Los triflavonoides, identificados por primera vez en *Bartramia pomiformis* pueden, de igual manera, cumplir la función de **marcadores específicos** de musgos frente a hepáticas. Por el momento, los identificados son todos ellos triluteolinas, por lo general con enlaces del tipo de la filonotisflavona, aunque en esta Memoria Doctoral se ha identificado la primera triluteolina macrocíclica denominada Ciclo-Triluteolina. En la Tabla 3.1., queda resumida toda esa inmensa variedad de tipos estructurales, monómeros y uniones interflavonoídicas de los biflavonoides de musgos. Sólo se incluyen aquellas familias en las que se identificó la estructura de algún biflavoide, y no aquellas en las que sólo se conoce la presencia de biflavonoides de forma general.

Tabla 3.1.: Biflavonoides de musgos: tipos de monómeros y enlaces.

TAXON	Lu	Ap	Er	Na	Or	Au	Df	Kf	5' 8''	5'' 8'''	2' 8'''	2' 6''	3'3'''	5' 5''	3'- O- 4'''	4'- O- 2''
Dicranaceae	+		+			+			+	+	+	+				
Dycnemonaceae	+								+	+						
Grimmiaceae	+								+	+						
Bryaceae	+				+				+	+						
Mniaceae	+	+	+						+	+						
Aulacomniaceae	+		+			+			+	+	+	+		+		
Bartramiaceae	+		+						+	+	+	+				
Hedwigiaceae	+								+							
Leucodontaceae	+								+	+						
Meteoriaceae				+									+			
Thuidiaceae				+									+			
Amblystegiaceae				+									+			
Hypnaceae		+		+			+	+		+			+		+	+
Entodontaceae				+									+			
Brachytheciaceae		+	+	+									+			
Hylocomiaceae	+	+	+	+					+	+			+			

Lu:luteolina, Ap:apigenina, Er:eriodictiol, Na:naringenina, Or:orobol, Au:aureosidina, Df:dihidroflavonol, Kf:kaemferol.

Harborne (1977) consideraba la presencia de biflavonoides en 12 familias de Angiospermas como un relicto bioquímico primitivo, que obviamente no podemos admitir en briófitos donde, la complejidad estructural de los biflavonoides alcanza su grado máximo. Con seguridad, la síntesis de los biflavonoides es una de las especializaciones químicas que han experimentado los musgos, y como sugería Geiger (1990), como una respuesta frente a la radiación ultravioleta del sol en la conquista de la superficie terrestre. Sin embargo, debemos admitir, de acuerdo a la Fig. 3.10., que la síntesis de biflavonoides requiere de muy pocos pasos metabólicos, lo cual es típico de organismos primitivos (Swain, 1986).

Gornall & col. (1979) sugieren que un determinado tipo flavonoídico (carácter) tiene tres estados definidos: primitivo, avanzado y muy avanzado. El primitivo y el muy avanzado, a menudo, fenotípicamente son el mismo (Richardson, 1983). Esta acepción explicaría la síntesis de biflavonoides en organismos primitivos como los musgos y su existencia en ciertas monocotiledóneas (Geiger & Quinn, 1988).

Ahora bien, todo lo antes mencionado no es más que una generalización aceptable siempre y cuando nos refiramos a biflavonas. Pero como ya se mencionó, en musgos se conocen biauronas, dímeros con dihidroflavonol y flavonol, biapigeninas, biluteolinas, etc. Toda esta inmensa variedad de estructuras biflavonoídicas de musgos, algunas exclusivas de ellos, así como la ciclación molecular

y la adición de un tercer monómero para constituir triflavonoides, no explican sino la alta especialización que los musgos poseen en la síntesis de biflavonoides y triflavonoides.

En resumen, debemos aceptar que los musgos son organismos primitivos desde un punto de vista morfológico y ontogenético, pero su evolución química ha ido muy paralela a la de las angiospermas, ya que en cierta manera comparten numerosas afinidades, sobre todo en su composición flavonoídica.

3.2.2. Relaciones entre la composición flavonoídica de *Musci* y otros taxones.

La evolución de los flavonoides en el pasado, ha sido considerada bajo distintos puntos de vista, tanto quimiotaxonómicos como filogenéticos, basados en la acumulación final de diversos productos del metabolismo en distintos grupos vegetales, especialmente entre las angiospermas (Harborne, 1988a). Recientemente, similares estudios de índole quimiosistemática, bajo un prisma recopilatorio, se llevaron a cabo en briófitos y pteridófitos (Markham, 1988 y 1990).

Probablemente, la función que los flavonoides pudieron llevar a cabo durante los primeros pasos de la evolución y conquista de los territorios emergidos, fue la de servir a los vegetales como "filtros" de la luz ultravioleta. Este atractivo concepto, considerado como válido por muchos autores (Geiger, 1990), supone sin embargo la existencia de altas concentracciones de flavonoides, lo cual es una dificultad añadida a la hora de argumentar las ventajas que esta función pudiera desempeñar en los primeros estados evolutivos de las plantas terrestres. Presumiblemente, las primeras enzimas capaces de llevar a cabo la síntesis de flavonoides no fueron tan abundantes como algunas de las actuales ni tan eficaces, ya que esa alta concentración de flavonoides requerida no se había acumulado inicialmente (Stafford, 1991). Al mismo tiempo, los mecanismos que permitieron dicha acumulación en las vacuolas celulares en una concentración efectiva como filtro de la luz ultravioleta, coevolucionaron con otros que permitieron su transporte hacia las paredes celulares. Muy posiblemente, los primeros compuestos fenólicos que sirvieron de filtros contra la luz ultravioleta fueron los **fenilpropanoides** (Kubitzki, 1987), ya que poseen coeficientes de absorción efectivos, aunque lógicamente menores que los flavonoides por su peso molecular más bajo. El desarrollo de un sistema enzimatico "primordial" supuso la síntesis de flavonoides a partir de éstos por la adición de acetatos (ver Fig. 3.10) y su posterior acumulación.

Posteriormente, la aparición de especializaciones morfológicas entre diversas partes del vegetal, con la diferenciación de frutos, raíces, hojas, tallos y órganos reproductores, introdujo paralelamente una evolución de los sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de flavonoides. Aumentó el número de funciones que éstos podían desempeñar y su complejidad.

De acuerdo a Kubitzki (1987), los primeros vegetales que conquistaron los territorios emergidos que aún mantenían la humedad necesaria, procedían de la línea algal de las **Carofíceas**, directamente emparentadas con el grupo acuático de las algas verdes o Clorofíceas. Presumiblemente, estos incipientes vegetales terrestres desarrollaron células con una gran vacuola central, para el almacenamiento de agua, tal y como ocurre en *Nitella* y en las fanerófitas. Dicha vacuola, pudo servir al mismo tiempo de lugar de almacenaje de grandes cantidades de compuestos fenólicos del tipo

fenilpropanoide (C_6-C_3) y de los flavonoides (C_{15}) posteriormente sintetizados. En las formas actuales de las *Charophyceae*, tales como *Nitella* o *Chara*, se cree que la conquista del medio acuático fue una adaptación secundaria respecto de las primitivas formas terrestres (Chapman, 1985). La presencia de flavonoides en las carófitas actuales es cuestionable (Markham, 1988), aunque sí parecen ser capaces de sintetizar ciertas flavonas C-glicosiladas, como *Nitella hookeri* que contiene 6,8-di-C-glicósidos de apigenina y luteolina, también identificados tentativamente en *Chara* (Markham & col., 1969; Swain, 1975).

Los organismos pluricelulares, presumiblemente adquirieron un control hormonal que les permitió la síntesis de fenilpropanoides, seguida de la de flavonoides muy simples tales como flavanonas, flavonas y dihidroflavonoles (Stafford, 1990). La capacidad de acumulación en cantidades significativas de dichos compuestos fenólicos en las vaculas centrales de sus células, les permitió utilizarlos como una "defensa química" frente a la luz UV-A y UV-B. Contra ambas, los flavonoides son mucho más efectivos que los fenilpropanoides (Stafford, 1991). Dentro de dichos organismos pluricelulares, las primeras y pioneras plantas terrestres que conquistaron el suelo fueron la línea de los **briófitos**, que sintetizan principalmente flavonas y biflavonas, flavonoides ambos que requieren de pocas vías metabólicas y por tanto, de un sistema enzimático no demasiado complejo. Un avance evolutivo es evidente por el grado de elaboración de una determinada ruta metabólica (Markham, 1990). De esta manera, aquellos compuestos cuya síntesis requiera muchos pasos metabólicos y por tanto de un sistema enzimático complejo, no estarán presentes en los organismos más primitivos (Swain, 1986). En este sentido, los briófitos cumplen a la perfección su rol de vegetales bastante primitivos, ya que sus dos tipos flavonoídicos básicos (flavonas y biflavonas) requiere pocos pasos biosintéticos (ver Fig. 3.10).

Sin embargo, la química flavonoídica dentro de los briófitos es sensiblemente distinta en cada uno de los grupos. Los musgos (clase *Musci*) se han especializado en la síntesis de biflavonoides, de las que carecen las otras dos clases (*Hepaticae* y *Anthocerotae*). Las hepáticas (*Hepaticae*) sintetizan al igual que musgos, flavonoles, flavonas y auronas, pero no dihidroflavonoles ni biflavonoides. A diferencia de los musgos, en hepáticas se conoce la síntesis de flavanonas (agliconas) y de un tipo especial de flavonas, las **tricetinas-di-C-glicosiladas**, cuya síntesis no pueden llevar a cabo los musgos (Zinsmeister & Mües, 1980). Esta diferente composición flavonoídica de las diversas clases de *Bryophyta*, habla en pos del origen **polifilético** del grupo, ya que como afirma Asakawa (1986) no existen afinidades químicas notables entre las tres clases de briófitos. Las hepáticas según este autor tendrían un ancestro dentro del grupo de las algas pardas posiblemente, mientras que los musgos procederían de la línea de las algas verdes. Suire & Asakawa (1979), llegan incluso más lejos, ya que afirman que los datos químicos existentes dentro de la clase *Musci*, que consideran antinaturales, podrían indicar la existencia de tres grupos o subclases bien definidos que podrían separarse como clases distintas. Según ellos, dentro de briófitos existirían 5 clases: *Hepaticae*, *Anthocerotae* y las tres subclases incluídas en *Musci* (*Sphagnidae*, *Andreaeidae* y *Bryidae*).

Los briófitos en general, y los musgos en particular, bioquímicamente hablando parecen estar más cercanos a las plantas vasculares, sobre todo a los pteridófitos, que a las algas verdes (Suire & Asakawa, 1979). Ciertos taxones alcanzan grados de complejida biosintética muy cercanos a los de ciertas familias avanzadas de las angiospermas, mientras que otros en cambio son mucho menos

avanzados. Esta heterogeneidad química de los briófitos, en cualquier nivel de clasificación, es similar a la de su diversidad morfológica, lo que concuerda plenamente con esa inmensa variabilidad de su composición flavonoídica (flavonas, biflavonoides, flavonoles, isoflavonas, antocianidinas, dihidroflavonoles, auronas, chalconas, etc.) (ver Fig.3.7. pp. 22).

Las plantas vasculares más primitivas (*Psilopsida*) contienen biflavonas y trazas de otros O-glicósidos (Cooper-Driver, 1980), que también aparecen respectivamente en *Selaginellales* y en las más primitivas *Lycopsida* (Voirin & Jay, 1978). Las biflavonas, que aparecen principalmente en los pteridófitos más primitivos (*Psilotales*, *Selaginellales*), comparten este mismo criterio en las más primitivas gimnospermas (*Cycadales*, *Ginkgoales*) y angiospermas (Swain, 1974). Los otros dos órdenes de *Lycopsida*, *Lycopodiales* e *Isoetales*, contienen únicamente flavonas-O-glicósidos. La clase *Sphenopsida*, relacionada mediante su registro fósil con los licopodios, muestra un único avance en la química flavonoídica, contiene flavonoles, lo que indica su habilidad para introducir un grupo hidroxilo en posición C-3 (3-OH) de la flavanona precursora, junto a proantocianidinas y procianidinas. Estas nuevas características biosintéticas, que incluyen una mayor elaboración del sistema enzimático, son propias de los miembros más avanzados del Reino Vegetal, y probablemente su síntesis ocurrió durante el Devónico (Swain, 1980). La existencia de flavonoles, antocianidinas y dihidroflavonoles en musgos, juega el mismo papel que en pteridófitos, y su presencia en ciertas especies (*Hynum cupressiforme* p.e.) es indicativa de un mayor grado de evolución respecto a otros musgos incapeces de llevar a cabo su síntesis.

Los musgos y hepáticas, a pesar de su primitivo registro fósil y de la presunción de que son los progenitores de todas las plantas terrestres, son tan avanzados como *Sphenopsida* en su habilidad para para producir una gran diversidad de estructuras flavonoídicas (flavonoles, flavonas trihidroxiladas en el anillo B, etc.). Como afirma Swain (1980), parecería que, en base a ello, hasta cierto punto podríamos considerar que los briófitos procederían de la reducción morfológica de los vástagos de las plantas vasculares en el curso de la evolución, o bien, han experimentado un avanze paralelo a una "primitiva" clase botánica de angiospermas hoy extinta.

La presencia de biflavonoides en musgos y en los más primitivos pteridófitos, es una evidencia más de la afinidad química existente entre ambos (Asakawa, 1986; Geiger & Quinn, 1988), sustentada por una posible y ya mencionada evolución paralela, asociada con seguridad a la defensa contra predadores. Así mismo, la ausencia de biflavonoides en hepáticas, de acuerdo a Smith (1986) sugiere una similaridad química entre éstas y las algas pardas.

Los helechos "verdaderos" (*Filicinae*), ofrecen nuevas estructruras flavonoídicas respecto a *Sphenopsida*. Producen también flavonoles y protantocianidinas (excepto *Ophioglossales*), así como 3-deoxiantocianinas, flavonoides C- y O-metilados, acumulan chalconas y dihidrochalconas (Wollenweber, 1981). En los *Filicales,* que parecían carecer de biflavonoides (Cooper-Driver, 1980), se han identificado últimamente ciertos derivados metilados de la amentoflavona en *Osmunda regalis* L. y las poco comunes hegoflavonas (uniones 6',6'') en *Cyathea spinulosa* Wall. La ocurrencia de biflavonoides (serie de la amentoflavona) en los miembros más primitivos de *Filicales*, debe considerarse como un carácter plesiomórfico en los helechos, que en cambio son inherentes en otras plantas vasculares ancestrales que contienen biflavonoides (*Selaginellales* p.e.).

En gimnospermas, tanto *Cycadales* (series de la amentoflavona e hinokiflavona) como *Taxales*

(derivados de la amentoflavona) tienen biflavonoides. En *Coniferales* sólo *Lepidothamnus* de la familia *Podocarpaceae* posee una estructura con esqueleto biflavonoídico de podocarpusflavona (Geiger & Quinn, 1988). El resto de las especies de *Podocarpaceae* tienen derivados de la amentoflavona y en menor medida de hinokiflavona. La misma diversidad biflavonoídica se observa en la familia *Taxodiaceae*. En *Cupressaceae* se han identificado cupresoflavona en *Platycladus orientalis* (L.) Franco, pero faltan los biflavonoides en otras especies. También se conocen biflavonoides en *Araucariaceae*, *Cephalotaxaceae* y *Pinaceae* (sólo en *Abies* Mill., y *Picea* A.Dietr.), así como un espiroflavonoide en *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr., de las pináceas, como recojen Geiger & Quinn (1988).

Todos estos datos, refuerzan el punto de vista por el cual la ausencia de biflavonoides en la mayoría de las especies de *Pinaceae* es debida a su pérdida secundaria a lo largo de la evolución, dentro de las vías metabólicas que estaban presentes en las primitivas coníferas.

Geiger & Quinn (1988), recogen la identificación de biflavonoides en 32 géneros de 15 familias de angiospermas, tanto de dicotiledóneas como monocotiledóneas. La gran diversidad de puntos de acumulación de los flavonoides en las angiospermas (raíces, hojas, frutos, semillas, polen, etc.), sugiere una amplia multitud de funciones: filtros de la luz ultravioleta durante la colonización en el Silúrico de los territorios emergidos, proteción contra depredadores e invasión fúngica, antibióticos, etc.

Los biflavonoides que se han identificado en las plantas terrestres, tanto en briófitos (musgos) como en la línea de los traqueófitos (plantas vasculares), parece poco probable que tengan un origen común, sino que la hipótesis más válida es su desarrollo independiente (Geiger & Quinn, 1988). La identificación de series de amentoflavona debe pues ser tomada como un carácter primitivo (Geiger & Quinn, 1975), en base a su reciente descubrimiento en *Filicales*.

Desde un punto de vista evolutivo, los datos existentes indican una rápida evolución de las estructuras flavonoídicas básicas (chalconas, flavanonas, flavonas) durante el periodo Devónico (400 millones de años atrás), seguida de un largo periodo de relativo estancamiento, hasta el mismo momento en que se produce el dominio territorial de las angiospermas en el Cretácico medio (130 millones de años).

Los cambios originados a lo largo de la evolución en la estructura flavonoídica básica o "primordial", que dieron lugar a esa enorme diversidad de estructuras existentes tanto en musgos como en angiospermas, son debidos a la importancia funcional de proteger a los vegetales contra la luz, herbívoros primitivos y fitopatógenos. Tras el Cretácico, los cambios ocurridos presumiblemente derivarían de procesos de coevolución con diversos polinizadores (aves, insectos) y herbívoros (mamíferos, reptiles) (Stafford, 1991).

En el curso de la evolución, la diversidad flavonoídica ha dependido estrechamente de un incremento del número de rutas biosintéticas requeridas (Swain, 1980), para producir nuevas estructuras (p.e. isoflavonas), y en segundo lugar, de la habilidad de los vegetales para emplear ciertas rutas y conseguir aumentar la complejidad de los más primitivos flavonoides (p.e. flavonas). Ambos pasos forman parte de un proceso evolutivo constante, que ha tenido fiel reflejo en la composición flavonoídica de musgos: tanto biflavonas como isoflavonas podrían adaptarse a tales planteamientos, sobre todo aquellas estructuras que requieren ciclación molecular y adición de un

tercer monómero.

Por comparación con las angiospermas, podríamos afirmar que la estructura de los flavonoides identificados en musgos, es indicativa de la existencia de ciertos niveles de evolución biosintética, paralelos a la diversidad morfológica del grupo. Estos hechos se manifiestan sobre todo en la familia *Bryaceae*, que es capaz de sintetizar diversos flavonoles, incluso derivados glicosilados, que de acuerdo a la Fig. 3.10 necesitan en su síntesis de al menos tres pasos metabólicos (chalcona-flavanona-dihidroflavonol-flavonol).

Resumiendo finalmente, podemos afirmar que existe una tendencia general a lo largo de la evolución, a aumentar la complejidad estructural de los flavonoides desde la línea algal hasta las angiospermas (Harborne, 1967; Swain, 1975). Sin embargo, aunque esta doctrina es bastante clara en la mayoría de los casos, no siempre puede explicar la existencia de los primitivos biflavonoides en musgos y monocotiledóneas, o la existencia de auronas en las angiospermas más evolucionadas así como en musgos. Por todo ello, creemos que no se puede realizar ninguna afirmación generaliza en el sentido de admitir, en base a la composición flavonoídica, que los flavonoides de musgos son más primitivos que los de angiospermas. Más bien, la hipótesis más manejable sería la de una **evolución paralela pero independiente**, que en el caso de los musgos iría encaminada, salvo excepciones, a una especialización concreta en la síntesis de biflavonoides, así como de otras estructuras trimonoméricas (triflavonoides).

La evolución de un sistema enzimático único hacia la vía metabólica que conduce a las ligninas, permitió una mayor evolución y diversificación morfológica y ecológica de las plantas vasculares. Los briófitos carecen de este sistema enzimático, y por ende, son incapaces de sintetizar lignina, lo cual les obligó a seguir dependiendo del medio y a especializarse en la síntesis de flavonoides, consiguiendo estructuras a menudo más complejas en los taxones más evolucionados.

Muy diversos compuestos químicos se han utilizado como criterio de determinación evolutiva, así como del establecimiento de las relaciones taxonómicas y filogenéticas existentes entre los vegetales. Uno de ellos son los flavonoides, que han demostrado sufienciente eficacia y verosimilitud en ciertos niveles taxonómicos, pero plantean ciertos problemas cuando se intenta analizar su evolución desde las algas hasta las angiospermas. Obviamente, una comparación directa entre las secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos homólogos entre distintos taxones vegetales, proporcionaría la información más fiable y concreta del proceso de la evolución. Sin embargo, tal información es extremadamente limitada y se precisa acudir a otros criterios, como en nuestro caso la composición en flavonoides.

3.3. Actividad Biológica

El potencial terapeútico moderno se nutre en buena parte de los principios activos de las plantas, ya sean aislados de ellas u obtenidas por síntesis.

La ventaja del empleo de los vegetales es que, junto a sus principios activos, existen en muchos casos otros constituyentes de acción sinérgica que potencian su acción y la hacen más completa y duradera que el principio o principios activos aislados (Navasquillo, 1992).

El hombre depende muy extrechamente del "Mundo Vegetal", sin embargo, a lo largo de muchos milenios no ha sido aún capaz de alcanzar un conocimiento completo de las plantas más comunes. En la actualidad, en todo el mundo, se está produciendo una fuerte corriente de interés por las plantas como elementos terapeúticos, en un rama de la medicina que ya desarrollaron con profusión ciertas culturas históricas. En la antigüedad, algunas plantas eran consideradas sagradas por sus propiedades terapeúticas reconocidas, y su efecto se suponía debido a "cierto" poder mágico, sin necesidad de explicarse su mecanismo de acción. Hoy en día, se conocen varios centenares de plantas con acción terapeútica probada y, aunque nos alejamos en cierta medida de ese ritual mágico que veneraban nuestros antecesores, no es bien cierto que aún se sigue desconociendo el mecanismo de acción de muchos de los compuestos de naturaleza vegetal (Harborne, 1984).

Podemos pues afirmar que la utilización de los recursos terapeúticos vegetales es aún incierta e inagotable y los principales descubrimientos están aún por investigar (Navasquillo, 1992).

Muchos compuestos bioactivos han sido aislados en bacterias, hongos, líquenes y otros vegetales (Zinsmeister & col., 1991). No obstante, únicamente ciertos grupos botánicos han sido utilizados bajo este punto de vista, habiéndose excluído otros, entre ellos los briófitos, por no proporcionar productos de interés farmaceútico (Schneider, 1985). Sin embargo, como afirman Zinsmeister & col. (1987, 1991) y Zinsmeister & Mües (1987), tal parecer debe revisarse concienzudamente, pues los resultados y conocimientos hoy obtenidos hablan en este sentido. Es muy posible, que en base a nuevas investigaciones, el estatus de los briófitos dentro de la propia farmacognosia sea bien distinto y se revele como muy importante (Becker & col., 1992; Hedenäs, 1991). Con nuestro trabajo hemos pretendido apoyar este camino y dotar a la medicina y/o farmacia de una nueva fuente de productos de origen natural: **los musgos**.

Aunque los briófitos no han sido todavía considerados como plantas de importancia medicinal o bien tóxica, mientras que sí lo han sido el resto del Reino Vegetal (Becker & Wurzel, 1987; Schneider, 1985), distintas preparaciones obtenidos de ellos han sido notablemente utilizadas en la medicina popular de China y por los indios norteamericanos (Ando & col., 1984).

Durante la Primera Guerra Mundial, Alemania y sus aliados tomaron ventaja en base a las especiales propiedades antibióticas de distintas especies de *Sphagnum* L. (Zinsmeister & col., 1991). Posteriormente, leñadores de los bosques de Norteamérica y Europa, durante mucho tiempo fueron susceptibles a la aparición de distintas dermatitis, haciéndose famoso el tratamiento con hepáticas del género *Frullania* L. La observación de que muchos briófitos no eran comidos por animales, hizo especular acerca de la existencia de agentes endógenos con actividad protectora. Es también notable añadir que aún no han sido detectados virus en briófitos (Nienhaus, 1985). Tampoco se ha podido

demostrar la degradación bacteriana ni fúngica en vástagos vivos del musgo *Drepanocladus fluitans* (Hedw.) Warnst. (Satake & col., 1990).

Por todo ello creemos que no se debe despreciar a los briófitos como una nueva fuente de productos naturales, sino todo lo contrario. Abrir, si cabe, nuevos campos de investigación dentro de la biología, farmacia y medicina.

Entre las distintas actividades biológicas conocidas para los compuestos de briófitos podemos citar, entre otros, los efectos alergénicos, la acción citotóxica y citostática, actividad cardiotónica, acción carcinogenética y antiinflamatoria, actividad antibacteriana y antifúngica, actividad antidepredación, regulación del crecimiento y desarrollo de la planta e inhibición enzimática (Zinsmeister & col., 1987 y 1991).

Los briófitos son muy difíciles de degradar en base a una actividad fúngica o bacteriana, ya que son capaces de producir antibióticos, tales como poligodial, norpinguisano y cinamólido, inhibidores de la actividad microbiana (McCleary & col., 1960; McCleary & Walkinton, 1966; Asakawa, 1981; Huneck, 1983; Zehr, 1990).

La mayor dificultad para los microorganismos debe encontrarse en la matriz orgánica de la pared celular, básicamente consistente en los polisacáridos, que son muy resistentes a la degradación microbiana (Satake & col., 1990).

La producción de sustancias antimicrobianas es característica en las células vivas, lo cual puede explicar la presencia de algunos hongos únicamente en células descompuestas viejas o en vástagos muertos. Las relaciones entre *Sphagnum* spp., y el hongo *Lyophyllum* spp., son un ejemplo de la combinación musgo-descomponedor (Redhead, 1981; Grasso & Scheirer, 1981; Scheirer & Dolan, 1983; Simon, 1987). Una completa recopilación sobre las interrelaciones hongo-briófito es expuesta por Felix (1988). Debemos señalar a tal respecto que la invasión de las células del musgo por hifas fúngicas no siempre es causa de muerte como consecuencia de la protección que aporta la membrana celular del propio musgo (Racovitza, 1959). ¿Puede jugar un papel primordial la existencia de flavonoides en dichas membranas?.

Banerjee & Sen (1979), plantean el interrogante anterior ante la "minúscula" cantidad de briófitos parasitados por hongos en relación al número de especies existentes y en base al hecho de la posible existencia de barreras a nivel anatómico, inmunológico o químico, de probada actividad antimicrobiana.

Desde un punto de vista ecológico es curioso e interesante observar que los briófitos opongan una seria resistencia a la infección fúngica en condiciones naturales y no en cambio en condiciones axénicas (Simon, 1987).

La degradación bacteriana de briófitos no fue conocida hasta 1984, cuando se evidencia la invasión por bacterias en los vástagos vivos de la hepática *Jungermannia vulcanicola* Steph., la cual cuenta con monoterpenos en sus cuerpos oleíferos, y en *Scapania undulata* (L.) Dum., que cuenta con sesquiterpenos (Satake & Miyasaka, 1984; Satake & Shibata, 1986; Yokouchi & col., 1984). Es por ello que se puede afirmar la existencia de notables diferencias en la producción de compuestos bioactivos entre las hepáticas y los musgos, esperándose que las mayores diferencias residan precisamente en la matriz orgánica de la pared celular (Satake & col., 1990). Hasta el momento, y como ya se ha referido con anterioridad, no se ha podido demostrar la degradación bacteriana en las

células vivas de musgos, hecho que sí ha ocurrido en hepáticas; lo que confirma nuestro interés por estudiar los compuestos bioactivos de posible actividad farmacológica de este grupo botánico. Lo que tampoco se conoce hasta la actualidad son asociaciones de virus con briófitos de carácter mutualista (Horvath, 1977).

Hemos querido finalmente realizar una pequeña recopilación sobre los distintos trabajos existentes acerca de las propiedades antibióticas de los musgos como fuente bibliográfica de consulta obligada, así como exponer algunos comentarios al respecto:

Madsen & Pates (1952) y Pates & Madsen (1955), citan los poderes inhibidores de ciertos musgos y hepáticas (*Sphagnum portoricense* Hampe, *S. strictum* Sull., *Conocephalum conicum* (L.) Dum., y *Dumortiera hirsuta* Dum., sin referirse al tipo de compuesto activo ni al tipo de inhibición.

Belkin & col. (1952-53) refieren la actividad de *Polytrichum juniperinum* Hedw., frente al Sarcoma 37.

Cuatro años más tarde, Wren (1956), cita de nuevo el poder medicinal de la última especie.

Ramaut (1959), muestra el efecto inhibidor de estractos de *Sphagnum* spp., frente al crecimiento de *Sarcina lutea*, posiblemente como consecuencia de su acidez.

En 1960, McCleary & col., realizan el primer estudio profundo acerca de las propiedades antibióticas de 12 especies de musgos frente a 9 microorganismos (bacterias y hongos), ofreciendo únicamente un resultado positivo *Anomodon rostratus* (Hedw.) Schimp., *Orthotrichum rupestre* Schleich. ex Schwaegr., y *Mnium cuspidatum* Hedw. Aunque no refieren el compuesto químico causante de tal actividad inhibidora, por el tipo de extracción que realizan y por los conocimientos que hoy se poseen, bien podrían tratarse de flavonoides. Curiosamente, de entre esas nueve especies que dan resultado negativo, aquellas en las que se conoce el contenido flavonoídico (*Hygroamblystegium irriguum* (H. & W.) Loesk., *Bryum argenteum* Hedw., *Pohlia wahlenbergii* (W. & M.) Andr., *Bryum pallescens* Sch. ex Sch., *Sphagnum* spp., y *Polytrichum* spp.), se caracterizan todas ellas por no sintetizar biflavonoides, cuando en el caso de *Bryum argenteum*, *B. pallescens* y *Pohlia wahlenbergii* existen otras especies de su género respectivo que sí lo hacen. En cuanto a las otras tres especies que ofrecen resultados negativos (*Grimmia wrightii* (Sull.) Aust., *Ceratodon stenocarpus* (Hedw.) Brid., y *Hedwigia albicans* P. Beauv.), no se conoce la presencia de biflavonoides en los dos primeros géneros, y su identificación en *Hedwigia* spp., es dudosa (Österdahl, 1976; Österdahl & col., 1976). De las tres especies que resultan positivas frente a los microorganismos, sí se conoce la presencia de biflavonoides en *Plagiomnium cuspidatum* (Hedw.) T. Kop. (=*Mnium cuspidatum*). En el género *Orthotrichum* Hedw., no se ha hecho ningún estudio al respecto, y para la última especie sólo disponemos del antiguo ensayo realizado por McClure & Miller (1967), que denotaba la ausencia de flavonoides en *Anomodon rostratus* (Hedw.) Schimp., aunque muchas de las especies que ofrecían resultados negativos para tales autores han sido revisadas posteriormente, concluyéndose en muchos casos la existencia de flavonoides y biflavonoides (López-Sáez, 1992).

Años más tarde, Wolters (1964a y b), ofrece una corta revisión sobre las propiedades antibióticas de briófitos, donde pone de manifiesto la actividad antifúngica de *Diplophyllum albicans* (L.) Dum., *Pogonatum aloides* (Hedw.) P. Beauv., y *Plagiothecium denticulatum* Br., no habiéndose estudiado hasta el momento el contenido flavonoídico de las especies de musgos antes citadas (ver

Anexo 1).

De nuevo, McCleary & Walkington (1966), emprenden su segundo estudio sobre las propiedades antibióticas de diferentes especies de musgos, poniendo de manifiesto una fuerte capacidad de inhibición frente a los microorganismos *Gaffkya tetragena* y *Staphylococcus aureus* de las siguientes especies, entre las 50 estudiadas: *Atrichum angustatum* (Brid.) B. & S., y *A. undulatum* (Hedw.) P. Beauv., en los cuales no se conoce la presencia de flavonoides pero sí de cumarinas (Jung, 1993-94; ver Anexo 1); *Dicranum fuscencens* Sm., y *D. scoparium* Hedw., habiéndose identificado en la última especie un biflavonoide por Österdahl (1979 a y 1983), Ron & col. (1990) y Lindberg & col. (1974); *Funaria americana* Lindb. ex Sull. (no estudiado su contenido flavonoídico); *Hylocomium proliferum* Hedw., *Mnium glabrescens* Kindb., y *M. insigne* Kindb., que son especies en las que no se conoce ningún trabajo acerca de sus flavonoides, aunque otras especies de los géneros respectivos sí contienen biflavonoides; *Polytrichum commune* Hedw., *P. juniperinum* Hedw., y *P. piliferum* Hedw. (contienen cumarinas según Jung, 1993-94); *Pseudoisothecium stoloniferum* Lindb. (no se ha estudiado su composición flavonoídica); *Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst., según Vandekerkhove (1977b), no posee flavonoides, aunque tales resultados deberían revisarse pues otra especie del género, *R. squarrosus* (Hedw.) Warnst., en la que el mismo autor citaba igualmente la ausencia de flavonoides, sintetiza 5 biflavonoides (Seeger & col., 1990; Seeger, 1992); *Plagiothecium undulatum* (Hedw.) B.S.G., es un caso similar al anterior, pues Sievers (1992) realiza únicamente un estudio muy concreto sobre la presencia/ausencia de tres biflavonoides en dicha especie; *Sphagnum cuspidatum* Ehrh. ex Hoffm., *S. macrophyllum* Bernh. ex Brid., y *S. palustre* L., de composición química un tanto especial, son especies caracterizadas por sintetizar un tipo concreto de antocianidinas exclusivas del género, las esfagnorubinas (Anexo 2). Del estudio de McCleary & Walkington (1966), resulta particularmente interesante la reflexión que realizan acerca del ataque de musgos por distintos microorganismos y las referencias que ofrecen sobre distintos especímenes muscícolas de herbario, que no necesitan de un tratamiento previo de conservación, tal y como se realiza con el resto de vegetales.

No es hasta 5 años más tarde, cuando Hartwell (1971) refiere de nuevo las propiedades antitumorales de distintas especies del género *Polytrichum* Hedw., entre ellas *P. commune* Hedw., y otras indeterminadas.

En el mismo año, Gupta & Singh (1971), demuestran la actividad antibacteriana de dos especies de musgos de los géneros *Barbula* Hedw.. y *Timmiella* (De Not.) Limpr., frente a 33 especies de bacterias.

Posteriormente, Banerjee (1974) y Banerjee & Sen (1979), estudian la actividad antibiótica de 52 especies de briófitos, frente a 12 microorganimos (bacterias y hongos), poniendo de manifiesto una inhibición positiva de un 56% (29 especies) de las especies estudiadas frente a bacterias y una nula actividad antifúngica, citando así mismo la mayor ocurrencia de substancias antibióticas en hepáticas que en musgos y antocerotas. El hecho de utilizar disolventes puros en el proceso de extracción (acetona, metanol y etanol al 100%), sin ese 10-20% necesario de agua hace que la extracción de biflavonoides con dicha metodología sea muy difícil (Geiger, 1990), lo que podría explicar que algunas de las especies de musgos estudiadas por tales autores, que poseen biflavonoides, hayan dado un resultado de actividad antimicrobiana negativo, caso de las especies del género

Campylopus Brid., y *Bryum* Hedw. (Anexo 1).

Entre los musgos que ofrecen resultado positivo en el ensayo antimicrobiano de Banerjee (1974) y Banerjee & Sen (1979), destacamos *Campylopus laetus* (Mitt.) Jaeg., *Philonotis falcata* (HK.) Mitt. (especie de la familia *Bartramiaceae* efectiva contra *Bacillus subtilis*), *Hypnum plumaeforme* Wils., *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par., y *Mnium longirostrum* Brid., por tratarse de especies cuya composición flavonoídica es desconocida pero sí se conoce la existencia de biflavonoides en otras especies de los géneros respectivos.

Posteriormente, Van Hoof & col. (1981), realizan un estudio más profundo de actividad antimicrobiana, entre las que incluyen por primera vez la actividad antivírica. Entre las 20 especies de briófitos que estudian, queremos destacar, dentro de aquellas en las que se conoce el contenido flavonoídico, precisamente *Brachythecium rutabulum* (Hedw.) B.S.G., y *Mnium hornum* Hedw., que poseen una escasa o nula actividad antibacteriana, antifúngica e incluso antivírica, siendo además dos especies caracterizadas por no contener flavonoides (Wyatt & col., 1991b; Sievers, 1992; Vandekerkhove, 1980). En el polo opuesto, encontramos *Dicranum scoparium* Hedw., e *Hypnum cupressiforme* Hedw., especies que demuestran un gran poder de inhibición de la actividad microbiana, conociéndose en ambas la presencia de biflavonoides (Österdahl, 1979a y 1983; Ron & col., 1990; Lindberg & col., 1974; Sievers, 1992; Sievers & col., 1992). Por el tipo de extracción que realizan Van Hoof & col. (1981) de los compuestos briofíticos, con etanol 80%, mucho nos tememos que la actividad antimicrobiana de éstas dos últimas especies se deba precisamente a su contenido flavonoídico, ya que tal metodología de extracción es la que habitualmente se usa para biflavonoides (Geiger, 1990).

Castaldo-Cobianchi & col. (1986 y 1988), llevan a cabo un estudio sobre la actividad antibiótica de la hepática *Conocephalum conicum* (L.) Dum., y los musgos *Mnium undulatum* Hedw., y *Amblystegium riparium* (Hedw.) Br. Eur. (= *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst.), frente a 8 bacterias patógenas. Sus estudios ponen de manifiesto una importante actividad antibacteriana de los extractos acetónicos obtenidos con el método de McCleary & col. (1960), precisamente en los cuales se supone está contenida la mayor parte de los flavonoides existentes en tales especies. Además, tales autores ofrecen interesantes comentarios acerca del fenómeno de antibiosis que poseen los briófitos (musgos y hepáticas) en relación a ciertos simbiontes o comensales, que con ellos conviven en el suelo, tanto bacterias como hongos. De las dos especies de musgos únicamente se conoce la composición flavonoídica de *Plagiomnium undulatum* (=*Mnium undulatum*), que sintetiza básicamente flavonas O- y C-glicosiladas (Koponen & Nilsson, 1977; Österdahl, 1979a y c; Bendz & col., 1966; Harborne, 1967; Vandekerkhove, 1978a).

Ya más recientemente, un equipo americano (Spjut & col., 1986 y 1988), representante del Instituto Nacional contra el Cáncer (N.C.I.), emprende los primeros estudios profundos sobre la posibilidad de utilizar los briófitos (musgos, hepáticas y antocerotas) como antitumorales. En el primero de ellos, (Spjut & col., 1986), realizan ensayos antitumorales con 97 géneros de musgos, 16 de hepáticas y 1 de antocerotas. Setenta y cinco de los extractos obtenidos de especies de los géneros referidos resultaron tóxicos, mientras que 43 fueron activos. Dicha actividad antitumoral, se manifestó principalmente en las familias *Dicranaceae* Schimp., *Grimmiaceae* Arnott, *Mniaceae* Schwaegr., *Neckeraceae* Schimp., *Thuidiaceae* Schimp., *Brachytheciaceae* G. Roth., *Hypnaceae* Schimp., y

Polytrichaceae Schwaegr. Los autores sugieren que los briófitos son una prometedora fuente de productos naturales, ya que en ellos cabe la posibilidad de descubrir e identificar nuevos compuestos con actividad biológica. La posibilidad de que dicha actividad biológica en briófitos pueda ser el resultado de fenómenos alelopáticos, puede deberse a la habilidad de los briófitos para acumular sustancias tóxicas.

Finalmente, queremos resaltar la existencia de excelentes recopilaciones al respecto de las propiedades farmacológicas de los distintos compuestos procedentes de briófitos, entre los que se incluyen lípidos y ácidos grasos, flavonoides, terpenoides y ácidos fenólicos (McClure, 1975; McClure & Miller, 1967; Huneck, 1969 y 1983; Asakawa, 1981 y 1990; Asakawa & col., 1978 y 1980b; Wolters, 1964a y b).

El principal problema con que se cuenta, es el desconocimiento acerca de qué compuesto es el responsable de tal actividad antimicrobiana, de ahí que toda la recopilación bibliográfica que anteriormente hemos presentado, la hayamos intentado correlacionar con la presencia/ausencia de biflavonoides en las especies de musgos estudiadas. En nuestro trabajo, como ya se ha expuesto con anterioridad, nos hemos centrado en un único tipo de compuestos: los **flavonoides**, y particularmente los biflavonoides, cuya función en la planta debe ser muy importante aunque no es del todo conocida.

En el área biológica los flavonoides poseen una actividad polivalente, ya que entre otras, se conocen sus propiedades **antibióticas**, **antifúngicas** e incluso **virostáticas** (McClure, 1975 y 1986; Ghisalberti, 1979; Konig & Dustman, 1983; Levin, 1971; Van Hoof & col., 1981; Abou-Karam & Thomas Shier, 1992; Mori & col., 1987; Gnanamanickam & Mansfield, 1981; Wood & Jellis, 1984; Selway, 1986; Bertram, 1989; Spilková & Hubík, 1988 y 1992); **antifertilidad** (Mandich & col., 1984), su capacidad de **inhibición del crecimiento larvario** y del ataque por insectos y otros animales (Elliger & col., 1980 a y b; Hedin & Waagea, 1986; Kubo & col., 1983; Chan & col., 1978; Denno & McClure, 1983); **inhibición enzimática** (Shu-Chen & col., 1992; Shimizu & col., 1984; Beretz & col., 1979; Gaudette & Holub, 1990); propiedades **antitumorales** y **anticancerosas** (Lee & col., 1981; Bertram, 1989; Constantinou & col., 1990; Bracke & col., 1990; Dani & col., 1990; Deak & col., 1990; Richardson, 1992), **antihepatotóxicas** (Iwu, 1985) y pueden interferir en el **crecimiento** de semillas (Rice, 1984). Algunos de ellos son los **pigmentos** de las plantas, las antocianinas (McClure, 1975 y 1986), dando color a flores, frutos y hojas (Harborne, 1967 y 1986; Czygan, 1980), aunque sin embargo, la mayor parte de las flavonas y flavonoles son incoloros. El elemento común de estos compuestos es un núcleo básico: el 2-fenil cromano (Bruneton, 1991). Así mismo, en los últimos años se está demostrando la utilidad de los flavonoides y otros compuestos fenólicos en la **caracterización de diferentes alimentos** de origen vegetal, entre ellos los vinos (Etievan & Schilich, 1988; Tomás-Lorente & col., 1989), zumos de frutas (Elkins & col., 1988; Galensa, 1988), etc. Parecen desempeñar igualmente un **papel regulador** como inhibidores del trasporte de auxinas (Jacobs & Rubery, 1988).

Finalmente, los flavonoides son los típicos compuestos fenólicos que, gracias a su estructura química, se comportan como potentes **antioxidantes y quelatos** de metales (Pincemail & col., 1990; McClure, 1975). Esta actividad está extrechamente relacionada con lo antes expuesto, pues supone unas ventajas ecofisiológicas enormemente trascendentales, evitando la peligrosa actividad oxidante de ciertos metales (Swain, 1986).

Por el mismo motivo, los flavonoides, apoyados en esa estructura química de enlaces conjugados y anillos aromáticos (ver Fig.3.6 pp. 21), debieron suponer la primera barrera que los briófitos presentaron a la destructiva luz ultravioleta en su conquista del medio terrestre, puesto que Geiger (1990) ya señala que algunos flavonoides pueden ligarse fuertemente a las paredes celulares de briófitos. El mejor ejemplo lo tenemos en el musgo *Bryum argenteum* Hedw., especie cosmopolita que vive incluso en la Antártida, cuyo contenido en flavonoides se incrementa considerablemente cuando el agujero en la capa de ozono polar, que entre otras funciones sirve de pantalla contra las radiacciones ultravioletas, se agranda (Hedenäs, 1991). Incluso, diversas modificaciones bioquímicas sufridas por los compuestos de los musgos, pudieron jugar un papel fundamental en su evolución y sobre todo, en la defensa contra distintos organismos (Swain, 1986).

La estructura molecular, las pautas de hidroxilación, glicosilación, metilación, etc., parecen jugar un papel fundamental en la actividad biológica de muchos flavonoides, ya que existe una relación muy extrecha entre la estructura molecular y su actividad (Cody & col., 1986; Elliger & col., 1980; Hedin & Waagea, 1986; Albert, 1971; Spilkova & Hubik, 1992).

Finalmente, únicamente hemos pretendido hacer una recopilación lo más exhaustiva posible de las distintas actividades biológicas que poseen los flavonoides, sin extendernos demasiado pues sería materia para otro trabajo, por su dimensión y variedad, y porque el objetivo de nuestro estudio se centrará primordialmente en la actividad biológica de los biflavonoides de los musgos estudiados en esta Memoria Doctoral. Además, existen excelentes recopilaciones al respecto (Cody & col., 1986 y 1988; Chopra & Bhatla, 1990; Das, 1990; Harborne, 1967, 1986, 1988a y b, 1993; Harborne & Mabry, 1982; Harborne & col., 1975; Swain, 1977a; McClure, 1975). De todas ellas debemos destacar las de Spilkova & Hubik (1988 y 1992), quienes hacen un repaso exhaustivo a las diversas actividades biológicas de los flavonoides, entre las que recogen: antimicrobianos, espasmolíticos, antivirales, función hepatoprotectiva, analgésicos, antialergénicos, antiulcerosos, antitumorales, etc.

Sin lugar a dudas los biflavonoides, objeto principal de nuestro trabajo, son uno de los grupos de productos naturales más interesantes (Foo & col., 1992), tanto desde el punto de vista químico como del de sus propiedades farmacológicas, antiinflamatorias, antihepatotóxicas y antimicrobianas (Beretz & col., 1986, Shimizu & col., 1984; Iwu, 1985 y 1986; Chakravarthy & col., 1981), incluyendo las antihistamínicas. Juegan igualmente un papel defensivo en la predacción de las plantas por hongos e insectos (Kubo & col., 1983; Lowry & col., 1983; Swain, 1975; Krolicki & Lamer-Zarawska, 1984; Geiger & Quinn, 1988; Ron & col., 1992).

3.3.1. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

A continuación, puesto que los ensayos de Actividad Biológica de la presente Memoria Doctoral se llevaron a cabo sobre cultivos celulares infectados con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), creemos conveniente dedicar un capítulo a resumir algunos aspectos tales como el descubrimiento de la enfermedad y el estado actual en que se encuentra.

A. Antecedentes

En junio del año 1981, y tras uno de los múltiples exámenes rutinarios a que se somete la documentación procedente de todos los estados americanos que llegan a la institución, los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta (Georgia, Estados Unidos), dieron a la luz un informe sobre un extraño tipo de neumonía que se había diagnosticado a lo largo de los ocho meses anteriores. El informe señalaba así mismo, que la afección se había diagnosticado en tres hospitales de Los Angeles en cinco varones jóvenes, de raza blanca, sin ningún otro tipo de patología y que tenían en común su condición de homosexuales. La infección en un principio se creyó causada por el protozoo ***Pneumocystis carinii***, rarísimo en patología humana, donde sólo se advierte como responsable oportunista de infecciones en enfermos con una merma "brutal" de sus defensas. Casi al mismo tiempo, tanto en California como en Nueva York, se detectó un crecimiento anormal en la declaración de los casos diagnosticados como **sarcoma de Kaposi**, un tumor maligno de los capilares de desarrollo lento y propio de varones mayores de sesenta años. Los pacientes eran también homosexuales y con una evolución letal muy rápida (1 ó 2 años), y muchos de ellos padecían al mismo tiempo una neumonía concomitante por *P. carinii*. Todos estos hechos, que parecían albergar un paralelismo desmesurado, pusieron en alerta a los epidemiólogos, acerca de un proceso que presentaban numerosos elementos extraños.

En el verano de 1982, se pudo finalmente definir la aparición de un síndrome caracterizado por la existencia de enfermedades habitualmente consideradas oportunistas en pacientes con una baja respuesta inmunitaria. Se le dió el nombre de ***Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)***, con un conjunto de cuadros clínicos caracterizados por una alteración subyacente de la inmunidad celular, y que se manifestaban esencialmente bajo la forma del sarcoma Kaposi e infecciones graves por gérmenes oportunistas en personas jóvenes previamente sanas (B.E.S., 1989). Junto a la neumonía por *P. carinnii*, se advirtió la frecuente aparición de diarreas producidas por *Cryptosporidium muris* o *Isospora belli*, meningitis por *Cryptococus neoformans* y encefalitis por *Toxoplasma gondii*, procesos todos ellos infrecuentes. Lo impreciso de su denominación, evidenció en su vaguedad la confusión inicial de los médicos ante un proceso desconocido. Se abandonaron así algunos de los nombres que la enfermedad tuvo en un primer momento como *gay cancer* o GRID (*Gay-Related Immune Deficiency*).

Los primeros casos de SIDA fueron descritos en **homosexuales** por Michael Gottlieb en Los Angeles y a partir de ese momento, el número de casos se ha multiplicado y la enfermedad, que inicialmente parecía centrada en determinados núcleos urbanos de los Estados Unidos, se ha hecho presente en Europa y el resto de los continentes. La repercusión social en los países más afectados

es importante y el temor ante este síndrome, en ocasiones por falta de una adecuada información, ha llevado a ciertas formas de rechazo social de determinadas personas, por características tan diversas como la nacionalidad (haitianos) o sus prácticas sexuales (homosexualidad).

La etiología de la enfermedad ha suscitado muchas teorías, orientándose en los primeros momentos a la búsqueda de factores causales entre los rasgos característicos del tipo de vida de los homosexuales, en los que se describieron los primeros casos. Así se valoraron entre otras posibles causas, la importancia de drogas como el nitrito de amilo, de las infecciones de repetición o el estímulo antigénico del propio semen (B.E.S., 1989). Pero ya desde el inicio, la enfermedad no apareció asociada a los homosexuales en general, sino a un subgrupo de esta colectividad con activa vida sexual, de manera que uno de los primeros estudios "caso-control" entre homosexuales sanos y afectos de SIDA, se evidenciaba una mayor frecuencia de ciertas infecciones en los homosexuales enfermos que en los controles (sífilis, enterovirus, citomegalovirus y Epstein-Barr), así como un mayor número y variabilidad de compañeros sexuales.

Al ampliarse el espectro de grupos de riesgo con la aparición de casos entre haitianos, drogadictos y hemofílicos, y conocerse algo más de los mecanismos de transmisión, pasó a considerarse con más interés la posibilidad de un agente transmisible, probablemente un virus (B.E.S., 1983; Carreras, 1991).

Uno de los primeros gérmenes objeto de atención fue el citomegalovirus (CMV), que ya antes de la aparición del SIDA había sido incriminado como posible agente causal del sarcoma de Kaposi (cáncer frecuente en el curso del SIDA, que afecta aproximadamente al 35% de los pacientes enfermos de SIDA y que se caracteriza por la presencia de placas o nódulos cutáneos de color azul o pardo, que se encuentran no sólo en la piel sino también en los ganglios, pulmones y en casi todas las vísceras). Estudios seroepidemiológicos previos habían puesto de manifiesto una asociación de este virus con el sarcoma, habiéndose encontrado anticuerpos en pacientes europeos y americanos estudiados en los años setenta. En personas afectadas por el SIDA que a su vez presentaban el sarcoma de Kaposi, se evidenció también un alto volúmen de anticuerpos para CMV. Hasta el momento, la infección por el CMV parece ser endémica en la población homosexual y su transmisión se hace a través del semen y de la orina, por lo cual no parecía ser el agente causal directamente implicado en el SIDA, aunque ésto no significa que la asociación del CMV con la enfermedad sea causal.

Junto a los citomegalovirus, el virus de Epsein-Barr y el de la hepatitis B, fueron otros dos de los iniciales candidatos a los que se supuso responsables de la afección, pero muy pronto hubo de deshecharse esta atribución por las características absolutamente novedosas de la enfermedad (Carreras, 1991).

Datos posteriores, demostraron que los pacientes con SIDA estaban infectados además por el virus de la leucemia linfocitaria T humana (HTLV) (B.E.S., 1983). Este retrovirus se aisló de los linfocitos y de la sangre periférica de personas que presentaban el síndrome. También por hibridación se detectó la presencia de secuencias del ácido nucleico de HTLV en linfocitos de 2 de los 33 pacientes con SIDA que se estudiaron (C.D.C., 1983), y por inmunofluorescencia indirecta se demostró la existencia de anticuerpos contra antígenos de superficie de linfocitos infectados por HTLV en 19 de los 75 enfermos con SIDA (25%). En sujetos que presentaban una linfoadenopatía o aumento

considerable de tumores en los ganglios linfáticos (considerada posible precursora de SIDA) también se encontraron anticuerpos análogos en 6 de 23 casos. Incluso investigadores del National Cancer Institute de los Estados Unidos (Profesor Robert Gallo y su equipo) llegaron a aislar en mayo de 1984 el retrovirus HTLV-III en pacientes con SIDA.

El primer retrovirus del tipo HTLV (*Human T Cell Leukemia Virus*) que fue identificado fue el HTLV-I, por el Dr. Rober Gallo en 1980. Dicho retrovirus HTLV-I era causante de la leucemia aguda de las células T (linfocitos con intensa actividad inmunitaria al producir sustancias que facilitan la acción de los macrófagos) y estaba difundido regularmente por Africa, el Caribe y Japón. En 1982 se hallaba otro retrovirus patógeno en el hombre, el HTVL-II, productor de la leucemia de células pilosas y que se transmitía por la sangre, el contacto sexual y de la madre al hijo (Carreras, 1991). La conjunción de varias circunstancias indujo a suponer que un retrovirus debía ser el agente productor del SIDA. Era indudable que se trataba de una enfermedad transmisible que podía adquirirse por contacto sexual, transmisión materna y trasfusión de sangre y hemoderivados. Además, se advertía en los enfermos una afectación muy selectiva de linfocitos T colaboradores como en las infecciones por HTLV-I y HTLV-II. El aislamiento antes comentado del HTLV-III en 1983, vino a confirmas tales sospechas.

A pesar de que la asociación del HTLV con el SIDA ha sido puesta pues de manifiesto, como en el caso del CMV no pareció tratarse del agente causal directo y concreto. Las diferentes manifestaciones clínicas de la leucemia de células T y del SIDA, así como la gran diferencia existente entre la incidencia de ambas, por ejemplo en Japón, donde la primera tiene una incidencia altísima y el SIDA no se conocía todavía en 1983, serían datos que se opondrían a una etiología común de ambas enfermedades. Con los datos que se poseían no podía en modo alguno considerarse al HTLV como agente causal de la enfermedad del SIDA, aunque cabría la posibilidad de que el virus actuara como un germen oportunista en personas con la inmunidad celular previamente disminuída.

Todos los datos conocidos hasta ese momento, en cierta forma resumidos, tendían a poner de manifiesto que el SIDA tenía un agente causal probablemente vírico, que tenía las mismas vías de transmisión que la hepatitis B, siendo las más probables la sexual o más raramente la parenteral, a través de jeringuillas o sangre contaminada. No existían evidencias de transmisión por contactos ocasionales entre las personas, ni a través del los alimentos, aire u objetos.

Sin embargo, el descubrimiento definitivo del virus del SIDA vino amparado por una expectación paralela, debida a la patente de su descubrimiento. El posible retrovirus no reaccionaba frente a los reactivos específicos HTLV-I y HTLV-II. La inmediata constatación de que tampoco crecía en los linfocitos T4 a los que destruía o cuyo crecimiento impedía, así como las imágenes obtenidas a través del microscopio electrónico, diferentes a las conocidas del HTLV-I, llevaron a los investigadores franceses del Intituto Pasteur en Francia, Luc Montagnier y su equipo, a identificar en mayo de 1983, el virus como LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*), virus ligado al síndrome linfadenopático, en una proporción muy elevada de pacientes con SIDA, que no pertenecía a la serie de retrovirus humanos sobre los que el Dr. Gallo y su equipo venían trabajando (HTLV).

En mayo de 1984, el Dr. Gallo y su equipo presentaban al HTLV-III en la revista *Science* como el responsable del SIDA, y que parecía coincidir plenamente con el virus LAV aislado por el Dr. Montagnier, así como con el denominado ARV (*AIDS Related Virus*) aislado por el Dr. Levy y

sus colaboradores en 1984. Todas estas coincidencias no hicieron sino someter a la investigación sobre el agente causal del SIDA en un mundo de confusiones sobre la patente del descubrimiento. En 1986, el Comité de Taxonomía de Virus propuso la denominación **HIV** (*Human Inmunodeficiency Virus*) o **VIH** (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), frente a las ya conocidas HTLV-III, LAV o ARV, y que aceptada por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) fue impuesta.

B. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana

B.1. Patogenia.

El SIDA es una enfermedad causada por la destrucción del sistema inmunitario por causa de un virus llamado VIH inicialmente denominado LAV, ARV o HTLV-III. Se trata pues de una enfermedad adquirida debida al virus y no hereditaria. Este virus se encuentra en las secrecciones sexuales (semen, flujo vaginal), saliva, lágrimas y en la sangre (linfocitos especialmente, pero también en el suero). Se trata de un virus lábil a la temperatura (se inactiva a 56° C en 30 minutos) y a diversos antisépticos corrientes (hipoclorito, fenol, glutaraldehído agua oxigenada, etc.). Hoy en día los dos sistemas de transmisión predominantes son las relaciones sexuales, tanto heterosexuales como homosexuales, y el uso compartido de agujas y jeringuillas contaminadas.

El sistema inmunitario humano actúa ejerciendo su acción por todo el organismo, gracias especialmente a un tipo de glóbulos blancos de la sangre, los **linfocitos**, producidos por los órganos linfáticos. Existen básicamente dos tipos de linfocitos, los linfocitos T que atacan directamente al agente invasor y, los linfocitos B que son los encargados de procucir unas sustancias denominadas anticuerpos para combatir al patógeno. Estos anticuerpos son específicos de cada microbio y su presencia en el organismo indica que éste ha estado en contacto con el microbio en cuestión. En la actualidad éste es uno de los métodos actuales de detección del SIDA en el hombre, previa detección de los anticuerpos respectivos mediante la prueba serológica del SIDA.

Un tipo especial de linfocitos T, los llamados **linfocitos T4** son los encargados de "reconocer" al organismo o microbio invasor, y dar lugar a la señal de alerta al resto de linfocitos T y B que actuarán en defensa del organismo.

El virus del SIDA tiene la particularidad de poder destruir progresivamente el sistema inmunitario humano, ya que ataca directamente al "centro de control o mando" de éste, es decir, destruye directamente a los linfocitos T, incluso antes de que dichas defensas hayan podido organizarse para combatirlo. Tras ser destruído el sistema inmunitario, los signos y síntomas del SIDA aparecen, y el organismo enfermo está desde ese momento expuesto a numerosas infecciones por otros gérmenes oportunistas, que en condiciones normales no serían capaces de vencer al sistema inmunitario. Como los demás virus, el VIH no puede sobrevivir de forma independiente, ya que únicamente puede vivir en el interior de una célula. Para poder infectar a unas células como los linfocitos T4, el virus del SIDA (VIH) debe *insertar* su código genético compuesto de ARN en el código genético de los linfocitos T4 formado por ADN básicamente. Estos dos "programas", ARN y ADN no son *compatibles*, y por eso el virus debe transformar previamente su código genético ARN

en un código ADN, lo cual realiza gracias a una enzima particular que posee, la **transcriptasa inversa**. Cuando el VIH ha implantado su código genético en el de los linfocitos T4, se multiplica a expensas de éstos y, finalmente, los destruye. De esta manera, el sistema inmunitario de va debilitando progresivamente. El virus primeramente se adhiere y luego penetra en la célula linfocitaria, gracias a la transcriptasa inversa, integrándose en el ADN celular donde puede permanecer latente para replicarse a medida que el linfocito T4 es estimulado, convirtiéndose éste así en una verdadera "fábrica" de material genético que codifica proteínas víricas que, previa lisis celular, pasan al torrente circulatorio o directamente a otra célula (Verger, 1988). De esta manera, a medida que la infección avanza, va destruyéndose una parte esencia del sistema inmune, los linfocitos T4, que en los estadíos finales pueden llegar a desaparecer. El VIH no sólo infecta a los linfocitos T4 sino que también, de forma crónica, lo hace con otra variedad de glóbulos blancos, los macrófagos, así como en células nerviosas o monocitos, pero escasamente o nada en los linfocitos B y en la mayoría de células del organismo. Los macrófagos tienen un papel importante en la inmunidad, ya que son los responsables, en especial, de la fagocitosis. Además, son las primeras células del sistema inmunitario que entran en contacto con el virus y los demás elementos invasores.

Con la disminución de los linfocitos T4 disminuye también la producción de interleucina-2 y otros mediadores, en consecuencia la actividad de las células T8 y la función normal de las células NK (*natural killer*), la de los linfocitos B y la de los monocitos se ve alterada. Las células NK tienen una función antivírica y antitumoral específica (Verger, 1988). La alteración de los linfocitos B se manifiesta por su incapacidad de producir anticuerpos adecuados a los estímulos antigénicos, produciendo un exceso de inmunoglobulinas de forma totalmente anárquica, que las células T8 no pueden frenar.

Por último, el papel que juegan los factores genéticos en la adquisición y progresión de la infección, sólo empieza a conocerse parcialmente y no siempre son interpretados de manera similar.

B.2. Etiología y Estructura.

El primer virus del SIDA aislado, conocido como **Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 o tipo 1)** es una partícula extremadamente pequeña (1/10000 mm). Se trata de un virus ARN de configuración icosaédrica, constituído por una cápsula de proteínas (envoltura externa) que rodea la molécula de ARN portadora del código genético del virus. El conjunto de este núcleo está envuelto por una cubierta compuesta de proteínas y lípidos (Fig. 3.11).

Pertenece a la familia *Retroviridae*, caracterizada por poseer una enzima característica, la transcriptasa inversa (Verger, 1988). La escuela francesa (Montagnier & col.), defiende la tesis de que los retrovirus pertenecen a la subfamilia *Lentiviridae*, que actúan en algunos animales como virus lentos en el Sistema Nervioso Central, contra la defendida por los norteamericanos (Gallo & col.), que defienden su pertenencia a los HTLV que actúan más bien como oncogénicos.

Las proteínas de la cubierta son importantes, ya que permiten la adhesión del virus a los linfocitos T4 y su penetración en las células. Algunas partes de las proteínas de la cubierta inducen una fuerte respuesta inmune, por lo que son indispensables para la elaboración de una vacuna (Montagnier, 1993). Hay, sobre todo, un bucle (ver Fig. 3.11.) expuesto en la superficie de estas

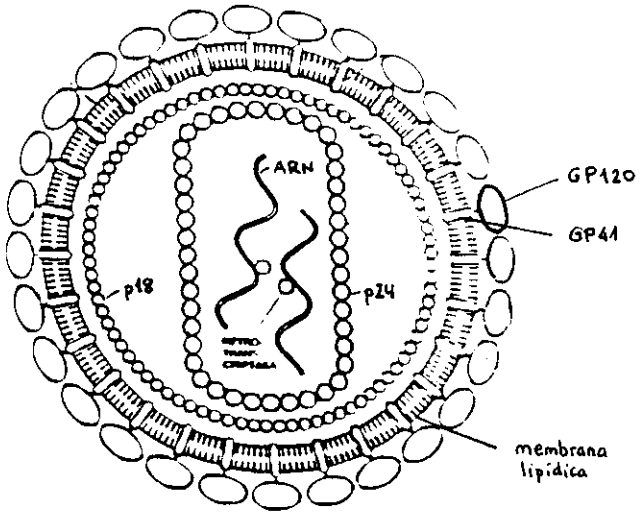


Fig. 3.11.: Representación esquematica de la estructura molecular del VIH.

proteínas, que induce anticuerpos capaces de neutralizar especialmente la infecciosidad del virus.

Se ha logrado cultivar el VIH en cultivo celular y se obtiene en suficiente cantidad para fabricar antígenos para las pruebas de laboratorio (ELISA p.e.), pero su cultivo no está al alcanze de los laboratorios clínicos.

Posteriormente se aisló un segundo virus en el Instituto Pasteur y en el Hospital Claude Bernard (Paris) a partir de un foco de SIDA existente en el oeste de Africa, y que fue denominado VIH-2 (Montagnier, 1993). El VIH-2 es un virus de la misma familia que el VIH-1 pero con algunas diferencias, sobre todo en las proteínas de la cubierta. El VIH-2 no siempre se detecta con las pruebas serológicas utilizadas para el VIH-1. Hoy en día se dispone de pruebas específicas para el VIH-2 y se utilizan como tales en la práctica. VIH-1 y VIH-2, aunque diferentes en algunos elementos de su estructura, producen, sin embargo, la misma enfermedad: el SIDA. El VIH-2 es, no obstante, menos virulento que el VIH-1.

El VIH-1 es el virus más importante que se conoce en lo que concierne al SIDA. Su código genético está demasiado alejado del de VIH-2 para sostener que éste pueda derivar de aquél por simple mutación (Montagnier, 1993). Sin embargo, es posible que provenga de un virus existente en el chimpancé, denominado STLV (*Simian T-Cell Leukemia Virus*), causante de la leucemia de las células T. El VIH-1 según esta teoría habría existido desde hace mucho tiempo en algunas poblaciones humanas aisladas que lo toleraban medianamente bien.

El VIH-2 es un pariente relativamente próximo al virus de los monos africanos (mono verde, mono mangabey). La hipótesis más probable que se maneja respecto a su origen, sería el paso, más o menos antigüo, de este virus entre el mono (especie receptáculo que lo toleraría relativamente bien) y el hombre (nuevo huésped del virus no preparado para recibirlo). Sin duda, este virus, al igual que el VIH-1, causa el SIDA en el hombre, aunque su transmisión es más difícil, y una vez transmitido, causa la enfermedad con menor frecuencia y rapidez que el VIH-1.

Las distintas cepas del VIH hasta ahora descritas en diferentes areas geográficas, no difieren fundamentalmente en su composición genética, excepto en el gen que codifica la envoltura, lo cual

puede suponer una dificultad para encontrar una vacuna efectiva. A parte del VIH-1 y el VIH-2 (tipo 2 o LAV-2) se ha descrito recientemente el HTLV-IV en prostitutas asintomáticas del Africa del Este.

C. Estado actual de la enfermedad.

El número de casos de SIDA declarados a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el mundo, hasta diciembre de 1992 es de 625.241 (Montagnier, 1993). El ritmo actual es de aproximadamente unos 10.000 casos nuevos declarados al mes, por lo que se estima que el número real se acerca a a los 2.500.000 afectados.

Las personas que han sido infectadas por el VIH no desarrollan necesariamente el SIDA. La OMS estima que en el espacio de 10 años el 60% de las personas seropositivas evolucionan hacia el SIDA, el 20% presentan manifestaciones menores de la enfermedad, y el 20% restante permanecen indemnes a toda sintomatología.

Aunque el número de seropositivos es difícil de precisar, y más, cuando aún hoy, muchos casos no se declaran, se puede afirmar que alrededor de 14 millones de personas están ya infectadas por el virus del SIDA (seropositivos) en el mundo. Las 3/4 partes están en Africa.

En muchos países en vías de desarrollo la epidemia, desgraciadamente, se halla sólo en sus inicios. Si no se encuentra rápidamente un tratamiento eficaz, se producirá, inexorablemente, un aumento de casos de SIDA y de muertes producidas por esta enfermedad.

La OMS prevé un crecimiento importante de la epidemia en los años 90, y estima el número de casos de SIDA en 13-18 millones para finales de siglo. El número de personas seropositivas se acercará entonces a los 30-40 millones (Montagnier, 1993). La gran mayoría de los nuevos casos se registrarán en los países en vías de desarrollo.

D. Posibilidades de Tratamiento.

La evolución de la enfermedad conocida como SIDA sigue siendo considerada en la actualidad como muy grave, ya que por el momento, no se dispone de un tratamiento curativo válido al 100%. No obstante, si es cierto que se poseen en la actualidad medios que permiten tratar algunas de las manifestaciones relacionadas con el SIDA, y mejorar la calidad de vida de los enfermos, así como su supervivencia. Por eso, es sumamente importante que los seropositivos reciban una asistencia médica precoz, y ésta sólo es posible en la medida en que las personas afectadas conozcan su estado, lo cual es el principal argumento a favor de la prueba de detección voluntaria.

El SIDA, a pesar de todo, es una enfermedad reciente, y por ello es difícil sino imposible, precisar por el momento cuál será su evolución más allá de los diez años. Aunque sí queda claro que un número de seropositivos en buen estado de salud después de 10 años de evolución, desgraciadamente desarrollarán la enfermedad más adelante (sino se dispone entonces de tratamiento), es cierto que el tiempo máximo del periodo de incubación en aún desconocido. Existen una serie de factores, tales como la predisposición personal o las infecciones recurrentes que activan el sistema

inmunitario, que en cierta manera pueden ayudar a retrasar la manifestación del SIDA impidiendo su evolución.

Desde los primeros signos de flaqueza del sistema inmunitario (menos de 200 linfocitos T4, p.e.) es posible administrar un **tratamiento preventivo** destinado a evitar la aparición de infecciones como la pneumocistosis (aerosol de pentamidina, cotrimoxazol, Dapsona...), la toxoplasmosis (pirimetamina, Dapsona...), incluso la tuberculosis. La mayor parte de las infecciones pulmonares, cerebrales y cardiacas asociadas al SIDA pueden igualmente tratarse de forma eficaz por medio de antibióticos, antimicósicos, antiparasitarios y antivíricos. Estos tratamientos permiten hoy controlar muy a menudo los episodios de infecciones oportunistas. El tratamiento del sarcoma de Kaposi puede mejorarse mediante ciertas quimioterapias solas (Daunorrubicina liposomal) o asociadas al Interferón o al GM CSF (dos factores que actúan sobre la multiplicación celular).

Entre los productos contra el virus eficaces en el laboratorio, el **AZT** (Azidotimidina o Retrovir) es el que tiene hoy un uso más extendido junto al **ddI** (Montagnier, 1993). Otros productos están en curso de evaluación (ddC, TIBO, Antiproteasas). Mediante distintos mecanismos, todos estos medicamentos bloquean la multiplicación del virus en el organismo. Sin embargo, ninguna de estas terapias permite una erradicación completa y definitiva del virus. No obstante, la investigación va por buen camino y las esperanzas están abiertas al futuro. Nuestra investigación, y en particular los ensayos realizados con los flavonoides aislados e identificados en musgos van encaminados a aumentar éstas.

Es posible que las asociaciones entre estos diferentes medicamentos (AZT + ddI, AZT + ddC + Interferón ...) sean más eficaces que la utilización individual de cada uno de estos productos. De hecho, así ha quedado puesto de manifiesto en el reciente Congreso sobre el virus de la inmunodeficiencia humana celebrado en Tokio (Japón) en el presente año de 1994.

Respecto al tratamiento de la enfermedad en el estadío precoz de la infección por el virus del SIDA, sólo el AZT ha demostrado hasta hoy cierta eficacia (Montagnier, 1993).

La **profilaxis**, de momento, es el único medio eficaz de lucha contra la propagación del SIDA. Sobre todo, los esfuerzos han de ir mayoritariamente dirigidos a evitar el contagio.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Material Biológico

De la mayor parte del material biológico utilizado en este trabajo se depositó un pliego testigo en los herbarios de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid (MACB) y del Departamento de Botánica de la Universidad de Saarlandes, Saarbrücken, Alemania (SAAR).

Las autorías correspondientes proceden de Engler (1924) salvo aquellas modificaciones propuestas por Griffin III & Buck (1989), Corley & col. (1981) y Corley & Crundwell (1991).

La relación de las muestras poblacionales utilizadas es la que figura a continuación:

***Anacolia intertexta* (Schimp.) Jaeg.**

BOLIVIA: Dep. Cochamba, prov. Ayopaya, Tarucani, alt. 4440 m, Shady cliffs, Leg.: Marko Lewis 79-2436 A.

***Anacolia laevisphaera* (Tayl.) Hower**

COLOMBIA: Dep. de Cundinamarca, ferme de Sasaima, alt. 1500 m, Leg.: M. Onraedt 5944.

FRANCIA: La Reunión, Cirque de Mafate, sol volcanique, alt. 1600 m, Leg.: M. Onraedt 9082.

***Anacolia laevisphaera* (Tayl.) Hower (= *Bartramia rosea* Herzog)**

ECUADOR: near Quito, on páramo, 3000 m, Leg.: Marko Lewis.

***Anacolia menziesii* (Turn.) Paris**

ESTADOS UNIDOS: California, Mendocino Co, about 5 miles W of Calpella, on cliff face, Leg.: Schofield & Thomas 28970.

***Anacolia subsessilis* (Tayl.) Broth.**

COLOMBIA: Dep. de Cundinamarca, ferme de Sasaima, alt. 1500 m, Leg.: M. Onraedt.

***Anacolia webbii* (Mont.) Schimp.**

ESPAÑA: CANARIAS: Tenerife, Aguamansa, La Caldera, 6-VIII-1989, Leg.: Siegel, Det.: R. Mües; Tenerife, Monte de la Esperanza, IX-1971, Leg. & Det.: Acuña.

ESPAÑA: SEVILLA: Pruna, 26-V-1972, Leg. & Det.: Silvestre.

***Bartramia afro-ithyphylla* Broth.**

RUANDA: Pref. de Ruhengeri, Mt. Karisimbi, Hagenia-Hypericum forest (with moss balls on branches) in the saddle between Mt. Visoke and Mt. Karisimbi, 3000-3300 m. alt., on rock, 13-IX-1991, Leg.: T. Pócs, Det.: J.P. Frahm.

***Bartramia angustifolia* Mitt.**

COLOMBIA: Meta, Páramo de Himapaz, Cerro Nevado, alt. 4050 m, Leg.: Antoine M. Cleef 805.

VENEZUELA: Estado Mérida, 19-II-1985, Leg. & Det.: D. Griffin III.

***Bartramia halleriana* Hedw.**

BELGICA: Vallée du Bayelon, sur schistes humides, Leg.: M. Onraedt 11846.

ESPAÑA: CANTABRIA: Sierra de la Corta, 21-I-1992, Leg.: J.A. López-Sáez & P.Peón, Det.: J.A. López-Sáez.

FRANCIA: Alpes, Gorges de la Diosaz (Chamonix), Leg.: M. Onraedt 11852.

SUIZA: Canton des Grissons, Le Prese, sur rochers en pessière, alt. 1400 m, Leg.: M. Onraedt 8441.

***Bartramia ithyphylla* Brid.**

ESPAÑA: LERIDA: Lago Ratera, en pinar de Pinus uncinata, en el P.N. de Aigües Tortes i Lago S. Mauricio, 2-XI-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: MADRID: Puerto de Canencia, en pinar de pino silvestre, 10-XII-1988, Leg. et Det.: M.E. Ron.

ITALIA: Val d' Aosta, Val Veny, rochers ombragés, alt. 1500 m, Leg.: M. Onraedt 14428.

NORUEGA: Geiranger, rcher, en fôret de Bouleaux, Leg.: M. Onraedt 12110.

***Bartramia longifolia* Hook.**

BOLIVIA: Dep. La Paz, prov. Lare-Caja, Nevado Jankho Voma, alt. 4180 m, Boulders piles, Leg.: Marko Lewis 79-1459.

***Bartramia mathewsii* Mitt.**

COLOMBIA: Cundinamarca, Páramo de Palacio, musgo epilítico, alt. 3800 m, Leg.: Antonie M. Cleef 4033.

***Bartramia mossmanniana* C. Müll.**

PERU: Apurimac, Pass Socchacasa, alt. 3000 m, Leg.: E. Hegewald.

***Bartramia papillata* Hook. f. & Wils.**

NUEVA ZELANDA: South Island, Southland, Milford Sound Road near Holly Ford Valley turn off.

***Bartramia patens* Brid.**

PERU: Huancavelica, Ichoquenus, 4150 m, Leg.: E. Hegewald.

***Bartramia polytrichoides* C. Müll.**

BOLIVIA: stones along cascade in wooded humid ravine, alt. 3250 m, Depto. La Paz, NNW of Chuma, Leg.: Marko Lewis 79-1047.

***Bartramia pomiformis* Hedw.**

BELGICA: Malonne, Vallée du Landoir, psammite famennier, alt. 100 m, Leg.: M. Onraedt 11753.

ESPAÑA: AVILA: Mijares, borde de la garganta, en granito, 4-I-1992, Leg.: J.A. López Sáez & P. Peón. Det.: J.A. López Sáez; Hoyocasero, monte 43 "Pinar de Hoyocasero", en pinar de pino silvestre, 1280 m, 14-XII-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Guisando, Nogal del Barranco, en encinar supramediterráneo, 23-II-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; carretera de Pedro Bernardo a S. Esteban del Valle, valle del Tiétar, 1140 m, en granitos, 1-III-1992, Leg.: J.A. López Sáez & P. Sáez, Det.: J.A. López Sáez; Candeleda, Garganta Lóbrega, 770 m, 8-V-1992, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: CACERES: Parque Nacional de Montfragüe, cta. de Torrejón el Rubio a Villareal de S. Carlos, en encinar-alcornocal, 29SQE50, 21-XI-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Cta. de Villarreal de S. Carlos a La Bazagona, Portilla del Tiétar, 29SQE51, 2-II-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Guadalupe, 28-VI-1992, Leg.: J.A. López Sáez & M. Tapia, Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: HUESCA: Valle de Ordesa, en hayedo-abetal, 2-VIII-1991, Leg.: J.A. López Sáez & P. Peón, Det.: J.A. López Sáez; Valle de Ordesa en hayedo-abetal, 26-X-1991, Leg. et Det.: J.A.López Sáez.

ESPAÑA: MADRID: Montejo de la Sierra, en hayedo (Galio-Fagetum), 30TVL66, 27-I-1991, Leg.: J.A. López Sáez & P.Peón, Det.: J.A. López Sáez; Montejo de la Sierra, robledal, 30TVL64, 27-I-1991, Leg.: J.A. López Sáez & P.Peón, Det.: J.A. López Sáez; Carretera de Navas del Rey a Pelayos de la Presa junto al Embalse de Picadas, en encinar y pinar de pino piñonero, 18-I-1991, Leg.: J.A. López Sáez & M.J. Pérez Alonso, Det.: J.A. López Sáez; Navas del Rey, en encinar, subida al Puerto de la carretera a Pelayos de la Presa, 8-II-1992, Leg.: J.A. López Sáez & P. Peón, Det.: J.A. López Sáez; Presa de El Villar, Embalse del Atazar, en encinar, 30TVL63, 27-I-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Puerto de Canencia, en pinar de pino albar, 1-V-1990, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Puerto de Canencia, en pinar de pino silvestre, 10-XII-1988, Leg. et Det.: M.E. Ron; El Escorial, silla de Felipe II, en robledal, 25-II-1990, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: NAVARRA: Orbaiceta, hayedo en la margen izquierda del río Irati, a 7 km del pueblo, 13-X-1990, Leg.: B. Estébanez, Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: SEGOVIA: El Espinar, estación de FFCC, en pinar de pino albar junto al río Moros, 15-V-1990, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: TOLEDO: Navahermosa, fuentes del río Estena, en robledal, 26-IX-1989, Leg.: Ron, Velasco, Jover & Buades, Det.: J.A. López Sáez.

ITALIA: Val d' Aosta, Semporcher, alt. 1600 m, Leg.: M. Onraedt 14517.

NORUEGA: distr. Nordland, Mo i Rana, rocher en pessière, alt. 150 m, Leg.: M. Onraedt 11515.

***Bartramia potosica* Mont.**

BOLIVIA: Dep. Cochabamba, prov. Ayopaya, base of serranias Tarucani, alt. 4500 m, Leg.: Marko Lewis 79-2463 A.

COLOMBIA: Cundinamarca, cta. Pº de Palacio a Rio Chuza, alt. 3675 m, Leg.: A.M. Cleef 5429.

***Bartramia pruinata* Herzog**

BOLIVIA: Prov. Murillo, 572 m slightly NE of Millímí, stable cliffs, 4980 m, Leg.. Marko Lewis 79-1740.

***Bartramia rufescens* Card.**

BOLIVIA: stones along cascade in wooded humid ravine, alt. 3250 m, Depto. La Paz, NNW of Chuma, Leg.: Marko Lewis.

***Bartramia ruwenzoriensis* Broth.**

ZAIRE: Prov. Kivu, Kahuzi-Biega Nat. Park., Mt. Kahuzi, Elfin-forest like Syzygium stand and Erica heath along summit traid, 3140-3200 m. alt., below rock overhang, 3-IX-1991, Leg.: T. Pócs, Det.: J.P. Frahm.

***Bartramia stricta* Brid.**

ESPAÑA: CACERES: Parque Nacional de Montfragüe, ribera del río Almonte, 7-III-1992, Leg.: J.A. López Sáez & M. Tapia Ariza, Det.: J.A. López Sáez; Jaraicejo, río Almonte, 30STJ69, 21-XI-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Jaraicejo, cruce con el río Almonte, sobre muro de pizarra, en encinar, 30STJ69, 2-II-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; P. N. Montfragüe, en la cta. de Torrejón el Rubio a Villareal de S. Carlos, en alcornocal, 29SQE50, 2-II-1991, Leg.: J.A. López Sáez & P. Peón. Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: MADRID: Navas del Rey, en encinar, subida al puerto de la ctra. a Pelayos de la Presa, 8-II-1992, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; Cta. de Navas del Rey a Pelayos de la Presa, en encinar junto al embalse de Picadas y pinar de pino piñonero, 18-I-1991, Leg.: J.A. López Sáez & M.J. Pérez Alonso, Det.: J.A. López Sáez; Villa del Prado, en el cauce del tamujar, 23-III-1992, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

***Bartramia vulcanica* Brid.**

FRANCIA: La Réunion, isla (Africa), Maïdo blocs de basalte, alt. 2180 m, Leg.: M. Onraedt 1822.

***Breutelia affinis* (Hook.) Mitt.**

NUEVA ZELANDA: South Island, Southland, Milford Sound Road near Holly Ford Valley turn off, Leg.: M. Onraedt.

***Breutelia allionii* Broth.**

BOLIVIA: prov. Camacho, NNW of Chuma, cliffs below summit, alt. 4630 m, Leg.: Marko Lewis.

***Breutelia arundinifolia* (Dub.) Fleisch.**

FILIPINAS: Luzon, Bagnio, Talus de la route, alt. 1550-2350 m en direction du Mont Sto. Tomas, 27-XII-1984, Leg.: M. Onraedt 84.L.10943.

***Breutelia austro-arcuata* (C. Müll.) Par.**

BOLIVIA: prov. Murillo, from 1 km upstream from Chaca Pampa, alt. 3650 m, humid area of highest shrubs, Leg.: Marko Lewis 82-466.

***Breutelia azorica* (Mitt.) Card.**

PORTUGAL: Azores, Sao Miguel, SN 155, 5-VI-1981, Leg. et Det.: G. Schwab.

***Breutelia boliviensis* Herzog**

BOLIVIA: Camacho, NNW of Chuma, cliffs below summit, alt. 4630 m, Leg.: M. Lewis 79-911.

***Breutelia chrysea* (C. Müll.) Jaeg.**

PERU: Amazonas, Calla-Calla between Balsan and Leimabamba, 3100 m alt., Leg.: E. Hegewald.

***Breutelia chrysocoma* (Hedw.) Lindb.**

ESCOCIA: Scotish Highland, Lochstach See, Am Fels, 19-VII-1989, Leg.: Ch. Müller, Det.: Ch. Müller & R. Mües.

ESPAÑA: ASTURIAS: Covadonga, V-1970, Leg. & Det.: R.M.Simó.

***Breutelia deflexifolia* Card.**

PERU: Cuzco, Aguas Calientes by Machu Pichu, on rocks, alt. 2100 m, Leg.: E. Hegewald 8774.

***Breutelia diffracta* Mitt.**

RUANDA: Pref. de Ruhengeri, Mt. Karisimbi, Alchemilla johnstonii vegetation interrupted by boulders on the E-slope in the alpine belt, 4350 m alt. on soil, 14-IX-1991, Leg. & Det.: J.P. Frahm.

***Breutelia elongata* (Hook. f. & Wils.) Mitt.**

NUEVA ZELANDA: South Island, Southland, Milford Sound Road near Holly Ford Valley turn off, Leg.: M. Onraedt.

***Breutelia eugeniae* Aongstr.**

ISLA MAURICIO: Le Pouce, roches volcaniques ensoleillés, alt. 550 m, Leg.: M. Onraedt.

***Breutelia humbertii* P. Varde & Ther.**

RUANDA: Pref. de Ruhengeri, Mt. Karisimbi, Alchemilla johnstonii vegetation interrupted by boulders on the E-slope in the alpine belt, 4350 m alt. on soil, 14-IX-1991, Leg. & Det.: J.P. Frahm.

***Breutelia integrifolia* (Tayl.) Jaeg.**

BOLIVIA: prov. Larecaja, Millipaya, boulders in sloping bog., alt. 4050 m, prov. Larecaja, Leg.: Marko Lewis 79-1395.

***Breutelia lorentzii* (C. Müll.) Par.**

BOLIVIA: prov. Larecaja, Canyon just NE of Sorata, alt. 3000 m, exposed bank of trail, Leg.: Marko Lewis 79-1180.

***Breutelia mniocarpa* Schimp.**

BOLIVIA: prov. Carecaja, Nevada Jankho Uma, above Mina St. Antonio, alt. 4280 m along glacier fed creek, Leg.: Marko Lewis 79-1483.

***Breutelia patens* Herzog**

BOLIVIA: prov. Guillacollo, head of río Suturi, alt. 4450 m shady cliff, Leg.: Marko Lewis 79-2600.

***Breutelia pendula* (Hook.) Mitt.**

ISLANDIA: North Island, near Lake Waikaremoana, Leg.: G.F. Jarolina, janv. 1948 de l' herbier of G.O.K. Sainsbury.

***Breutelia polygastrica* (C. Müll.) Broth.**

BOLIVIA: prov. Larecaja, Chilcani, alt. 3250 m, pastures, Leg.: Marko Lewis 82-259 A.

***Breutelia squarrosa* Jaeg.**

VENEZUELA: Estado de Mérida, environs de Aguadá (tiéf), alt. 3452 m, páramos: endroits ombragés, Leg.: M. Onraedt.

***Breutelia stuhlmannii* Broth.**

RUANDA: parc des Volcans, Bysoke, crête du cratère, alt. 3600 m., Leg.: De Sloover Jean-Louis 13448.

ZAIRE: Prov. Kivu, Kahuzi-Biega Nat. Park, Mt. Biega, Erica rugegensis stand covering the main Biega ridge from 2600 m to the summit 2705 m on soil, 28-VIII-1991, Leg. et Det.: J.P. Frahm.

***Breutelia subarcuata* (C. Müll.) Schimp.**

BOLIVIA: prov. Larecaja, Canyon just NE of Sorata on soil in wooded humid ravine, alt. 3150 m, Leg.: Marko Lewis 79-1198.

***Breutelia tomentosa* (Brid.) Jaeg.**

NICARAGUA: Dep. Matagalpa, vicinity of Aranjuez, alt. 1200 m, among grasses on wet clay roastbank, Leg.: Richards Donald 3740.

Catoscopium nigritum **(Hedw.) Brid.**

ESPAÑA: HUESCA: Puerto de Benasque, en el suelo del robledal, 4-III-1990, Leg. & Det.: J.A. López-Sáez.

Conostomum cleistocarpum **Herzog**

BOLIVIA: Dep. La Paz, prov. Murillo slightly NE of Milluni, alt. 4730 m, stony hills, Leg.: Marko Lewis 79-1637.

Conostomum macrotheca **Herzog**

BOLIVIA: Dep. Cochamba, prov. Ayopaya, Tarucani, alt. 4440 m, Shady cliffs, Leg.: Marko Lewis 79-2436 A.

Conostomum pentastichum **(Brid.) Lindb.**

PERU: Ayacucho, Pass Tapuna, between Tambo and Ayna, rocks, 3800-4420 m alt., Leg.: E. Hegewald.

Conostomum pusillum **Card. & Broth.**

PERU: Ayacucho, Pass Tapuna, 2500 m, between Tambo and Ayna, Leg.: E. Hegewald.

Conostomum tetragonum **(Hedw.) Lindb.**

SUECIA: Kassevage, Stugan bei Abisko, Lappland, 23-VIII-1964, Leg. et Det.: E. Sauer.

Conostomum tetragonum **(Hedw.) Lindb. (=*Conostomum boreale* Sw.)**

NORUEGA: Lac Tyin, sol humide couvert par la neige, alt. 1078 m, Leg.: M. Onraedt 7123.

Leiomela bartramioides **(Hook.) Par.**

PERU: Amazonas, between Ingenio and Pomacochas, rocks and trees, Leg.: E. Hegewald.

Leiomela deciduifolia **Herzog**

PERU: Amazonas, between Ingenio and Pomacochas, 900 m, Leg.: E. Hegewald 1986.

Leiomela lopezii **Griffin**

COLOMBIA: Cundinamarca, P° de Palacio, Lag. de Buitrago, alt. 3680 m., Leg.: A.M. Cleef 6733.

Leiomela piligera **(Hampe) Broth.**

BRASIL: Rio de Janeiro, Serra do Mar, zwischen Parati und Cunha An Zelswänden im Regenwald, alt. 1200 m, Leg.: J.P. Frahm.

Philonotis andina **(Mitt.) Jaeg.**

COLOMBIA: Cundinamarca, Páramo de Palacio, Lagunas de Buitrago, alt. 3600 m, Leg.: Antoine M. Cleef & T. van der Hammer 4973.

***Philonotis arnellii* Husn.**

ALEMANIA: Saarland, Felsen an der Bahn, N der Alten van Heisterberg, 6-II-1986, Leg. et Det.: R. Mües.

ESPAÑA: AVILA: Puerto del Pico, 13-X-1984, Leg. & Det.: Ron & Soria.

***Philonotis australis* (Mitt.) Par.**

ISLA MAURICIO: Le Pouce, roches volcaniques ensoleillés, alt. 550 m, Leg.: M. Onraedt.

***Philonotis caespitosa* Jur.**

ALEMANIA: Erlenbruuch bei Reimsbach am Wegrand, Kreis Merzig, 9-IV-1986, Leg.: R. Mües, Det.: E. Sauer.

ESPAÑA: GUADALAJARA: Sierra del Bulejo, 17-III-1986, Leg.: Ayala, Herguido, Mazimpaka & Ron, Det.: Ayala & Ron.

***Philonotis calcarea* (B. & S.) Schimp.**

AUSTRIA: Kalktuffquelle, Bärental, 1400 m, 26-VII-1980, Leg. et Det.: R. Mües.

BELGICA: prov. de Luxembourg, Forges de Buzenol, au bord de l' eau, Leg.: M. Onraedt.

ESPAÑA: TOLEDO: Castillo de Bayuela, 9-III-1982, Leg. & Det.: E. Fuertes.

NORUEGA: Nordland, env. Narvik sol au bord d' un lac, Leg.: M. Onraedt 11687.

***Philonotis capillaris* Lindb.**

NORUEGA: environs de Srjotli, Mocher suintant, alt. 1200 m, Leg.: M. Onraedt 7647.

***Philonotis fontana* (Hedw.) Brid.**

ESPAÑA: SEGOVIA: subida al Puerto de la Quesera, hayedo, 19-IV-1992, Leg.: J.A. López Sáez & M. Tapia Ariza, Det.: M.E. Ron.

ESPAÑA: TOLEDO: Navahermosa,fuentes del río Estena, 26-IX-1989, Leg.: Ron, Velasco, Jover & Buades, Det.: Ron & J.A. López Sáez.

FRANCIA: Jura, Col de Rothenbach, rocher calcaire suintant, Leg.: M. Onraedt 11900; Jura, Lac d' Iley, sol humide, Leg.: M. Onraedt 10573.

***Philonotis glaucescens* (Hornsch.) Broth.**

COLOMBIA: Meta, bord du Rio Guayariba, rochers sous couovert forêt tropicale, Leg.: M. Onraedt 026.

***Philonotis hastata* (Dub.) Wijk. & Marg.**

ISLA MAURICIO: Le Pouce, roches volcaniques ensoleillés, alt. 550 m, Leg.: M. Onraedt 191.

***Philonotis heterophylla* Mitt.**

SRI LANKA: Nuwara tliya, falaise de grès, alt. 1000 m, Leg.: M. Onraedt 9445.

***Philonotis lancifolia* Mitt.**

SRI LANKA: Nuwara tliya, Lover's Leaf Talls, alt. 1900 m, sur granit humide, Leg.: M. Onraedt 2858.

***Philonotis laxissima* C. Müll.**

ISLA MAURICIO: Magenta, rochers baslatiques suintants, alt. 500 m, Leg.: M. Onraedt 461.

***Philonotis marchica* (Hedw.) Brid.**

BELGICA: prov. de Luxembourg, Carlsbourg, alt. 440 m, rivière á eau limpide et froide, Leg.: M. Onraedt 7650 m.

ISLANDIA: W-Island, Snaefellness, Miklholtshreppur, 19-VIII-1987, Leg.: M. Neitzke, Det.: R. Mües.

***Philonotis revoluta* Br. jav.**

FILIPINAS: Luzón, Bagnio talus de la routa, alt. 1550-2350, Leg.: M. Onraedt 10975.

***Philonotis rigida* Brid.**

ESPAÑA: ASTURIAS: en los alrededores de Cangas de Tineo, 4-II-1991, Leg. & Det.: J.A. López-Sáez.

***Philonotis scabrifolia* (Hook. f. & Wils.) Braithw.**

PERU: Pasco, along road from Cerro de Pascoto Lima via Canta, north of Huayllay, km. 224.4, on soil, 4160 m alt., Leg.: Vitt 21734.

***Philonotis secunda* (Toz. & Molk.) Br. jav.**

FILIPINAS: Luzon, Ifugas prov. Bontoc, Talns de la route, alt. 1100-1300 m, 2-II-1987, Leg.: M. Onraedt 12148.

***Philonotis seriata* Mitt.**

FRANCIA: Mont Aigual, 30-VII-1983, Leg.: R. Mües, Det.: E. Sauer.

SUIZA: Canton des Srisons, Col de La Bermica, pré marécagluse, alt. 2300 m, Leg.: M. Onraedt 11580.

***Philonotis sphaerocarpa* (Hedw.) Brid.**

NICARAGUA: Dep. Matagalpa, vicinity of Aranjuez, alt. 1300 m on wet day bank along trail, Leg.: Donald Richards 3791.

***Philonotis tenuis* Mitt.**

COLOMBIA: Meta, bord du Rio Guayariba, rochers sous couovert forêt tropicale, Leg.: M. Onraedt.

***Philonotis thwaitesii* Mitt.**

SRI LANKA: Nuwara tliya dist Kotmale, sur rocher ensoleillé, alt. 1200-1430 m, Leg.: M. Onraedt 8919; Nuwara tliya talus de granit, alt. 1850 m, 8-III-1976, Leg.: M. Onraedt 3182.

***Philonotis tjibodensis* (Fleisch.) Broth.**

FILIPINAS: île Mindoro, environs du Mont Halcon, en forêt humide, alt. 750 à 1400 m, 29-II-1988, Leg.: Edw. Salgado 12116.

***Philonotis tomentella* Moll.**

AUSTRIA: auf Mineralboden im Schmelzwasser, Glockner Massiv, 2200 m, 30-VIII-1985, Leg.: R. Mües, Det.: E. Sauer.

NORUEGA: dist. Finnland, a Berlevag, bord de l' Ocean glac. arctique, Leg.: M. Onraedt 11670.

***Philonotis turneriana* (Schwaegr.) Mitt.**

EE.UU.: HAWAII: Oahu, Waianag Mount, Metrosideros-Cheirodendron moss forest, very wet roadside areas, alt. 4000 ft., 22-II-1975, Leg.: W.J. Hoe 3350-O.

***Philonotis uncinata* (Schwaegr.) Brid.**

PERU: Amazonas, Saullamur between Balsas and Leimebamba, on rocks and trees, Leg.: E. Hegewald.

***Plagiopus oederiana* (Sw.) Crum.**

AUSTRIA: an Felsspalten auf Kalk im Bodental, Kärnten, 16-VII-1980, Leg.: R. Mües.

FRANCIA: Haute Savoie, La Grande Chartreuse, alt. 1000 m, rochers calcaires, Leg.: M. Onraedt 12421; Les Causses, rochers calcaires, Leg.: M. Onraedt 7667.

SUIZA: Canton de Tribourg, blocs calcaires, alt. 1600 m, Schwarzsee - Col des Neuschels, Leg.: M. Onraedt 7665.

Así mismo, se dispuso de otro material vegetal no perteneciente a la familia *Bartramiaceae*, para la obtención de "patrones" químicos de compuestos conocidos, parte de los cuales constituían la base química de los biflavonoides de musgos:

***Dicranum scoparium* Hedw.**

ALEMANIA: Saarland, valle de Kirheler, entre Kirhel y Lantzhirchen, en hayedo, 3-XII-1992, Leg.: López Sáez, Geiger, Jung & Mües, Det.: López Sáez.

ESPAÑA: AVILA: Lanzahita, en pinar de pino resinero, 750 m alt., 15-I-1993, Leg. & Det.: J.A. López-Sáez.

ESPAÑA: MADRID: Puerto de Canencia, en pinar de pino silvestre, 18-III-1992, Leg. & Det.: J.A. López-Sáez.

Ron & col. (1990), Österdahl (1979a, 1983) y Lindberg & col. (1974), denuncian la presencia en este musgo del biflavonoide 5',8''-biluteolina, también identificado en *Bartramiaceae* (ver Anexo 2). La identificación previa en nuestro trabajo mediante ensayo de un nuevo biflavonoide en esta especie (Geiger & col., 1993b), y la posibilidad de obtener patrones biflavonoídicos con los que trabajar igualmente en *Bartramiaceae* nos hicieron llevar a cabo el estudio del componente biflavonoídico de *Dicranum scoparium* como ya quedo manifiesto en la Justificación de la Memoria Doctoral.

***Selaginella denticulata* (L.) Spring.**

ESPAÑA: CACERES: P.N. Montfragüe, de Torrejón el Rubio a Villareal de S. Carlos, en encinar subhúmedo y alcornocal, 29SQE50, 21-XI-1991, Leg. et Det.: J.A. López Sáez; P. N. Montfragüe, cta. de Torrejón el Rubio a Villareal de S. Carlos, en alcornocal, 29SQE50, 2-II-1991, Leg.: J.A. López Sáez & P. Peón, Det.: J.A. López Sáez.

ESPAÑA: MADRID: Villa del Prado, en el cauce del tamujar, 23-XII-1992, Leg. et Det.: J.A. López Sáez.

Voirin (1972), refiere la presencia de amentoflavona en esta especie, y de biflavonas únicamente en el género. Posteriormente, López-Sáez & col. (1994a y b), identifican un total de 7 biflavonoides: amentoflavona, robustaflavona, hinokiflavona, tetrametileter de amentoflavona, criptomerina B, isocriptomerina y sotetsuflavona.

***Selaginella selaginoides* (L.) PB. ex Schrank & C.F.P. Mart.**

ESPAÑA: SANTANDER: Borleña, en el sotobosque del castañar, 4-XI-1991, Leg. & Det.: J.A. López-Sáez.

López-Sáez & col. (1994a y c), refieren la presencia en esta especie de 3 biflavonoides: amentoflavona, robustaflavona e hinokiflavona.

4.2. Flavonoides

4.2.1. Extracción

El primer y primordial paso consiste en la limpieza exhaustiva de cada una de las muestras para eliminar restos fúngicos y tierra, acículas de pinos, líquenes u otros restos orgánicos que pudieran contaminar la muestra y concluir en resultados erróneos. Dicho material debe permanecer durante unos días a temperatura ambiente para secarse por completo. Deben eliminarse incluso los rizoides y conseguir un perfecto secado del material vegetal para poder trabajar así con el peso correcto y real, eliminando en la medida de lo posible la mayor cantidad de agua.

El siguiente paso consistió en la extracción en sí propiamente dicha, siguiendo básicamente dos tipos de metodología: una metodología auxiliar (métodos 1-8) y una metodología general (método 9).

Los métodos de extracción utilizados, en general, se han basado en la deslipidización previa de la muestra mediante un disolvente apolar (cloroformo, hexano, etc.) y la extracción posterior de los compuestos fenólicos con disolventes de mayor polaridad. El solvente utilizado en la extracción de los flavonoides en general y de los biflavonoides en particular, depende largamente de la propia naturaleza del compuesto y del material vegetal de partida (Geiger & Quinn, 1975). Así por ejemplo, el tricloroetileno y el cloroformo han sido utilizados para extraer la kayaflavona y otros biflavonoides (Geiger & Quinn, 1975). En el caso de los musgos, tales disolventes se antojan excesivamente apolares y su uso es inútil en la extracción de biflavonoides, por lo que es aconsejable utilizar disolventes más polares, tales como metanol, etanol y/o acetona con un 10-20% de agua (Geiger, 1990). Siegel (1988) afirma que los biflavonoides se extraen con facilidad con un 65-75% de metanol, mientras que los flavonoides di y triglicosilados necesitan en cambio un 20-40% de metanol únicamente.

Las metodologías de extracción seguidas han sido las siguientes:

4.2.1.1. METODOLOGIA AUXILIAR (métodos 1-8).

Nos sirvió como banco de pruebas para estudiar la capacidad de distintos disolventes en la extracción de flavonoides.

En este caso fue necesaria la pulverización de las muestras (gametófito + esporófito) para facilitar de esta manera la extracción de los compuestos fenólicos. Posteriormente, cada una de las muestras, por separado, se sometió a percolación en caliente en aparato Soxhlet (López-Sáez, 1992). En todos los casos, se utilizó en la extracción de las muestras muscícolas, tanto gametófito como esporófito conjuntamente.

Los métodos auxiliares son los siguientes:

METODO 1- 1º) cloroformo, 2º) metanol 90%. Mües (1988) propone la extracción con metanol 80%, muy especialmente para glicósidos pues son los flavonoides que más frecuentemente se

presentan en briófitos. Así mismo refiere la deslipidización previa y eliminación de agliconas lipofílicas, previa extracción con cloroformo, metanol puro o acetato de etilo.

METODO 2- 1°) cloroformo, 2°) metanol 90%, 3°) acetona 90%.

METODO 3- 1°) cloroformo, 2°) acetona 90%, 3°) metanol 90%.

METODO 4- Directamente con metanol 90%.

METODO 5- 1°) cloroformo, 2°) etanol 80% (Seeger & col., 1990 y 1991). Tiene la ventaja de la menor toxicidad del etanol frente al metanol.

METODO 6- 1°) cloroformo, 2°) etanol 100%, 3°) etanol 70%, 4°) metanol 70%. Las fracciones obtenidas de las dos últimas extracciones se concentraron y unieron hasta obtener un concentrado de aproximadamente 60 ml. A esta solución de 60 ml se añadieron 100 ml de agua en ebullición. Tras dejarse enfriar se obtuvo un precipitado que se desechó y una solución acuosa. Esta última fue lavada en un embudo de decantación durante 3 veces y sucesivamente con 100 ml de cloroformo, acetato de etilo y n-butanol, obteniéndose las subfracciones clorofórmica, acetato de etilo, n-butanol y acuosa final que fue desechada. Fue preciso utilizar sulfato sódico anhidro para deshidratar las subfracciones de acetato de etilo y n-butanol.

METODO 7- 1°) cloroformo, 2°) metanol 90% y posterior purificación de dicha fracción con hexano. La fracción metanólica purificada se llevó a sequedad y se diluyó en una mezcla de cloroformo-metanol-agua (10:9:1). De esta manera se obtuvo una nueva subfracción metanólica 90%, siendo eliminadas el resto de subfracciones. La purificación con hexano permite observar con mayor claridad y viveza los colores de las manchas obtenidas en la cromatografía en capa fina.

METODO 8- 1°) cloroformo, 2°) etanol 100%, 3°) etanol 70%. Es una modificación del método 6. Las fracciones etanol 100% y etanol 70% se unen y se sigue el proceso ya descrito en el método 6, hasta obtener las subfracciones clorofórmica, acetato de etilo y n-butanol. La fracción resultante de la primera extracción con cloroformo, y a diferencia del resto de métodos en que es desechada, es lavada sucesivamente con éter de petróleo y tolueno, obteniéndose así dos nuevas subfracciones: éter de petróleo y la resultante de la unión de las subfracciones clorofórmica y toluénica, siguiendo un método semejante al expuesto por Chawla & col. (1974), para isoflavonas-C-glicósidos.

En todos los casos las fracciones correspondientes a la extracción con cloroformo se desecharon (excepto en el método 8), así como la fracción etanol 100% del método 6 y la fracción hexánica del método 7, ya que aplicadas alicuotas de dichas fracciones en los sistemas de cromatografía en capa fina elegidos, se demostraba la inexistencia en ellas de flavonoides. Las fracciones acetónica y metanólica de los métodos 2 y 3, dado que tras la cromatografía en capa fina ofrecían los mismos resultados, se unieron en cada caso.

Cada una de las fracciones resultantes, sea cual fuere el método de extracción utilizado, fue posteriormente lavada cuatro veces, con la mezcla dimetilformamida (DMF):agua:éter dietílico (4:1:8) (Geiger & col., 1988; Geiger, 1990; Seeger & col., 1990 y 1991), mediante la llamada "**Distribución de Craig**"; que permite remover las clorofilas aún existentes, distribuyendo el extracto en dos fracciones, una superior de éter etílico que elimina los restos de clorofilas y grasas, y una inferior acuosa-DMF, más polar, que extrae los flavonoides (Markham, 1982). Todas las fracciones resultantes de eter etílico fueron desechadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, dedujimos que lo más adecuado es seguir el método básico propuesto por Mües (1988), previa deslipidización con cloroformo y extracción seguida de los flavonoides con metanol 80%, o, en su defecto con etanol 80%, de menor toxicidad (métodos 1 y 5). Se debe evitar excesivos fraccionamientos (métodos 6 y 8) pues las subfracciones obtenidas (clorofórmica, acetato de etilo, n-butanol), además de tener menor riqueza flavonoídica (cualitativa y cuantitativa), no separan alternativamente distintos compuestos en cada subfracción, sino que cada una de ellas separa los mismos pero en distintas concentracciones. Sí parece ser recomendable el lavado de los extractos metanólicos/etanólicos con hexano, pues elimina gran cantidad de impurezas, dando mayor nitidez a los colores cromatográficos. Finalmente el fraccionamiento con DMF:agua:éter etílico es igualmente obligado, por la mejoría notable que se observa en la eliminación de impurezas, y por ello puede sustituir al lavado con hexano, ya que además permite una concentracción mucho mayor de los compuestos polifenólicos.

La extracción con metanol-agua (9:1) o etanol-agua (9:1), es recomendable para biflavonas, las cuales no se extraen con metanol puro, cloroformo o diclorometano (Geiger, 1990; Ron & col., 1990). Es preciso al menos un 10-20 % de agua en la extracción.

4.2.1.2. METODOLOGIA GENERAL (método 9).

La extracción denominada "general" se lleva a cabo con grandes cantidades de material biológico, generalmente 200 ó 300 gramos. Esta, a diferencia de los métodos auxiliares, se realiza en frío, sumergiendo el musgo dentro de recipientes de vidrio de capacidad suficiente, en los disolventes respectivos y siempre sin pulverizar. Es aconsejable remover el extracto de vez en cuando con paleta de plástico para facilitar el proceso.

En nuestro caso hemos seguido en todo momento las recomendaciones del Prof. Dr. Hans Geiger (Universidad de Saarlandes, Saarbrücken, Alemania), utilizando únicamente disolventes polares (metanol y posteriormente acetona). Resulta esencial que el solvente contenga aproximadamente un 10-20% de agua, porque aumenta no sólo la solubilidad de los biflavonoides (por ej. la 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona es escasamente soluble en 100% de acetona pero lo puede ser fácilmente en un 80%), sino que también se facilita su extracción de las paredes celulares (Geiger, 1990).

A diferencia de las metodologías auxiliares, no se utiliza primeramente un disolvente apolar para deslipidizar y eliminar clorofilas, aunque en ocasiones puede ser aconsejable utilizar por ejemplo cloroformo, para eliminar un alto contenido de clorofilas y facilitar el trabajo (Salm, 1992).

Debido a la polaridad de los biflavonoides de musgos, éstos no son generalmente extraídos

con diclorometano o cloroformo, disolventes que se suelen usar primordialmente para la eliminación de lípidos. No obstante, si se utiliza como primer paso un disolvente apolar, es aconsejable realizar siempre un ensayo cromatográfico en TLC de dicho extracto clorofórmico (p.e. en celulosa/acético 40%) para detectar la posible presencia de flavonoides menos polares (Geiger, 1990).

El extracto correspondiente a cada una de las distintas extracciones sucesivas es filtrado en vacío con filtros Rundfilter de 150 mm de diámetro y, evaporados a sequedad en rotavapor, al cual va acoplado igualmente una bomba de vacío. Básicamente se utilizaron dos tipos de bomba: una de Büchi 165/S Vacuum Controller y otra de Vaccumbrand modelo Vakuum-Controller CVC 24. La temperatura adecuada de trabajo en ambos casos es de 40° C. a una presión de vacío ideal en el caso del metanol, cercana a 320 mbares.

Los extractos así obtenidos son chequeados en TLC, tomando una pequeña alicuota del extracto previamente a su evaporación a sequedad total.

El ensayo se realiza en placas de poliamida-6 en el sistema Stahl (ver apartado 4.2.2.1.: "Sistemas Cromatográficos"), permitiéndonos conocer en cada momento la concentración de cada uno de los extractos sucesivos y con ello cuando debe finalizar el proceso de extracción, o bien, cuando se debe cambiar el disolvente de extracción cuando la concentración en flavonoides sea baja o nula. De cada extracto se aplican en TLC aproximadamente 10 μl correspondientes a 5 microcapilares.

Una vez conocida la concentración de cada extracto parcial, si se debe seguir el proceso de extracción se pueden ir uniendo a los anteriores, así hasta que se sepa que se debe finalizar el proceso, en cuyo caso todos los extractos parciales resultantes pueden unirse en uno final total.

Es muy posible, que como consecuencia de la alta concentración en distintos compuestos en los extractos parciales o en el final total, el recipiente de trabajo posea en su zona superior un halo negro sumamente adherido al vidrio, correspondiente a clorofilas, azúcares, etc., fiel reflejo de que la concentración y material vegetal utilizados para el estudio flavonoídico han sido suficientes. Este halo u otros restos adheridos pueden disolverse mediante un agitador de ultrasonidos Bandelin Sonorex TK 20. Es posible que igualmente, en el fondo del recipiente de trabajo se forme un "sirope" básicamente compuesto de azúcares difíciles de solubilizar. En este caso es preferible utilizar primeramente acetona 80% (para solubilizar los azúcares) o metanol 60%, disolver en la medida de lo posible tal sirope, mediante agitación manual continuada del recipiente y evaporar de nuevo a sequedad el extracto para disolver el sirope anteriormente formado.

Una vez que el extracto total (procedente de la unión de todos los extractos parciales) está evaporándose a sequedad, justo antes de la sequedad total cuando dicho extracto es más o menos semilíquido, se debe filtrar previamente en vacío para eliminar restos de partículas o filidios que puedan existir en el extracto, e impedir un desarrollo normal del trabajo.

Una vez filtrado el extracto final se lleva a sequedad total en rotavapor.

En caso de que algún extracto debamos conservarlo durante varios días, es aconsejable antes de introducirlo en un refrigerador, añadirle unos ml de acetona (de acción bactericida), metanol al 80% (no puro pues puede romper ciertas moléculas flavonoídicas sobre todo las glicosiladas) y añadir igualmente unos ml de ácido acético, pues los compuestos fenólicos son en general bastante inestables en medio básico (Markham, 1982).

Los procesos de extracción seguidos con cada muestra, los litros de solvente utilizados y el

tiempo empleado son los siguientes:

Bartramia ithyphylla Brid.
Material vegetal empleado (gametófito + esporófito): 120 gr.
Extracciones: 1ª extracción: 5 l de metanol 80% (48 h.),
2ª extracción: 5 l de metanol 80% (24 h.),
3ª extracción: 4 l de metanol 80% (48 h.),
4ª extracción: 4 l de acetona 80% (48 h.),
5ª extracción: 4 l de acetona 80% (24 h.).

Bartramia halleriana Hedw.
Material vegetal empleado (gametófito + esporófito): 185 gr.
Extracciones: 1ª extracción: 5 l de metanol 80% (48 h.),
2ª extracción: 5 l de metanol 80% (72 h.),
3ª extracción: 4 l de metanol 80% (24 h.),
4ª extracción: 4 l de acetona 80% (48 h.),
5ª extracción: 4 l de acetona 80% (24 h.),
6ª extracción: 4 l de acetona 80% (24 h.).

Bartramia pomiformis Hedw.
Material vegetal empleado (gametófito + esporófito): 250 gr.
Extracciones: 1ª extracción: 5 l de metanol 80% (48 h.),
2ª extracción: 6 l de metanol 80% (48 h.),
3ª extracción: 5 l de metanol 80% (24 h.),
4ª extracción: 5 l de metanol 80% (72 h.),
5ª extracción: 5 l de acetona 80% (48 h.),
6ª extracción: 5 l de acetona 80% (76 h.),
7ª extracción: 4 l de acetona 80% (24 h.),
8ª extracción: 4 l de acetona 80% (24 h.).

Bartramia stricta Brid.
Material vegetal empleado (gametófito + esporófito): 200 gr.
Extracciones: 1ª extracción: 4 l de metanol 80% (24 h.),
2ª extracción: 4 l de metanol 80% (48 h.),
3ª extracción: 3 l de metanol 80% (96 h.),
4ª extracción: 3 l de metanol 80% (24 h.),
5ª extracción: 2 l de metanol 80% (24 h.),
6ª extracción: 2 l de acetona 80% (24 h.),
7ª extracción: 2 l de acetona 80% (72 h.),
8ª extracción: 2 l de acetona 80% (24 h.),
9ª extracción: 2 l de acetona 80% (24 h.).

Dicranum scoparium Hedw.
Material vegetal empleado (gametófito + esporófito): 285 gr.
Extracciones: 1ª extracción: 11 l de metanol 80% (48 h.),
2ª extracción: 9 l de metanol 80% (96 h.),
3ª extracción: 8 l de metanol 80% (24 h.),
4ª extracción: 7 l de acetona 80% (24 h.),
5ª extracción: 8 l de acetona 80% (24 h.),
6ª extracción: 7 l de acetona 80% (48 h.).

Una vez seco el extracto total, se le somete a la llamada **Distribución de Craig** (Geiger, 1990; Geiger & col., 1988; Seeger & col., 1990 y 1991), que permite eliminar clorofilas, carotenoides y otros restos lipofílicos, pudiendo aislar el contenido flavonoídico en una fracción separada (ver apartado 4.2.1.1.).

La distribución en sí consiste en tratar el extracto seco total con la mezcla dimetilformamida (DMF):agua:éter etílico (4:1:8). Para ello se preparan previamente 650 ml de tal disolvente (200:50:400), separándose en un embudo de decantación en dos fases: una superior básicamente de éter etílico, y otra inferior DMF-acuosa. El uso de agua nos permite precisamente conseguir esa separación, pues si usamos únicamente DMF y éter sólo se formaría una fase, pues son miscibles. El primer paso consiste en solubilizar el extracto seco utilizando únicamente la fase inferior (DMF-agua) que previamente habíamos separado del embudo de decantación, hasta hacerlo soluble totalmente. Se utiliza en este caso unos 105 ml aproximadamente de la fase DMF-acuosa. Una vez solubilizado, la solución resultante se pasa a un nuevo embudo de decantación, y se le añade una cantidad equivalente de la fase de éter etílico (aproximadamente 150 ml), tras lo cual se debe agitar muy bien el embudo eliminando los gases del éter y esperar aproximadamente 1/2-1 h. a la separación en dos fases de la solución. Estas dos primeras fases las llamaremos respectivamente ETER 1 (posee básicamente clorofilas) y DMF 1.

A continuación la fase DMF 1 se pasa a un segundo embudo de decantación y se le añaden otros 150 ml de éter etílico, repitiéndose el proceso anterior y obteniéndose dos nuevas fases: ETER 2, que elimina restos de clorofilas no eliminados por la fase ETER 1 y, la fase anterior DMF 1 lavada por segunda vez con éter. El proceso de repite una tercera vez en un tercer y nuevo embudo de decantación, obteniéndose una nueva fase ETER 3 y la fase DMF 1 que ya se separa en un erlenmeyer.

A continuación se retoma la fase ETER 1 y se le añaden 105 ml del solvente DMF-agua previamente preparado, obteniéndose al cabo de 1/2-1 h. dos fases, la misma fase ETER 1 lavada con DMF-agua y una nueva fase que llamaremos DMF-2, la cual, al igual que se hizo con la DMF-1, es lavada sucesivamente en los embudos correspondientes a las fases que resultaron ETER 2 y ETER 3.

El proceso se repite una tercera vez, añadiendo otros 105 ml. del disolvente DMF-agua a la fase ETER 1 y lavando posteriormente la fase DMF-3 resultante dos veces en las fases ETER 2 y ETER 3.

Al final de todo el proceso dispondremos de seis fracciones correspondientes a cada una de

las fases, que recogemos en erlenmeyer separados: ETER 1, ETER 2, ETER 3, DMF 1, DMF 2 y DMF 3.

Es importante en cada paso agitar muy bien el embudo de decantación correspondiente, eliminar gases etéreos y permitir una buena y rápida separación de las dos fases resultantes.

Las seis fracciones así obtenidas fueron posteriormente cromatografiadas en TLC, en el sistema stahl-poliamida 6 (ver apartado 4.2.2.1.) para cada una de las muestras.

Generalizando para las cinco especies estudiadas, podemos afirmar que las tres fracciones etéreas (ETER 1, ETER 2, ETER 3) únicamente contenían clorofilas, por lo que se desecharon. Las fracciones DMF 2 y DMF 3 contenían un bajo contenido en flavonoides (manchas de color violeta claro en el ensayo en TLC) y bajo igualmente en clorofilas, por lo que no se desecharon pero fue necesario lavarlas sucesivamente con nuevo solvente (éter etílico) hasta eliminar definitivamente los restos de clorofilas contaminantes. La fracción DMF 1 en cambio, no contenía clorofilas y sí un alto y rico contenido en flavonoides (manchas color violeta oscuro en el ensayo en TLC).

Tras lo anterior, las tres fracciones libres de clorofilas (DMF 1, DMF 2, DMF 3) se unieron y llevaron a sequedad en rotavapor. La evaporación del DMF es difícil, siendo recomendable para unas condiciones de trabajo de 40° C., añadir unos ml de acetona y evaporar a velocidad muy baja, hasta conseguir llegar al punto de ebullición del DMF, que se consigue a una presión de 10 mbares con la ayuda de una bomba de vacío acoplada al sistema de evaporación. Generalmente no hace falta evaporar todo el extracto disuelto en DMF hasta sequedad total, lo que facilita si cabe el proceso por la dificultad de tal evaporación, sino que se puede evaporar hasta que resten aproximadamente unos 50 ml de extracto ("solución aceitosa" no "siruposa") que se someterán a otras pruebas analíticas y preparativas tales como la Cromatografía en Columna.

En adelante, estos extractos o soluciones aceitosas finales, recibirán la denominación de **"Extracto General"**, específico para cada una de las especies estudiadas, y de acuerdo a él nos referiremos en metodologías posteriores tales como la Cromatografía en Columna.

4.2.2. Técnicas Analíticas

4.2.2.1. Cromatografía

A.- Cromatografía en Capa Fina (T.L.C.)

Dado que los compuestos polifenólicos se presentan generalmente en forma de mezclas complejas, todos los métodos utilizados para su análisis incluyen una técnica de separación, generalmente cromatográfica. La Cromatografía en Capa Fina (T.L.C.) resulta por este motivo enormemente válida y útil. En nuestro trabajo hemos seguido todas las recomendaciones aportadas por Mües (1988) y Harborne (1984), utilizando placas de 20 x 20 cm, con el punto de aplicación a los 2 cm y un frente de 15 cm. En las cromatografía monodimensionales (1D-TLC) la aplicación de

la muestra se hace en banda de aproximadamente 1 cm, y en las bidimensionales (2D-TLC) en un punto (pa) de cerca de 0.5 cm de diámetro a 2 cm de cada uno de los lados de la placa (Fig. 4.1. y 4.2.). Es necesario advertir que, tras desarrollarse la primera dimensión de las 2D-TLC se debe secar perfectamente la placa, eliminando cualquier resto del primer solvente, de manera que no interfiera en el desarrollo de la segunda dimensión en un nuevo solvente.

Las placas cromatográficas utilizadas poseen las siguientes fases estacionarias:

- cromatofolios PL de plástico, preextendidos con Poliamida-6 Polygram, de 0.1 mm de espesor, de Macherey-Nagel (MN).
- cromatofolios AL de aluminio, preextendidos con Poliamida 11 F-254, con indicador de fluorescencia, espesor de capa de 0.15 mm de Merck.
- cromatofolios PL de plástico, preextendidos con celulosa F con indicador de fluorescencia, de 0.1 mm de espesor de Merck.
- cromatofolios PL de plástico, preextendidos con celulosa sin indicador de fluorescencia, de 0.1 mm de espesor de Merck.
- cromatoplacas extendidas preparativas y analíticas de celulosa, sin indicador de fluorescencia, de 0.25 mm de espesor. Se preparan haciendo una suspensión con 60 gr. de celulosa para TLC de Merck y 210 ml de agua destilada, suficiente para 10 placas (Markham, 1982). Se mezcla eliminando todos los grumos posibles formados en la papilla. Para ello se puede utilizar un agitador de ultrasonidos Bandelin Sonorex TK 20, tras lo cual se extiende la papilla en cromatoplacas de vidrio (previamente deslipidizadas con acetona) de 20 x 20 cm y se dejan secar.

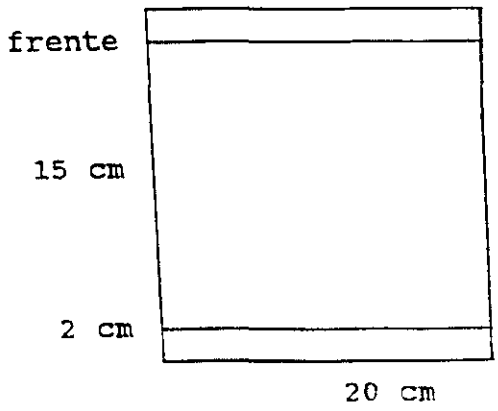


Fig. 4.1.: TLC MONODIMENSIONAL (1D-TLC)

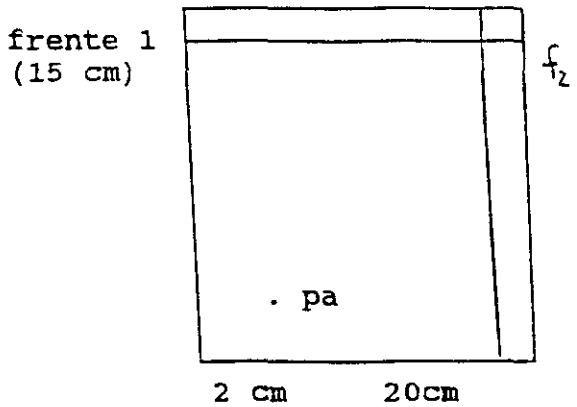


Fig. 4.2.: TLC BIDIMENSIONAL (2D-TLC)

Dado que los resultados obtenidos con las cromatoplacas extendidas previamente en el laboratorio eran semejantes a los obtenidos con aquellas preextendias procedentes de distintas casas comerciales, aunque con menor nitidez tanto en la separación de los compuestos como en su coloración, se emplearon únicamente con fines preparativos. Así, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se utilizaron básicamente en el aislamiento del denominado Compuesto VI (Bartramiaflavona), siendo su purificación posteriormente realizada por otros métodos.

La relación de solventes utilizados en T.L.C. (Markham & Wilson, 1988 y 1989; Mües, 1988; Markham, 1982) y la fase estacionaria en la que se desarrollaron es la siguiente (los solventes únicamente son válidos durante una semana, tras la cual debe prepararse un sistema nuevo, siendo aconsejable anotar la fecha de preparación en la cubeta cromatográfica):

A.1. Cromatografía monodimensional (1D-TLC)

Z_1: Acético 15% en celulosa (1-3 h.).

Z_2: Acético 40% en celulosa (2-4 h.).

Z_3: TBA = t-butanol:acético:agua (3:1:1) en celulosa (6-7 h.). Es aconsejable utilizar una fuente de calor tal como una estufa de calefacción por aire, para conseguir una desarrollo cromatográfico más rápido, pues este sistema es bastante lento.

P_1: STAHL = AEBFW = acetato de etilo:metiletilcetona:fórmico:agua (5:3:1:1) en poliamida (1-2 h.) (Stahl, 1967).

P_2: AWE = Acetona:agua:acético (6:2:2) en cromatoplacas de poliamida (1-2 h.).

La aplicación de las muestras en las placas de cromatografía se realizó mediante una microjeringa Hamilton-Bonaduz, en aplicaciones que iban desde los 7 a los 30 μl dependiendo de la concentracción de la muestra.

A.2. Cromatografía bidimensional (2D-TLC)

A la vista de los resultados hasta ahora obtenidos, es evidente que la gran mayoría de los biflavonoides de musgos poseen más o menos la misma polaridad (Geiger, 1990). Es por ello que se debe buscar un sistema cromatográfico bidimensional adecuado que nos proporcione una separación razonable de los distintos compuestos.

En nuestro trabajo se utilizaron dos tipos de sistemas cromatográficos bidimensionales:

Z_3-Z_1: Se utilizó el disolvente TBA para desarrollar la placa en la primera dimensión y acético 15% para la segunda, en placas de celulosa (Mabry & col., 1970; Mües, 1988). En este sistema la mayoría de los biflavonoides presentan un alto Rf en TBA y apenas migran en acético 15%, excepto los biflavonoides macrocíclicos (Seeger & col., 1991; Seeger, 1992; Salm, 1992; López Sáez, 1992) (Fig. 4.3.).

P_1-P_2: Stahl (5:3:3:1) para la primera dimensión y AWE (acetona:agua:acético) (6:2:2) para la segunda, en placas de poliamida-6 (Stahl, 1967; Salm, 1992; Seeger, 1992). Es un buen sistema para biflavonoides pues al contener acetato de etilo el primer solvente impide el desarrollo cromatográfico de muchos monoflavonoides, sobre todo flavonas. Con este sistema además, la mayoría de los biflavonoides poseen un valor de Rf medible en ambas dimensiones, a diferencia del anterior, en el que en la dimensión del acético 15% apenas se desarrollan y en TBA tienen un Rf generalmente muy alto (Fig. 4.4.).

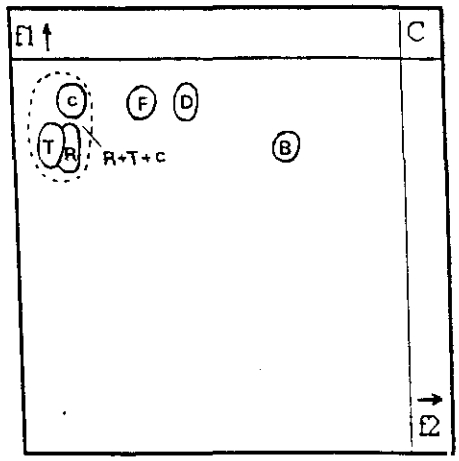


Fig. 4.3.: Movilidad de los biflavonoides más comunes en musgos en el sistema 2D-TLC acético 15%-TBA en celulosa.

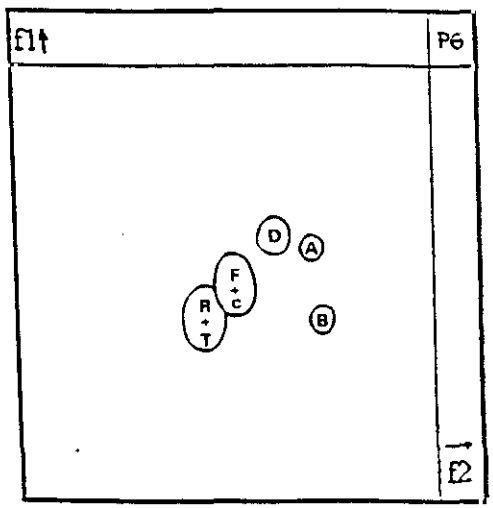


Fig. 4.4.: Movilidad de los biflavonoides más comunes en musgos en el sistema 2D-TLC Stahl-AWE en poliamida-6.

En todos los casos se prepararon aproximadamente 100-150 ml de solvente para cada cubeta de cromatografía, cantidad suficiente para garantizar un buen desarrollo, sin que el disolvente llegue al punto de aplicación.

B.- Reveladores Cromatográficos

El color o la fluorescencia es un indicativo válido del compuesto con el que estamos trabajando. Si éste es un biflavonoide, su color o fluorescencia es reflejo claro de los monoflavonoides que lo forman (Geiger, 1990).

Una vez desarrolladas las 1D-TLC (monodimensionales) o la 2D-TLC (bidimensionales) se procedió a observar las manchas aparecidas bajo la luz ultravioleta. Para facilitar el proceso, y como medio de distinción de los tipos flavonoídicos se usaron una serie de reveladores específicos de flavonoides (Mües, 1988; Geiger, 1985; Vioque, 1984):

B.1.- Amoniaco (NH_3, 25%): las manchas púrpuras oscuras correspondientes a flavonas o flavonoles con un grupo hidroxilo libre en posición 4'- del anillo B cambian a una fluorescencia amarilla o amarilla verdosa tras ser sometidas a vapores de amoniaco. En el caso de no producirse tal cambio con los vapores de NH_3 es probable que se trate de un flavonoide inespecífico en cuanto al tipo, con el oxígeno en posición 4'del anillo B sustituído o ausente el grupo hidroxilo en tal posición (ver Fig. 3.6 pp. 21).

B.2. - Naturstoffreagenz A (NA). Neu (1957) propone el empleo de complejos de ácidos diarilbóricos y de oxialquilaminas como reactivos de derivados de la fenil-benzo-γ-pirona. El reactivo comercializado ha sido el difenilborato de aminoetanol (PEG 400), también llamado Naturstoffreagenz A, Natural Product Reagent A y Flavognost (Fig. 4.5), notablemente recomendado en la Farmacopea Europea (Brasseur & Angenot, 1986) que ha resultado ser un muy interesante y válido revelador cromatográfico de biflavonoides, aunque también es útil con otros flavonoides y compuestos fenólicos. El NA es en sí un buen reactivo como revelador de flavonoides pues éstos tienen grupos hidroxilos libres y, los electrones del oxígeno son atraídos por el boro del NA.

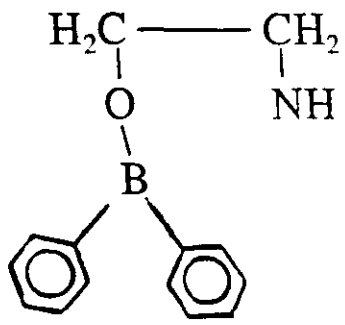


Fig. 4.5.: Estructura química del Naturstoffreagenz A (NA).

El NA se prepara en una solución metanólica al 0.3% que se pulveriza sobre la placa de cromatografía formando con las manchas existentes complejos irreversibles, al contrario que el

amoniaco. Igualmente, se puede pulverizar posteriormente con polietilenglicol al 2% en metanol, para conservar mejor el color de las manchas y hacerlos más vivos.

Si manchas púrpuras reveladas con NA cambian a colores verdes o amarillo verdosos fluorescentes, se trata con seguridad de compuestos que poseen un grupo OH- libre en posición 4'- del anillo B, o hidroxilos adjuntos sustituídos en posiciones 3'- y/o 5'- (4'-OH, 4'-OH- 3',5'-diOCH_3, 4'-OH- 3'-OCH_3). En el caso de que el cambio de color sea hacia colores amarillos o naranja-amarillentos fluorescentes, se tratará de compuestos que pueden presentar: o-diOH en posiciones 3',4'- del anillo B, tres grupos hidroxilos adjuntos y libres en posiciones 3',4',5'- del anillo B o bien, o-diOH en 4',5'- y -OCH_3 en 3' (ver Fig.3.6 pp. 21)

Las manchas azules fluorescentes o azul violáceas, suelen corresponder a ácidos cinámicos, sobre todo las azules fluorescentes, u otros ácidos fenólicos derivados del cafeico. Así mismo, tonos más oscuros azulados pueden corresponder a flavonoides glicosilados, generalmente en 1 y/o 5 de flavona (Geiger, com.per.; Wagner & col., 1983).

Generalmente el color de los biflavonoides bajo la luz ultravioleta (360 nm) es el de una mancha oscura, violeta/púrpura, cuya fluorescencia tras revelar con NA se torna hacia colores amarillos o naranjas fluorescentes (Geiger, 1990). No obstante, hay dos casos especiales dignos de mención y que hemos creído importante señalar aquí:

1. Por una parte, nos encontramos con los biflavonoides macrocíclicos, bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona, cuyo color no cambia tras ser revelados con NA o vapores de amoniaco, lo que los hace fácilmente distinguibles del resto de biflavonoides (Seeger, 1992; Salm, 1992, López Sáez, 1992).
2. Otro caso curioso es el de los biflavonoides que cuentan con una mitad monoflavonoídica de eriodictiol (flavanona de la luteolina), cuyas manchas a la luz de la lampara de ultravioleta (360 nm), al igual que el propio eriodictiol, viran a color rojo intenso con el tiempo tras ser reveladas con NA (Geiger, 1990; Wollenweber, 1981; Anhut & col., 1989b; Geiger & Bockel, 1989). Tal es el caso, por ejemplo, de los 2,3-dihidro-biflavonoides, que viran todos ellos a color rojo con el tiempo tras ser expuestos a vapores de NA (Geiger, 1990).

Por todo lo anterior, en el apartado correspondiente al "Ensayo para biflavonoides" y, en la exposición de los resultados, hemos distinguido e identificado con relativa facilidad la presencia de ambos macrociclos, bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona, así como de la 2,3-dihidro filonotisflavona, fácilmente identificables por su fluorescencia y típico Rf (Seeger, 1992).

B.3. - Benedict. Revelador de grupos o-dihidroxilo en compuestos fenólicos. Se prepara de acuerdo a Reznik & Egger (1961) y Krebs & col. (1967), a partir de dos soluciones previas (I y II) (Mües, 1988).

A la luz visible, los flavonoides revelados con dicho reactivo se observan de color amarillo limón verdoso. A la luz ultravioleta, los compuestos con un grupo hidroxilo libre en 4'-OH del anillo B muestran una fluorescencia verde o azul clara, mientras que los que poseen agrupamientos o-diOH en ese mismo anillo muestran una fluorescencia oscura (ver Fig. 3.6 pp. 21).

En el caso de tratarse de compuestos cuyo color previo al uso del revelador es ya púrpura

oscuro, la utilización del reactivo de Benedict no es muy útil.

C.- Ensayo para Biflavonoides

El estudio se realizó básicamente de acuerdo a Seeger (1992) y Anhut (1992), junto con las recomendaciones de Markham (1982) y Stahl (1969). Es un método rápido que, con poca cantidad de material biológico, nos permite conocer la ausencia/presencia de flavonoides en la muestra y definir el tipo flavonoídico correspondiente.

Ciento cincuenta a doscientos miligramos de material vegetal limpio y seco, se sumergen en 20-25 ml. de metanol 80% en un erlenmeyer de 100 ml. Así permanece dicho material durante 24 h. extrayéndose el componente flavonoídico, tras las cuales, el extracto es filtrado y evaporado a sequedad en rotavapor (no más de 40° C.). En el caso de que el material biológico de partida tenga un exceso de tierra y sea difícil eliminar ésta, es aconsejable utilizar al menos 300 mg. de material vegetal limpio y seco. Los filtros utilizados son de Schleicher & Schüll (S & S) Rundfilter de 90 y 110 mm. de diámetro.

El extracto filtrado y evaporado a sequedad es posteriormente disuelto en 1 ml de acetona:metanol:agua (5:4:2). La solución así obtenida es cromatografiada en 2D-TLC en el sistema TBA/ácido acético 15% (Z_3-Z_1) en placas de celulosa (ver pp. 77-78). Este primer ensayo cromatográfico nos sirve para confirmar la presencia/ausencia de flavonoides y aproximar el tipo flavonoídico.

Los biflavonoides, como ya se ha referido con anterioridad, poseen un bajo o nulo Rf en acético 15% y muy alto en TBA. La placa es así mismo revelada con los reactivos específicos anteriormente descritos (amoniaco, NA) y observada en lámpara de luz ultravioleta (254 y 366 nm). Normalmente, la cantidad de extracto aplicado en la cromatografía es de 7.5-8 alicuotas de un capilar de 3 cm de altura por 0.1 mm de diámetro interno, equivalentes a 2 μl por capilar (aproximadamente 16 μl). Las placas de celulosa utilizadas son cromatoplacas extendidas preparativas y analíticas (ver apartado 4.2.2.1.).

La solución anterior, una vez cromatografiada en el primer ensayo, es de nuevo evaporada a sequedad en rotavapor a no más de 40° C. y, posteriormente, disuelta en 10 ml de acetato de etilo, pasándose la nueva solución obtenida a un embudo de decantación. El erlenmeyer que contenía la solución original es lavado a continuación con 10 ml de agua destilada que también se pasan al mismo embudo de decantación anterior. El proceso se repite sucesivamente con otros 10 ml de acetato de etilo y 10 ml de agua destilada.

Los 40 ml del embudo de decantación son a continuación agitados manualmente, eliminando los gases que se puedan producir, tras lo cual se debe esperar 1/2-1 h. para permitir la separación en dos fases claras del contenido del embudo: una superior de acetato de etilo que contendrá primordialmente los biflavonoides y, otra inferior acuosa que se desecha o bien se cromatografía en el sistema acético 40%/celulosa (Z_2) si se sospecha por su color la presencia de flavonoides no aislados en la fracción de acetato de etilo.

La fase acetato de etilo se separa de la acuosa y se recoge en un matraz llevándose

posteriormente de nuevo a sequedad en rotavapor (no más de 40° C.), tras lo cual el extracto seco obtenido es disuelto nuevamente en 0.5 ml de acetona 100%, y posteriormente cromatografiado en 2D-TLC en placas de poliamida-6 en el sistema Stahl-AWE (P_1-P_2) (ver pp. 77-78), observándose luego las cromatoplacas en lámpara de luz ultravioleta (254 y 366 nm) antes y después del revelado con reactivos específicos (amoniaco, NA). Se aplican en la cromatografía aproximadamente 8-10 alicuotas (20 μl) del microcapilar anteriormente descrito.

Este segundo ensayo es más específico para biflavonoides y puede aproximar el tipo biflavonoídico aunque no es exclusivo.

Como ya se ha comentado con anterioridad (ver apartado 4.2.2.1. - B), el ensayo biflavonoídico nos permite diferenciar con relativa facilidad los biflavonoides macrocíclicos del resto de biflavonoides, así como los 2,3-dihidro biflavonoides y, en particular, la 2,3-dihidro-filonotisflavona. Es por ello que en la exposición de los resultados del ensayo realizado con las distintas especies de la familia *Bartramiaceae*, se haga precisamente hincapié, en la presencia/ausencia de bartramiaflavona, anhidrobartramiaflavona, 2,3-dihidrofilonotisflavona, otros 2,3-dihidrobiflavonoides y otros flavonoides.

En todos los casos, excepto cuando se especifique en los resultados, el ensayo se realizó conjuntamente de las fases gametófito y esporófito sin separar. De manera general, podemos afirmar que únicamente se procedió a separar gametófito de esporófito, en los ensayos realizados con las cinco especies que fueron objeto central de la presente Tesis, mientras que en el resto no se llevó a cabo dicha separación.

D.- Cromatografía en Papel (preparativa)

Se realizó según las indicaciones de Mabry & col. (1970) y Markham (1975), en papel Whatman 3MM de 57 cm de largo por 43 de ancho. La muestra se aplicó a 6.5 cm de la base, con un frente de 50.5 cm en sentido descendente.

El disolvente utilizado fue Acético 15% (1\2 l), pues era el que mejor se acomodaba a los resultados previamente obtenidos en las TLCs respectivas.

Se realizaron un total de 12 cromatogramas preparativos (6 por cada especie), aplicando alicuotas de los extractos metanólicos de *Bartramia pomiformis* y *Bartramia halleriana* de distintas localidades, ya que en todos ellos se detectó la presencia del Compuesto VI, que es aquel que intentamos aislar en cantidades suficientes mediante la cromatografía en papel preparativa.

El tiempo aproximado de desarrollo del cromatograma fue de unas 16 horas.

Tras el desarrollo de la cromatografía preparativa se extrajo del papel la mancha correspondiente al Compuesto VI mediante percolación en Soxhlet con metanol-agua (1:1). El extracto obtenido se llevó a sequedad en un rotavapor para eliminar el disolvente y se purificó posteriormente. De esta manera se obtuvieron un total de 40 mg purificados del Compuesto VI.

La extracción del compuesto del papel es preferible realizarla con metanol-agua (1:1) que con metanol-agua (9:1), pues una alta concentracción de metanol descompondría el papel en sus fibras de celulosa, haciendo más difícil la purificación posterior, afectando así mismo al espectro de ultravioleta

que se pueda obtener del flavonoide extraído.

Normalmente, utilizaremos la mezcla metanol-agua (9:1) para extraer los compuestos fenólicos del material biológico en vivo y, la mezcla metanol-agua (1:1) para extraerlos del papel o fase estacionaria.

E.- Cromatografía en Columna (C.C.)

El uso de esta técnica se centra en el aislamiento de flavonoides a una mayor escala cuantitativa. Básicamente se trata de la separación de una mezcla en disolución de distintos compuestos flavonoídicos, en una columna provista de un adsorbente (celulosa, silicagel, poliamida, etc.) y la subsecuente elución de cada compuesto, individualmente o en una mezcla de un número mucho menor de compuestos (en este caso se utilizarían posteriormente nuevas columnas) con los solventes apropiados.

En nuestro trabajo hemos utilizado primordialmente la cromatografía en columna con dos fines: por un lado, el aislamiento de biflavonoides u otros flavonoides, en cantidades necesarias para poder aplicar posteriormente ciertas técnicas analíticas tales como la Resonancia Magnética Nuclear o la Espectrometría de Masas y, por otro lado, para la purificación de cada uno de los compuestos previamente aislados por la misma cromatografía en columna o técnicas afines como la cromatografía en papel preparativa.

Se siguieron básicamente las recomendaciones de Mabry & col. (1970), Seeger (1992), Hostettmann & Hostettmann (1982) y Markham (1975 y 1982).

Así mismo, queremos expresar que la separación en bandas de la columna cromatográfica, correspondientes cada una de ella a los distintos flavonoides a aislar, puede hacerse visible por la coloración amarilla de éstas a la luz del día o bien por el uso de una lámpara de luz ultravioleta (366 nm), en cuyo caso las bandas flavonoídicas se ven de color violeta (claro y oscuro) y su recolección es sumamente sencilla en recipientes separados, ya que el proceso se convierte con este método en un proceso simple y sencillo (Markham, 1982). A la luz ultravioleta la banda de clorofilas en la columna posee color rojo intenso y la correspondiente a los lípidos más polares que no se eliminaron con el DMF se ven de color marrón claro y oscuro. Otros compuestos tales como ácidos fenólicos o tetraterpenoides pueden visualizarse por su color azul fluorescente o azul violáceo a la luz ultravioleta en la columna. En el caso de que las bandas no sean visibles, se deben colectar fracciones a intervalos regulares (cada 25-50 ml) y, chequear cada una de las fracciones por separado en TLC (acético 40%/celulosa p.e.), para determinar qué compuesto poseen, y saber así cuáles de ellas pueden unirse y cuáles no. Un colector de fracciones automático, en este caso, es ideal para facilitar tal trabajo.

Los compuestos aislados y purificados por los distintos sistemas de cromatografía en columna (CC) son llevados a sequedad en rotavapor, depositados en un recipiente de vidrio adecuado y posteriormente introducidos en un **Desecador de Silicagel** que nos permite eliminar los restos que pudieran existir de agua en los compuestos teóricamente puros. Así permanecen durante 2-3 días en el desecador sin presión alguna o bien puede utilizarse una bomba de presión durante 20-30 minutos.

Fueron utilizadas los siguientes tipos de Columnas Cromatográficas:

E.1. Columna de Sephadex LH-20 de Sigma.

El sephadex es un gel compuesto de moléculas de dextrano que tiene la particularidad de separar los distintos compuestos de la mezcla de acuerdo a su tamaño molecular. El sephadex del tipo LH-20 es un gel de dextrano hidroxipropilado, diseñado para usarse con solventes orgánicos o mezclas con agua (Markham, 1975). Se trata de un sephadex lipofílico, que consigue que la atracción de la muestra por el gel sea la menor posible. De esta manera, el mismo gel (sephadex) es capaz de eliminar grasas y otros compuestos afines de la mezcla, permitiendo el paso a través de él de los compuestos fenólicos de nuestro estudio.

El tamaño de separación de partículas oscila entre las 25 y 100 micras, que corresponden al tamaño de la trama del gel. Compuestos menores a dichas medidas no son separados, y los mayores no atraviesan el gel.

El sephadex está compuesto de partículas de dextranos que forman un entramado. Las partículas de bajo tamaño serán las que se separen más tarde, siendo por ello las de mayor tamaño tales como biflavonas y glicósidos las que antes se separan. Este tipo de adsorbente está específicamente destinado para el uso de solventes orgánicos (Markham, 1982), siendo especialmente recomendado para la purificación final de distintas agliconas flavónicas, biflavonoides y glicósidos que han sido previamente aislados por otros métodos cromatográficos como la cromatografía en columna de poliamida. El tipo de solvente que se utiliza depende mucho de la polaridad del compuesto problema, lo que se ha de comprobar previamente mediante 2D-TLC en celulosa o poliamida. Así por ejemplo, en el caso de tratarse de un flavonoide glicosilado, es conveniente desarrollar la CC de Sephadex con un 25-30% de metanol, mientras que si se trata de un biflavonoide o una aglicona monoflavónica se suele usar al menos un 80% de metanol como disolvente cromatográfico.

Se utilizaron columnas a las que se incorporó un algodón en su base y en las cuales se evitó sobremanera la formación de burbujas de aire que deformaran el frente cromatográfico. Es aconsejable preparar la columna con gel de sephadex y el disolvente a utilizar y dejarla desarrollarse únicamente con él durante un corto tiempo, y no con la muestra problema, de tal manera que la columna se estabilize correctamente, y una vez así no se produzca un desarrollo excesivamente rápido de la cromatografía.

El gel de sephadex se preparó con 6 gramos de sephadex LH-20 y 30 ml de metanol (relación de 1:5). El metanol es generalmente un solvente conveniente para este tipo de columna aunque, algunas veces, puede necesitarse agua al principio del proceso para disolver la mezcla flavonoídica (Markham, 1982). Dicho gel se mantuvo a reposo durante una noche para permitir el embebimiento del sephadex en el metanol. Sobre la columna se eluyó posteriormente una solución suficientemente concentrada de la muestra problema.

Geiger (1990) refiere el uso de acetona:metanol:agua (2:1:1) como un buen solvente para este tipo de columna, especialmente válido para la purificación de biflavonoides. Así mismo, Nilsson & col. (1973), refieren el uso de etanol 80% en vez de la mezcla metanólica usual.

El gel de sephadex puede reciclarse fácilmente con sólo metanol al 100% y un posterior lavado con metanol 80%. Cuando se prepara el gel, es frecuente la formación de grumos que si no son eliminados podrían dar lugar a deformaciones en la columna. Estos fueron fácilmente eliminados mediante un Agitador de Ultrasonidos de Bandelin Sonorex TX 52-H o en ocasiones con el modelo TX 20.

E.2. Columna de poliamida-6 microcristalina de Macherey-Nagel (MN-polyamid SC 6).

Este tipo de cromatografía se usó básicamente como método previo de aislamiento de flavonoides, para posteriomente utilizar otros métodos cromatográficos tales como la columna de sephadex en su purificación. Generalmente es conveniente tras la CC de poliamida realizar una CC de sephadex, aunque hayamos conseguido aislar un único compuesto, pues las fracciones aisladas por CC de poliamida pueden poseer oligómeros procedentes de la ruptura del polímero de poliamida, cuya presencia podría deformar los posibles espectros de RMN o EM que posteriormente realizáramos. Estos pueden, en cambio, eliminarse fácilmente si tras la CC de poliamida se emprende una CC de sephadex que nos ayuda, además, a una completa purificación del compuesto o muestra inical problema.

En cuanto a la metodología hemos seguido básicamente a Seeger (1992) y Salm (1992) (para una columna de 1 l): un vaso de precipitados de 2 l se llena aproximadamente hasta 1 l con poliamida-6 microcristalina, añadiéndose agua destilada hasta conseguir una pasta semilíquida. Tras ello, se deja reposar la poliamida durante 24 h. para permitir el embebimiento de la poliamida en el agua, al cabo de las cuales se debe eliminar el agua sobrante. Se añaden de nuevo algunos ml de agua para suspender restos de poliamida aún no diluídos consiguiendo finalmente una pasta "semilíquida" que puede ya depositarse en la columna cromatográfica. Una vez depositada ésta, se debe abrir la llave inferior de la columna para permitir la salida del agua sobrante, hasta que la columna de poliamida quede estabilizada, sin grietas ni oquedades y con un frente más o menos uniforme. Es importante no dejar dicho frente de desarrollo sin cubrir por el solvente pues la columna se secaría y debería repetirse el proceso al agrietarse ésta. En general, deben dejarse aproximadamente unos 5 cm de solvente por encima del nivel del frente.

Una vez preparada la columna de poliamida, se puede ya depositar en el frente el extracto problema. Este corresponde al que denominamos extracto DMF-acuoso en el proceso de extracción de flavonoides, el cual había sido previamente evaporado hasta aproximadamente 50 ml en rotavapor a no más de 40° C. Esos 50 ml de solución "aceitosa" se mezclan con 100 ml de la pasta semilíquida de poliamida-6 para cromatografía en columna que previamente habíamos preparado, removiendo vigorosamente. Tras ello, se añade agua destilada hasta aproximadamente 1 l total, pues los biflavonoides no son solubles en agua y sí en DMF, y al utilizar agua son capaces de adsorber a la poliamida y permitir su separación a lo largo de la columna cromatográfica, eliminándose el DMF.

Suspendida la poliamida-6 con el extracto flavonoídico, se deposita tal contenido en la columna, procurando en todo momento tener el frente de desarrollo estable. El DMF se eliminará junto al agua y, los flavonoides irán depositándose junto a la poliamida, en forma de partículas de

poliamida, en el frente de la columna. Es conveniente, en cualquier caso, evitar fuentes laterales de frío que ladearían el frente de desarrollo cromatográfico, por lo que es aconsejable recubrir la columna de vidrio con papel de aluminio que la aisle del ambiente exterior.

Una vez eliminada gran parte del agua y DMF por la parte inferior de la columna, y cuando el solvente ésta aproximadamente a unos 2 cm por encima del frente que ya posee las partículas de poliamida con flavonoides, puede irse añadiendo los distintos solventes de elución en orden de apolaridad creciente.

De cada uno de los solvente se utiliza 1 l, pues éste es el volumen de la columna. Siempre se debe añadir el mismo volumen de solvente del que tenga la columna (Salm, 1992).

Geiger (1990) recomienda el uso de un gradiente de acetona:agua, que es el que hemos seguido en nuestra metodología.

Se utilizó basicamente un gradiente acetona:agua desde 1:9 hasta 8:2. En general, y dado que trabajábamos primordialmente con biflavonoides, las subfracciones correspondientes a los solventes acetona 10% hasta 40% se desechaban pues no contenían biflavonoides, excepto en el caso de *Dicranum scoparium* que poseía flavonoides monoméricos en tales fracciones que, también fueron aislados e identificados.

A partir del solvente acetona 50% se comienzan a recolectar fracciones de 100 ml, mediante un colector automático de fracciones (10-20 ml) aunque las subfracciones correspondientes a biflavonoides no aparecen en general hasta el solvente acetona 70%. Cada una de las subfracciones que se van obteniendo es chequeada en TLC monodimensional en el sistema acético 40%/celulosa (aplicación de una sola alicuota de microcapilar de dos microlitros), para comprobar aquellas que poseen o no flavonoides, y cuales pueden o no unirse si poseen el mismo contenido flavonoídico (ver pp. 77-78). Las fracciones con un sólo compuesto pueden purificarse directamente con CC de sephadex, mientras que las que posean 2 ó más pueden volver a pasarse por la CC de poliamida o aún mejor por la CC de sephadex que además de purificarnos la muestra nos separa incluso en nuestro caso los distintos compuestos de cada muestra problema.

Es aconsejable utilizar junto a cada litro de disolvente respectivo un 2% de ácido acético, o bien un 5% de acético únicamente a partir del solvente acetona 80% (p.e. 800 ml de acetona, 150 ml de agua destilada y 50 ml de ácido acético), en compensación de los grupos "amina" de la poliamida.

En general, y aunque hemos afirmado que se utiliza únicamente 1 l de cada solvente, equivalente al mismo volumen de la columna, debemos decir que del último solvente, acetona 80%, no debemos especificar una cantidad determinada a utilizar pues es el solvente con el que mayormente se extraen los biflavonoides. Por ello, se van utilizando distintos litros de acetona 80% hasta que el test en TLC de las subfracciones respectivas nos diga que se puede finalizar el proceso de aislamiento en la columna cuando la concentracción en flavonoides sea muy baja o nula.

La purificación y lavado de la poliamida (Fig. 4.6.) para su reciclado y posterior uso, se puede llevar a cabo con metanol puro o metanol:acetona (1:1). En el caso de ser una poliamida ya muy usada, es conveniente reciclarla además usando también metóxido sódico en el lavado.

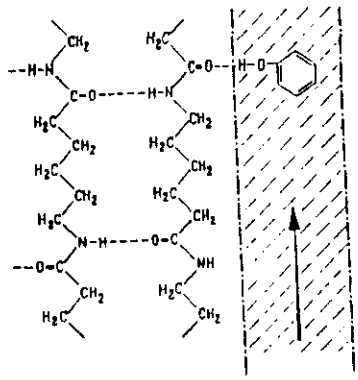


Fig. 4.6.: Esquema detallado de la composición química de la Poliamida-6 en su uso para el aislamiento de compuestos fenólicos.

E.3. Fase Reversa (RP).

La cromatografía en fase reversa (Reverse Phase) es un sistema de cromatografía en columna bastante lipofílico, más aún dependiendo de la cadena de carbonos que se utilize: RP-18 (18 carbonos) o bien RP-8 (8 carbonos). En realidad la RP es una modificación de una típica columna de silicagel generalmente bastante polar, a la que se le añaden cadenas carbonadas de 8 ó 18 carbonos que hacen variar sustancialmente la polaridad de la fase estacionaria, que en el caso de la RP es relativamente apolar. En sí, la RP es es realidad una MPLC (middle precision liquid chromatography). Generalmente este sistema de cromatografía va asociado a una bomba de vacío que facilita enormemente el proceso.

El uso de la RP en la presente Memoria Doctoral se llevó a cabo en dos momentos: a) para eliminar clorofilas del extracto primitivo obtenido en la extracción general con cloroformo, acetona y metanol y, b) para separar los flavonoides ya purificados del disolvente utilizado en la RMN (DMSO-d_6).

Para el primer caso lo normal es utilizar metanol 70% para separar los flavonoides de las clorofilas que se quedan en la superficie de la columna y, posteriormente, usar metanol 100% para desarrollar las clorofilas y limpiar así la columna.

En el segundo caso, el DMSO se puede eliminar fácilmente desarrollando la columna únicamente con agua 3-4 veces, y aislando posteriormente el biflavonoide inicialmente disuelto en DMSO con acetona:agua:metanol (2:1:1).

La columna de RP utilizada fue de RP-18 de 20-45 micras (Fig. 4.7). Inicialmente se mezcló la RP-18 con metanol 100% para hacer la pasta previa, la cual se lavó seguidamente tres veces más con metanol 100% usando una bomba de vacío, de tal manera que se eliminaran posibles contaminantes de la RP tales como partículas de polvo, lípidos y otras clorofilas que pudieran existir. Nuevos lavados se realizaron 3-5 veces con agua únicamente. A continuación se depositó la muestra problema en el frente cromatográfico y posteriormente se utilizaron los disolventese antes comentados.

Cuando se usa asiduamente la columna de RP, es aconsejable su lavado para evitar contaminaciones. Para ello se usa una mezcla cloroformo:metanol (1:1) con un 5% de ácido fosfórico, y posteriormente se realiza un nuevo lavado con metanol 100%.

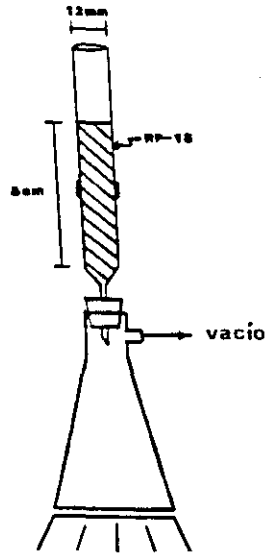


Fig. 4.7.: Diagrama esquemático de una columna de RP-18 usada para recuperar flavonoides del DMSO-d_6 después del análisis por RMN.

En resumen, el **esquema básico de aislamiento y purificación** de los flavonoides identificados en esta Memoria Doctoral por **Cromatografía en columna**, constó básicamente de 2 pasos:

1°. Aislamiento de los compuestos de la mezcla flavonoídica mediante una columna de poliamida-6. Las columnas respectivas se fueron denominando como P1, P2, P3 ...(columnas de poliamida-6 de Machery-Nagel de 1 l de capacidad, 90 cm de longitud y 6 cm de diámetro, con gradiente de acetona:agua desde porcentajes de 1:9 hasta 8:2, siempre añadiendo un 2% de acético. De cada uno de los porcentajes respectivos (1:9, 2:8, 3:7, ... 8:2) se utilizó 1 l excepto en el caso del gradiente 8:2 en que fueron necesarios 6 l de acetona 80%).

2°. Purificación de cada uno de los compuestos aislados en la columna de poliamida-6 mediante columnas de sephadex LH-20, que se denominaron respectivamente como S1, S2, S3 ...(columnas de Sephadex LH-20 de 0.5 l de capacidad, 40 cm de longitud y 3.5 cm de diámetro, utilizando como solvente acetona:metanol:agua (2:1:1) hasta agotamiento del contenido flavonoídico).

En ciertos casos, tras la columna de poliamida-6, se obtuvieron fracciones no totalmente puras, es decir, que contenían uno o más compuestos. En dichas ocasiones, la columna de sephadex correspondiente cumplió una doble función: aislamiento de la mezcla no resuelta por la columna de poliamida-6 y purificación de cada uno de los compuestos que se aislaban.

En la especie *Bartramia stricta*, fue necesario utilizar una columna de Sephadex LH-20 (de 0.5 l de capacidad, 40 cm de longitud y 3.5 cm de diámetro), con solvente metanol 80 % para separar los compuestos triflavonoídicos que aparecían en una misma fracción tras la inicial columna de poliamida y una segunda columna de sephadex con el disolvente habitual..

F.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Durante los últimos años se ha advertido un rápido incremento de la popularidad de este técnica analítica (Markham, 1982). Una adecuada y crítica revisión sobre los conocimientos recogidos en la literatura es expuesta por Pryde & Gilbert (1979).

Básicamente, la HPLC es un tipo de Cromatografía en Columna, que utiliza un material de relleno formado a base de partículas de pequeño tamaño y forma regular. La resolución del HPLC es bastante superior a la de la TLC, aunque los tiempos de retención se mueven en un rango relativamente estrecho cuando se analizan compuestos flavonoídicos.

Dado que el cromatógrafo de HPLC iba acoplado a un detector de diodos, pudimos por su espectro de ultravioleta (UV), distinguir fácilmente diferentes tipos flavonoídicos: 6-OH-flavonas (350 y 285 nm), otros monómeros de flavonas (350 y 270 nm), isoflavonas (261 287sh y 334 sh) y biflavonoides (261 350 nm) (Siegel, 1988; Siegel & col., 1989). Esta técnica ofrece además un método de análisis cuantitativo de los componentes flavonoídicos de una disolución problema, poseyendo un alto nivel de resolución y sensibilidad, incluso con cantidades menores a los 50 ng.

La cromatografía líquida de alta resolución, ha utilizado un variado rango de combinaciones entre el material de empaquetamiento o relleno de la columna y el disolvente. Una excelente revisión de éstas es aportada por Kingston (1979). En el mayor número de los casos, se han utilizado columnas cromatográficas del tipo C-18, que parecen ser las más convenientes en este tipo de análisis, con un material de empaquetamiento de sílice, al que se suele enlazar un hidrocarburo (Markham, 1982).

Los solventes en cambio son mucho más variados: agua/metanol, agua/metanol/acético y agua/acetonitrilo, han sido utilizados sucesivamente para cromatografiar flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, catequinas, antocianidinas y flavonoides glicosilados. Gradientes agua/metanol conteniendo un 3% de ácido fórmico (Markham & col., 1988) o un 5% de ácido acético (Siegel & col., 1989; Siegel, 1988), han sido usados tanto en trabajos analíticos como semipreparativos, en la identificación y aislamiento de biflavonoides (Geiger, 1990; Briançon-Scheid & col., 1982; Stein, 1988b; Siegel, 1988; Siegel & col., 1989).

La habilidad de la cromatografía líquida de alta resolución para resolver mezclas naturales de compuestos flavonoídicos ha sido establecida por Galensa & Hermann (1980), Galensa (1988), Hardin & Stutte (1980), Niemann & Koerselman-Kooy (1977), Niemann (1980), Strack & col. (1979), Briançon-Scheid & col. (1982), Siegel & col. (1989), Becker & col. (1977), Strack & Krause (1978), Wollenweber (1981 y 1982) y Sendra & col. (1988).

En nuestro caso, la metodología empleada es la expuesta por Siegel & col. (1989) y Siegel (1988), junto a las recomendaciones aportadas por Briançon-Scheid & col. (1982), Stein (1988b), Seeger (1992) y Wilschke & Rudolph (1988).

El cromatógrafo de HPLC utilizado es un Hewlett Packard, con un sistema de inyector de bombas serie 1050, con detector de diodos 1040 M serie II (Meier & Sticher, 1986), y columna de nucleosil 120-5 C 18, de 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno. El solvente utilizado fue un gradiente linear agua-metanol desde un 30 a un 70% de metanol durante 40 minutos (Figura 4.8.), con una concentracción constante de ácido acético al 5% y un flujo de 1 ml/min. El agua fue

desionizada y filtrada con un filtro Millipore de 0.45 μm. No es aconsejable utilizar acetona como solvente para HPLC, pues ésta absorbe en el ultravioleta en un rango que llega hasta los 330 nm, por lo que su espectro podría confundirse con el de un flavonoide (Engelhardt, 1977). Los alcoholes en general, absorben por debajo de 200 nm, con lo que no interferirán ni se confundirán, con los espectros correspondientes a flavonoides. Por ello es preferible utilizar metanol (absorbe sobre 210 nm) o etanol en vez de acetona, como solventes para HPLC.

Así mismo, se incorporó un paquete informático, en el que se instaló una "biblioteca" con patrones conocidos de distintos compuestos flavonoídicos, y se estableció un rango de semejanza de 960, como el punto de validez comparativa entre el compuesto problema y el patrón de la biblioteca. Dicho rango de semejanza fue establecido por la casa comercial Hewlett Packard.

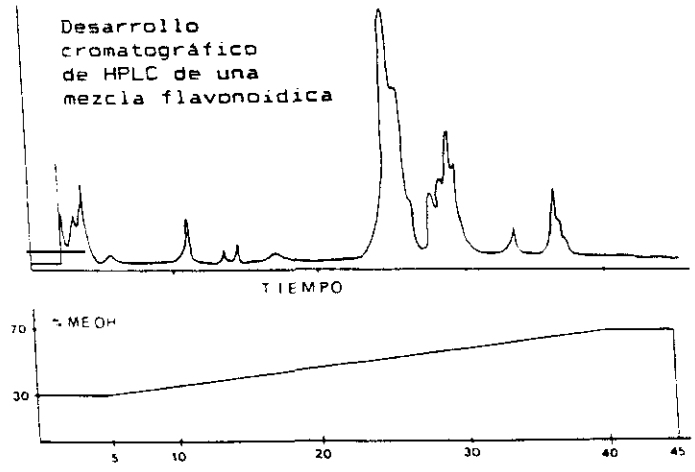


Fig. 4.8.: Metodología de trabajo en HPLC.

4.2.2.2. Espectrofotometría de Ultravioleta

La espectrofotometría de absorción ultravioleta (UV) es tal vez la técnica más asequible y mayormente utilizada en el análisis de la estructura molecular de flavonoides (Markham, 1982). Nos permite, no sólo conocer el tipo estructural flavonoídico, sino también, sus pautas de oxigenación, la localización de azúcares o grupos metilo unidos a los anillos fenólicos.

Los trabajos de Markham & Mabry (1975), Mabry & col. (1970), Jurd (1962), Harborne (1967 y 1984) y Jay & col. (1975) aportan valiosas compilaciones sobre espectros de absorción ultravioleta referentes a flavonoides.

Es una técnica asociada a las transiciones de niveles electrónicos de energía. Corresponde a transiciones energéticas en el intervalo comprendido entre 1200 y 400 mμ. Dichas transiciones se producen entre un orbital enlazante y otro antienlazante, o bien, entre orbitales atómicos y moléculas antienlazantes.

La longitud de onda de la luz absorbida es una medida de la separación de energía entre los

orbitales afectados. Las mayores diferencias de energía se observan cuando se excitan electrones π (120-200 nm), pero esta zona es de poca utilidad práctica. Por encima de los 200 nm la excitación corresponde a electrones de orbitales p, d, π y δ, en especial sistemas conjugados δ, donde se puede predecir mediante las reglas de Woodward, la longitud de onda a que absorberá una determinada conjugación.

El espectro ultravioleta se realiza normalmente sobre una disolución muy diluída de la sustancia a medir. Para conocer la absorción se recurre a la ecuación:

$$\mathbf{lg\ (I_2/I_1) = C\ l_c}$$

siendo $\mathbf{I_1}$ e $\mathbf{I_2}$ las intensidades de la luz emitida y absorbida, **l** la longitud en cm que ha de recorrer el rayo incidente en la solución absorbente y C el coeficiente de extinción molar en moles por cm^3.

Las medidas han sido realizadas en dos espectrofotómetros de ultravioleta-visible: en primer lugar en un Perkin Elmer modelo Hitachi 200 y en segundo lugar en un UV-160 A Recording Spectrophotometer de Shimadzu, provistos de una lámpara de Deuterio para las medidas en el ultravioleta, que se realizaron básicamente entre los rangos de 185 a 380 nm y 210 a 440 nm en otras ocasiones. El espectro obtenido se obtuvo en un registrador Hitachi 200. La velocidad de barrido fue de 60 nm/minuto, idéntica a la carta del registrador, de forma que el espectro registrado cada cm equivale a 10 nm.

Se realizaron básicamente dos tipos de medida: por un lado medimos la longitud de onda máxima y por otro, la intensidad (I), que nos mostraron el comportamiento U.V.-VIS del compuesto problema frente a los reactivos usuales en este tipo de análisis (Harborne, 1984; Markham, 1982; Markham & Mabry, 1968; Mabry & col., 1970; Wolfbeis & col., 1984): metóxido sódico, tricloruro de aluminio, ácido bórico, ácido clorhídrico y acetato sódico. La adición de cada uno de estos reactivos se verá reflejada en el espectro mediante dos posibles tipos de efectos:

a) efecto batocrómico: aumento de la longitud de onda máxima.
b) efecto ipsocrómico: disminución de la longitud de onda máxima.

El espectro típico consiste en dos absorciones máximas en los rangos 240-285 nm (banda II) y 300-550 (banda I) (Tabla 4.1.), que en la mayoría de tipos flavonoídicos equivale a un patrón de oxigenación 5,7,4' (Markham, 1982).

Las distintas variaciones en la absorción en el espectro para los dos rangos antes definidos, vendrán dadas por los patrones de hidroxilación y el grado de subtitución de dichos hidroxilos. Se pueden, en este sentido, establecer algunas generalidades (Baker & col., 1963; Markham, 1982):
- Cambios en la sustitución del anillo A quedan reflejados en la absorción de la banda II, mientras que alteraciones en la sustitución en los anillos B y C tienden a ser más aparentes en la absorción en la banda I (ver Fig. 3.6. pp. 21).
- Metilaciones o glicosilaciones (especialmente de los hidroxilos 3,5,7 y 4') son causa de cambios cortos en las oscilaciones del espectro, sin, al parecer, ser importante la naturaleza del azúcar del glicósido.

- Oxigenaciones adicionales, especialmente hidroxilaciones, generan cambios en la absorción del espectro que suponen una larga oscilación de éste, por ejemplo, en la banda I las 3,5,7-triOH flavonas absorben a 359 nm, las 3,5,7,4'-OH flavonas a 367 nm, las 3,5,7,3',4'-OH flavonas a 370 nm y, las 3,5,7,3',4',5'-OH flavonas a 374 nm.

BII(nm)	BI (nm)	Flavonoides tipo
250-280	310-350	Flavonas
250-270	330-350	Biflavonoides
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH sustituído)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas
	320	Isoflavonas (5-deoxy-6,7-dioxy)
275-295	300-330	Flavanonas y dihidroflavonoles
230-270	340-390	Chalconas
230-270	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianinas y antocianidinas

Tabla 4.1.: Rangos de absorción ultravioleta para los principales tipos de flavonoides (Markham, 1982; Harborne, 1984).

La preparación de los reactivos se realizó de acuerdo a Mabry & col. (1970) y Markham (1982). Se usó como "blanco" metanol.

Después de la medida del espectro en metanol, se añadieron 3 gotas de metóxido sódico y se registró el nuevo espectro, así como el espectro producido a los 5 minutos, tras la descomposición del metóxido sódico.

Registrados los 3 espectros, se procedió al lavado exhaustivo de la cubeta donde se deposita la solución problema (1 x 1 cm de base y 2 cm de altura, 2 ml de volumen) y se realizó el mismo proceso, registrando otra vez el espectro en metanol, añadiendo 6 gotas de tricloruro de aluminio y registrando el espectro, y posteriormente sin eliminar el $AlCl_3$, se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico y se registró el nuevo espectro.

Finalmente, tras un nuevo lavado y espectro base en metanol, se añadió a la cubeta una solución de acetato sódico que alcanzó 2 mm de altura, resgistrándose el espectro producido y, en esa misma solución, posteriormente, se añadió hasta 1 mm más, una solución de ácido bórico y se registró el espectro final.

Debemos reseñar, que la espectrofotometría de ultravioleta no es una buena técnica analítica de identificación de biflavonoides y/o triflavonoides, sobre todo cuando estos están doblemente unidos (biflavonoides o triflavonoides macrocíclicos), ya que en este tipo de compuestos macrocíclicos se pierde la polaridad de la molécula y, por tanto, varía notablemente la respuesta del cromóforo frente a los reactivos usuales de la espectrofotometría de ultravioleta.

Si un biflavonoide está formado por dos unidades monoflavonoídicas iguales, por ejemplo dos luteolinas en una biluteolina, esta técnica en cambio si es realmente válida, pues la respuesta de ambos monómeros es la misma y se pueden deducir algunos resultados acerca de su posible estructura.

En el caso de los biflavonoides formados por dos monómeros flavonoídicos distintos, por

ejemplo una flavona y una flavanona, los resultados obtenidos por la espectrofotometría de ultravioleta provendrán de ambos monómeros, y en realidad se tratará de una mezcla de las respuestas procedentes de cada uno de ellos, por lo que no se pueden otorgar con rotundidad a ninguno de los dos monómeros en concreto. Por ello, el uso de la espectrofotometría de ultravioleta en la identificación y elucidación de estructuras flavonoídicas correspondientes a biflavonoides y triflavonoides, debe ser tratada con mucho cuidado.

4.2.2.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El uso de la RMN en la identificación de flavonoides es notable en la actualidad, no revistiendo mayor problema en el caso de los biflavonoides (Geiger, 1990).

No queremos, sin embargo, extendernos demasiado en la explicación de esta técnica analítica, por existir publicaciones al respecto suficientemente contrastadas, algunas de ellas específicas de biflavonoides (Mabry & col., 1970; Agrawal, 1989; Markham & col., 1982 y 1987; Agrawal & Rastogi, 1981; Chari & col., 1977; Kalinowski & col., 1984; Markham & Mabry, 1975; Schilling, 1985; Günther, 1983; Clark, 1987; Markham & Geiger, 1993; Geiger & col., 1993a).

No obstante, hemos creído adecuado el presentar algunos puntos concernientes a los dos tipos de resonancia magnética nuclear utilizados: ^{1}H RMN y ^{13}C RMN.

En general, la metodología seguida es la que se relaciona en el Anexo 2, desde un punto de vista comparativo, para cada uno de los compuestos identificados en este trabajo, junto a la bibliografía antes reseñada.

A. ^{1}H RMN. Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

Entre las aplicaciones típicas de esta técnica en la elucidación de flavonoides se encuentran: la definición del patrón de oxigenación de los tres anillos del flavonoide; la determinación del número y posición de los grupos metoxilo; la distinción entre isoflavonas, flavanonas y dihidroflavonoles; la determinación del número de azúcares presentes y si están α o ß unidos y, finalmente, la detección de cadenas laterales hidrocarbonadas tales como metilos o prenilos C- u O- unidos (Markham, 1982).

El espectro de ^{1}H RMN aparece predominantemente en el rango de 0-10 p.p.m., tomando como señal de referencia la del tetrametilsilano (TMS), arbritariamente definida como 0 p.p.m. Sólamente los protones producen señales (resonancia) en este rango y, protones químicamente idénticos son representados por la misma señal. El tamaño de ésta (integral) es proporcional al número de protones que representa. Así por ejemplo, una señal que representa un grupo $-OCH_3$ (metoxilo) integrará tres veces el valor de la señal que representa un solo protón (Markham, 1982). La posición de la señal en la escala 0-10 p.p.m., denominada "**desplazamiento químico**" define hasta cierto punto el tipo de protón que representa. Los protones correspondientes a los anillos A y B aromáticos del flavonoide aparecen representados en los valores 6.0-8.0 de la escala antes definida (ver Fig. 3.6. pp. 21).

En general, la cantidad de muestra requerida para esta técnica es mínima (5-25 mg), aunque

depende mucho del espectrómetro de trabajo. Una relación de los solventes más comunes utilizados es aportada por Markham (1982). Entre ellos, destacamos básicamente dos: el DMSO-d_6 (hexadeuterodimetil sulfóxido) utilizado en nuestra investigación, que es un buen solvente para agliconas y glicósidos flavonoídicos; y tiene la ventaja de que en condiciones anormales, permite la detección de las señales correspondientes a los protones de los grupos -OH (Clark, 1987) y, por otra parte, el CCl_4-TMS éter que, básicamente, consiste en convertir los flavonoides en sus trimetilsilil (TMS) éter derivados, solubles en CCl_4 (tetracloruro de carbono), realizándose el espectro sin problemas. Así mismo, este segundo solvente cuenta con la ventaja añadida de existir un largo número de espectros comparativos de flavonoides TMS-éteres (Mabry & col., 1970). Un estudio contrastado y comparativo entre el uso de ambos solventes es expuesto por Clark (1987) y parcialmente por Mabry & col. (1970).

De manera general podemos afirmar que el espectro de RMN de protón de los biflavonoides, se caracteriza por la existencia de dos picos sobre 13 ppm, y de uno sobre 12 ppm y otro sobre 13 ppm en el caso de los 2,3-dihidrobiflavonoides (Seeger, 1992). En el caso de los triflavonoides, generalmente aparecen 3 picos sobre 13 ppm (Seeger, 1992; Voigt, 1993). Estos picos que aparecen generalmente sobre 12-13 ppm corresponden a la señal del protón en posición 5 del grupo hidroxilo de una luteolina, ya que se establece un puente de hidrógeno entre este hidroxilo del anillo A y el correspondiente oxígeno en posición 4 del anillo C. La presencia de un sólo pico sobre 12 ppm indicaría que se trata de un flavonoide monomérico derivado de la luteolina. En el caso de los biflavonoides aparecen dos picos o señales sobre 12-13 ppm lo que nos indica la existencia de dos grupos hidroxilos libres en posición 5 en cada uno de los monómeros del biflavonoide. El pico existente en 5.4 ppm es típico del eriodictiol y, por lo tanto aparece en los biflavonoides con una unidad monomérica de flavanona. Las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C generalmente se sitúan entre 6.1 y 6.7 ppm, mientras que los del anillo B llegan incluso a 9 ppm. Los protones del anillo heterocíclico, es decir del C, aparecen generalmente por debajo de 5.5 ppm. Así por ejemplo, y refiriéndonos a los protones del anillo B, se da el caso de que cuando éstos se encuentran sobre carbonos simétricos y no son hidroxílicos, caso de los protones en 3' y 5' ó de 2' y 6', las señales que aparecen son las mismas, por lo que los protones en 3'-5' ó 2'-6' aparecen en el espectro como sendos dobletes, generalmente sobre 7.0 ppm (J= 8 Herzios) (ver Fig. 3.6. pp. 21).

Los protones en C-6 y C-8 de flavonas, flavonoles e isoflavonas que cuentan con el típico patrón de sustitución 5,7-dihidroxi- quedan reflejados en el espectro de RMN por dos dobletes (J= 2.5 Hz) en el rango 6.0-6.5 ppm. El doblete para H-6 aparece a valores de ppm más bajos que la señal para H-8, debido al fuerte apantallamiento del oxígeno próximo al C-8.

En flavanonas (algunos biflavonoides identificados en la presente Memoria Doctoral están constituídos por un monómero de flavanona) y dihidroflavanonas con 5,7-dihidroxi- sustitución como patrón, las señales para los protones del anillo A están situados a mayor rango (valores de ppm más bajos) que los correspondientes para flavonas y flavonoles (ver Fig. 3.7. pp. 22).

El único protón en el núcleo flavonoídico que ofrece una señal en la misma región del espectro que los protones en C-6 y C-8 de 5,7-dihidroxi- flavonas y flavanonas es el protón en C-3 de flavonas, que aparece como un singlete cerca de 6.3 ppm. Ocasionalmente sin embargo, los protones en C-3' y C-5' dan señales que también aparecen en esta región del espectro.

En flavonas con patrón 5,7-dihidroxilación los protones en C-6 y C-8 aparecen como dobletes (J= 2.5 Hz) y se distinguen bien del singlete del protón en C-3. Sin embargo, muchas flavonas tienen por ejemplo un único protón en el anillo A (p.e. 5,6,7,- ó 5,7,8- con patrón de sustitución) y en estos compuestos el único protón del anillo A produce un singlete que está a menudo en la misma región del espectro que la señal para el protón de C-3 (ver Fig. 3.6. pp. 21).

En los flavonoides 3',4'-oxigenados, tales como la luteolina y sus derivados (biluteolinas) con 3',4'-diOH, el espectro resultante de los protones del anillo B es algo más complejo que en los flavonoides únicamente 4'-oxigenados. El protón en C-5'de flavonas y flavonoles 3',4'-oxigenados aparece como un doblete entre 6.7-7.1 ppm (J= 8.5 Hz), y las señales para los protones en C-2' y C-6' sobre 7.2-7.9 ppm. Las posiciones relativas de las señales para los protones en C-2'y C-6' pueden usarse para distinguir los 3'-metoxi-4'-hidroxi- de los 4'-metoxi-3'-hidroxi sustituídos en el anillo B de flavonoles, debido a los diferentes efectos de apantallamiento existentes de los grupos OH- o metoxi- (ver Fig. 3.6. pp. 21).

Diferentes patrones espectrales son observados para isoflavonas, flavanonas y dihidroflavanonas 3',4'-oxigenadas. Estos compuestos muestran un complejo multiplete (usualmente 2 picos), para los protones en C-2', C-5' y C-6' en la región 6.7-7.1 ppm. Los cambios químicos para los protones del anillo B en estos flavonoides dependen claramente de si el protón está situado en posición orto- o para- respecto de una función oxígeno. En flavanonas 3',4'-dioxigenadas, alguno de cuyos ejemplos se presentan en los biflavonoides identificados en la presente Memoria Doctoral, los protones en C-2', C-5' y C-6' están en orto- o para- respecto del oxígeno sustituído y tienen por ello un desplazamiento químico similar (ver Fig. 3.7. pp. 22).

En los protones del anillo C existe una considerable variación en los desplazamientos químicos que se producen para los protones según el tipo de flavonoide que se trate. En todo caso, el espectro resultante dependerá del nivel de oxidación del anillo C. El protón en C-3 de flavonas muestra un singlete cerca de 6.3 ppm que usualmente se solapa con la señal producida por los protones del anillo A.

La señal para el protón en C-2 de flavanonas aparece como un doble doblete (dd) o a veces como un cuadruplete (q) con J_{cis}=5 Hz y J_{trans}=11 Hz, cerca de 5.2. ppm como resultado del acoplamiento del protón en C-2 con los 2 protones de C-3. Los protones de C-3 se acoplan cada uno con los demás (J=17 Hz) en adición a la interacción spin-spin que ocurre con el protón en C-2. Los protones en C-3 aparecerán como dobles dobletes (dd) cerca de 2.8 ppm

La señal correspondiente al solvente, el DMSO-d_6, aparece normalmente sobre 2.6 ppm, por lo que no interfiere en la interpretación del resto del espectro.

Las medidas del espectro de ^{1}H RMN se realizaron en un aparato Bruker AM 400 con una frecuencia de 400 MHz, a 25 ^{o} C. (temperatura ambiente) tomando como solvente de referencia el DMSO-d_6, siguiendo en todo momento las indicaciones de Salm (1992), Seeger (1992) y Voigt (1993).

Así mismo, se realizaron espectros COSY (Correlated Spectroscopy) de ^{1}H-^{1}H y ^{1}H-^{13}C de los Compuestos BP-1, BS-5A y BS-3 a 200 MHz de frecuencia y temperatura ambiente, en una aparato Bruker AM 400, con DMSO-d_6 como solvente de referencia (Geiger & col., 1993a). Los espectros COSY nos permiten establecer el acoplamiento existente entre los protones de una

determinada molécula (^{1}H-^{1}H COSY), así como poder asignar ciertos protones a sus respectivos carbonos (^{1}H-^{13}C COSY). La estructura de los biflavonoides puede deducirse en la mayoría de los casos por sus espectros de ^{1}H RMN y ^{13}C RMN, si existen asignamientos completos en la bibliografía, referentes a los monómeros que componen el biflavonoide. Sin embargo, esta posibilidad no siempre se produce, y en en el caso de los biflavonoides de musgos es frecuente. Es entonces, cuando se hace necesario establecer una correlación entre los espectros de ^{1}H RMN y ^{13}C RMN, que nos permita asignar todas las señales registradas. Esta correlación se puede lograr mediante las técnicas de correlación C-H y H-H (COSY). Con el descubrimiento reciente de los triflavonoides en musgos, este tipo de técnicas analíticas supone una ayuda adicional e imprescindible en la elucidación estructural de tales compuestos (Geiger & col., 1993a).

B. ^{13}C RMN. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13.

La Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C en el caso de los flavonoides, se aplica para el establecimiento del número total de átomos de carbono de la molécula, tanto de los carbonos oxigenados en el núcleo flavonoídico como del número de carbonos en el azúcar si éste lo hubiere; para la identificación de las uniones C- y O- por azúcares; en la determinación de los puntos de unión interglicosídicos; para la identificación de los acil sustituyentes y el lugar de acilación, y finalmente, en la determinación del lugar donde se presentan C-uniones (p.e. en C-glicósidos, biflavonoides, etc.) (Agrawal, 1989; Markham, 1982).

La abundancia natural del isótopo ^{13}C es sólo del 1.1 %. La resonancia de ^{13}C ocurre predominantemente en el rango 0-200 p.p.m. respecto del tetrametilsilano (TMS), pudiendo cada carbono representar una señal diferente. En contraste con la resonancia de protón, la intensidad de la resonancia de ^{13}C no necesariamente refleja el número de carbonos que representa y, por ello, la integración del espectro de ^{13}C es raramente de valor.

En general, ambos tipos de RMN deben usarse conjuntamente para obtener resultados más acordes y con mayor facilidad (Geiger, 1990; Geiger & col., 1993a). Agrawal (1989), Chari & col. (1977) y Markham & col. (1982 y 1987) ofrecen un gran número de espectros de ^{13}C RMN de referencia, como punto de comparación para numerosos estudios.

La cantidad de muestra necesaria es igualmente pequeña, aunque algo mayor que para la resonancia de protón, pues basta con 20-50 mg (Geiger, 1990). Los solventes utilizados en general son los mismos que en la RMN de protón (Clark, 1987).

Centrándonos en los biflavonoides, debemos decir que la mayoría de ellos cuentan con uniones carbono-carbono entre sus dos monómeros flavonoídicos, con el anillo A de uno de ellos al menos implicado generalmente en el enlace interflavonoídico (Geiger & Quinn, 1975; Chari & col., 1977).

La Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C permite establecer la estructura química de los biflavonoides, así como de los átomos de carbono implicados en el enlace interflavonoídico (Agrawal, 1989). En el biflavonoide, los cambios químicos que se producen en las señales de los carbonos implicados en el enlace interflavonoídico, respecto a sus unidades monoméricas, suponen señales

situadas en un campo más bajo, es decir, valores de ppm más altos, aunque en general y en el resto de carbonos no se producen cambios químicos considerables.

Así por ejemplo, algunas biflavanonas derivadas de la naringenina, tales como la binaringenina, poseen uniones C-C entre dos unidades de naringenina que pueden estar α o β orientadas. Debido a la unión interflavonoídica, la resonancia de C-3 se muestra entre 46.8 y 51.2 ppm, es decir, entre 3-7 ppm más altas respecto a la unidad monomérica de naringenina. Los cambios químicos en C-2 y C-3 dependen en sí de la orientación del grupo fenilo respecto de C-2 y del tipo de enlace interflavanónico de que se trate.

Excepto la sikokianina A, el resto de biflavanonas muestran 13 señales en su espectro de resonancia de ^{13}C debido a la superimposición de las señales correspondientes a las unidades monoméricas. Las señales correspondientes a C-2 y C-3 de ambos monómeros tienen una absorción diferente e independientes a 81.3-83.1 y 49.4-50.8 ppm en biflavanonas con geometría cis-trans para C-2/C-3 y C-2''/C-3 '' (Agrawal, 1989).

En el caso de las flavanoflavanonas, es decir, biflavonoides formados por una unidad monomérica de flavona y otra de flavanona, los espectros de ^{13}C resultantes son sumamente variados dependiendo de la naturaleza química de ambos monómeros. Agrawal (1989) sumariza numerosos ejemplos al respecto de los cambios químicos que se producen en los diversos subtipos de flavanoflavanonas así como de otros biflavonoides (ver Fig. 3.7. pp. 22).

Respecto a las biflavonas, biflavonoides cuyas dos unidades monoméricas son flavonas, ocurre lo mismo que en el caso anterior, ya que las posibilidades de unión interflavonoídica son variadísimas. Así por ejemplo, la señal correspondiente a los átomos de carbono implicados en el enlace interflavonoídico en la agatisflavona (8,6''-biapigenina) y en la cupresoflavona (8,8''-biapigenina), aparece sobre 103.6 y 99.4 ppm en la agatisflavona y 98.7 ppm en la cupresoflavona. La resonancia para C-8 de ambas unidades monoméricas de flavona en los casos descritos, se muestra a 100.0 y 102.0 en el caso de la 4,4'''-diO-metil-cupresoflavona.

Otra subcategoría de biflavonas poseen uniones C-C entre los carbonos C-5' ó C-6' de una flavona y C-6 ó C-8 de la otra unidad de flavona. En este grupo de biflavonas se encuentran la robustaflavona (identificada en *Selaginella* spp. por López-Sáez & col., 1994 a, b y c) y la 5',3'''-diOH-robustaflavona (identificada en musgos, ver Anexo 2) que pertenecen al tipo de unión interflavonoídica 5'-6''. La señal correspondiente al carbono C-5' en ambos compuestos absorbe a 120.8 y 120.2 ppm respectivamente (Agrawal, 1989). La señal para C-6 aparece sobre 103.5 ppm en la robustaflavona y sobre 108.9 en la 5',3'''-diOH-robustaflavona (Agrawal, 1989).

Por su parte, la amentoflavona y la 5',3'''-diOH-amentoflavona (5',8''-biluteolina) son biflavonas que presentan una unión interflavonoídica del tipo 5'-8''. Las señales de resonancia para C-5' y C-8'' aparecen a 123.1, 105.2 y 123.7 y 105.3 respectivamente (Geiger & col., 1987). La señal para C-5' en la 5',8''-biluteolina, aislada e identificada en musgos, absorbe a 120.6 ppm (Österdahl, 1983; Geiger & col., 1987). Una comparación entre los cambios químicos ocurridos en las señales correspondientes a los carbonos del anillo B de dichas biflavonas, con respecto a sus unidades monoméricas de referencia, revela un aumento en los valores de ppm del orden de 3-5 ppm para C-5' debido al efecto del enlace interflavonoídico (Agrawal, 1989) (ver Fig. 3.7. pp. 22).

Unicamente hemos pretendido mostrar algunas de las características fundamentales que

muestra la RMN de ^{13}C de los biflavonoides, de ahí que hayamos elegido el centrarnos en los derivados de amentoflavona y robustaflavona, por ser éstos los que básicamente se presentan y se han identificado en musgos.

Para finalizar, diremos que las medidas del espectro de ^{13}C RMN se realizaron en un aparato Bruker AM 400 con una frecuencia de 100 MHz, a 25° C (temperatura ambiente) usando como solvente el DMSO-d_6, siguiendo en todo momento las indicaciones de Salm (1992), Seeger (1992) y Voigt (1993).

Del Compuesto BS-5A se realizó además un espectro DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) en un aparato Bruker Gerät a 200 MHz de frecuencia usando el solvente DMSO-d_6, a temperatura ambiente. Este tipo de espectro permite distinguir el tipo de carbono (cuaternario, terciario, secundario o primario) que estamos estudiando, desdoblando las señales respectivas a cada tipo de carbono respecto del espectro general.

4.2.2.4. Espectrometría de Masas (E.M.)

El empleo de la EM como técnica analítica es de reciente introducción, ya que es a partir de 1960 cuando se establecen sus pautas de utilización, habiendo revolucionado las investigaciones en el campo de los productos naturales a partir de ese momento (Harborne, 1984). El valor de esta técnica es que únicamente requiere microgramos de la muestra problema para llevarse a cabo (Harborne, 1984; Markham, 1982).

En esencia, nos permite determinar el peso molecular, establecer la distribución de los sustituyentes en ambos anillos A y B del flavonoide y determinar la naturaleza y lugar de unión de los azúcares en los flavonoides C- y O- glicosilados (Markham, 1982).

Un espectro de masas de un flavonoide consiste en una serie de señales, cada una de las cuales representa un fragmento cargado procedente del flavonoide "inicial" o "problema", siendo el espectro el resultado de un impacto de electrones originado con el espectrómetro.

Las señales son expuestas en una serie de líneas sobre un papel cuadriculado o bien de forma numérica, y ordenadas acorde a los valores de m/z (peso molecular por unidad de carga) de los fragmentos que representan.

En el espectro de masas, la intensidad de la señal es proporcional a los niveles de carga individual de los fragmentos producidos por el impacto electrónico.

La señal de mayor intensidad es el pico base, asignándosele el 100% de intensidad, estando el resto de señales referidas porcentualmente respecto de ésta.

Markham (1982), Mabry & Markham (1975), Harborne (1984), Audier (1966), Domon & Hostettmann (1985), Howe & Jarman (1985), Schröder (1991), Wollenweber & Dietz (1979) y Geiger & Schwinger (1980), aportan suficiente bibliografía sobre la metodología a seguir con esta técnica en el caso de los flavonoides, así como la interpretación de sus espectros.

En nuestro trabajo nos hemos basado metodológicamente en las referencias anteriores y en la expuestas en el Anexo 2 para cada compuesto en particular desde un punto de vista comparativo.

De acuerdo a Geiger (com. per.) el EM de impacto de electrones no es tan exacto para los

biflavonoides como el FAB modus (Fast Atom Bombardment con átomos de xenon) de ahí que optáramos por el segundo método (Fenselau, 1984). La técnica FAB-EM permite, a diferencia de la EM por impacto de electrones, poder analizar mediante espectrometría de masas isótopos estables y, cuantificar y cualificar la mezcla de ellos.

En esencia, la técnica FAB consiste en que la muestra es presentada en una matriz líquida de baja volatilidad, que es "bombardeada" mediante un flujo relativamente alto de partículas neutras tales como átomos de argon o xenon (Fig. 4.9. y 4.10.).

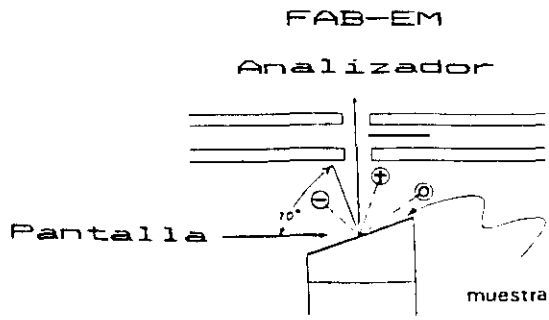


Fig. 4.9.: Esquema de la técnica FAB-EM.

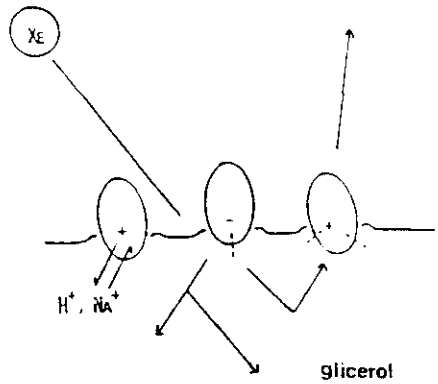


Fig. 4.10.: Representación esquemática de la matriz líquida.

Los espectros de masas se realizaron en un aparato MAT 90 de Fa. Finnigan, en Modo Negativo ("Negative Modus") excepto para BP-1 que también se utilizó el Modo Positivo, siguiendo las indicaciones de Domon & Hostettman (1985), Fenselau (1984), Seeger (1992) y Salm (1992), mediante el método de ionización FAB realizado sobre una matriz de glicerina o de glicerina-metanol con xenon (1-5 μl, FAB-Target, 4-8 KeV) (Schröder, 1991). En el modo positivo, cada señal representa $[M + H]^+$, mientras que en el modo negativo es $[M - H]^-$ (Fenselau, 1984).

En el caso del Compuesto BS-3 (Compuesto X), las medidas se realizaron sobre un Analizador de Masas de Laser Micropore (LAMMA) sobre una matriz de ácido nicotinamídico (Voigt, 1993). La pobre solubilidad del Compuesto X en los solventes más comunes, incluso en el

DMSO-d_6, nos impidió obtener el espectro de masas (FAB-MS) correspondiente en las matrices de trabajo usuales (glicerina o glicerina-metanol). Por ello, y de acuerdo a lo expuesto por Seeger & col. (1993b) utilizamos para el Compuesto X una matriz sólida de ácido nicotinamídico, obteniendo el espectro de masas correspondiente en un analizador de masas bajo un modo diferente, mediante ionización inducida por laser (LAMMA-espectro).

4.2.2.5. Hidrólisis Acida

La hidrólisis ácida permite romper los flavonoides-O-glicósidos por el enlace glicosídico establecido entre el flavonoide y la molécula de azúcar. El tiempo que tarda en ocurrir la hidrólisis en cada glicósido depende estrechamente de la naturaleza del/los azucar/es que lleva unido. Así se establece un orden de más a menos tiempo de ocurrencia de la hidrólisis, según el azúcar sea el glucurónido » glucósido = galactósido » rhamnósido. Los flavonoides C-glicosilados no se hidrolizan con esta técnica. La metodología seguida es básicamente la aportada por Markham (1982) y McClure & Miller (1967).

Se realizó sobre la muestra del Compuesto VI, previamente aislado y purificado (10 mg). Los 10 mg del compuesto problema (Compuesto VI) se disolvieron en 30 ml de ácido clorhídrico 2 N (preparado con 5,8 ml de ClH 10.5 N y 24,2 ml de H_2O), y se añadieron unas gotas de metanol para facilitar la disolución. A continuación dicha solución se sometió primeramente a una hidrólisis en caliente de 2 horas, a reflujo, y trascurridas éstas, se extrajeron pequeñas alicuotas para cromatografiarlas en TLC. Estas, fueron previamente disueltas en un mismo volumen de éter etílico para remover el agua. La fase acuosa fue eliminada, mientras que la etérea (una vez eliminado todo el agua restante con SO_4Na_2) se llevó a sequedad y disolvió en unas gotas de metanol 80% y se cromatografió. La misma solución inicial, sin retirarla de la fuente de calor, permaneció otras 2 horas a reflujo, hasta un total de 4 horas de duración de la hidrólisis, tras lo cual se extrajeron igualmente nuevas alicuotas, con las que se siguió el procedimiento antes descrito, siendo posteriormente cromatografiada la fase etérea correspondiente a la hidrólisis a las 4 horas.

Las dos submuestras así obtenidas: H-2 (procedente de la hidrólisis a las 2 horas) y H-4 (hidrólisis a las 4 horas) fueron posteriormente cromatografiadas en TLC en los sistemas cromatográficos acético 15%-celulosa y TBA-celulosa en mono y bidimensional (ver pp. 136-137).

De acuerdo a Markham (1982):

- Si la hidrólisis ha ocurrido, se deberá observar una reducción del Rf, si se trata de un flavonoide O-glicósido, o menos comúnmente, si está bisulfatado o se trata de un O-glicosilado-C-glicósido.
- En caso de no producirse hidrólisis, el glicósido es un C-glicósido o posiblemente el azúcar sea un glucurónido. Bien puede darse el caso de que el flavonoide no esté glicosilado, con lo que tampoco debería producirse hidrólisis.
- Si la hidrólisis es parcial, es muy posible que el azúcar sea un glucurónido, ya que como antes se ha indicado, son los flavonoides que se glicosilan con dicho azúcar los que necesitan mayor tiempo de hidrólisis. Por ello, habría moléculas totalmente hidrolizadas y otras no, de ahí que la hidrólisis sería parcial.

4.3. Actividad Biológica

Se realizaron ensayos de actividad biológica, concretamente anti-VIH, de los compuestos previamente identificados en esta Memoria Doctoral, de los que se dispuso de cantidad suficiente (Tabla 4.2.). Seguimos el método descrito por Lee & col. (1981), así como las referencias y recomendaciones aportadas por Banerjee & Sen (1979), Van Hoof & col. (1980 y 1981), Zehr (1990) y Ieven & col. (1979) respecto a actividad antifúngica y antibacteriana; y Vanden Berghe & col. (1978 y 1986), más las indicaciones propuestas por Van Hoof & col. (1980 y 1981), para la actividad antivírica. Debido a que el método propuesto por los anteriores autores se refería principalmente a ensayos contra los virus de la polio y herpes, creímos conveniente, dado que tratábamos con el virus del SIDA, introducir ciertas modificaciones metodológicas de acuerdo a los postulados de Biotech Research Laboratories (Dr. Lee, com. per.). Así mismo, se utilizaron en los ensayos otros flavonoides monoméricos y biflavonoides, que tomamos como patrones de referencia, por lo general también aislados de musgos, pero de familias botánicas distintas a la que es objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. De esta manera, tales compuestos nos sirvieron como punto de comparación para delimitar la importancia de la estructura química en la actividad biológica correspondiente (Selway, 1986) y, a su vez, por existir en ciertos casos referencias bibliográficas concernientes a ellos, contribuyeron a completar profundamente el estudio de actividad biológica emprendido, dada además la gran escasez de investigaciones en este sentido existentes.

Tabla 4.2.: Relación de Compuestos en los que se ensayo actividad anti-VIH.

	MUESTRA	PROCEDENCIA
1	Filonotisflavona	*Bartramia pomiformis*
2	5',3'''-*diOH-robustaflavona*	*Bartramia halleriana*
3	Dicranolomina	*Bartramia stricta*
4	2,3-dihidro-filonotisflavona	*Bartramia ithyphylla*
5	Bartramiaflavona	*Bartramia pomiformis*
6	5',3'''-diOH-amentoflavona	*Bartramia stricta*
7	Ciclo-Triluteolina	*Bartramia stricta*
8	Amentoflavona	*Selaginella denticulata*
9	Saponarina	*Plagiomnium cuspidatum*
10	Quercetina	Patrón Comercial
11	*Luteolina-7-O-neohesperidosido*	*Dicranum scoparium*
12	Lucenina-2	*Hedwigia ciliata*
13	Apigenina-7-O-triglicósido	*Dicranum scoparium*
14	Isoorientina-3'-O-soforósido	*Plagiomnium cuspidatum*
15	Eriodictiol	Patrón Comercial

En todos los casos, se necesitaron siempre **10 mg** de partida de cada una de las muestras puras, aisladas de musgos o de procedencia comercial (Fa. Roth., Alemania), en los ensayos anti-VIH, que posteriormente fueron ensayadas a diversas concentracciones.

Numerosos flavonoides de origen natural poseen actividad antiviral (Beladi & col., 1965 y 1977; Borel & col., 1976; Cutting & col., 1949 y 1953; Guttner & col., 1982; Selway, 1986), y su existencia y funcionalidad se conoce desde hace más de 40 años. En estos últimos años, el desarrollo de una quimioterapia viral evolucionada, camina en pos de la síntesis en laboratorio de estructuras flavonoídicas, con una actividad antiviral superior a la de los flavonoides de origen natural. Chalconas, flavanos y flavonas son por el momento los flavonoides básicos en los que se están intentando conseguir derivados sintéticos activos contra virus (Van Hoof & col., 1984a y b; Selway, 1986). Por el momento no se conoce actividad anti-VIH de chalconas ni flavonas, pero si se sabe de ciertos flavanos activos contra algunos serotipos rinovirales *in vitro* (Bauer & col., 1981) así como de la actividad antivírica de otros tipos flavonoídicos (Vanden Berghe & col., 1986; Veckenstedt & Pusztai, 1981; Vrijsen & col., 1984).

Para poder establecer un punto de comparación entre nuestras muestras y otros tratamientos ya iniciados contra el SIDA, se utilizó como patrón de referencia el **DDC** o **ddC**, ya que éste es el que usan los Biotech R. Laboratories, quienes realizaron los ensayos anti-VIH a partir de las muestras aisladas en la presente Memoria Doctoral. Las iniciales **DDC** corresponden a la abreviatura de la **dideoxicitidina**, que es un **Inhibidor de la Transcriptasa Inversa** (enzima vírica que permite la transcripción del ARN vírico a ADN). Esta es una de las tres drogas que en la actualidad se usa con más frecuencia en el tratamiento de infecciones por SIDA en el hombre, junto a otros inhibidores de la transcriptasa inversa tales como el **AZT** y el **DDI** o **ddI (dideoxiinosina)**, a las que ya nos referimos con anterioridad en el apartado de Antecedentes y cuyas estructuras quedan reflejadas en la Fig. 4.11.

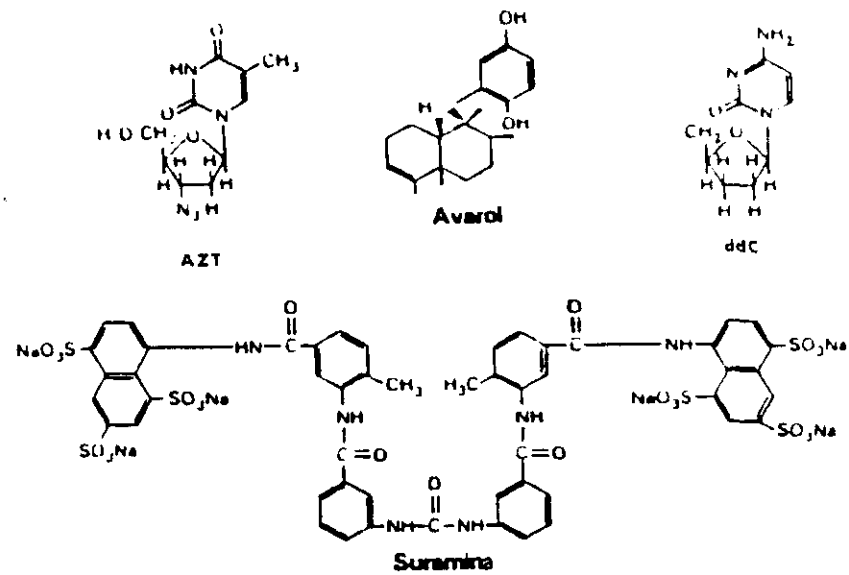


Fig. 4.11.: Estructura molecular de algunas drogas utilizadas en el tratamiento del SIDA.

La Tabla 4.3. presenta un relación de las principales drogas que causan inhibición de la replicación del VIH-1 (Sarin, 1988).

Tabla 4.3.: Drogas inhibidoras de la replicación del VIH-1.

DROGAS	POSIBLE MODO DE ACCION
Avarol/Avarona	Aglutina al VIH-1 e impide su libertad
Foscarnet	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa
Suramina	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa
AZT	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa, finaliza la cadena de ADN
Ribavarina	Bloquea al ARNm
Dideoxycitidina (ddc)	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa, finaliza la cadena de ADN
Análogos de la Amfotericina	Unen el colesterol a la envuelta del VIH-1

Por el momento, y gracias a la inestimable ayuda de los Dr. K.H. Lee y Dr. Yoshiki Kashiwada (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, U.S.A.), pudimos ensayar las muestras flavonoídicas procedentes de musgos frente a la droga control DDC en los **Biotech Research Laboratories (A Boston Biomedica Company**, Rockville, Maryland, U.S.A.).

Se utilizaron en su caso, diversas concentracciones de la droga patrón (ddC) hasta encontrar el momento en que se producía una supresión completa, lo que era indicativo de que el sistema de ensayo que se iba a utilizar era el correcto. Una vez establecido el sistema de ensayo mediante el patrón ddC, se procedió a ensayar cada una de las 15 muestras flavonoídicas reflejadas en la Tabla 4.2. El método de ensayo elegido fue un método de tipo **ELISA** para detectar un antígeno vírico en el suero o en un cultivo de células libres en suspensión, concretamente el **antígeno p24**.

A. Medio de Cultivo.

Los cultivos celulares se llevaron a cabo en un medio muy similar al propuesto por Geran & col. (1972) y Vanden Berghe & col. (1978 y 1986). Básicamente, se llevaron a cabo cultivos en placa de Petri, en forma de monocapas de células en crecimiento, en las cuales se inoculaban diluciones diversas de una suspensión viral (VIH-1). Después de la absorción de las partículas infecciosas de virus por las células huéspedes, las monocapas eran cubiertas con un medio que contenía agarosa, de tal forma que las nuevas partículas víricas formadas pudieran ser localizadas en la sobrecubierta de agar sólido. Las partículas de nuevas formación procedían lógicamente de las células en cultivo inicialmente infectadas que infectaron a sus adyacentes, y que al cabo de cierto tiempo sufrían un proceso de degeneración fruto de la actividad vírica. Estas áreas de células muertas, que se denominaron "**placas**", eran visualizadas mediante tinción de la monocapa celular con un colorante "vital" como el rojo neutro (Vanden Berghe & col., 1986). Las placas que no absorbían dicho colorante aparecían como zonas no teñidas. Por regla general, una placa procede de una única partícula infecciosa, de tal forma que éste es un buen método para calcular la tasa de reproducción de las partículas víricas originales. Dichas placas pudieron así mismo detectarse microscópicamente, mediante determinación de células multinucleadas o por inmunofluorescencia.

No pudimos, sin embargo, disponer de más información al respecto de dichos métodos de cultivo y detección de las partículas víricas, por ser propiedad intelectual de los laboratorios antes mencionados. De hecho, se ha logrado cultivar el VIH en cultivo celular y se obtiene por lo general, suficiente cantidad como para fabricar antígenos para las pruebas de laboratorio, pero su cultivo no está al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos, y aquellos que han desarrollado un método de cultivo lo tienen lógicamente patentado. Debido a que se nos brindó la oportunidad de ensayar los flavonoides aislados en esta Memoria Doctoral, frente al virus del SIDA, preferimos en cualquier caso acometer tal investigación.

B. El antígeno p24.

El virión del HTLV-III (VIH) es una esfera que transversalmente mide unos 1000 angstrom (ver Fig. 4.12). La partícula está recubierta por una membrana, formada por dos capas de material lipídico, que procede de la membrana externa de la célula hospedadora. De la membrana sobresalen ciertas glicoproteínas a modo de protuberancia, formadas por dos componentes: una primera proteína (GP-120) que sobresale de la membrana, que aparece anclada en una segunda proteína (GP-41) que la atraviesa de un lado a otro.

Cada protuberancia consta de 3 series de moléculas proteínicas. La envuelta lipídico-proteínica antes nombrada, engloba al "núcleo" del virión, formado por dos nuevas cubiertas proteínicas, una exterior (p18) y otra interior (**p24**). En su interior se encuentran, además, el ARN vírico y la enzima retrotranscriptasa.

Biotech Research Laboratories y muchas otras compañías biomédicas, han desarrollado y establecido un **Método ELISA** para la detección del antígeno p24 en el suero o cultivos celulares, que es el que nosotros seguimos.

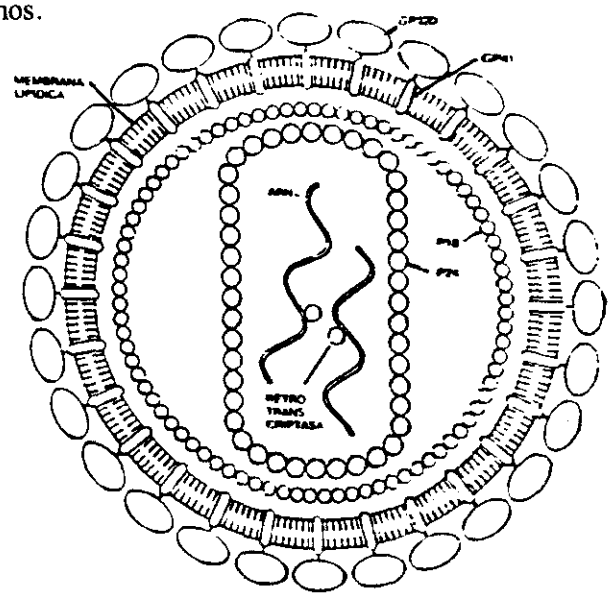


Fig. 4.12.: Virión del VIH-1.

C. El método o test ELISA.

Este tipo de prueba, por regla general, pone de manifiesto la presencia de los anticuerpos producidos por el organismo como reacción frente a la existencia de diversos antígenos de origen vírico como puede ser la proteína p24. La metodología que se sigue en este caso se denomina "indirecta", ya que no se detecta directamente el virus sino los anticuerpos producidos, mediante una reacción química coloreada al formarse el complejo antígeno-anticuerpo. Para ello, lo que normalmente se realiza es poner en contacto el suero de un paciente posiblemente portador del VIH con sus anticuerpos respectivos, con una solución provista de microcúpulas que contienen el antígeno vírico correspondiente. De esta manera, si el suero contiene anticuerpos contra el virus del SIDA, éstos se unirán al antígeno formando un complejo antígeno-anticuerpo, que por medio de una reacción química se colorea y nos permite deducir que se trata de una persona portadora. Si el medio permanece incoloro la prueba lógicamente es negativa y se trata de una persona sana. La intensidad de color, generalmente, es proporcional a la tasa de anticuerpos presente.

El método ELISA que seguimos, propuesto por Biotech Research Laboratories, consiste en utilizar poblaciones celulares de una línea concreta de **linfocitos T**, conocida como **células H9** (Mitsuya & Broder, 1986; Perno & col., 1988; Baba & col., 1987; Balzarini & col., 1991). La línea H9 es una línea clónica de linfocitos T que, permite la replicación del VIH, pero es parcialmente resistente al efecto citopático, por lo que el cálculo de la concentración del antígeno p24 en ellas, es un índice que permite medir la infectividad viral y la replicación (Popovic & col., 1984). Se utilizaron dos poblaciones de células H9 distintas: unas que fueron tratadas con diversas drogas (flavonoides y ddC patrón) y otras no, pero ambas infectadas con VIH. Ambas poblaciones se llevaron a cultivo, y en el caso de las tratadas, con distintas concentraciones de droga (100, 20, 4 y 0.8 μg/ml) así como con el propio medio (control). Después de 4 días de cultivo, se recogió el sobrenadante que contenía las partículas víricas libres en suspensión. A éste se le añadió un detergente, que permitía romper la cubierta del virus, dejando libre la cápsula proteínica del núcleo del virión. De esta manera la proteína p24 podría ser liberada por las partículas víricas tras las lisis celular, y ser detectada mediante el test ELISA por inmunofluorescencia (Mitsuya & col., 1984 y 1987; Perno & col., 1988). La detección del antígeno p24 se llevó a cabo mediante un método indirecto como cuantificación de la cantidad existente del virus, que sin embargo es del todo fiable y aceptable. Por cada ensayo se utilizaron 5 cultivos para cada concentracción de droga y 5 control.

D. Medidas de actividad.

D.1. Porcentaje medio de p24 (% p24): esta primera medida viene referida a la concentración del antígeno p24 en los cultivos celulares infectados tratados en relación a los no tratados. Los Biotech Research Laboratories nos facilitaron únicamente su significado biológico, pero no la manera de llevar a cabo su cálculo matemático. De acuerdo a ello, se establecieron 3 niveles de efectividad de la droga:

1) * valor de % p24 entre 50-69%
2) ** valor de % p24 entre 25-49%.
3) *** valor de % p24 menos del 25%.

La droga patrón ddC pertenecía al nivel de efectividad ***, por lo que ha de ser una droga sumamente eficaz. Lógicamente, el valor de esta medida, si la droga es efectiva al menos inhibiendo la replicación del virus, será siempre menor en aquellos cultivos celulares tratados con agentes de ensayo (muestras flavonoídicas) que en los no tratados, pudiendo llegar a ser negativo según los resultados que nos fueron facilitados. Podríamos pues afirmar que, mientrs más bajos sean los valores del % p24, incluso negativos, más efectiva es la droga.

D.2. Valor de CC_{50} (concentración citotóxica): este valor se refiere a la concentración del agente de ensayo o droga que inhibe el 50% del crecimiento de las células que no habían sido previamente infectadas con VIH. En realidad, es una medida de la **toxicidad** de la droga. Podría ser un error considerable considerar que la muerte celular es debida a la replicación vírica, cuando se debe realmente a la droga ensayada, de ahí la importancia de este valor (Bauer & col., 1981). También se conoce este valor como IC_{50}. Desde un punto de vista terapeútico, interesa que este valor sea lo más alto posible, es decir, que la droga pueda ser tóxica a concentracciones muy elevadas.

D.3. Valor de EC_{50}: valor que se refiere a la concentracción de la droga que inhibe la replicación del virus en un 50%. Su cálculo se lleva a cabo mediante una determinación gráfica, a través de la reducción en la producción del antígeno p24 (Balzarini & col., 1991). Se trata en realidad de una medida de la **actividad** de la droga. Desde un punto de vista terapéutico, lo que interesa es que este valor sea lo más bajo posible, es decir, que se inhiba la replicación de virus con la concentracción de droga más baja posible.

D.4. Indice Terapéutico: este índice se establece por regla general, de acuerdo a una droga patrón así como respecto a una línea celular concreta. Por ello, cada laboratorio lo establece independientemente de acuerdo a ambos factores. Así por ejemplo, el índice terapéutico del AZT considerado en el Instituto de Química Médica (CSIC, Madrid) es de 2.000 (Dra. Ana San Félix, com. per.), mientras que nosotros utilizamos el establecido por los Biotech Research Laboratories con el valor de 25.000 en referencia a la droga patrón ddC. En cambio, Baba & col. (1987) consideran un índice terapeútico para el ddC de 616, pero utilizan cultivos celulares de células MT4 y no H9 como nosotros. En cualquier caso, se puede afirmar, que un compuesto puede considerarse que tiene actividad antiviral, siempre que su índice terapeútico sea mayor de 10 (Dra. Ana San Félix, com. per.). Es decir, una droga tendrá un índice terapeútico notable siempre que logre inhibir la replicación del virus con una concentracción muy baja (EC_{50}) que sea tóxica solamente a concentracciones muy altas (CC_{50}). Se calcula pues, a través del cociente entre la toxicidad del producto (CC_{50}) respecto a su actividad (EC_{50}). También se conoce con las siglas I.S. (Indice de selectividad) y lo que viene en resumen a ofrecer es una medida de la "seguridad" de la droga.

D.5. Porcentaje medio de supervivencia celular: es el cociente entre el número de células que sobreviven en los cultivos infectados y tratados con droga frente al número de células totales de cultivos no infectados (calculado en 1.59 millones).

D.6. Toxicidad de la droga: mide el límite de supervivencia celular frente a una determinada concentracción de droga. Se considera que una droga no es tóxica cuando sobreviven más del 70% de las células en cultivos controles que no estaban infectados. Si se produce una muerte celular superior al 70% del total de células se considera que dicha concentración de droga es tóxica.

5. RESULTADOS

5.1. FLAVONOIDES

En primer lugar se presentan los resultados correspondientes a las cromatografías bidimensionales realizadas en un total de **79** especies de la familia *Bartramiaceae*, excluídas las 4 especies objeto central de esta Memoria Doctoral. En dichos ensayos, se refleja mediante la simbología anexa la identificación tentativa de algunos de los biflavonoides más representativos.

En segundo lugar, se relacionan los resultados cromatográficos de las **5** especies estudiadas en profundidad en la presente Memoria doctoral (**4** *Bartramiaceae* y **1** *Dicranaceae*) indicándose también la posición en las cromatografías respectivas de cada uno de los compuestos identificados tanto en TLC como en HPLC.

Posteriormente, se presentarán los resultados correspondientes a cada uno de los compuestos aislados y/o identificados en este trabajo: TLCs, UV, EM y RMN.

Dado que gran parte de los compuestos identificados lo fueron a su vez en todas o la gran mayoría de las cinco especies estudiadas, hemos preferido presentar únicamente los resultados de cada uno de los compuestos, generalizando éstos para todas las especies, con el único fin de evitar un exceso de reiteración en los resultados. Así por ejemplo, el Compuesto I correspondiente a la 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona, fue identificado en todas las especies estudiadas (*Bartramia pomiformis*, *B. halleriana*, *B. stricta*, *B. ithyphylla* y *Dicranum scoparium*). Con el fin de evitar la presentación cinco veces de los espectros de EM, UV, ^{13}C RMN y ^{1}H RMN, correspondientes al compuesto en sí aislado de cada una de las especies nombradas, lo cual creemos innecesario, hemos preferido presentarlos unitariamente, pero eso sí, estableciendo la relación existente entre el Compuesto I y el correspondiente en cada una de las especies. Los mismos comentarios pueden aceptarse para el resto de compuestos identificados y/o aislados en este trabajo.

En los espectros de ultravioleta de cada uno de los compuestos, se indican: de un lado la longitud de onda que viene reflejada en nm sobre el eje de abscisas y, de otro la intensidad en amstrongs sobre la vertical o eje de ordenadas.

En las tablas correspondientes a los espectros de ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN las constantes de acoplamiento vienen reflejadas entre paréntesis. Junto a cada valor de ppm quedan, en ocasiones, indicados mediante la siguiente simbología, los desdoblamientos de los picos correspondientes a cada señal: s, singlete; d, doblete; t, triplete; dd, doble doblete; q, cuadruplete y m, multiplete.

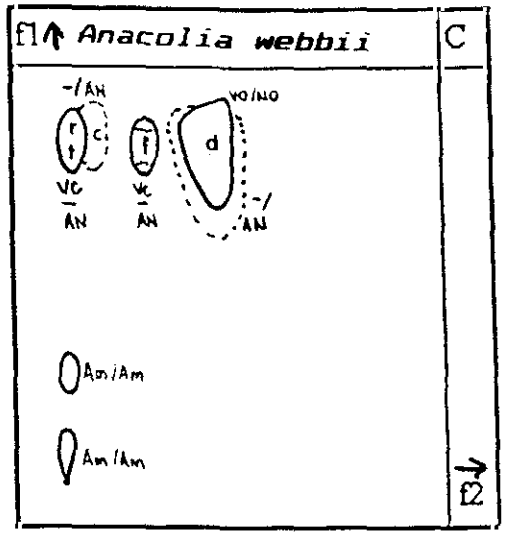
5.1.1. Análisis mediante TLC de la familia *Bartramiaceae* Schwaegr.

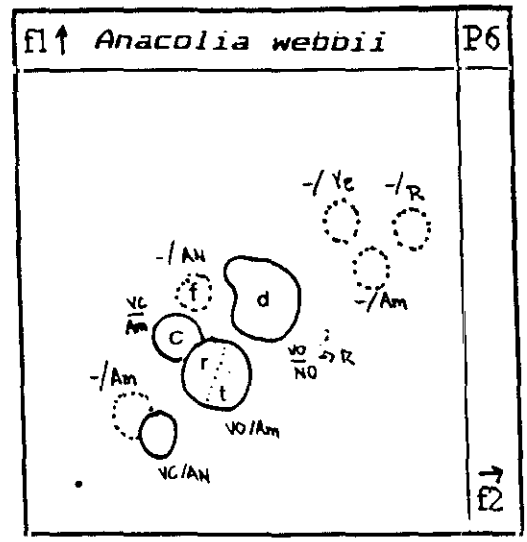
Como ya se ha comentado anteriormente se estudió mediante cromatografía en capa fina, la composición flavonoídica de 79 especies pertenecientes a la familia *Bartramiaceae*, correspondientes a un total de 8 géneros: *Anacolia* (5 especies), *Bartramia* (14 especies sin incluir las 4 que son objeto central de la Memoria Doctoral), *Breutelia* (23), *Catoscopium* (1), *Conostomum* (6), *Leiomela* (4), *Philonotis* (25) y *Plagiopus* (1).

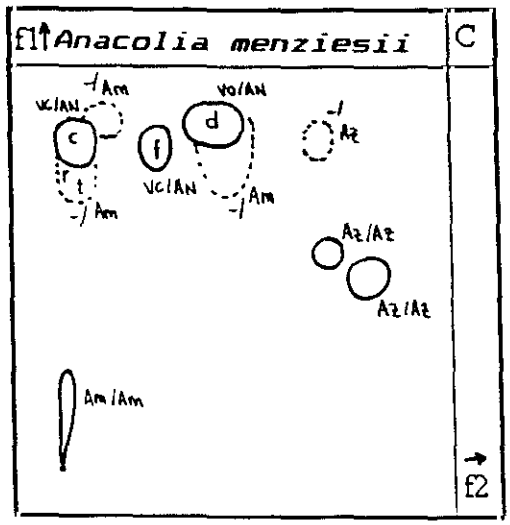
Los sistemas 2D-TLC elegidos fueron respectivamente Z_1-Z_3 en celulosa (C) y P_1-P_2 en poliamida-6 (P6) (ver pp. 77-78). f_1 y f_2 representan los frentes de desarrollo cromatográfico en cada una de las dimensiones. A continuación se presentan las cromatografías bidimensionales, respectivas a las 79 especies referidas, en ambos sistemas cromatográficos. La tabla que se anexa a continuación, representa toda la simbología utilizada en los resultados obtenidos en las **158** cromatografías bidimensionales.

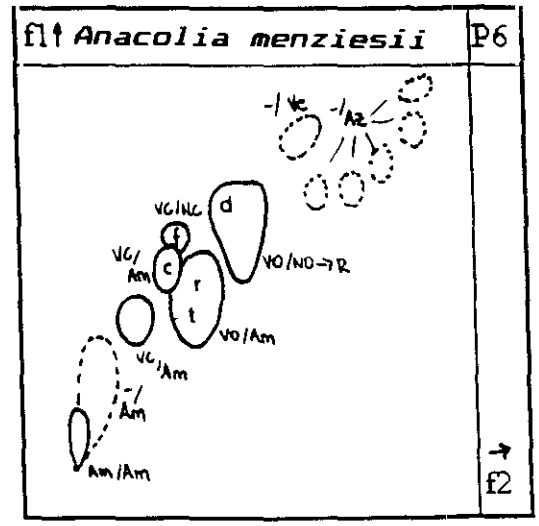
Tabla 5.1.: Simbología utilizada en las TLC_s respectivas.

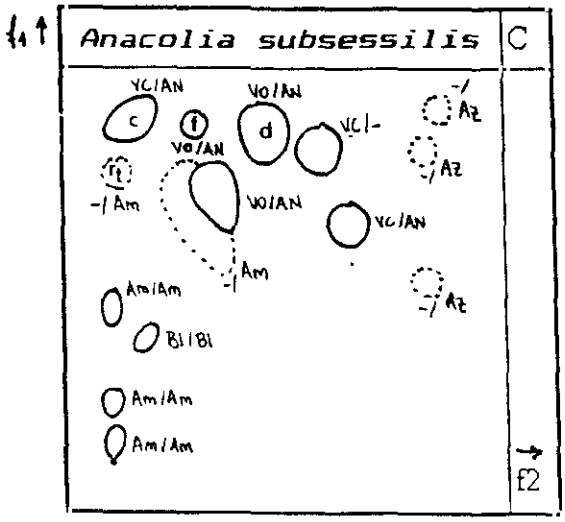
1. COLORES	**2. COMPUESTOS**
A, amarillo claro	**a**, Anhidrobartramiaflavona
Af, amarillo fluorescente	**b**, Bartramiaflavona
Am, amarillo oscuro	**c**, Dicranolomina
AN, amarillo anaranjado	**d**, 2,3-dihidro-filonotisflavona
Az, azul claro	**f**, Filonotisflavona
Azf, azul fluorescente	**fc**, Filonotisflavona y/o Dicranolomina
Bl, blanco	**r**, 5',3'''-diOH-robustaflavona
G, gris	**t**, 5',3'''-diOH-amentoflavona
MC, marrón claro	**tr**, 5',3'''-diOH-amentoflavona y/o 5',3'''-diOH-robustaflavona
NC, naranja claro	**3. Trazado de Líneas**
NO, naranja oscuro	**Línea contínua**, observable UV-vis/NA
R, rojo (con el tiempo)	**Línea discontínua**, observable sólo con NA
VC, violeta (púrpura) claro	**4. Sistemas Cromatográficos (ver pp. 77-78)**
Ve, verde	**C**, celulosa: f1 frente TBA, f2 frente AcOH 15%
VeA, verde amarillento	**P6**, poliamida-6: f1 frente AWE, f2 frente STAHL
VO, violeta (púrpura) oscuro	
Z, azul grisáceo	
Zf, azul fluorescente violáceo	

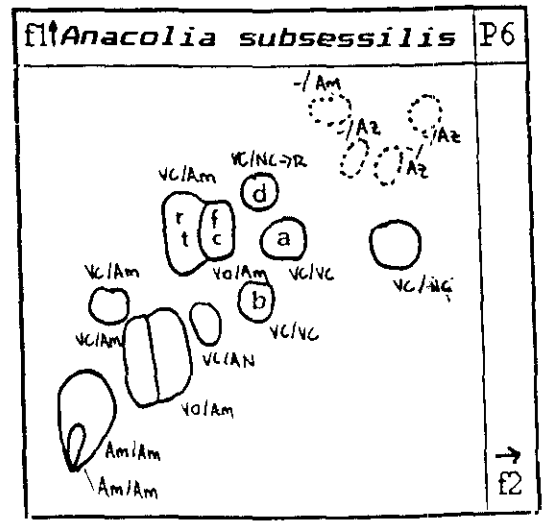

f1
Anacolia webbii
C
-/AN
VO/NO
VC/AN
VC/AN
-/AN
Am/Am
Am/Am
f2

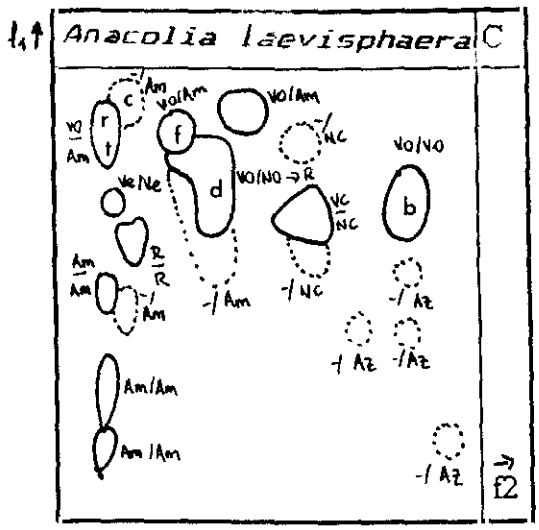

f1
Anacolia webbii
P6
-/Ve
-/R
-/AN
-/Am
VC/Am
VO/NO→R
-/Am
VO/Am
VC/AN
f2

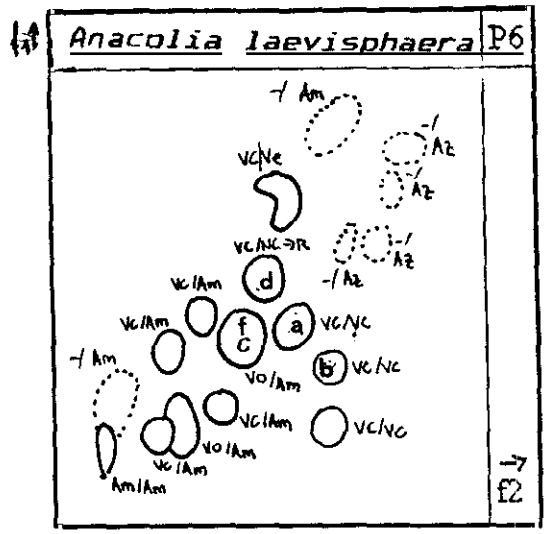

f1
Anacolia menziesii
C
-/Am
VC/AN
VO/AN
-/Az
-/Am
VC/AN
-/Am
Az/Az
Az/Az
Am/Am
f2

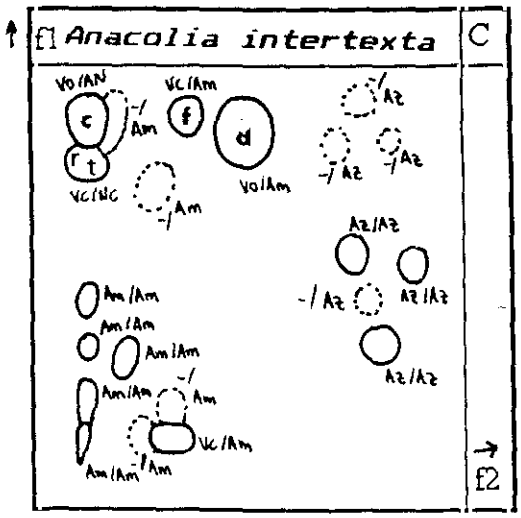

f1
Anacolia menziesii
P6
-/Ve
-/Az
VC/NC
VC/Am
VO/NO→R
VO/Am
VC/Am
-/Am
Am/Am
f2

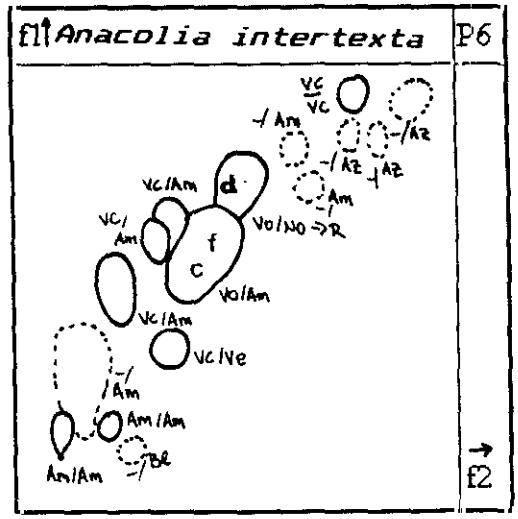

f1
Anacolia subsessilis
C
VC/AN
VO/AN
-/Az
VO/AN
VC/-
-/Az
-/Am
VO/AN
VC/AN
-/Am
-/Az
Am/Am
Bl/Bl
Am/Am
Am/Am
f2

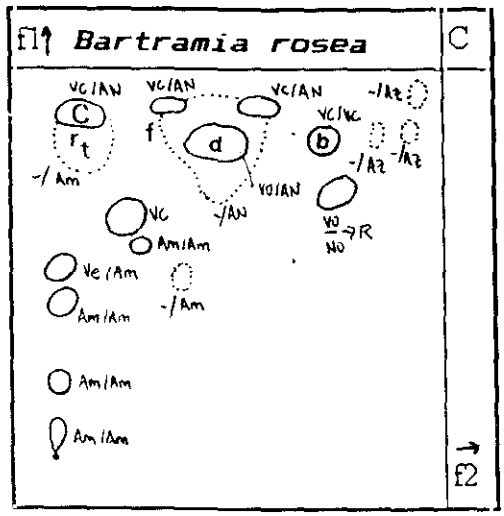

f1
Anacolia subsessilis
P6
-/Am
-/Az
-/Az
-/Az
VC/NC→R
VC/Am
VC/Am
VO/Am
VC/VC
VC/NC
VC/Am
VC/VC
VC/AN
VO/Am
Am/Am
Am/Am
f2

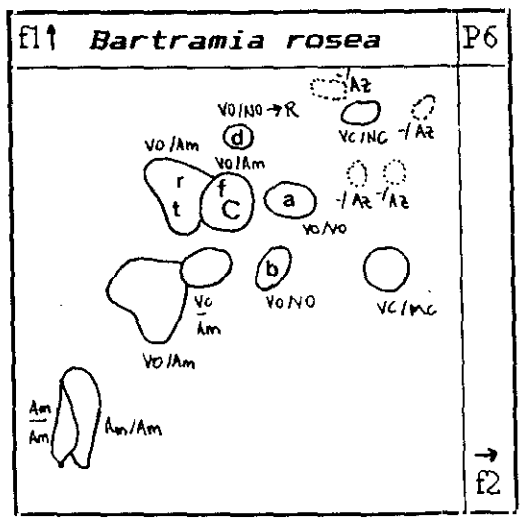

Anacolia laevisphaera
C
f2

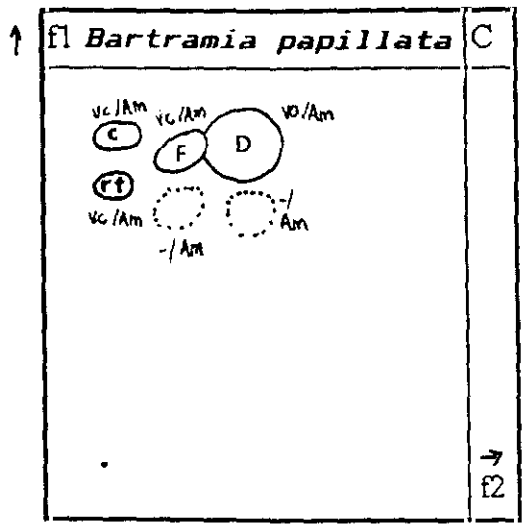

Anacolia laevisphaera
P6
f2

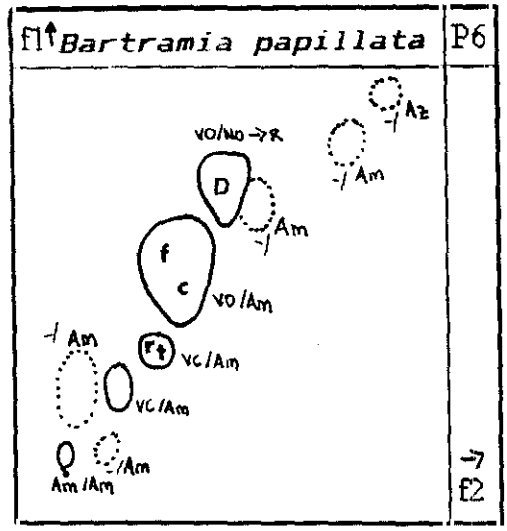

Anacolia intertexta
C
f2

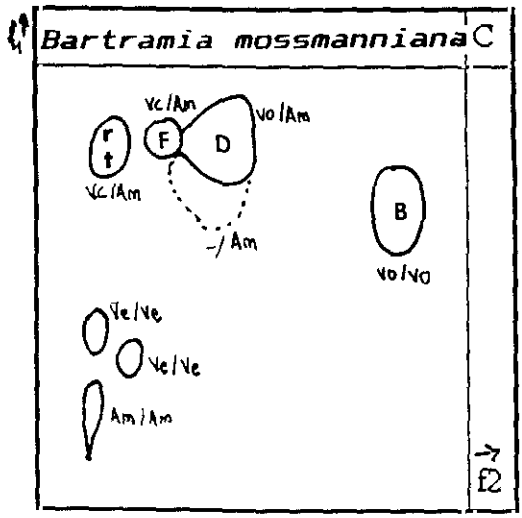

Anacolia intertexta
P6
f2

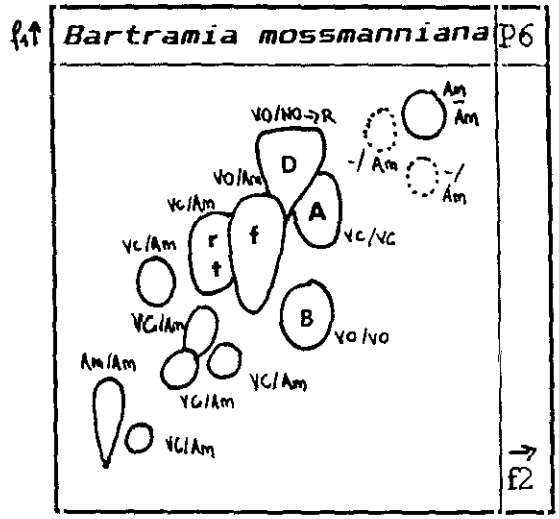

Bartramia rosea
C
f2

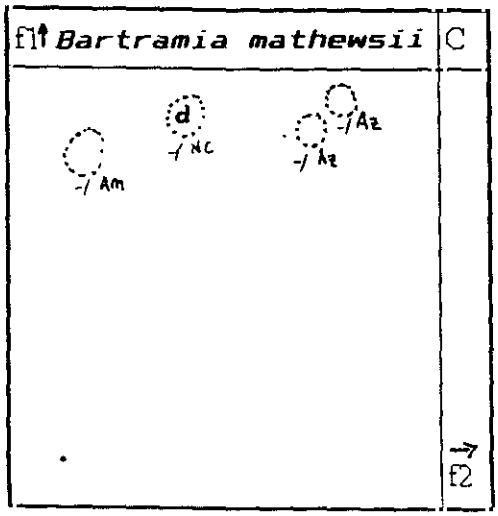

Bartramia rosea
P6
f2

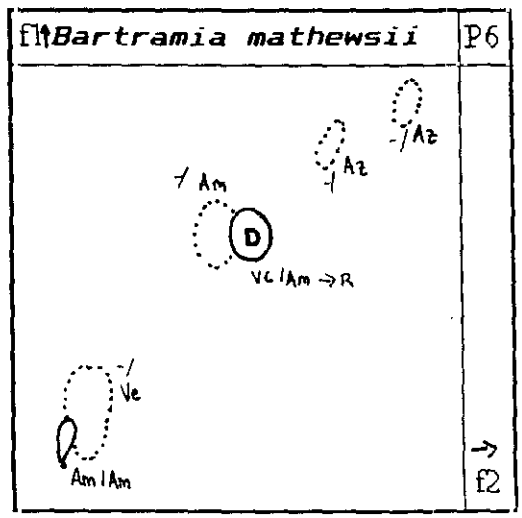

f1 Bartramia papillata
C
vc/Am
vc/Am
vo/Am
c
F
D
rf
vc/Am
-/Am
-/Am
-/Am
f2

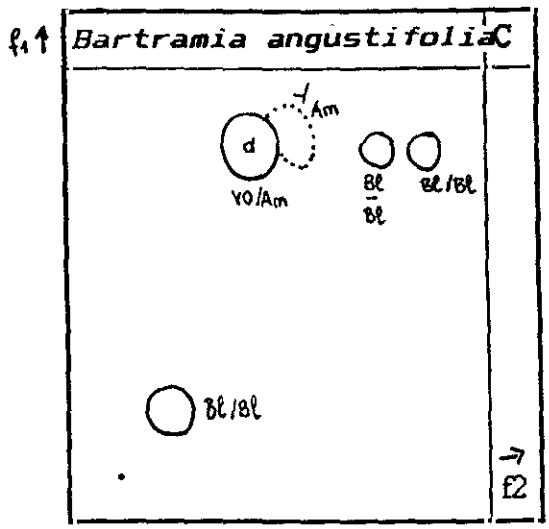

f1 Bartramia papillata
P6
-/Az
vo/No→R
-/Am
D
-/Am
f
c
vo/Am
-/Am
rf
vc/Am
vc/Am
Am/Am
-/Am
f2

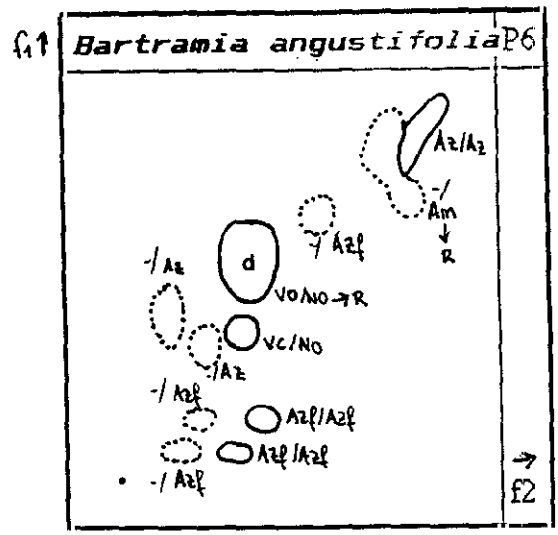

Bartramia mossmanniana
C
vc/Am
r
f
F
D
vo/Am
vc/Am
-/Am
B
vo/vo
Ve/Ve
Ve/Ve
Am/Am
f2

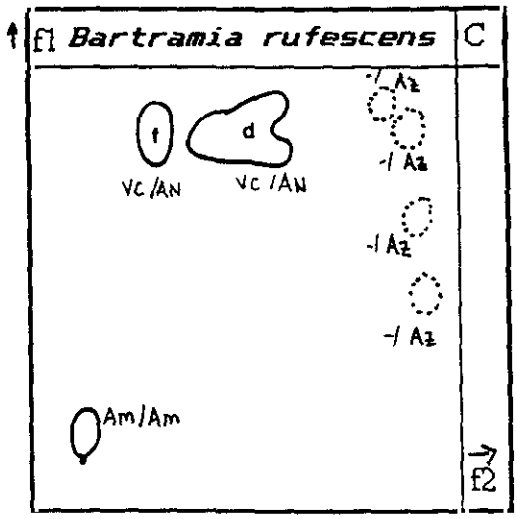

Bartramia mossmanniana
P6
vo/No→R
Am
Am
-/Am
-/Am
D
vo/Am
vc/Am
A
r
f
vc/Am
vc/vc
vc/Am
B
vo/vo
Am/Am
vc/Am
vc/Am
vc/Am
f2

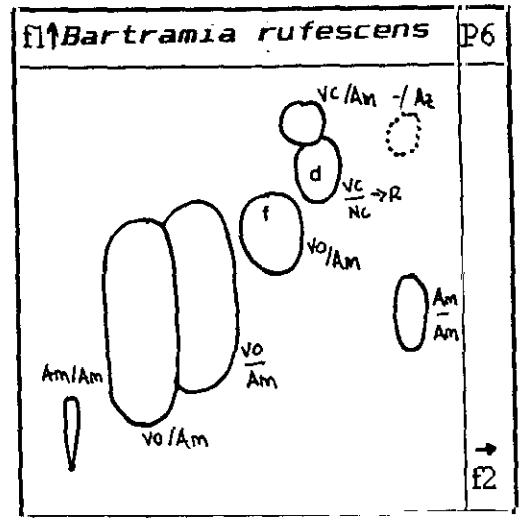

f1 Bartramia mathewsii
C
d
-/Nc
-/Az
-/Az
-/Am
f2

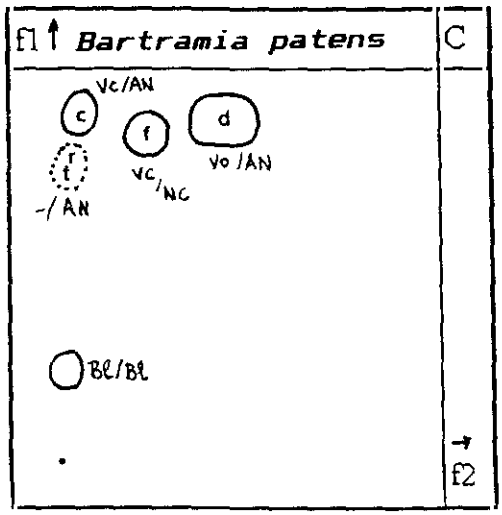

f1 Bartramia mathewsii
P6
-/Az
-/Az
-/Am
D
vc/Am→R
-/
Ve
Am/Am
f2

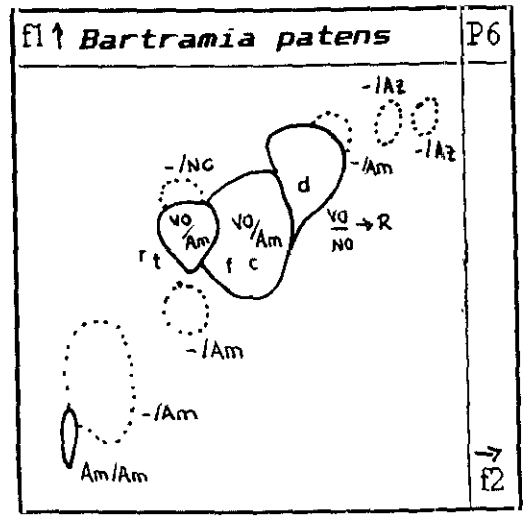

f1
Bartramia angustifolia
C
d
-/Am
Vo/Am
Bl/Bl
Bl/Bl
Bl/Bl
f2

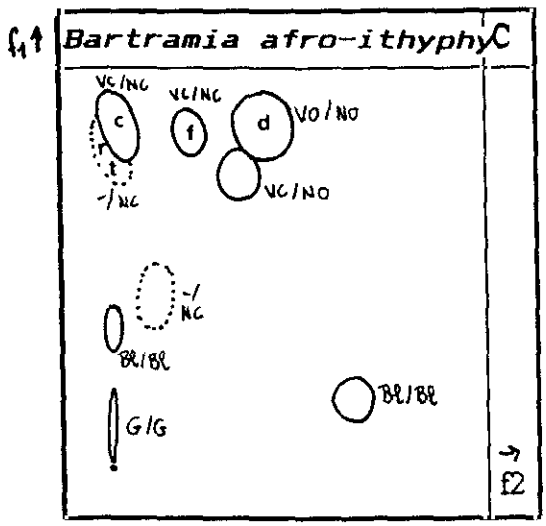

f1
Bartramia angustifolia
P6
Az/Az
-/Am
R
-/Azf
d
-/Az
Vo/No→R
Vc/No
-/Az
-/Azf
Azf/Azf
Azf/Azf
-/Azf
f2

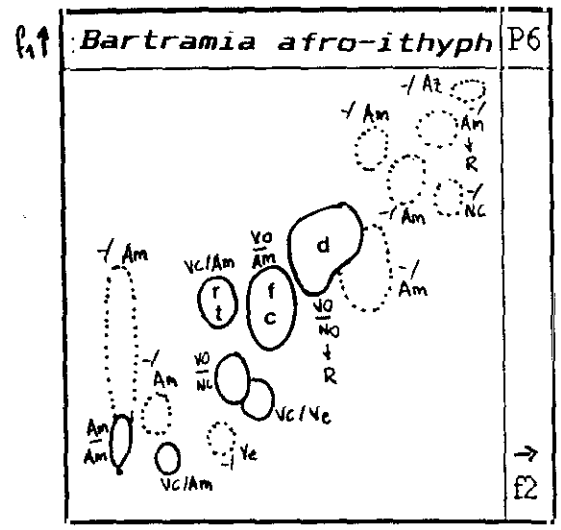

f1
Bartramia rufescens
C
-/Az
f
d
-/Az
Vc/An
Vc/An
-/Az
-/Az
Am/Am
f2

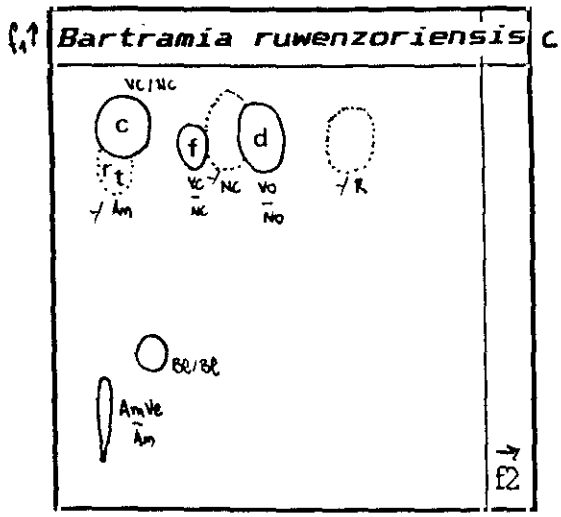

f1
Bartramia rufescens
P6
Vc/Am
-/Az
d
Vc/Nc→R
f
Vo/Am
Am/Am
Vo/Am
Vo/Am
Am/Am
f2

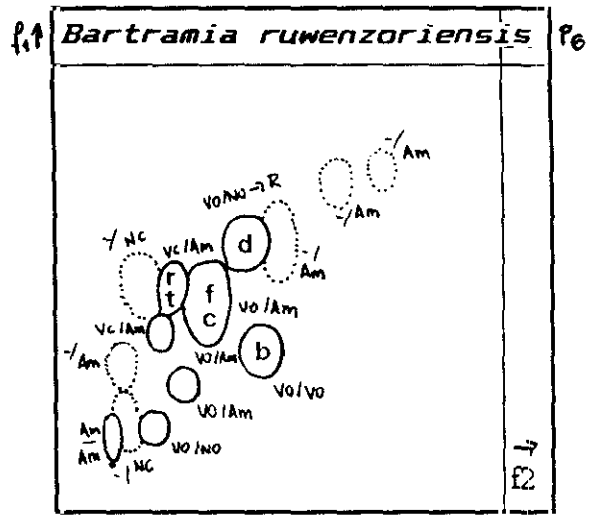

f1
Bartramia patens
C
Vc/An
c
f
d
t
Vc/Nc
Vo/An
-/An
Bl/Bl
f2

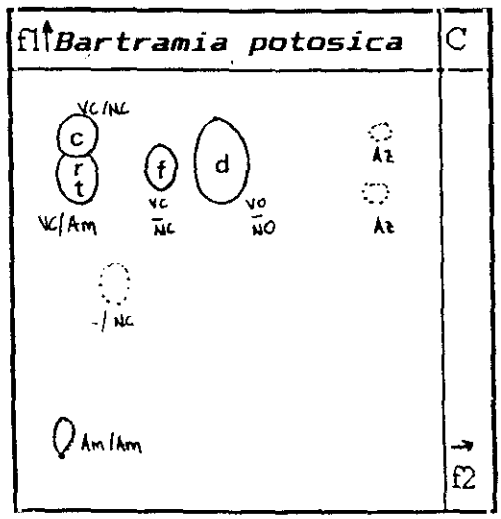

f1
Bartramia patens
P6
-/Az
-/Az
-/Nc
-/Am
d
Vo/Am
Vo/Am
Vo/No→R
r t
f c
-/Am
-/Am
Am/Am
f2

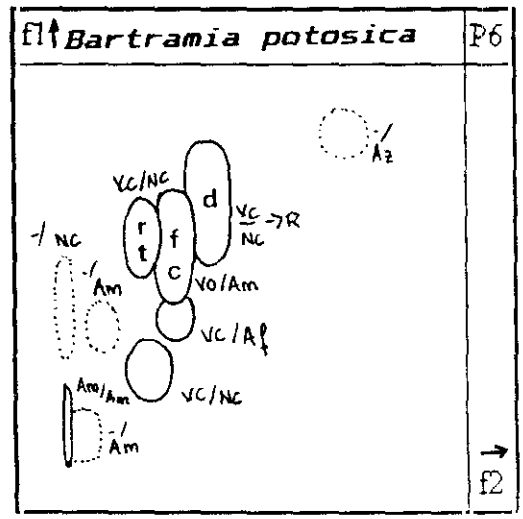

f1
Bartramia afro-ithyphyC
VC/NC
VC/NC
VO/NO
VC/NO
-/NC
-/NC
Bl/Bl
Bl/Bl
G/G
f2

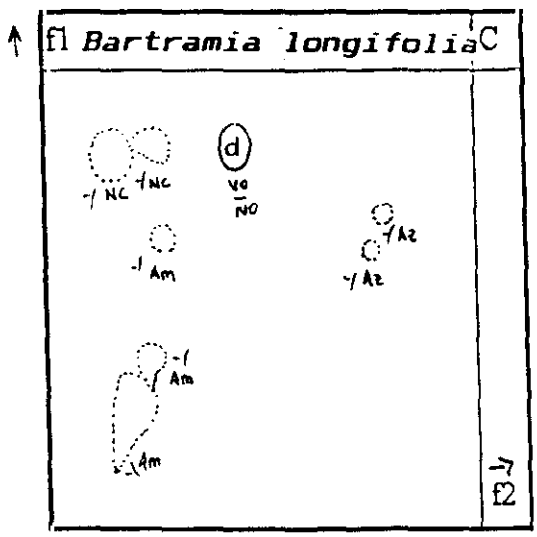

f1
Bartramia afro-ithyph P6
-/Az
-/Am
-/Am
R
-/NC
-/Am
-/Am
VC/Am
VO/Am
VO/NO
R
-/Am
VO/NC
VC/Ve
-/Ve
VC/Am
f2

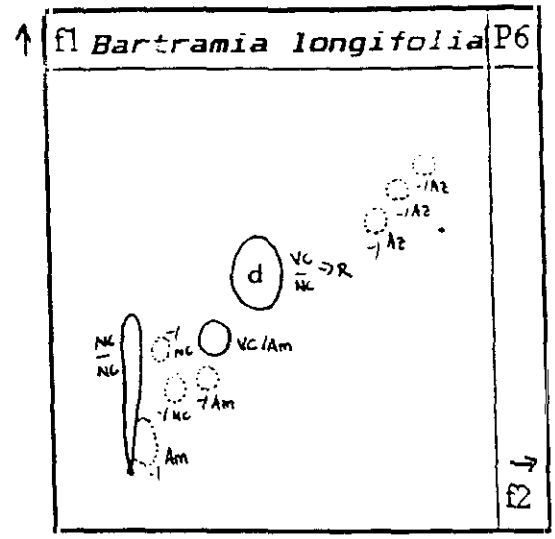

f1
Bartramia ruwenzoriensis C
VC/NC
-/Am
VC/NC
NC
VO/NO
-/R
Bl/Bl
Am/Ve
Am
f2

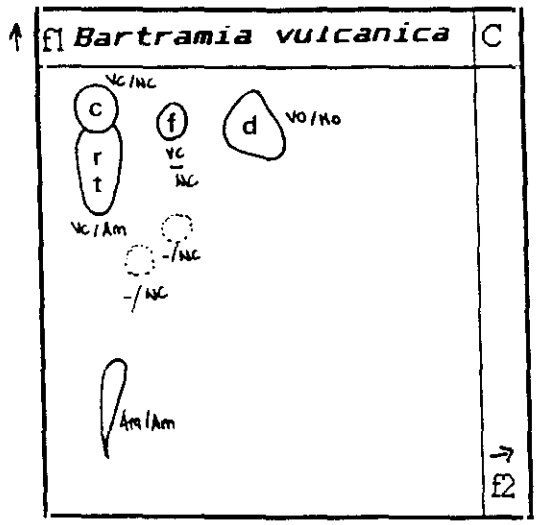

f1
Bartramia ruwenzoriensis P6
-/Am
-/Am
VO/NO→R
-/NC
VC/Am
-/Am
VO/Am
VC/Am
VO/Am
VO/Vo
VO/Am
Am/Am
VO/NO
-/NC
f2

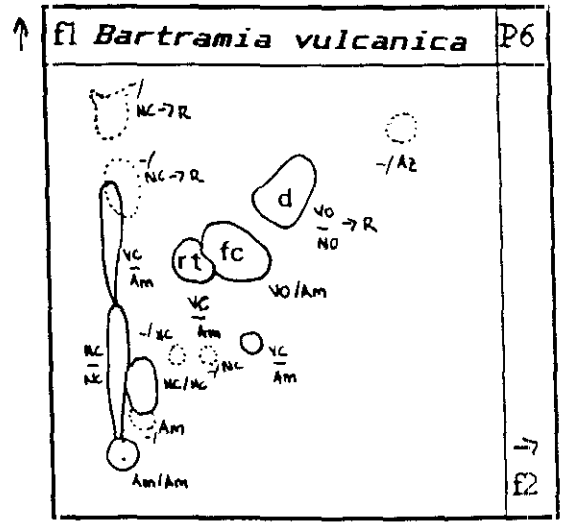

f1
Bartramia potosica C
VC/NC
VC/Am
VC/NC
VO/NO
Az
Az
-/NC
Am/Am
f2

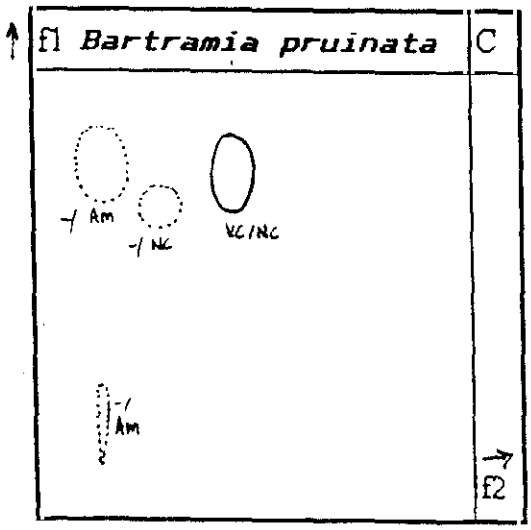

f1
Bartramia potosica P6
-/Az
VC/NC
-/NC
VC/NC→R
-/Am
VO/Am
VC/Af
Amo/Am
VC/NC
-/Am
f2

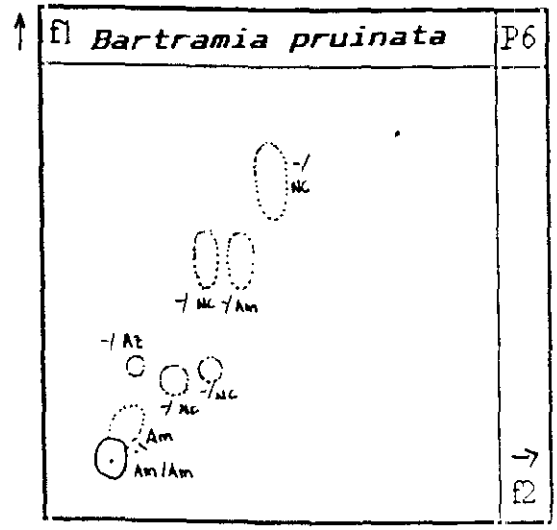

f1 Bartramia longifolia C
d
VO/NO
-/NC
-/NC
-/Am
-/Az
-/Az
-/Am
-/Am
f2

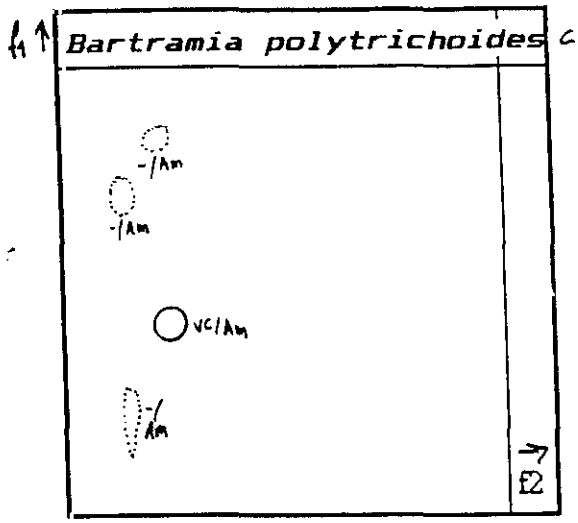

f1 Bartramia longifolia P6
-/Az
-/Az
-/Az
d
VC/NC → R
NC/NC
-/NC
VC/Am
-/NC
-/Am
-/Am
f2

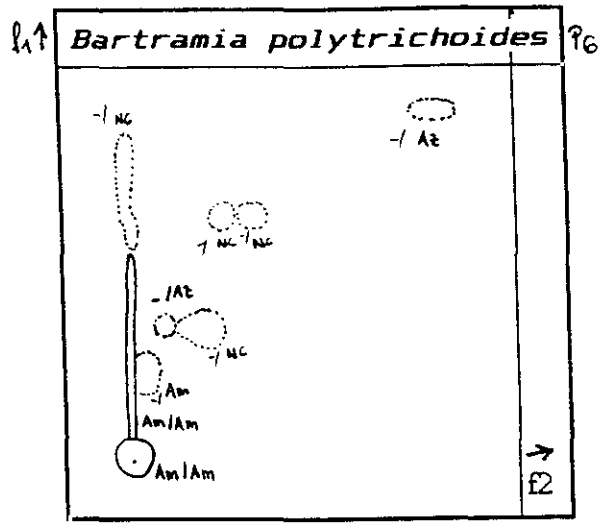

f1 Bartramia vulcanica C
VC/NC
c
r
t
f
VC/NC
d
VO/NO
VC/Am
-/NC
-/NC
Am/Am
f2

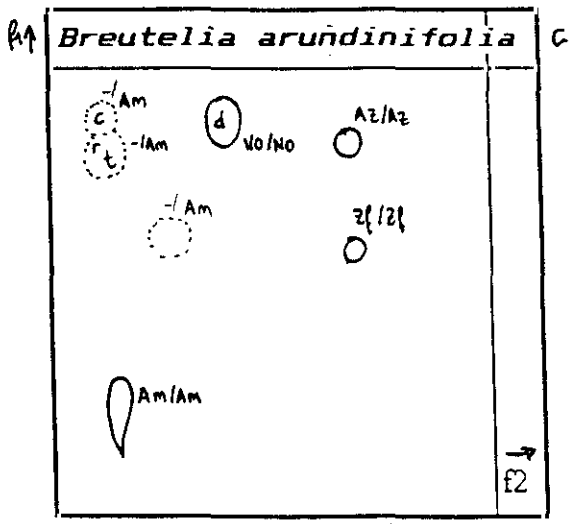

f1 Bartramia vulcanica P6
-/NC → R
-/NC → R
-/Az
d
VO/NO → R
VC/Am
r t
fc
VO/Am
VC/Am
-/NC
NC/NC
-/NC
NC/NC
VC/Am
-/Am
Am/Am
f2

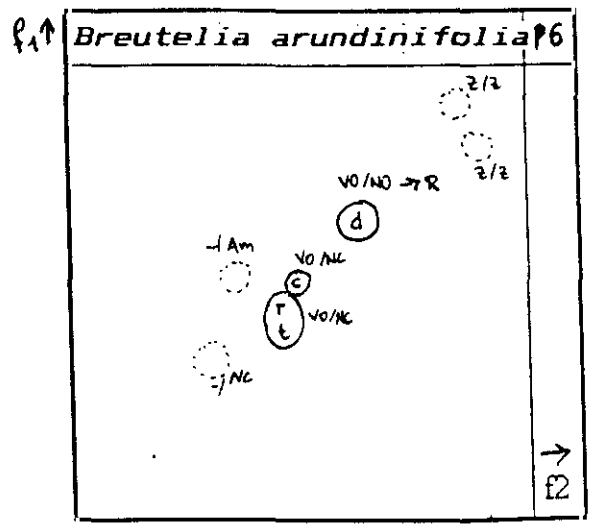

f1 Bartramia pruinata C
-/Am
-/NC
VC/NC
-/Am
f2

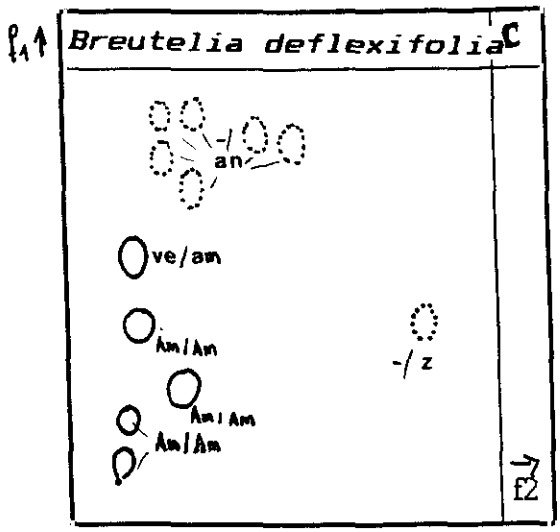

f1 Bartramia pruinata P6
-/NC
-/NC -/Am
-/Az
-/NC
-/NC
-/Am
Am/Am
f2

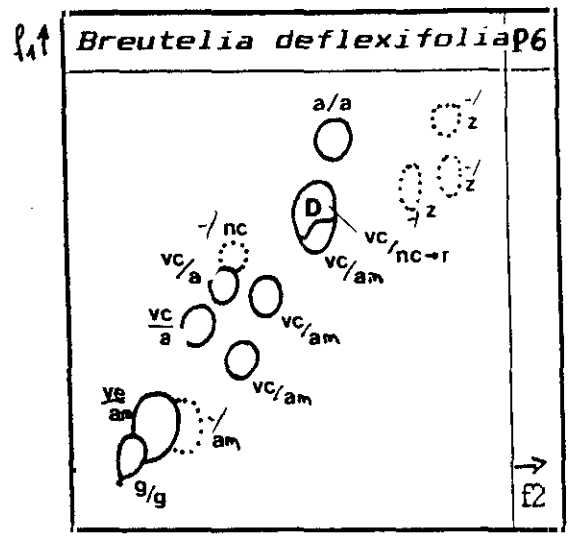

f1
Bartramia polytrichoides
C
-/Am
-/Am
VC/Am
-/Am
f2

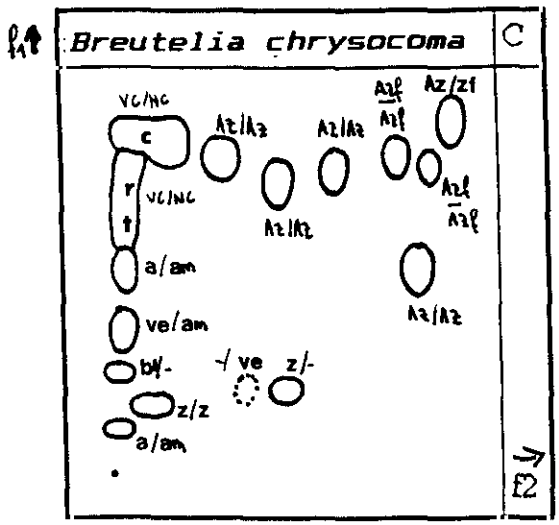

f1
Bartramia polytrichoides
P6
-/NC
-/Az
-/NC -/NC
-/Az
-/NC
-/Am
Am/Am
Am/Am
f2

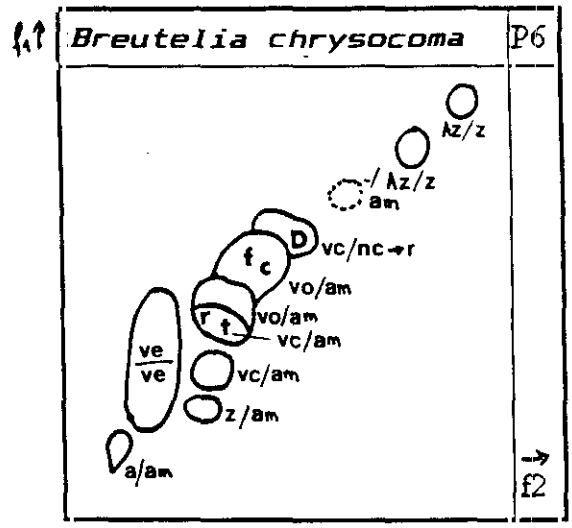

f1
Breutelia arundinifolia
C
-/Am
c
-/Am
r
t
d
VO/NO
Az/Az
-/Am
Zf/Zf
Am/Am
f2

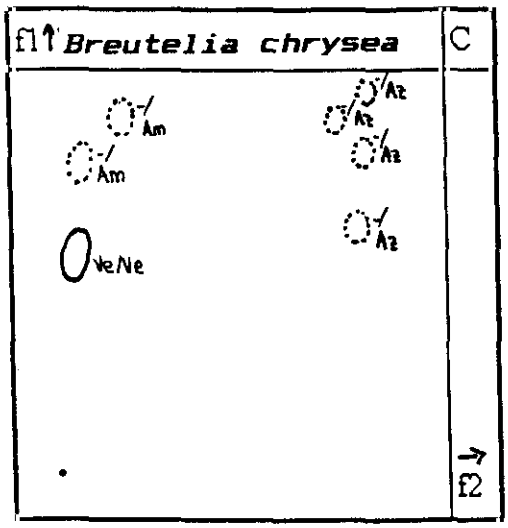

f1
Breutelia arundinifolia
P6
Z/Z
Z/Z
VO/NO → R
d
-/Am
VO/NC
c
r
t
VO/NC
-/NC
f2

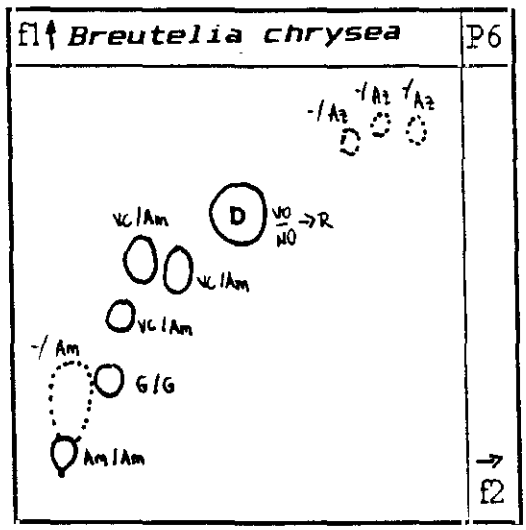

f1
Breutelia deflexifolia
C
an
ve/am
Am/Am
Am/Am
Am/Am
-/z
f2

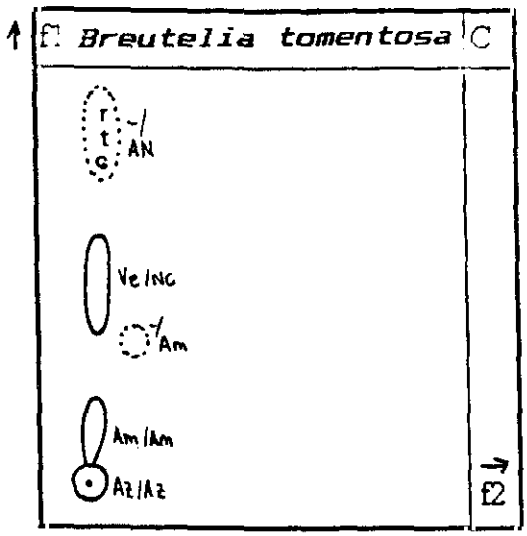

f1
Breutelia deflexifolia
P6
a/a
-/z
z
-/z
z
D
-/nc
vc/nc→r
vc/a
vc/am
vc/a
vc/am
vc/am
ve/am
-/am
g/g
f2

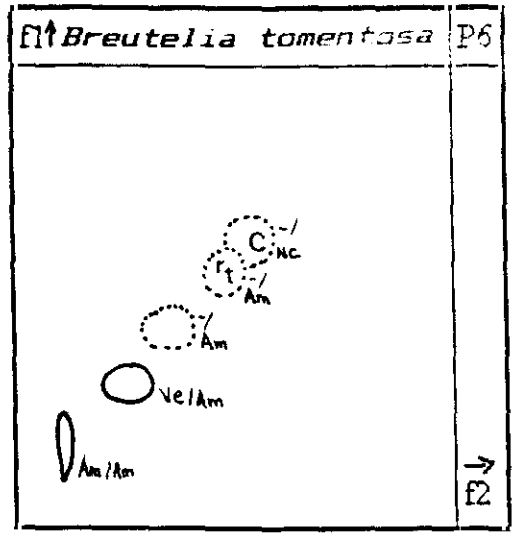

f1
Breutelia chrysocoma
C
VC/NC
c
Az/Az
Az/Az
Azℓ/Azℓ
Az/zf
r
VC/NC
Az/Az
Azℓ/Azℓ
a/am
ve/am
bl/-
-/ve
z/-
z/z
a/am
f2

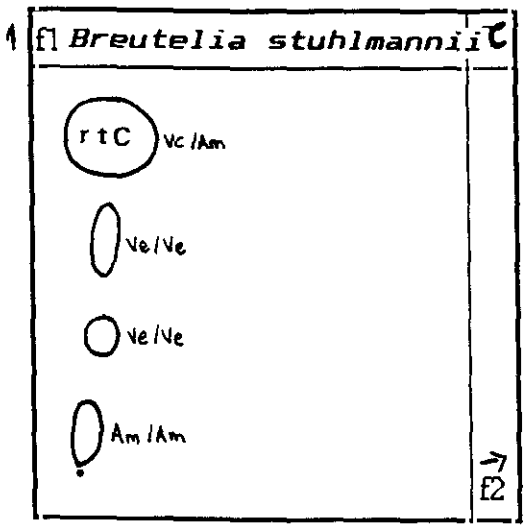

f1
Breutelia chrysocoma
P6
Az/z
-/Az/z
am
D
vc/nc→r
f c
vo/am
r f
vo/am
vc/am
ve/ve
vc/am
z/am
a/am
f2

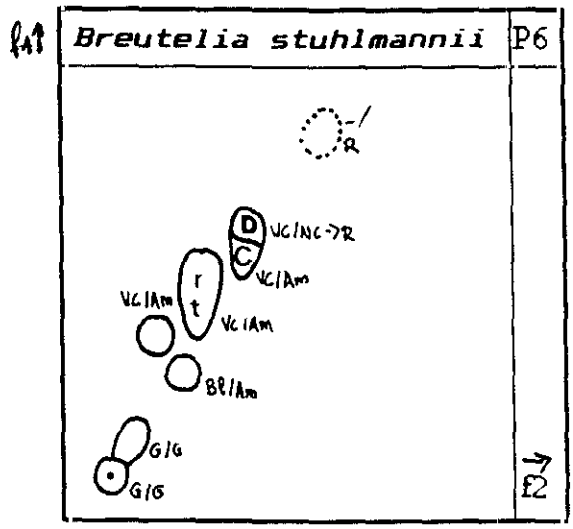

f1
Breutelia chrysea
C
-/Am
-/Am
-/Az
Az
-/Az
-/Az
Ve/Ne
f2

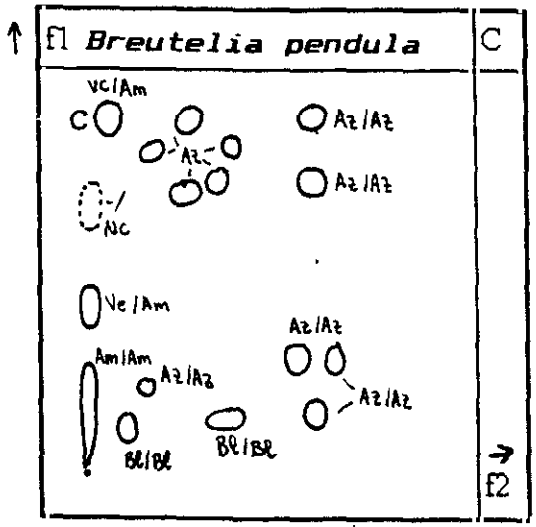

f1
Breutelia chrysea
P6
-/Az
-/Az
-/Az
D
VC/Am
VO/VO →R
VC/Am
VC/Am
-/Am
G/G
Am/Am
f2

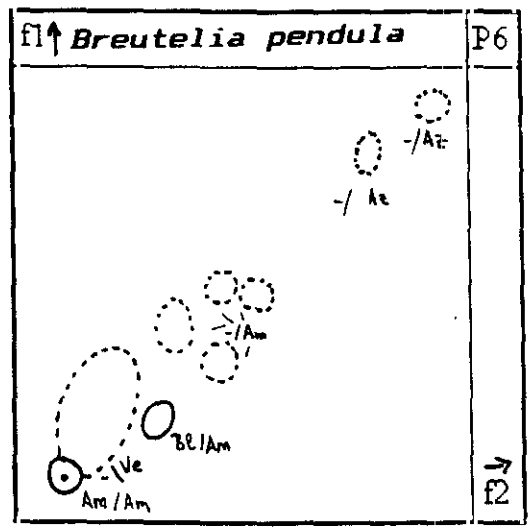

f1 Breutelia tomentosa
C
r
t
G
-/
AN
Ve/NC
-/
Am
Am/Am
Az/Az
f2

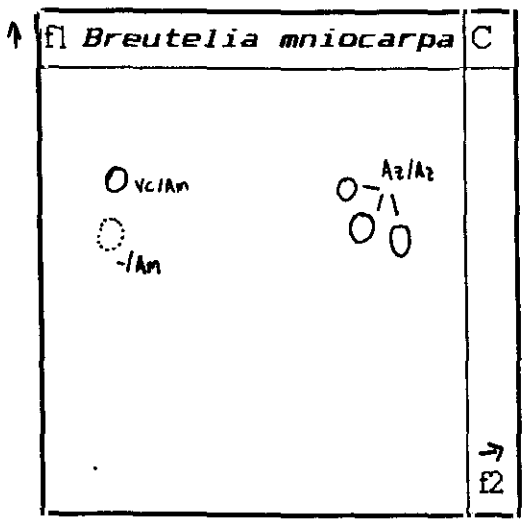

f1 Breutelia tomentosa
P6
C
-/
NC
r
t
-/
Am
Am
Ve/Am
Am/Am
f2

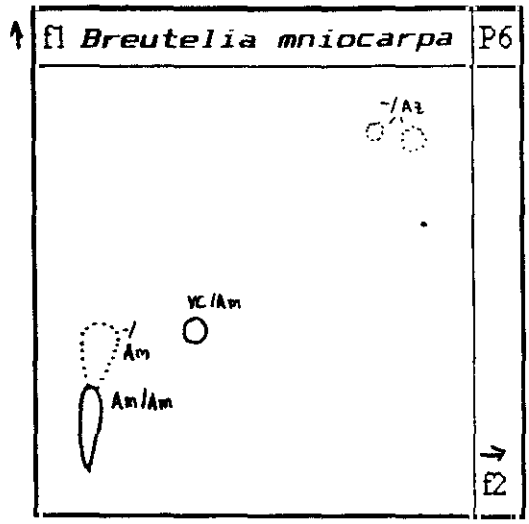

f1 Breutelia stuhlmannii
C
r t C
Vc/Am
Ve/Ve
Ve/Ve
Am/Am
f2

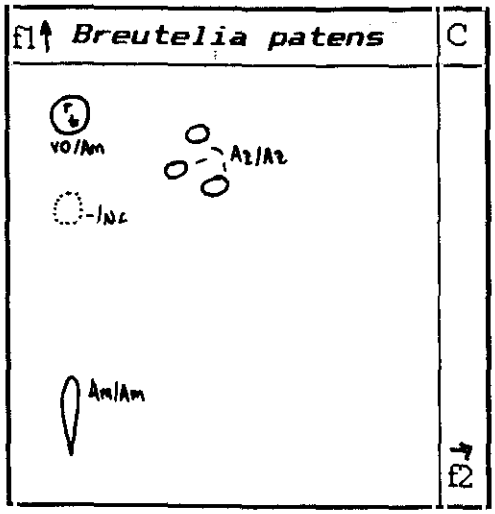

f1 Breutelia stuhlmannii
P6
-/
R
D
C
Vc/NC->R
Vc/Am
Vc/Am
r
t
Vc/Am
Bl/Am
G/G
G/G
f2

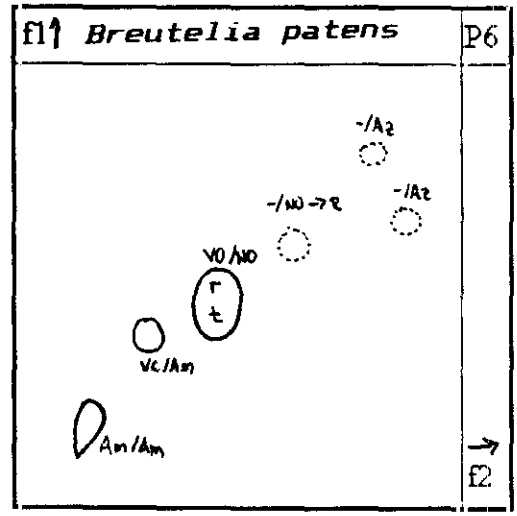

f1 Breutelia pendula
C
Vc/Am
C
Az/Az
Az/Az
-/
NC
Ve/Am
Am/Am
Az/Az
Az/Az
Az/Az
Bl/Bl
Bl/Bl
f2

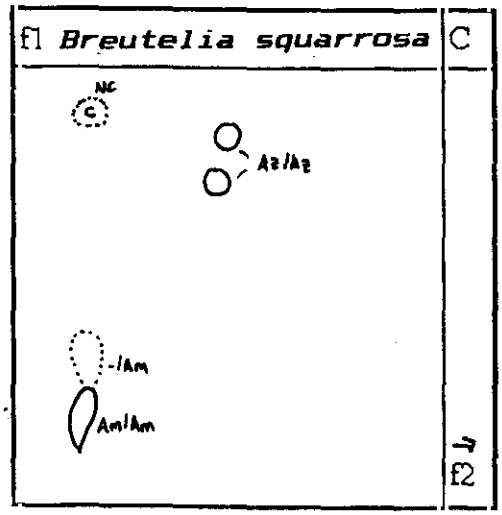

f1 Breutelia pendula
P6
-/Az
-/ Az
-/Am
Bl/Am
Ve
Am/Am
f2

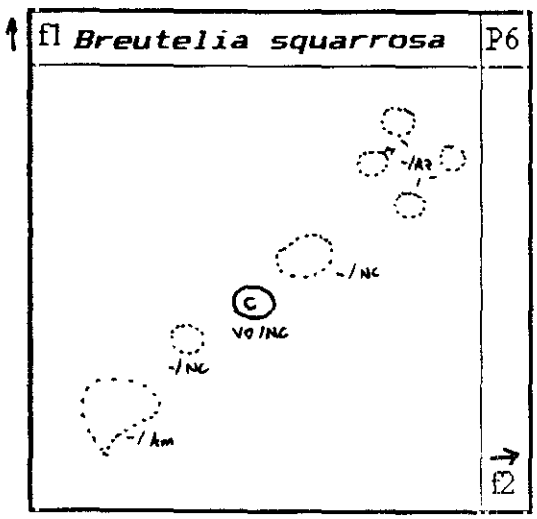

f1 Breutelia mniocarpa
C
VC/Am
-/Am
Az/Az
f2

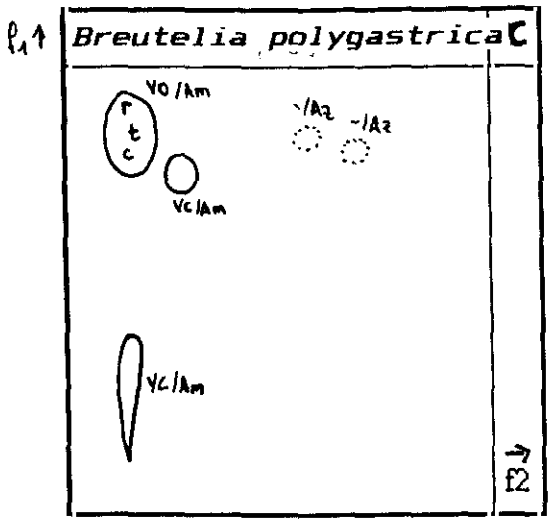

f1 Breutelia mniocarpa
P6
-/Az
VC/Am
-/Am
Am/Am
f2

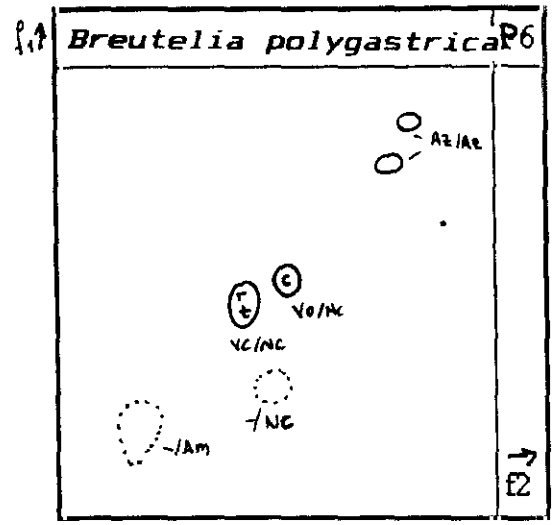

f1 Breutelia patens
C
VO/Am
Az/Az
-/Am
Am/Am
f2

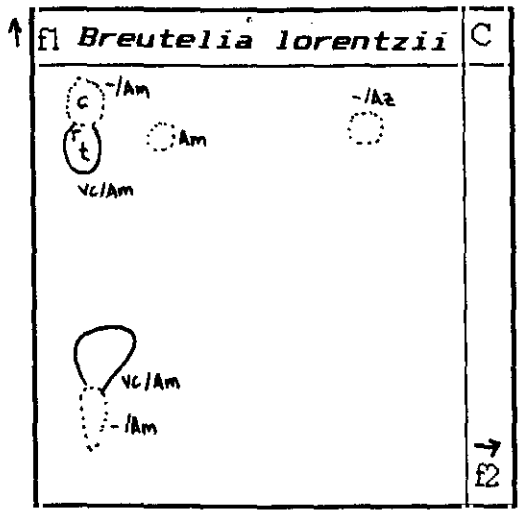

f1 Breutelia patens
P6
-/Az
-/Az
VO/NO
VC/Am
Am/Am
f2

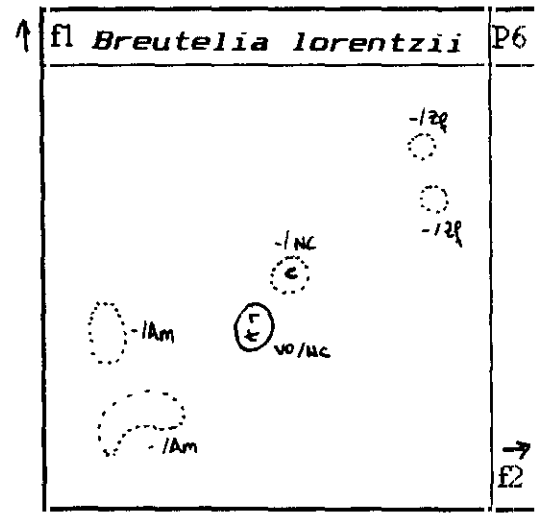

f1 Breutelia squarrosa
C
NC
Az/Az
-/Am
Am/Am
f2

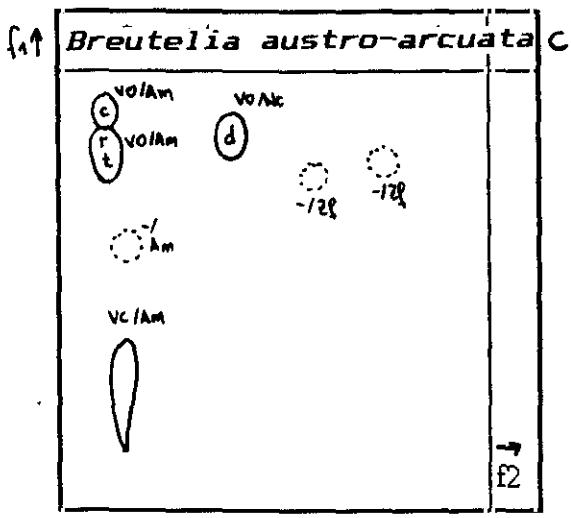

f1 Breutelia squarrosa
P6
-/Az
-/NC
VO/NC
-/NC
-/Am
f2

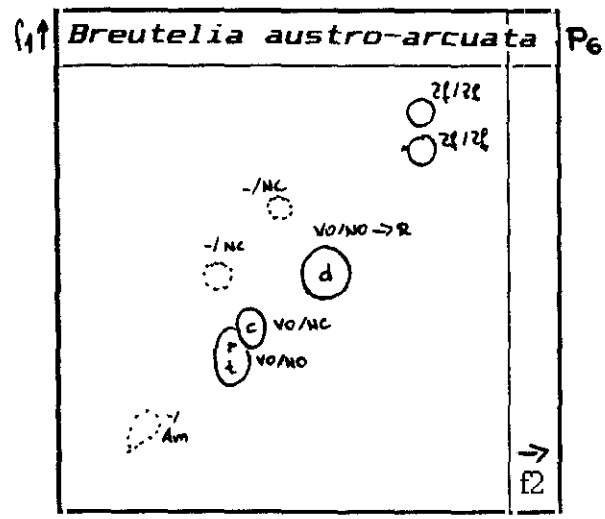

f1
Breutelia polygastrica C
Vo /Am
-/Az
-/Az
Vc/Am
Vc/Am
f2

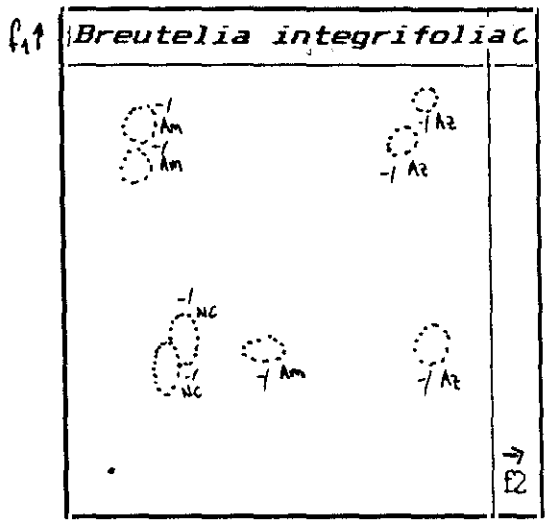

f1
Breutelia polygastrica P6
Az/Az
Vo/Nc
Vc/Nc
-/Nc
-/Am
f2

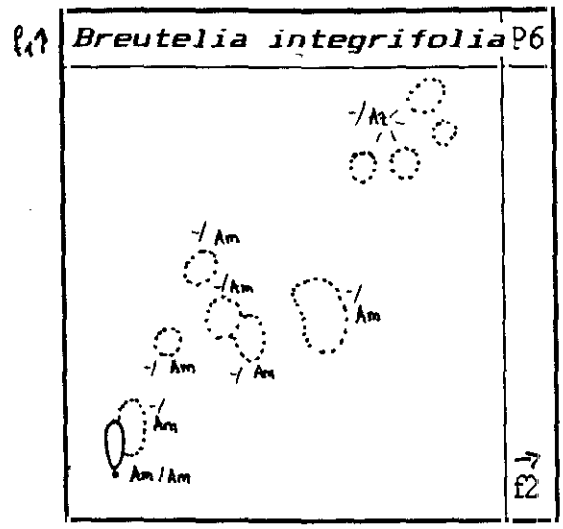

f1 Breutelia lorentzii C
-/Am
-/Az
Am
Vc/Am
Vc/Am
-/Am
f2

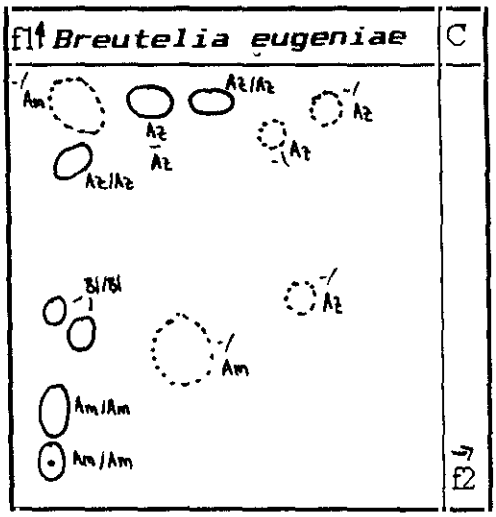

f1 Breutelia lorentzii P6
-/2f
-/2f
-/Nc
-/Am
Vo/Nc
-/Am
f2

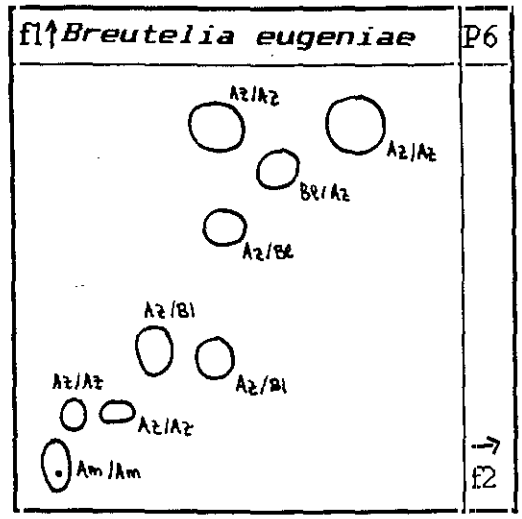

f1
Breutelia austro-arcuata C
Vo/Am
Vo/Nc
Vo/Am
-/2f
-/2f
-/Am
Vc/Am
f2

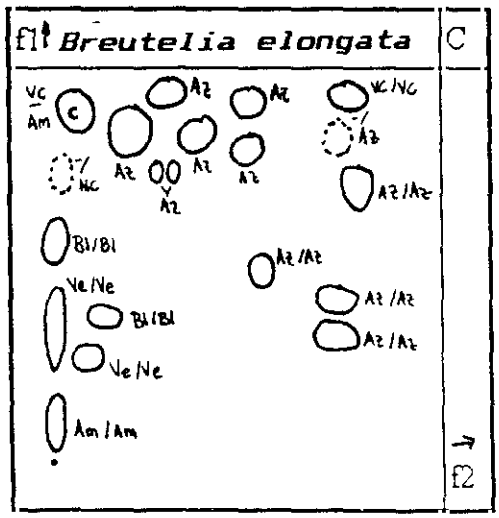

f1
Breutelia austro-arcuata P6
2f/2f
2f/2f
-/Nc
-/Nc
Vo/No → R
Vo/Nc
Vo/No
-/Am
f2

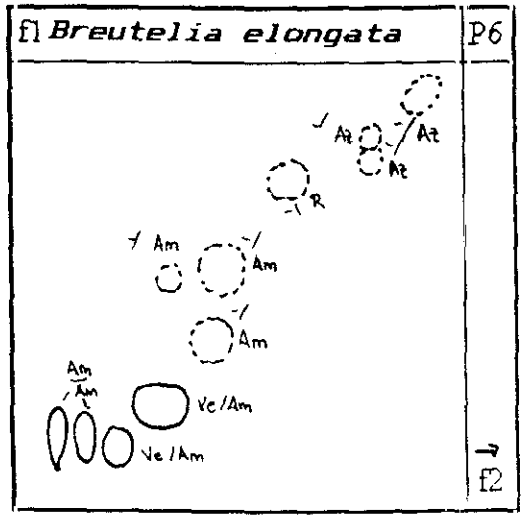

f1
Breutelia integrifolia C
Am
Az
NC
f2

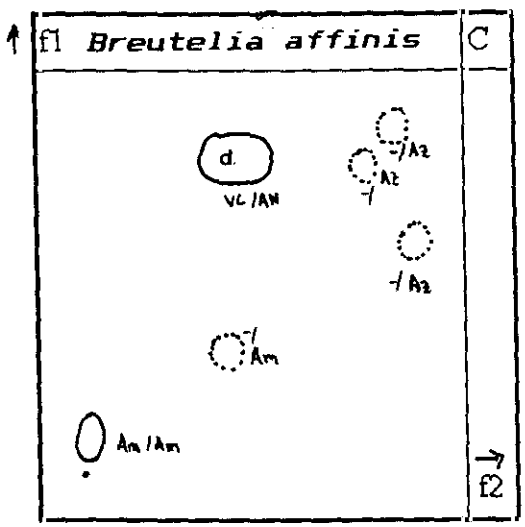

f1
Breutelia integrifolia P6
Az
Am
Am/Am
f2

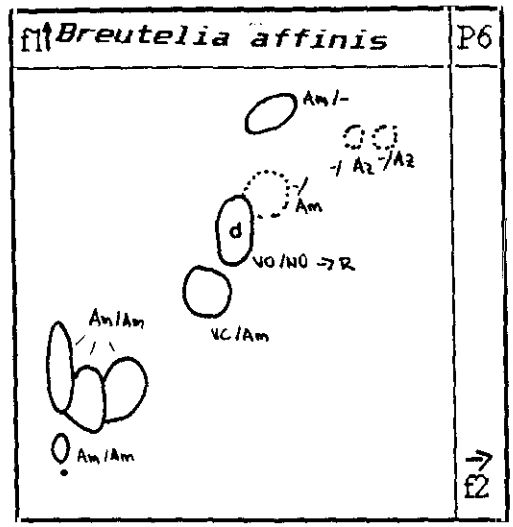

f1
Breutelia eugeniae C
Am
Az
Az/Az
Bl/Bl
Am/Am
f2

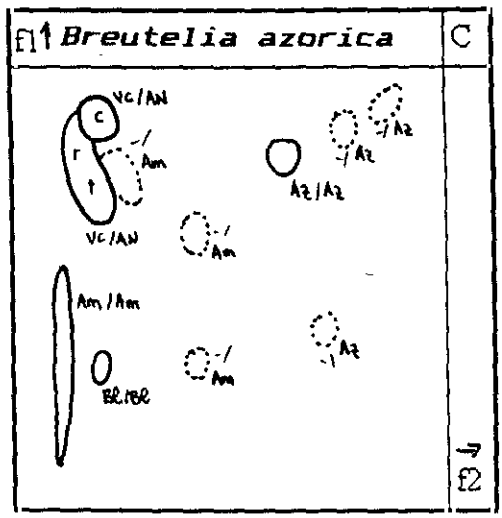

f1
Breutelia eugeniae P6
Az/Az
Bl/Az
Az/Bl
Am/Am
f2

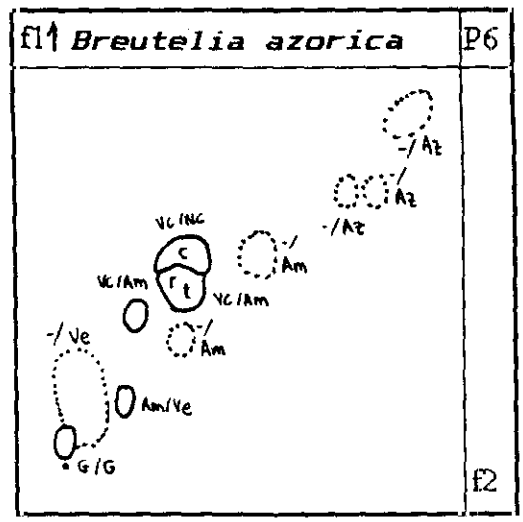

f1
Breutelia elongata C
Vc
Am
Az
NC
Vc/Vc
Az/Az
Bl/Bl
Ve/Ve
Am/Am
f2

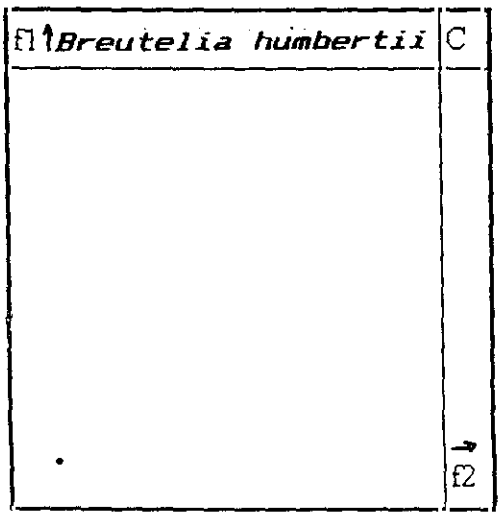

f1
Breutelia elongata P6
Az
R
Am
Ve/Am
f2

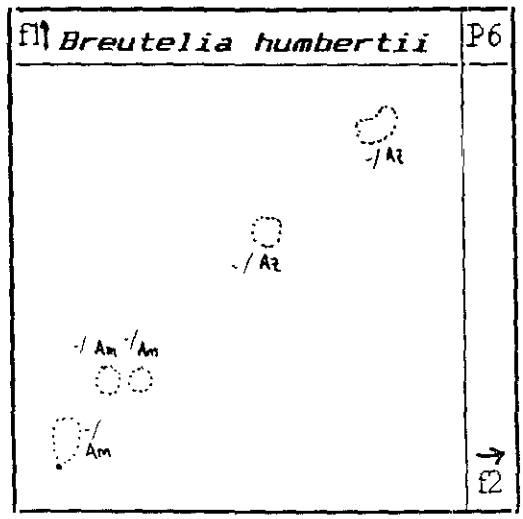

f1 Breutelia affinis
C
d
VC/AN
-/Az
Az
-/Az
-/Am
Am/Am
f2

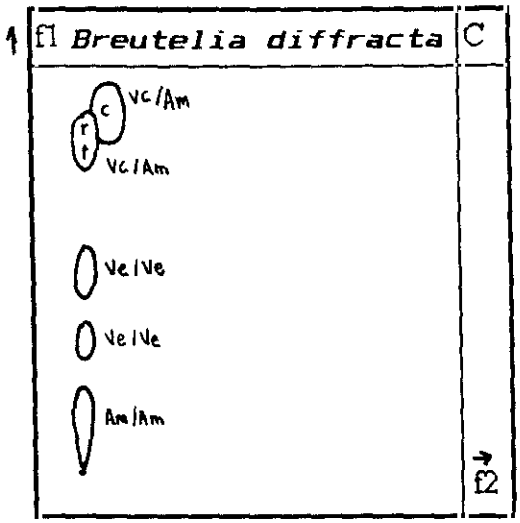

f1 Breutelia affinis
P6
Am/-
-/Az
-/Az
-/Am
d
VO/NO → R
VC/Am
Am/Am
Am/Am
f2

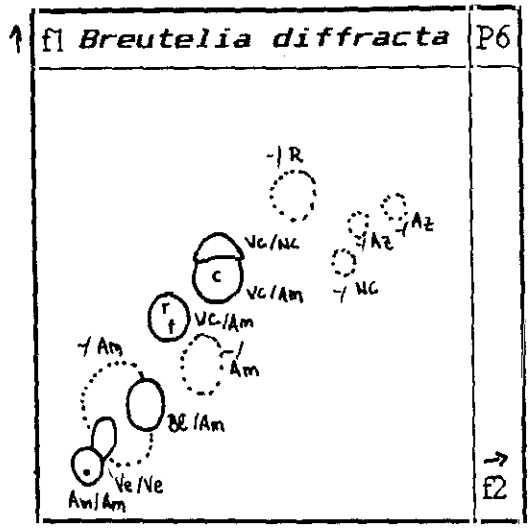

f1 Breutelia azorica
C
VC/AN
c
r
t
-/Am
VC/AN
-/Az
-/Az
Az/Az
-/Am
Am/Am
BR/BR
-/Am
Az
f2

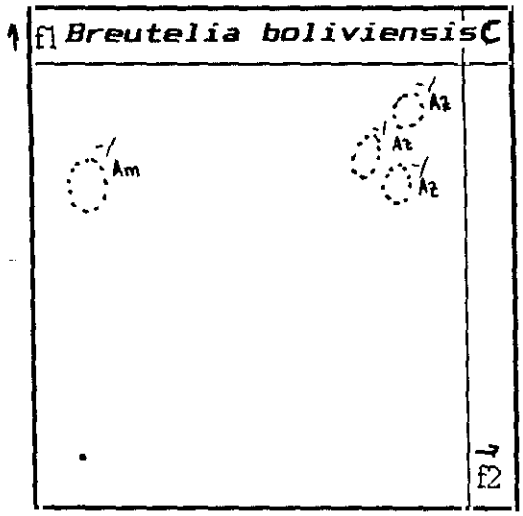

f1 Breutelia azorica
P6
-/Az
-/Az
-/Az
VC/NC
c
r
t
-/Am
VC/Am
VC/Am
-/Am
-/Ve
Am/Ve
G/G
f2

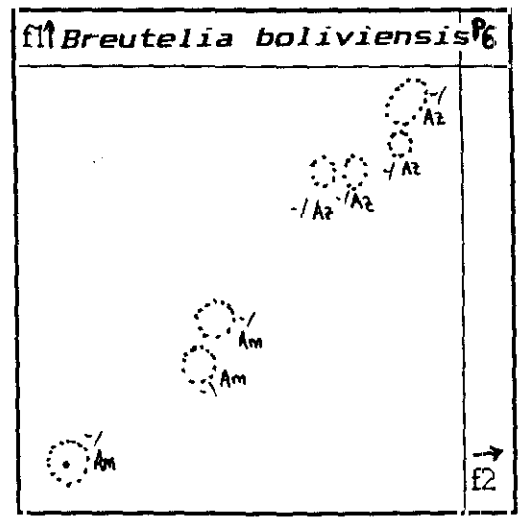

f1 Breutelia humbertii
C
f2

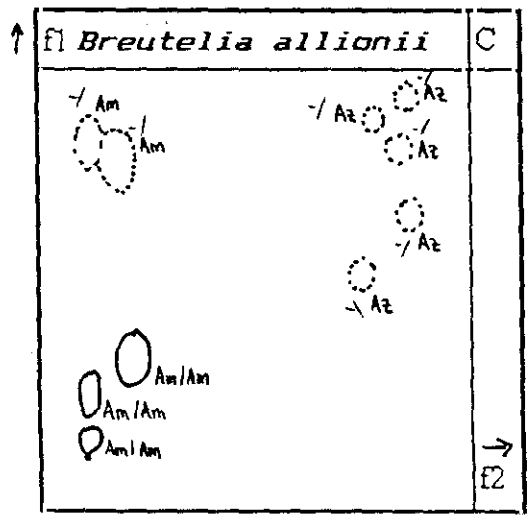

f1 Breutelia humbertii
P6
-/Az
-/Az
-/Am
-/Am
-/Am
f2

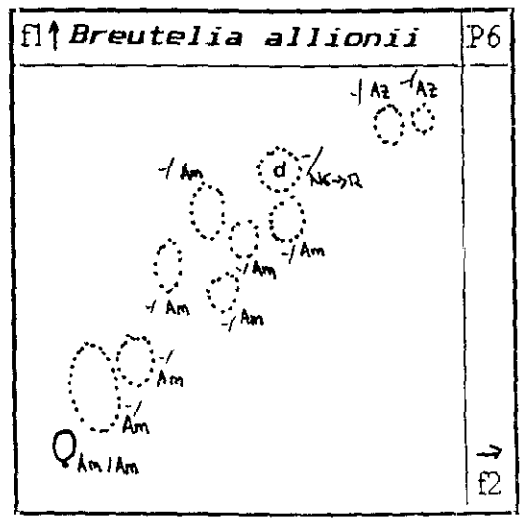

f1 Breutelia diffracta
C
c
r
f
Vc/Am
Vc/Am
Ve/Ve
Ve/Ve
Am/Am
f2

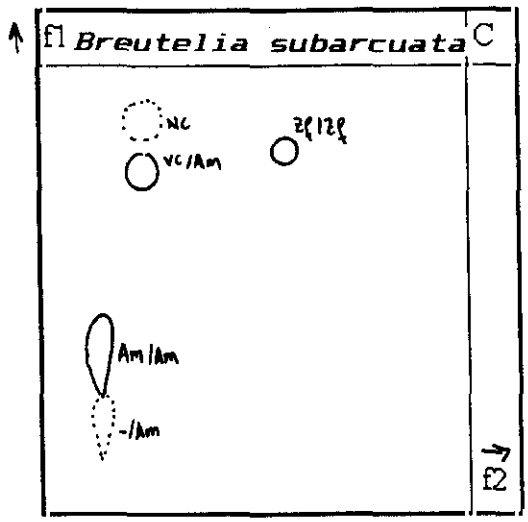

f1 Breutelia diffracta
P6
-/R
-/Az
-/Az
Vc/Nc
c
Vc/Am
-/Nc
r
f
Vc/Am
-/Am
-/Am
Bc/Am
Ve/Ve
Am/Am
f2

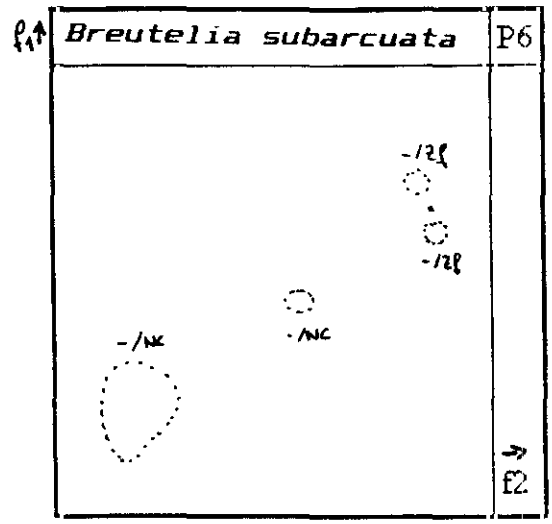

f1 Breutelia boliviensis
C
-/Am
-/Az
-/Az
-/Az
f2

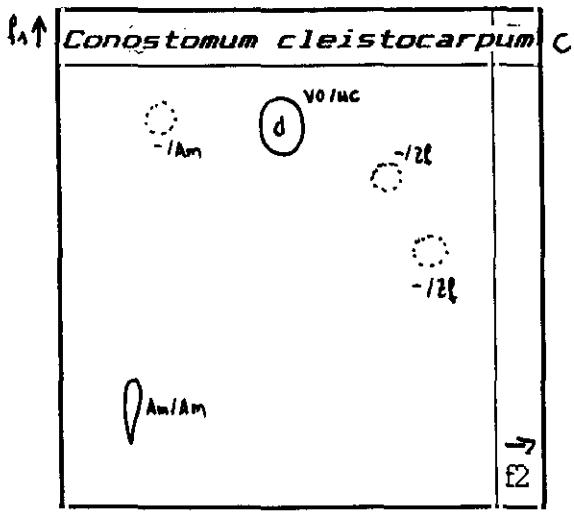

f1 Breutelia boliviensis
P6
-/Az
-/Az
-/Az
-/Az
-/Az
Am
Am
-/Am
f2

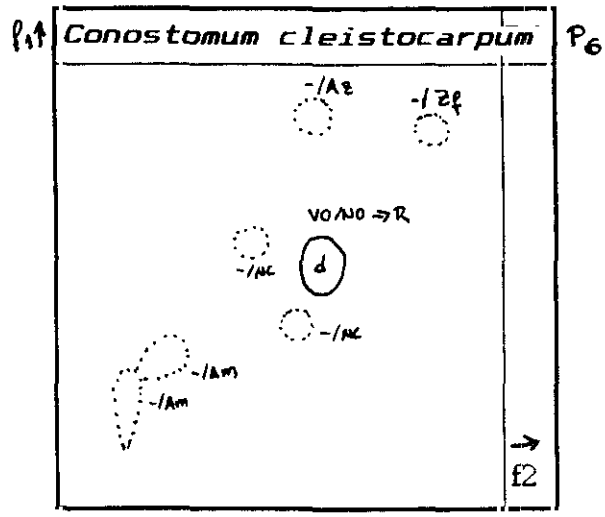

f1 Breutelia allionii
C
-/Am
-/Am
-/Az
-/Az
-/Az
-/Az
Am/Am
Am/Am
Am/Am
f2

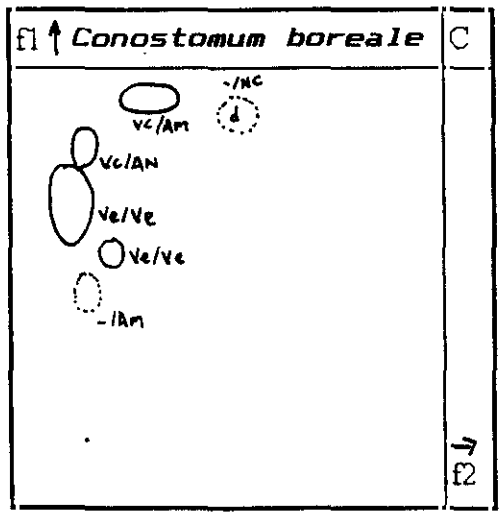

f1 Breutelia allionii
P6
-/Az
-/Az
-/Am
d
-/Nc→Bc
-/Am
-/Am
-/Am
-/Am
-/Am
-/Am
Am/Am
f2

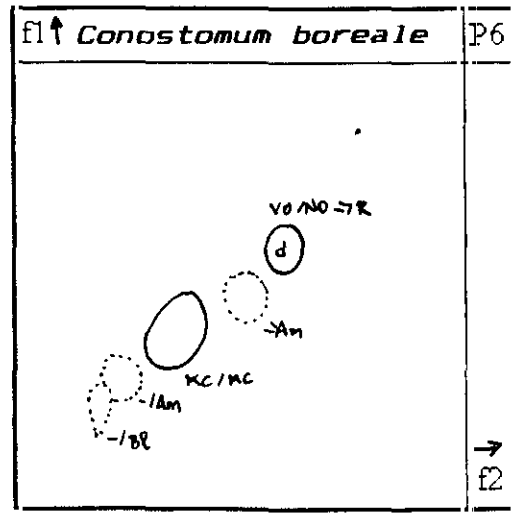

f1 Breutelia subarcuata C
NC
2ℓ/2ℓ
Vc/Am
Am/Am
-/Am
f2

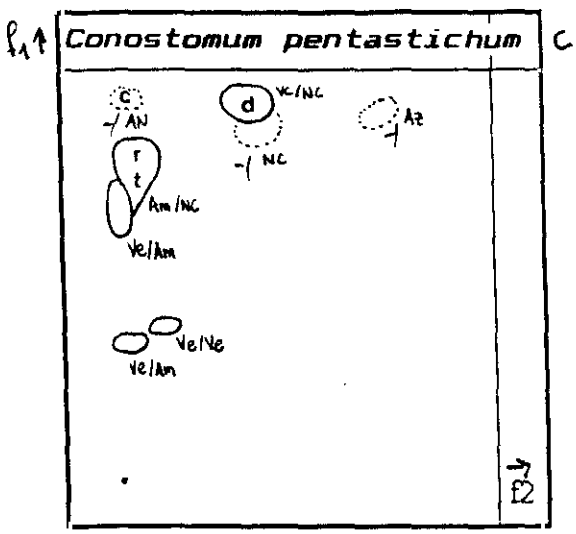

f1 Breutelia subarcuata P6
-/2ℓ
-/2ℓ
-/NC
-/NC
f2

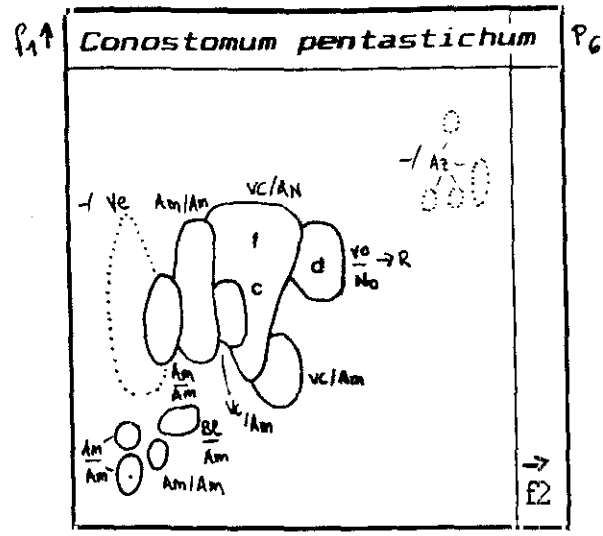

f1 Conostomum cleistocarpum C
Vo/NC
-/Am
-/2ℓ
-/2ℓ
Am/Am
f2

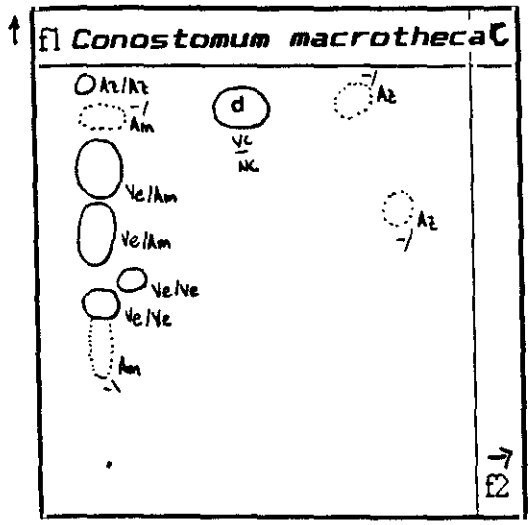

f1 Conostomum cleistocarpum P6
-/Aℓ
-/2ℓ
Vo/No → R
-/NC
-/NC
-/Am
-/Am
f2

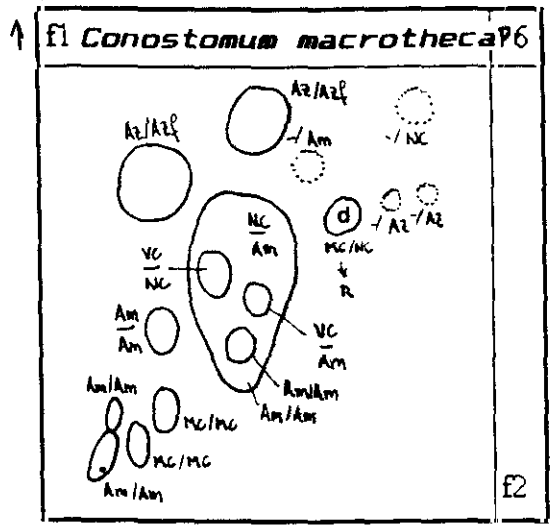

f1 Conostomum boreale C
-/NC
Vc/Am
Vc/AN
Ve/Ve
Ve/Ve
-/Am
f2

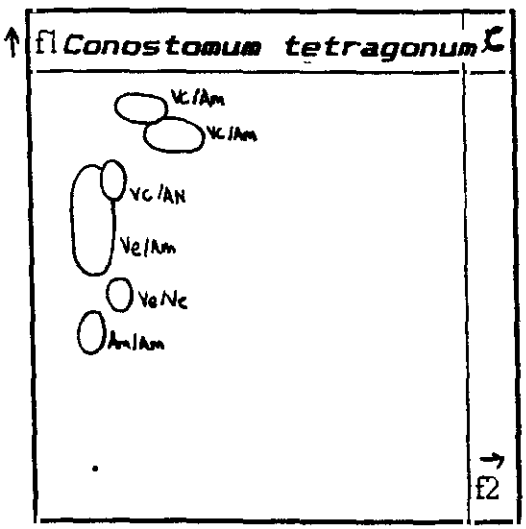

f1 Conostomum boreale P6
Vo/No → R
-Am
Kc/NC
-/Am
-/Bℓ
f2

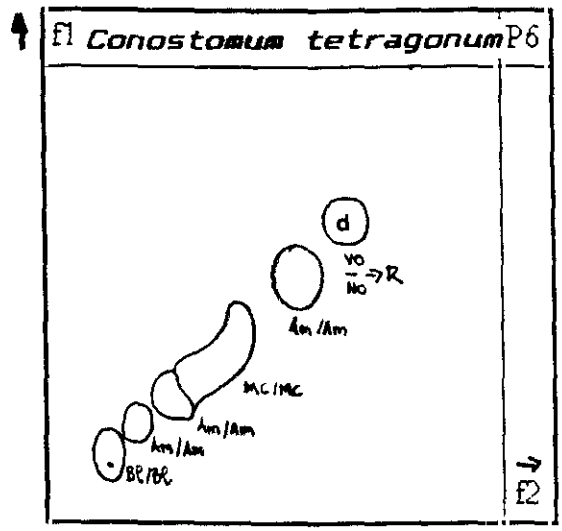

f1
Conostomum pentastichum
C
f2

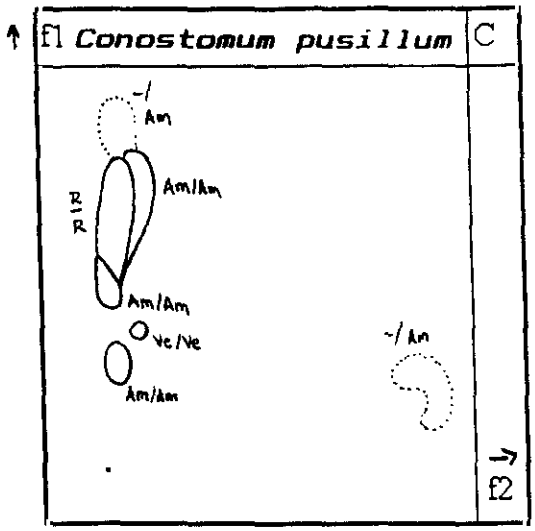

f1
Conostomum pentastichum
P6
f2

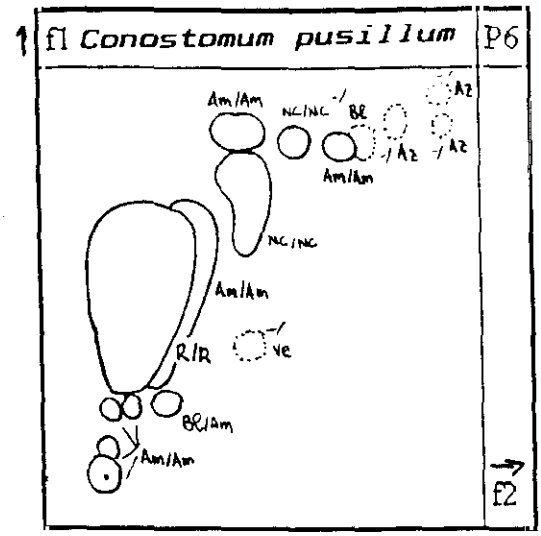

f1
Conostomum macrotheca
C
f2

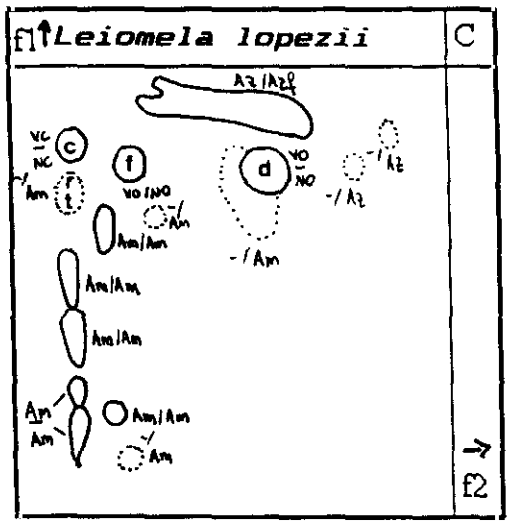

f1
Conostomum macrotheca
P6
f2

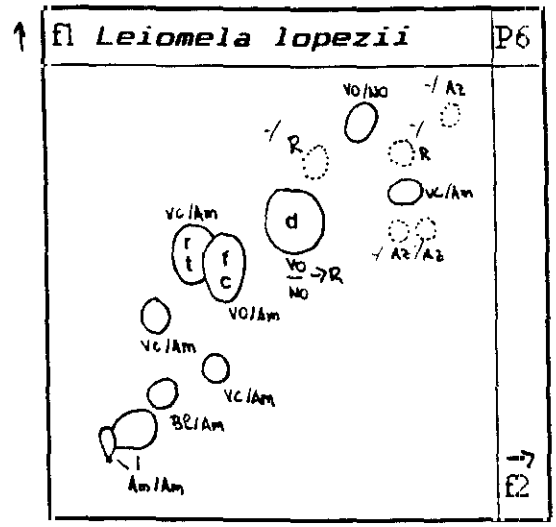

f1
Conostomum tetragonum
C
f2

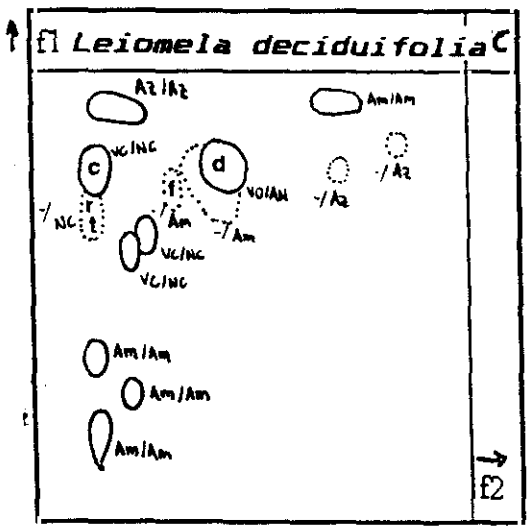

f1
Conostomum tetragonum
P6
f2

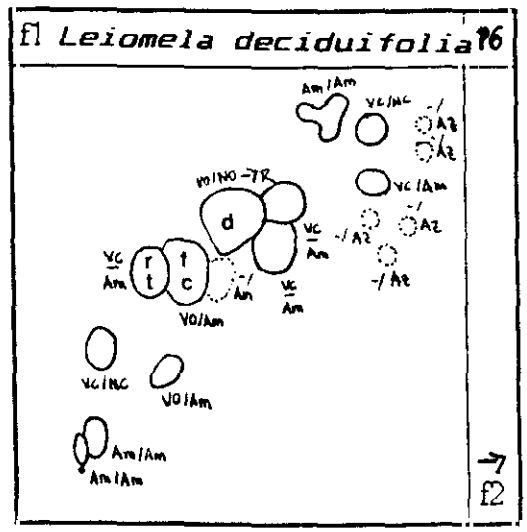

f1 Conostomum pusillum
C
f2

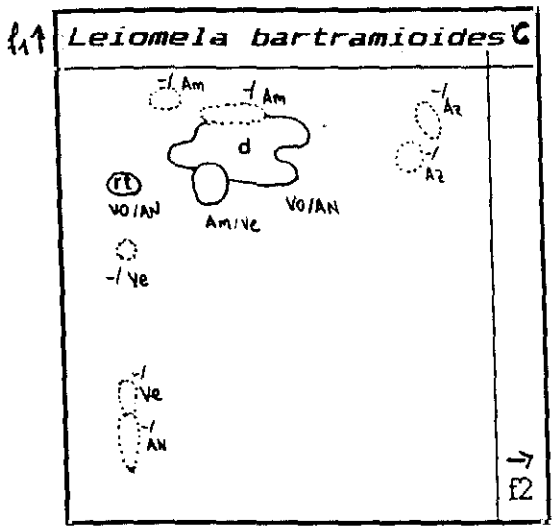

f1 Conostomum pusillum
P6
f2

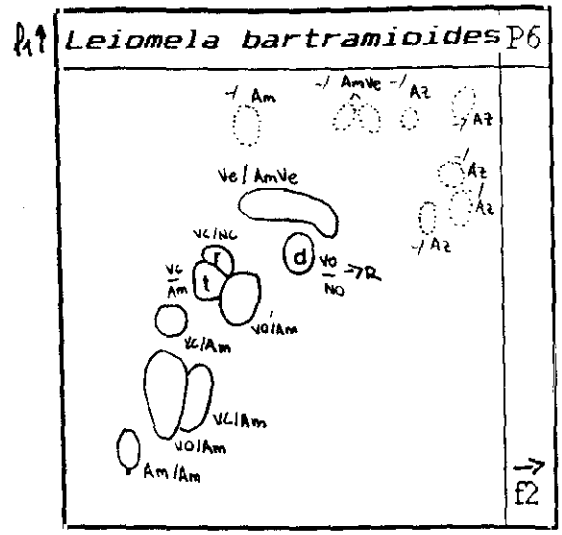

f1 Leiomela lopezii
C
f2

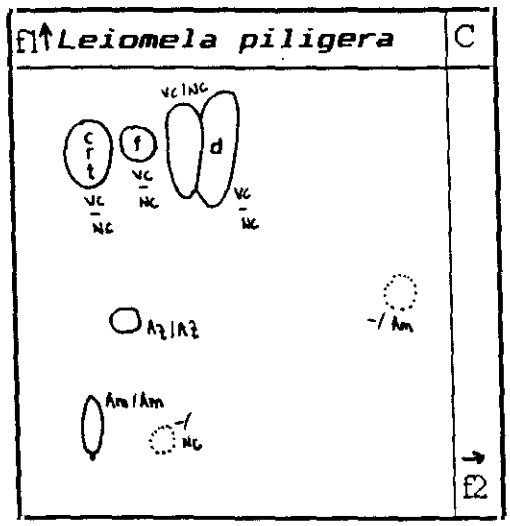

f1 Leiomela lopezii
P6
f2

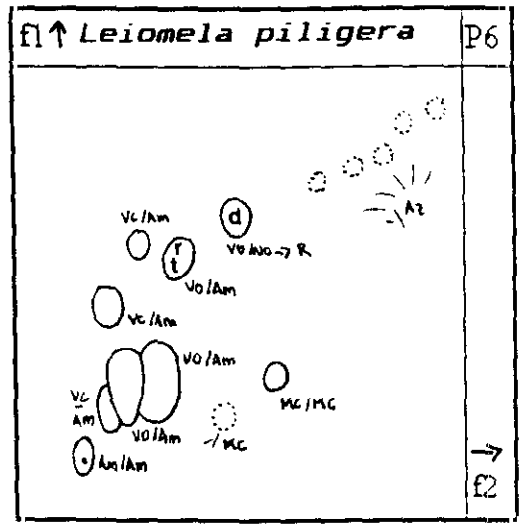

f1 Leiomela deciduifolia
C
f2

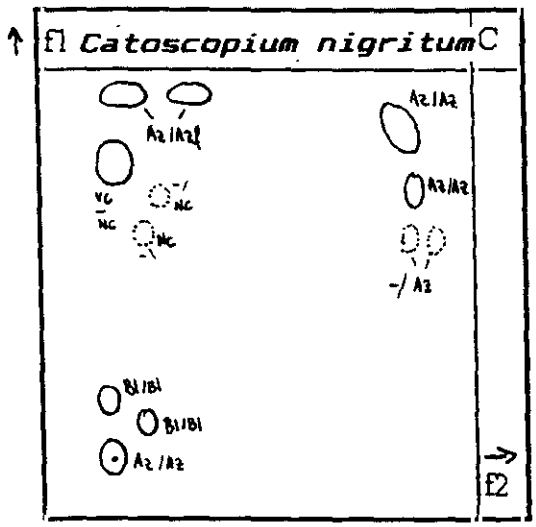

f1 Leiomela deciduifolia
P6
f2

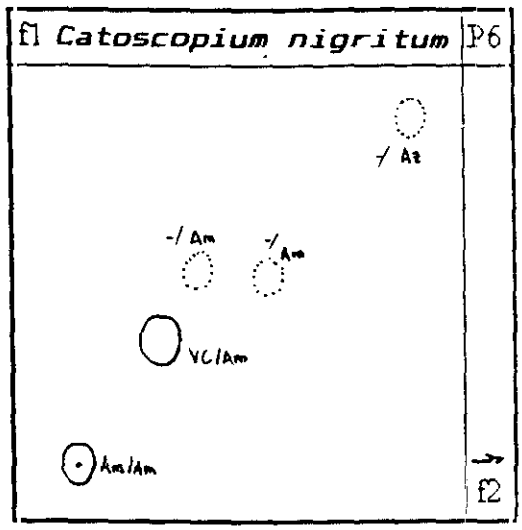

f1
Leiomela bartramioides
C
-/ Am
-/ Am
-/ Az
-/ Az
d
rt
VO/AN
Am/Ve
VO/AN
-/ Ve
-/ Ve
-/ AN
f2

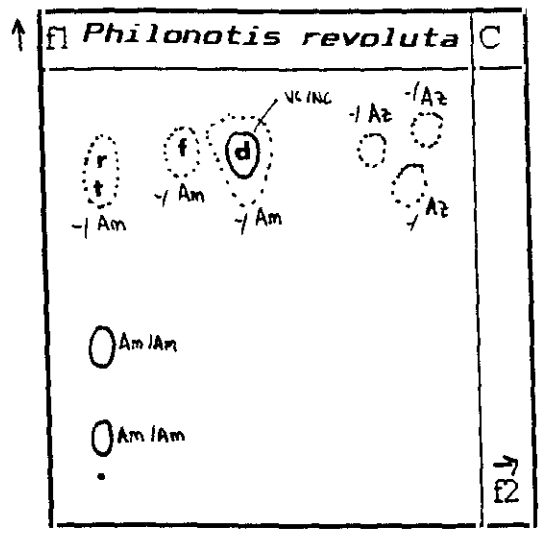

f1
Leiomela bartramioides
P6
-/ Am
-/ AmVe
-/ Az
-/ Az
Ve/AmVe
-/ Az
-/ Az
-/ Az
VC/NC
r
t
d
VO/NO → R
VC/Am
VO/Am
VC/Am
VC/Am
VO/Am
Am/Am
f2

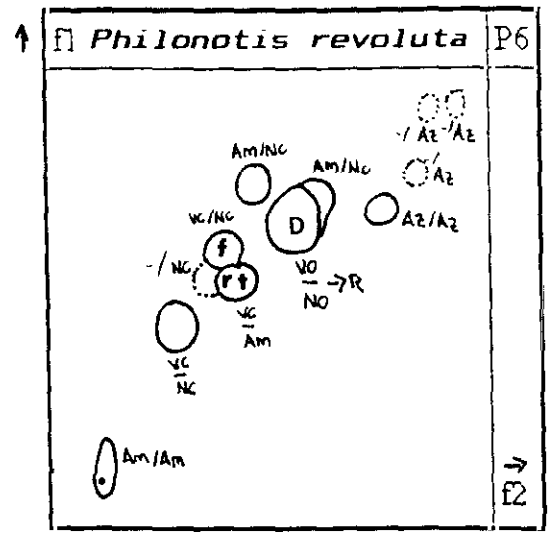

f1
Leiomela piligera
C
VC/NC
c
r
t
f
d
VC/NC
VC/NC
VC/NC
Az/Az
-/ Am
Am/Am
-/ NC
f2

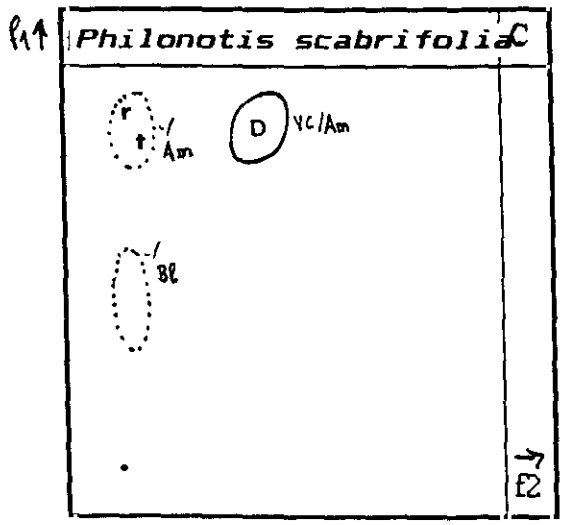

f1
Leiomela piligera
P6
Az
VC/Am
d
VO/NO → R
r
t
VO/Am
VC/Am
VO/Am
MC/MC
VC/Am
VO/Am
-/ MC
Am/Am
f2

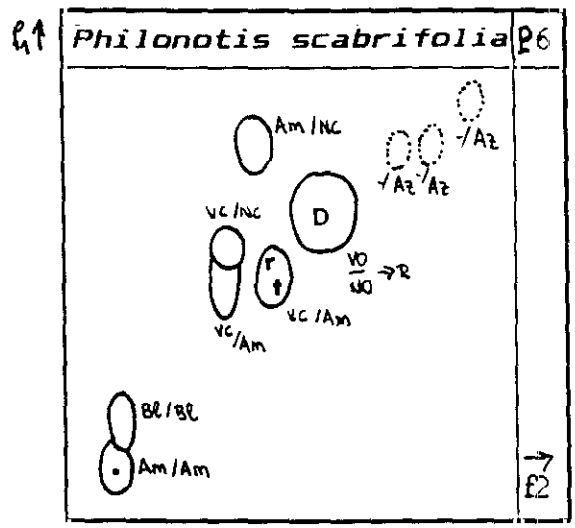

f1
Catoscopium nigritum
C
Az/Az
Az/Az
VC/NC
-/ NC
-/ NC
Az/Az
-/ Az
Bl/Bl
Bl/Bl
Az/Az
f2

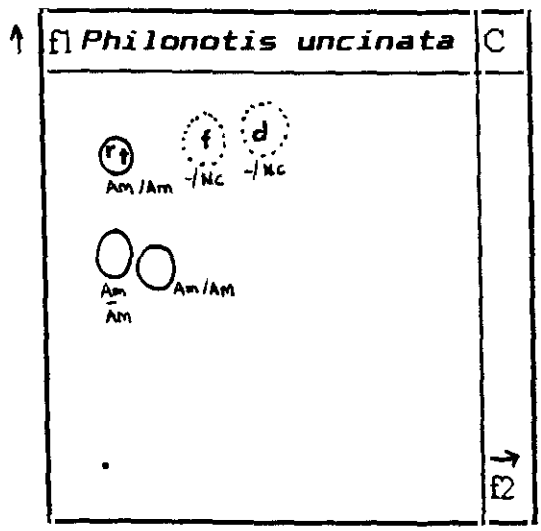

f1
Catoscopium nigritum
P6
-/ Az
-/ Am
-/ Am
VC/Am
Am/Am
f2

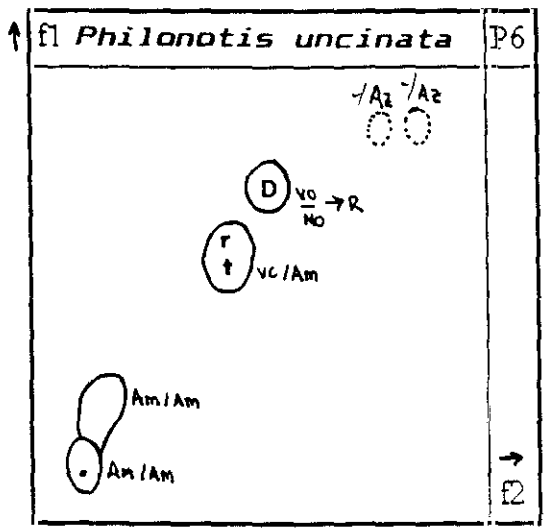

f1 Philonotis revoluta
C
f2

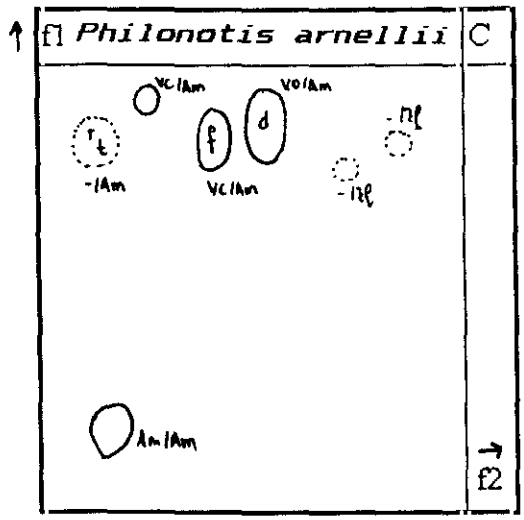

f1 Philonotis revoluta
P6
f2

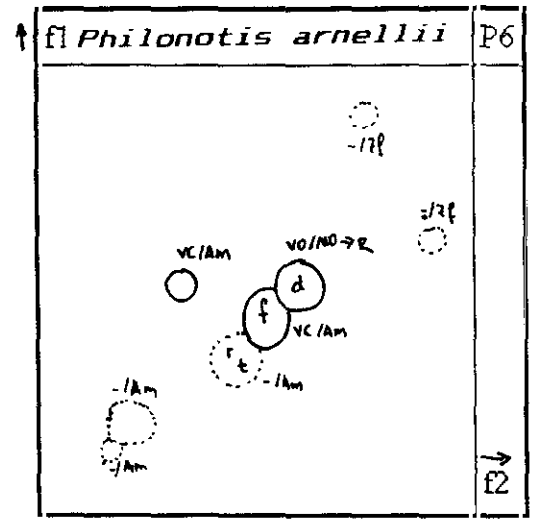

f1
Philonotis scabrifolia
C
f2

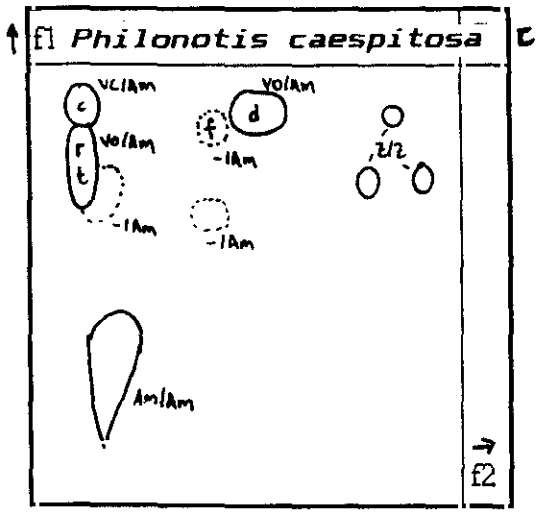

f1
Philonotis scabrifolia
P6
f2

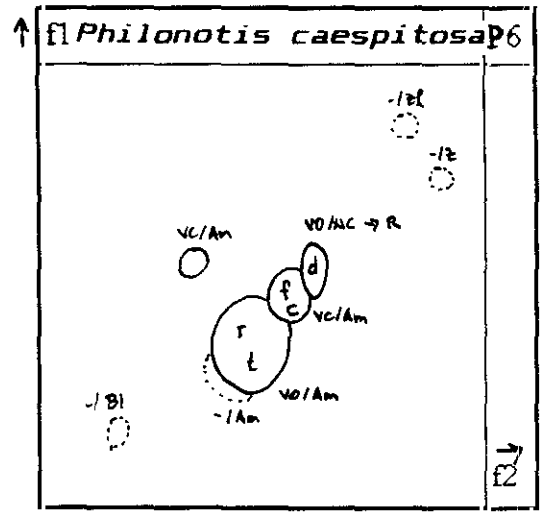

f1 Philonotis uncinata
C
f2

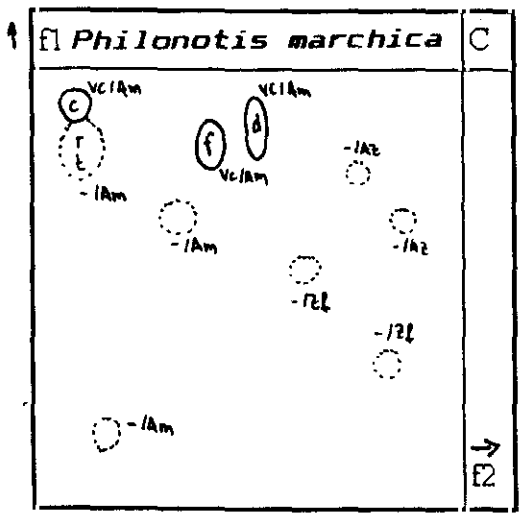

f1 Philonotis uncinata
P6
f2

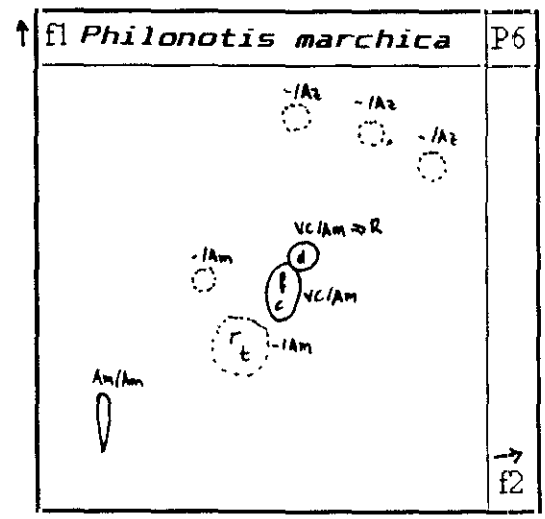

f1 Philonotis arnellii
C
VC/Am
VO/Am
-/Am
VC/Am
-/Zl
Am/Am
f2

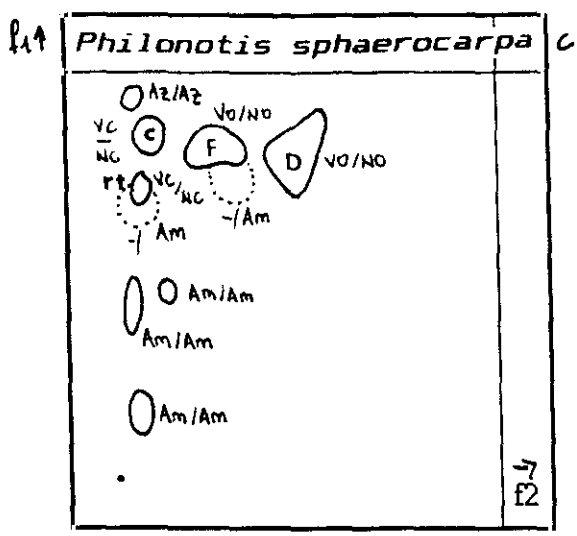

f1 Philonotis arnellii
P6
-/Zl
VC/Am
VO/NO → R
VC/Am
-/Am
-/Am
f2

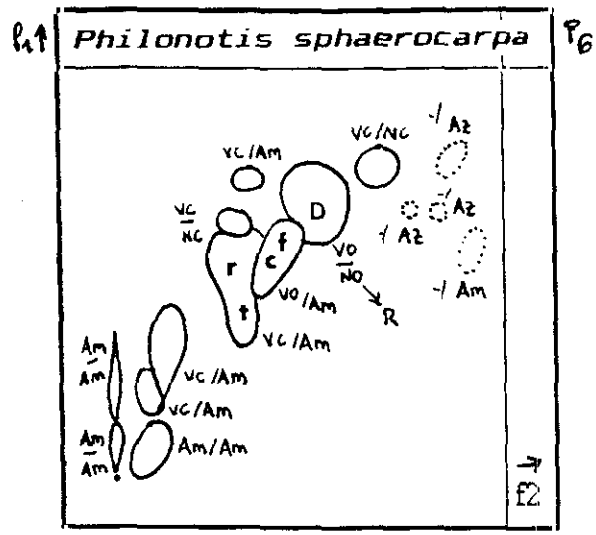

f1 Philonotis caespitosa
C
VC/Am
VO/Am
VO/Am
-/Am
-/Am
-/Am
Am/Am
f2

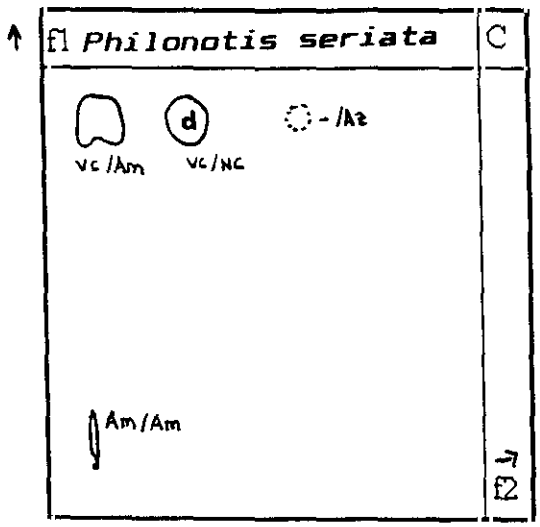

f1 Philonotis caespitosa
P6
-/Zl
-/Z
VC/Am
VO/NC → R
VC/Am
VO/Am
-/Am
-/Bl
f2

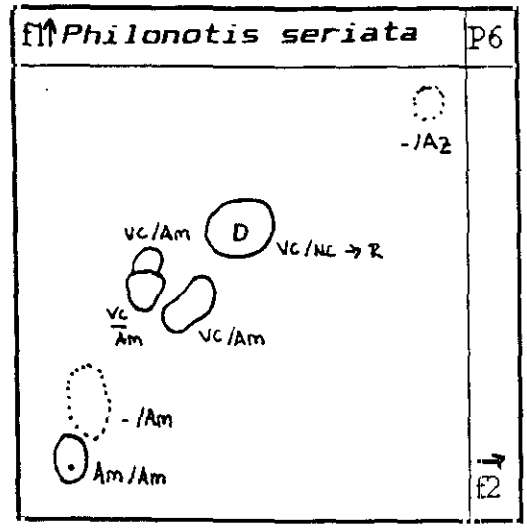

f1 Philonotis marchica
C
VC/Am
VC/Am
-/Am
VC/Am
-/Az
-/Am
-/Az
-/Zl
-/Zl
-/Am
f2

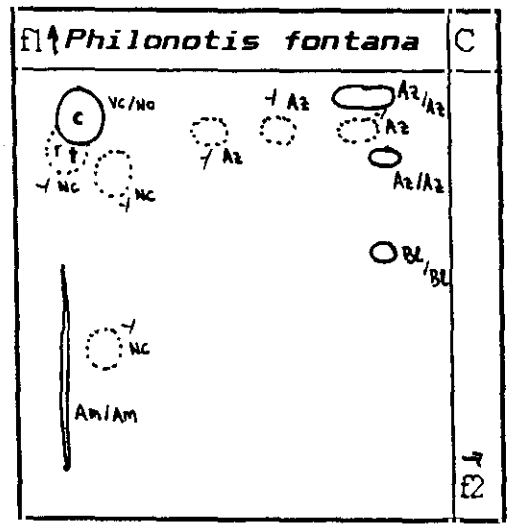

f1 Philonotis marchica
P6
-/Az
-/Az
-/Az
VC/Am → R
-/Am
VC/Am
-/Am
Am/Am
f2

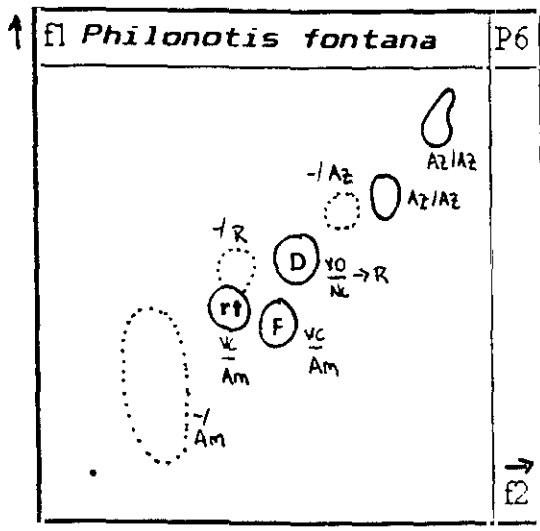

f1
Philonotis sphaerocarpa
C
Az/Az
Vo/No
Vc/Nc
c
F
D
Vo/No
rf
Vc/Nc
-/Am
-/Am
Am/Am
Am/Am
Am/Am
f2

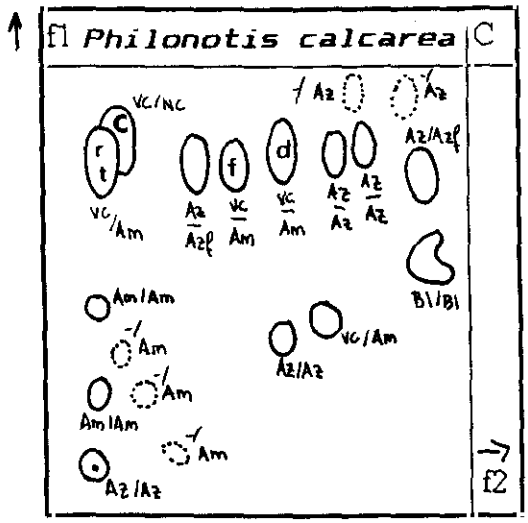

f1
Philonotis sphaerocarpa
P6
Vc/Am
Vc/Nc
-/Az
D
Vc/Nc
-/Az
f
r
c
-/Az
Vo/No
t
Vo/Am
R
-/Am
Vc/Am
Am/Am
Vc/Am
Vc/Am
Am/Am
f2

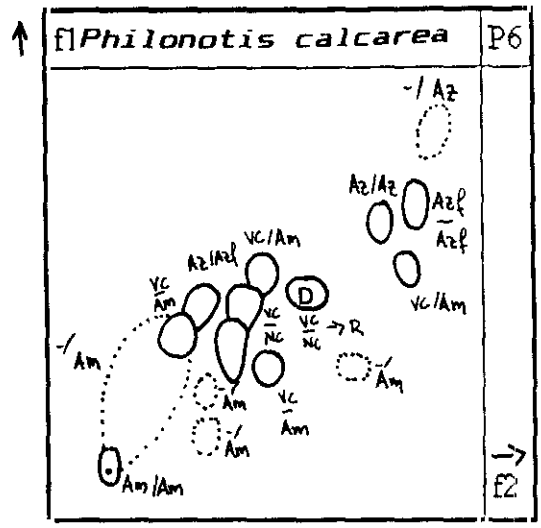

f1
Philonotis seriata
C
d
-/Az
Vc/Am
Vc/Nc
Am/Am
f2

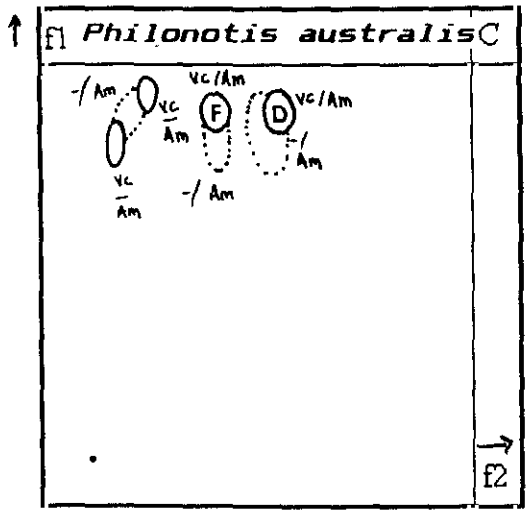

f1
Philonotis seriata
P6
-/Az
Vc/Am
D
Vc/Nc → R
Vc/Am
Vc/Am
-/Am
Am/Am
f2

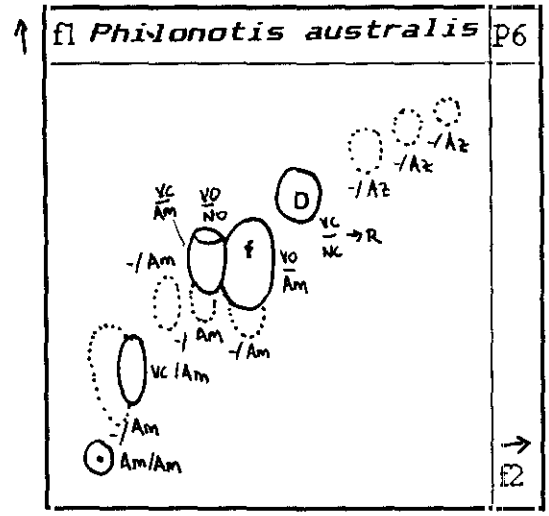

f1
Philonotis fontana
C
c
Vc/No
-/Az
Az/Az
Az
-/Nc
-/Nc
-/Az
Az/Az
Bl/Bl
-/Nc
Am/Am
f2

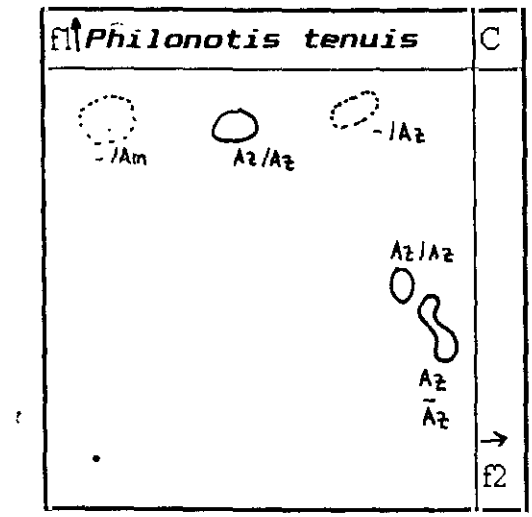

f1
Philonotis fontana
P6
Az/Az
-/Az
Az/Az
-/R
D
Vo/Nc → R
rf
F
Vc/Am
Vc/Am
-/Am
f2

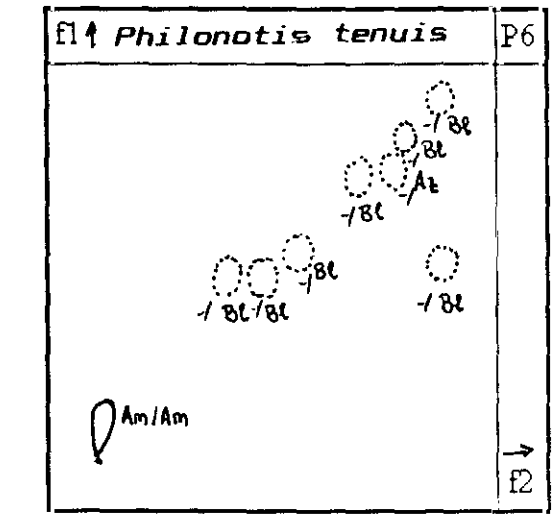

f1 Philonotis calcarea
C
f2

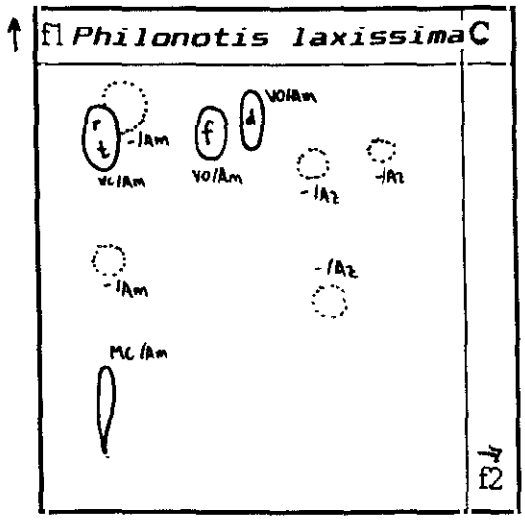

f1 Philonotis calcarea
P6
f2

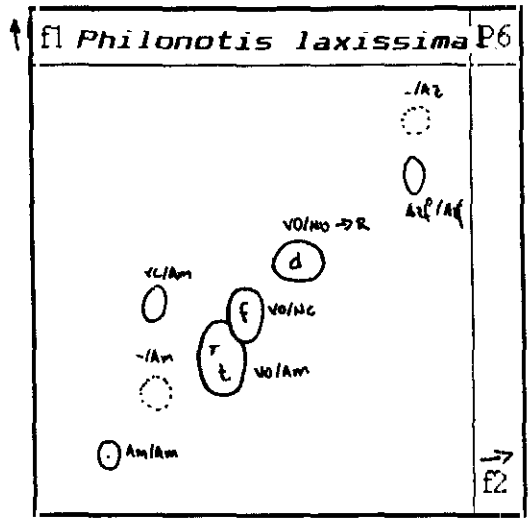

f1 Philonotis australis
C
f2

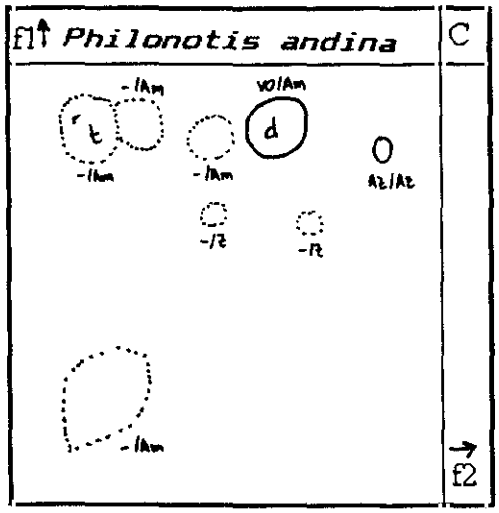

f1 Philonotis australis
P6
f2

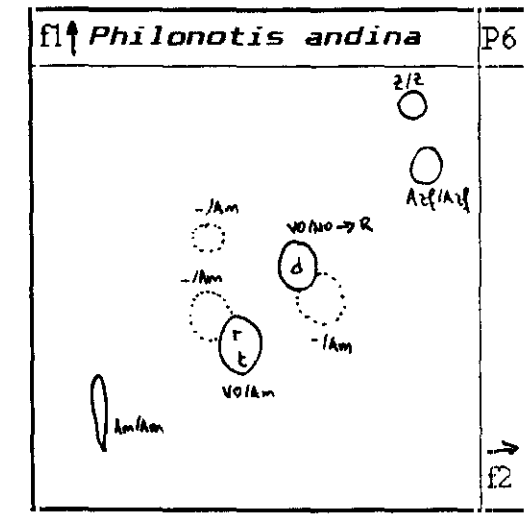

f1 Philonotis tenuis
C
f2

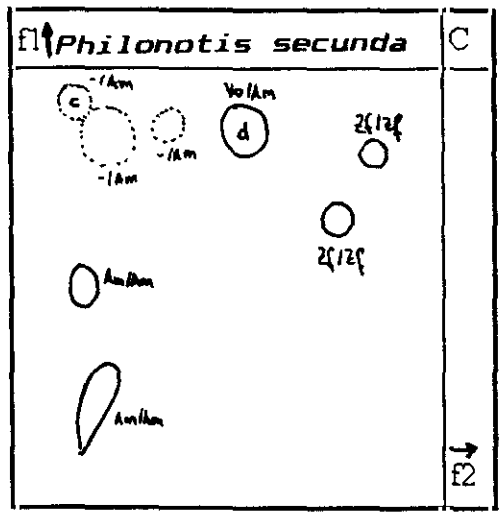

f1 Philonotis tenuis
P6
f2

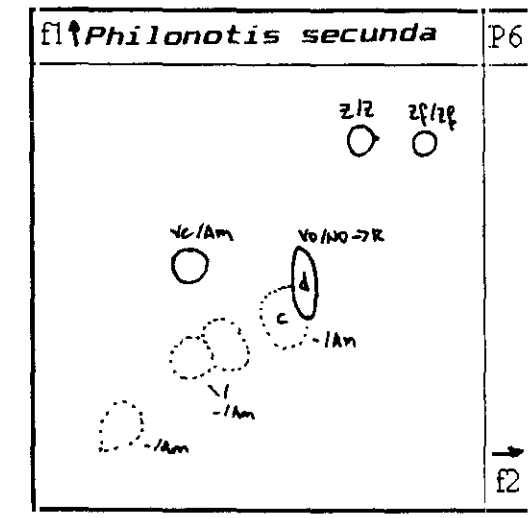

f1 Philonotis laxissima C
f2

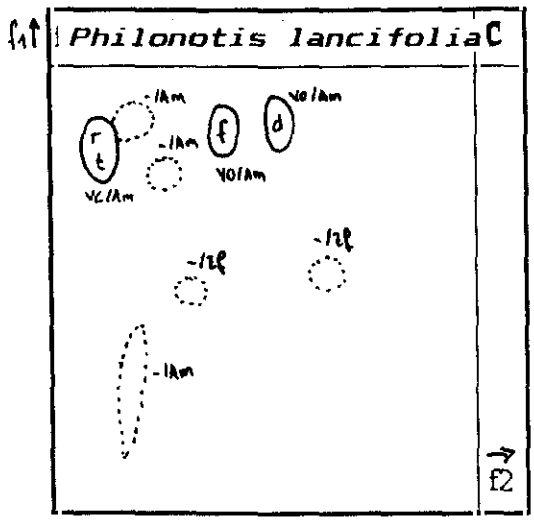

f1 Philonotis laxissima P6
f2

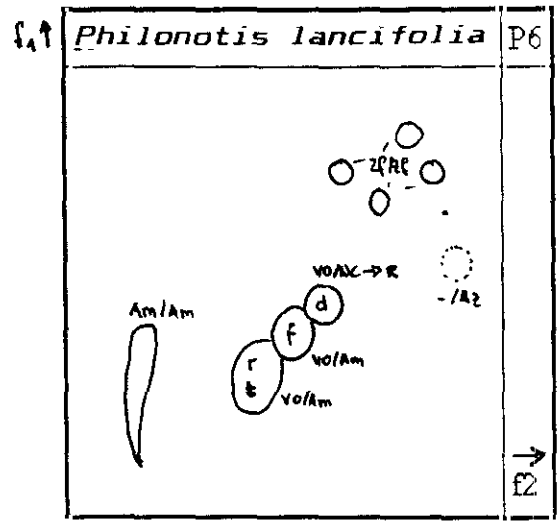

f1 Philonotis andina C
f2

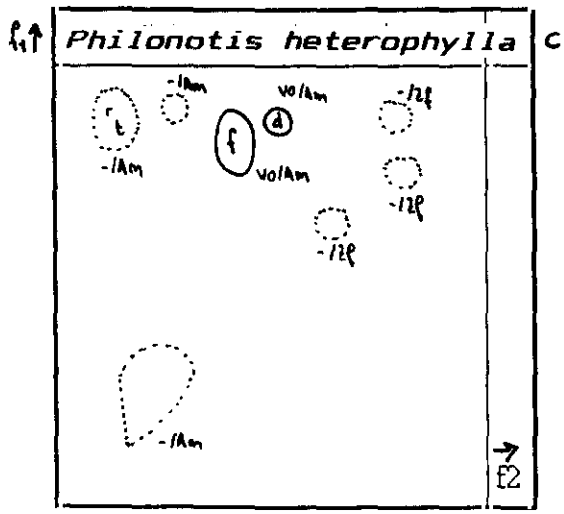

f1 Philonotis andina P6
f2

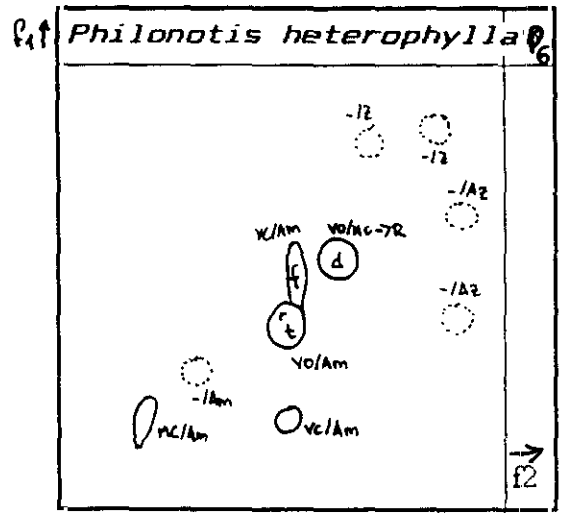

f1 Philonotis secunda C
f2

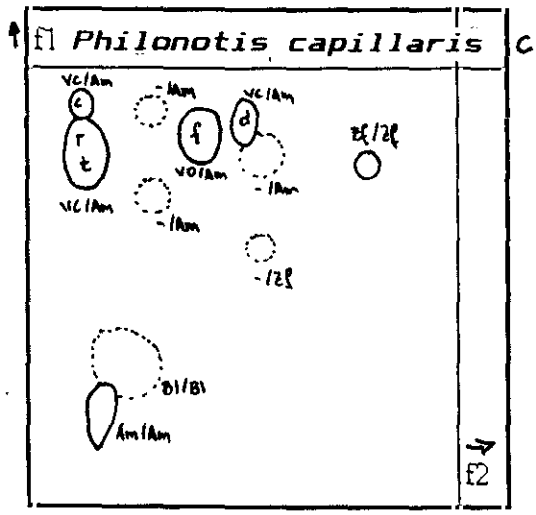

f1 Philonotis secunda P6
f2

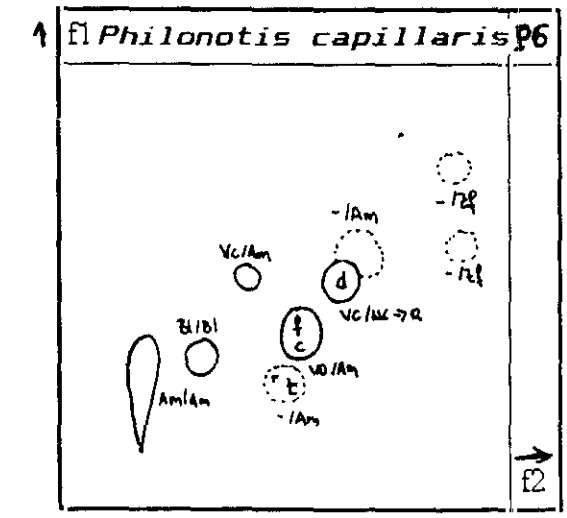

f1
Philonotis lancifolia
C
-/Am
VO/Am
VC/Am
-/Zf
f2

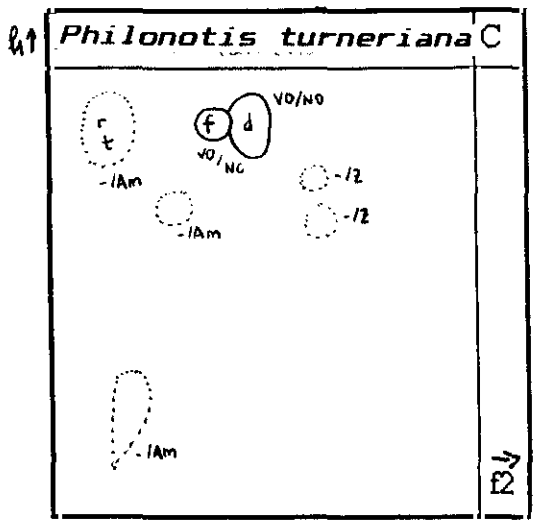

f1
Philonotis lancifolia
P6
Am/Am
VO/Am
-/Az
f2

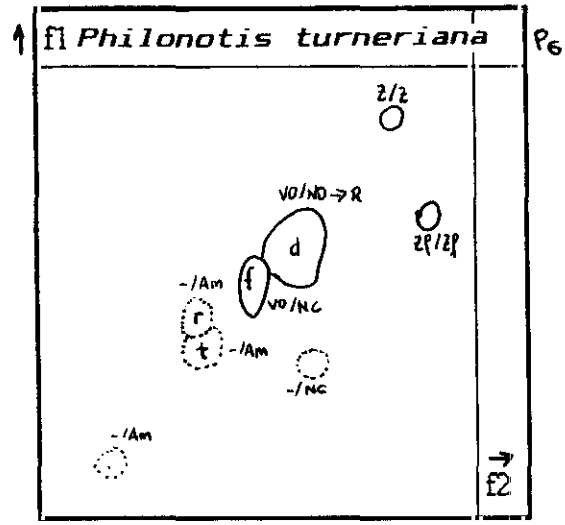

f1
Philonotis heterophylla
C
-/Am
VO/Am
-/Zf
f2

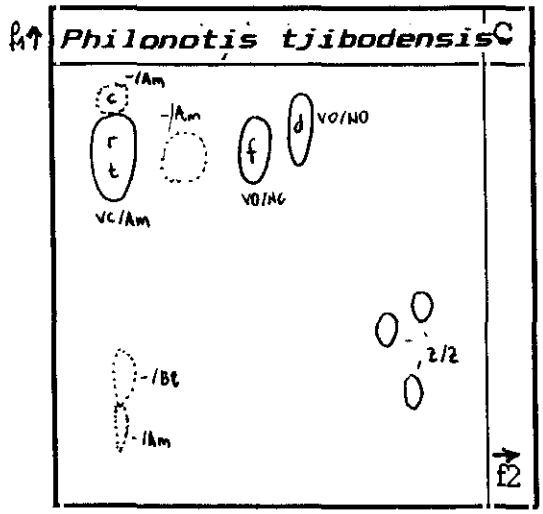

f1
Philonotis heterophylla
P6
-/Z
-/Az
VC/Am
VO/Am
-/Am
f2

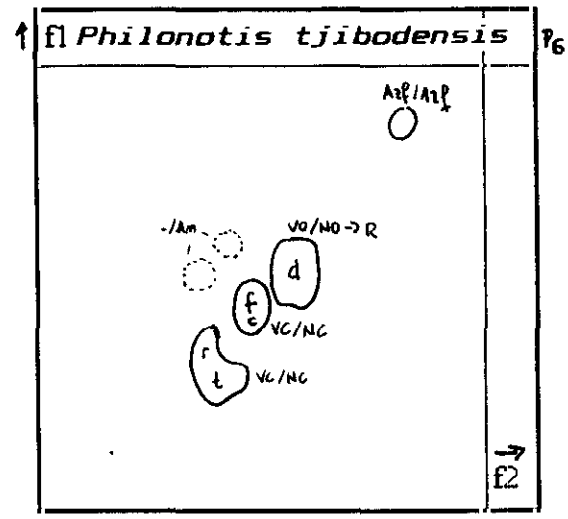

f1
Philonotis capillaris
C
VC/Am
-/Am
VO/Am
Zf/Zf
-/Zf
Bl/Bl
Am/Am
f2

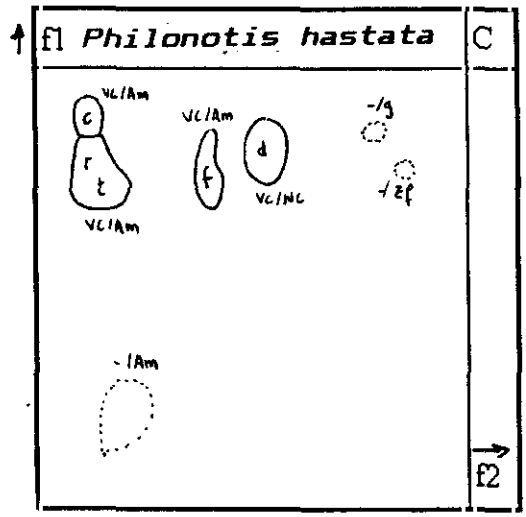

f1
Philonotis capillaris
P6
-/Zf
-/Am
VC/Am
Bl/Bl
VO/Am
Am/Am
f2

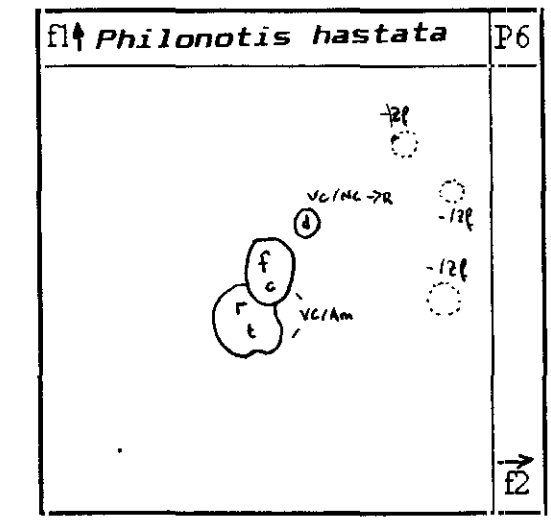

Philonotis turneriana C
VO/NO
VO/NC
-/Am
-/2
-/Am
-/2
-/Am
f2

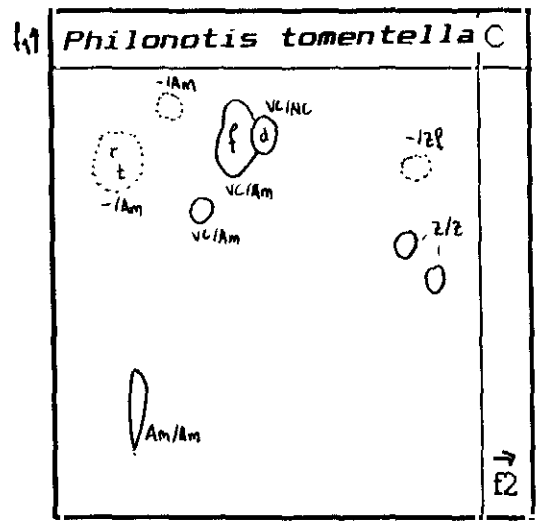

f1 Philonotis turneriana P6
2/2
VO/NO → R
2f/2f
-/Am
VO/NC
-/Am
-/NC
-/Am
f2

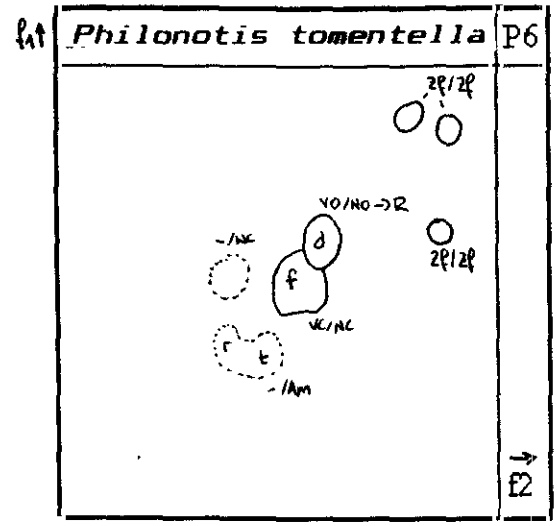

Philonotis tjibodensis C
-/Am
-/Am
VO/NO
VO/NC
VC/Am
2/2
-/Bf
-/Am
f2

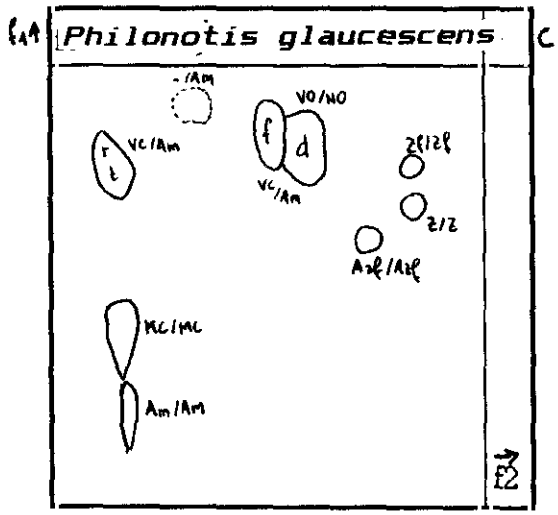

f1 Philonotis tjibodensis P6
Af/Af
-/Am
VO/NO → R
VC/NC
VC/NC
f2

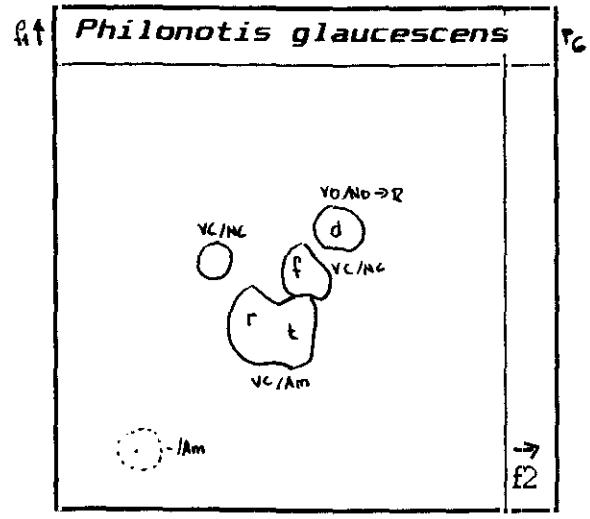

f1 Philonotis hastata C
VC/Am
VC/Am
-/3
VC/NC
-/2f
VC/Am
-/Am
f2

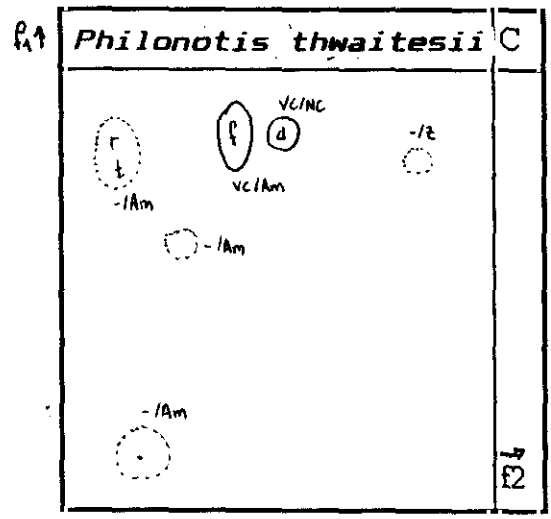

f1 Philonotis hastata P6
-/2f
VC/NC → R
-/2f
-/2f
VC/Am
f2

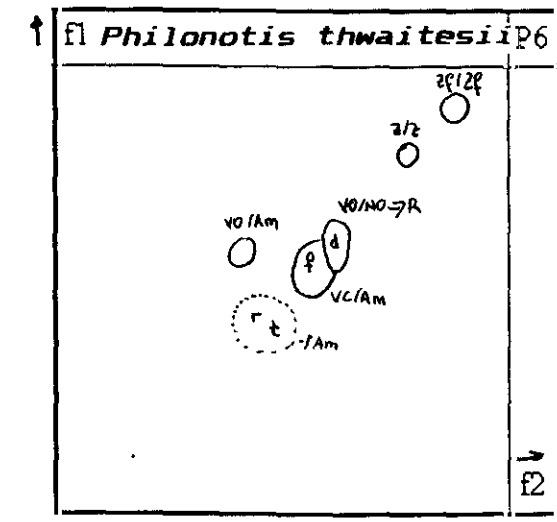

Philonotis tomentella C
-/Am
VC/NC
f
d
r
t
-/Am
VC/Am
VC/Am
-/2f
2/2
Am/Am
f2

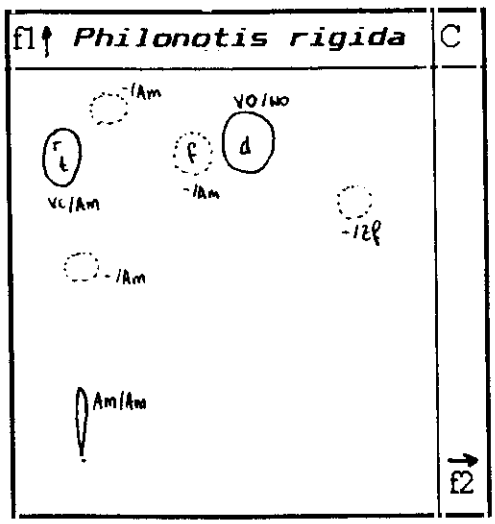

Philonotis tomentella P6
2f/2f
VO/NO→R
-/NC
d
f
2f/2f
VC/NC
r
t
-/Am
f2

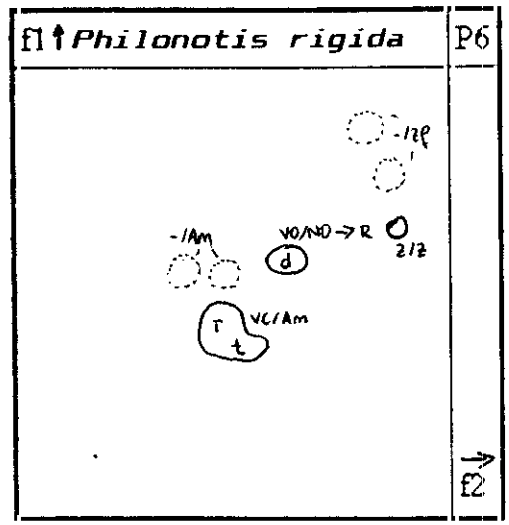

Philonotis glaucescens C
-/Am
VO/NO
f
d
VC/Am
r
t
VC/Am
2f/2f
2/2
A2f/A2f
MC/MC
Am/Am
f2

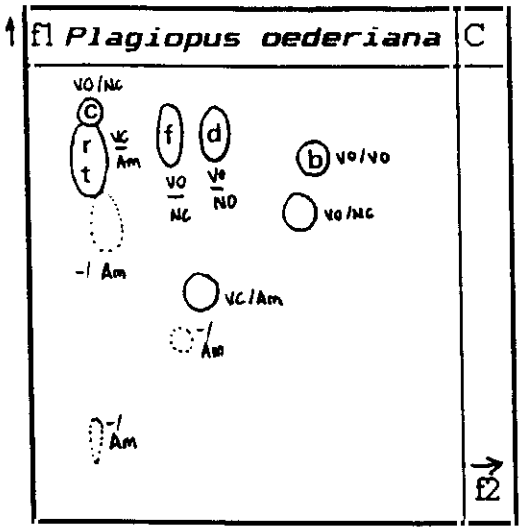

Philonotis glaucescens C
VO/NO→R
VC/NC
d
f
VC/NC
r
t
VC/Am
-/Am
f2

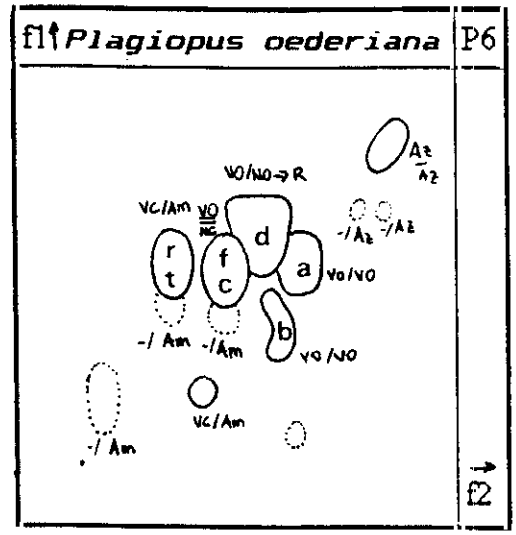

Philonotis thwaitesii C
VC/NC
f
d
r
t
-/Am
VC/Am
-/2
-/Am
-/Am
f2


f1 Philonotis thwaitesii P6
2f/2f
2/2
VO/NO→R
VO/Am
d
f
VC/Am
r
t
-/Am
f2


f1 Philonotis rigida
C
-/Am
VO/NO
r
t
VC/Am
f
d
-/Am
-/2f
-/Am
Am/Am
f2


f1 Philonotis rigida
P6
-/2f
-/Am
VO/NO → R
2/2
d
r
t
VC/Am
f2


f1 Plagiopus oederiana
C
VO/NC
c
r
t
VC
Am
f
VO
NC
d
Vo
NO
b
Vo/Vo
Vo/NC
-/ Am
VC/Am
-/
Am
-/
Am
f2


f1 Plagiopus oederiana
P6
A2
A2
VO/NO → R
VC/Am
VO
NC
-/A2
-/A2
r
t
f
c
d
a
Vo/Vo
b
VO/NO
-/ Am
-/Am
VC/Am
-/ Am
f2

5.1.2. Resultados cromatográficos de las especies centrales de la Memoria Doctoral.

5.1.2.1. *Bartramia halleriana* Hedw.

En las Figuras 5.1 y 5.2 vienen representadas las 2D-TLC realizadas con *B. halleriana* (gametófito + esporófito) tanto en celulosa como en poliamida-6. Salvo para los compuestos, el resto de la simbología es la que refleja la Tabla 5.1. La numeración de los compuestos es la misma en TLC y HPLC, y queda expuesta tras los resultados de HPLC.

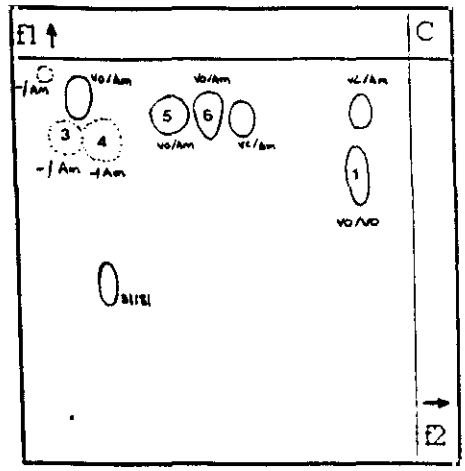


Fig. 5.1.: Cromatografía bidimensional de *B. halleriana* en celulosa.

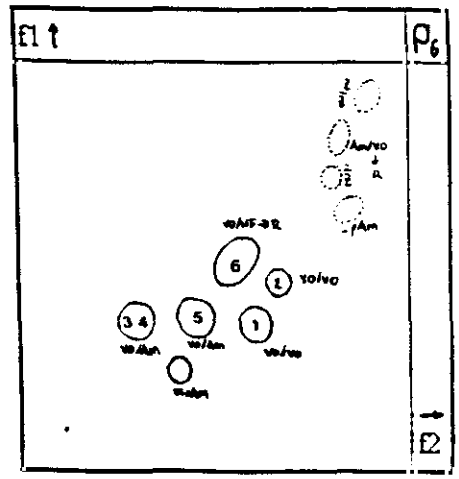


Fig. 5.2.: Cromatografía bidimensional de *B.halleriana* en poliamida-6.

La Figura 5.3 ofrece el cromtograma de HPLC procedente de *B. halleriana* (gametófito + esporófito), en el que se indican los tiempos de retención y posición relativa de cada uno de los compuestos identificados, cuya simbología coincide con la utilizada en las 2D-TLC anteriores.

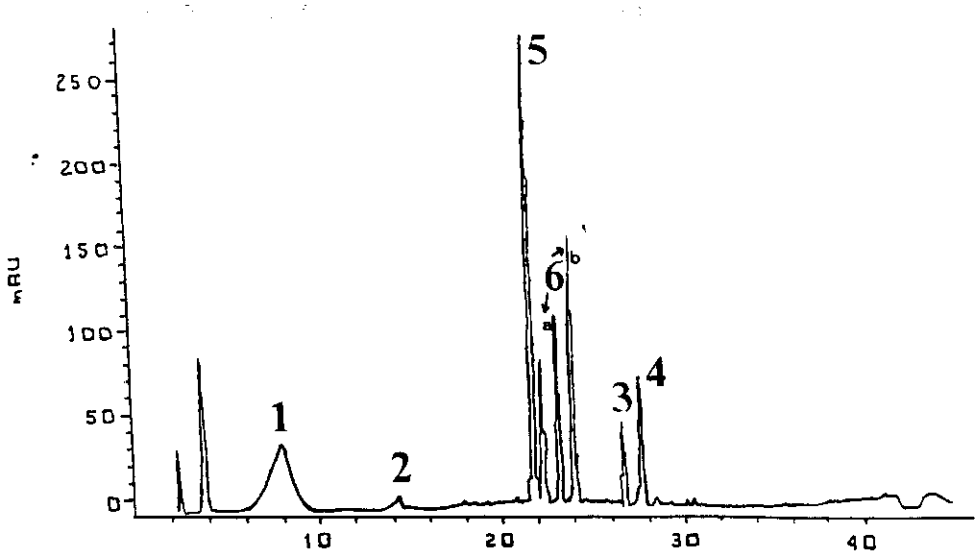


Fig. 5.3.: HPLC de *B. halleriana*.

Numeración de los compuestos

BH-1 Bartramiaflavona
BH-2 Anhidrobartramiaflavona
BH-3 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona
BH-4 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona
BH-5 Filonotisflavona
BH-6 2,3-dihidro-filonotisflavona (a y b corresponden a ambos diastereómeros)

5.1.2.2. *Bartramia ithyphylla* Brid.

En las Figuras 5.4 y 5.5 vienen representadas las 2D-TLC realizadas con *B. ithyphylla* (gametófito + esporófito) tanto en celulosa como en poliamida-6. Salvo para los compuestos, el resto de la simbología es la que refleja la Tabla 5.1. La numeración de los compuestos es la misma en TLC y HPLC, y queda expuesta tras los resultados de HPLC.

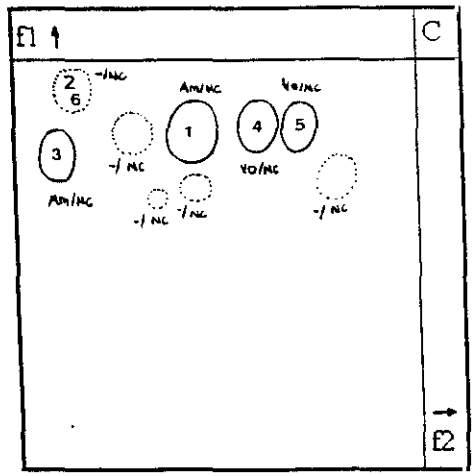


Fig. 5.4.: Cromatografía bidimensional de *B. ithyphylla* en celulosa.

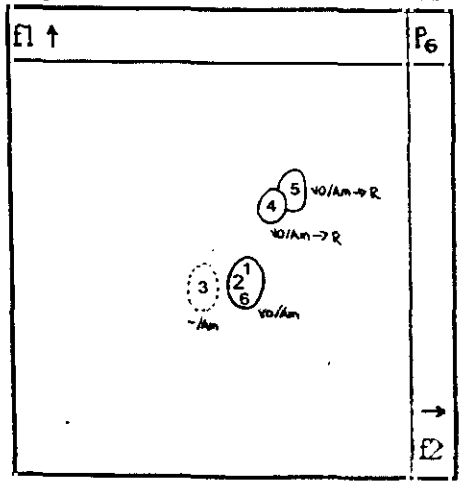


Fig. 5.5.: Cromatografía bidimensional de *B. ithyphylla* en poliamida-6.

La Figura 5.6 ofrece el cromatograma de HPLC procedente de *B. ithyphylla* (gametófito + esporófito), en el que se indican los tiempos de retención y posición relativa de cada uno de los compuestos identificados, cuya simbología coincide con la utilizada en las 2D-TLC anteriores.

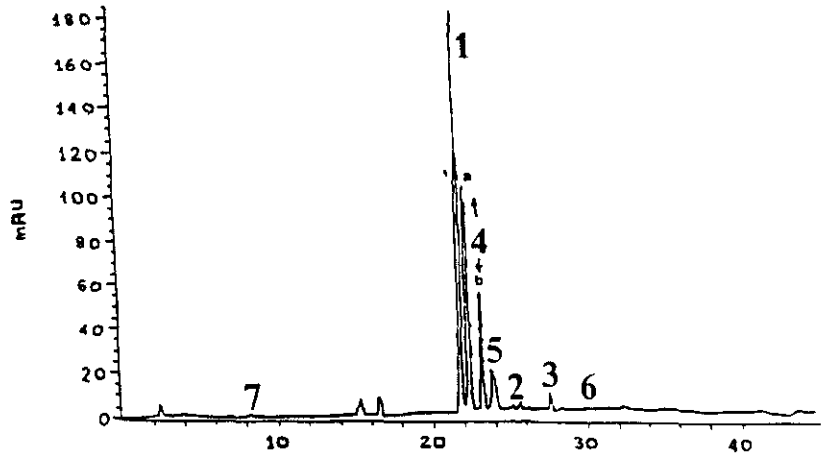


Fig. 5.6.: HPLC de *B. ithyphylla*.

Numeración de los compuestos.

BI-1 *Filonotisflavona*
BI-2 Dicranolomina
BI-3 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona
BI-4 2,3-dihidro-filonotisflavona (a y b corresponden a ambos diastereómeros)
BI-5 2,3-dihidro-biflavonoide
BI-6 5'-OH-amentoflavona
BI-7 p-OH-benzoico (4-OH-benzoico)

BI-5 se identificó mediante cromatografía en capa fina como un 2,3-dihidro-biflavonoide, ya que al poco tiempo de revelar con NA la placa cromatográfica, el color de la mancha observada a la luz ultravioleta viraba a color rojo, lo cual es indicativo de la existencia de un monómero flavanónico de eriodictiol. No obstante, no se detectó con claridad su presencia en el espectro de HPLC ni se pudo aislar en cantidad suficiente, por lo que su identificación definitiva no fue posible. De acuerdo a los datos bibliográficos de que disponemos y tomando como referencia su movilidad cromatográfica, puede tratarse de la 2,3-dihidro-5',3'''-amentoflavona o bien de la 2,3-dihidro-dicranolomina. El primero de ellos ha sido identificado en otra especie de la familia, concretramente en *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989); mientras que el segundo 2,3-dihidro-biflavonoide, ya fue identificado tentativamente en *B. ithyphylla* por López-Sáez (1992).

El Compuesto **BI-7** fue identificado mediante cocromatrografía por HPLC como el ácido p-OH-benzoico. Los derivados del ácido benzoico pueden, de acuerdo a Wilson & col. (1989), sugerir la existencia de taninos o polímeros de hidroxibenzofurano, responsables de la rigidez de los musgos. Su existencia en briófitos, tanto musgos como hepáticas, ha sido puesta de manifiesto en varias ocasiones por Asakawa (1986), Mües & Zinsmeister (1988), Wilson & col. (1989) y Zinsmeister & col. (1991). En la presente Memoria Doctoral, hemos querido únicamente reflejar su presencia en *Bartramia ithyphylla*, sin entrar en más detalles sobre su aislamiento e identificación, pues éstos se salen de los objetivos previstos.

5.1.2.3. *Bartramia pomiformis* Hedw.

En las Figuras 5.7 y 5.8 vienen representadas las 2D-TLC realizadas con *B. pomiformis* (gametofito + esporofito) tanto en celulosa como en poliamida-6. Salvo para los compuestos, el resto de la simbología es la que refleja la Tabla 5.1. La numeración de los compuestos es la misma en TLC y HPLC, y queda expuesta tras los resultados de HPLC.

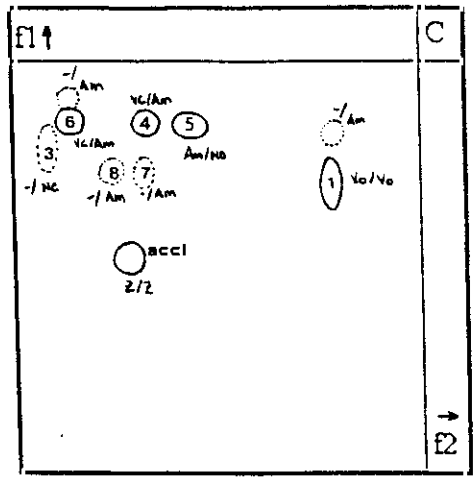


Fig. 5.7.: Cromatografía bidimensional de *B. pomiformis* en celulosa.

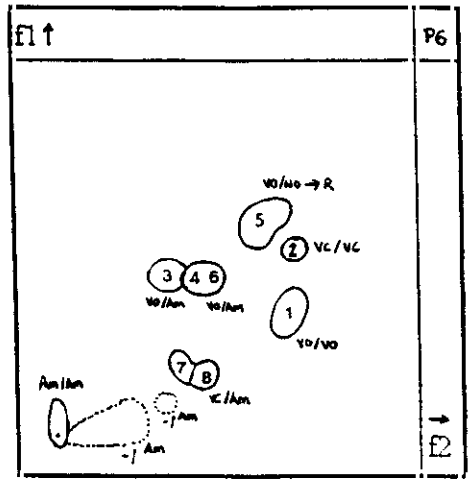


Fig. 5.8.: Cromatografía bidimensional de *B. pomiformis* en poliamida-6.

La Figura 5.9 ofrece el cromatograma de HPLC procedente de *B. pomiformis* (gametófito + esporófito), en el que se indican los tiempos de retención y posición relativa de cada uno de los compuestos identificados, cuya simbología coincide con la utilizada en las 2D-TLC anteriores.

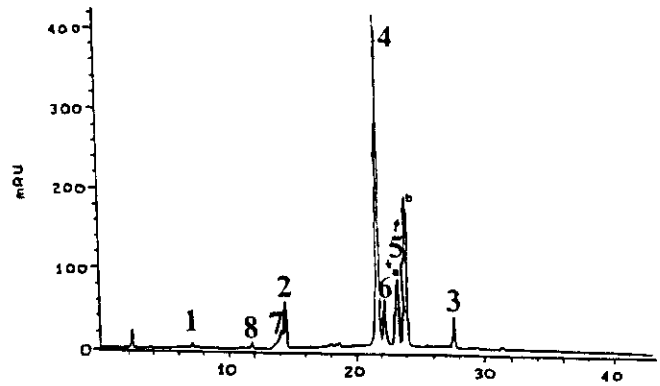


Fig. 5.9.: HPLC de *B. pomiformis*.

Numeración de los compuestos.

BP-1 Bartramiaflavona
BP-2 Anhidrobartramiaflavona
BP-3 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona
BP-4 Filonotisflavona
BP-5 2,3-dihidro-filonotisflavona (a y b corresponden a ambos diastereómeros)
BP-6 Dicranolomina
BP-7 Bartramia-Triluteolina
BP-8 Acido Bartrámico
AcCl Acido Clorogénico

En el aislamiento y purificación del extracto metanólico procedente de *B. pomiformis* mediante cromatografía en columna se aisló un compuesto de naturaleza desconocida que denominamos **BP-X**. Dicho compuesto no pudo ser identificado por TLC y se requirieron de otras técnicas analíticas tales como RMN y EM para su identificación. Los resultados derivados demostraron que en realidad BP-X es una mezcla de 3 triflavonoides (Seeger, 1992): de un lado la Bartramia-Triluteolina (BP-7) y de otro, otros 2 triflavonoides que, no pudieron ser identificados por no ser posible la separación entre ellos ni disponer de cantidad suficiente para un análisis más fino.

Hemos creído conveniente hacer aquí esta aclaración dado que BP-X aparece en el esquema metodológico de CC pero no fue identificado en las TLC_s respectivas, lo que podría conducir a una confusión. Los resultados procedentes de la analítica realizada sobre el Compuesto BP-X se presentan por ello junto a los de la Bartramia-Triluteolina.

La Tabla 5.2 ofrece los resultados acerca del estudio de la composición flavonoídica de diversas muestras de *B. pomiformis* procedentes de distintas localidades, cuya procedencia concreta aparece en la relación de pliegos expuesta en el apartado de "Material y Métodos":

Tabla 5.2: Composición flavonoídica de *B. pomiformis* en distintas localidades.
(+, presencia, - ausencia)

COMPUESTOS / LOCALIDAD	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8	Acido Clorogénico
Guisando	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Canencia	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Ordesa	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Atazar	-	+	+	+	+	+	+	+	-
El Escorial	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5.1.2.4. *Bartramia stricta* Brid.

En las Figuras 5.10 a 5.13 vienen representadas las 2D-TLC realizadas con *B. stricta*, procedentes tanto del gametófito como del esporófito, en celulosa y en poliamida-6. Salvo para los compuestos, el resto de la simbología es la que refleja la Tabla 5.1. La numeración de los compuestos es la misma en TLC y HPLC, y queda expuesta tras los resultados de HPLC.

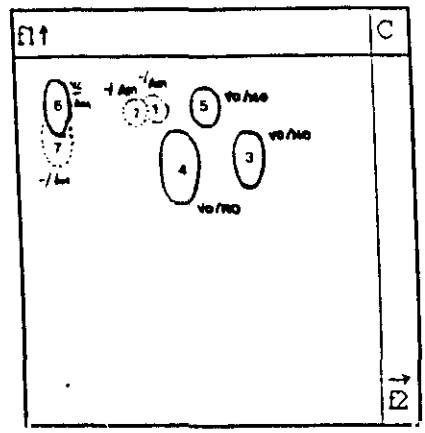


Fig. 5.10.: Cromatografía 2D del gametófito de *B. stricta* en celulosa.

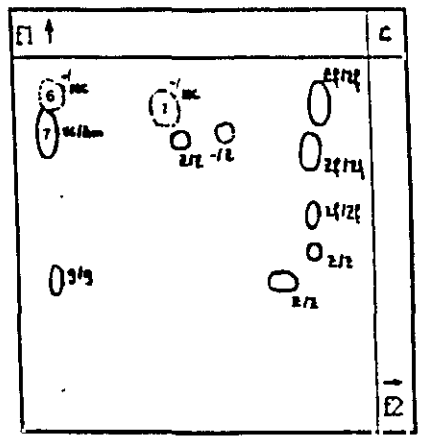


Fig. 5.11.: Cromatografía 2D del esporófito de *B. stricta* en celulosa.

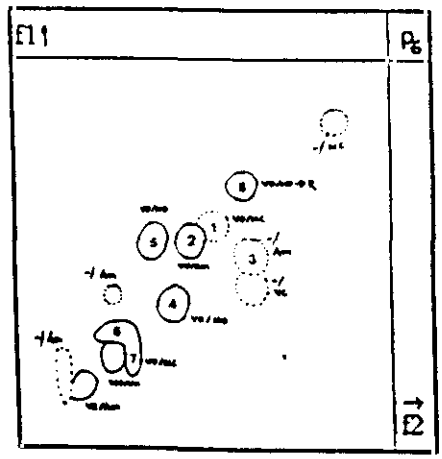


Fig. 5.12.: Cromatografía 2D del gametófito de *B. stricta* en poliamida-6.

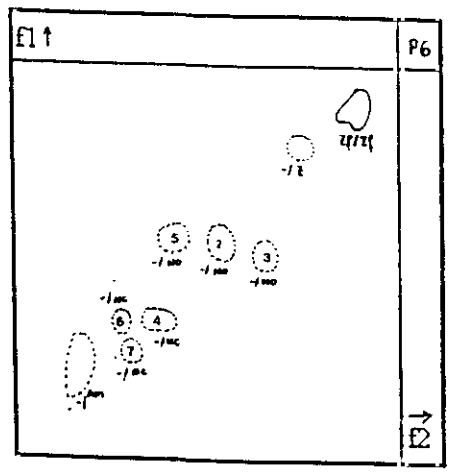


Fig. 5.13.: Cromatografía 2D del esporófito de *B. stricta* en poliamida-6.

La Figura 5.14 ofrece el cromatograma de HPLC procedente de *B. stricta* (gametófito + esporófito), en el que se indican los tiempos de retención y posición relativa de cada uno de los compuestos identificados, cuya simbología coincide con la utilizada en las 2D-TLC anteriores.

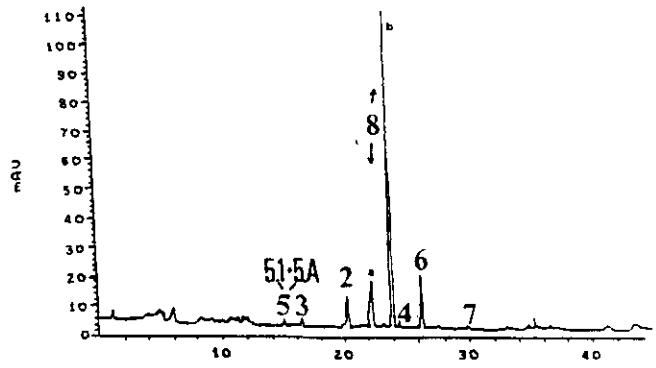


Fig. 5.14.: HPLC de *B. stricta*.

Numeración de los compuestos.

BS-1 No identificado (posible isómero de la Ciclo-Triluteolina)
BS-2 Filonotisflavona
BS-3 Ciclo-Triluteolina
BS-4 Dicranolomina
BS-5 Mezcla de Triflavonoides (separados por CC)
BS-5.1 Bartramia-Triluteolina
BS-5.A Epi-Bartramia-Triluteolina
BS-6 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona
BS-7 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona
BS-8 posiblemente 2,3-dihidro-filonotisflavona (a y b corresponden a ambos diastereómeros)

El Compuesto **BS-1** fue aislado mediante CC y se detectó igualmente su presencia en las TLC_s respectivas, aunque no dispusimos de cantidad suficiente para poder emprender un estudio analítico profundo e identificarlo completamente. No obstante, podemos decir que se trata de un compuesto relacionado con la Ciclo-Triluteolina (BS-3) de la misma manera que lo están la Bartramiaflavona y la Anhidrobartramiaflavona. Por todo ello, hemos creído conveniente presentar los resultados derivados de su estudio junto a los de la Ciclo-Triluteolina.

El Compuesto **BS-5** que fue aislado mediante CC y detectado en TLC, hubo de ser sometido a nuevos procesos de aislamiento mediante CC con metanol al 80 %, ya que los resultados de la analítica realizada sobre él (RMN principalmente), denotaban la existencia de diversos tipos de uniones interflavonoídicas y un número de señales excesivo, lo que sugería que BS-5 debería tratarse realmente de una mezcla de varios flavonoides. En realidad, BS-5 está compuesto: por un lado de **BS-5A** (Epi-Bartramia-Triluteolina) y por otro de BS-X que también fue aislado mediante CC pero no identificado en TLC. **BS-X** se corresponde con BP-X, ya que es una mezcla de tres triflavonoides: Bartramia-Triluteolina (**BS-5.1**) y otros dos triflavonoides desconocidos que no pudieron ser aislados ni identificados.

El Compuesto **BS-8** no pudo ser aislado mediante CC pero se demostró su presencia mediante TLC y HPLC. Por sus características cromatográficas (fluorescencia, Rf, tiempo de retención) y por tratarse de un 2,3-dihidro-biflavonoide (Geiger, 1990), suponemos que se trata de la 2,3-dihidro-filonotisflavona, ya que es precisamente el biflavonoide más abundante de este tipo (2,3-dihidro) descrito en la familia *Bartramiaceae*.

La Tabla 5.3 ofrece los resultados acerca del estudio de la composición flavonoídica de diversas muestras de *B. stricta* procedentes de distintas localidades, cuya procedencia concreta aparece en la relación de pliegos expuesta en el apartado de "Material y Métodos":

Tabla 5.3: Composición flavonoídica de *B. stricta* en distintas localidades.
(+, presencia, - ausencia)

COMPUESTOS / LOCALIDAD	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8
E. Picadas	-	+	+	+	+	+	-	+
Villa del Prado	+	+	+	+	+	+	+	+
Jaraicejo	-	+	+	+	+	+	+	+
Montfragüe	-	+	+	+	+	+	+	+

5.1.2.5. *Dicranum scoparium* Hedw.

Dicranum scoparium fue la primera especie dentro de los musgos donde se identificó una biflavona (Lindberg & col., 1974), denominada 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona. Cuando Österdahl (1983) estudió el contenido flavonoídico de esta especie, únicamente detectó la presencia de un biflavonoide, ya que en su trabajo sólo analizaba aquellas fracciones solubles en agua, con lo que pasaba por alto muchas otras que también contenían biflavonoides.

Dada la similitud de compuestos biflavonoídicos identificados en esta especie respecto a los de la familia *Bartramiaceae*, llevamos a cabo en ella un ensayo preliminar sobre su composición flavonoídica, en el que pusimos de manifiesto la existencia de un nuevo compuesto biflavonoídico no detectado anteriormente en los trabajos realizados en *Dicranum scoparium*, por lo que decidimos estudiar en profundidad su composición flavonoídica. A pesar de no pertenecer a la familia *Bartramiaceae*, objeto central de estudio de la presente Memoria Doctoral, decidimos no obstante incluirla en ella por parecernos los resultados lo suficientemente interesantes como complemento adicional, y por servirnos los compuestos aislados de *Dicranum scoparium* como patrones químicos.

En las Figuras 5.15 a 5.17 vienen representadas las 2D-TLC realizadas con *D. scoparium*, procedentes tanto del gametófito como del esporófito, en celulosa y en poliamida-6. Salvo para los compuestos, el resto de la simbología es la que refleja la Tabla 5.1. La numeración de los compuestos es la misma en TLC y HPLC, y queda expuesta tras los resultados de HPLC.

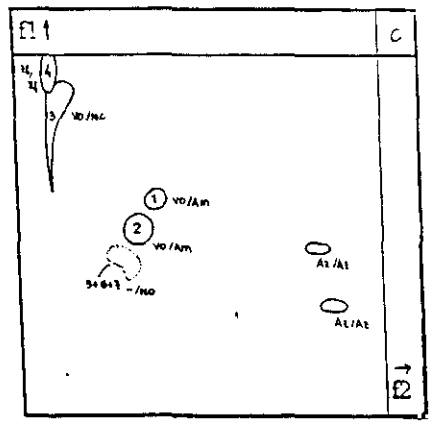


Fig. 5.15.: Cromatografía 2D del gametófito de *D. scoparium* en celulosa.

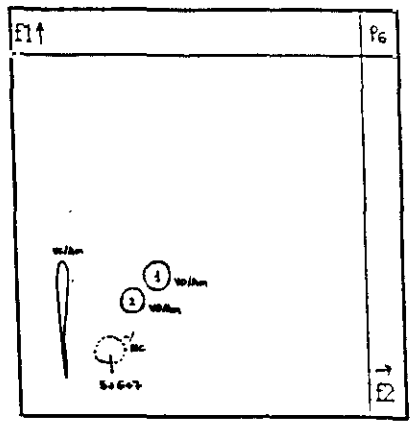


Fig.5.16.: Cromatografía 2D del gametófito de *D.scoparium* en poliamida-6.

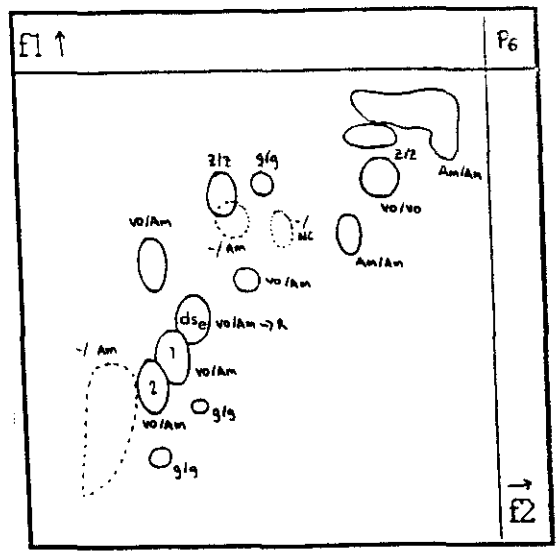


Fig.5.17.: Cromatografía 2D del esporófito de *D.scoparium* en poliamida-6.

La Figura 5.18 ofrece el cromatograma de HPLC procedente de *D. scoparium* (gametófito + esporófito), en el que se indican los tiempos de retención y posición relativa de cada uno de los compuestos identificados, cuya simbología coincide con la utilizada en las 2D-TLC anteriores.

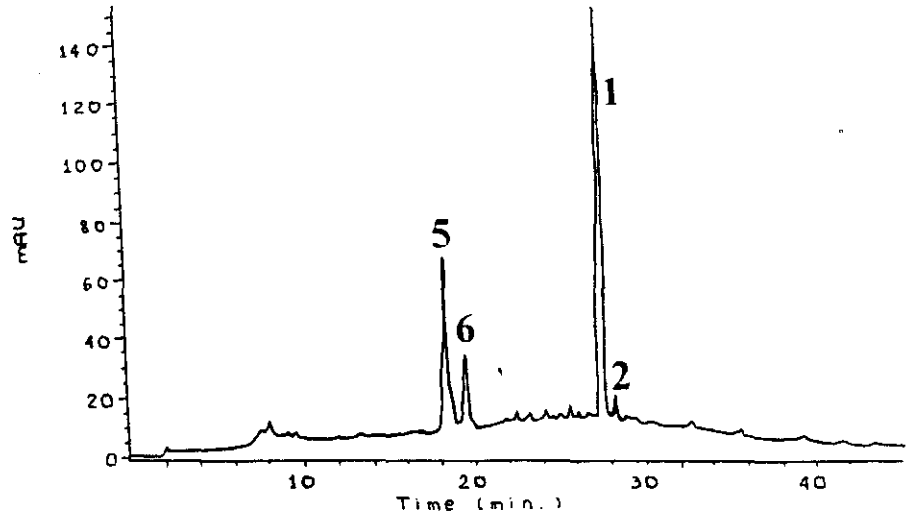


Fig. 5.18.: HPLC de *D. scoparium*.

Numeración de compuestos.

DS-1 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona
DS-2 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona
DS-3 flavonoide/biflavonoide glicosilado
DS-4 No identificado
DS-5 Apigenina-7-O-triglicósido
DS-6 Luteolina-7-O-neohesperidósido
DS-7 Diosmetina-7-O-triglicósido
DSe 2,3-dihidro-biflavonoide

El Compuesto **DS-3** no pudo ser aislado mediante CC en cantidad suficiente para una analítica profunda, aunque sí se detectó su presencia mediante TLC. Por sus características cromatográficas puede tratarse de un monoflavonoide glicosilado o de un biflavonoide glicosilado (Geiger, com.per., Voigt, 1993). No queremos extraer más comentarios al respecto y dejar por el momento su identificación como provisional hasta estudios posteriores, ya que los biflavonoides glicosilados son bastante raros, y por el momento sólo se conocen en gimnospermas (Geiger & Quinn, 1975).

El Compuesto **DS-4** aislado por CC, parecía poseer una naturaleza no fenólica de acuerdo a los resultados obtenidos por TLC, por lo que en un principio obviamos su estudio dentro de la presente Memoria Doctoral. Por sus características de movilidad cromatográfica y fluorescencia al ultravioleta parecía tratarse de un tetraterpenoide u otro derivado isoprénico de cadena larga y abierta, nunca de naturaleza flavonoídica. Sin embargo, los resultados de la RMN parecían en cambio que podía admitirse una naturaleza fenólica. No podemos por el momento establecer su estructura con claridad, por lo que está siendo objeto de estudio analítico en la actualidad.

El Compuesto **DS-7** *no se aisló mediante CC pero sí fue identificado por cromatografía* comparativa con patrón en TLC como la Diosmetina-7-O-triglicósido.

El Compuesto **DSe** no pudo ser aislado mediante CC pero sí se detectó su presencia en la 2D-TLC en poliamida-6 del esporófito de *D. scoparium* aunque no en el gametófito. Este compuesto, por sus características cromatográficas (color rojo con el tiempo tras revelar con NA), se corresponde con un 2,3-dihidro-biflavonoide (Geiger, 1990; Wollenweber, 1981), en el que uno de los dos monómeros es la flavanona eriodictiol. El hecho de presentarse únicamente en el esporófito y no en el gametófito nos hizo sospechar del porqué no pudimos aislarlo mediante CC, ya que no se dispuso de material esporofítico suficiente de partida para su aislamiento en cantidades necesarias para una buena analítica. Dada su naturaleza de 2,3-dihidro-biflavonoide, puede en realidad tratarse de la ya nombrada 2,3-dihidro-filonotisflavona, con la que coincide en sus características cromatográficas, aunque por el momento se desconoce dicho biflavonoide en la familia *Dicranaceae* (Anexo 2). No obstante, se conoce por otra parte la existencia de 2,3-dihidro-biflavonoides en otras especies de la familia *Dicranaceae*, concretamente la 2'',3''-dihidro-5',3'''-dihidroxi-robustaflavona en *Dicranoloma robustum* y *Dicranoloma billardieri* (Markham & col., 1988) y de la 2,3-dihidro-dicranolomina en *D. robustum* (Markham & col., 1988). Comparando los resultados cromatográficos del Compuesto DSe observamos que estos coindicen con los de la 2,3-dihidro-dicranolomina, aunque por el momento preferimos mantener tales hechos como provisionales hasta que obtengamos material suficiente para su análisis.

5.1.3. Resultados Analíticos de los Compuestos Identificados.

5.1.3.1. COMPUESTO I (BH-3, BI-3, BP-3, BS-6, DS-1)

(5',3'''-dihidroxi-amentoflavona o 5',8''-biluteolina)

En la Tabla 5.4 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto I, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.4.: Datos cromatográficos del Compuesto I.

		Compuesto I	5',3'''-diOH-amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-amentoflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	VO	VO
	+ NA	Am	Am	Am
	+ Benedict	VO	-	VO
Rf_s	Z_1	26	5	4
	Z_2	41	-	40
	Z_3	83	90	-
	P_1	24	-	53
	P_2	31	-	-

[1] 5',3'''-diOH-amentoflavona según Lindberg & col. (1974)
[2] 5',3'''-diOH-amentoflavona según Seeger & col. (1990)
(ver pp. 77-78 para los sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto I, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.5.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto I (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto I	5',3'''-diOH-amentoflavona[1]
MeOH	256 288sh 353	237sh 281sh 349
NaOMe	236sh 270 394	269 398 400
$AlCl_3$	271 367sh 417	273 285sh 382sh 419
$AlCl_3$ + HCl	257sh 272sh 295sh 357 381sh	270sh 293sh 358 371sh
NaOAc	268 404	263 276sh 364
NaOAc + H_3BO_3	269 405	263 276sh 376

[1] datos procedentes de Salm (1992)

La Fig. 5.19 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto I frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.20 presenta el Espectro de Masas del Compuesto I.

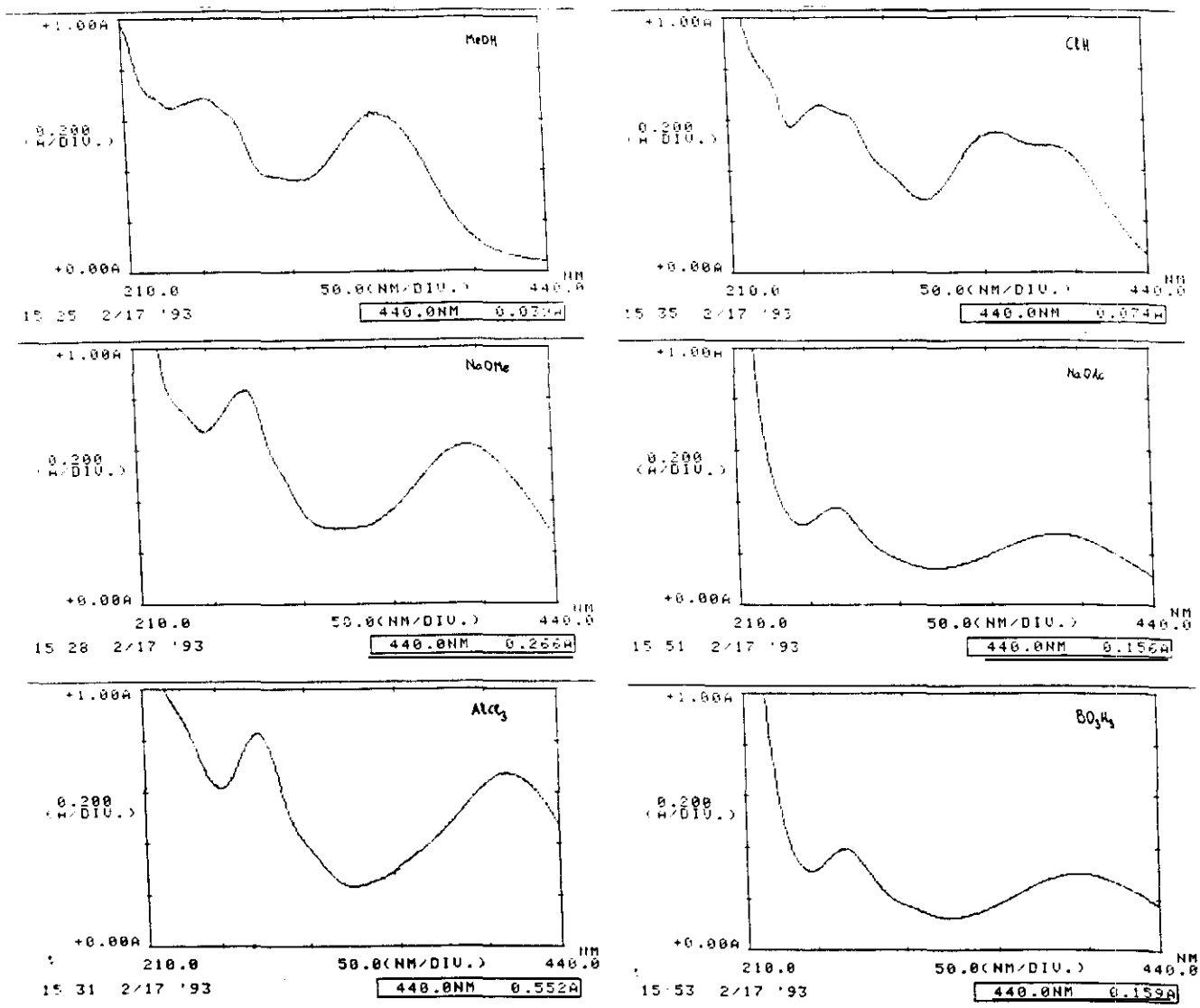


Fig. 5.19.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto I.

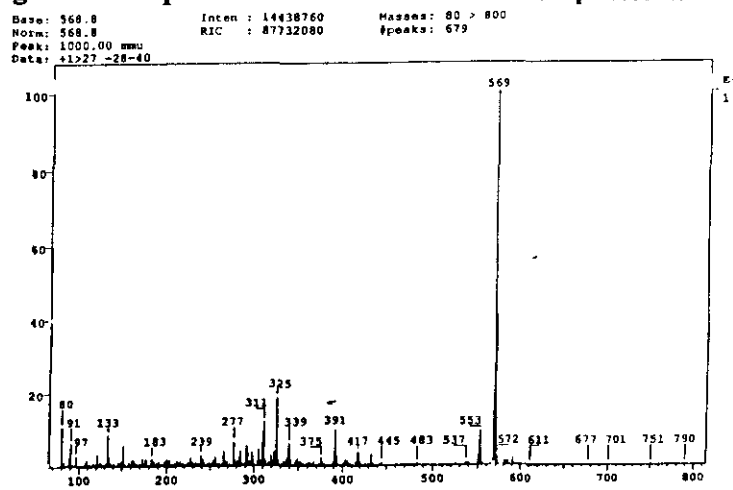


Fig. 5.20.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto I.

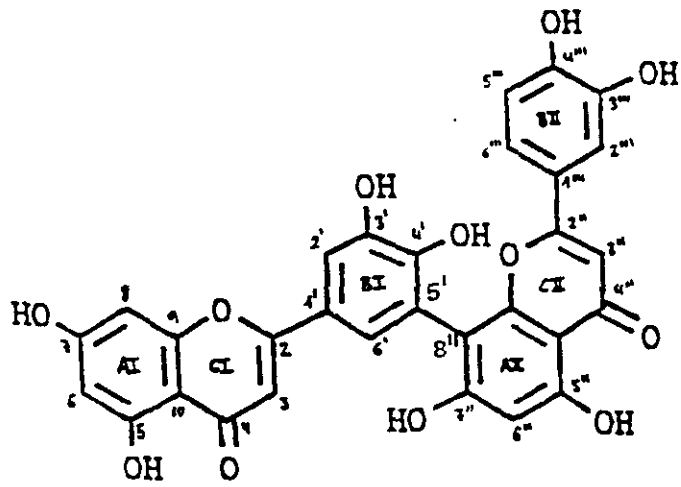
En la Tabla 5.6 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto I comparados con la bibliografía aneja correspondiente (5',3'''-dihidroxi-amentoflavona y luteolina).

En la Fig. 5.21 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto I.

En la Tabla 5.7 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto I, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.22 y 5.23 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto I, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.22) y el intervalo 5.7-7.5 ppm (Fig. 5.23).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Salm (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto I

Tabla 5.6.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto I.

Carbonos	Compuesto I	5',3'''-DHA[1]	Luteolina[2]
2	164,0	163,9	164,5
2''	164,0	164,0	-
3	102,9	102,9	103,3
3''	102,5	102,5	-
4	182,0	181,9	182,2
4''	181,5	181,5	-
5	161,4	161,4	162,1
5''	160,4	160,4	-
6	98,6	98,7	99,2
6''	98,6	98,6	-
7	164,0	164,0	164,7
7''	162,0	161,7	-
8	93,8	93,8	94,2
8''	**104,1**	104,0	-
9	157,3	157,3	157,9
9''	154,5	154,5	-
10	103,7	103,6	104,2
10''	103,7	103,6	-
1'	120,4	120,6	122,1
1'''	121,8	121,8	-
2'	112,0	112,1	113,8
2'''	113,7	113,7	-
3'	145,5	145,5	146,2
3'''	145,8	145,8	-
4'	148,5	148,2	150,1
4'''	149,4	149,4	-
5'	**120,1**	120,0	116,4
5'''	115,5	115,5	-
6'	122,2	122,2	119,3
6'''	118,6	118,6	-

[1] 5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

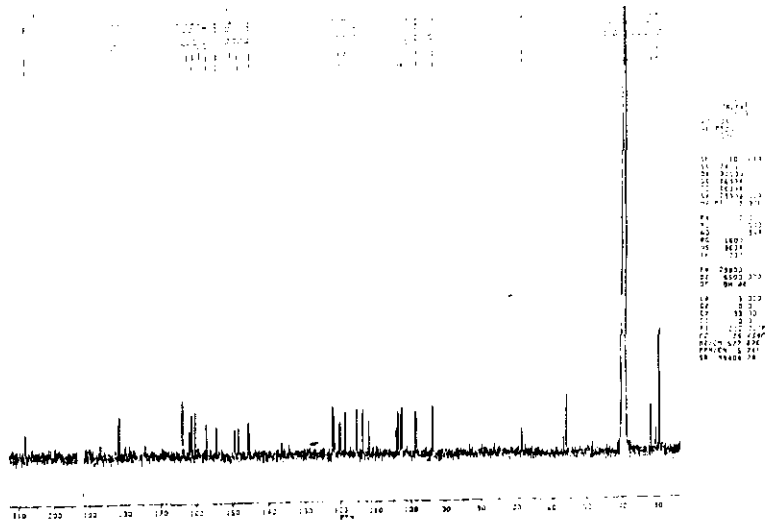


Fig. 5.21.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto I.

Tabla 5.7.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto I.

Protones	Compuesto I	5',3'''-DHA[1]	Luteolina[2]
3	6,64 s	6,68 s	6,69 s
3''	*6,68 s*	*6,72 s*	-
6	6,18 d (2)	6,21 d (2)	6,22 d
6''	6,37 s	6,41 s	-
8	6,42 d (2)	6,45 d (2)	6,47 d (2)
2'	7,48 d (2)	7,51 d (2)	7,43 d (2)
5'	—	—	6,92 d (8)
6'	7,49 d (2)	7,52 d (2)	7,77 dd (2;9)
2'''	7,06 d (2)	7,09 d (2)	-
5'''	6,67 d (8)	6,70 d (8)	-
6'''	7,04 dd (2;8)	7,07 dd (2;8)	-
OH-5	13,00 s	-	-
OH-5''	13,13 s	-	-

[1]5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

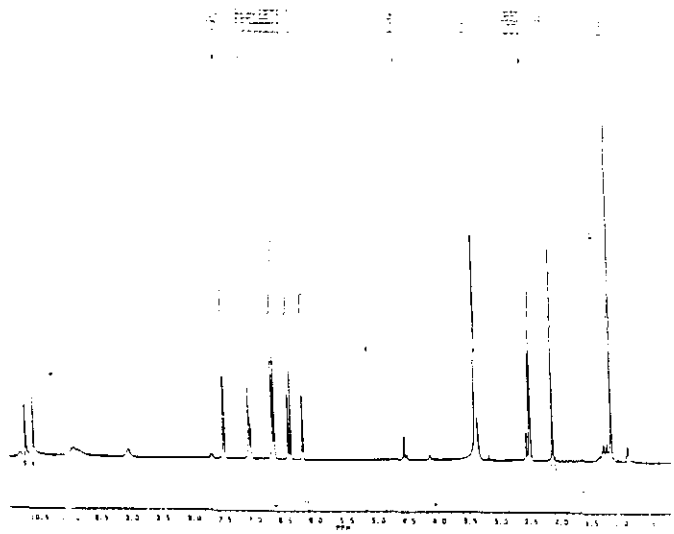


Fig. 5.22.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto I (1.0-13.0 ppm).

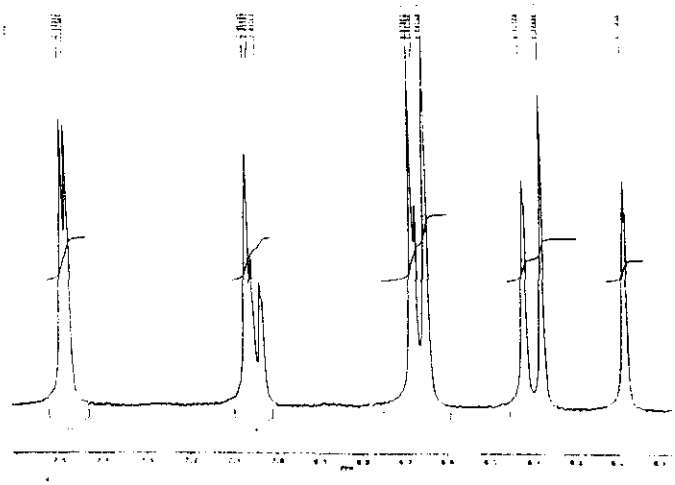


Fig. 5.23.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto I (5.7-7.5 ppm).

5.1.3.2. COMPUESTO II (BH-4, BS-7, DS-2)

(5',3'''-dihidroxi-robustaflavona o 5',6''-biluteolina)

En la Tabla 5.8 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto II, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.8.: Datos cromatográficos del Compuesto II.

		Compuesto II	5',3'''-diOH-robustaflavona[1]	5',3'''-diOH-robustaflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	VO
	+ NA	Am	Am	Am
	+ Benedict	VO	-	VO
Rf_i	Z_1	11	3	-
	Z_2	22	34	22
	Z_3	16	-	-
	P_1	25	54	34
	P_2	31	22	-

[1] 5',3'''-diOH-robustaflavona según Seeger (1992).
[2] 5',3'''-diOH-robustaflavona según Stein (1988b).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.9 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto II, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.9.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto II (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto II	5',3''-diOH-robustaflavona[1]
MeOH	223sh 266sh 360	255 264 280sh 357
NaOMe	272sh 406	270 331 407
$AlCl_3$	272 299sh 425	272 301sh 367 426
$AlCl_3$ + HCl	274sh 294sh 362 385sh	263sh 273sh 298sh 361
NaOAc	269 400	271 327 408
NaOAc + H_3BO_3	268 302sh 407	265 380

[1] datos procedentes de Stein (1988b)

La Fig. 5.24 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto II frente a los reactivos específicos en cada caso.

La Fig. 5.25 presenta el Espectro de Masas del Compuesto II.

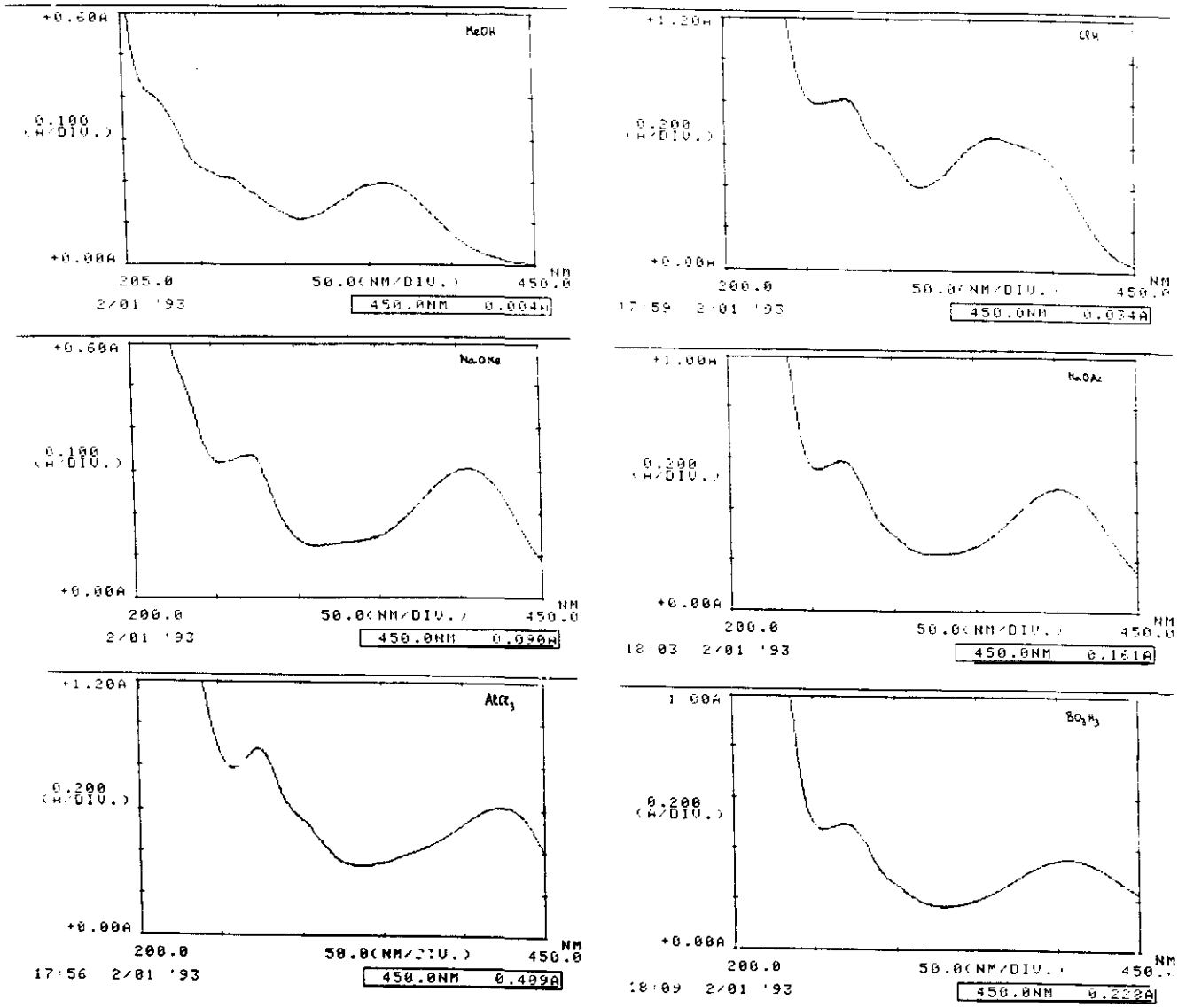


Fig. 5.24.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto II.

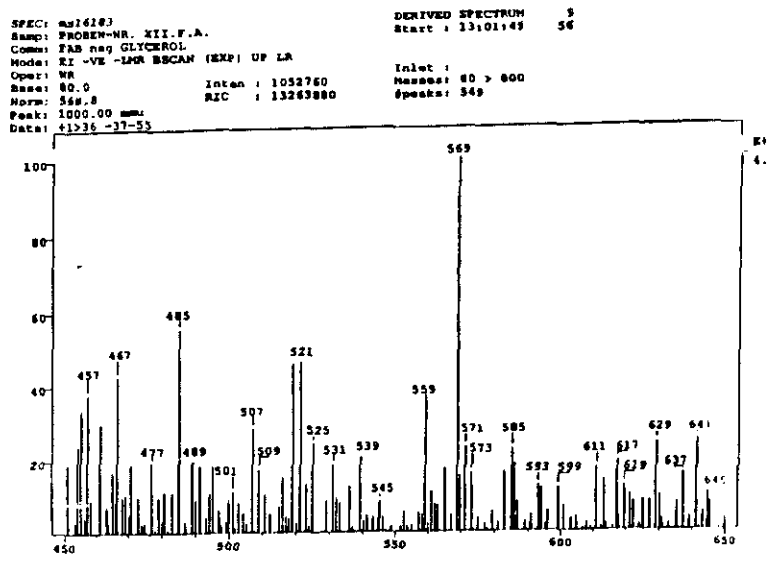


Fig. 5.25.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto II.

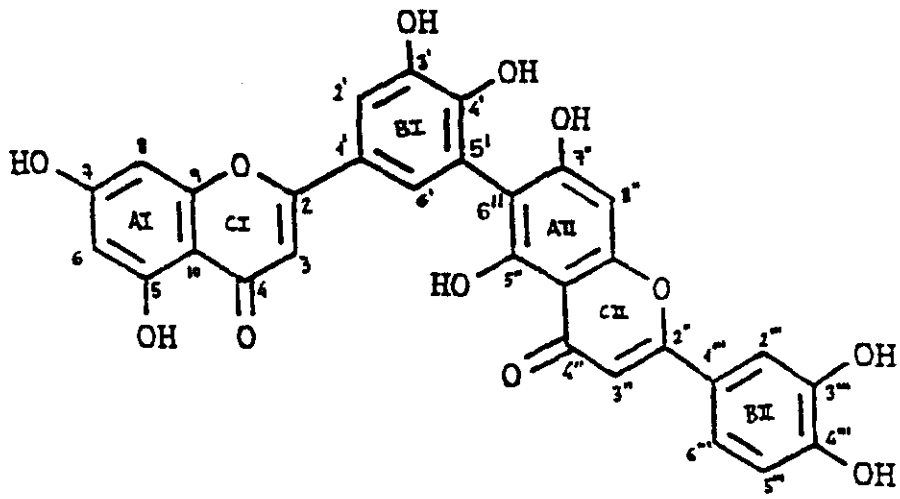
En la Tabla 5.10 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto II comparados con la bibliografía aneja correspondiente (5',3'''-dihidroxi-robustaflavona y luteolina).

En la Fig. 5.26 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto II.

En la Tabla 5.11 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto II, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.27 y 5.28 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto II, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.27) y el intervalo 6.1-7.9 ppm (Fig. 5.28).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Salm (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto II.

Tabla 5.10.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto II.

Carbonos	Compuesto II	5',3'''-DHR[1]	Luteolina[2]
2	163,7	163,6	164,5
2''	164,1	164,0	-
3	103,2	102,8	103,3
3''	102,1	102,7	-
4	181,2	181,6	182,2
4''	181,1	181,5	-
5	162,5	162,3	162,1
5''	159,0	159,1	-
6	98,5	98,7	99,2
6''	**108,9**	108,9	-
7	165,5	164,0	164,7
7''	162,5	162,3	-
8	93,6	93,4	94,2
8''	93,6	93,8	-
9	157,2	157,2	157,9
9''	156,3	156,2	-
10	103,5	103,6	104,2
10''	103,5	103,4	-
1'	121,9	121,5	122,1
1'''	120,8	121,9	-
2'	112,1	111,7	113,8
2'''	113,1	113,3	-
3'	145,9	145,8	146,2
3'''	145,6	145,7	-
4'	148,5	148,6	150,1
4'''	150,3	149,6	-
5'	**120,3**	120,2	116,4
5'''	115,9	116,0	-
6'	122,3	121,9	119,3
6'''	120,3	119,9	-

[1] 5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-robustaflavona según Becker & col. (1986).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

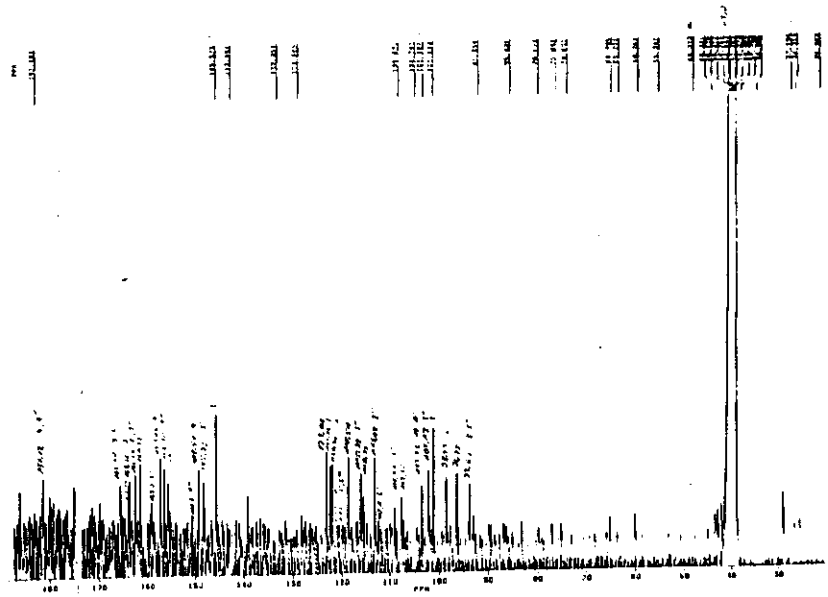


Fig. 5.26.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto II.

Tabla 5.11.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto II.

Protones	Compuesto II	5',3'''-DHR[1]	Luteolina[2]
3	6,55 s	6,58 s	6,69 s
3''	6,50 s	6,53 s	-
6	6,14 d (2)	6,16 d (2)	6,22 d
8	6,42 d (2)	6,44 d (2)	6,47 d (2)
8''	6,24 s	6,26 s	-
2'	7,18 d (2)	7,20 d (2)	7,43 d (2)
6'	7,83 d (2)	7,82 d (2)	7,77 dd (2;9)
2'''	7,39 m	7,39 m	-
5'''	6,89 d (8)	6,89 d (8)	-
6'''	7,39 m	7,39 m	-
OH-5	13,02 s	-	-
OH-5''	13,28 s	-	-

[1]5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-robustaflavona según Markham & col. (1988).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

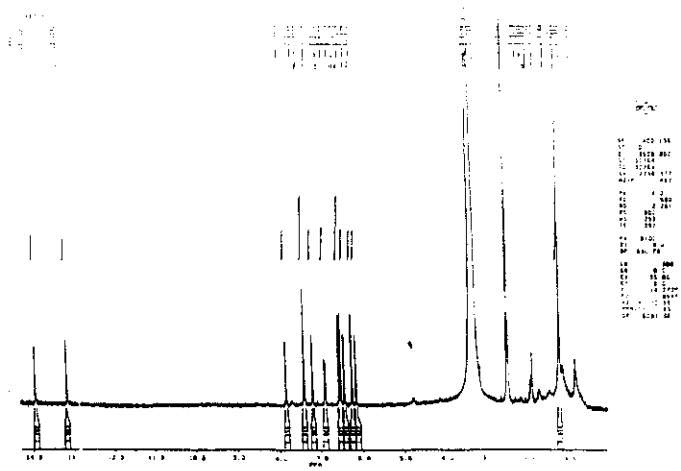


Fig. 5.27.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto II (1.0-13.0 ppm).

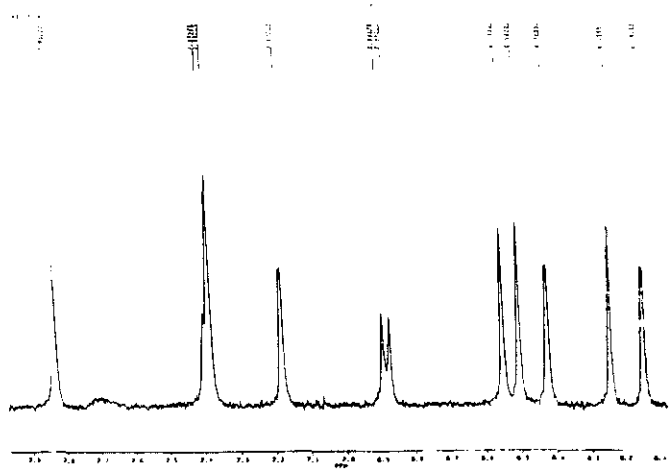


Fig. 5.28.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto II (6.1-7.9 ppm).

5.1.3.3. COMPUESTO III (BH-5, BI-1, BP-4, BS-2)

(Filonotisflavona o 2',8''-biluteolina)

En la Tabla 5.12 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto III, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.12.: Datos cromatográficos del Compuesto III.

		Compuesto III	Filonotisflavona[1]	Filonotisflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	Am	Am	Am
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	58	46	30
	Z_2	65	74	75
	Z_3	83	77	-
	P_1	23	33	54
	P_2	42	42	45

[1] Filonotisflavona según Salm (1992).
[2] Filonotisflavona según Seeger (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.13 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto III, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.13.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto III (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto III	Filanotisflavona[1]
MeOH	255sh 345	242sh 346
NaOMe	269 330sh 400	262 400
$AlCl_3$	271 303sh 419	271 283sh 393sh 419
$AlCl_3$ + HCl	260sh 299sh 357 390sh	257 281sh 358
NaOAc	269 299sh 408	266 397
NaOAc + H_3BO_3	270 409	268 402

[1]datos procedentes de Salm (1992).

La Fig. 5.29 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto III frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.30 presenta el Espectro de Masas del Compuesto III.

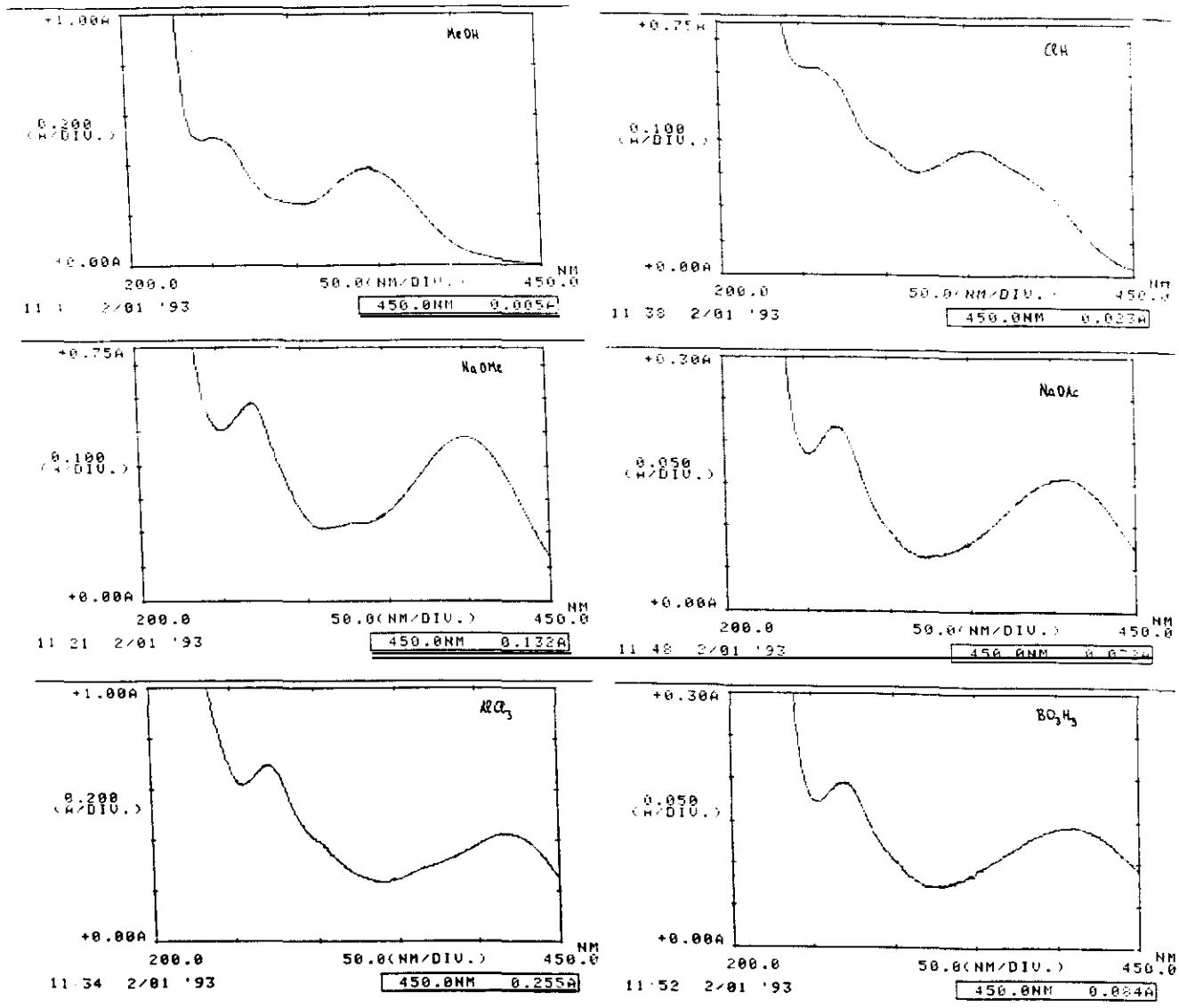


Fig. 5.29.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto III.

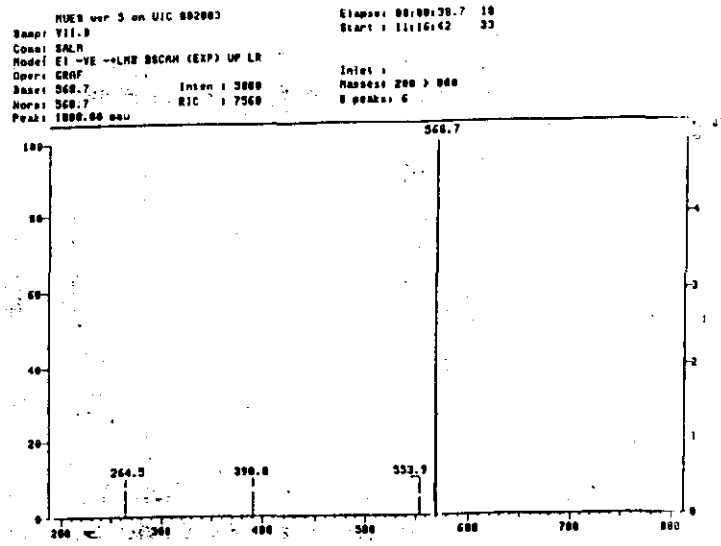


Fig. 5.30.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto III.

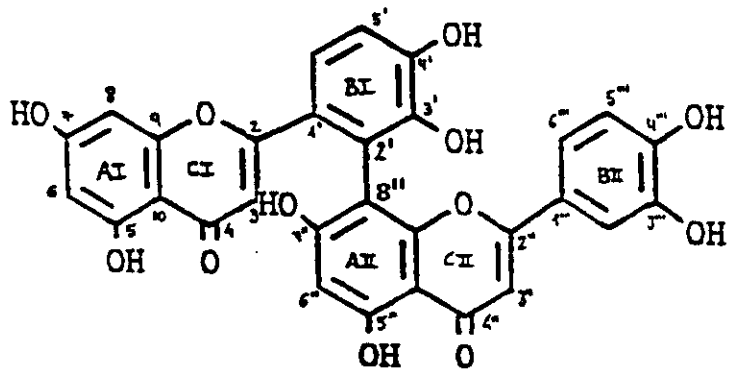
En la Tabla 5.14 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto III comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona y luteolina).

En la Fig. 5.31 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto III.

En la Tabla 5.15 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto III, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.32 y 5.33 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto III, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.32) y el intervalo 5.7-7.3 ppm (Fig. 5.33).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Salm (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto III

Tabla 5.14.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto III.

Carbonos	Compuesto III	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	166,7	166,5	164,5
2''	163,8	163,8	-
3	106,5	106,4	103,3
3''	102,5	102,4	-
4	181,9	181,7	182,2
4''	181,3	181,1	-
5	161,2	161,1	162,1
5''	160,5	160,3	-
6	98,6	98,6	99,2
6''	98,3	98,3	-
7	163,8	163,7	164,7
7''	161,3	161,4	-
8	93,1	93,0	94,2
8''	**103,5**	105,5	-
9	157,3	157,2	157,9
9''	154,4	154,3	-
10	103,1	102,9	104,2
10''	103,3	103,2	-
1'	124,0	124,0	122,1
1'''	121,8	121,7	-
2'	**118,6**	118,7	113,8
2'''	113,6	113,5	-
3'	144,4	144,3	146,2
3'''	145,6	145,7	-
4'	148,5	148,3	150,1
4'''	149,6	149,4	-
5'	114,6	114,6	116,4
5'''	115,6	115,5	-
6'	120,7	120,5	119,3
6'''	118,8	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).

[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

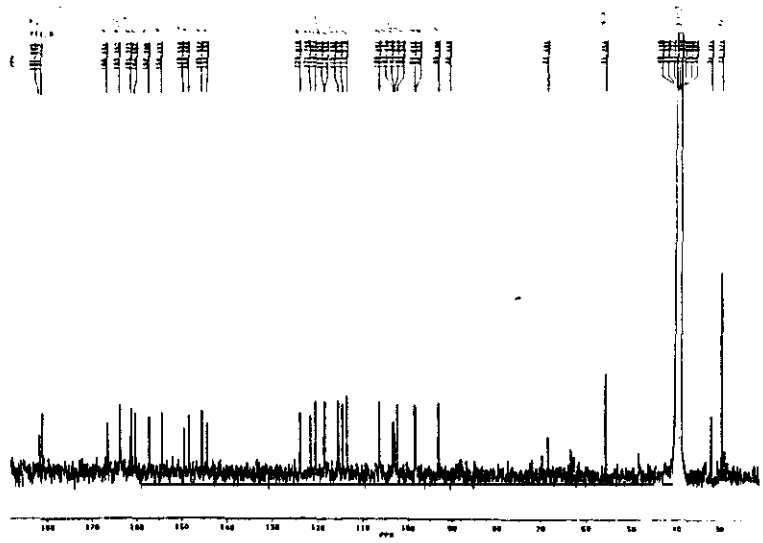


Fig. 5.31.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto III.

Tabla 5.15.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto III.

Protones	Compuesto III	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
3	6,06 s	6,06 s	6,69 s
6	5,75 d (2)	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	6,07 d (2)	6,07 d (2)	6,47 d (2)
5'	7,01 m	7,01 d (8;5)	6,92 d (9)
6'	7,24 d (8;5)	7,24 d (8;5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,62 s	6,62 s	-
6''	6,27 s	6,27 s	-
2'''	7,01 m	7,02 d (2)	-
5'''	6,74 d (8)	6,74 d (9)	-
6'''	7,01 m	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,73 s	-	-
OH-5''	13,01 s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

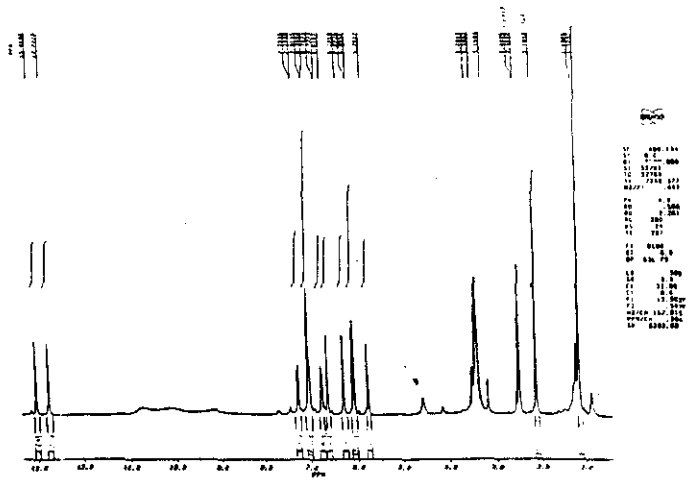


Fig. 5.32.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto III (1.0-13.0 ppm).

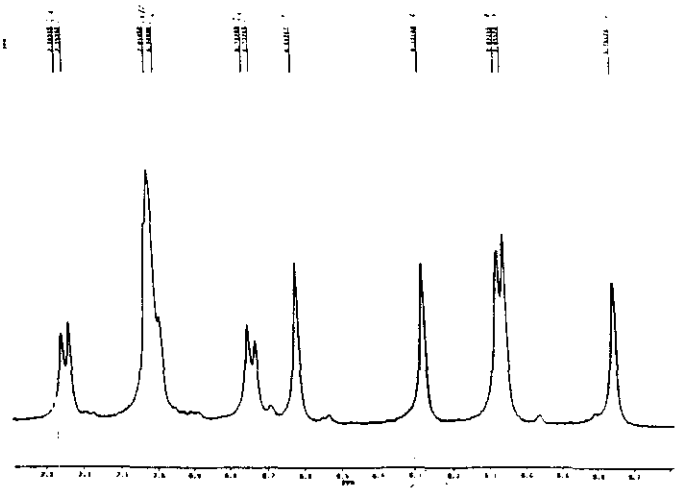


Fig. 5.33.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto III (5.7-7.3 ppm).

5.1.3.4. COMPUESTO IV (BH-6, BI-4, BP-5, BS-8)

(2,3-dihidro-filonotisflavona o 2,3-dihidro-2',8''-biluteolina)

En la Tabla 5.16 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto IV, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.16.: Datos cromatográficos del Compuesto IV.

		Compuesto IV	2,3-dihidro-filonotisflavona[1]	2,3-dihidro-filonotisflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	Am
	+ NA	AN-rojo con el tiempo	Am-rojo con el tiempo	AN-rojo con el tiempo
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_c	Z_1	35	35	33
	Z_2	76	76	68
	Z_3	85	-	76
	P_1	70	70	61
	P_2	54	54	51

[1] 2,3-dihidro-filonotisflavona según Seeger (1992).
[2] 2,3-dihidro-filonotisflavona según Salm (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.17 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto IV, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.17.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto IV (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto IV	2,3-dihidro-filonotisflavona[1]
MeOH	254sh 273 288sh 344	274 285sh 346
NaOMe	281 322 406	288sh 321 409
$AlCl_3$	273sh 301sh 362	279 285sh 382sh 426
$AlCl_3$ + HCl	276sh 301sh 359	278 286sh 361 376sh
NaOAc	277 298sh 328sh 421	271 305sh 402
NaOAc + H_3BO_3	280 300sh 421	274 392

[1]datos procedentes de Salm (1992).

La Fig. 5.34 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto IV frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.35 presenta el Espectro de Masas del Compuesto IV.

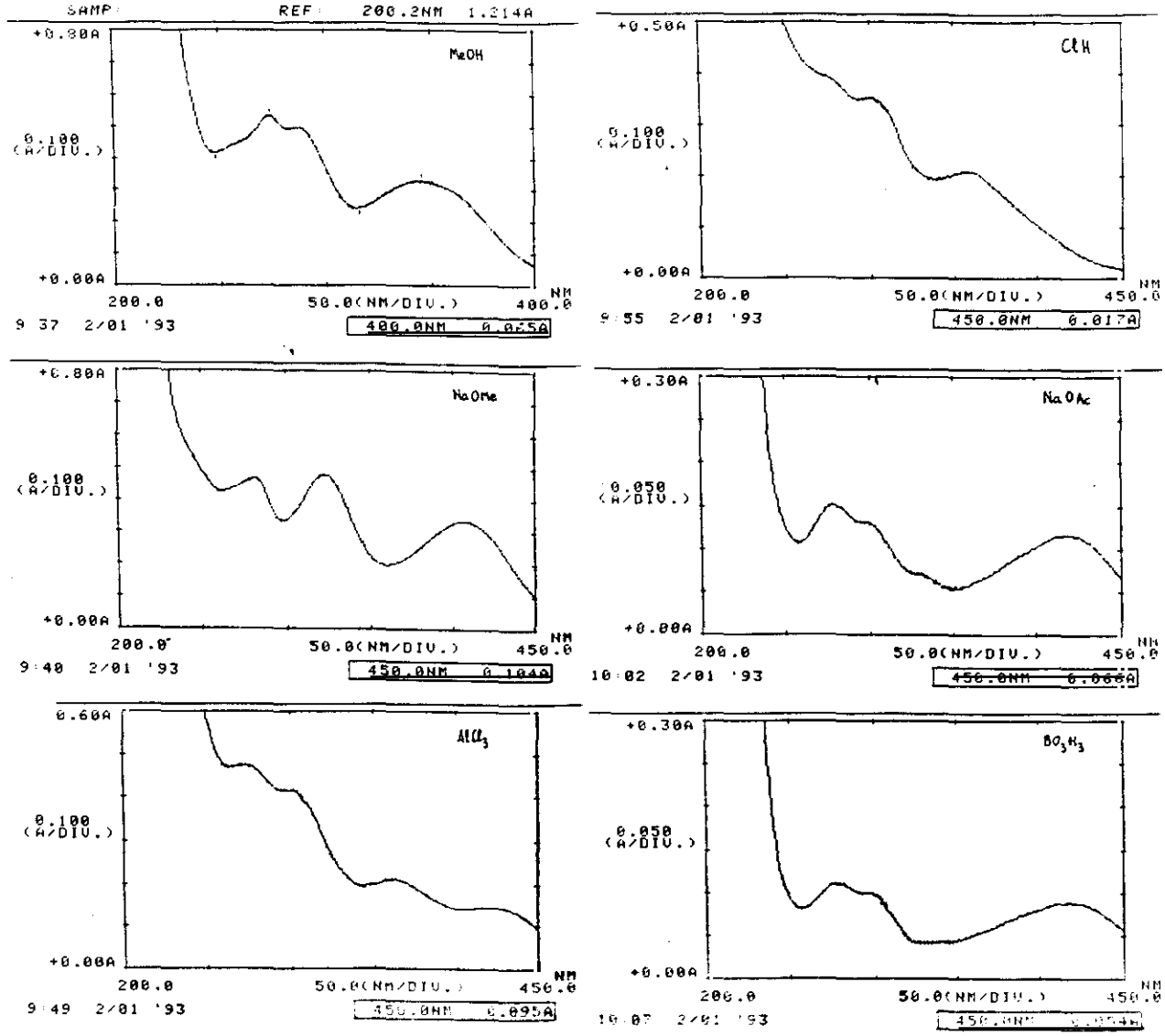


Fig. 5.34.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto IV.

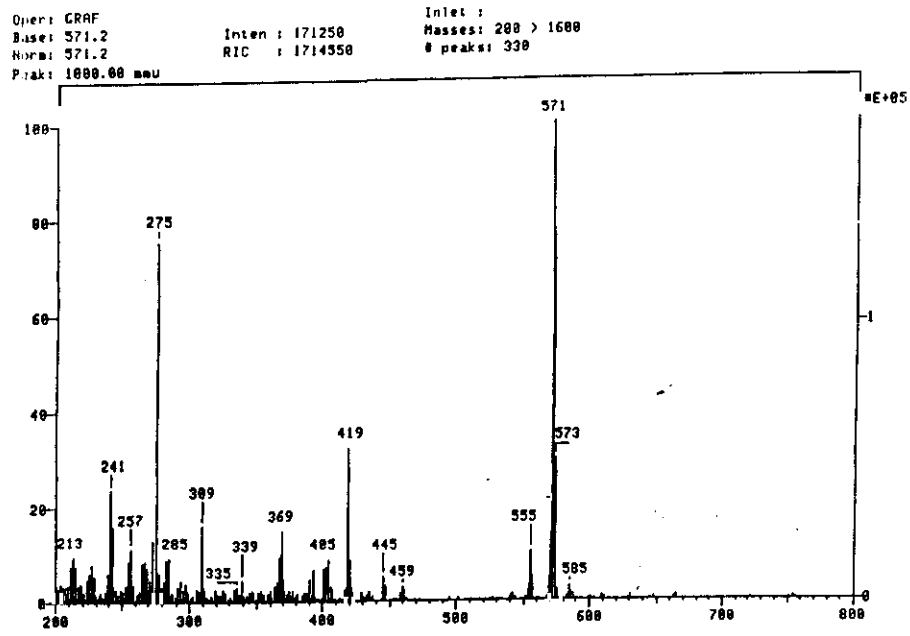


Fig. 5.35.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto IV.

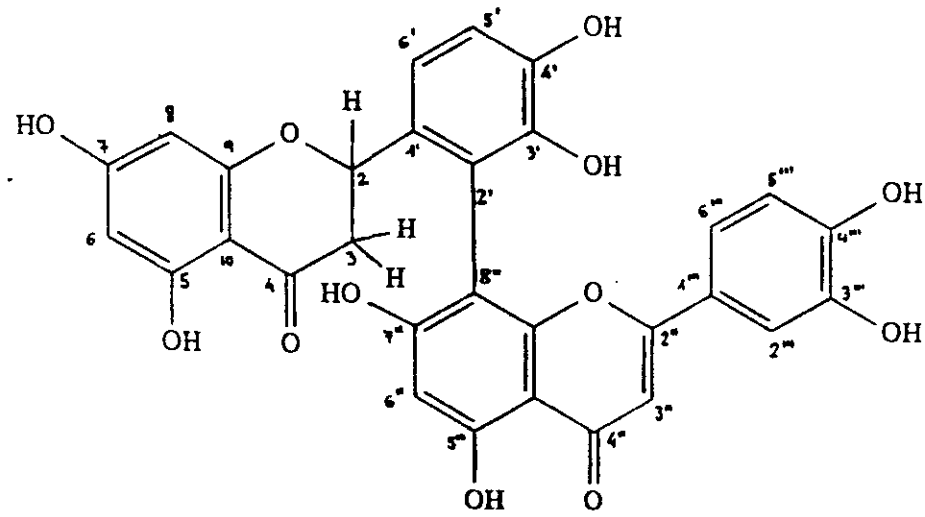
En la Tabla 5.18 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto IV comparados con la bibliografía aneja correspondiente (2,3-dihidro-filonotisflavona y luteolina).

En la Fig. 5.36 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto IV.

En la Tabla 5.19 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto IV, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.37 y 5.38 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto IV, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.37) y el intervalo 4.9-7.2 ppm (Fig. 5.38).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Salm (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto IV

Tabla 5.18.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto IV.

Carb.	Compuesto IV	Luteolina[1]	Eriodictiol[1]	2,3-dihidro-filonotisflavona[2]
2	77,1* - 76,8**	-	78,3	77,1* -76,8**
2''	163,2 - 163,2	164,5	-	163,6 - 163,6
3	42,4 - 42,0	-	42,2	44,5 - 42,2
3''	102,5 - 102,5	103,3	-	102,5 - 102,7
4	196,3 - 196,3	-	196,2	196,0 - 196,0
4''	181,8 - 181,8	182,2	-	182,0 - 182,0
5	163,2 - 163,9	-	163,4	163,6 - 164,1
5''	160,4 - 160,4	162,1	-	160,5 -160,5
6	95,6 - 95,6	-	95,7	95,6 - 95,6
6''	98,4 - 98,4	99,2	-	98,5 - 98,5
7	166,7 - 166,5	-	166,6	166,5 - 166,4
7''	162,1 - 162,1	164,7	-	161,7- 161,7
8	94,7 - 94,5	-	94,8	94,7 - 94,6
8''	**103,7 -103,7**	**94,2**	-	103,8 - 103,8
9	163,0 - 163,0	-	162,8	163,1 - 163,1
9''	154,8 - 154,7	157,9	-	154,9 - 154,8
10	101,4 - 101,4	-	101,7	101,5 - 101,5
10''	102,4 - 102,4	104,2	-	102,1 - 102,1
1'	129,0 - 128,6	-	129,4	129,4 - 129,0
1'''	121,8 - 121,6	122,1	-	122,0 - 121,7
2'	**118,7 - 118,7**	-	**117,8**	118,4 - 118,8
2'''	113,5 - 113,8	119,3	-	113,6 - 113,9
3'	143,6 - 143,5	-	115,3	143,6 - 143,5
3'''	145,5 - 145,5	116,4	-	145,6 - 145,5
4'	145,2 - 145,4	-	145,6	145,2 - 145,4
4'''	149,5 - 149,5	150,1	-	149,6 - 149,5
5'	114,7 - 114,7	-	145,1	114,8 - 114,8
5'''	115,4 -115,4	146,2	-	115,6 - 115,5
6'	117,0 - 117,0	-	114,2	117,1 - 117,1
6'''	118,7 - 119,3	113,8	-	118,6 - 119,3

[1]Luteolina y Eriodictiol según Harborne & Mabry (1982).
[2]2,3-dihidro-filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
* Componente principal
** Componente secundario

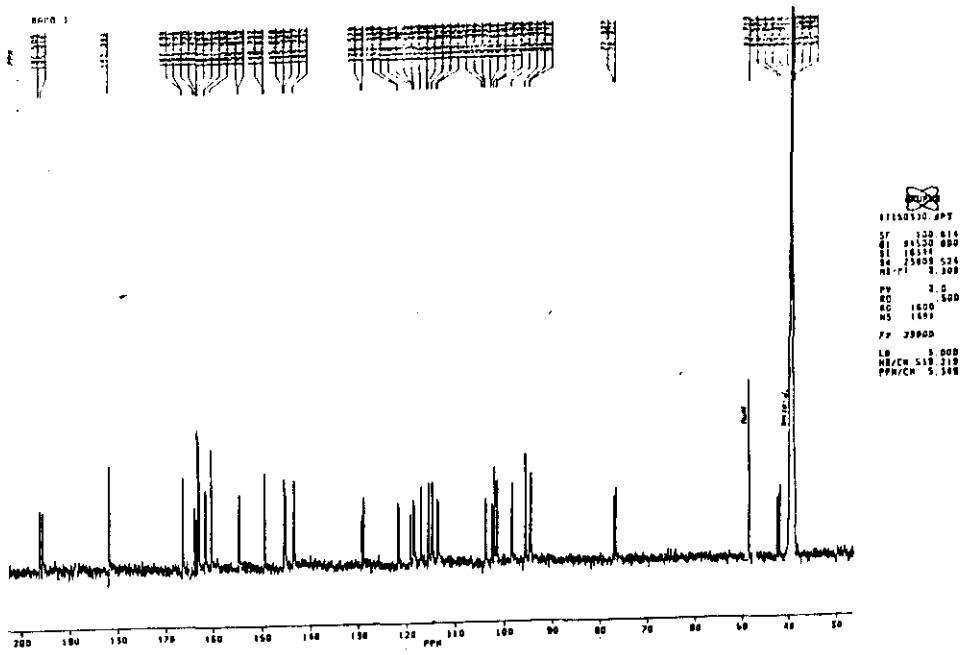


Fig. 5.36.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto IV.

Tabla 5.19.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto IV.

Protones	Compuesto IV		2,3-dihidro-filonotisflavona[1]	
	*	**	*	**
2	5,01 dd (12;2)	5,09 dd (12;2)	5,08 dd (13;3)	5,00 dd (13,3)
3a ***	3,27 dd (17;14)	3,05 dd (17;14)	2,96 dd (17;13)	3,18 dd (17;13)
3b ***	2,59 dd (18;-) ♣	2,19 dd (16;-) ♣	2,22 dd (17;3)	2,60 dd (17;3)
6	5,78 d (2)	5,82 d (2)	5,80 d (2)	5,76 d (2)
8	5,43 d (2)	5,76 d (2)	5,73 d (2)	5,42 d (2)
5'	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
6'	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
3''	6,62 s	6,66 s	6,54 s	6,51 s
6''	6,35 s	6,34 s	6,33 s	6,33 s
2'''	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
5'''	6,75 d (8)	6,74 d (8)	6,72 d (8,5)	6,73 d (8,5)
6'''	6,91-7,10 m ♠	6,92 dd (9,-) ♣	6,89 dd (8,5;2)	6,94-7,08 m ♠
OH-5	12,05 s	11,94 s	-	-
OH-5''	-	-	-	-

[1]2,3-dihidro-filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).

*, ** Componente principal (*) y Componente secundario (**). La relación entre ambos diastereómeros es de 1:1,2, al contrario que en Geiger & Bokel (1989).

*** Señales correspondientes a los 2 hidrógenos situados en posición 3 de la mitad flavanónica del biflavonoide.

♣ Señales no resueltas.

♠ Multiplete no analizable.

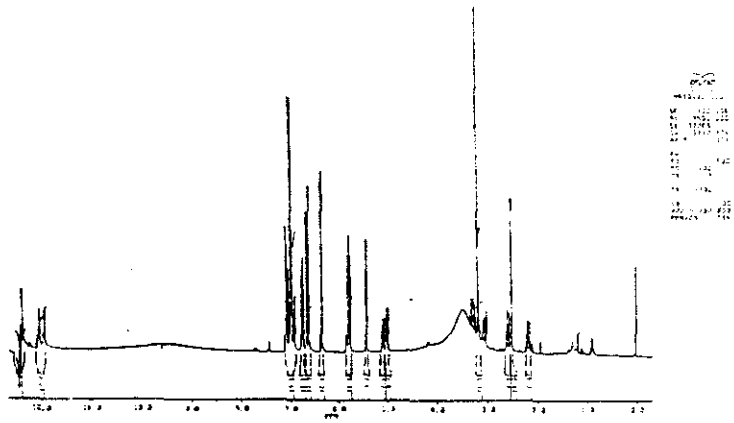


Fig. 5.37.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto IV (1.0-13.0 ppm).

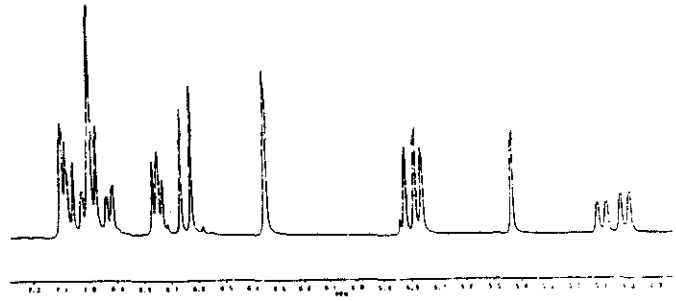


Fig. 5.38.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto IV (4.9-7.1 ppm).

5.1.3.5. COMPUESTO V (BI-2, BP-6, BS-4)

(Dicranolomina o 2',6''-biluteolina)

En la Tabla 5.20 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto V, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1 (pp. 108).

Tabla 5.20.: Datos cromatográficos del Compuesto V.

		Compuesto V	Dicranolomina[1]	Dicranolomina[2]
Fluorescencia	UV (350 nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	VO	VO
	+ NA	Am	Am	Am
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	45	17	17
	Z_2	59	69	69
	Z_3	83	81	-
	P_1	20	54	54
	P_2	37	43	43

[1] Dicranolomina según Seeger (1992) en *Bartramia pomiformis*.
[2] Dicranolomina según Seeger (1992) en *Anacolia webbii*.
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.21 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto V, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.21.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto V (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto V	Dicranolomina[1]
MeOH	254 288sh 344	260 349
NaOMe	267sh 327 399	266 272sh 400
$AlCl_3$	274 299sh 422	268 373
$AlCl_3$ + HCl	270 294sh 366	263 372
NaOAc	266 328sh 395	272 303sh 406
NaOAc + H_3BO_3	269 396	264 274sh 301sh 360 390sh

[1]datos procedentes de Markham & col. (1988).

La Fig. 5.39 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto V frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.40 presenta el Espectro de Masas del Compuesto V.

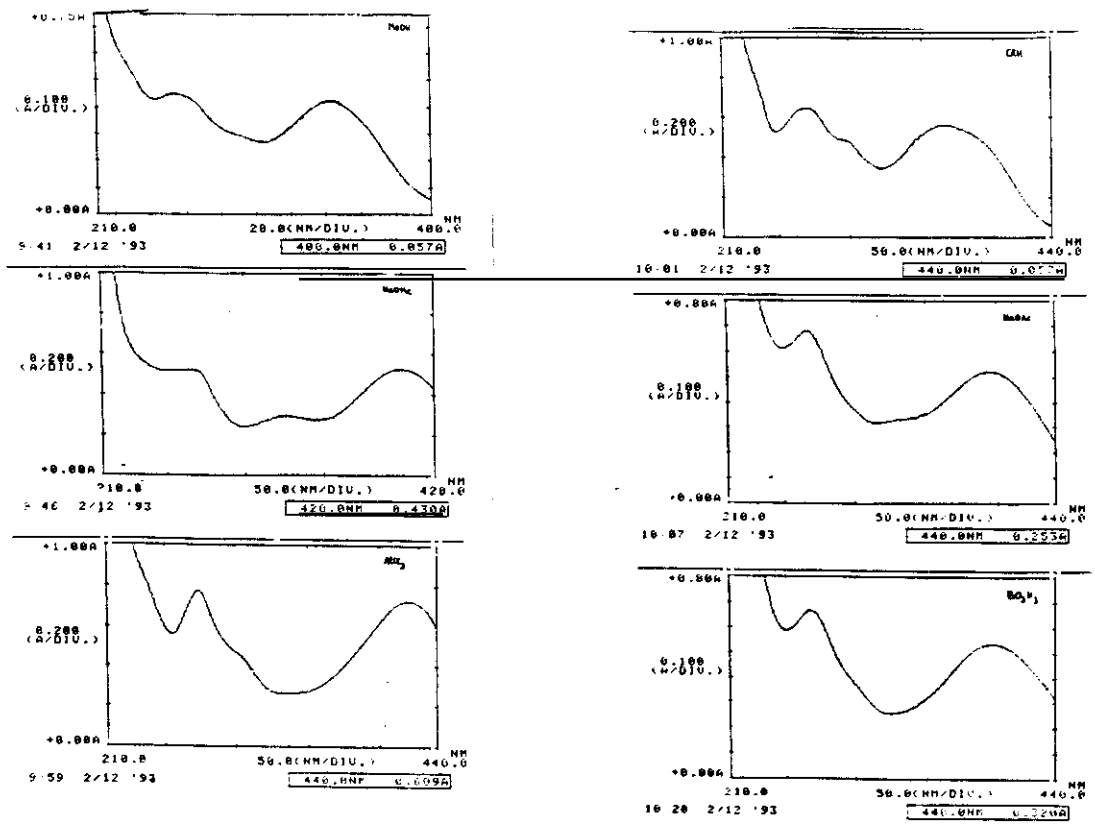


Fig. 5.39.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto V.

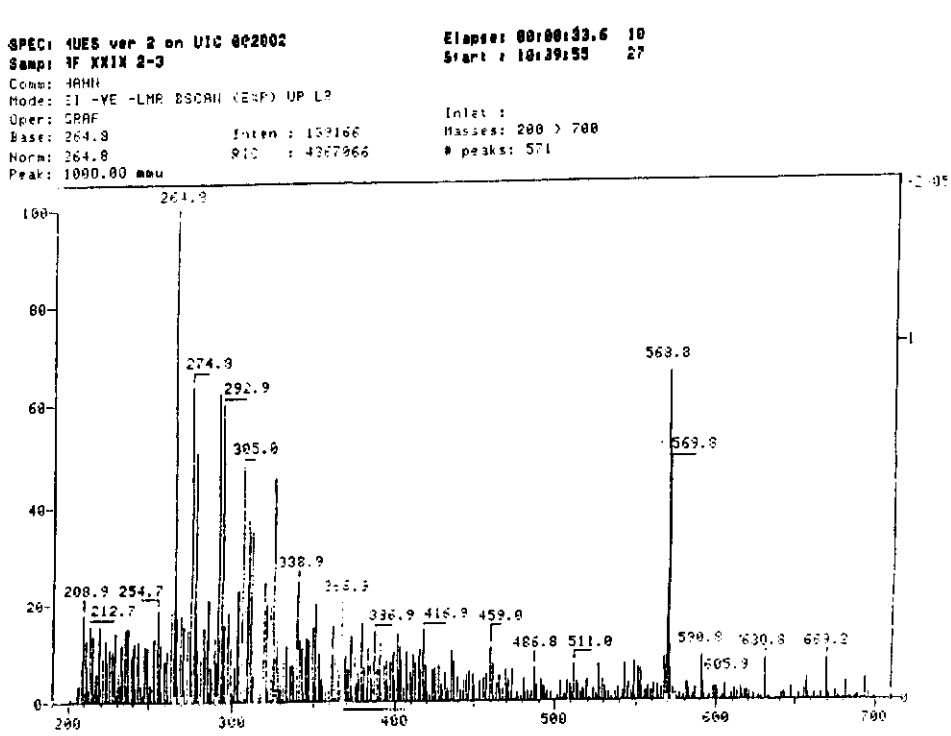


Fig. 5.40.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto V.

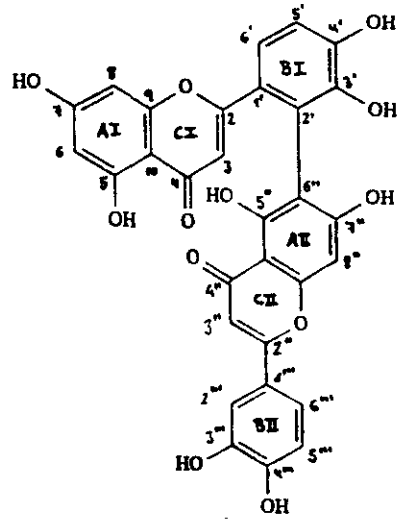
En la Tabla 5.22 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto V comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona y luteolina).

En la Fig. 5.41 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto V.

En la Tabla 5.23 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto V, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.42 y 5.43 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto V, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.42) y el intervalo 5.9-7.5 ppm (Fig. 5.43).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Salm (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto V.

Tabla 5.22.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto V.

Carbonos	Compuesto V	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	166,3	166,5	164,5
2''	163,9	163,8	-
3	106,2	106,4	103,3
3''	103,3	102,4	-
4	181,6	181,7	182,2
4''	181,2	181,1	-
5	161,2	161,1	162,1
5''	158,7	160,3	-
6	98,6	98,6	99,2
6''	**107,9**	98,3	-
7	163,6	163,7	164,7
7''	161,8	161,4	-
8	93,1	93,0	94,2
8''	**93,3**	103,5	-
9	157,3	157,2	157,9
9''	156,2	154,3	-
10	102,8	102,9	104,2
10''	103,3	103,2	-
1'	123,7	124,0	122,1
1'''	120,2	121,7	-
2'	**119,7**	118,7	113,8
2'''	113,3	113,5	-
3'	144,2	144,3	146,2
3'''	145,7	145,7	-
4'	148,2	148,3	150,1
4'''	149,6	149,4	-
5'	114,3	114,6	116,4
5'''	116,0	115,5	-
6'	121,5	120,5	119,3
6'''	118,9	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).

[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

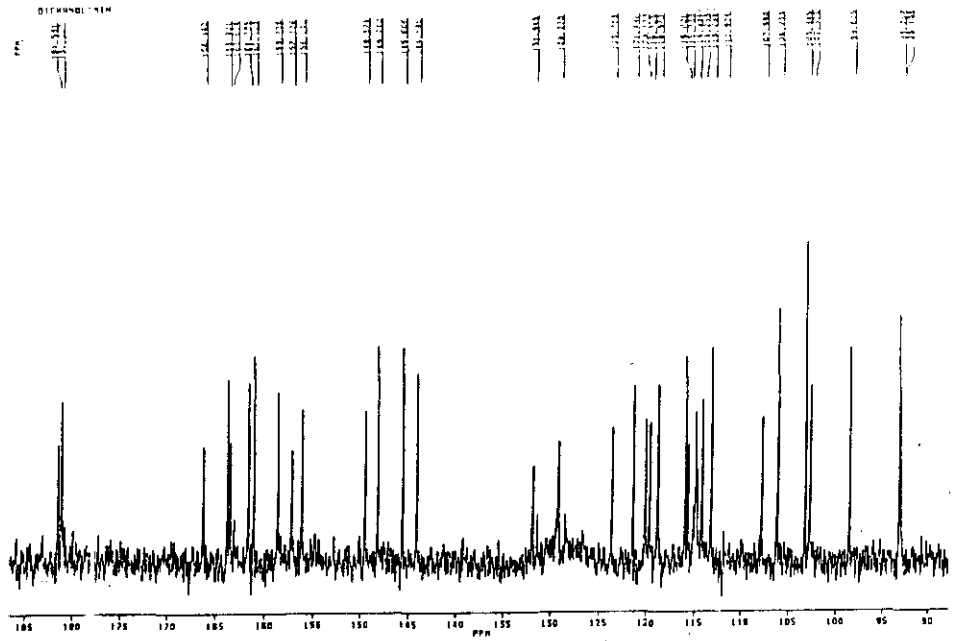


Fig. 5.41.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto V.

Tabla 5.23.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto V.

Protones	Compuesto V	Dicranolomina[1]	Luteolina[2]
3	6,04s	6,03 s	6,69 s
6	5,96 d (2)	5,96 d (2)	6,22 d (2)
8	6,08 d (2)	6,08 d (2)	6,47 d (2)
5'	6,94 d (8,5)	6,93 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	7,18 d (8,5)	7,18 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,68 s	6,69 s	-
8''	6,54 s	6,52 s	-
2'''	7,42 d (2)	7,41 d (2)	-
5'''	6,89 d (8)	6,89 d (8)	-
6'''	7,43 dd (9;2)	7,43 dd (8;2,5)	-
OH-5	12,78 s	-	-
OH-5''	13,13 s	-	-

[1]Dicranolomina según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

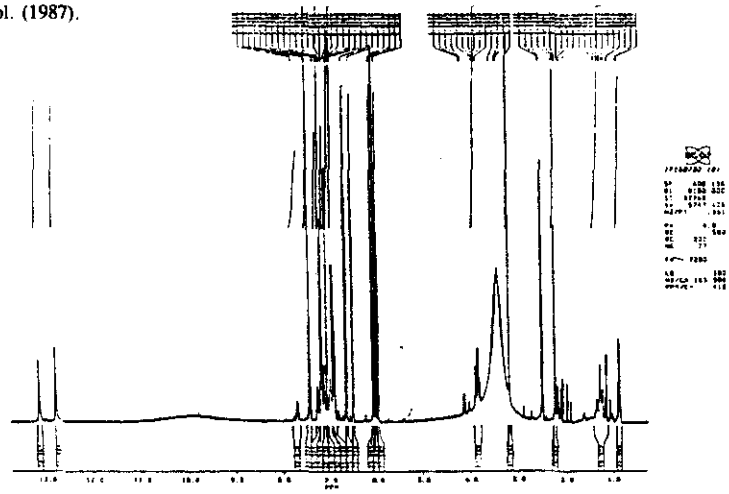


Fig. 5.42.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto V (1.0-13.0 ppm).

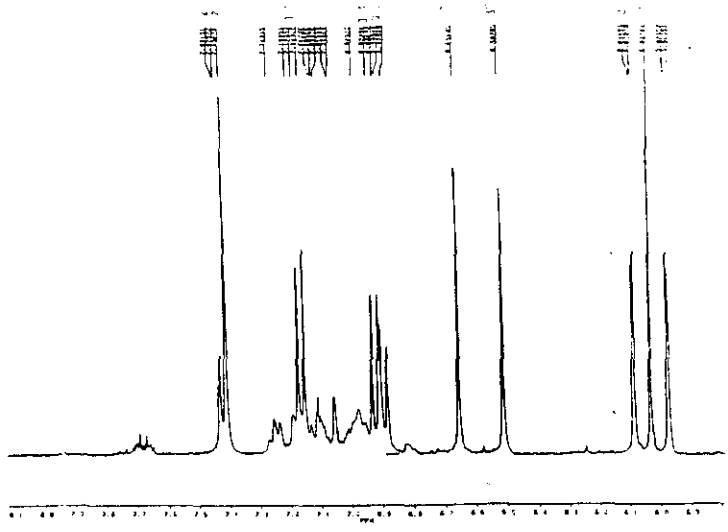


Fig. 5.43.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto V (5.9-7.5 ppm).

5.1.3.6. COMPUESTO VI (BP-1, BH-1)

(Bartramiaflavona o 2-hidroxi-2,3-dihidro-2',8''-8,2'''-biluteolina)

En la Tabla 5.24 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto VI, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.24.: Datos cromatográficos del Compuesto VI.

		Compuesto VI	Bartramiaflavona[1]	Bartramiaflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	VO	VO	VO
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	70	69	71
	Z_2	76	77	75
	Z_3	67	63	67
	P_1	50	51	46
	P_2	55	57	54

[1] Bartramiaflavona según Seeger (1992).
[2] Bartramiaflavona según Salm (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.25 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto VI, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.25.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto VI (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto VI	Bartramiaflavona[1]
MeOH	263 276sh 328sh 364sh	263 291 315sh
NaOMe	276 392sh	269 344
$AlCl_3$	268 316sh 364sh	275 311 350sh
$AlCl_3$ + HCl	263 312 364	271 311 368
NaOAc	273 388sh	266 322
NaOAc + H_3BO_3	258sh 304sh 340	262 293 326sh

[1]datos procedentes de Seeger (1992).

La Fig. 5.44 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto VI frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.45 presenta el Espectro de Masas del Compuesto VI.

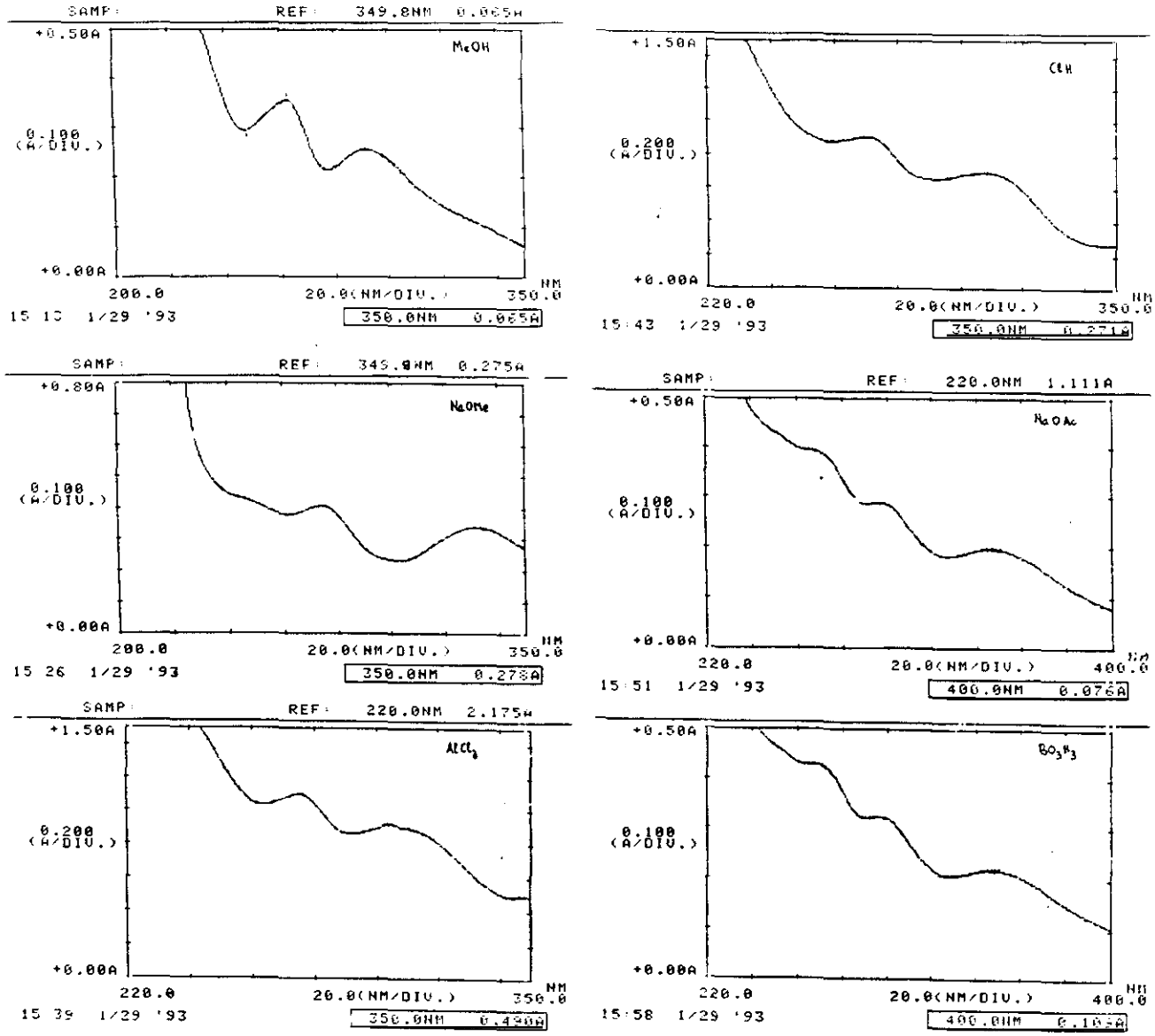


Fig. 5.44.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto VI.

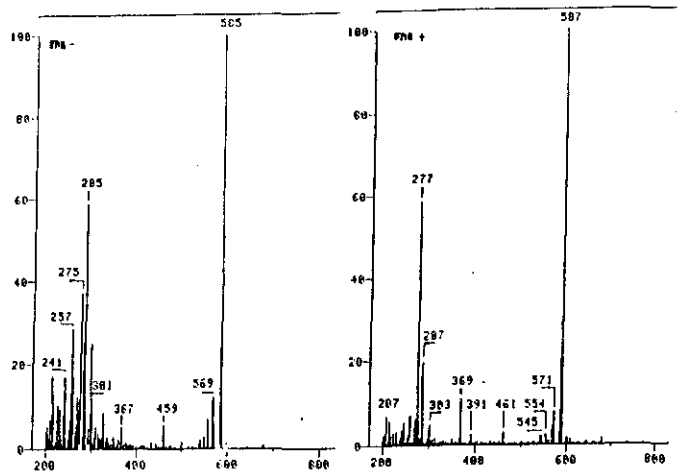


Fig. 5.45.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto VI.

En la Tabla 5.26 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto VI comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona y luteolina).

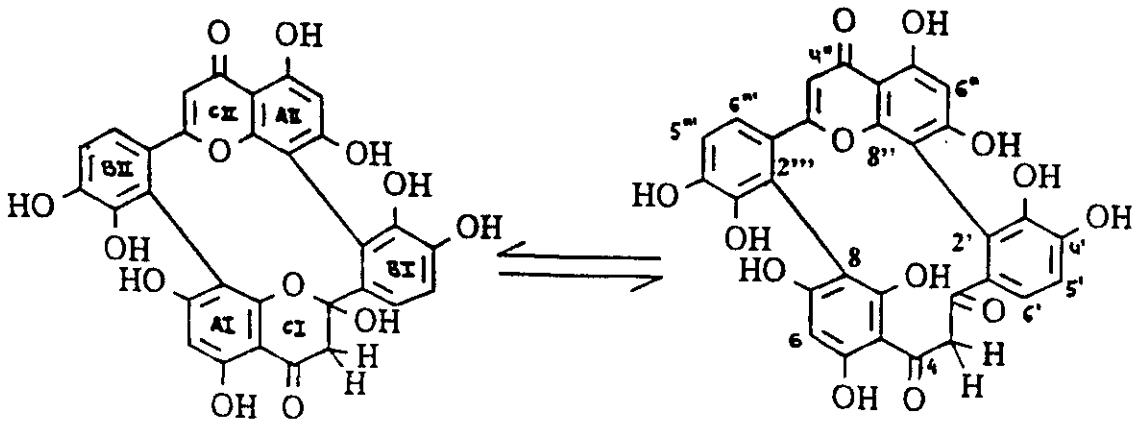
En la Fig. 5.46 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto VI.

En la Tabla 5.27 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto VI, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.47 y 5.48 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto VI, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.47) y el intervalo 5.7-7.4 ppm (Fig. 5.48).

Así mismo se presentan los resultados procedentes del Espectro COSY (^{1}H-^{1}H) realizado en el Compuesto VI (Fig. 5.49).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Seeger & col. (1991) y Salm (1992).



Estructura Molecular del Compuesto VI.

Tabla 5.26.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto VI.

Carbonos	Compuesto VI (ciclo)	Compuesto VI (oxo)	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	102,6	200,0	166,5	164,5
2''	168,0	168,4	163,8	-
3	48,7 sec.	55,3 sec.	106,4	103,8
3''	108,6 t.	109,0 t.	102,4	-
4	194,3	195,2	181,7	182,2
4''	182,0	182,3	181,1	-
5	160,8	162,2	161,1	162,1
5''	158,2	160,0	160,3	-
6	94,5 t.	95,0 t.	98,6	99,2
6''	98,5 t.	98,5 t.	98,3	-
7	164,3	165,3	163,7	164,7
7''	162,4	162,6	161,4	-
8	**104,1**	**105,1**	93,0	94,2
8''	**103,8**	**104,1**	**103,5**	-
9	156,7	149,3	157,2	157,9
9''	154,8	155,1	154,3	-
10	100,2	100,5	102,9	104,2
10''	103,1	103,7	103,2	-
1'	129,4	132,1	124,0	122,1
1'''	126,4	127,1	121,7	-
2'	**119,6**	**120,9**	**118,7**	113,8
2'''	**118,3**	**118,3**	113,5	-
3'	144,7	144,7	144,3	146,2
3'''	144,4	144,4	145,7	-
4'	145,3	145,8	148,3	150,1
4'''	146,7	147,0	149,4	-
5'	113,7 t.	114,5 t.	114,6	116,4
5'''	113,1 t.	113,6 t.	115,5	-
6'	119,9 t.	122,5 t.	120,5	119,3
6'''	117,4 t.	117,4 t.	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
Los carbonos secundarios (sec.) y terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

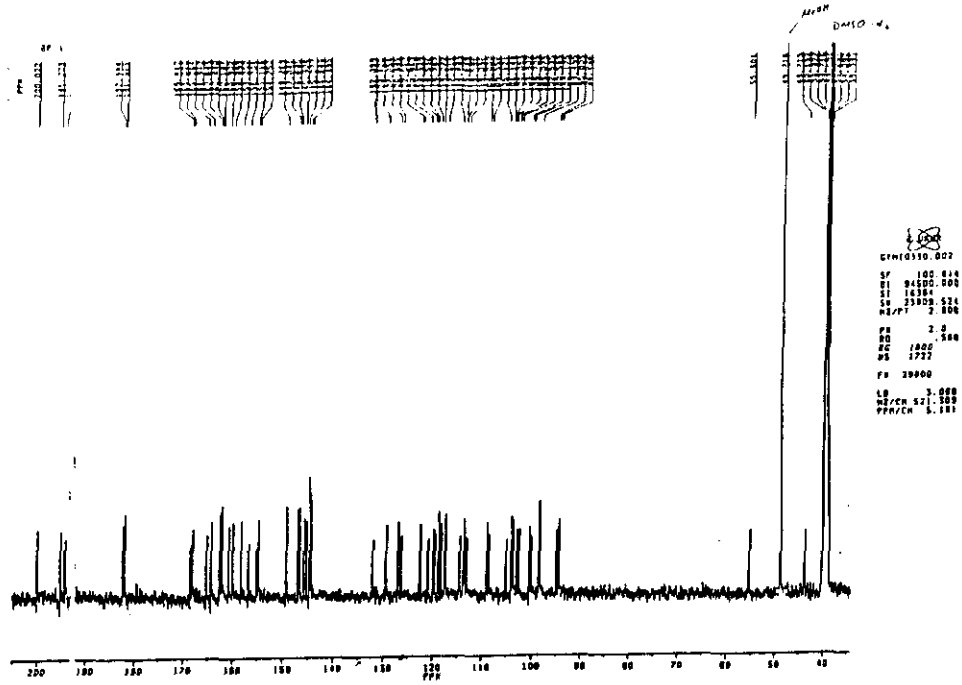


Fig. 5.46.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto VI.

Tabla 5.27.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VI.

Protones	Compuesto VI (ciclo)	Compuesto VI (oxo)	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
OH-2	7,37s **	-	-	-
3a *	2,36 d (17)	3,40 d (15)	6,06 s	6,69 s
3b *	2,92 d (17)**	5,38 d (15)	-	-
6	5,82s	5,90s	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	—	—	6,07 d (2)	6,47 d (2)
2'	—	—	-	7,43 d (2)
5'	6,78 d (8)	6,84 d (8)	7,01 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	7,14 d (8)	7,40 d (8)	7,24 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,28 s	6,32s	6,62 s	-
6''	5,78s	5,78s	6,27s	-
2'''	—	—	7,02 d (2)	-
5'''	6,74 d (8)	6,65 d (8)	6,89 d (9)	-
6'''	6,78 d (8)	6,80 d (8)	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,08 s	12,86s	-	-
OH-5''	12,79 s	12,99s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).
* Señales correspondientes a los 2 hidrógenos situados en posición 3 de la mitad flavanónica del biflavonoide.
** El espectro COSY revela un débil acoplamiento entre estos dos protones.

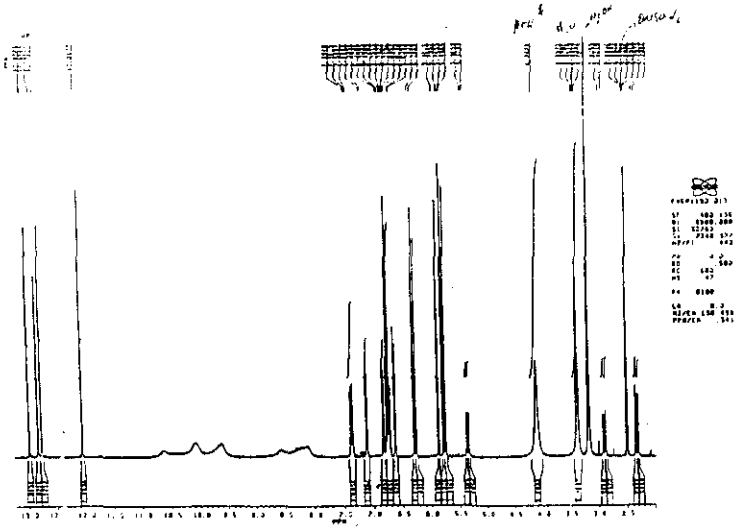


Fig. 5.47.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VI (1.0-13.0 ppm).

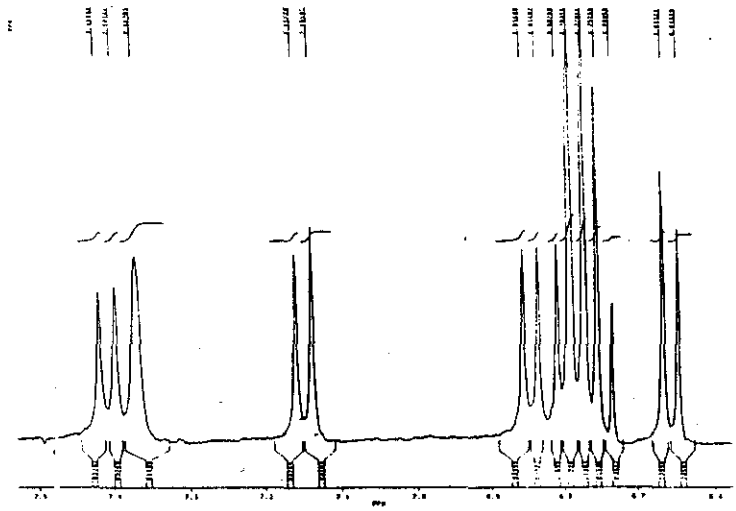


Fig. 5.48.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VI (5.7-7.4 ppm).

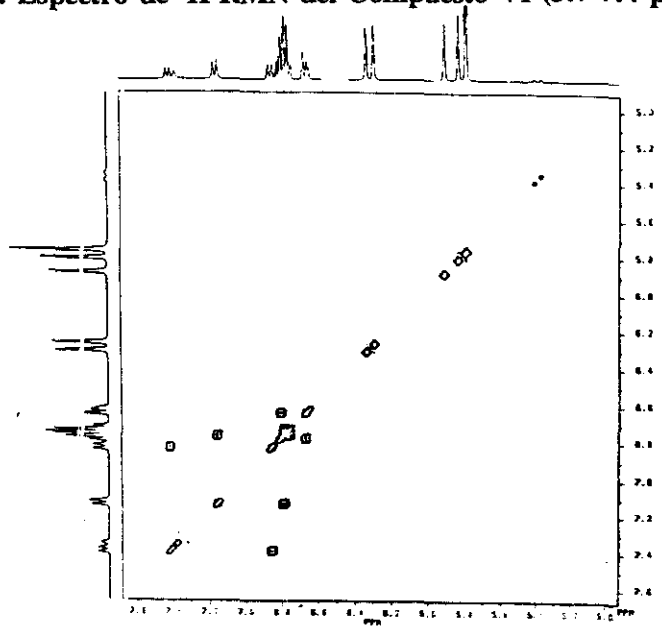


Fig. 5.49.: Espectro COSY (^{1}H-^{1}H) del Compuesto VI.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL I

* 5 3 0 9 5 4 1 6 7 9 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FLAVONOIDES EN BARTRAMIACEAE SCHWAEGR. (MUSCI, BRYOPHYTA): ASPECTOS QUIMIOSISTEMATICOS Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

TESIS DOCTORAL

Autor:
JOSE ANTONIO LOPEZ SAEZ

DIRECTORA
María José Pérez Alonso

DIRECTOR
Arturo Velasco Negueruela

V°B° Directora

V°B° Director

Madrid 1994

El Compuesto VI es una mezcla de dos ciclo-oxo tautómeros, de ahí que tanto en la Tabla 5.26 como en la Tabla 5.27, se reflejen por separado los resultados de los espectros de ^{13}C y ^{1}H RMN para cada uno de los tautómeros.

Los resultados procedentes del Tratamiento del Compuesto VI con clorhídrico 2N, tanto a las 2 horas (H-2) como a las 4 horas (H-4), fueron los siguientes:

Z_1 -Sistema Acético 15%/celulosa:

a) en H-2 se observa la presencia de dos manchas de Rf 66 y 52, frente al Rf de 70 del Compuesto VI patrón sin tratar. Estos resultados apuntan a una posible hidrólisis parcial del Compuesto VI a las 2 horas de tratamiento con ácido.

b) en H-4: igual resultado que en H-2.

Z_3 -Sistema TBA/celulosa:

a) en H-2 se observan dos manchas de Rf 82 y 70.

b) en H-4 se observa una única mancha de Rf 70.

5.1.3.7. COMPUESTO VII (BH-2, BP-2)

(Anhidro-Bartramiaflavona o 2',8''-8,2'''-biluteolina)

En la Tabla 5.28 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto VII, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1 (pp. 108).

Tabla 5.28.: Datos cromatográficos del Compuesto VII.

		Compuesto VII	Anhidro-Bartramiaflavona[1]	Bartramiaflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	VO	VO	VO
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	53	74	71
	Z_2	84	79	75
	Z_3	81	74	67
	P_1	65	54	46
	P_2	54	65	54

[1] Anhidro-Bartramiaflavona según Salm (1992).
[2] Bartramiaflavona según Salm (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.29 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto VII, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.29.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto VII (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto VII	Anhidro-Bartramiaflavona[a]
MeOH	258 281sh 329sh	257 269sh 302sh
NaOMe	274 321sh	273 288sh
$AlCl_3$	272 314sh 357sh	271 284sh 365
$AlCl_3$ + HCl	263 304sh 363sh	264 275sh 368
NaOAc	267 298sh	266 280sh 309sh
NaOAc + H_3BO_3	266 300sh	266 280sh 309sh

[a] datos procedentes de Salm (1992).

La Fig. 5.50 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto VII frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.51 presenta el Espectro de Masas del Compuesto VII.

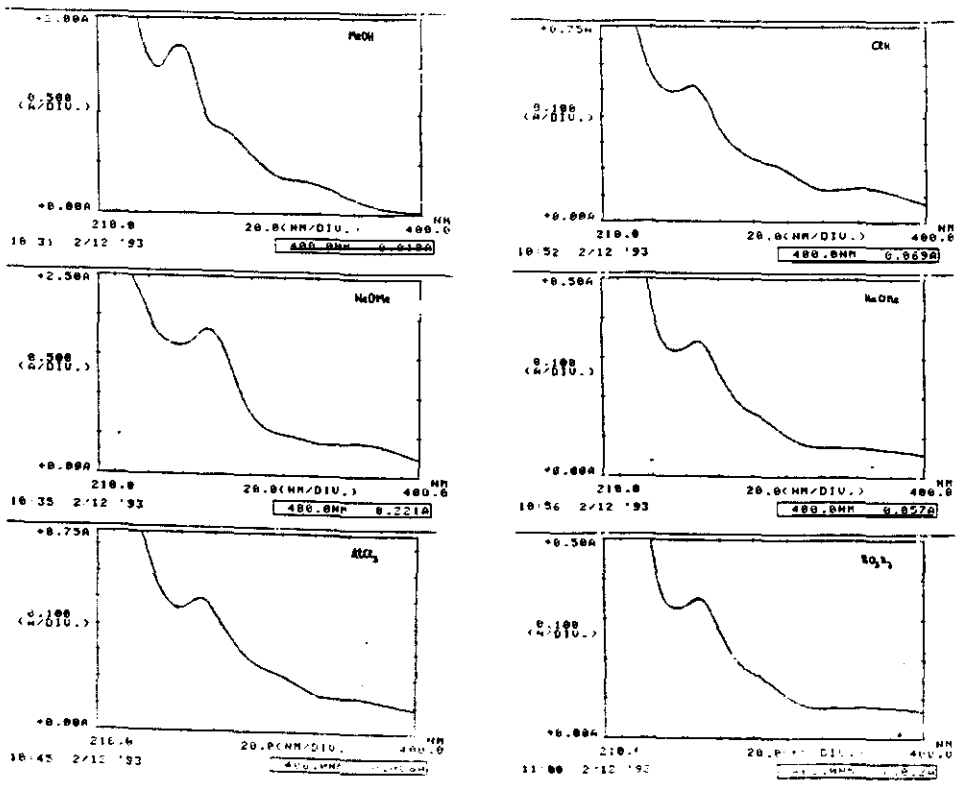


Fig. 5.50.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto VII.

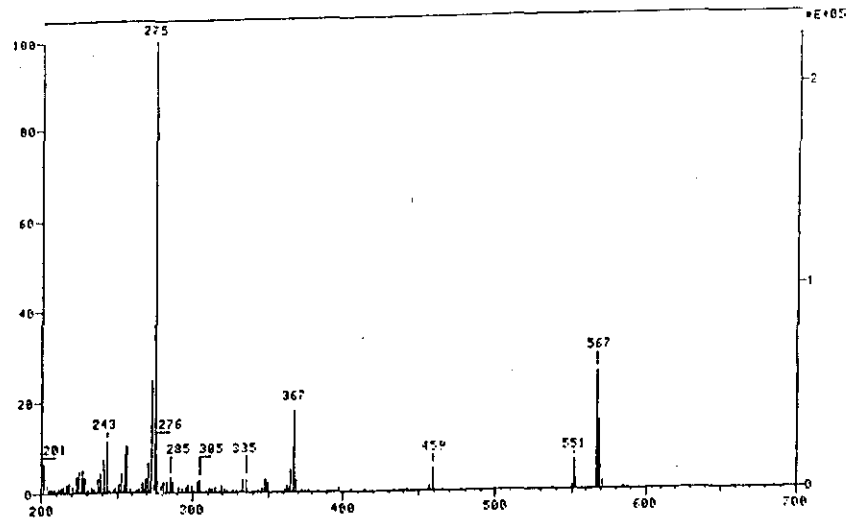


Fig. 5.51.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto VII.

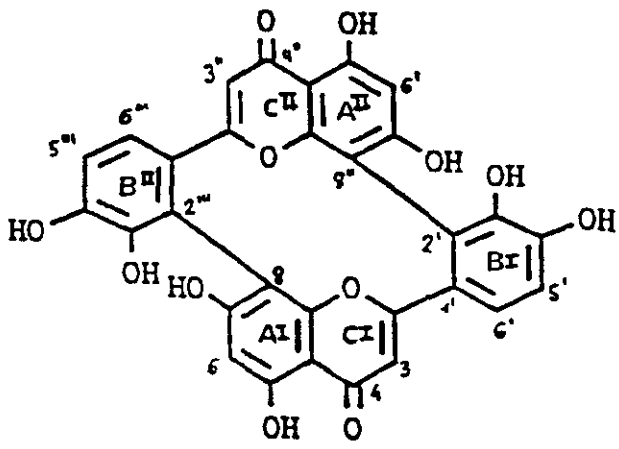
En la Tabla 5.30 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto VII comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona y luteolina).

En la Fig. 5.52 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto VII, así como el realizado bajo la técnica DEPT (Seeger, 1992; Seeger & col., 1981).

En la Tabla 5.31 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto VII, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.53 y 5.54 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto VII, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.53) y el intervalo 5.7-7.4 ppm (Fig. 5.54).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Seeger & col. (1991), Geiger & col. (1993) y Salm (1992).



Estructura Molecular del Compuesto VII

Tabla 5.30.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto VII.

Carbonos	Compuesto VII	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	167,1	166,5	164,5
2''	167,1	163,8	-
3	108,9 t.	106,4	103,8
3''	108,9 t.	102,4	-
4	181,8	181,7	182,2
4''	181,8	181,1	-
5	160,4	161,1	162,1
5''	160,4	160,3	-
6	98,6 t.	98,6	99,2
6''	98,6 t.	98,3	-
7	163,0	163,7	164,7
7''	163,0	161,4	-
8	**103,1**	93,0	94,2
8''	**103,1**	**103,5**	-
9	154,6	157,2	157,9
9''	154,6	154,3	-
10	102,7	102,9	104,2
10''	102,7	103,2	-
1'	125,5	124,0	122,1
1'''	125,5	121,7	-
2'	**119,1**	**118,7**	113,8
2'''	**119,1**	113,5	-
3'	144,4	144,3	146,2
3'''	144,4	145,7	-
4'	147,0	148,3	150,1
4'''	147,0	149,4	-
5'	113,9 t.	114,6	116,4
5'''	113,9 t.	115,5	-
6'	118,7 t.	120,5	119,3
6'''	118,7 t.	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
Los carbonos terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

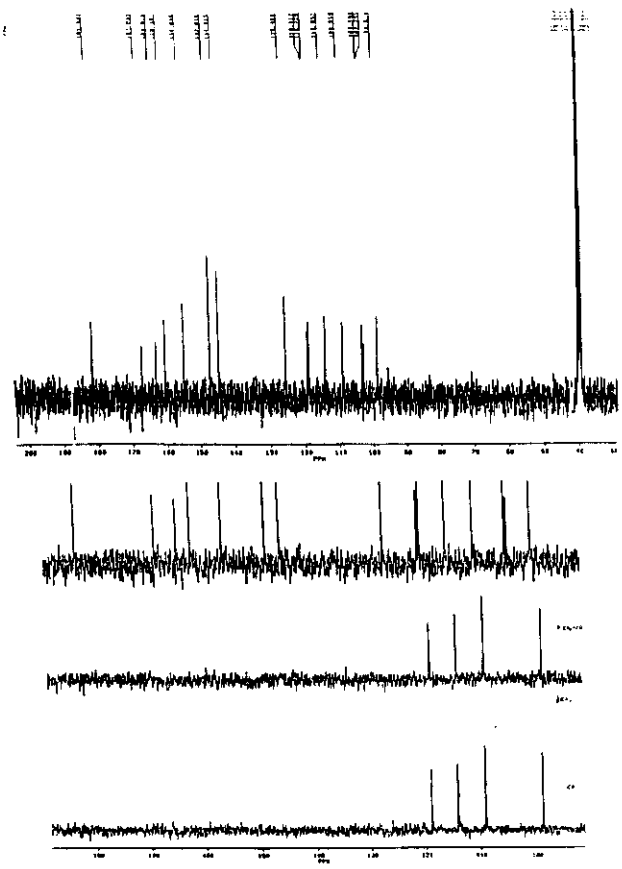


Fig. 5.52.: Espectro de ^{13}C-RMN (y DEPT) del Compuesto VII.

Tabla 5.31.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VII.

Protones	Compuesto VII	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
3	6,26s	6,06s	6,69s
6	5,74s	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	—	6,07 d (2)	6,47 d (2)
2'	—	-	7,43 d (2)
5'	6,73 d (8)	7,01 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	6,80 d (8)	7,24 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,26s	6,62 s	-
6''	5,74s	6,27s	-
2'''	—	7,02 d (2)	-
5'''	6,73 d (8)	6,89 d (9)	-
6'''	6,80 d (8)	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,64 s	-	-
OH-5''	12,64 s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Locker (1959).
[2]Luteolina segun Geiger & col. (1997).

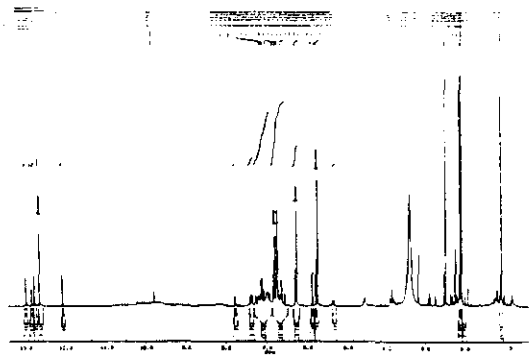


Fig. 5.53.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VII (1.0-13.0 ppm).

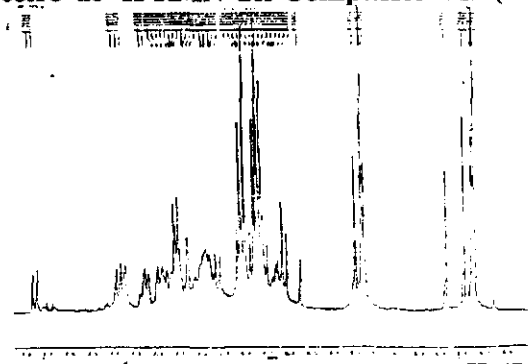


Fig. 5.54.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VII (5.7-7.4 ppm).

5.1.3.8. COMPUESTO VIII (BP-7, BS-5.1)

(Bartramia-Triluteolina o 2',8'',2''',8''''-triluteolina)

En la Tabla 5.32 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto VIII, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1 (pp. 108).

Tabla 5.32.: Datos cromatográficos del Compuesto VIII.

		Compuesto VIII	Bartramia-Triluteolina[1]	Bartramiaflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	Am	Am	VO
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	32	25	71
	Z_2	25	60	75
	Z_3	63	69	67
	P_1	26	32	46
	P	51	28	54

[1] Bartramia-Triluteolina según Seeger (1992).
[2] Bartramiaflavona según Sabri (1992).
(ver pp. 77-78 sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.33 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto VIII, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.33.: Datos de Espectroscopía de UV del Compuesto VIII (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto VIII	Bartramia-Trihuteolina[1]
MeOH	220sh 256 346	225sh 256 346
NaOMe	270 332sh 395	225sh 270 329sh 398
$AlCl_3$	272 296sh 418	273 301sh 410
$AlCl_3$ + HCl	262sh 299sh 355	263 307sh 350 397sh
NaOAc	265 387	258sh 348
NaOAc + H_3BO_3	265 390	260 368

[1]datos procedentes de Seeger (1992).

La Fig. 5.55 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto VIII frente a los reactivos específicos en cada caso. La Fig. 5.56 presenta el Espectro de Masas del Compuesto VIII.

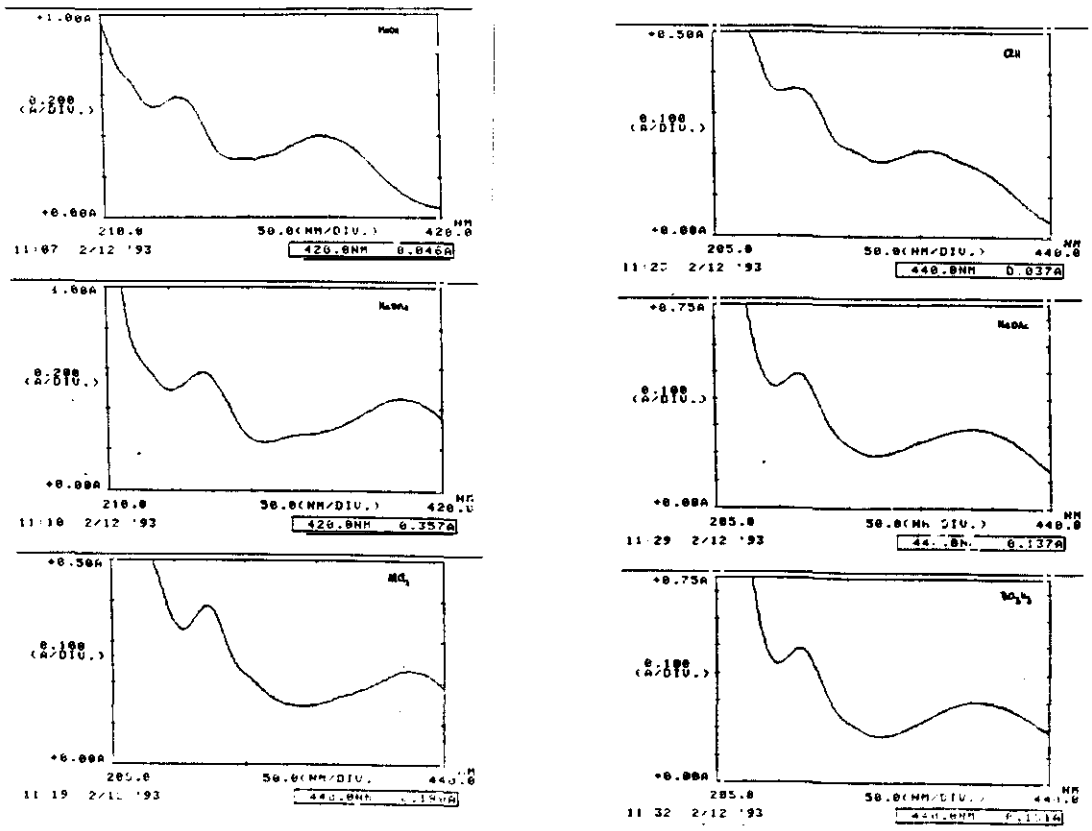


Fig. 5.55.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto VIII.

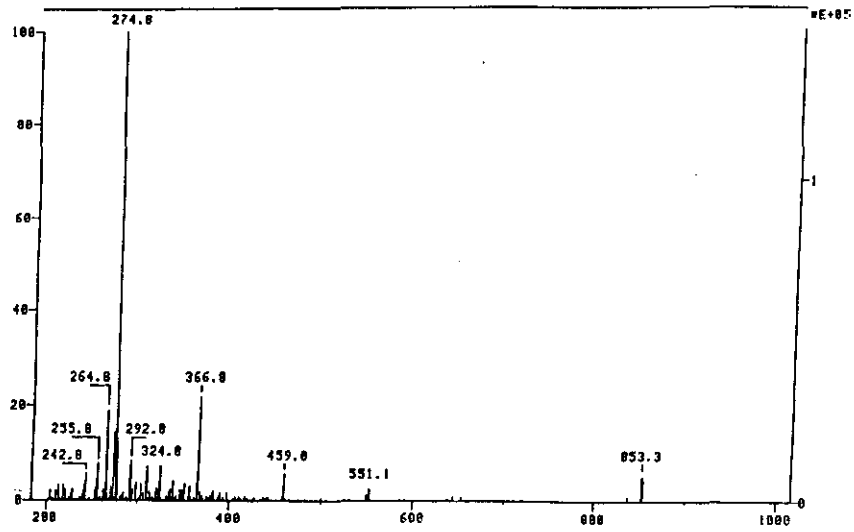


Fig. 5.56.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto VIII.

En la Fig. 5.57 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto VIII realizado bajo la técnica DEPT (Seeger, 1992; Seeger & col., 1981). En la Tabla 5.34 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto VIII. Las Fig. 5.58 y 5.59 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto VIII, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.58) y el intervalo 5.3-7.2 ppm (Fig. 5.59).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Seeger & col. (1991), Geiger & col. (1993) y Salm (1992).

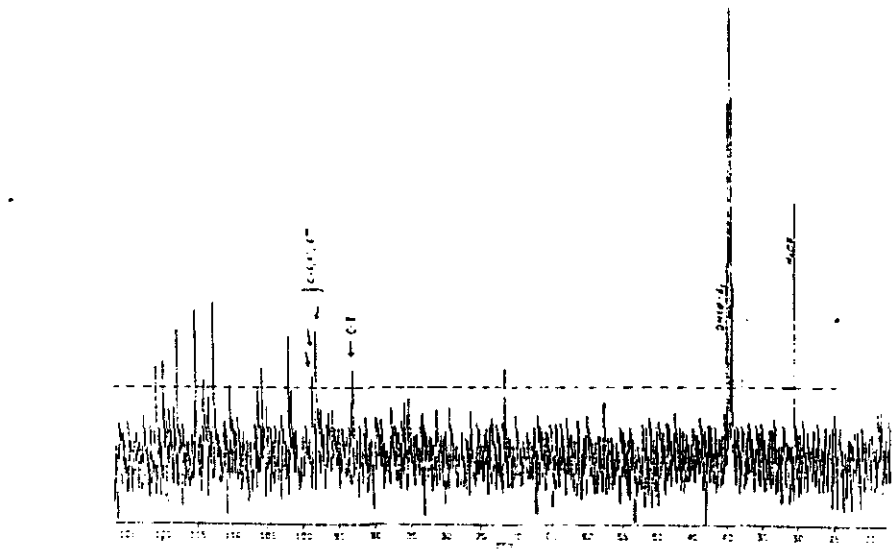
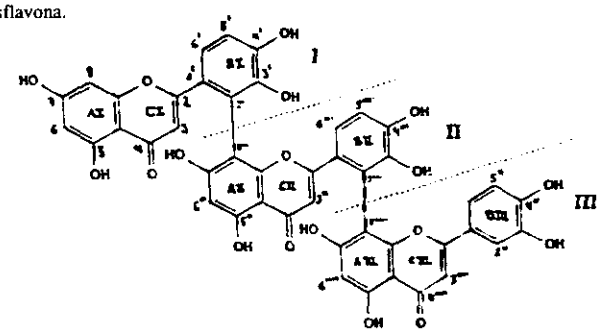


Fig. 5.57.: Espectro DEPT de ^{13}C-RMN del Compuesto VIII.

Tabla 5.34.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII.

Protones *	Compuesto VIII			Filonotisflavona[1]		Luteolina[2]
I / II / II	I i	II c	III d	I i	II d	
H 3 / 3'' / 3''''	6,05s	6,14s	6,18s	6,06s	6,62s	6,69s
H 6 / 6'' / 6''''	5,34 d(2)	5,67s	5,70s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)
H 8 / 8'' / 8''''	6,01 d(2)	—	—	6,07 d(2)	-	6,47 d(2)
H 2' / 2''' / 2'''''	—	—	6,64 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)
H 5' / 5''' / 5'''''	6,91 d(8)	6,81 d(8)	6,12 d(8)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,98 d(8)
H 6' / 6''' / 6'''''	7,10 d(8)	7,06 d(8)	6,43 dd(8;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)
OH 5 / 5'' / 5''''	12,88s	12,89s	13,02s	13,01s	12,88s	13,00s

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989) y Seeger (1992).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987) y Seeger (1992).
* I, II, III representan cada uno de los monómeros del triflavonoide (I i, monómero izquierdo; II c, monomero medio y III d, monómero derecho) o en su caso del biflavonoide filonotisflavona.



Estructura Molecular del Compuesto 8.

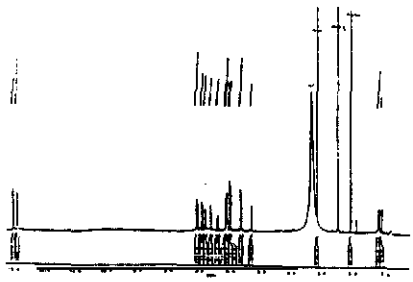


Fig. 5.58.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII (1.0-13.0 ppm).

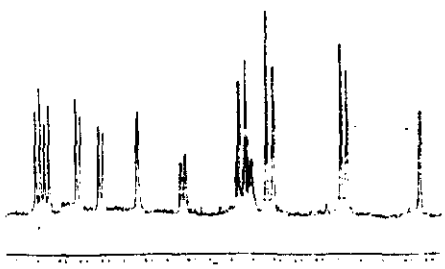


Fig. 5.59.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII (5.3-7.2 ppm).

Junto a los resultados de la Bartramia-Triluteolina, hemos creído conveniente presentar los correspondientes al Compuesto BP-X o BS-X, cuya naturaleza ya se comentó con anterioridad. Dicho compuesto es en realidad una mezcla de otros tres triflavonoides y fue inicialmente citado en *Bartramia pomiformis* (Seeger, 1992) aunque no se identificó totalmente la naturaleza química de los compuestos que componían la mezcla denominada "BP-X". Este compuesto, que coincide totalmente con BS-X tiene al menos un 50% de Bartramia-Triluteolina y el resto corresponde a otros dos triflavonoides, ya que el espectro de masas (Fig. 5.60) al igual que en los datos aportados por Seeger (1992), no ofrece señal alguna correspondiente a biflavonoides y sí un pico de triflavonoide coincidente para los tres compuestos que forman la mezcla BP-X o BS-X. El RMN de protón (Fig. 5.61) indica la existencia de tres uniones diferentes entre los monómeros flavonoídicos, lo que supone la existencia al menos de tres triflavonoides distintos. Dada su complejidad se hicieron diversas pruebas en TLC, con el fin de aislarlos. En el sistema de TLC en celulosa, se utilizaron concentraciones de ácido acético desde el 15% al 40% no consiguiendo en ningún caso separarlos, permaneciendo el Compuesto BP-X/BS-X como una única mancha en la TLC en todos los casos. El principal problema con que nos encontramos fue que en la mezcla, cuando intentábamos separar sus tres compuestos bajo unas condiciones de temperatura de 5° C., rápidamente los tres triflavonoides que la componían se volvían a unir como uno solo a temperatura ambiente. Por ello, decidimos que la mejor manera de conocer la verdadera naturaleza de los otros 2 triflavonoides componentes, era mediante ciertas y especiales técnicas de RMN, de las que no pudimos disponer durante la investigación realizada con motivo de esta Tesis Doctoral. Por ello preferimos postergar dichas investigaciones para futuros trabajos científicos, en los cuales sí pudieramos disponer de la metodología adecuada para ellos. El hecho de que la Bartramia-Triluteolina sea precisamente uno de los triflavonoides que componen el Compuesto BP-X/BS-X, nos hizo incluir los resultados derivados de su analítica junto a ésta.

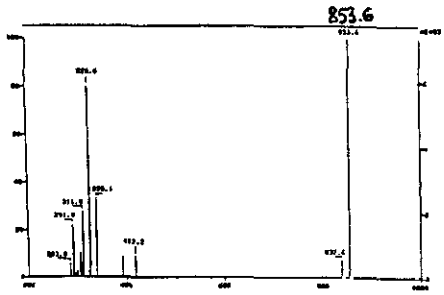


Fig. 5.60.: Espectro de Masas del Compuesto BP-X.

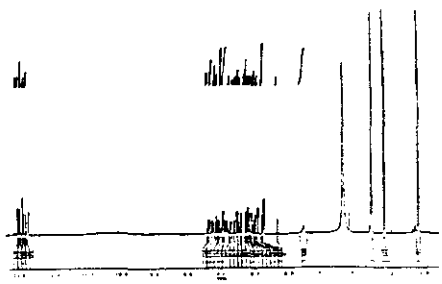


Fig. 5.61. Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto BP-X.

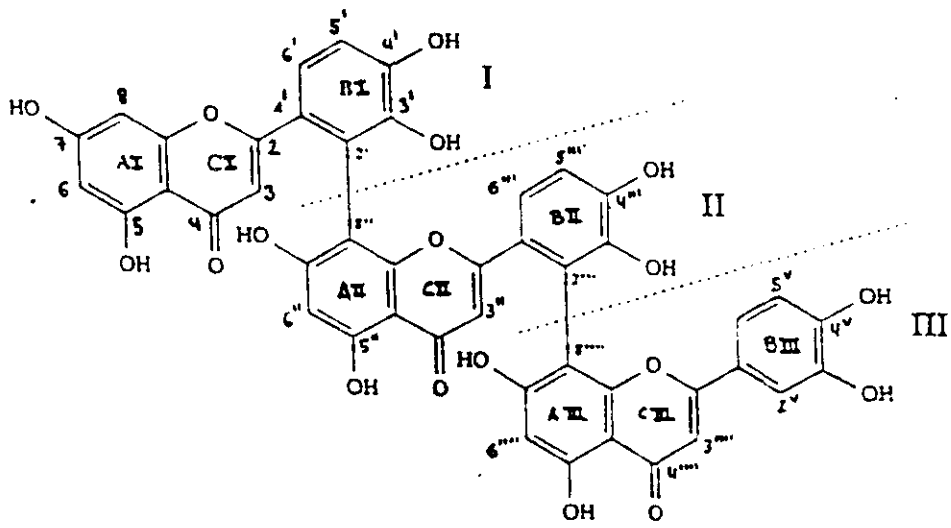
5.1.3.9. COMPUESTO IX (BS-5A)

(Epi-Bartramia-Triluteolina o 2',8'',2''',8''''-triluteolina)

El Compuesto IX resultó ser un diastereoisómero del Compuesto VIII, y de hecho, tanto en las TLC y CC respectivas aparecían como una sola mancha de desarrollo cromatográfico idéntico, que por regla general impedía su separación y purificación. Sólo mediante ciertas técnicas complejas de RMN (COSY) se pudo elucidar su estructura. Por todo lo anterior, se comprende fácilmente que tanto la movilidad cromatográfica (Rf) del Compuesto IX, su color bajo la luz ultravioleta tras el uso de reactivos específicos, así como sus espectros respectivos de ultravioleta y masas, sean idénticos a los del Compuesto VIII, y por ello no los reflejamos aquí, ya que son los mismos que figuran en las respectivas Tablas 5.32, 5.33 y Fig. 5.56.

En la Tabla 5.35 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto IX comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona). En la Fig. 5.62 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto IX realizado a 200 MHz, así como el espectro-DEPT (Fig. 5.63).

En la Tabla 5.36 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto IX, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía. Las Fig. 5.64 y 5.65 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto IX, a 400 y 200 MHz respectivamente, comprendidos entre el intervalo 5.6-7.2 ppm (Fig. 5.64) y el intervalo 6.7-7.2 ppm (Fig. 5.65). Así mismo quedan recogidos los espectros COSY (^{1}H-^{1}H) (Fig. 5.66) y (^{1}H-^{13}C) (Fig. 5.67) de correlación C-H realizados. Los átomos de carbono e hidrógenos del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía Seeger (1992) y Voigt (1993).



Estructura Molecular del Compuesto IX.

Tabla 5.35.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto IX.

Carbonos	Compuesto IX	Filonotisflavona[1]
2	166,7	166,5
2''	164,6	163,8
2''''	165,6	---
3	106,1 t.	106,4 t.
3''	106,1 t.	102,4 t.
3''''	102,4 t.	---
4	181,5	181,7
4''	181,4	181,1
4''''	181,9	---
5	161,1	161,1
5''	160,4	160,3
5''''	160,6	---
6	98,7 t.	98,6 t.
6''	98,3 t.	98,3 t.
6''''	99,1 t.	---
7	163,9	163,7
7''	161,3	161,4
7''''	161,3	---
8	93,5 t.	93,0 t.
8''	**103,5**	**103,5**
8''''	**103,7**	---
9	157,3	157,2
9''	154,6	154,3
9''''	155,2	---
10	102,9	102,9
10''	103,4	103,2
10''''	102,7	---
1'	123,8	124,0
1'''	121,9	121,7
1'''''	123,8	---
2'	**118,7**	**118,7**

Carbonos	Compuesto IX	Filonotisflavona[1]
2'''	118,7	113,5 t.
2'''''	113,7 t.	---
3'	144,2	145,7
3'''	145,6	145,7
3'''''	144,1	---
4'	148,4	148,3
4'''	149,6	149,4
4'''''	148,6	---
5'	114,5 t.	114,6 t.
5'''	115,7 t.	115,5 t.
5'''''	114,3 t.	---
6'	120,7 t.	120,5 t.
6'''	118,7 t.	118,9 t.
6'''''	120,7 t.	---

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
Los carbonos terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

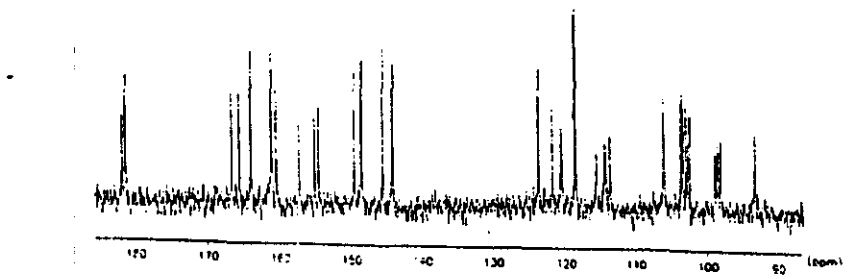


Fig. 5.62.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto IX (200 MHz).

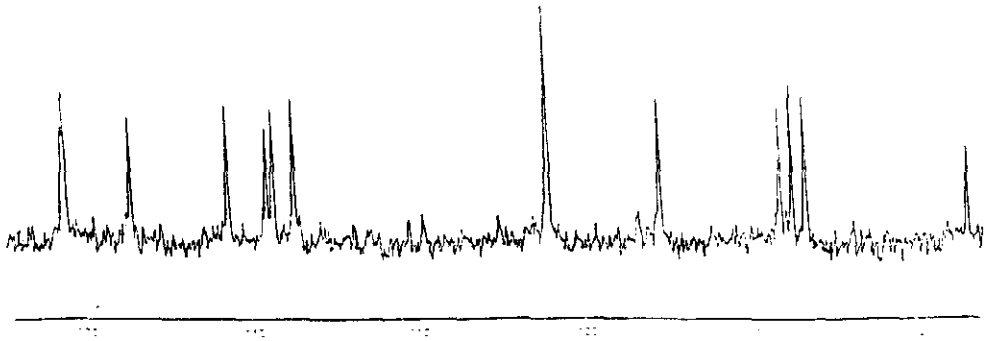


Fig. 5.63.: Espectro de ^{13}C-RMN (DEPT) del Compuesto IX.

Tabla 5.36.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto IX.

Protones *			Compuesto IX			Filonotisflavona[1]		Luteolina[2]
I	II	II	*I i*	*II c*	*III d*	*I i*	*II d*	
H 3 / 3'' / 3'''			5,91s	5,60s	6,61s	6,06s	6,62s	6,69s
H 6 / 6'' / 6'''			6,11 d(2)	6,14s	6,61s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)
H 8 / 8'' / 8'''			5,75 d(2)	—	—	6,07 d(2)	-	6,47 d(2)
H 2' / 2''' / 2'''''			—	—	7,03 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)
H 5' / 5''' / 5'''''			6,76 d(8)	6,73 d(8)	6,97 d(8)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,98 d(8)
H 6' / 6''' / 6'''''			7,17 d(8)	7,12 d(8)	6,98 dd(8;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)
OH 5 / 5'' / 5'''			12,88s	12,89s	13,02s	13,01s	12,88s	13,00s

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989) y Seeger (1992).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987) y Seeger (1992).
* I, II, III representan cada uno de los monómeros del triflavonoide (I i, monómero izquierdo; II c, monómero medio y III d, monómero derecho) o en su caso del biflavonoide filonotisflavona.

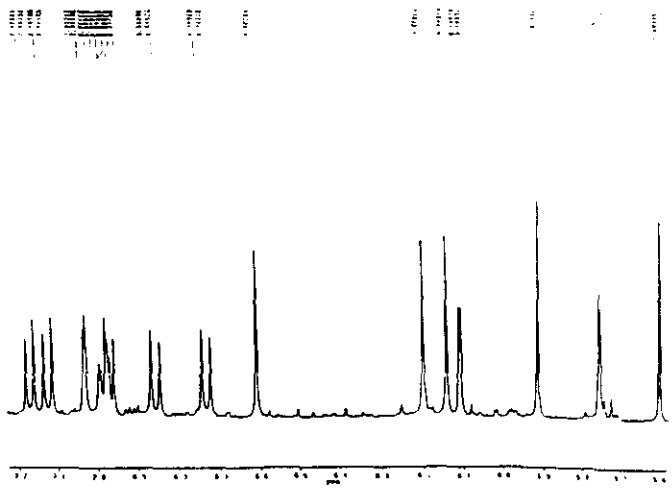


Fig. 5.64.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto IX a 400 MHz.

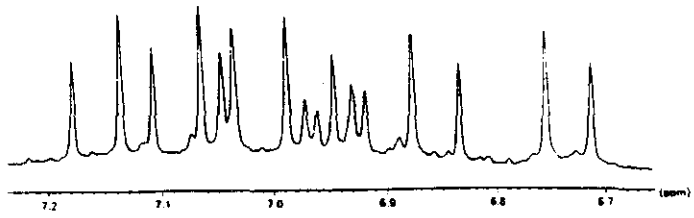


Fig. 5.65.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto IX a 200 MHz.

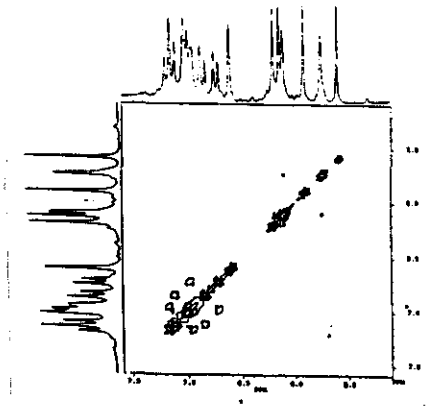


Fig. 5.66.: Espectro COSY (^{1}H-^{1}H RMN) del Compuesto IX.

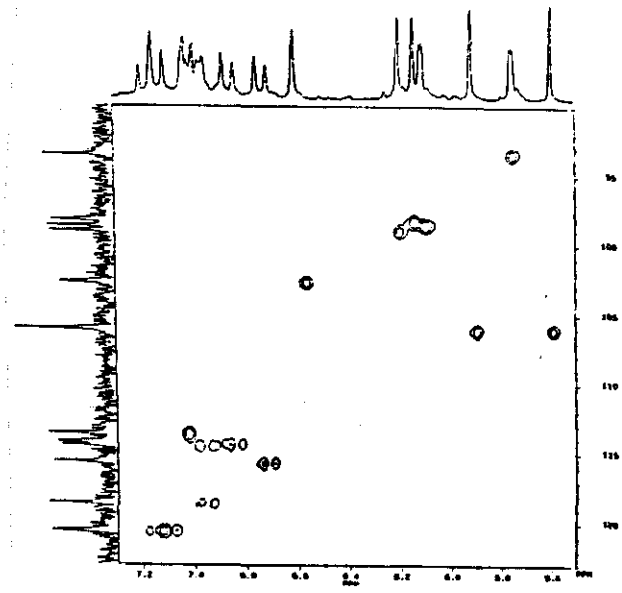


Fig. 5.67.: Espectro COSY (^{1}H-^{13}C RMN) del Compuesto IX.

5.1.3.10. COMPUESTO X (BS-3)

(Ciclo-Triluteolina)

En la Tabla 5.37 vienen reflejados los valores de Rf del Compuesto X en los distintos sistemas cromatográficos realizados, así como el color de absorción al UV y tras la aplicación de reveladores específicos. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.37.: Datos cromatográficos del Compuesto X.

		Compuesto X	Bartramia-Triluteolina[1]	Bartramiaflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	Am	Am	VO
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_x	Z_1	44	25	71
	Z_2	74	60	75
	Z_3	67	69	67
	P_1	25	32	46
	P_2	33	28	54

[1] Bartramia-Triluteolina según Seeger (1992).
[2] Bartramiaflavona según Salm (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.38 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto X, con y sin la ayuda de reactivos específicos. La Fig. 5.68 representa gráficamente estos espectros. Los resultados de la Espectroscopía de Masas realizada sobre el Compuesto X mediante un Analizador de Masas LAMMA de Laser Microprobe en ácido nicotinamídico, reflejaron la existencia de un pico al que se le otorgó un 100% de intensidad a **852 m/z**.

Tabla 5.38.: Datos de Espectroscopía de UV del Compuesto X (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto X	Luteolina[1]
MeOH	267 339sh	253 265sh 289 348
NaOMe	270 396sh	266 327sh 401
$AlCl_3$	269	272 300sh 324sh 422
$AlCl_3$ + HCl	268 349sh	260 268sh 294sh 354 380sh
NaOAc	267 376sh	267 322sh 384
NaOAc + H_3BO_3	267 382sh	260 371

[1] datos procedentes de Geiger & col. (1988)

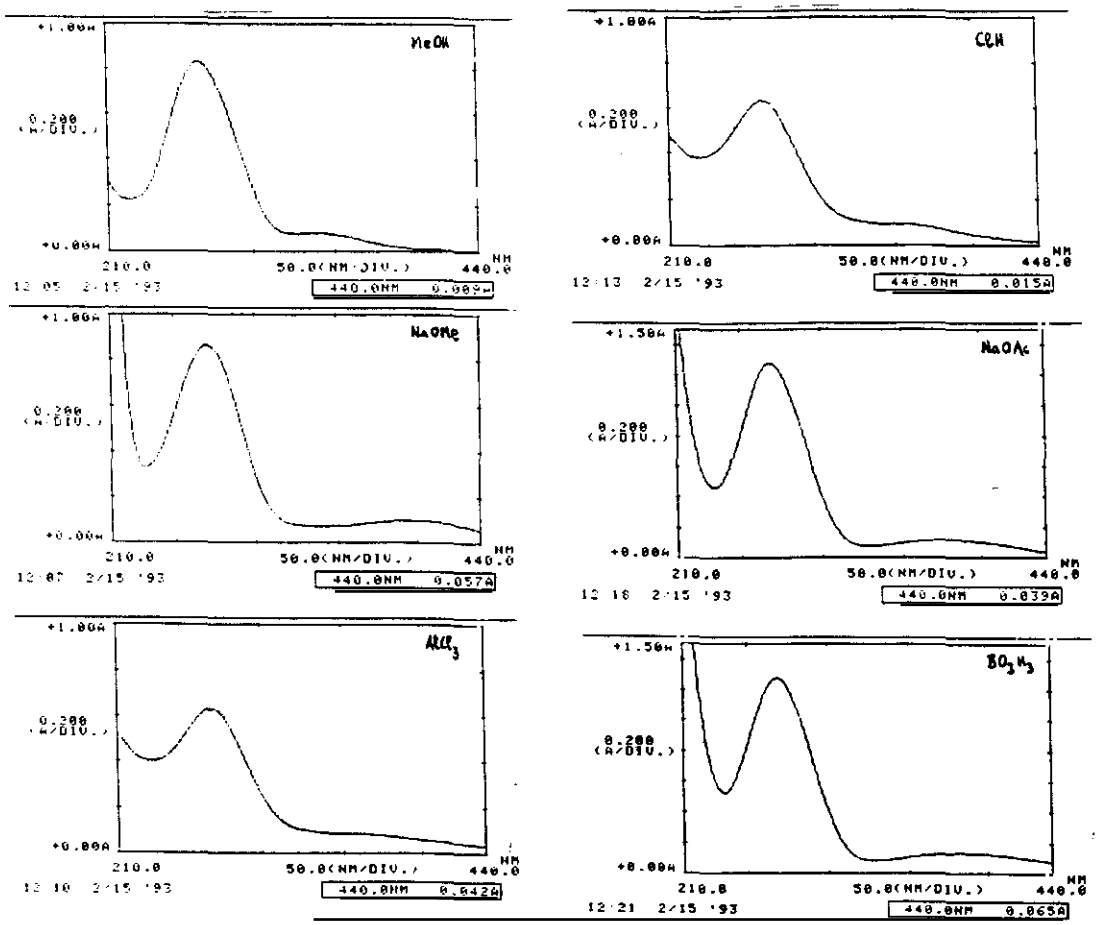


Fig. 5.68.: Espectro de Ultravioleta del Compuesto X.

La Tabla 5.39 ofrece los resultados del espectro de ^{13}C-RMN realizado sobre el Compuesto X. En la Fig. 5.69 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto X. En la Tabla 5.40 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto X. Las Fig. 5.70 y 5.71 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto X, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm a 400 MHz (Fig. 5.70) y el intervalo 5.8-6.8 ppm a 200 MHz (Fig. 5.71).

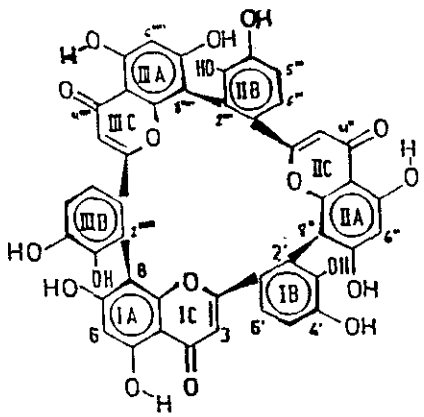
Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Seeger & col. (1991), Geiger & col. (1993) y Salm (1992).

Así mismo se realizó un espectro COSY (^{1}H-^{13}C) de correlación C-H (Fig. 5.72) (Geiger & col., 1993a) del Compuesto X.

Tabla 5.39.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto X.

Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]	Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]
C-2	164,8	167,1	C-9''''	154,6	—
C-2''	164,8	167,1	C-10	102,8	102,7
C-2''''	164,8	—	C-10''	102,8	102,7
C-3	106,7	108,9	C-10''''	102,8	—
C-3''	106,7	108,9	C-1'	124,9	125,5
C-3''''	106,7	—	C-1'''	124,9	125,5
C-4	181,1	181,8	C-1'''''	124,9	—
C-4''	181,1	181,8	C-2'	**118,9**	**119,1**
C-4''''	181,1	—	C-2'''	**118,9**	**119,1**
C-5	160,4	160,4	C-2'''''	**118,9**	—
C-5''	160,4	160,4	C-3'	144,3	144,4
C-5''''	160,4	—	C-3'''	144,3	144,4
C-6	98,0	98,6	C-3'''''	144,3	—
C-6''	98,0	98,6	C-4'	147,6	147,4
C-6''''	98,0	—	C-4'''	147,6	147,4
C-7	162,4	163,0	C-4'''''	147,6	—
C-7''	162,4	163,0	C-5'	114,6	113,9
C-7''''	162,4	—	C-5'''	114,6	113,9
C-8	**103,3**	**103,1**	C-5'''''	114,6	—
C-8''	**103,3**	**103,1**	C-6'	118,6	118,7
C-8''''	**103,3**	—	C-6'''	118,6	118,7
C-9	154,6	154,6	C-6'''''	118,6	—
C-9	154,6	154,6			

datos de la Anhidrobarbamiaflavona según Seeger (1992)



Estructura Molecular del Compuesto X.

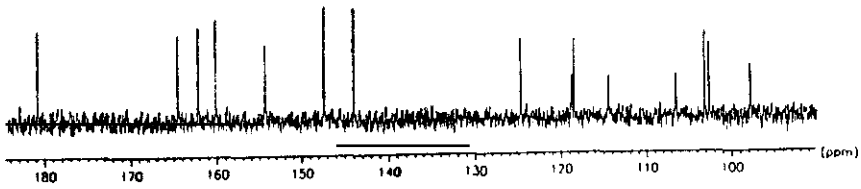


Fig. 5.69.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto X.

Tabla 5.40.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto X.

Protones	Compuesto X	Anhidrohartramiaflavona[1]	Filonotisflavona[2]
H-3	5,93s	5,74s	6,06s
H-3''	5,93s	5,74s	6,62s
H-3'''	5,93s	---	---
H-6	6,32s	6,26s	6,07d (2)
H-6''	6,32s	6,26s	6,27s
H-6''''	6,32s	---	---
H-8	---	---	5,75d (2)
H-2'''	---	---	7,02d (2)
H-5'	6,70d (8)	6,80d (8)	7,01d (8)
H-5'''	6,70d (8)	6,80d (8)	6,74d (9)
H-5'''''	6,70d (8)	---	---
H-6'	6,34d (8)	6,73d (8)	7,24d (8)
H-6'''	6,34d (8)	6,73d (8)	7,00dd (2;9)
H-6'''''	6,34d (8)	---	---
OH-5	12,66s	12,64s	---
OH-5''	12,66s	12,64s	---
OH-5''''	12,66s	---	---

[1] datos procedentes de Seeger (1992).
[2] datos procedentes de Geiger & Bokel (1989).

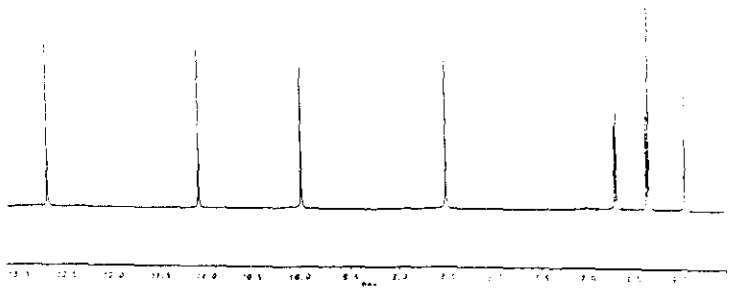


Fig. 5.70.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto X a 400 MHz.

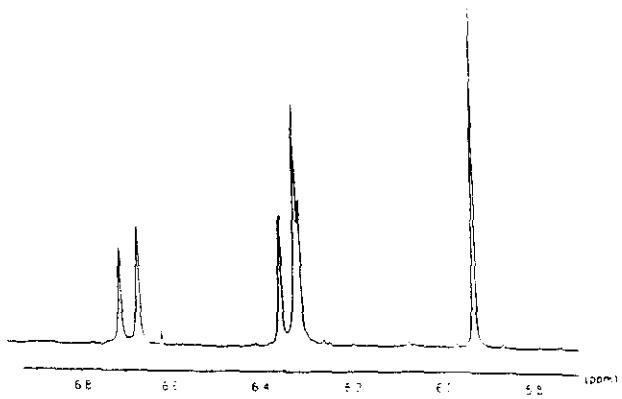


Fig. 5.71.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto X a 200 MHz.

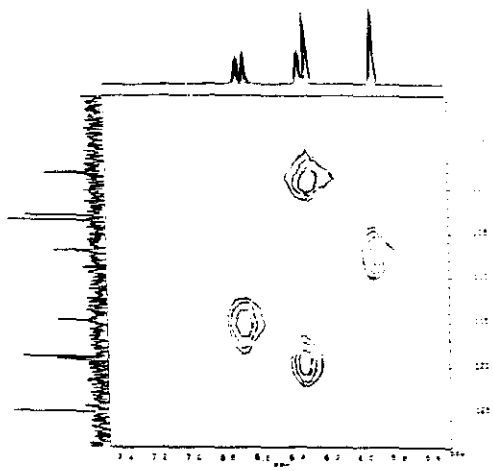


Fig. 5.72.: Espectro COSY (^{1}H-^{13}C RMN) del Compuesto X.

Finalmente, hemos querido presentar junto a los resultados de la Ciclo-Triluteolina los del Compuesto **BS-1**, que como ya se refirió con anterioridad está íntimamente relacionado con la Ciclo-Triluteolina, de la misma manera que lo están la Bartramiaflavona y la Anhidrobartramiaflavona. El Compuesto BS-1 se intentó aislar mediante CC en poliamida pero apenas se obtuvieron trazas poco definidas. De acuerdo a Geiger (com.per.), **BS-1** podría tratarse del compuesto resultante de la deshidratación de la Ciclo-Triluteolina y cambiar hacia ésta (BS-3) en el interior de la columna cromatográfica. Mediante deshidratación en medio ácido de BS-3 podría obtenerse el otro compuesto que se correspondería con BS-1, aunque el problema que se planteó fue la imposibilidad de establecer la correspondiente comparación entre BS-1 y el compuesto obtenido por deshidratación de BS-3, por no poseer Compuesto BS-1 con el que comparar ya que, rápidamente, incluso a 5° C., se transformaba en el interior de la columna.

Unicamente hemos podido realizar los espectros de Ultravioleta del Compuesto BS-1, que se presentan en la Fig. 5.73, ya que no pudimos disponer de cantidad suficiente para acometer otras técnicas analíticas.

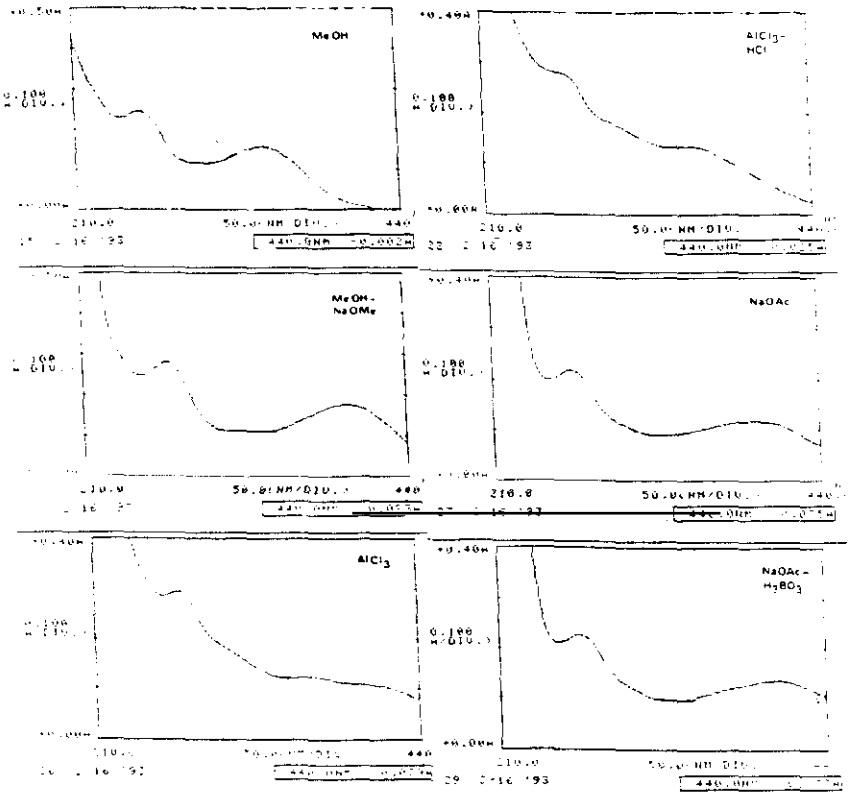


Fig. 5.73.: Espectros de ultravioleta del Compuesto BS-1.

5.1.3.11. COMPUESTO XI (BI-6)

(5'-OH-Amentoflavona o luteolina-5',8''-apigenina)

En la Tabla 5.41 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto XI, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

Tabla 5.41.: Datos cromatográficos del Compuesto XI.

		Compuesto XI	5'-OH-amentoflavona[1]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO
	+ NH_3	VO	VO
	+ NA	Am	Am
	+ Benedict	VO	VO
Rf_s	Z_1	3	6
	Z_2	59	58
	Z_3	89	91
	P_1	71	40
	P_2	37	-

[1] 5'-OH-amentoflavona según Geiger & col. (1988) en *Plagiomnium elatum*.
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

En la Tabla 5.42 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto XI, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

Tabla 5.42.: Datos de Espectroscopía de UV del Compuesto XI (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto XI	Luteolina[1]
MeOH	265 291sh 343	253 265sh 289 348
NaOMe	272 325sh 388	266 327sh 401
$AlCl_3$	272 306sh 352 410	272 300sh 342sh 422
$AlCl_3$ + HCl	255 269sh 304 345	260 268sh 294sh 354 380sh
NaOAc	269 313sh 371	267 322sh 384
NaOAc + H_3BO_3	263 360	260 371

[1] datos procedentes de Geiger & col. (1988).

La Fig. 5.74 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto XI frente a los reactivos específicos en cada caso.

La Fig. 5.75 presenta el Espectro de Masas del Compuesto XI.

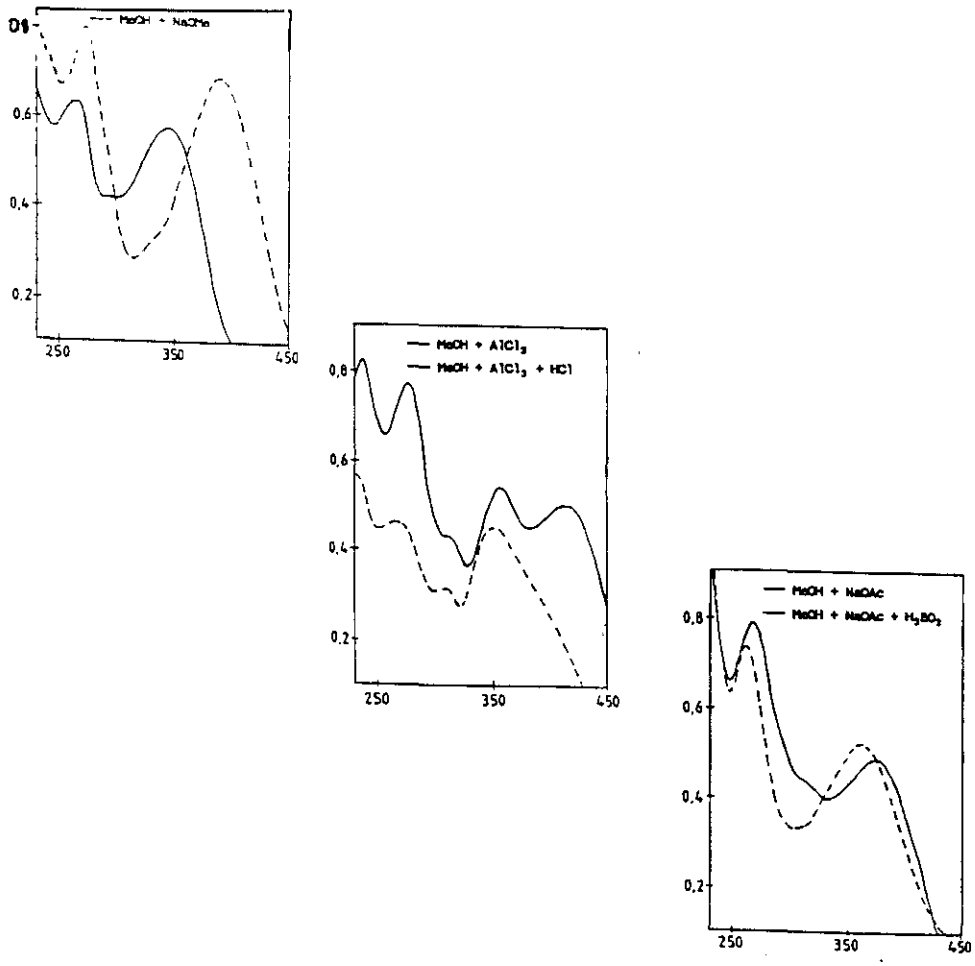


Fig. 5.74.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto XI.

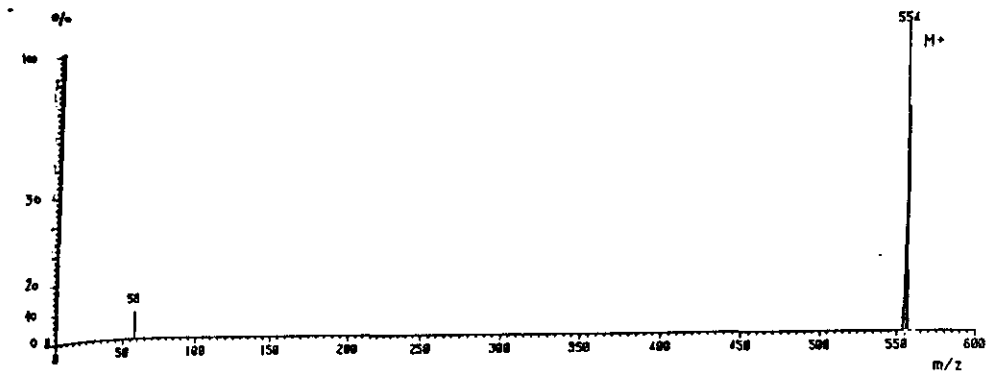


Fig. 5.75.: Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto XI.

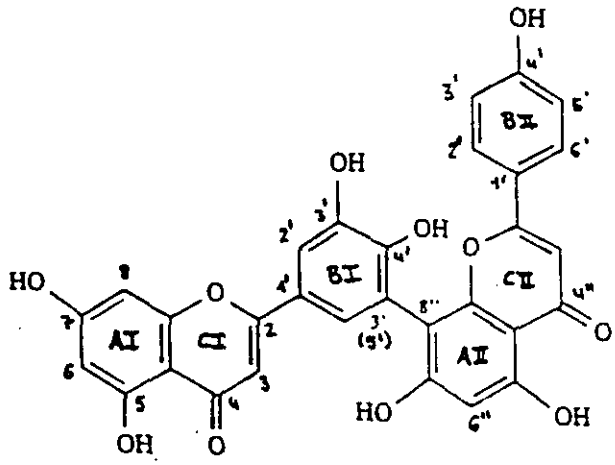
En la Tabla 5.43 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto XI comparados con la bibliografía aneja correspondiente (amentoflavona y 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona).

En la Fig. 5.76 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto XI.

En la Tabla 5.44 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto XI, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía.

Las Fig. 5.77-A y 5.77-B representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto XI, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm a 400 MHz (Fig. 5.77-A) y el intervalo 6.0-7.7 ppm a 200 MHz (Fig. 5.77-B).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992), Geiger & col. (1988 y 1993a).



Estructura Molecular del Compuesto XI

Tabla 5.43.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto XI.

Carbonos	Compuesto XI	Amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-amento.[2]
2	163,8	164,1	163,9
2''	164,2	164,3	164,0
3	103,0	103,2	102,9
3''	102,6	102,8	102,5
4	182,2	181,9	181,9
4''	181,7	182,2	181,5
5	161,1	161,6	161,4
5''	160,7	160,8	160,4
6	99,0	98,8	98,7
6''	98,9	99,1	98,6
7	164,2	163,9	164,0
7''	162,6	161,9	161,7
8	93,9	94,2	93,8
8''	**104,4**	**104,1**	**104,0**
9	157,5	157,6	157,3
9''	154,7	154,7	154,5
10	103,8	104,0	103,6
10''	103,8	104,0	103,6
1'	120,5	120,3	120,6
1'''	121,6	121,4	121,8
2'	112,0	131,6	112,1
2'''	128,3	128,3	118,6
3'	146,2	116,4	145,5
3'''	115,8	116,0	145,8
4'	149,0	159,6	148,2
4'''	161,7	161,1	149,4
5'	**120,4**	**121,7**	**120,0**
5'''	115,8	116,0	115,5
6'	122,5	127,9	122,2
6'''	128,3	128,3	118,6

[1] Amentoflavona según Markham & col. (1987).

[2] 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).

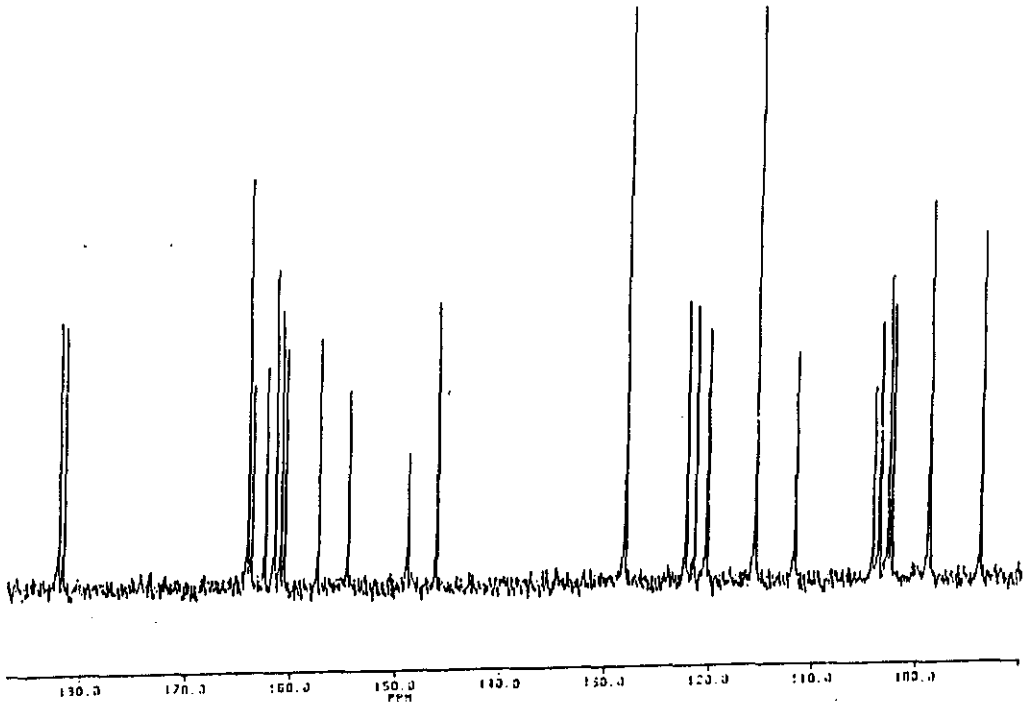


Fig. 5.76.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto XI.

Tabla 5.44.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto XI.

Protones	Compuesto XI	Amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-ament.[2]
3	6,77s	6,74 s	6,68 s
6	6,25 d (2)	6,22 d (2)	6,21 d (2)
8	6,49 d (2)	6,50 d (2)	6,45 d (2)
2'	7,55 d (2)	8,07 d (2)	7,51 d (9)
3'	—	7,19 d (9)	
5'	—	—	—
6'	7,62 d (2)	7,99 dd (2;9)	7,52 d (2)
3''	6,84 s	6,81 s	6,72 s
6''	6,44 s	6,45 s	6,41 s
2'''	7,66 d (9)	7,57 d (9)	7,09 d (2)
3'''	6,77 d (9)	6,77 d (9)	-
5'''	6,77 d (9)	6,77 d (9)	6,70 d (8)
6'''	7,66 d (9)	7,57 d (9)	7,07 dd (2;8)
OH-5	13,09 s	-	13,01 s
OH-5''	12,97 s	-	13,14 s

[1]Amentoflavona según Markham & col. (1987).
[2]5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).

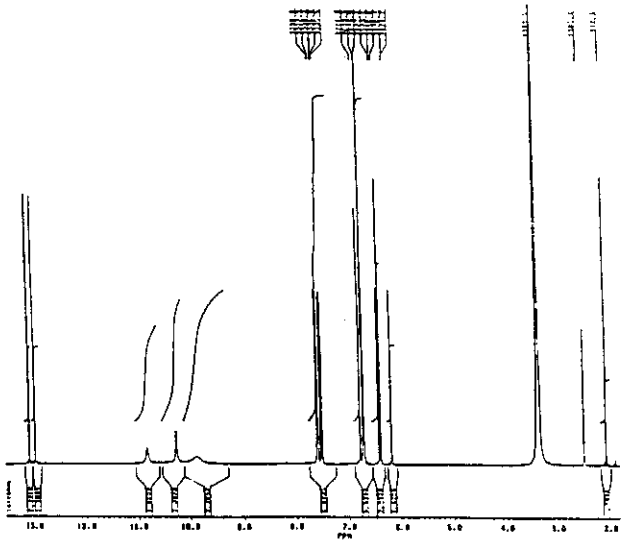


Fig. 5.77 - A: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto XI a 400 MHz.

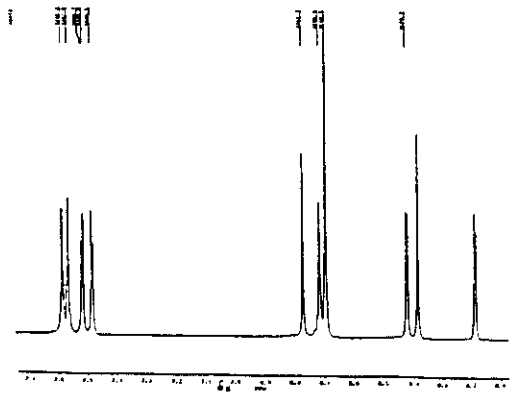


Fig. 5.77 - B: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto XI a 200 MHz.

5.1.3.12. COMPUESTO XII (BP-8)

(Acido Bartrámico o luteolina-8,2''-ácido protocatéquico)

En la Tabla 5.45 se exponen los resultados procedentes de los distintos sistemas cromatográficos realizados, en los que se puso de manifiesto la identificación del Compuesto XII, que son así mismo comparados con la bibliografía respectiva. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

En la Tabla 5.46 se presentan los resultados de la Espectroscopía de Ultravioleta realizada sobre el Compuesto XII, con y sin la ayuda de reactivos específicos.

La Fig. 5.79 muestra los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto XII frente a los reactivos específicos en cada caso.

La Fig. 5.78 presenta el Espectro de Masas del Compuesto XII.

Tabla 5.45.: Datos cromatográficos del Compuesto XII.

		Compuesto XII	Filonotisflavona[1]	Filonotisflavona[2]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO	VO
	+ NH_3	VO	-	-
	+ NA	Am	Am	Am
	+ Benedict	VO	-	-
Rf_s	Z_1	20	46	30
	Z_2	52	74	75
	Z_3	63	77	-
	P_1	32	33	54
	P_2	36	42	45

[1] Filonotisflavona según Salm (1992).
[2] Filonotisflavona según Seeger (1992).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

Tabla 5.46.: Datos de espectroscopía de UV del Compuesto XII (sh= hombro).

Reactivos	Compuesto XII	Luteolina[1]
MeOH	255 274sh 294 346	253 265sh 289 348
NaOMe	271 404	266 327sh 401
$AlCl_3$	276 308sh 335sh 429	272 300sh 324sh 422
$AlCl_3$ + HCl	261sh 279sh 297sh 357 393sh	260 268sh 294sh 354 380sh
NaOAc	268 347	267 322sh 384
NaOAc + H_3BO_3	232 262 301sh 372	260 371

[1]datos procedentes de Geiger & col. (1988).

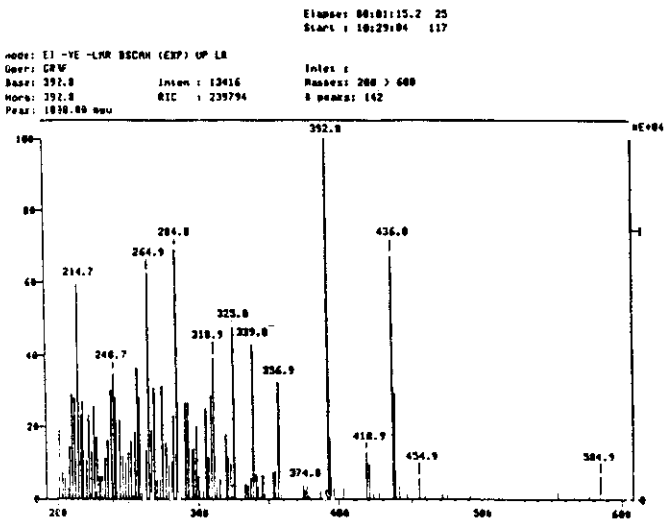


Fig. 5.78. Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto XII.

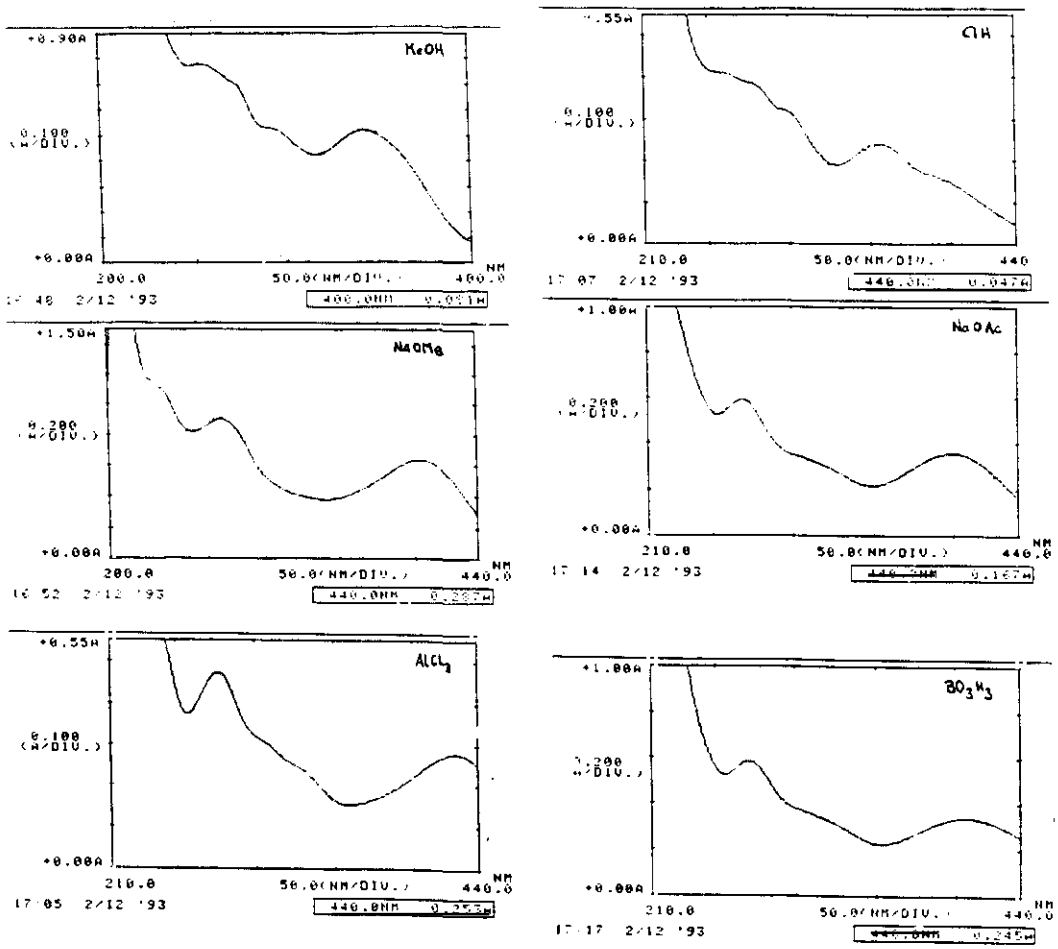
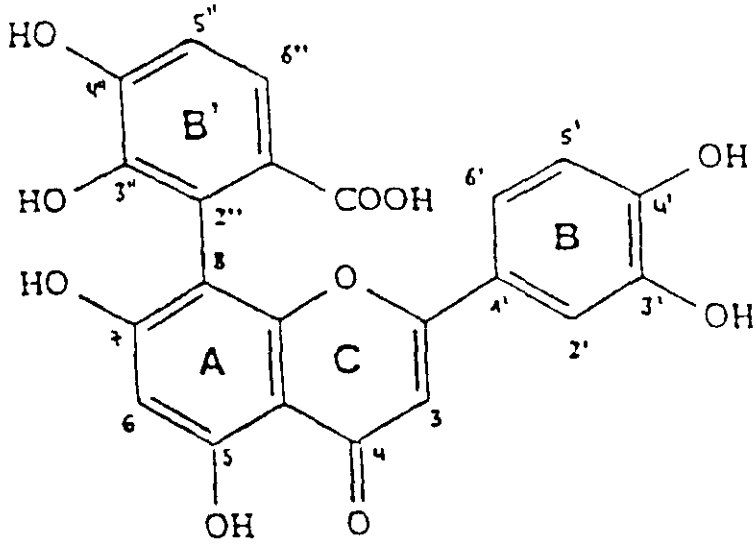


Fig. 5.79.: Espectros de Ultravioleta del Compuesto XII.

En la Tabla 5.47 se muestran los resultados de la ^{13}C-RMN del Compuesto XII comparados con la bibliografía aneja correspondiente (filonotisflavona y luteolina). En la Fig. 5.80 queda representado el espectro de ^{13}C correspondiente al Compuesto XII. En la Tabla 5.48 quedan reflejados los resultados de la ^{1}H-RMN del Compuesto XII, estableciendo al igual que para la ^{13}C-RMN, la correspondiente comparación entre los datos proporcionados por el compuesto problema y los aportados por la bibliografía. Las Fig. 5.81 y 5.82 representan los espectros de ^{1}H-RMN correspondientes al Compuesto XII, comprendidos respectivamente entre el intervalo 1.0-13.0 ppm (Fig. 5.81) y el intervalo 6.4-7.5 ppm (Fig. 5.82).

Los átomos de carbono e hidrógeno del compuesto problema se asignaron mediante comparación con la bibliografía que se aneja en cada tabla, así como de acuerdo a Seeger (1992) y Seeger & col. (1992b).



Estructura Molecular del Compuesto XII

Tabla 5.47.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto XII.

Carbono	Compuesto XII	Filonot.[1] (l)	Filonot.[1] (d)	Luteol.[2]	Ac. Protocatéquico
2/2''	163,6	166,5	163,8	163,9	-
3/3''	102,1	106,4 t.	102,4 t.	102,8	-
4/4''	182,0	181,7	181,1	181,6	-
5/5''	159,7	161,1	160,3	161,4	-
6/6''	98,4	98,6 t.	98,3 t.	98,8	-
7/7''	161,7	163,7	161,4	164,1	-
8/8''	**104,8**	93,0 t.	**103,5**	93,8	-
9/9''	154,3	157,2	154,3	157,2	-
10/10''	103,4	102,9	103,2	103,7	-
1'/1'''	121,9	124,0	121,7	121,5	-
2'/2'''	113,5	118,7	113,5 t.	113,3	-
3'/3'''	145,4	144,3	145,7	145,7	-
4'/4'''	149,3	148,3	149,4	149,6	-
5'/5'''	115,5	114,6 t.	115,5 t.	116,0	-
6'/6'''	118,4	120,5 t.	118,9 t.	118,9	-
1/1'' *	123,3	-	-	-	121,7
2/2'' *	**120,6**	-	-	-	**115,1**
3/3'' *	143,8	-	-	-	144,8
4/4'' *	148,7	-	-	-	149,9
5/5'' *	113,6	-	-	-	116,5
6/6'' *	122,1	-	-	-	121,8
COOH	**167,7**	-	-	-	167,2

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989). (d): monómero derecho, (l): monómero izquierdo.
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
* Resonancias correspondientes a los carbonos del ácido protocatéquico.
t. Los carbonos terciarios fueron determinados por el método DEPT.

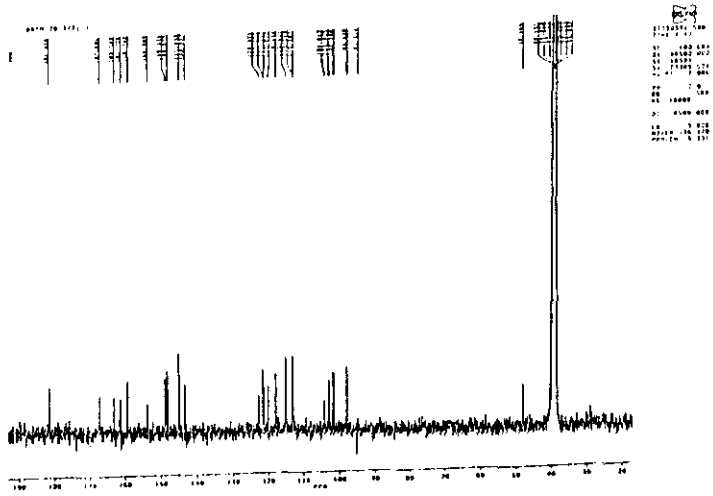


Fig. 5.80.: Espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto XII.

Tabla 5.48.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto XII.

Protón	Compuesto XII	Filonat.[1] (i)	Filonat.[1] (d)	Luteol.[2]	Ac. Protocatéqu.
3/3''	6,56s	6,06s	6,62s	6,69s	-
6/6''	6,25s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)	-
8/8''	—	6,07 d(2)	—	6,47 d(2)	-
2'/2'''	6,98 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)	-
5'/5'''	6,69 d(8,5)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,92 d(8)	-
6'/6'''	6,93 dd(9;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)	-
OH-5/5''	12,98s	12,73s	13,01s	13,00s	-
2	-	-	-	-	7,32 d(2)
5/5''	6,88 d(8,5)	-	-	-	6,77 d(8)
6/6''	7,39 d(8,5)	-	-	-	7,27 dd(8;2)

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989), (d): monómero derecho, (i): monómero izquierdo.
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).
* Resonancias correspondientes a los protones del ácido protocatéquico.

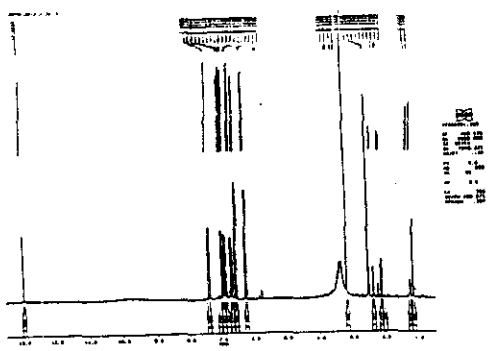


Fig. 5.81.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto XII (1.0-13.0 ppm).

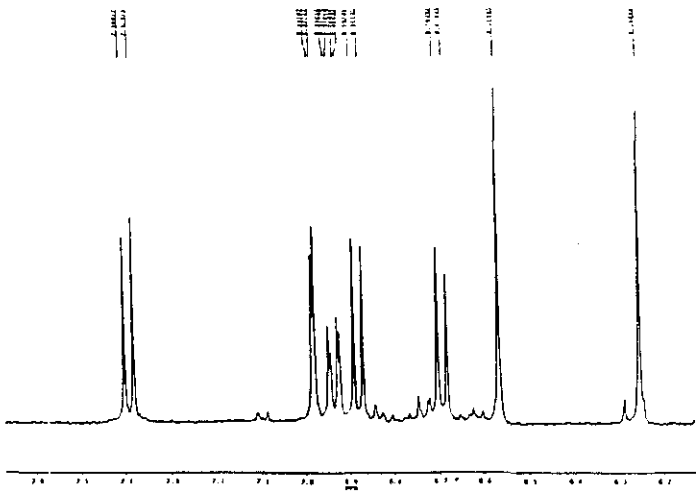


Fig. 5.82.: Espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto XII (6.4-7.5 ppm).

Dado que el Compuesto XII, que fue identificado como el Acido Bartrámico, poseía una estructura molecular típica de un flavonoide monomérico, pero en posición C-8 portaba un grupo ácido, concretamente el ácido protocatéquico, decidimos incluir junto a los resultados del Compuesto XII los relativos a dicho ácido, que han sido debidamente comparados en las Tablas 5.47 y 5.48. La Fig. 5.83 muestra el espectro de ultravioleta del ácido protocatéquico, mientras que en la Fig. 5.84 se ofrece su espectro de masas.

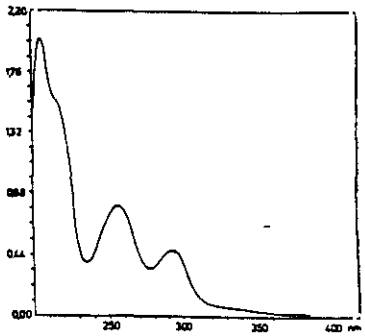


Fig. 5.83.: Espectro de Ultravioleta del Acido Protocatéquico en MeOH.

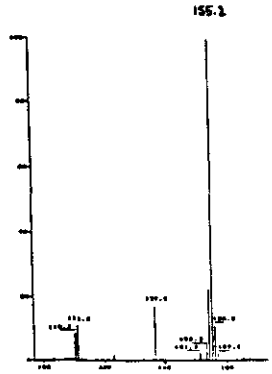


Fig. 5.84.: Espectro de Masas del Acido Protocatéquico.

En la Fig. 5.85 se muestra el espectro de ^{13}C-RMN del Acido protocatéquico mientras que la Fig. 5.86 ofrece el espectro de ^{1}H-RMN del mismo compuesto.

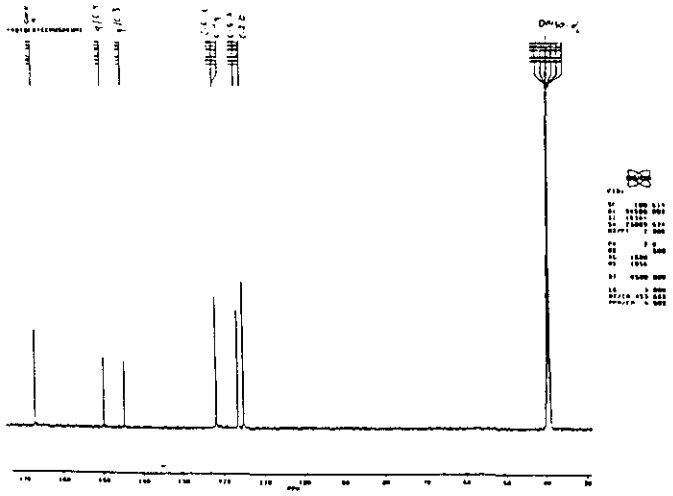


Fig. 5.85.: Espectro de ^{13}C-RMN del Acido Protocatéquico.

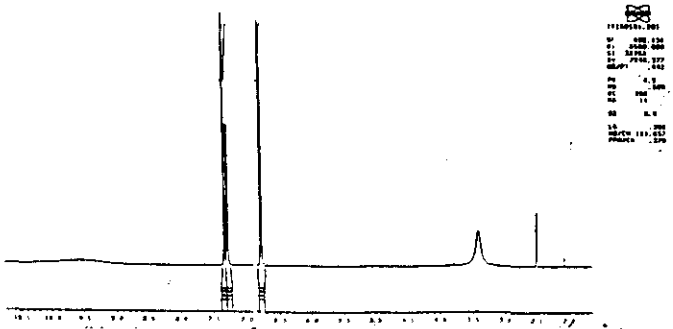


Fig. 5.86.: Espectro de ^{1}H-RMN del Acido Protocatéquico.

5.1.3.13. COMPUESTO XIII (DS-7)

(Diosmetina-7-O-triglicósido o 4'-metiléter-7-O-triglicósido-apigenina)

El Compuesto XIII se identificó en *Dicranum scoparium* (DS-7) pero únicamente en la TLC, no pudiendo ser aislado y purificado mediante CC. No obstante, y dado que se identicó fácilmente por cromatografía comparativa con patrón, hemos creído conveniente, al igual que para los Compuestos XIV y XV, presentar los resultados disponibles, a pesar de tratarse de flavonoides glicosilados, y no de biflavonoides o triflavonoides que son el objeto "central" de esta Memoria Doctoral.

La Tabla 5.49 recoge los resultados de los diversos sistemas de TLC realizados, en los que se puso de manifiesto la presencia del Compuesto XIII. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108).

La Tabla 5.50 contiene los resultados de la espectroscopía de ultravioleta realizada sobre el Compuesto XIII.

Tabla 5.49.: Datos cromatográficos del Compuesto XIII.

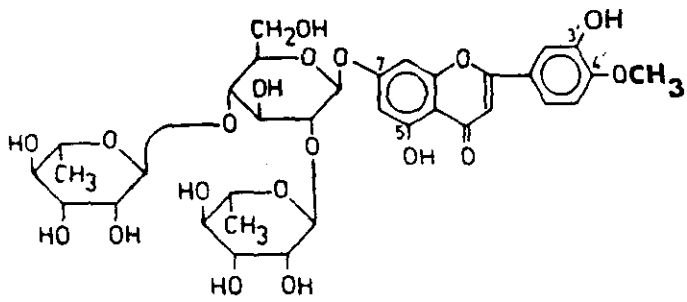
		Compuesto XIII	Diosmetina-7-O-triglicósido[1]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO
	+ NH_3	VeA	VeA
	+ NA	Am	Am
	+ *Benedict*	VO	-
Rf_x	Z_1	32	29
	Z_2	-	-
	Z_3	26	25
	P_1	-	-
	P_2	-	-

[1] Diosmetina-7-O-triglicósido según Österdahl (1978b).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

Tabla 5.50.: Datos de espectroscopía de ultravioleta del Compuesto XIII.

Reactivos	Compuesto XIII	Diosmetina-7-O-triglicósido[1]
MeOH	256 270 342	252 267 343
NaOMe	269 330 391	266 325 383
$AlCl_3$	266sh 274 296sh 370sh 386	265sh 272 294sh 365sh 384
$AlCl_3$ + ClH	268sh 275 296sh 364 382sh	264sh 274 294sh 357 381sh
NaOAc	258sh 268 340	258sh 266 339
NaOAc + H_3BO_3	255sh 268 347	254sh 266 345

[1]Diosmetina-7-O-triglicósido según Österdahl (1978b).



Estructura Molecular del Compuesto XIII

5.1.3.14. COMPUESTO XIV (DS-5)

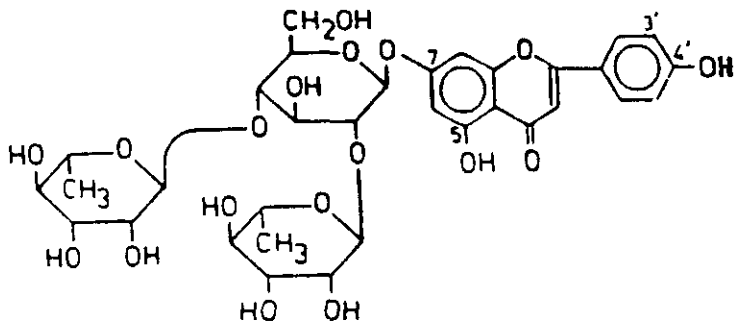
(Apigenina-7-O-triglicósido o 5,3'-diOH-7-triglicósido-flavona)

La Tabla 5.51 recoge los resultados de los diversos sistemas de TLC realizados, en los que se puso de manifiesto la presencia del Compuesto XIV. Las abreviaturas son las que figuran en la Tabla 5.1. (pp. 108). La Tabla 5.52 contiene los resultados de la espectroscopía de ultravioleta realizada sobre el Compuesto XIV. La Fig. 5.87 ofrece los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto XIV frente a reactivos específicos.

Tabla 5.51.: Datos cromatográficos del Compuesto XIV.

		Compuesto XIV	Apigenina-7-O-triglicósido[1]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO
	+ NH_3	VeA	VeA
	+ NA	Am	Am
	+ Benedict	VO	-
Rf_x	Z_1	39	40
	Z_2	-	-
	Z_3	46	45
	P_1	-	-
	P_2	-	-

[1] Apigenina-7-O-triglicósido según Nilsson & col. (1973).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)



Estructura Molecular del Compuesto XIV

Tabla 5.52.: Datos de espectroscopía de ultravioleta del Compuesto XIV.

Reactivos	Compuesto XIV	Apigenina-7-O-triglicósido[1]
MeOH	268 334	270 335
NaOMe	237sh 269 291sh 345sh 385	254 269 307sh 390
$AlCl_3$	274 295sh 342 371sh	277 301 351 383
$AlCl_3$ + HCl	275 295sh 340 372sh	278 301 345 383
NaOAc	266 337	260 270 295sh 390
NaOAc + H_3BO_3	268 334	270 341

[1]Apigenina7-O-triglicósido según Nilsson & col. (1973) .

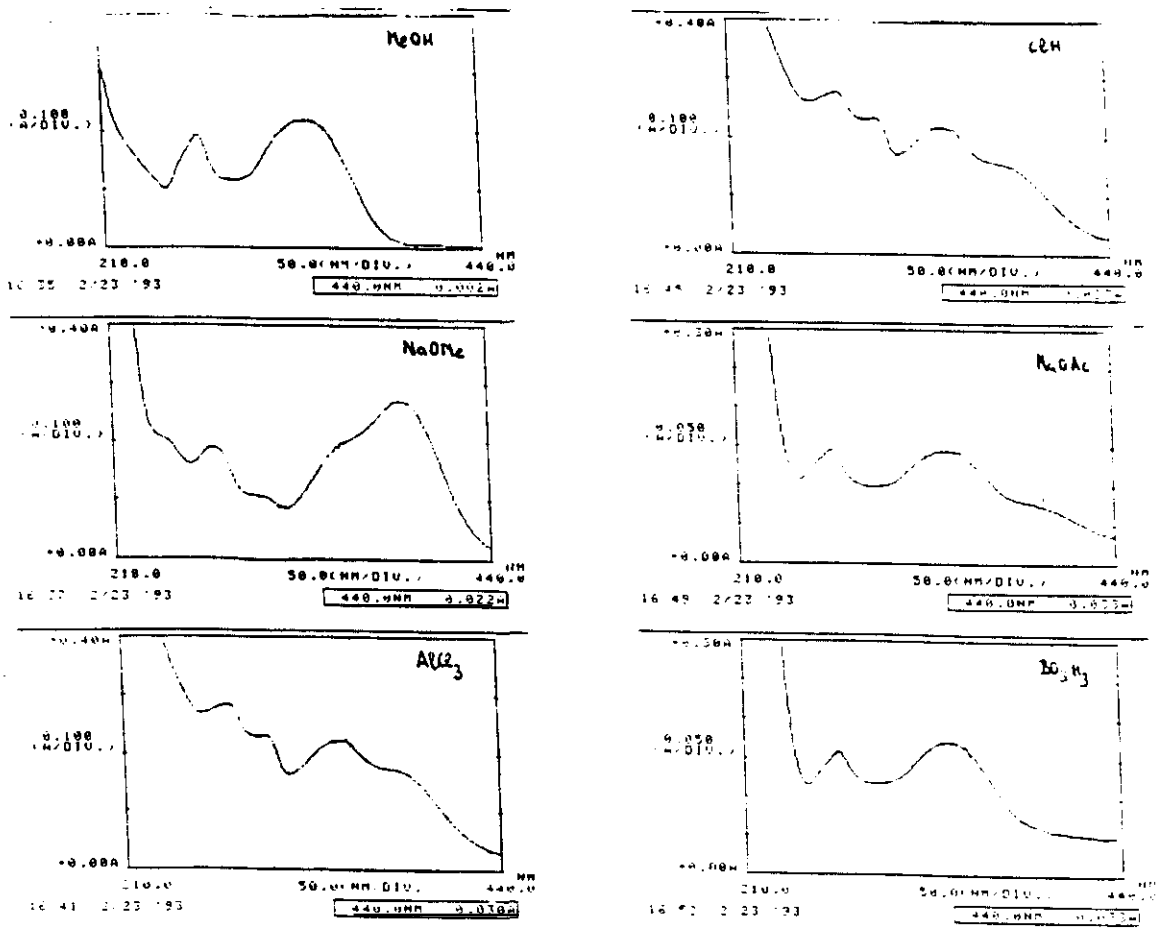


Fig. 5.87.: Espectros de ultravioleta del Compuesto XIV.

5.1.3.15. COMPUESTO XV (DS-6)

(Luteolina-7-O-neohesperidósido o 4'-OH-7-O-neohesperidósido-apigenina)

La Tabla 5.53 recoge los resultados de los diversos sistemas de TLC realizados, en los que se puso de manifiesto la presencia del Compuesto XV. Las abreviaturas son las que aparecen en la Tabla 5.1. (pp. 108). La Tabla 5.54 contiene los resultados de la espectroscopía de ultravioleta realizada sobre el Compuesto XV. La Fig. 5.88 ofrece los respectivos espectros de ultravioleta del Compuesto XV frente a los reactivos específicos utilizados. La Fig. 5.89 muestra el espectro de masas del Compuesto XV.

Tabla 5.53.: Datos cromatográficos del Compuesto XV.

		Compuesto XV	Luteolina-7-O-neohesp.[1]
Fluorescencia	UV(350nm)	VO	VO
	+ NH_3	VeA	VeA
	+ NA	Am	Am
	+ Benedict	VO	-
Rf_x	Z_1	20	18
	Z_2	63	63
	Z_3	40	33
	P_1	23	-
	P_2	-	-

[1] Luteolina-7-O-neohesperidósido según Stein & Zinsmeister (1990).
(ver pp. 77-78 para sistemas cromatográficos)

Tabla 5.54.: Datos de espectroscopía de ultravioleta del Compuesto XV.

Reactivos	Compuesto XV	Luteolina-7-O-neohesperidósido[1]
MeOH	218sh 255 264sh 348	254 267sh 348
NaOMe	265 286sh 389	263 295sh 388
$AlCl_3$	233sh 273 291sh 325sh 419	235 272 297sh 320 367sh 424
$AlCl_3$ + HCl	266sh 272 289sh 354sh 384	260 273sh 294sh 359 380sh
NaOAc	262 397	259 362 400sh
NaOAc + H_3BO_3	263 381	259 372

[1]Luteolina-7-O-neohesperidósido según Stein (1988b).

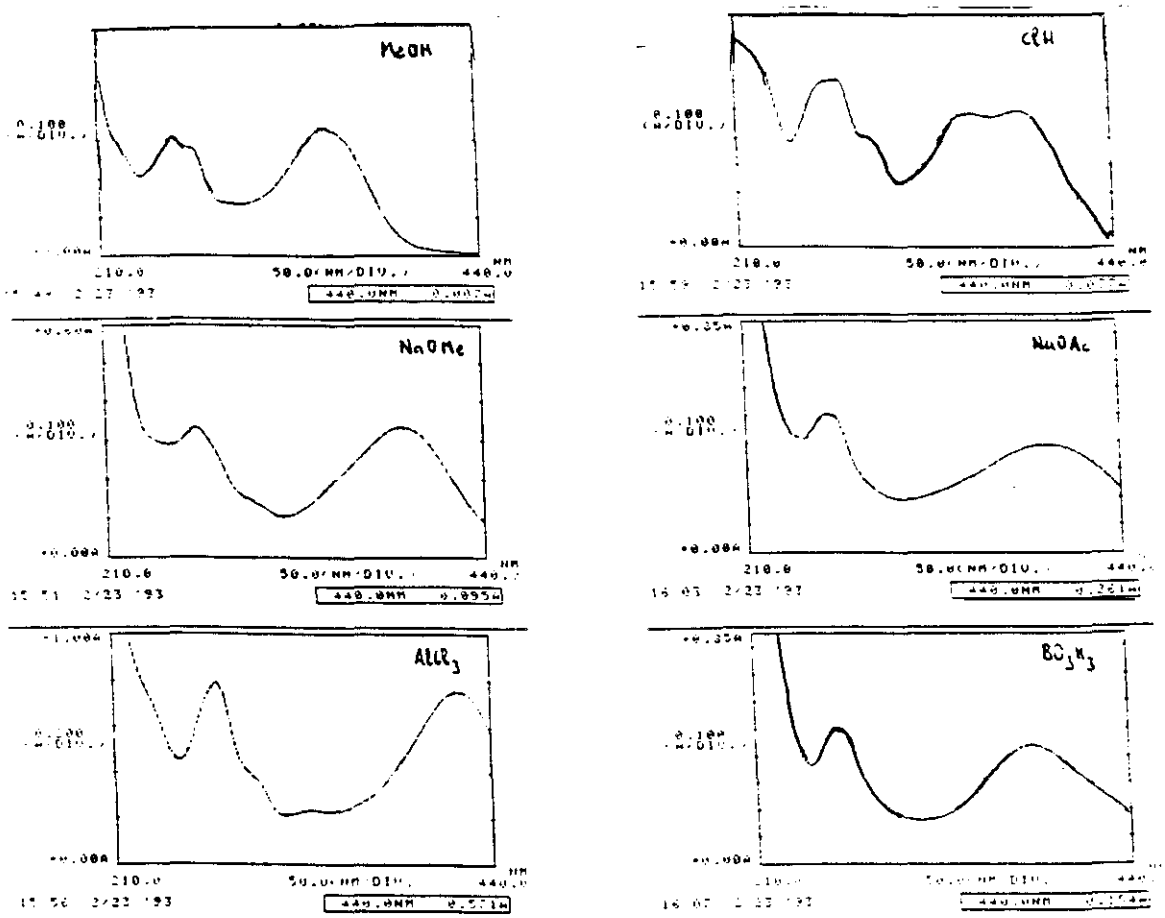


Fig. 5.88.: Espectros de ultravioleta del Compuesto XV.

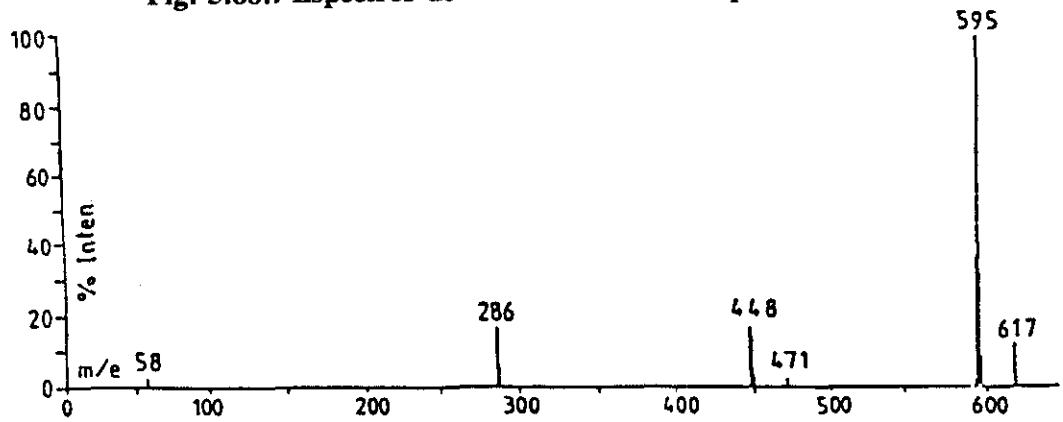
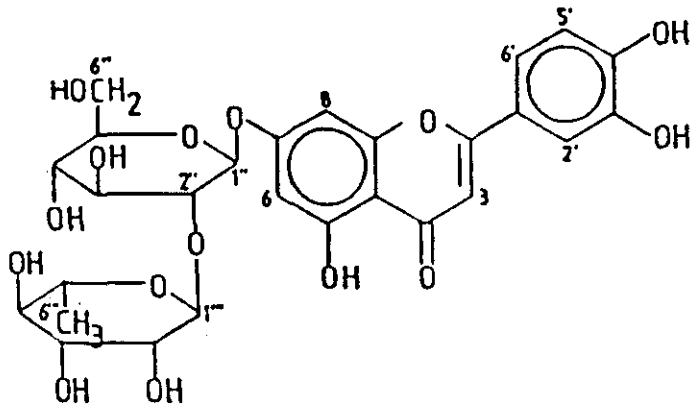


Fig. 5.89.: Espectro de masas (FAB-EM) del Compuesto XV.



Estructura Molecular del Compuesto XV.

5.2. ACTIVIDAD BIOLOGICA: ANTI-VIH.

La Tabla 5.55 recoge los valores respectivos de CC_{50} (μg/ml) y de EC_{50} (μg/ml), así como los valores del Indice Terapeútico, establecido para la droga control en 25.000.

La Tabla 5.56 ofrece los resultados del estudio de actividad anti-VIH de las 15 muestras flavonoídicas frente al patrón ddC. En dicha tabla se recogen los valores del porcentaje medio de supervivencia celular en cultivos infectados y tratados con drogas (**% superv. cel.**), la evaluación de la efectividad de la droga ensayada (**Eval.**), la toxicidad referida a la concentracción de la droga que permite una supervivencia del 70% de las células en cultivos no infectados (droga no tóxica) o una muerte celular superior al 70% (droga tóxica) y el porcentaje medio del antígeno vírico p24.

Para cada droga (muestra flavonoídica), se presentan los resultados correspondientes a diversas concentracciones (μg/ml) ensayadas. Las concentracciones superiores o inferiores de cada droga que no aparecen en la tabla, no ofrecieron resultados significativos que impliquen su ubicación en ella.

El número de células totales H9 de los cultivos no infectados fue de 1.59 millones. El valor de p24 de los cultivos no tratados (control) osciló entre 6624 pg/ml y 5255 pg/ml en los cinco cultivos realizados, y su cálculo fue la media entre ellos cinco.

Tabla 5.55.: Valores de algunos índices del ensayo anti-VIH.

Droga	Pureza	CC_{50} (μg/ml)	EC_{50} (μg/ml)	Indice Terapeútico
3	pura	»20 a «100	50	»0.4 a «2
4	pura	»20 a «100	25	»0.8 a «4
7	pura	»20 a «100	20	»1 a «5
9	pura	»100	80	»1.3
10	pura	20	2	10
11	pura	»100	20	»5
12	pura	»100	42	»2.4
13	pura	»100	52	»1.9
14	pura	»100	60	»1.7
15	pura	4	0.8	5

· **Valor de CC_{50}:** este valor se refiere a la concentracción del agente de ensayo o droga que inhibe el 50% del crecimiento de las células que no habían sido previamente infectadas con VIH.
· **Valor de EC_{50}:** valor que se refiere a la concentracción de la droga que inhibe la replicación del virus en un 50%.
· **Indice Terapéutico:** Se calcula a través del cociente entre la toxicidad del producto (CC_{50}) respecto a su actividad (EC_{50}).

Tabla 5.56.: Resultados de los ensayos anti-VIH de 15 muestras flavonoídicas.

Droga	Concentración	% supervv.cel.	Toxicidad	% p24	Eval.
1	20	0.98	no tóxica	199	
	4	1.06	no tóxica	133	
	0.8	1.01	no tóxica	150	
2	20	0.85	no tóxica	257	
	4	1.02	no tóxica	244	
	0.8	1.00	no tóxica	186	
	0.16	1.10	no tóxica	137	
3	20	0.90	no tóxica	69	*
	4	0.91	no tóxica	109	
	0.8	0.97	no tóxica	114	
4	20	0.98	no tóxica	59	*
	4	0.99	no tóxica	123	
	0.8	1.00	no tóxica	119	
5	100	0.68	tóxica	-10	***
	20	0.92	no tóxica	108	
	4	0.92	no tóxica	115	
	0.8	0.96	no tóxica	84	
6	20	0.87	no tóxica	129	
	4	0.88	no tóxica	120	
	0.8	0.98	no tóxica	70	
7	20	0.91	no tóxica	56	*
	4	0.94	no tóxica	99	
	0.8	0.94	no tóxica	88	
8	20	0.95	no tóxica	77	
	4	0.95	no tóxica	159	
	0.8	0.95	no tóxica	141	
9	100	0.82	no tóxica	39	**
	20	0.93	no tóxica	123	
	4	0.94	no tóxica	104	
	0.8	0.97	no tóxica	109	
10	20	0.53	tóxica	-8	***
	4	0.80	no tóxica	27	**
	0.8	0.88	no tóxica	78	

	Concentración	% superv.cel.	Toxicidad	% p24	Eval.
11	100	0.74	no tóxica	-7	***
	20	0.92	no tóxica	47	**
	4	0.95	no tóxica	105	
	0.8	0.97	no tóxica	106	
12	100	0.76	no tóxica	-9	***
	20	0.85	no tóxica	92	
	4	0.86	no tóxica	100	
	0.8	0.92	no tóxica	159	
13	100	0.87	no tóxica	4	***
	20	0.92	no tóxica	149	
	4	0.94	no tóxica	150	
	0.8	0.94	no tóxica	117	
14	100	0.73	no tóxica	16	***
	20	0.88	no tóxica	138	
	4	0.91	no tóxica	164	
	0.8	0.97	no tóxica	125	
15	20	0.41	tóxica	-37	***
	4	0.49	tóxica	-28	***
	0.8	0.86	no tóxica	42	**
ddC	10.5	0.92	no tóxica	-21	***
	2.1	0.94	no tóxica	-28	***
	0.42	0.96	no tóxica	-33	***
	0.084	0.99	no tóxica	-42	***

· **Porcentaje medio de p24 (% p24):** Su cálculo se realiza a partir de la relación entre el incremento de p24 de los cultivos tratados respecto a los no tratados (control). Según su valor se consideraron tres niveles de efectividad de la droga:

1) * valor de % p24 entre 50-69%
2) ** valor de % p24 entre 25-49%.
3) *** valor de % p24 menor del 25%.

· **Porcentaje medio de supervivencia celular (% superv.cel.):** es el cociente entre el número de células que sobreviven en los cultivos infectados y tratados con droga frente al número de células totales de cultivos no infectados (calculado en 1.59 millones).

· **Toxicidad de la droga:** mide el límite de supervivencia celular frente a una determinada concentración de droga. Se considera que una droga no es tóxica cuando sobreviven más del 70% de las células en cultivos controles que no estaban infectados. Si se produce una muerte celular superior al 70% del total de células se considera que dicha concentración de droga es tóxica.

· **Concentración de la droga:** en μM.

6. DISCUSION

En la presente Memoria Doctoral se aislaron e identificaron un total de **15** compuestos con estructura flavonoídica. De ellos, 8 fueron biflavonoides, 3 triflavonoides, 1 ácido flavonoídico y 3 flavonoides glicosilados.

En primera instancia presentaremos las discusiones respectivas a la elucidación de la estructura de cada uno de dichos compuestos, cuya identificación fue demostrada básicamente por TLC, HPLC, UV, EM y RMN.

A continuación, se discutirán algunos aspectos tales como la distribución de los flavonoides en las familias *Bartramiaceae* y *Dicranaceae*, su validez taxonómica y la variación existente en la composición flavonoídica respecto a la fenología y localización geográfica.

Finalmente, se discutiran los resultados de los ensayos anti-VIH realizados a partir de los compuestos flavonoídicos aislados en la presente Memoria Doctoral junto a otros patrones químicos.

En la siguiente tabla, resumimos toda la simbología utilizada en el apartado de resultados, relativa a los compuestos que fueron identificados en la discusión.

	NOMBRE	SIMBOLOGIA	
		en TLC	en especies
COMPUESTO I	5',3'''-diOH-amentoflavona	t	BH3, BI3, BP3, BS6, DS1
COMPUESTO II	5',3'''-diOH-robustaflavona	r	BH4, BS7, DS2
COMPUESTO III	Filonotisflavona	f	BH5, BI1, BP4, BS2
COMPUESTO IV	2,3-dihidro-filonotisflavona	d	BH6, BI4, BP5, BS8
COMPUESTO V	Dicranolomina	c	BI2, BP6, BS4
COMPUESTO VI	Bartramiaflavona	b	BH1, BP1
COMPUESTO VII	Anhidrobartramiaflavona	a	BH2, BP2
COMPUESTO VIII	Bartramia-Triluteolina	-	BP7, BS5.1
COMPUESTO IX	Epi-Bartramia-Triluteolina	-	BS5.A
COMPUESTO X	Ciclo-Triluteolina	-	BS3
COMPUESTO XI	5'-OH-amentoflavona	-	BI6
COMPUESTO XII	Acido Bartrámico	-	BP8
COMPUESTO XIII	Diosmetina-7-O-triglicósido	-	DS7
COMPUESTO XIV	Apigenina-7-O-triglicósido	-	DS5
COMPUESTO XV	Luteolina-7-O-neohesperidósido	-	DS6

6.1. FLAVONOIDES

6.1.1. Identificación de Compuestos

6.1.1.1. 5', 3'''- DIHIDROXI-AMENTOFLAVONA
(Compuesto I) (5',8''-biluteolina)

La gran parte de los biflavonoides de origen natural poseen uniones interflavonoídicas de tipo carbono-carbono (C-C). Sus estructuras son por ello difíciles de determinar, especialmente cuando los carbonos C-6 ó C-8 están implicados en el enlace C-C entre ambas mitades flavonoídicas (Österdahl, 1983; Geiger & col., 1993a).

El Compuesto I que identificamos como 5',3'''-diOH-amentoflavona, es sin lugar a dudas uno de los biflavonoides de musgos mejor conocido, ya que fue el primer biflavonoide que se describió, concretamente en *Dicranum scoparium* (Lindberg & col., 1974), y, como demuestra lo expuesto en el Anexo 2, es el biflavonoide que se ha identificado mayoritariamente en musgos. De hecho, se conoce en un total de 21 especies pertenecientes a familias muy diversas. Dentro de la familia *Bartramiaceae* se ha identificado en las cuatro especies objeto central de nuestro estudio doctoral (*Bartramia halleriana*-BH 3, *Bartramia ithyphylla*-BI 3, *Bartramia pomiformis*-BP 3 y *Bartramia stricta*-BS 6) y se conoce también en *Anacolia webbii* (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992), *Breutelia chrysocoma* (Salm, 1994) y *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989); así como en *Dicranum scoparium* (DS 1) de *Dicranaceae*.

El Rf del Compuesto I es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA. Este primer resultado y su parecida movilidad cromatográfica con la 5',3'''-diOH-amentoflavona en el sistema P_1-P_2 en poliamida-6, nos hicieron pensar ya desde el principio que el Compuesto I se correspondía con tal biflavona. El Compuesto I exhibe además, unas características cromatográficas en capa fina muy semejantes a las de la luteolina (5,7,3',4'-tetraOH-flavona) (Markham & col., 1988), ya que al ser observado a la luz ultravioleta muestra una absorción de color púrpura o violeta oscuro que cambia a la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar con NA. Este cambio observado es típico de flavonoides o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B).

De acuerdo a Geiger (1990), el color de los biflavonoides a la luz ultravioleta (360 nm) es el de una mancha oscura, violeta o púrpura, que con NA vira a tonalidades amarillo-anaranjadas. Estos datos concordaban con los que obtuvimos para el Compuesto I, por lo que dedujimos que debía tratarse de un biflavonoide, y muy posiblemente derivado de la luteolina, concretamente una biluteolina. El color que se observaba tras revelar con amoniaco y reactivo Benedict, apoyaban, de acuerdo a Mües (1988) y Krebs & col. (1967), que el Compuesto I era un flavonoide que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente podía tratarse de una

biluteolina.

El espectro de absorción ultravioleta de la 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona es aproximadamente el de la luteolina (Tabla 5.5.) (Markham & col., 1988), ya que este biflavonoide es una biluteolina, y por lo tanto el espectro obtenido es en sí la suma de los dos espectros correspondientes a ambos monómeros de luteolina que se solaparían como uno solo. Comparando el espectro de ultravioleta del Compuesto I con el de la 5',3'''-diOH-amentoflavona (Tabla 5.5.) se observa un paralelismo muy acusado de acuerdo a los datos expuestos por Salm (1992), lo que de nuevo vino a confirmar que el Compuesto I podía ser dicha biflavona. Analizando detenidamente los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto I vemos que, de manera general, se corresponde con el típico espectro de un biflavonoide (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992) pues absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I.

Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente ipsocrómico en la banda II, lo que es indicativo de flavonas que poseen agrupamientos o-diOH en el anillo B. El espectro en NaOAc supone un efecto batocrómico marcado de +8 nm (268-256) en la banda II, indicativo de que se trata de una flavona con un grupo OH en posición 7 (7-OH). Al añadir H_3BO_3 no se observa ningun cambio ya que tanto la banda I como la II permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B. El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +15 nm (271 por 256) en la banda II y de +41 nm (394-353) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto I debía tratarse de una flavona (o dímero de ella) con un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con dos hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es claramente la luteolina, y dado que hemos deducido con anterioridad que era posiblemente un biflavonoide, debía tratarse de una biluteolina. Queda por analizar cúal es la posición del enlace de unión interflavonoídico entre ambos monómeros de luteolina.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto I muestra un ión $[M - H]^+$ de 569 um, que confirma su estructura de biluteolina ($C_{30}H_{18}O_{12}$), ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta y que concuerda con resultados ya publicados respecto de la 5',3'''-diOH-amentoflavona (Österdahl, 1983; Becker & col., 1986; Seeger, 1992). Dicho espectro de masas se corresponde claramente con el de una **octahidroxibiflavona (biluteolina)** con unión interflavonoídica de tipo C-C entre los anillos BI y AII de ambos monómeros (Seeger, 1988).

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Österdahl, 1983) (ver Tabla 6.1a al final de la discusión del compuesto). En caso de tratarse de un biflavonoide simétrico, al comparar las señales correspondientes a cada átomo de carbono con las del correspondiente monómero, cada señal de éste debe tener al menos dos equivalentes en el biflavonoide.

La presencia de dos señales a 182.0 y 181.5 ppm son debidas a 2 átomos de carbono carbonílicos correspondientes a dos flavonas, concretamente a C-4 y C-4''. La similitud de señales entre ellos, y con respecto a la señal correspondiente de la luteolina (C-4), parece indicar que el Compuesto I debe ser un dímero de luteolina (biluteolina). En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-

dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 manifiestamente a campo menor (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). En la luteolina, la señal para C-6 aparece a 99.2 ppm y la de C-8 a 94.2 ppm. Si el Compuesto I es una biluteolina, en dicho rango de 90-100 ppm deberían aparecer 4 señales: dos correspondientes a los carbonos del anillo AI y otras dos del AII. Como se refleja en la Tabla 6.1a, sólo aparecen tres señales dentro de dicho rango: una a 93.8 ppm y dos a 98.6 ppm. La de menor valor de ppm se asignó por lo dicho antes a C-8 y las otras dos de valores de ppm más elevados a C-6 y C-6''. **La ausencia de una cuarta señal en el rango 90 a 100 ppm indica que C-8'' debe estar sustituído**, y que debe tratarse de un carbono cuaternario, ya que no se encuentra señal equivalente en el otro monómero (C-8) ni en la luteolina. Estos resultados pueden ser indicativos de que precisamente C-8'' (del anillo AII) es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas. La intensa señal a 104.1 ppm, que no aparece dividida, y que debe corresponder a un carbono cuaternario, es asignada a C-8''. Las dos señales a 102.9 y 102.5 ppm son asignadas a C-3 y C-3''. Entre las tres señales más intensas restantes, las dos menos intensas a 120.4 y 121.8 son asignadas a C-1'y C-1'''.

Las señales correspondientes a los carbonos de los anillos BI y BII, no cuaternarios, encuentran fácil correspondencia con los del anillo B de la luteolina, salvo C-5' y C-5'''. Sólo una de ellas (C-5' o C-5''') encuentra su señal correspondiente en las señales de la luteolina. Dado que con anterioridad habíamos deducido que uno de los carbonos que intervenían en el enlace interflavonoídico era C-8'' del anillo AII, el otro carbono implicado debería pertenecer al anillo BI, es decir C-5', mientras que C-5''' sería el carbono cuya señal coincidiría con la de C-5 de la luteolina. La señal a 120.1 ppm corresponde al **carbono C-5'**, cuya señal se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico** (apantallamiento por el hidroxilo existente en C-6''), ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 116.4 ppm. Las señales inferiores entre 145.8 y 160.4 son asignadas por comparación con el espectro de la luteolina y, se deben a carbonos oxigenados (C-7, C-7'', C-3', y C-3''').

Analizando finalmente el espectro general de ^{13}C-RMN del Compuesto I, se observa con claridad que todas las señales pueden asignarse sin problema a las correspondientes de la luteolina, teniendo en cuenta por supuesto que se repiten de 2 en 2 al ser una biluteolina. Las dos únicas señales en que no puede llevarse a cabo tal asignación directa son respectivamente 5' y 8'', ya que corresponden a los carbonos entre los que se lleva a cabo un enlace interflavonoídico entre ambos monómeros de luteolina. De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podríamos deducir que el Compuesto I es la **5',8''-biluteolina**, cuya denominación actual es **5',3'''-dihidroxi-amentoflavona**.

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.1b al final de la discusión de los resultados), observamos que se detectan 3 señales correspondientes a singletes entre 6,37 y 6,68 ppm, 6 dobletes entre 6,18 y 7,49 ppm y un doble doblete a 7,04 ppm. Respecto a las 2 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden ambas a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros de luteolina, concretamente OH-5 para la señal a 13.00 ppm y OH-5'' para 13.13 ppm. Estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con

el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos.

Las señales de los protones del resto de grupos hidroxílicos de la molécula, aparecen bajas y anchas y no como verdaderos picos.

Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992), que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.64s y 6.68s ppm para el protón en C-3 y C-3'' respectivamente, 6.18d y 6.37s ppm para H-6 y H-6'' y 6,42d ppm para H-8, y cuya asignación es sencilla simplemente comparando con los señales propias de la luteolina. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para los protones H-2' y H-6' del anillo B de la luteolina, aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-2' y H-2''' para las señales a 7.48d y 7.06d ppm respectivamente, y H-6' y H-6''' para las señales a 7.49d y 7.04d ppm.

El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992). No obstante sólo se detecta una señal correspondiente al protón situado en C-5''' a 6.67 ppm y ninguna señal para H-5' ni H-8'', lo que indica la inexistencia de protones tanto en C-5' como en C-8''. Estos hechos se justifican fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que intervienen en el enlace interflavonoídico, y por lo tanto carecen de protones, de ahí que no se detecte ninguna señal para H-5' ni H-8''.

En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto I se correspondería con la **5',3'''-diOH-amentoflavona (5',8''-biluteolina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.1.

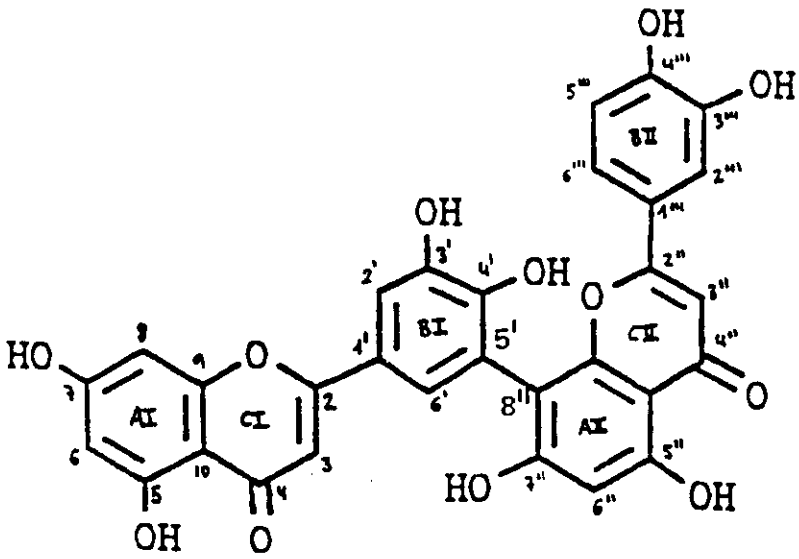


Fig. 6.1.: 5',3'''-diOH-amentoflavona ($C_{30}H_{18}O_{12}$)
(5',8''-biluteolina)

Tabla 6.1a: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto I.

Carbonos	Compuesto I	5',3'''-DHA[1]	Luteolina[2]
2	164,0	163,9	164,5
2''	164,0	164,0	-
3	102,9	102,9	103,3
3''	102,5	102,5	-
4	182,0	181,9	182,2
4''	181,5	181,5	-
5	161,4	161,4	162,1
5''	160,4	160,4	-
6	98,6	98,7	99,2.
6''	98,6	98,6	-
7	164,0	164,0	164,7
7''	162,0	161,7	-
8	93,8	93,8	94,2
8''	**104,1**	104,0	-
9	157,3	157,3	157,9
9''	154,5	154,5	-
10	103,7	103,6	104,2
10''	103,7	103,6	-
1'	120,4	120,6	122,1
1'''	121,8	121,8	-
2'	112,0	112,1	113,8
2'''	113,7	113,7	-
3'	145,5	145,5	146,2
3'''	145,8	145,8	-
4'	148,5	148,2	150,1
4'''	149,4	149,4	-
5'	**120,1**	120,0	116,4
5'''	115,5	115,5	-
6'	122,2	122,2	119,3
6'''	118,6	118,6	-

[1] 5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

Tabla 6.1b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto I.

Protones	Compuesto I	5',3'''-DHA[1]	Luteolina[2]
3	6,64 s	6,68 s	6,69 s
3''	6,68 s	6,72 s	-
6	6,18 d (2)	6,21 d (2)	6,22 d
6''	6,37 s	6,41 s	-
8	6,42 d (2)	6,45 d (2)	6,47 d (2)
2'	7,48 d (2)	7,51 d (2)	7,43 d (2)
5'	---	---	6,92 d (8)
6'	7,49 d (2)	7,52 d (2)	7,77 dd (2;9)
2'''	7,06 d (2)	7,09 d (2)	-
5'''	6,67 d (8)	6,70 d (8)	-
6'''	7,04 dd (2;8)	7,07 dd (2;8)	-
OH-5	13,00 s	-	-
OH-5''	13,13 s	-	-

[1]5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

6.1.1.2. 5',3'''- DIHIDROXI- ROBUSTAFLAVONA
(Compuesto II) (5',6''-biluteolina)

El Compuesto II que identificamos como 5,3'''-diOH-robustaflavona, es junto al anterior (Compuesto I), uno de los biflavonoides mayormente citados en musgos. Concretamente, se ha identificado en 18 especies (Anexo 2) pertenecientes a familias muy diversas. Su identificación en musgos se llevó a cabo por primera vez en la especie *Hylocomium splendens* (Becker & col., 1986), y dentro de la familia objeto de estudio de la presente Tesis, se ha identificado en *Bartramia halleriana*-BH 4 y *Bartramia stricta*-BS 7, y se conoce también en *Anacolia webbii* (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992), *Breutelia chrysocoma* (Salm, 1994) y *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989); así como en *Dicranum scoparium* (DS 2) de *Dicranaceae*.

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy semejantes a las de la luteolina y a las del Compuesto I (5',3'''-diOH-amentoflavona), ya que al ser observado a la luz ultravioleta ofrece un color púrpura (violeta oscuro) que vira hacia fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA. Todo ello nos llevó de nuevo a pensar, como ocurrió con el Compuesto I, que el Compuesto II podría tratarse de una biflavona (López-Sáez, 1992). Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict

o NA, y al igual que en el caso del Compuesto I, nos llevaron a concluir que el Compuesto II debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (del anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de una **biluteolina**. Todas las conclusiones derivadas son las mismas que se ejercieron con el Compuesto I.

El espectro de absorción ultravioleta de la 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona es aproximadamente el de la luteolina (Tabla 5.9.) (Markham & col., 1988), ya que este biflavonoide es una biluteolina, y por lo tanto el espectro obtenido es en sí la suma de los dos espectros correspondientes a ambos monómeros de luteolina, que lógicamente se solaparían como uno solo. Comparando el espectro de ultravioleta del Compuesto II con el de la 5',3'''-diOH-robustaflavona (Tabla 5.9.) se observa un paralelismo muy acusado de acuerdo a los datos expuestos por Stein (1988b), lo que de nuevo vino a confirmar que el Compuesto II podría ser dicha biflavona, y más concretamente una biluteolina. Analizando detenidamente los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto II vemos que, de manera general, como en el caso del Compuesto I, se corresponde con el típico espectro de un biflavonoide (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992) pues *absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I. Siguiendo* a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +46 (406 por 360 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I como en la II, indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). La adición de H_3BO_3 al NaOAc no supone ningun cambio significativo en ninguna de las dos bandas del espectro, pues ambas permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B. El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +49 nm (272 por 223) en la banda II y de +65 (425-360) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto II debía tratarse de una flavona (o dímero de ella) con un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es la luteolina, y dado que hemos deducido con anterioridad que se trata de un biflavonoide, debía tratarse de una biluteolina. Queda por analizar cual es la posición del enlace de unión interflavonoídico entre ambos monómeros de luteolina.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto II muestra un ión $[M-H]^+$ de 569 um, que confirma su estructura de biluteolina ($C_{30}H_{18}O_{12}$), ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta, y que concuerda con resultados ya publicados respecto de la 5',3'''-diOH-robustaflavona (Becker & col., 1986; Seeger, 1992). Dicho espectro de masas se corresponde con él de una **octahidroxibiflavona (biluteolina)** con unión interflavonoídica de tipo C-C entre los anillos BI y AII de ambos monómeros (Seeger, 1988).

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Becker & col, 1986; Seeger, 1992; Voigt, 1993; Salm, 1992) (ver Tabla 6.2b al final de la discusión del compuesto). En caso de tratarse de un biflavonoide simétrico, al comparar las señales correspondientes a cada átomo de carbono con las del

correspondiente monómero, cada señal de éste debe tener al menos dos equivalentes en el biflavonoide. La presencia de dos señales a 181.2 y 181.1 ppm son debidas a 2 átomos de carbono carbonílicos correspondientes a dos flavonas, concretamente a C-4 y C-4''. La similitud de señales entre ellos, y respecto a la señal correspondiente de la luteolina (C-4) indica que el Compuesto II debía ser un dímero de luteolina (biluteolina). En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 manifiesta en un nivel inferior (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). En la luteolina, la señal para C-6 aparece a 99.2 ppm y la de C-8 a 94.2 ppm. Si el Compuesto II es una biluteolina, en dicho rango de 90-100 ppm deberían aparecer 4 señales: dos correspondientes a los carbonos del anillo AI y otras dos del AII. Como se refleja en la Tabla 6.2b, sólo aparecen tres señales dentro de dicho rango: una a 98.5 ppm y dos a 93.6 ppm. Las de menor ppm se asignaron por lo dicho antes a C-8 y C-8'' y la otra de valor de ppm más elevado a C-6. **La ausencia de una cuarta señal en el rango 90 a 100 ppm indica que C-6'' debe estar sustituído**, y que debe tratarse de un carbono cuaternario, ya que no se encuentra señal equivalente en el otro monómero (C-6) ni en la luteolina. Estos resultados pueden ser indicativos de que precisamente C-6'' (del anillo AII) es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas. La intensa señal a 108.9 ppm, que no aparece dividida, y que debe corresponder a un carbono cuaternario, es asignada a C-6''. A diferencia del Compuesto I, sí se detectó dentro de dicho intervalo la señal correspondiente a C-8'', lo que indica que en el caso del Compuesto II, dicho carbono C-8'' no está implicado en el enlace interflavonoídico. Sin embargo, **la ausencia de una señal en el rango 90 a 96 ppm indica por contra que C-6'' está sustituído**, ya que es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas (AII). Las dos señales a 103.2 y 102.1 ppm son asignadas a C-3 y C-3''. Entre las tres señales más intensas restantes, las dos menos intensas a 121.9 y 120.8 son asignadas a C-1'y C-1'''. Las señales correspondientes a los carbonos de los anillos BI y BII, no cuaternarios, encuentran fácil correspondencia con los del anillo B de la luteolina, salvo C-5' y C-5'''. Sólo una de ellas (C-5' o C-5''') encuentra su señal correspondiente en las señales de la luteolina. Dado que con anterioridad habíamos deducido que uno de los carbonos que intervenían en el enlace interflavonoídico era C-6'' del anillo AII, el otro carbono implicado debería pertenecer al anillo BI, es decir C-5', mientras que C-5''' sería el carbono cuya señal coincidiría con la de C-5 de la luteolina. La señal a 120.3 ppm corresponde al **carbono C-5'**, cuya señal se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico** (concretamente por el efecto de apantallamiento de hidroxilo en C-6 que está muy cercano debido a la existencia del enlace interflavonoídico) ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 116.4 ppm. Las señales inferiores entre 165.58 y 120.3 son asignadas por comparación con el espectro de la luteolina y, se deben a carbonos oxigenados (C-7, C-7'', C-3', y C-3''').

Analizando finalmente el espectro general de ^{13}C-RMN del Compuesto II, se observa con claridad que todas las señales pueden asignarse sin problema a las correspondientes de la luteolina, teniendo en cuenta por supuesto que se repiten de 2 en 2 al ser una biluteolina. Las dos únicas señales en que no puede llevarse a cabo tal asignación directa son respectivamente 5' y 6'', ya que corresponden a los carbonos que intervienen en el enlace interflavonoídico entre ambos monómeros

de luteolina. Las señales correspondientes a los carbonos C-2', C-3' y C-6' se encuentran ligeramente desplazadas respecto a las de la luteolina, como consecuencia del solapamiento que se produce por la cercanía del enlace interflavonoídico en C-5'. Algo similar se produce en la otra mitad monomérica en C-5'' y C-7'' por la cercanía al enlace que existe en C-6''.

De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto II debía ser la **5',6''-biluteolina**, cuya denominación actual es **5',3'''-dihidroxi-robustaflavona**.

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.2a al final de la discusión del compuesto), observamos que se detectan 3 señales correspondientes a singletes entre 6.24 y 6.55 ppm, 5 dobletes entre 6.14 y 7.83 ppm y dos multipletes a 7.39 ppm. Respecto a las 2 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden ambas a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros de luteolina, concretamente OH-5 para la señal a 13.02 ppm y OH-5'' para 13.28 ppm. Como ocurría en el Compuesto I, y por regla general en los biflavonoides de musgos (Agrawal, 1989; Geiger & col., 1993a), estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos. Las señales de protones del resto de grupos hidroxílicos de la molécula, aparecen bajas y anchas y no como verdaderos picos. Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.55 y 6.50 ppm para el protón en C-3 y C-3'' respectivamente que aparecen como singletes al igual que en la luteolina, 6.14 ppm para H-6 y 6.42 y 6.24 ppm para H-8 y H-8'' cuya asignación es sencilla simplemente comparando con los señales propias de la luteolina. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para los protones H-2' y H-6' aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-2' y H-2''' para las señales a 7.18d y 7.39m ppm respectivamente, y H-6' y H-6''' para las señales a 7.83d y 7.39m ppm. El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992). No obstante sólo se detecta la señal correspondiente al protón situado en C-5''' a 6.89d ppm y ninguna señal para H-5' ni H-6'', lo que indica la inexistencia de protones tanto en C-5' como en C-6''. Estos hechos se justifican fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que llevan a cabo el enlace interflavonoídico, y por lo tanto carecen de protones, de ahí que no se detecte ninguna señal para H-5' ni H-6''.

En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto II se correspondería con la **5',3'''-diOH-robustaflavona (5',6''-biluteolina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.2.

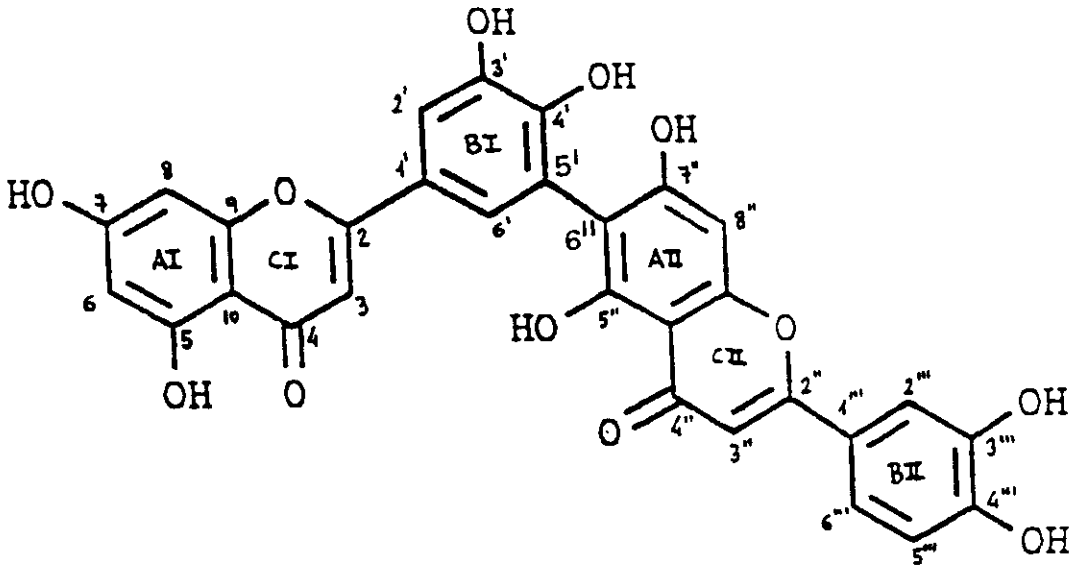


Fig. 6.2.: 5',3'''-diOH-robustaflavona ($C_{30}H_{18}O_{12}$)
(5',6''-biluteolina)

Tabla 6.2a.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto II.

Protones	Compuesto II	5',3'''-DHR[1]	Luteolina[2]
3	6,55 s	6,58 s	6,69 s
3''	6,50 s	6,53 s	-
6	6,14 d (2)	6,16 d (2)	6,22 d
8	6,42 d (2)	6,44 d (2)	6,47 d (2)
8''	6,24 s	6,26 s	-
2'	7,18 d (2)	7,20 d (2)	7,43 d (2)
6'	7,83 d (2)	7,82 d (2)	7,77 dd (2;9)
2'''	7,39 m	7,39 m	-
5'''	6,89 d (8)	6,89 d (8)	-
6'''	7,39 m	7,39 m	-
OH-5	13,02 s	-	-
OH-5''	13,28 s	-	-

[1]5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-robustaflavona según Markham & col. (1988).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

Tabla 6.2b.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto II.

Carbonos	Compuesto II	5',3'''-DHR[1]	Luteolina[2]
2	163,7	163,6	164,5
2''	164,1	164,0	-
3	103,2	102,8	103,3
3''	102,1	102,7	-
4	181,2	181,6	182,2
4''	181,1	181,5	-
5	162,5	162,3	162,1
5''	159,0	159,1	-
6	98,5	98,7	99,2
6''	**108,9**	108,9	-
7	165,5	164,0	164,7
7''	162,5	162,3	-
8	93,6	93,4	94,2
8''	93,6	93,8	-
9	157,2	157,2	157,9
9''	156,3	156,2	-
10	103,5	103,6	104,2
10''	103,5	103,4	-
1'	121,9	121,5	122,1
1'''	120,8	121,9	-
2'	112,1	111,7	113,8
2'''	113,1	113,3	-
3'	145,9	145,8	146,2
3'''	145,6	145,7	-
4'	148,5	148,6	150,1
4'''	150,3	149,6	-
5'	**120,3**	120,2	116,4
5'''	115,9	116,0	-
6'	122,3	121,9	119,3
6'''	120,3	119,9	-

[1] 5',3'''-DHA: 5',3'''-diOH-robustaflavona según Becker & col. (1986).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

6.1.1.3. FILONOTISFLAVONA

(Compuesto III) (2',8''-biluteolina)

El Compuesto III que identificamos como la Filonotisflavona, fue descrito por primera vez en *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989), y a partir de ese momento ha sido también identificado en otras especies de la familia *Bartramiaceae*, como es el caso de las cuatro especies ibéricas del género *Bartramia* que han sido estudiadas en esta Tesis Doctoral: *B. halleriana*-BH 5, *B. ithyphylla*-BI 1, *B. pomiformis*-BP 4 y *B. stricta*-BS 2.

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy semejantes a las de la luteolina y a las de los dos compuestos hasta ahora referidos (5',3'''-diOH-amentoflavona y 5',3'''-diOH-robustaflavona), ya que al ser observado al ultravioleta muestra un color púrpura (violeta oscuro) que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA, aunque por lo general es algo superior al de los dos compuestos referidos. Todo ello nos llevó de nuevo a pensar, como ocurrió con el Compuesto I y el II que debía tratarse de una biflavona (López-Sáez, 1992). Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto III debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de una **biluteolina**. Todas las conclusiones derivadas son las mismas que se ejercieron con los Compuestos I y II.

El espectro de absorción ultravioleta de la filonotisflavona es aproximadamente el de la luteolina (Tabla 5.13.) (Markham & col., 1988), ya que este biflavonoide es una biluteolina, y por lo tanto el espectro obtenido es en sí la suma de los dos espectros correspondientes a ambos monómeros de luteolina, que lógicamente se solaparían como uno solo. Comparando el espectro de ultravioleta del Compuesto III con el de la filonotisflavona se observa una gran concordancia que nos hace pensar que ambos sean el mismo. Analizando detenidamente los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto III vemos que de manera general, como en el caso de los compuestos anteriores, se corresponde con el típico espectro de un biflavonoide (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992) pues absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I.

Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +55 (400 por 345 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I como en la II, indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). La adición de H_3BO_3 al NaOAc no supone ningun cambio significativo en ninguna de las dos bandas del espectro, pues ambas permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B, así como la inexistencia de un grupo 3-OH, es decir, que se trata de una flavona y no de

un flavonol (Salm, 1992). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +16 nm (271/255) en la banda II y de +74 nm (419-345) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH, como ya ocurría en los compuestos I y II. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto III debía tratarse de un compuesto muy semejante a los compuestos I y II, es decir, de una flavona (o dímero de ella) con un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es nuevamente la luteolina, y dado que hemos deducido con anterioridad que se trata de un biflavonoide, debía tratarse de una biluteolina.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto III muestra un ión $[M -- H]^+$ de 569 um, que confirma su estructura de biluteolina ($C_{30}H_{18}O_{12}$), ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta, y que concuerda con resultados ya publicados respecto de la filonotisflavona (Geiger & Bokel, 1989). Dicho espectro de masas se corresponde claramente con el de una **octahidroxibiflavona (biluteolina)** con unión interflavonoídica de tipo C-C entre los anillos AII y BI de ambos monómeros (Seeger, 1988). Lógicamente, el Compuesto III que sería una biluteolina al igual que los compuestos I y II, debería tener un enlace interflavonoídico en el que interviniese al menos un carbono distinto respecto de los que lo hacen en el Compuesto I (5',8'') y el Compuesto II (5',6'').

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Voigt, 1993; Salm, 1992) (ver Tabla 6.3b al final de la discusión del compuesto). La presencia de dos señales a 181.9 y 181.3 ppm son debidas a 2 átomos de carbono correspondientes a dos flavonas, concretamente a C-4 y C-4'', cuya similitud de señales entre ellos, y respecto a la señal correspondiente de la luteolina (C-4) indica que el Compuesto III debe ser un dímero de luteolina (biluteolina). En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 a campo menor (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar las señales correspondientes a los carbonos C-6 y C-6'' en 98.6 y 98.3 ppm respectivamente, y a niveles de ppm más bajos la correspondiente a C-8 en 93.1 ppm. A diferencia del Compuesto II, sí se detectó dentro del intervalo mencionado, la señal correspondiente a C-6'', lo que indica que en el caso del Compuesto III, dicho carbono C-6'' no está implicado en el enlace interflavonoídico. Sin embargo, **la ausencia de una cuarta señal en el rango 90 a 100 ppm indica por contra que C-8'' está sustituído**, ya que es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas, y su señal difiere notablemente respecto de la correspondiente en la luteolina. La intensa señal a 103.5 ppm, que no aparece dividida, es asignada a C-8''. Las dos señales a 106.5 y 102.5 ppm son asignadas a C-3 y C-3''. Entre las tres señales más intensas restantes, las dos menos intensas a 124.0 y 121.8 son asignadas a C-1'y C-1'''. La señal a 118.6 ppm corresponde al **carbono C-2'**, cuya señal se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico**, ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 113.8 ppm (Geiger & Bokel, 1989). El resto de señales del espectro (C-2, C-2'', C-5, C-5'', C-7, C-7'', C-9, C-9'', C-10, C-10'', C-2''', C-3', C-

3''', C-4', C-4''', C-5' y C-5''') se identificaron y asignaron de acuerdo a la literatura (Geiger & Bokel, 1989; Salm, 1992), por lo que por la misma multiplicidad y casi iguales desplazamientos químicos (isocronía) que las referencias bibliográficas, la asignación de los carbonos correspondientes a cada señal fue sencilla. La señal correspondiente al carbono C-5' es igual a la que ofrece la luteolina, lo que indica que este carbono no interviene en el enlace interflavonoídico. Analizando finalmente el espectro general de ^{13}C-RMN del Compuesto III, se observa con claridad que todas las señales pueden asignarse sin problema a las correspondientes de la luteolina, teniendo en cuenta por supuesto que se repiten de 2 en 2 al ser una biluteolina. Las dos únicas señales en que no puede llevarse a cabo tal asignación directa son respectivamente 2' y 8'', ya que corresponden a los carbonos entre los que se lleva a cabo un enlace interflavonoídico entre ambos monómeros de luteolina. De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto III sería la **2',8''-biluteolina**, cuya denominación actual conocida es **Filonotisflavona**, en honor a la especie en que se identificó por primera vez (*Philonotis fontana*).

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.3a al final de la discusión del compuesto) , observamos que se detectan 3 señales correspondientes a singletes entre 6.06 y 6.62 ppm, 4 dobletes entre 5.75 y 7.24 ppm y 3 multipletes a 7.01 ppm. Respecto a las 2 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden ambas a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros de luteolina, concretamente OH-5 para la señal a 12.73 ppm y OH-5'' para 13.01 ppm. Como ocurría en los compuestos I y II, y por regla general en los biflavonoides de musgos (Agrawal, 1989; Geiger & col., 1993a), estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos. Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.06 y 6.62 ppm para el protón en C-3 y C-3'' respectivamente que aparecen como singletes al igual que en la luteolina, 5.75 y 6.27 ppm para H-6 y H-6'', y 6.07 ppm para H-8, cuya asignación es sencilla simplemente comparando con las señales propias de la luteolina. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para el protón H-6' aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-6' y H-6''' para las señales a 7.24d y 7.01m ppm. El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992) por lo que H-5' y H-5''' fueron asignados para las señales a 7.01m y 6.74d ppm respectivamente. No se detectaron las señales correspondientes a los protones de C-2' y C-8'', lo que indica la inexistencia de protones tanto en C-2' como en C-8''. Estos hechos se justifican fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que intervienen en el enlace interflavonoídico, y por lo tanto carecen de protones, de ahí que no se detecte ninguna señal para H-2' ni H-8''. Que el Compuesto III no posee ningún monómero de flavanona (como sí ocurre en el Compuesto IV), se deduce por la posición de la señal con los menores desplazamientos químicos del espectro de ^{1}H-RMN, observada a 5.75 ppm. El modelo de acoplamiento deducido del espectro estaría en cualquier caso, en consonancia con la conclusión definitiva de que el Compuesto III

sea de hecho la Filonotisflavona.

En resumen, podríamos deducir finalmente que el Compuesto III se correspondería con la **Filonotisflavona (2',8''-biluteolina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.3.

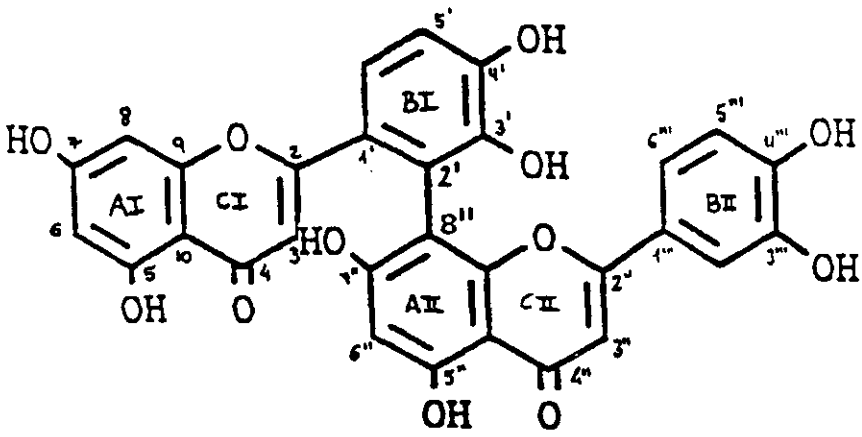


Fig. 6.3.: Filonotisflavona ($C_{30}H_{18}O_{12}$)
(2',8''-biluteolina)

Tabla 6.3a.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto III.

Protones	Compuesto III	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
3	6,06 s	6,06 s	6,69 s
6	5,75 d (2)	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	6,07 d (2)	6,07 d (2)	6,47 d (2)
5'	7,01 m	7,01 d (8;5)	6,92 d (9)
6'	7,24 d (8;5)	7,24 d (8;5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,62 s	6,62 s	-
6''	6,27 s	6,27 s	-
2'''	7,01 m	7,02 d (2)	-
5'''	6,74 d (8)	6,74 d (9)	-
6'''	7,01 m	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,73 s	-	-
OH-5''	13,01 s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

Como señalan Geiger & col. (1993a), en el espectro de ^{13}C-RMN de la 5',3'''-diOH-amentoflavona (Compuesto I) y de la 5',3'''-diOH-robustaflavona (Compuesto II), las señales para C-3 y C-3'' aparecen generalmente sobre 103 ppm, mientras que en el espectro de la filonotisflavona (Compuesto III) así como de la Dicranolomina (Compuesto V), sólo la resonancia debida a C-3'' aparece reflejada sobre 103 ppm. La resonancia de C-3 en cambio aparece cerca de 106 ppm, debido a la existencia de un enlace interflavonoídico muy cercano en el carbono C-2' (ver Fig. 6.3 y 6.5), que impide la coplanaridad entre los anillos CI y BI que sí existe en los Compuesto I y II. Este enlace en 2' interfiere además en la resonancia de los carbonos de ambos anillos CI y BI.

Tabla 6.3b.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto III.

Carbonos	Compuesto III	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	166,7	166,5	164,5
2''	163,8	163,8	-
3	106,5	106,4	103,3
3''	102,5	102,4	-
4	181,9	181,7	182,2
4''	181,3	181,1	-
5	161,2	161,1	162,1
5''	160,5	160,3	-
6	98,6	98,6	99,2
6''	98,3	98,3	-
7	163,8	163,7	164,7
7''	161,3	161,4	-
8	93,1	93,0	94,2
8''	**103,5**	105,5	-
9	157,3	157,2	157,9
9''	154,4	154,3	-
10	103,1	102,9	104,2
10''	103,3	103,2	-
1'	124,0	124,0	122,1
1'''	121,8	121,7	-
2'	**118,6**	118,7	113,8
2'''	113,6	113,5	-
3'	144,4	144,3	146,2
3'''	145,6	145,7	-
4'	148,5	148,3	150,1
4'''	149,6	149,4	-
5'	114,6	114,6	116,4
5'''	115,6	115,5	-
6'	120,7	120,5	119,3
6'''	118,8	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).

[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

6.1.1.4. 2,3 -DIHIDRO-FILONOTISFLAVONA

(Compuesto IV) (eriodictiol-(2',8'')-luteolina)

El Compuesto IV que fue identificado como la 2,3-dihidro-filonotisflavona, es un biflavonoide derivado de la filonotisflavona, y fue descrito por primera vez junto con ésta en *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989). Básicamente, la 2,3-dihidro-filonotisflavona, es uno de los flavonoides más afines a la familia *Bartramiaceae*, ya que con la excepción de *Aulacomnium androgynum* (Hahn, 1993), no se conoce ninguna otra especie fuera de dicha familia que sea capaz de sintetizar dicho biflavonoide. Se ha identificado también a parte de en *Philonotis fontana*, en *Anacolia webbii* (Seeger & col., 1993a, Seeger, 1992) así como en las cuatro especies del género *Bartramia* estudiadas en esta Tesis Doctoral (*B. halleriana*-BH 6, *B. ithyphylla*-BI 4, *B. pomiformis*-BP 5 y *B. stricta*-BS 8. En los ensayos por TLC que realizamos de las numerosas especies de *Bartramiaceae*, pudimos así mismo identificarlo en multitud de ocasiones, lo que es fiel reflejo de su presencia más o menos continuada en la mayoría de las especies pertenecientes a esta familia.

Las características cromatográficas en TLC del Compuesto IV, son semejantes a las de la luteolina en cuanto al color que se visualiza en la absorción al ultravioleta: púrpura oscuro que cambia a amarillo-anaranjado tras revelar con NA. Tras revelar precisamente con NA y tras un cierto tiempo el Compuesto IV muestra una fluorescencia roja clara. Una reacción similar ha sido observada anteriormente para la 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (eriodictiol) y su 7-metiléter (Wollenweber, 1981 y 1982; Geiger, 1990). Estos resultados nos indican que efectivamente el Compuesto IV debe poseer al menos una mitad flavonoídica correspondiente a **eriodictiol** (flavanona de la luteolina) causante de tal respuesta al NA.

Su espectro de absorción al ultravioleta es el resultado de la superposición de los espectros de la luteolina y la dihidroluteolina (eriodictiol) (Tabla 5.17), ya que el mismo comportamiento se observa en otros 2,3-dihidro-biflavonoides, tales como la 2,3-dihidro-dicranolomina y la 2',3'''-dihidro-5',3'''-robustaflavona aisladas e identificadas en *Dicranoloma robustum* (Markham & col., 1988). La naturaleza de la dihidroflavona o flavanona en los dihidro-biflavoides como es el caso del Compuesto IV que estamos tratando, es evidente a partir de sus datos de absorción al ultravioleta, y en particular la absorción a 288 nm que experimenta un característico efecto batocrómico hacia 322 nm en NaOMe (Mabry & col., 1970). Este cambio descrito junto al que ocurre en la banda II de 254 a 277 nm con NaOAc indica que tanto el grupo hidroxilo en posición 7- como él de la posición 7''- están insustituídos.

En general, la información que aporta el espectro de ultravioleta es muy reducida pero concreta, ya que nos viene a decir que el biflavonoide posee un monómero flavanónico, pero el resto de los datos aportados han de tomarse con suma precaución pues son el resultado de la suma de dos espectros: de un lado la flavanona nombrada y de otro, un flavonoide que posiblemente es la luteolina.

Los dos picos que se observan en la cromatografía obtenida por HPLC (Fig. 6.4) corresponden cada uno de ellos a los respectivos diastereoisómeros, lo que indica que tenemos ambos (Salm, 1992; Seeger, 1992; Geiger, 1990). En el caso de que en el cromatograma de HPLC

apareciera un único pico, sería indicativo de la existencia de uno sólo de los isómeros, en aquellos biflavonoides que en teoría puedan tener isomería.

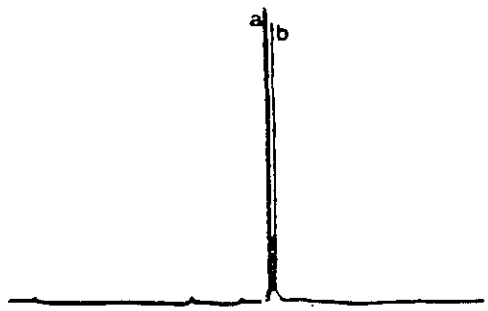


Fig. 6.4. Cromatograma de HPLC del Compuesto 4 puro.

El FAB-EM del Compuesto IV muestra un pico a 571 um $[M - H]^+$ que sugiere la estructura de una **dihidro-biluteolina** (Markham & col., 1988), es decir, de una biluteolina (569 mu) que ha ganado dos átomos de hidrógeno (569 um + 2 um = 571 um), y por lo tanto se trataría de un producto de dihidratación de la filonotisflavona (Geiger & Bokel, 1989).

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Voigt, 1993; Salm, 1992) (ver Tabla 6.4a al final de la discusión del compuesto). En dicho espectro se detectaron un total de 60 señales, lo cual podía dar lugar a que pensáramos que el Compuesto IV era un tetraflavonoide (de momento no descritos en musgos y excepcionalmente en angiospermas, por lo que descartamos tal posibilidad) o bien un biflavonoide que mostraba las señales correspondientes a sus dos isómeros. Esta última, parecía ser la posibilidad más cierta, ya que dichos datos concordaban con lo obtenido en el cromatograma de HPLC y con las afirmaciones antes realizadas. La presencia de una única señal a 181.8 ppm es típica del carbono situado en C-4'' de flavonas, cuya similitud respecto a la señal respectiva de la luteolina (C-4) indica que el Compuesto IV debía poseer al menos un monómero del biflavonoide que se correspondiera con una luteolina. A diferencia de lo que ocurría en los compuestos anteriores (I-III), no se detecta la señal correspondiente a C-4 con la misma resonancia que C-4'', de ahí que podamos interpretar que uno de los dos monómeros si es una flavona (el que da la señal para C-4'') pero el otro no (señal para C-4 a 196.3 ppm). Como ya habíamos visto con anterioridad en la discusión de la TLC, este segundo monómero debía ser una flavanona y concretamente el eriodictiol. En resumen, podemos llegar a la conclusión de que el Compuesto IV sería un biflavonoide del tipo flavona-flavanona, y más concretamente un dímero de luteolina-eriodictiol.

En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides, las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 a campo menor (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar las señales correspondientes a los carbonos C-6 y C-6'' en 95.6 y 98.4 ppm respectivamente, y a niveles de ppm más bajos la correspondiente a C-8 en 94.7 ppm. A diferencia del Compuesto II y al igual que ocurría en los Compuestos I y III, sí se detectó dentro del intervalo mencionado, la señal correspondiente a C-6'', lo que indica que en el caso del Compuesto IV, dicho

carbono C-6'' no está implicado en el enlace interflavonoídico. Sin embargo, **la ausencia de una señal en el rango 90 a 96 ppm indica por contra que C-8'' está sustituído**, ya que es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas y por lo tanto su señal se detectó a 103.7 ppm y no dentro del intervalo mencionado. La señal a 102.5 ppm fue asignada a C-3'' por comparación directa con el espectro de la luteolina y del Compuesto III. Esta señal a C-3'' corresponde al monómero flavónico (luteolina). En las biflavanonas, que únicamente poseen 13 señales en su espectro por superimposición de las señales de ambos monómeros, las señales para C-2/2'' y C-3/3'' absorben a 81.3-83.1 y 49.4-50.8 ppm respectivamente en biflavanonas con geometría cis-trans (Agrawal, 1989). En nuestro caso, sí se detecta la señal para C-3 correspondiente al monómero de eriodictiol a 42.4 ppm, y la señal para C-2 a 77.1 ppm, algo desplazada del intervalo 81.3-83.1 ppm referido pues no se trata de una biflavanona sino de una flavona-flavanona. De hecho, la señal para C-2'' fue asignada a 163.2 ppm mediante comparación con la señal de la luteolina, lo que confirma de nuevo que el Compuesto IV posee un monómero flavónico. El resto de las señales, que no se ven tan influenciadas como las anteriores por la naturaleza flavónico/flavanónica del compuesto, fueron asignadas sin problemas respecto de los compuestos anteriores así como de la luteolina, y no varían apenas su resonancia en ambos monómeros. La señal a 118.7 ppm corresponde al **carbono C-2'**, cuya señal se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico**, ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 113.8 ppm (Geiger & Bokel, 1989). De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podríamos deducir que el Compuesto IV sería un **dímero flavanona-flavona** con un enlace interflavonoído entre el carbono C-2' de la flavanona y C-8'' de la flavona, aunque esta situación es justamente la contraria en el caso del otro diastereoisómero. Estos datos se ajustan perfectamente a un biflavonoide conocido como **2,3-dihidro-filonostisflavona**, descrito primeramente en *Philonotis fontana*, y que ha resultado ser un derivado de la filonotisflavona mediante la adquisión de dos átomos de hidrógeno, como muestra claramente su espectro de masas.

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.4b al final de la discusión del compuesto), podemos deducir que la señal que aparece sobre 13 ppm, corresponde a uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5, concretamente OH-5 para la señal a 12.05 ppm en uno de los isómeros y 11.94 ppm en el otro, que realmente equivaldría a la señal OH-5''. Como ocurría en los compuestos I y II, y por regla general en los biflavonoides de musgos (Agrawal, 1989; Geiger & col., 1993a), estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos.

Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.62/6.66 ppm para el protón en C-3'' que aparece como un singlete, 6.35/6.34 ppm para C-6'' también como singlete, 5.78/5.82 ppm para C-6 que aparece como un doblete (J = 2 Hz) y 5.43/5.76 ppm para H-8. Tanto la señal para H-6 como H-8 se encuentran algo desplazadas por el efecto de acoplamiento que suponen los protones en C-3 del monómero de eriodictiol. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C.

Las flavanonas 3',4'-oxigenadas como el eriodictiol, muestran un patrón espectral complejo, generalmente en forma de un multiplete para H-2', H-5' y H-6' entre 6.7 y 7.1 ppm (Markham, 1982). Dichos protones, están situados en posiciones orto- o para- respecto del oxígeno sustituído, lo cual influye notablemente, pues da lugar a que dichos protones tengan un desplazamiento químico muy similar o idéntico, no así el protón que se sitúa en posición meta- (Markham, 1982; Seeger, 1992). De acuerdo a lo anterior, la señal para los protones en H-6' y H-6''' aparecía a 6.91-7.01 ppm, y al igual que la señal para H-5' se mostraba como un multiplete no analizable, de ahí dicha asignación. Respecto a H-6''', en el componente minoritario se detectaba así mismo una señal a 6.92 ppm como un doble doblete, propia del monómero de luteolina del biflavonoide. El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992) por lo que la señal para los protones H-5''' fue asignada a 6.75/6.74 ppm (J= 8 Hz). No se detectaron las señales correspondientes a los protones de C-2' y C-8'', lo que indica la inexistencia de protones tanto en C-2' como en C-8''. Estos hechos se justifican fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que intervienen en el enlace interflavonoídico, y por lo tanto carecen de protones, de ahí que no se detecte ninguna señal para H-2' ni H-8''. El espectro de ^{1}H-RMN nos confirma además que el Compuesto IV está constituído por una mezcla de 2 diastereoisómeros (2,3- y 2'',3''- dihidro-filonotisflavona) existiendo atropoisomería, ya que existe un centro de quiralidad en el carbono C-2, cuyo protón H-2 se detecta a 5.01/5.09 ppm como un doble doblete (ya que se acopla a los dos protones H-3a y H-3b). Por regla general, la señal para H-2 de flavanonas aparece como un doble doblete cerca de 5.2 ppm, siendo la señal a 5.4 ppm típica del eriodictiol (Markham, 1982), debido al acoplamiento del protón en C-2 con los dos protones de C-3 de la flavanona, cada uno de los cuales se acopla con los demás en adicción a la interación spin-spin que ocurre con H-2. Dichos protones H-3a y H-3b se detectan respectivamente a 3.27/3.05 y 2.59/2.19 ppm como sendos dobles dobletes (ya que tienen un doble acoplamiento: entre ellos y con H-2). Esto nos viene a demostrar de nuevo la naturaleza flavanónica de uno de los dos monómeros del Compuesto IV. En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto IV se correspondería con la **2,3-dihidro-filonotisflavona** (**2,3-dihidro-2',8''-biluteolina** o **eriodictiol-(2',8'')-luteolina**), cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.5.

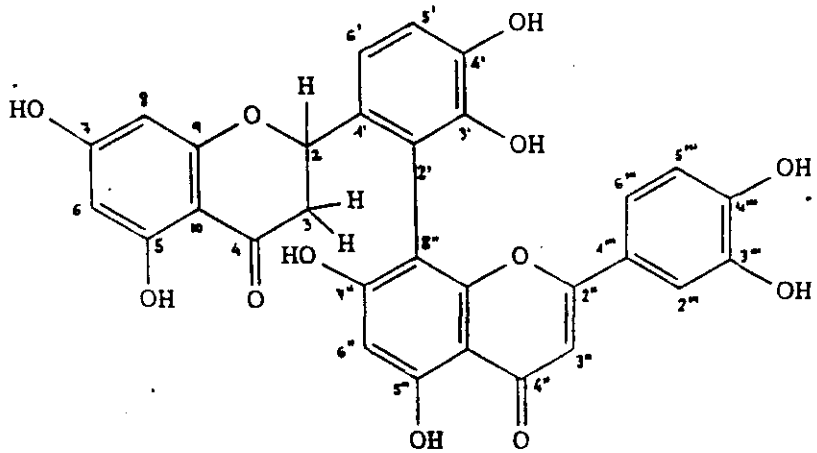


Fig. 6.5.: 2,3-dihidro-filonotisflavona ($C_{30}H_{20}O_{12}$)
(2,3-dihidro-2',8''-biluteolina)

Tabla 6.4a.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto IV.

Carb.	Compuesto IV	Luteolina[1]	Eriodictiol[1]	2,3-dihidro-filonotisflavona[2]
2	77,1* - 76,8**	-	78,3	77,1* -76,8**
2''	163,2 - 163,2	164,5	-	163,6 - 163,6
3	42,4 - 42,0	-	42,2	44,5 - 42,2
3''	102,5 - 102,5	103,3	-	102,5 - 102,7
4	196,3 - 196,3	-	196,2	196,0 - 196,0
4''	181,8 - 181,8	182,2	-	182,0 - 182,0
5	163,2 - 163,9	-	163,4	163,6 - 164,1
5''	160,4 - 160,4	162,1	-	160,5 -160,5
6	95,6 - 95,6	-	95,7	95,6 - 95,6
6''	98,4 - 98,4	99,2	-	98,5 - 98,5
7	166,7 - 166,5	-	166,6	166,5 - 166,4
7''	162,1 - 162,1	164,7	-	161,7- 161,7
8	94,7 - 94,5	-	94,8	94,7 - 94,6
8''	**103,7 -103,7**	**94,2**	-	103,8 - 103,8
9	163,0 - 163,0	-	162,8	163,1 - 163,1
9''	154,8 - 154,7	157,9	-	154,9 - 154,8
10	101,4 - 101,4	-	101,7	101,5 - 101,5
10''	102,4 - 102,4	104,2	-	102,1 - 102,1
1'	129,0 - 128,6	-	129,4	129,4 - 129,0
1'''	121,8 - 121,6	122,1	-	122,0 - 121,7
2'	**118,7 - 118,7**	-	**117,8**	118,4 - 118,8
2'''	113,5 - 113,8	119,3	-	113,6 - 113,9
3'	143,6 - 143,5	-	115,3	143,6 - 143,5
3'''	145,5 - 145,5	116,4	-	145,6 - 145,5
4'	145,2 - 145,4	-	145,6	145,2 - 145,4
4'''	149,5 - 149,5	150,1	-	149,6 - 149,5
5'	114,7 - 114,7	-	145,1	114,8 - 114,8
5'''	115,4 -115,4	146,2	-	115,6 - 115,5
6'	117,0 - 117,0	-	114,2	117,1 - 117,1
6'''	118,7 - 119,3	113,8	-	118,6 - 119,3

[1]Luteolina y Eriodictiol según Harborne & Mabry (1982).
[2]2,3-dihidro-filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
* Componente principal
** Componente secundario

Tabla 6.4b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto IV.

Protones	Compuesto IV		2,3-dihidro-filonotisflavona[1]	
	*	**	*	**
2	5,01 dd (12;2)	5,09 dd (12;2)	5,08 dd (13;3)	5,00 dd (13,3)
3a ***	3,27 dd (17;14)	3,05 dd (17;14)	2,96 dd (17;13)	3,18 dd (17;13)
3b ***	2,59 dd (18;-) ♣	2,19 dd (16;-) ♣	2,22 dd (17;3)	2,60 dd (17;3)
6	5,78 d (2)	5,82 d (2)	5,80 d (2)	5,76 d (2)
8	5,43 d (2)	5,76 d (2)	5,73 d (2)	5,42 d (2)
5'	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
6'	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
3''	6,62 s	6,66 s	6,54 s	6,51 s
6''	6,35 s	6,34 s	6,33 s	6,33 s
2'''	6,91-7,10 m ♠	6,91-7,10 m ♠	6,94-7,08 m ♠	6,94-7,08 m ♠
5'''	6,75 d (8)	6,74 d (8)	6,72 d (8,5)	6,73 d (8,5)
6'''	6,91-7,10 m ♠	6,92 dd (9,-) ♣	6,89 dd (8,5;2)	6,94-7,08 m ♠
OH-5	12,05 s	11,94 s	-	-
OH-5''	-	-	-	-

[1]2,3-dihidro-filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
*, ** Componente principal (*) y Componente secundario (**). La relación entre ambos diastereómeros es de 1:1,2, al contrario que en Geiger & Bokel (1989).
*** Señales correspondientes a los 2 hidrógenos situados en posición 3 de la mitad flavanónica del biflavonoide.
♣ Señales no resueltas.
♠ Multiplete no analizable.

6.1.1.5. DICRANOLOMINA

(Compuesto V) (2',6''-biluteolina)

El Compuesto V que identificamos como la Dicranolomina fue descrito por primera vez en *Dicranoloma robustum* (Markham & col., 1988) y nombrado en honor a dicha especie. A partir de ese momento ha sido también identificado en algunas especies de la familia *Bartramiaceae*, como es el caso de tres de las especies ibéricas del género *Bartramia* que han sido estudiadas en esta Tesis Doctoral: *B. ithyphylla*-BI 2, *B. pomiformis*-BP 6 y *B. stricta*-BS 2. Exceptuando las 4 especies anteriores, también recogidas en la bibliografía (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b), se conoce así mismo en *Anacolia webbii* (Seeger, 1992; Seeger & col., 1993a) y *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989) de *Bartramiaceae*, así como en *Aulacomnium palustre* (Hahn, 1993). Al igual que el Compuesto IV (2,3-dihidro-filonotisflavona), la dicranolomina parece ser uno de los biflavonoides más afines a las familias *Bartramiaceae*, *Dicranaceae* y *Aulacomniaceae*.

Exhibe unas características cromatográficas en TLC muy semejantes a las de la luteolina y

a las de los tres primeros compuestos referidos (5',3'''-diOH-amentoflavona, 5',3'''-diOH-robustaflavona y filonotisflavona), ya que al ser observado a la luz ultravioleta muestra un color púrpura que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA, aunque por lo general es algo superior al de los Compuestos I y II. Por regla general, el Compuesto V aparecía a menudo solapado como una única mancha junto al Compuesto III en las TLCs desarrolladas en placas de poliamida-6, mientras que si se utilizaban placas de celulosa su movilidad era muy similar a la de los compuestos I y II. Todo ello nos llevó de nuevo a pensar que debía tratarse de una **biflavona** (López-Sáez, 1992). Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto V debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de una **biluteolina**.

El espectro de absorción ultravioleta de la dicranolomina es aproximadamente el de la luteolina (Tabla 5.21.) (Markham & col., 1988), ya que este biflavonoide es una biluteolina, y por lo tanto el espectro obtenido es en sí la suma de los dos espectros correspondientes a ambos monómeros de luteolina, que lógicamente se solaparían como uno solo. Comparando el espectro de ultravioleta del Compuesto V con el de la dicranolomina se observa una gran concordancia que nos hace sospechar que ambos sean el mismo. Analizando detenidamente los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto V vemos que de manera general, como en el caso de los compuestos anteriores, se corresponde con el típico espectro de un biflavonoide (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992) pues absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I. Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +55 (399 por 344 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I (+51 nm) como en la II (+22 nm), indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). La adición de H_3BO_3 al NaOAc no supone ningun cambio significativo en ninguna de las dos bandas del espectro, pues ambas permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B, así como la inexistencia de un grupo 3-OH, es decir, que se trata de una flavona y no de un flavonol (Markham & col., 1988). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +20 nm (274/254) en la banda II y de +78 nm (422-345) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH, como ya ocurría en los compuestos I, II y III. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto V debía ser muy semejante a los compuestos I, II y III, es decir, una flavona (o dímero de ella) con un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es nuevamente la luteolina, y dado que hemos deducido con anterioridad que se trata de un biflavonoide, debía tratarse de una biluteolina.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto V muestra un ión $[M-H]^+$ de 569 um, que

confirma su estructura de biluteolina ($C_{30}H_{18}O_{12}$), ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta, y que concuerda con resultados ya publicados respecto de la dicranolomina (Geiger & Bokel, 1989). Dicho espectro de masas se corresponde con el de una **octahidroxibiflavona (biluteolina)** con unión interflavonoídica de tipo C-C entre los anillos BI y AII de ambos monómeros (Seeger, 1988). Lógicamente, el Compuesto V que debía ser una biluteolina al igual que los compuestos I, II y III, debería tener un enlace interflavonoídico en el que interviniese al menos un carbono distinto respecto de los que lo hacen en el Compuesto I (5',8''), el Compuesto II (5',6'') o el Compuesto III (2',8'').

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Markham & col., 1988; Seeger, 1992; Voigt, 1993) (ver Tabla 6.5a al final de la discusión del compuesto).

La presencia de dos señales a 181.6 y 181.2 ppm son debidas a 2 átomos de carbono correspondientes a dos flavonas, concretamente a C-4 y C-4'', cuya similitud de señales entre ellos, y respecto a la señal correspondiente de la luteolina (C-4) indica que el Compuesto V debía ser un dímero de luteolina (biluteolina). En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 a campo menor (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar las señales correspondientes al carbono C-6 en 98.6 ppm, y a niveles de ppm más bajos las correspondientes a C-8 y C-8'' en 93.1 y 93.3 ppm respectivamente. A diferencia del Compuesto III, sí se detectó dentro del intervalo mencionado, la señal correspondiente a C-8'' y C-5', lo que indica que en el caso del Compuesto V, dichos carbonos no están implicados en el enlace interflavonoídico. Sin embargo, **la ausencia de una cuarta señal en el rango 90 a 100 ppm indica por contra que C-6'' está sustituído**, ya que es el carbono que interviene en el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas, y su señal difiere notablemente de la respectiva de la luteolina. La intensa señal a 107.9 ppm, que no aparece dividida, es asignada a C-6''. Las dos señales a 106.2 y 103.3 ppm son asignadas a C-3 y C-3''. Entre las tres señales más intensas restantes, las dos menos intensas a 123.7 y 120.2 son asignadas a C-1'y C-1'''. La señal a 119.7 ppm corresponde al **carbono C-2'**, y se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico**, ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 113.8 ppm (Geiger & Bokel, 1989). El resto de señales del espectro (C-2, C-2'', C-5, C-5'', C-7, C-7'', C-9, C-9'', C-10, C-10'', C-2''', C-3', C-3''', C-4', C-4''', C-5', C-5''', C-6 y C-6''') se identificaron y asignaron de acuerdo a la literatura (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Markham & col., 1988), respecto a la dicranolomina y su 2,3-dihidro-derivado, la 2,3-dihidro-dicranolomina.

Analizando finalmente el espectro general de ^{13}C-RMN del Compuesto V, se observa con claridad que todas las señales pueden asignarse sin problema a las correspondientes de la luteolina, teniendo en cuenta por supuesto que se repiten de 2 en 2 al ser una biluteolina. Las dos únicas señales en que no puede llevarse a cabo tal asignación directa son respectivamente 2' y 6'', ya que corresponden a los carbonos entre los que se lleva a cabo el enlace interflavonoídico entre ambos monómeros de luteolina. De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto V sería la **2',6''-biluteolina**, cuya denominación actual es **Dicranolomina**, en honor

a la especie en que se identificó por primera vez (*Dicranoloma robustum*).

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.5b al final de la discusión del compuesto), observamos que se detectan 3 señales correspondientes a singletes entre 6.04 y 6.68 ppm, 6 dobletes entre 5.96 y 7.42 ppm y un doble doblete a 7.43 ppm. Respecto a las 2 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden ambas a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros de luteolina, concretamente OH-5 para la señal a 12.78 ppm y OH-5'' para 13.13 ppm. Estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos. Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.04 y 6.68 ppm para el protón en C-3 y C-3'' respectivamente que aparecen como singletes al igual que en la luteolina, 5.96d ppm para H-6 y 6.08 y 6.54d ppm para H-8 y H-8'', cuya asignación es sencilla simplemente comparando con los señales propias de la luteolina. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para los en protones H-6' aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-6' y H-6''' para las señales a 7.18d y 7.43dd ppm. El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992) por lo que H-5' y H-5''' fueron asignados para las señales a 6.94d y 6.89d ppm respectivamente. No se detectaron las señales correspondientes a los protones de C-2' y C-6'' de la luteolina, lo que indica la inexistencia de protones tanto en C-2' como en C-6''. Estos hechos se justifican fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que llevan a cabo el enlace interflavonoídico, y por lo tanto carecen de protones, de ahí que no se detecte ninguna señal para H-2' ni H-6''.

En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto V se correspondería con la **Dicranolomina (2',6''-biluteolina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.6.

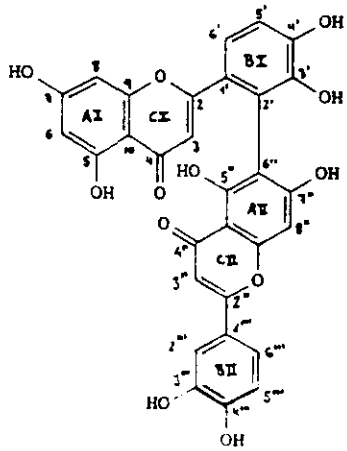


Fig. 6.6.: Dicranolomina ($C_{30}H_{18}O_{12}$)
(2',6''-biluteolina)

Tabla 6.5a: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto V.

Carbonos	Compuesto V	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	166,3	166,5	164,5
2''	163,9	163,8	-
3	106,2	106,4	103,3
3''	103,3	102,4	-
4	181,6	181,7	182,2
4''	181,2	181,1	-
5	161,2	161,1	162,1
5''	158,7	160,3	-
6	98,6	98,6	99,2
6''	**107,9**	98,3	-
7	163,6	163,7	164,7
7''	161,8	161,4	-
8	93,1	93,0	94,2
8''	**93,3**	103,5	-
9	157,3	157,2	157,9
9''	156,2	154,3	-
10	102,8	102,9	104,2
10''	103,3	103,2	-
1'	123,7	124,0	122,1
1'''	120,2	121,7	-
2'	**119,7**	118,7	113,8
2'''	113,3	113,5	-
3'	144,2	144,3	146,2
3'''	145,7	145,7	-
4'	148,2	148,3	150,1
4'''	149,6	149,4	-
5'	114,3	114,6	116,4
5'''	116,0	115,5	-
6'	121,5	120,5	119,3
6'''	118,9	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).

Tabla 6.5b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto V.

Protones	Compuesto V	Dicranolomima[1]	Luteolina[2]
3	6,04s	6,03 s	6,69 s
6	5,96 d (2)	5,96 d (2)	6,22 d (2)
8	6,08 d (2)	6,08 d (2)	6,47 d (2)
5'	6,94 d (8,5)	6,93 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	7,18 d (8,5)	7,18 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,68 s	6,69 s	-
8''	6,54 s	6,52 s	-
2'''	7,42 d (2)	7,41 d (2)	-
5'''	6,89 d (8)	6,89 d (8)	-
6'''	7,43 dd (9;2)	7,43 dd (8;2,5)	-
OH-5	12,78 s	-	-
OH-5''	13,13 s	-	-

[1]Dicranolomima según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

El enlace interflavonoídico en posición 2',6''- en las biluteolinas como la Dicranolomina, crea una doble orto-sustitución respecto a dicho enlace en ambas mitades bifenílicas (ver Fig. 6.6.), que implica tanto al anillo B de una flavona como al anillo A de la otra. Cabe la posibilidad por ello de que el enlace interflavonoídico tenga rotación libre, pudíendose dar en dicho caso que en ciertas circunstancias podamos distinguir en el espectro de ^{13}C-RMN, las señales correspondientes a ambos rotámeros. Aunque tales hechos son difíciles de apreciar, son mucho más comunes cuando tratamos con 2,3-dihidro-2',6''-biluteolinas (Markham & col., 1988).

6.1.1.6. BARTRAMIAFLAVONA

(Compuesto VI) (2-hidroxi-2,3-dihidro-2',8''-8,2'''-biluteolina)

El Compuesto VI que identificamos como la Bartramiaflavona (BP-1, BH-1), fue descrito por primera vez en *Bartramia pomiformis* (Seeger & col., 1991) y posteriormente en la misma especie (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992) así como en *Bartramia halleriana* (Salm, 1992).

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy peculiares, ya que **no cambia de color** a luz ultravioleta tras aplicar los diversos reactivos específicos empleados, incluyendo el NA, de ahí que sea fácilmente distinguible en las TLCs respectivas, del resto de biflavonoides hasta ahora identificados; al igual que también lo es por su relativa **alta movilidad cromatográfica** (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Salm, 1992). En todo momento, el Compuesto VI se observa a la luz ultravioleta como una mancha púrpura oscura, que no cambia de color ni con vapores de amoniaco, NA o reactivo de Benedict, lo que viene a significar que su

estructura ha de ser sensiblemente diferente a la de otras biluteolinas tales como los Compuestos I-V. Su alto Rf de hasta 70 en acético 15% y 76 en acético 40%, complementado con un Rf también muy alto de 67 en TBA, confirman esas diferencias que deben existir respecto a las biluteolinas típicas ya nombradas. Es difícil, en principio, explicar tal movilidad cromatográfica, ya que por un lado el Compuesto VI sería un compuesto bastante polar al presentar un desarrollo alto en acético 15% (todo lo contrario que las agliconas monoflavónicas o biflavónicas típicas) y, de otro, sería un compuesto relativamente apolar en base a su alto Rf en TBA semejante al de las biluteolinas (Markham, 1982). Incluso en los sistemas cromatográficos desarrollados en placas de poliamida, sus Rfs son así mismo altos en comparación con otras biluteolinas de musgos, ya que tanto en la dimensión del solvente Stahl (Rf de 50) como del AWE (Rf 55) su movilidad es muy alta. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de dichos reactivos específicos vinieron sin embargo a confirmar que el Compuesto VI debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de un compuesto relacionado con las biluteolinas (Markham, 1982; Seeger, 1992), aunque el cambio inexistente de color debía producirse por un impedimento de tipo estructural. Los Rfs del Compuesto VI en la cromatografía bidimensional alejaban, en principio, cualquier posibilidad de que éste correspondiera a una biflavona, sobre todo de las conocidas en musgos. Según Mabry & col. (1970) y Markham (1982), los biflavonoides pueden poseer un Rf alto en TBA pero apenas se desarrollan en la dirección del acético 15%. En nuestro caso, los Rfs eran muy altos en ambos sentidos de la 2D-TLC, lo que cuadraba, de acuerdo a los mismos autores, con una isoflavona o un flavonol ambos glicosilados. **La particular estructura tridimensional y cíclica de esta molécula podría explicar ese alto Rf**: el macrociclo posee un alto Rf en TBA por ser un biflavonoide, y por ello relativamente apolar, pero se desarrollaba por igual con alto Rf en 15% AcOH, no por ser polar, sino por la nula afinidad del macrociclo por la celulosa (Salm, 1992). Los grupos hidroxilo del macrociclo, que dan polaridad a la molécula, quedan escondidos en su interior, disminuyendo aún más si cabe la afinidad por el disolvente. Así mismo, los grupos hidroxilos en posición 3' y 3''' de los respectivos anillos BI y BII forman puentes de hidrógeno con los hidroxilos correspondientes en posiciones 7' y 7 de los anillos AII y AI respectivos (ver Fig. 6.7.), disminuyendo así, tanto la afinidad del macrociclo por el disolvente como por la celulosa, de ahí que su Rf en un disolvente polar como el acético 15% sea bastante alto. Salm (1992), en base a la estructura macrocíclica del Compuesto VI, explicó esos Rfs tan altos atendiendo a la casi nula afinidad de dicho compuesto por los distintos solventes empleados, lo que implicaría que se desarrollara prácticamente con el frente, aunque lógicamente quedara mínimamente retenido.

Analizando los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto VI vemos que de manera general, su espectro se corresponde con el típico espectro de un biflavonoide o bien de una isoflavona (Markham, 1982; Harborne, 1984; López-Sáez, 1992; Salm, 1992) pues absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I. Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +28 nm (392 por 364 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I (+24 nm) como en la II (+10 nm), indicativo de la

existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH) tanto de flavonas como de isoflavonas. La adición de H_3BO_3 al NaOAc supone un cambio significativo en de las dos bandas del espectro, pues ambas sufren un efecto ipsocrómico de -48 nm (340/388) y -15 nm (258/273) respectivamente. Estos hechos indican la inexistencia de grupos o-diOH tanto en el anillo A como el B de flavona e isoflavonas, ya que en caso contrario se esperaría un efecto batocrómico al menos en la banda I (Markham & col., 1982; Mabry & col., 1970), como ocurre en la luteolina y sus derivados (biluteolinas). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, no supone ninguna alteración en las dos bandas del espectro, que igualmente permanecen inalterables al añadir ClH. Estos datos indican de nuevo la inexistencia de o-diOH en los anillos A y B así como de 5-OH, tanto de flavonas como de isoflavonas. Resumiendo, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto VI no debía poseer o-diOH ni en el anillo A ni en el B, así como carecer de un hidroxilo libre en posición C-5 (5-OH), y sí existir 4'-OH y 7-OH. Estos resultados no coinciden prácticamente en nada con los expuestos para los compuestos anteriormente identificados, y ni siquiera con los resultados de la TLC. Según ellos, el Compuesto VI tendría un espectro de isoflavona o biflavonoide, pero no podría ser un luteolina y ni siquiera una apigenina, sino un derivado de la 7,4'-dihidroxi-flavona/isoflavona. Ingham (1983) cita que el 90% de las isoflavonas conocidas son producidas por especies de la subfamilia *Papilionoideae* de las Fabáceas, lo que nos da una idea de lo particular de la existencia de este tipo de compuestos en el Reino Vegetal. Las primeras isoflavonas descritas en un briófito lo fueron en el musgo *Bryum capillare* por Anhut & col. (1984), correspondiendo a los tipos orobol y pratenseina. Mües & Zinsmeister (1988) cifran la frecuencia de isoflavonas en musgos en un 6-14% respecto del total de flavonoides identificados. Ante lo anteriormente expuesto y dado que nuestros resultados no se acoplaban a la bibliografía existente (Wolfbeis & col., 1984; etc), aceptamos con mayor prioridad que el Compuesto VI fuese un **biflavonoide**. Estos son cada vez más comunes en musgos, y la mayoría de trabajos que se van publicando ofrecen generalmente algún biflavonoide como nuevo compuesto identificado en la especie de musgo estudiada (Geiger, 1990). Cuando iniciamos el proceso de aislamiento e identificación del Compuesto VI, que finalizó con la lectura de la Memoria de Licenciatura (López-Sáez, 1992), en la familia *Bartramiaceae* sólo se conocía la existencia de biflavonoides en *Philonotis fontana* (Geiger & Bokel, 1989), pero los resultados procedentes del Compuesto VI no se correspondían con ninguno de los biflavonoides identificados en dicha especie ni en ninguna otra de musgos. El posterior trabajo de Seeger & col. (1991) vino a confirmar nuestras sospechas de que el Compuesto VI se trataba de un biflavonoide y el porqué de la no coincidencia de nuestros datos con los existentes. Todos nuestros resultados coincidían con los aportados por dichos autores para la **Bartramiaflavona**, un **biflavonoide macrocíclico**, que fue la primera estructura de este tipo que se conoció, correspondiente a un biflavonoide, después de las citas de Hauteville & col. (1973), en *Populus nigra* y Ogiso & col. (1972), en *Leucothoe keiskei*, referentes a estructuras monoflavonoídicas también cíclicas. En base a la distinta naturaleza que tienen las dos unidades monoméricas del Compuesto VI, flavona y flavonona, así como a la estructura macrocíclica de la molécula, se pudieron explicar esos altos Rfs (nula afinidad tanto por el solvente como por la fase estacionaria), su respuesta a los reactivos específicos (el macrociclo impide una perfecta exposición de los hidroxilos libres impidiento la reacción de color con dichos reactivos), así como el espectro de ultravioleta resultante (los biflavonoides no parecer seguir un modelo espectral fijo, como

le ocurre generalmente al resto de tipos flavonoídicos, y más cuando están formados por dos monómeros de naturaleza distinta). En el caso del Compuesto VI, su espectro de ultravioleta corresponde a la suma del espectro de una flavona (luteolina) con el de una flavanona, por lo que la información que de él se puede obtener es prácticamente escasa y a menudo puede conducir a confusión.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto VI muestra un ión $[M -H]^+$ de 585 um y de 587 um $[M + H]^+$, que confirma su estructura de biflavonoide ($C_{30}H_{18}O_{13}$), ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta, y que concuerda con los resultados ya publicados respecto de la bartramiaflavona (Seeger & col., 1991). Comparando este espectro de masas con el de una biluteolina como la filonotisflavona (569 mu), el Compuesto VI parece tener al menos un átomo de oxígeno y otro de hidrógeno más que la filonotisflavona (569 + 16 + 1= 586 M^+). Estos datos se explicarían, mediante la adición de una molécula de agua a la filonotisflavona y la existencia de un segundo enlace interflavanoídico..

Los resultados del tratamiento con ácido clorhídrico fueron clarificadores: a las dos horas de tratamiento con ácido ya se había producido la reacción pues se observan al menos dos manchas de distinto Rf, tanto en el sistema de ácido acético como en el TBA. Una de ellas coincide en el Rf de ambos sistemas aproximadamente con el compuesto problema VI. Esto es indicativo de la existencia de una hidrólisis parcial caso de un glicósido a las 2 horas, o de otro tipo de reacción en caso de ser aglicona; en las que tendríamos, por una parte, algunas moléculas del Compuesto VI totalmente hidrolizadas/reaccionadas y otras sin hidrolizar/reaccionar, lo que explicaría la existencia de esas dos manchas, y la correspondencia del Rf de una de ellas con él del Compuesto VI sin hidrolizar/reaccionar. Continuado el tratamiento con clorhídrico hasta las 4 horas, ya sólo aparece una mancha cuyo Rf es distinto al del Compuesto VI sin hidrolizar/reaccionar, por lo que se puede suponer que a las 4 horas de tratamiento con ácido clorhídrico se ha completado la hidrólisis/reacción, estando todas las moléculas del Compuesto VI hidrolizadas/reaccionadas. De acuerdo a estos resultados y, a lo expuesto por Markham (1982), si a las 2 horas la hidrólisis es parcial pero al menos se ha producido, el Compuesto VI no puede ser ni un flavonoide O-glicósido (en éste caso la hidrólisis sería total), ni un flavonoide C-glicósido (no habría hidrólisis). Cabe pues la posibilidad de que se trate de un flavonoide cuyo azúcar sea un glucurónido, pero esta posibilidad es muy remota, y menos de acuerdo a los datos que al respecto se tienen sobre flavonoides en musgos: sólo presentan como azúcar de glicosilación el glucurónico, *Rhizomnium magnifolium* y *R. pseudopunctatum* (Mües & col., 1986). Por ello, dichos resultados parecen concordar más con lo deducido respecto al Compuesto VI en los apartados anteriores y que efectivamente se trate de bartramiaflavona. Este, el Compuesto VI o bartramiaflavona, posee una estructura molecular bastante compleja, ya que se trata de un macrociclo no glicosilado, en el que la hidrólisis difícilmente se produciría, y sí, en cambio una deshidratación, que al realizarse con clorhídrico sería relativamente lenta. Sólo tras un largo tratamiento con el ácido podría producirse la deshidratación y formarse, por tanto, la anhidrobartramiaflavona (Compuesto VII). El anillo bencénico, caracterizado por el fenómeno de la mesomería, es una estructura particularmente estable. Es por ello poco problable que el anillo se rompa en una reacción química o biológica, lo que explica el resultado del tratamiento con clorhídrico realizado sobre el Compuesto VI.

Un primer repaso al espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto VI muestra como la gran mayoría de las señales están duplicadas, algo que también ocurre en el espectro de ^{1}H-RMN. Dichos datos vienen a confirmar la existencia en el Compuesto VI de **dos isómeros diferentes** que se encuentran en equilibrio. En la naturaleza se conocen casos de ciertas flavonas que en presencia de agua dan lugar a dos isómeros (2-hidroxi-flavanonas y diaroilmetanos) que son en realidad **ciclo-oxo tautómeros** (Hauteville & col., 1973; Traub & Geiger, 1975). Los cambios químicos observados así como las multiplicidades existentes en ambos espectros de RMN nos hacen sospechar, en comparación con la literatura antes referida, que el Compuesto VI sea una mezcla equimolecular de dos **ciclo-oxo tautómeros**. En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Salm, 1992) (ver Tabla 6.6b al final de la discusión del compuesto). Las señales principales en las que queremos hacer hincapié son las siguientes:

- En la región baja del espectro (valores de ppm elevados), aparece una señal a 200 ppm correspondiente al grupo carbonilo de C-2 en la forma oxo (1b), que es precisamente el punto en el que la molécula se abre respecto a la forma ciclo (1a). (Seeger & col., 1991).
- Dos señales sobre 195 ppm atribuídas a los carbonilos en C-4 de las mitades diaroilmetano y 2-hidroxi-flavanona respectivamente tanto de la forma ciclo (1a) como de la oxo (1b).
- Dos señales para C-4'' a 182.0 y 182.3 ppm en cada uno de los tautómeros, son típicas de una flavona, lo que indica que el Compuesto VI está compuesto al menos por un monómero de flavona, concretamente de luteolina.
- En la región alta del espectro, valores de ppm bajos, aparecen dos señales correspondientes a carbonos secundarios (C-3), tanto de la forma ciclo como la oxo, que fueron asignadas respectivamente a 48.7 (forma ciclo) y 55.3 (forma oxo).
- Las señales para C-2', C-8'', C-2''' y C-8 son sensiblemente diferentes respecto de las correspondientes de la luteolina, lo que indica que los 4 carbonos deben estar implicados en algún tipo de enlace interflavonoídico. Comparando ahora el espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto VI con el de la filonotisflavona, observamos en cambio que las resonancias de C-2' y C-8'' son prácticamente idénticas a las de los mismos carbonos en la filonotisflavona mientras que no ocurre lo mismo con C-2''' y C-8. Esto viene a decirnos que el Compuesto VI tiene al menos un enlace entre los dos monómeros del biflavonoide idéntico al de la filonotisflavona, concretamente el enlace entre C-2' y C-8'', mientras que C-2''' y C-8 son los otros dos carbonos que intervienen en el segundo enlace interflavonoídico que en cambio está ausente en la filonotisflavona, de ahí esas diferencias en el espectro.
- El resto de señales (C-2'', C-4'', C-5, C-5'', C-6, C-6'', C-7, C-7'', C-9, C-9'', C-10, C-10'', C-1', C-1''', C-3', C-3''', C-4', C-4''', C-5', C-5''', C-6', C-6''') se pudieron asignar sin problemas respecto a las correspondientes de la filonotisflavona y luteolina, aunque por lo general con valores de ppm más bajos debido al propio efecto de apantallamiento que causa la estructura macrocíclica de la molécula. La señal para C-1' en cambio aparecía con valores de ppm algo más elevados que en la filonotisflavona y luteolina, por la cercanía del punto de apertura de la molécula que rompía en cierta manera ese efecto de apantallamiento, y por la existencia contigüa del enlace flavanónico. Las señales para C-6/6'' y C-8/8'' entre 90-105 ppm indican que el Compuesto VI es un 5,7-dihidroxi-flavonoide

(Agrawal, 1989).

De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto VI es un biflavonoide cíclico, con dos enlaces interflavonoídicos C-2'/C-8'' y C-2'''/C-8, que uno de los monómeros es la luteolina y que el otro monómero da lugar a que el Compuesto VI esté en realidad formado por dos isómeros (**ciclo-oxo tautómeros**), uno con el anillo C de cadena abierta o forma "oxo" (2-OH-flavanona) y otro de cadena cerrada o forma "ciclo" (diaroilmetano). A pesar de todo, debemos finalmente decir que muchas de las señales de espectro de ^{13}C-RMN no pudieron ser asignadas con certeza a uno u otro tautómero pero sí a su respectivo carbono.

Si analizamos el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.6a al final de la discusión del compuesto), observamos que al igual que el de ^{13}C-RMN, cada señal se duplica en dos, cada una de ellas correspondientes al respectivo tautómero. Respecto a las 4 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros, para los dos isómeros. Concretamente se asignaron como OH-5 para las señales a 12.08 ppm (ciclo) y 12.86 ppm (oxo) y OH-5'' para 12.79 ppm (ciclo) y 12.99 ppm (oxo). Estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos (Agrawal, 1989; Geiger & col., 1993a). La señal a 7.37 ppm que aparece como un singlete se otorgó al protón del grupo hidroxilo libre en posición C-2 del ciclo-tautómero, mientras que lógicamente no se detectó dicha señal en el oxo-tautómero por carece de hidroxilo libre en C-2. Las señales correspondientes a H-3'', H-6/6'', H-5'/5''' y H-6'/6''' se asignaron por comparación directa con el espectro de la filonotisflavona, aunque en el caso del Compuesto VI, la resonancia observada se producía lógicamente a valores de ppm más bajo debido al apantallamiento que produce la estructura macrocíclica de la molécula. Al igual que en la filonotisflavona, no se detectó la señal correspondiente a los protones H-2' y H-8'' de la luteolina, lo que indica que dichos carbonos están implicados en un enlace interflavonoídico similar al que ocurre en la **filonotisflavona**, es decir (2',8''). A diferencia de la filonotisflavona, tampoco se pusieron de manifiesto las señales correspondientes a H-2''' y H-8, que en la filonotisflavona aparecían a 7.02 y 6.07 ppm respectivamente. Estos datos vienen a confirmar la existencia de un segundo enlace entre los dos monómeros del biflavonoide entre C-2''' y C-8, del que carece la filonotisflavona, y que daría la conformación de **macrociclo** al Compuesto VI. Finalmente, las 4 señales que se detectan a valores de ppm muy bajos, corresponden a los protones en C-3 de ambos monómeros (2 señales por cada tautómero). Se asignaron como 2.36 y 3.40 ppm para H-3a en ciclo y oxo, y 2.92 y 5.38 ppm para H-3b en ciclo y oxo respectivamente. Estas señales que se detectan en la parte alta del espectro (valores de ppm bajos) son típicas de los protones en C-3 de flavanonas, ya que existe un fuerte acoplamiento entre ellos mismos y respecto al protón en C-2. En el caso del Compuesto VI, las constantes de acoplamiento para dichos protones son relativamente altas, de $J=17$ para los protones H-3a y H-3b en el tautómero ciclo y de $J=15$ en los mismos protones en el oxo-tautómero. Estas cifras se comprenden perfectamente si atendemos al acoplamiento existente entre ambos protones H-3a y H-3b, entre ellos y el hidroxilo libre en C-2 en el tautómero oxo y debido al apantallamiento existente por su compleja estructura molecular.

En resumen, podemos deducir que el Compuesto VI se correspondería con la

Bartramiaflavona, cuya fórmula química aparece en la Fig. 6.7. Es un biflavonoide macrocíclico compuesto de dos ciclo-oxo tautómeros. Uno de sus monómeros es la luteolina y el otro varía dependiendo del tautómero. En el ciclotautómero, la luteolina establece dos enlaces interflavonoídicos en C-2''' y C-8'', con C-8 y C-2' respectivamente, de una 2-hidroxi-flavanona (2-OH-eriodictiol). En el oxo-tautómero, establece los mismos enlaces y con los mismos carbonos de un flavonoide de anillo C abierto que deriva del diaroilmetano, con un grupo ceto en C-2 donde se rompe el anillo C.

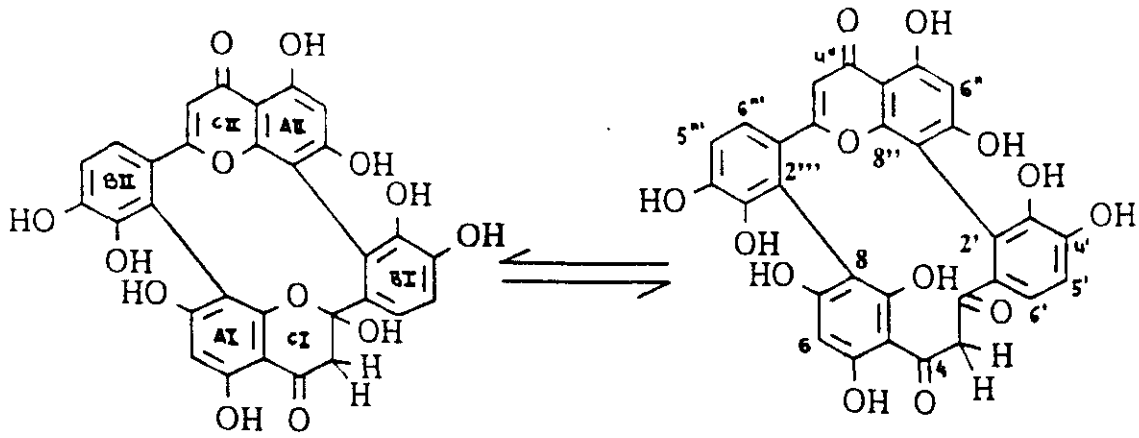


Fig. 6.7.: Bartramiaflavona ($C_{30}H_{18}O_{13}$)
(2-OH-2,3-dihidro-(2',8''-8,2''')-biluteolina)

Tabla 6.6a.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VI.

Protones	Compuesto VI (ciclo)	Compuesto VI (oxo)	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
OH-2	7,37s	-	-	-
3a *	2,36 d (17)	3,40 d (15)	6,06 s	6,69 s
3b *	2,92 d (17)	5,38 d (15)	-	-
6	5,82s	5,90s	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	—	—	6,07 d (2)	6,47 d (2)
2'	—	—	-	7,43 d (2)
5'	6,78 d (8)	6,84 d (8)	7,01 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	7,14 d (8)	7,40 d (8)	7,24 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,28 s	6,32s	6,62 s	-
6''	5,78s	5,78s	6,27s	-
2'''	—	—	7,02 d (2)	-
5'''	6,74 d (8)	6,65 d (8)	6,89 d (9)	-
6'''	6,78 d (8)	6,80 d (8)	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,08 s	12,86s	-	-
OH-5''	12,79 s	12,99s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).
* Señales correspondientes a los 2 hidrógenos situados en posición 3 de la mitad flavanónica del biflavonoide.

Tabla 6.6b.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto VI.

Carbonos	Compuesto VI (ciclo)	Compuesto VI (oxo)	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	102,6	200,0	166,5	164,5
2''	168,0	168,4	163,8	-
3	48,7 sec.	55,3 sec.	106,4	103,8
3''	108,6 t.	109,0 t.	102,4	-
4	194,3	195,2	181,7	182,2
4''	182,0	182,3	181,1	-
5	160,8	162,2	161,1	162,1
5''	158,2	160,0	160,3	-
6	94,5 t.	95,0 t.	98,6	99,2
6''	98,5 t.	98,5 t.	98,3	-
7	164,3	165,3	163,7	164,7
7''	162,4	162,6	161,4	-
8	**104,1**	**105,1**	93,0	94,2
8''	**103,8**	**104,1**	**103,5**	-
9	156,7	149,3	157,2	157,9
9''	154,8	155,1	154,3	-
10	100,2	100,5	102,9	104,2
10''	103,1	103,7	103,2	-
1'	129,4	132,1	124,0	122,1
1'''	126,4	127,1	121,7	-
2'	**119,6**	**120,9**	**118,7**	113,8
2'''	**118,3**	**118,3**	113,5	-
3'	144,7	144,7	144,3	146,2
3'''	144,4	144,4	145,7	-
4'	145,3	145,8	148,3	150,1
4'''	146,7	147,0	149,4	-
5'	113,7 t.	114,5 t.	114,6	116,4
5'''	113,1 t.	113,6 t.	115,5	-
6'	119,9 t.	122,5 t.	120,5	119,3
6'''	117,4 t.	117,4 t.	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
Los carbonos secundarios (sec.) y terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

6.1.1.7. ANHIDRO-BARTRAMIAFLAVONA

(Compuesto VII) (2',8''-8,2'''-biluteolina)

El Compuesto VII que identificamos como la Anhidro-Bartramiaflavona (BH-2, BP-2) fue aislado por primera vez en *Bartramia pomiformis* (Seeger & col., 1991) y posteriormente en la misma especie (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992) y en *Bartramia halleriana* (Salm, 1992). Así mismo, Seeger & col. (1991), obtenían también en *Bartramia pomiformis*, mediante deshidratación de la bartramiaflavona (Compuesto VI) la anhidrobartramiaflavona, mediante H_2SO_4 al 20% a 250° C.

La Anhidrobartramiaflavona posee una complidada estructura tridimensional: los planos formados por las dos mitades de benzocromo (anillos AI CI y AII CII), están orientados uno respecto al otro con un ángulo de 60°, puenteados por los anillos BI y BII, cuyos planos se orientan casi perpendicularmente respecto del plano de benzocromo correspondiente (ver **Fig. 6.8** correspondiente al **Modelo molecular de la Anhidrobartramiaflavona**).

El hecho de tratarse de una molécula macrocíclica implica que no hay planaridad, y por ello el espectro de ultravioleta resultante es poco indicativo y de escasa validez analítica a la hora de determinar la estructura de la anhidrobartramiaflavona (Salm, 1992). Al igual que ocurría con el Compuesto VI, el Compuesto VII no cambia de color al ser observado a la luz ultravioleta tras aplicar NA, de ahí que sea fácilmente distinguible en las TLCs respectivas del resto de biflavonoides, al igual que también lo es por su relativa alta movilidad cromatográfica (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Salm, 1992).

Todas las consideraciones que ya adujimos respecto a la alta movilidad cromatográfica, a la respuesta al uso de reactivos específicos de TLC y a los resultados de la espectroscopía de ultravioleta del Compuesto VI, pueden aceptarse plenamente para el Compuesto VII.

En referencia al FAB-EM, a pesar de ser una biluteolina, la anhidrobartramiaflavona no tiene la señal a 569 um, típica de las biluteolinas, pues pierde dos H^+ con el segundo enlace que forma el macrociclo, y ión $[M - H]^+$ pasa a ser de 567 um, lo que viene a confirmar que el Compuesto VII es efectivamente una biluteolina macrocíclica con un nuevo segundo enlace.

Respecto al espectro de ^{13}C-RMN (ver Tabla 6.7b al final de la discusión del compuesto), las señales para C-2', C-8'', C-2''' y C-8 son sensiblemente diferentes respecto de las correspondientes de la luteolina, lo que indica que los 4 carbonos deben estar implicados en algún tipo de enlace interflavonoídico. Comparando ahora el espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto VII con el de la filonotisflavona, observamos en cambio que las resonancias de C-2' y C-8'' son prácticamente idénticas a las de los mismos carbonos en la filonotisflavona mientras que no ocurre lo mismo con C-2''' y C-8. Esto viene a decirnos que el Compuesto VII tiene al menos un enlace entre los dos monómeros del biflavonoide idéntico al de la filonotisflavona, concretamente el enlace entre C-2' y C-8'', mientras que C-2''' y C-8 son los otros dos carbonos que intervienen en el segundo enlace interflavonoídico que en cambio está ausente en la filonotisflavona, de ahí esas diferencias en el espectro. El resto de señales del espectro de ^{13}C-RMN pueden asignarse sin problemas por comparación directa con las resonancias respectivas de los mismos carbonos de la luteolina y la filonotisflavona. Resumiento lo deducido del espectro de ^{13}C-RMN podríamos afirmar que el

Compuesto VII sería un **biflavonoide macrocíclico**, concretamente una biflavona del tipo biluteolina, con un segundo y nuevo enlace entre C-2''' y C-8 respecto a la filonotisflavona.

Al tratarse de una molécula simétrica, en el espectro de ^{1}H-RMN de la anhidro-bartramiaflavona (Compuesto VII) sólo observamos la mitad de los picos, en referencia al número normal que aparece en el resto de biflavonoides (ver Tabla 6.7a al final de la discusión del compuesto). Así por ejemplo, en 13 ppm únicamente encontramos un pico, correspondiente el sólo a las señales de los protones situados en los hidroxilos en posición 5 de ambos monómeros, cuyas señales se solapan por ser simétricos. Todos estos hechos nos podrían confundir y pensar que se trata de un flavonoide monomérico, pero su movilidad cromatográfica ya comentada, y sobre todo, los resultados de la espectrometría de masas nos aclaran realmente que se trata de un biflavonoide. Todas las señales del espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VII pueden asignarse sin problemas, con las respectivas de la filonotisflavona, aunque por lo general a valores de ppm más bajos, debido al ya comentado efecto de apantallamiento causado por la estructura macrocíclica. Unicamente, respecto a la filonotisflavona, no se detectan las señales correspondientes a H-8 y H-2''', indicando que dichos carbonos C-8 y C-2''' son los implicados en el segundo enlace interflavonoídico, que en cambio no posee la filonotisflavona.

Como indican Geiger & col. (1993a), la Anhidro-Bartramiaflavona es un biflavonoide derivado de la filonotisflavona, mediante la adición de un segundo enlace interflavonoídico entre C-2''' y C-8, que da lugar a una molécula **simétrica y macrocíclica**. En ella, los dos anillos B están situados por poco casi perpendicularmente respecto a los anillos C respectivos (BI-CI y BII-CII), lo que da lugar a ese cambio químico en la resonancia de C-3 sobre 108.9 ppm en el espectro de ^{13}C-RMN, que alcanza valores de ppm más altos que el mismo C-3 en la filonotisflavona, donde no existe esa perpendicularidad acusada entre los anillos B-C. La señal en cambio para H-3 en la anhidrobartramiaflavona, se sitúa a valores de ppm más bajos que la misma señal en la filonotisflavona. Esto se debe al efecto "escudo" que ejerce el anillo A respecto de la otra mitad flavónica (Geiger & col., 1993a).

Traub & Geiger (1975), en las semillas de *Galega officinalis* L. aislaron el 2,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavano-5-glucósido, que al igual que la Bartramiaflavona (Compuesto VI) estaba formado de dos formas tautoméricas, una de ellas de cadena abierta y otra cerrada, interconvertibles entre ellas y con la posibilidad de sintetizar a partir de él la forma deshidratada (luteolina-5-glucósido), de la misma manera que puede hacerse con la Bartramiaflavona hacia Anhidro-Bartramiaflavona.

En resumen, el Compuesto VII sería la **Anhidro-Bartramiaflavona**, una **2',8''-2''',8-biluteolina** de estructura macrocíclica, derivada de la filonotisflavona, y que puede obtenerse como producto de deshidratación de la bartramiaflavona. Su fórmula queda reflejada en la Fig. 6.9.

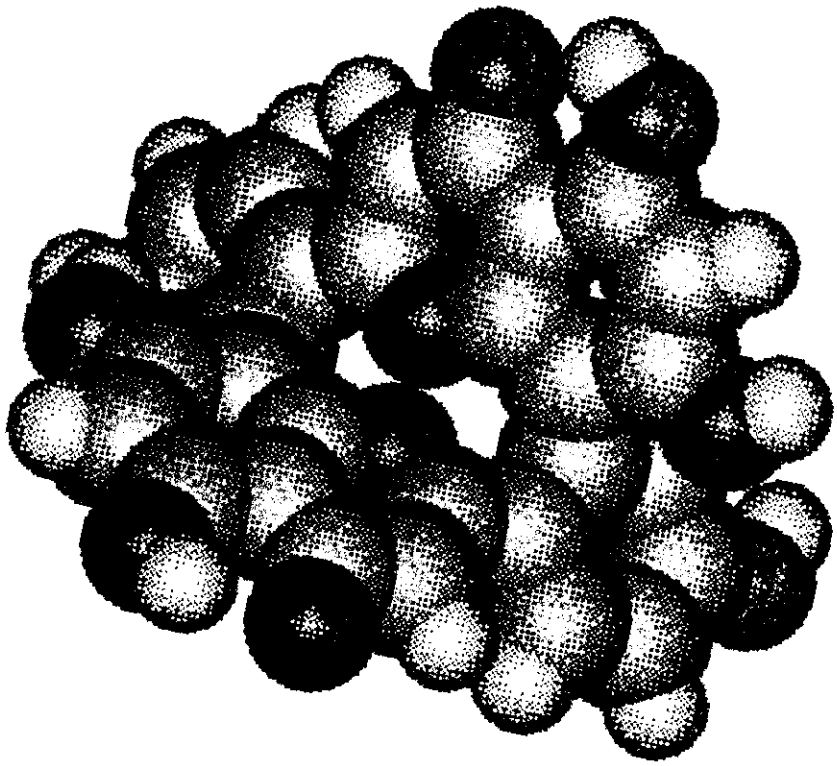


Fig. 6.8.: Modelo molecular de la Anhidro-Bartramiaflavona.

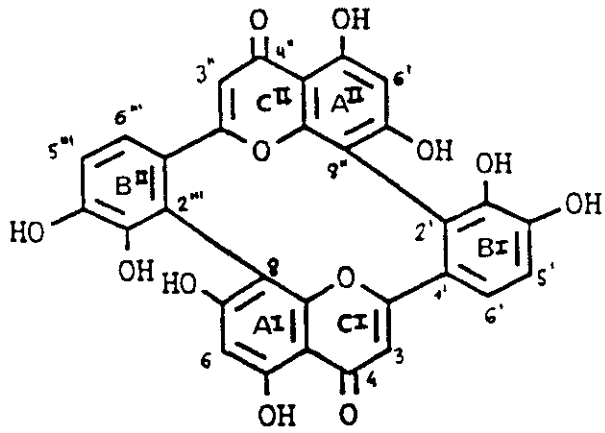


Fig. 6.9.: Anhidro-Bartramiaflavona ($C_{30}H_{16}O_{12}$)
(2',8''-8,2'''-biluteolina)

Tabla 6.7a.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VII.

Protones	Compuesto VII	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
3	6,26s	6,06s	6,69s
6	5,74s	5,75 d (2)	6,22 d (2)
8	—	6,07 d (2)	6,47 d (2)
2'	—	-	7,43 d (2)
5'	6,73 d (8)	7,01 d (8,5)	6,92 d (9)
6'	6,80 d (8)	7,24 d (8,5)	7,77 dd (2;9)
3''	6,26s	6,62 s	-
6''	5,74s	6,27s	-
2'''	—	7,02 d (2)	-
5'''	6,73 d (8)	6,89 d (9)	-
6'''	6,80 d (8)	7,00 dd (2;9)	-
OH-5	12,64 s	-	-
OH-5''	12,64 s	-	-

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).

Tabla 6.7b.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto VII.

Carbonos	Compuesto VII	Filonotisflavona[1]	Luteolina[2]
2	167,1	166,5	164,5
2''	167,1	163,8	-
3	108,9 t.	106,4	103,8
3''	108,9 t.	102,4	-
4	181,8	181,7	182,2
4''	181,8	181,1	-
5	160,4	161,1	162,1
5''	160,4	160,3	-
6	98,6 t.	98,6	99,2
6''	98,6 t.	98,3	-
7	163,0	163,7	164,7
7''	163,0	161,4	-
8	**103,1**	93,0	94,2
8''	**103,1**	**103,5**	-
9	154,6	157,2	157,9
9''	154,6	154,3	-
10	102,7	102,9	104,2
10''	102,7	103,2	-
1'	125,5	124,0	122,1
1'''	125,5	121,7	-
2'	**119,1**	**118,7**	113,8
2'''	**119,1**	113,5	-
3'	144,4	144,3	146,2
3'''	144,4	145,7	-
4'	147,0	148,3	150,1
4'''	147,0	149,4	-
5'	113,9 t.	114,6	116,4
5'''	113,9 t.	115,5	-
6'	118,7 t.	120,5	119,3
6'''	118,7 t.	118,9	-

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
Los carbonos terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

6.1.1.8. BARTRAMIA-TRILUTEOLINA

(Compuesto VIII) (2',8'',2''',8''''-triluteolina)

El Compuesto VIII que identificamos como la Bartramia-Triluteolina, se denominó así por Seeger (1992) y Seeger & col. (1992b) en honor a que se aisló e identificó por primera vez en *Bartramia pomiformis*. En esta Tesis Doctoral conseguimos aislarlo e identificarlo en la misma especie anterior (BP-7) así como en *Bartramia stricta* (BS-5.1).

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy semejantes a las de la luteolina y otras biluteolinas (Markham, 1982; Seeger, 1992), ya que al ser observado a la luz ultravioleta muestra un color púrpura oscuro que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA, aunque por lo general es algo superior al de la propia luteolina y a ciertas biluteolinas anteriormente descritas. Todo ello condujo a pensar que el Compuesto VIII debía tratarse de una biluteolina o cualquier otro derivado de la luteolina. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto VIII debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de un **derivado de la luteolina**.

Analizando los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto VIII vemos que, de manera general, como en el caso de compuestos anteriores (dicranolomina o filonotisflavona p.e.), se corresponde con el típico espectro de una flavona (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992). Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +39 nm (385 por 346 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I como en la II, indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). La adición de H_3BO_3 al NaOAc no supone ningun cambio significativo en ninguna de las dos bandas del espectro, pues ambas permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B, así como la inexistencia de un grupo 3-OH, es decir, que se trata de una flavona y no de un flavonol (Salm, 1992). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +52 nm en la banda II y de +72 nm (418-346) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto VIII debía tratarse de una flavona o derivado, con un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es la **luteolina**.

Los dos picos que se observan en el cromatograma de HPLC (Fig. 6.10), corresponden cada uno de ellos a los respectivos diastereoisómeros, lo que indica que ambos están presentes.

En el caso de que en el cromatograma de HPLC apareciera un único pico, sería indicativo de la existencia de uno sólo de los isómeros, en aquellos flavonoides que en teoría puedan tener isomería. Dichos diastereómeros son respectivamente el Compuesto VIII o Bartramia-Triluteolina y el Compuesto IX (Epi-Bartramia-Triluteolina). A diferencia de lo que ocurría con el Compuesto IV, que también estaba formado por dos diastereómeros, tanto el Compuesto VIII como el IX pudieron ser aislados por separado mediante CC, de ahí que hayamos preferido considerarlos como compuestos aparte, aunque sean isómeros. Ambos, compuestos VIII y IX fueron identificados en *Bartramia stricta*, mientras que en *Bartramia pomiformis* sólo se consiguió aislar el Compuesto VIII, aunque el HPLC realizado sobre el compuesto puro aislado de dicha especie también demostró la existencia de dos picos, por lo que posiblemente, también *Bartramia pomiformis* sintetize el Compuesto IX, que con seguridad forma parte de esa mezcla de diversos triflavonoides que es BP-X.

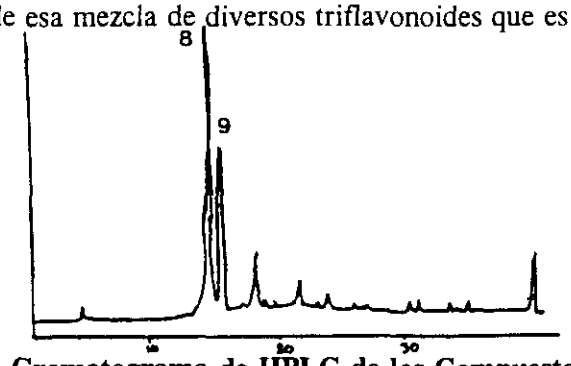


Fig. 6.10.: Cromatograma de HPLC de los Compuestos 8 y 9.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto VIII muestra un ión $[M - H]^+$ de 853 um, que confirma su estructura de **triluteolina**, que concuerda con los resultados ya publicados respecto de la Bartramia-Triluteolina (Seeger & col., 1992b). Dicho espectro de masas se corresponde claramente con él de una **triflavona (triluteolina)** con 12 hidroxilos libres en la molécula, con uniones interflavonoídicas de tipo C-C entre los diversos monómeros de luteolina (Seeger, 1992).

Estableciendo la correspondiente comparación entre las resonancias del espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII (ver Tabla 6.8a al final de la discusión del compuesto) y el de la filonotisflavona, se observa un total paralelismo entre las señales correspondientes a los mismos carbonos en ambos compuestos, con la salvedad de la existencia de una tercera señal correspondiente al tercer monómero de luteolina. Al igual que en la filonisflavona, y a diferencia de la luteolina, no se detectan las señales correspondientes a H-2' y H-8'', lo que indica que tanto C-2' como C-8'' forman parte de un enlace interflavonoídico entre dos de los monómeros de luteolina, como ocurre en la filonotisflavona. La señal para H-8'''' del tercer monómero tampoco aparece en el espectro, indicando que precisamente dicho carbono C-8'''' forma parte del segundo enlace entre el monómero medio y el derecho. A diferencia de la filonotisflavona, la señal para H-2''' no aparece en el espectro de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII ya que precisamente C-2''' es el carbono que lleva a cabo ese segundo enlace interflavonoídico con C-8''''.

En conclusión, el Compuesto VIII sería una **triluteolina lineal**, ya que no parece quedar manifiesta la existencia de un tercer enlace interflavonoídico. Los tres monómeros de la triflavona se unirían mediante enlaces C-C de la siguiente manera:

1er. Enlace entre C-2' del monómero izquierdo y C-8'' del monómero central.

2º. Enlace:entre C-2''' del monómero central y C-8'''' del monómero derecho.

Este triflavonoide ya ha sido anteriormente descrito y se conoce como **Bartramia-Triluteolina (2',8'',2''',8''''-triluteolina)**, cuya fórmula queda manifiesta en la Fig. 6.11.

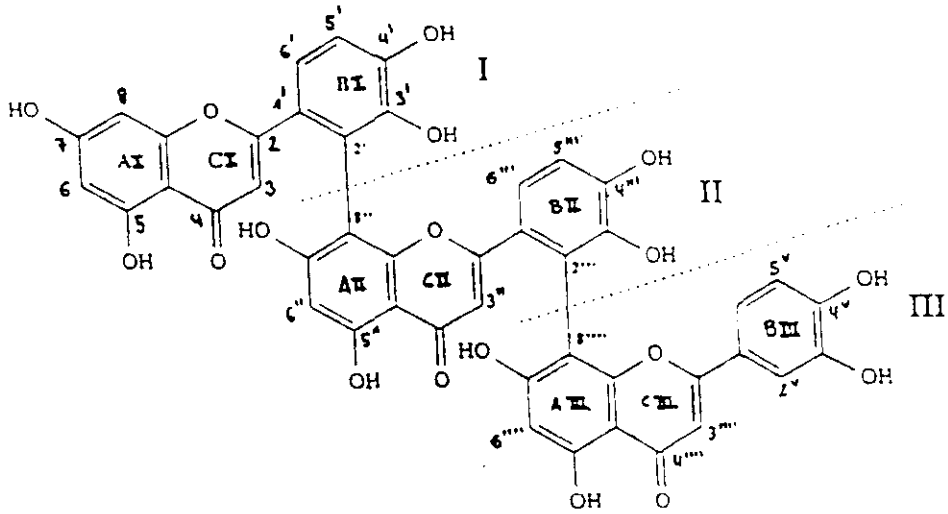


Fig. 6.11.: Bartramia-Triluteolina ($C_{45}H_{26}O_{18}$)
(2',8''-2''',8''''-triluteolina)

Tabla 6.8a.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto VIII.

Protones *	Compuesto VIII			Filonotisflavona[1]		Luteolina[2]
I II II	I i	II c	III d	I i	II d	
H 3 / 3'' / 3''''	6,05s	6,14s	6,18s	6,06s	6,62s	6,69s
H 6 / 6'' / 6''''	5,34 d(2)	5,67s	5,70s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)
H 8 / 8'' / 8''''	6,01 d(2)	—	—	6,07 d(2)	-	6,47 d(2)
H 2' / 2''' / 2'''''	—	—	6,64 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)
H 5' / 5''' / 5'''''	6,91 d(8)	6,81 d(8)	6,12 d(8)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,98 d(8)
H 6' / 6''' / 6'''''	7,10 d(8)	7,06 d(8)	6,43 dd(8;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)
OH 5 / 5'' / 5''''	12,88s	12,89s	13,02s	13,01s	12,88s	13,00s

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989) y Seeger (1992).
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987) y Seeger (1992).
* I, II, III representan cada uno de los monómeros del triflavonoide (I i, monómero izquierdo; II c, monomero medio y III d, monómero derecho) o en su caso del biflavonoide filonotisflavona.

6.1.1.9. EPI-BARTRAMIA-TRILUTEOLINA

(Compuesto IX) (2',8''-2''',8''''- triluteolina)

El Compuesto IX, que fue identificado como la **Epi-Bartramia-Triluteolina** en la especie *Bartramia stricta* (BS-5.A), es en realidad un diastereómero del Compuesto VIII, existiendo la duda sobre su también existencia en *Bartramia pomiformis*, de acuerdo a lo comentado con anterioridad en el Compuesto VIII. En base a lo anterior, todas las consideraciones que ya adujimos respecto a la movilidad cromatográfica, a la respuesta al uso de reactivos específicos de TLC y a los resultados de la espectroscopía de ultravioleta del Compuesto VIII, pueden aceptarse plenamente para el Compuesto IX.

El espectro de masas del Compuesto IX, al igual que el del VIII, ofrecía un ión $[M - H]^+$ de 853 um, típico de **triluteolinas** con 12 hidroxilos libres en la molécula.

Sólamente mediante correlación de los espectros de ^1H-^{13}C RMN y ^1H-^1H RMN mediante el método COSY se pudo llevar a cabo su identificación, ya que tanto en la TLC como en la CC aparecía conjuntamente con el Compuesto VIII.

El espectro de ^{13}C-RMN (ver Tabla 6.9a al final de la discusión del compuesto) muestra un total de 45 señales, correspondientes a otros tantos carbonos. Según ello, el Compuesto IX debía tratarse un **triflavonoide**, al igual que el anterior Compuesto VIII, pues un monómero flavonoídico daría únicamente 15 señales. La asignación de cada una de las resonancias respectivas a los carbonos del Compuesto IX se realizó por comparación directa con las que ofrece la filonotisflavona. La coincidencia es prácticamente total entre los dos primeros monómeros del triflavonoide (carbonos numerados como C, C', C'' y C'''), así como del tercer monómero del triflavonoide que lógicamente no posee la filonotisflavona, y cuyos carbonos se numeran como C'''' y C'''''. Según ello, el Compuesto IX debería tratarse de un triflavonoide directamente relacionado con la filonotisflavona, es decir, con 3 monómeros de luteolina entre los que se llevan a cabo uniones interflavonoídicas idénticas a las de la filonotisflavona (2',8''). Los enlaces entre los tres monómeros serían respectivamente: **2',8''**- entre el monómero izquierdo y el central del triflavonoide y, **2''',8''''**- entre el central y el derecho. Sería al igual que el Compuesto VIII, una **2',8''-2''',8''''-triluteolina**. Dado que el resultado es el mismo, deducimos que posiblemente el Compuesto IX fuese isómero del VIII.

El espectro de ^1H-RMN (ver Tabla 6.9b al final de la discusión del compuesto) muestra básicamente la misma combinación de señales respectivas a los acoplamientos en orto- y meta- que en el Compuesto VIII, lo que concuerda con el resultado del espectro de ^{13}C-RMN. En el espectro de ^1H-RMN del Compuesto IX al igual que ocurre en el Compuesto VIII, es posible reconocer las siguientes señales:

- Un singlete para H-6'', ya que no existe protón libre en C-8'' por intervenir este carbono en el enlace interflavonoídico, con lo que H-6'' no puede acoplarse con ningún otro protón.
- Un segundo singlete para H-6'''' por las mismas razones anteriores, ya que no existe protón libre en C-8'''', por intervenir este carbono en el segundo enlace interflavonoídico. Por regla general, los protones no acoplados a ningún otro aparecen en el espectro como singletes.
- Dos dobletes respectivos para H-6 y H-8 que se acoplan entre ellos en posición meta-.

- Dos dobletes para H-5' y H-6' debido a su orto-acoplamiento.
- Dos dobletes para H-5''' y H-6''', también por orto-acoplamiento entre ellos.
- Un doblete para H-5''''' por su orto-acoplamiento con H-6''''' en el tercer monómero.
- Un doblete para H-2''''' por su meta-acoplamiento con H-6'''''. Los protones acoplados con otro protón, ya sea en posiciones orto- o meta- aparecen como dobletes en el espectro de protón.
- Finalmente, un doble doblete para H-6''''', ya que este protón posee un doble acoplamiento en orto- con H-5''''' y en meta- con H-2'''''. Los protones acoplados a su vez con otros dos protones en orto- y meta- respectivamente, muestran una señal del tipo doble doblete.

Las señales correspondiente a los hidroxilos libres en posición C-5 en cada uno de los monómeros se asignaron como OH-5 para 12.88 ppm, OH-5'' a 12.89 ppm y OH-5'''' a 13.02 ppm respectivamente. A pesar de que las señales correspondientes a cada protón tanto en el Compuesto VIII como en el IX sean muy similares, es bien cierto que se pueden observar algunas diferencias sustanciales. Los protones del anillo B del tercer monómero del Compuesto IX, muestran frente a las señales respectivas del Compuesto VIII un mayor desplazamiento químico, lo que se traduce en valores de ppm más elevados. Valgan como ejemplo los siguientes datos: la señal para H-2''''' en el Compuesto VIII aparece a 6.56 ppm mientras que en el Compuesto IX lo hace a 7.03 ppm. La señal para H-5''''' se muestra a 6.12 ppm en el Compuesto VIII y a 6.97 ppm en el IX y, finalmente, la señal para H-6''''' en el Compuesto VIII aparece a 6.27 ppm y a valores de ppm más elevados (6.98) en el Compuesto IX. Estas diferencias significativas en las resonancias para los mismos protones entre ambos carbonos, pueden ser debidas a un debilitamiento sustancial del apantallamiento o efecto "escudo" de la propia molécula, pues mientras mayor es dicho efecto menores son los valores de ppm que se registran. Una respuesta parecida a la anterior es la que ofrecen los protones del anillo A, cuyos desplazamientos son por lo general también menores en el Compuesto VIII que en el IX, debido a ese mayor apantallamiento existente en el Compuesto VIII. En los protones H-5' y H-5''' del anillo B del primer y segundo monómeros, se produce en cambio el efecto contrario, es decir, aparecen por regla general a mayores valores de ppm en el Compuesto VIII que en el IX, mientras que H-6' y H-6''' lo hacen por debajo. Esto puede dar una idea de la importancia que tiene la estructura molecular en la respuesta de cada protón en el espectro de ^{1}H-RMN. El resto de señales son prácticamente idénticas en ambos compuestos VIII y IX.

Este fenómeno descrito puede explicarse en base a cierta particularidad del Compuesto IX respecto del VIII. Aunque ambos son triluteolinas con los dos mismos enlaces interflavonoídicos, puede darse el caso de que alguno de dichos enlaces tenga posibilidad de giro libre. Seeger (1992) afirma que el Compuesto VIII, la Bartramia-Triluteolina, posee dos centros quirales. De acuerdo a ello, el Compuesto IX podría ser fácilmente un **diastereoisómero** del Compuesto VIII. La única diferencia significativa en el espectro de RMN de ambos compuestos es la basada en un diferente apantallamiento o efecto escudo que ocasiona la estructura molecular. Por ello, la posible estructura del Compuesto IX sería concretamente la de un **epímero** del Compuesto VIII, por el momento hipotético, en el cual el monómero III estuviera situado con un ángulo de 180° respecto al monómero I. El esquema molecular que entonces resultaría, aunque volvemos a repetir que por el momento es una hipótesis, sería el expuesto en la Fig. 6.12. En dicha figura, I, II y III corresponden a cada uno de los monómeros de luteolina numerados como C y C' (I), C'' y C''' (II) y C'''' y C''''' (III)

respectivamente. En la Bartramia-Triluteolina se reflejó además la posición de los 2 centros quirales establecidos por Seeger (1992) con el símbolo " * ". En el esquema anexo a las fórmulas, cada uno de los monómeros se representa como una línea indicando la posición de los anillos A y B, así como en el centro de dicha línea el grupo oxígeno del anillo C respectivo.

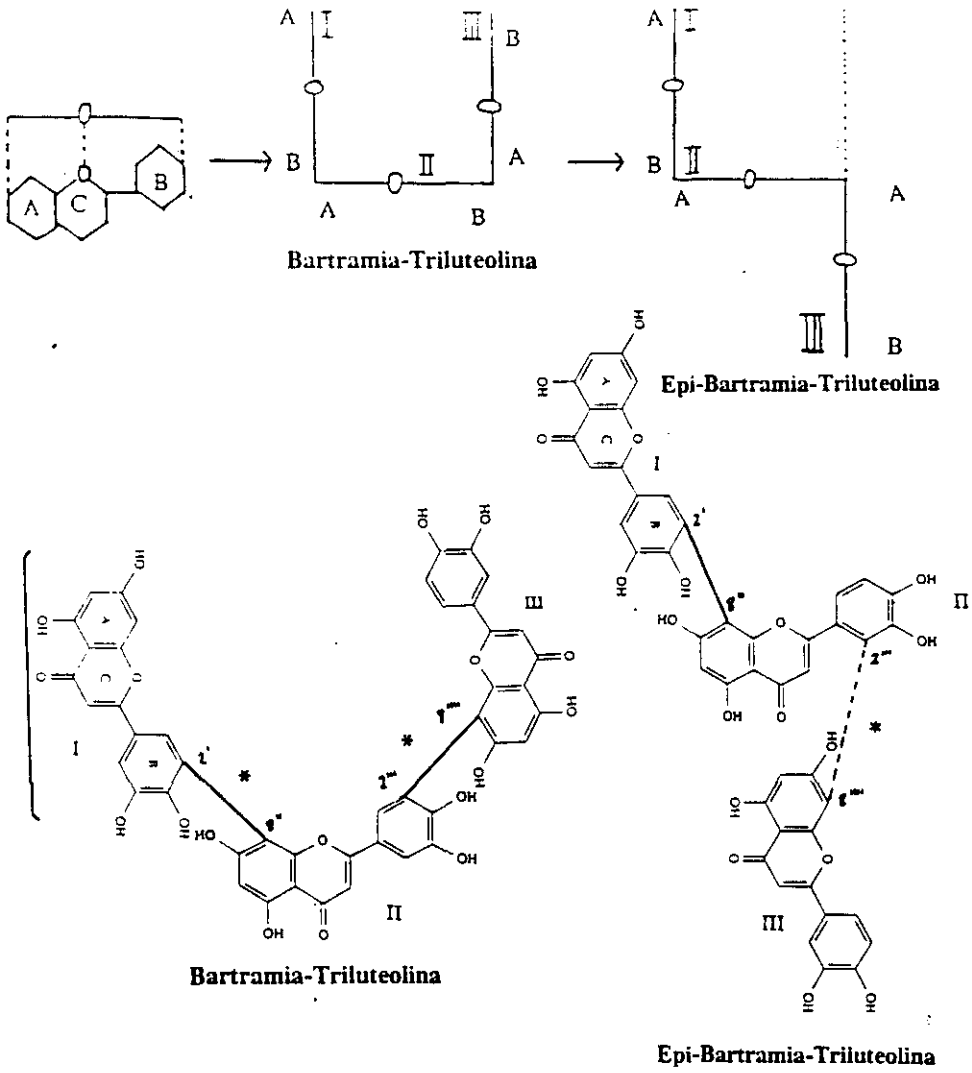


Fig. 6.12.: Epi-Bartramia-Triluteolina ($C_{45}H_{26}O_{18}$)
(2',8''-2''',8''''-triluteolina)

Tomando en consideración que el primer monómero quedaría representado en la vertical dirigido con el anillo A respectivo hacia la parte superior, y el segundo sobre la horizontal, se puede observar que tanto el monómero I como el II tendrían una posición relativa equivalente en los Compuestos VIII y IX. Sin embargo, la diferencia entre ellos radica precisamente en la posición del monómero III respecto al centro quiral existente en el enlace C-2'''/C-8''''. Estas diferencias se manifiestan sobre todo en relación a la posición del monómero III respecto al I.

En el Compuesto VIII (Bartramia-Triluteolina), el anillo A del monómero I quedaría en frente

del anillo B del monómero III. De la misma manera, los monómeros I y III se situarían aproximadamente paralelos entre ellos y perpendiculares respecto al monómero II o central. Esta estructura permitiría la planaridad de la molécula, pero al cerrarse el monómero III sobre el I a través del centro quiral en C-2'''/C-8'''', el apantallamiento que dicha estructura molecular causaría sería bastante mayor que en el Compuesto IX. De esta manera se explicarían fácilmente esos menores valores de ppm de las señales correspondientes al anillo BIII del Compuesto VIII. En el Compuesto IX, la **Epi-Bartramia-Triluteolina**, se produce un giro de 180° en el centro quiral situado entre C-2''' y C-8'''' respecto al Compuesto VIII, ocasionando que anillo BIII no quede frente al AI, la molécula es más abierta y por lo tanto el efecto "escudo" es menor, con lo que las resonancias se muestran a valores de ppm más elevados que en el Compuesto VIII. Lógicamente se pierde la planaridad de la molécula. El esquema estructural comentado en la Fig. 6.12 no puede por ello dibujarse en dos dimensiones, ya que los monómeros se encuentran en planos distintos. No obstante, hemos querido presentar la posible estructura derivada del giro sobre el centro quiral de la Epi-Bartramia-Triluteolina, aunque manifestando las limitaciones que lógicamente puedan existir por la existencia de diversos planos.

Tabla 6.9a.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto IX.

Carbonos	Compuesto IX	Filonotisflavona[1]
2	166,7	166,5
2''	164,6	163,8
2''''	165,6	---
3	106,1 t.	106,4 t.
3''	106,1 t.	102,4 t.
3''''	102,4 t.	---
4	181,5	181,7
4''	181,4	181,1
4''''	181,9	---
5	161,1	161,1
5''	160,4	160,3
5''''	160,6	---
6	98,7 t.	98,6 t.
6''	98,3 t.	98,3 t.
6''''	99,1 t.	---
7	163,9	163,7
7''	161,3	161,4
7''''	161,3	---
8	93,5 t.	93,0 t.
8''	**103,5**	**103,5**
8''''	**103,7**	---
9	157,3	157,2
9''	154,6	154,3
9''''	155,2	---
10	102,9	102,9
10''	103,4	103,2
10''''	102,7	---
1'	123,8	124,0
1'''	121,9	121,7
1'''''	123,8	---
2'	**118,7**	**118,7**

Carbonos	Compuesto IX	Filonotisflavona[1]
2'''	**118,7**	113,5 t.
2'''''	113,7 t.	---
3'	144,2	145,7
3'''	145,6	145,7
3'''''	144,1	---
4'	148,4	148,3
4'''	149,6	149,4
4'''''	148,6	---
5'	114,5 t.	114,6 t.
5'''	115,7 t.	115,5 t.
5'''''	114,3 t.	---
6'	120,7 t.	120,5 t.
6'''	118,7 t.	118,9 t.
6'''''	120,7 t.	---

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989).
Los carbonos terciarios (t.) fueron determinados por la técnica DEPT.

Tabla 6.9b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto IX.

Protones *	Compuesto IX			Filonotisflavona[1]		Luteolina[2]
I / II / II	I i	II c	III d	I i	II d	
H 3 / 3'' / 3''''	5,91s	5,60s	6,61s	6,06s	6,62s	6,69s
H 6 / 6'' / 6''''	6,11 d(2)	6,14s	6,61s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)
H 8 / 8'' / 8''''	5,75 d(2)	---	---	6,07 d(2)	-	6,47 d(2)
H 2' / 2''' / 2'''''	---	---	7,03 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)
H 5' / 5''' / 5'''''	6,76 d(8)	6,73 d(8)	6,97 d(8)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,98 d(8)
H 6' / 6''' / 6'''''	7,17 d(8)	7,12 d(8)	6,98 dd(8;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)
OH 5 / 5'' / 5''''	12,88s	12,89s	13,02s	13,01s	12,88s	13,00s

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989) y Seeger (1992).
[2] Luteolina según Geiger & col. (1987) y Seeger (1992).
* I, II, III representan cada uno de los monómeros del triflavonoide (I i, monómero izquierdo; II c, monomero medio y III d, monómero derecho) o en su caso del biflavonoide filonotisflavona.

6.1.1.10. CICLO-TRILUTEOLINA

(Compuesto X) (Ciclo-Bartramia-Triluteolina)

La identificación del Compuesto X como la Ciclo-Triluteolina en *Bartramia stricta* (BS-3), supone una novedad para la química flavonoídica, ya que hasta el momento no se conocía ningún compuesto de esta naturaleza, los **triflavonoides cíclicos**. Si bien es cierto, ya con anterioridad se había descrito un triflavonoide lineal en el musgo *Bartramia pomiformis* (Seeger, 1992).

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy semejantes a las de la luteolina y a las de la Bartramia-Triluteolina (Tabla 5.37), ya que al ser observado a la luz ultravioleta muestra un color púrpura (violeta oscuro) que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA, aunque por lo general es algo superior al de los dos compuestos referidos. Todo ello nos llevó de nuevo a pensar, de acuerdo a los conocimientos que hasta ese momento teníamos sobre los flavonoides en *Bartramiaceae*, que debía tratarse de una biflavona (López-Sáez, 1992). Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto X debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' (en el anillo B) y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de una biluteolina o de otro flavonoide también **derivado de la luteolina**.

Comparando el espectro de ultravioleta del Compuesto X con él de la filonotisflavona o con él de la luteolina (Tabla 5.38) se observa una gran concordancia en los datos, que nos hizo pensar que estaban fuertemente emparentados. Analizando detenidamente los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto X, vemos que a diferencia de lo que ocurre en los biflavonoides (absorben aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y entre 310-350 nm en banda I), el Compuesto X tenía su comportamiento sensiblemente distinto. En la banda II se observaba un pico a 267 nm que sí se correspondía al intervalo biflavonoídico, pero en la banda I apenas aparecía siempre un hombro sobre 338 nm (338sh) y no un segundo pico típico de biflavonoides (Salm, 1992; Harborne, 1984). Este primer dato ya nos llevó a pensar que el Compuesto X estaba relacionado directamente con la luteolina y la filonotisflavona, pero muy posiblemente no era un biflavonoide. Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +58 (396 por 358 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico en la banda I de +38 nm, mientras que la banda II no se altera, lo cual es indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). Sin embargo, esa ausencia de variación en la banda II del espectro en NaOAc nos hizo sospechar que debía existir alguna inferencia que impidiera una total correspondencia con el respectivo espectro de la luteolina o de la filonotisflavona. La adición de H_3BO_3 al NaOAc no supone ningun cambio significativo en ninguna de las dos bandas del espectro, pues ambas permanecen inalterables. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B, así como la inexistencia de un grupo 3-OH,

es decir, que se trata de una flavona y no de un flavonol (Salm, 1992). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH no supone de nuevo ninguna alteración del espectro correspondiente respecto al del MeOH, lo cual ya sí es una diferencia bastante significativa respecto al espectro de la luteolina. En caso de tratarse de una biluteolina o de una triluteolina lineal cabría esperarse que el espectro de ultravioleta del Compuesto X fuese cercano a éstas, y presenta no obstante ciertas alteraciones. Lo mismo puede afirmarse de la adición de HCl al espectro en tricloruro de aluminio. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta y a su movilidad cromatográfica, el Compuesto X debía tratarse de un compuesto relacionado con la luteolina o a la filonotisflavona, pero seguramente no es ni una biluteolina ni una triluteolina lineal, pues se detectan sensibles diferencias, sobre todo en su espectro de ultravioleta.

El espectro de masas muestra un ión $[M]^+$ de 852 um que ya desde un inicio sugería que el Compuesto X era un **triflavonoide**. Comparando este dato con el FAB-EM de otro triflavonoide conocido, la Bartramia-Triluteolina (Seeger, 1992), vemos que esta última es un triflavonoide lineal compuesto de tres monómeros de luteolina unidos por enlaces 2',8''- y 2''',8''''- y su ión $[M - H]^+$ aparece a 853 um (M^+ a 854 mu). Según ello, el Compuesto X sería un triflavonoide que **habría perdido dos protones** respecto a la Bartramia-Triluteolina, por lo que difícilmente podría tratarse de una Triluteolina lineal. Conociendo la existencia de biflavonoides macrocíclicos como la Bartramiaflavona y Anhidrobartramiaflavona (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Salm, 1992) sospechamos que el Compuesto X podría tener un comportamiento similar al de éstos respecto de la Bartramia-Triluteolina. De hecho, la existencia de un **tercer enlace interflavonoídico** entre los flavonoides extremos del triflavonoide lineal, supondría la pérdida de dos hidrógenos y explicaría ese ión M^+ a 852 um. En principio, y de acuerdo a la Espectrometría de Masas podríamos afirmar que el Compuesto X se trataría muy posiblemente de un **Triflavonoide Cíclico**, seguramente una **triluteolina**, y muy íntimamente relacionado con la Bartramia-Triluteolina. La anhidrobartramiaflavona tiene un ión $[M]^+$ de 568 um, correspondiente a dos luteolinas monosustituídas (2 x 284), mientras que el ión M^+ del Compuesto X equivale a la suma de tres luteolinas monosustituídas (3 x 284= 852), lo que indica finalmente que debe tratarse de una **triluteolina**.

El Compuesto X demuestra su naturaleza cíclica ya que en el espectro de ^{13}C sólo se identifican 15 señales y no las 45 que corresponderían a un triflavonoide de cadena abierta (Seeger, 1992). Esas 15 señales que aparecen reflejadas en el espectro de ^{13}C del Compuesto X, la Ciclo-Triluteolina, indican que o bien es un flavonoide monomérico, hecho que sabemos no es cierto gracias a su espectro de masas (propio de un triflavonoide), o en su caso debe tratarse de una estructura cíclica, como así ocurre. El hecho de que únicamente aparezcan 15 señales en el espectro se debe a que la Ciclo-Triluteolina es una molécula simétrica, donde las señales correspondientes a cada uno de los monómeros se solapan en su posición respectiva equivalente (ver Tabl 6.10a al final de la discusión del compuesto). Si se tratase de un triflavonoide de cadena abierta, el número de señales detectadas no sería 15, sino 45, pues no existiría esa simetría antes nombrada, que sólo se logra si la molécula es cíclica. En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Voigt, 1993; Salm, 1992) respecto de la anhidrobartramiaflavona (Compuesto VII). La

presencia de la señal a 181.1 ppm es debida a 3 átomos de carbono correspondientes a tres flavonas, concretamente a C-4, C-4'' y C-4'''', cuya similitud de señales entre ellos, y respecto a la señal correspondiente de la luteolina (C-4) indica que el Compuesto X debe ser un trímero de luteolina (triluteolina). En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 manifiesta en un nivel inferior (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar las señales correspondientes a los carbonos C-6, C-6'' y C-6'''' en 98.0 ppm, y a niveles de ppm más bajos en cambio, no encontramos las respectivas a C-8, C-8'' y C-8''''. **La ausencia de una señal en el rango 90 a 96 ppm indica en este caso que tanto C-8, C-8'' como C-8'''' están sustituídos**, ya que son los carbonos que llevan a cabo los enlaces interflavonoídicos en cada uno de los anillos A implicados pertenecientes a las tres unidades monoméricas respectivas. La intensa señal a 103.3 ppm es asignada a dichos carbonos. La señal a 106.7 corresponde a los carbonos C-3, C-3'' y C-3''''. La señal a 118.9 ppm corresponde a los **carbonos C-2', C-2''' y C-2'''''**, cuya señal se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico**, ya que varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la luteolina que se detecta a 113.8 ppm (Geiger & Bokel, 1989) y es por contra idéntica a la de la Anhidrobartramiaflavona. El resto de señales del espectro se asignaron de acuerdo a la literatura (Geiger & Bokel, 1989; Salm, 1992), respecto de la anhidrobartramiaflavona, por lo que por la misma multiplicidad y casi iguales desplazamientos químicos (isocronía) que las referencias bibliográficas, la asignación de los carbonos correspondientes a cada señal fue sencilla. La señal correspondiente a los carbonos C-5'/5'''/5''''' es igual a la que ofrece la luteolina y la anhidrobartramiaflavona, lo que indica que este carbono no interviene en el enlace interflavonoídico. Resumiendo, podemos decir que las resonancias correspondientes a los carbonos C-8/8''/8'''' a 103.3 ppm y C-2'/2'''/2''''' a 118.9 ppm son casi idénticas a las que ofrecen los mismos carbonos en la anhidrobartramiaflavona (103.1 y 119.1 ppm respectivamente), lo que significa que el Compuesto X tiene tres enlaces interflavonoídicos que implican los mismos carbonos que en la anhidrobartramiaflavona, es decir C-8 y C-2' en cada uno de los monómeros del triflavonoide. Analizando finalmente el espectro general de ^{13}C-RMN del Compuesto X, se observa con claridad que todas las señales pueden asignarse sin problema a las correspondientes de la anhidrobartramiaflavona, teniendo en cuenta por supuesto que se repiten de 3 en 3 al ser una triluteolina, además simétrica. De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto X es una **triluteolina cíclica**, que posee el mismo tipo de enlaces interflavonoídicos que la filonotisflavona y la anhidrobartramiaflavona.

En referencia al espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.10b al final de la discusión del compuesto) debemos decir que los picos a 8.5, 10.0 y 11.0 ppm son típicos de protones carbonílicos o aminas, pero son demasiado altos respecto de los que presenta el Compuesto X. El pico cercano a 13 ppm, en cambio, es típico de un flavonoide con un grupo OH- libre en posición 5. El hecho de que aparezca un sólo pico sobre 13 ppm, concretamente a 12.66 ppm, parece indicar en principio que se trata de un monómero flavonoídico, pero sabiendo que es un triflavonoide podemos concluir que dicha señal es la misma pero solapada respecto a los hidroxilos correspondientes en posiciones OH-5, OH-5'' y OH-5''''. Las señales entre 8.5 y 11.0 ppm son propias de los protones de hidroxilos, pero éstas

en general son anchas y bajas, como ocurre por ejemplo en el espectro de la filonotisflavona, y no tan altas y extrechas como en el espectro de protón del Compuesto X. Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 5.93 ppm para los protones en C-3, C-3'' y C-3'''' respectivamente que aparecen como un singlete al igual que en la luteolina, 6.32 ppm para H-6, H-6'' y H-6''''. La ausencia de la señal respectiva al protón H-8 respecto de la anhidrobartramiaflavona viene a demostrar de nuevo la naturaleza cíclica del Compuesto X y la existencia de un tercer enlace interflavonoídico respecto a la anhidrobartramiaflavona. Las señales de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para los protones en H-6', aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-6', H-6''' y H-6''''' para la señal a 6.34 ppm, en la cual el efecto de apantallamiento debido a la estructura macrocíclica de la molécula, y a la cercanía del enlace respectivo en C-2' que ocasiona acoplamiento con los protones más cercanos tanto de su anillo B respectivo como del anillo C del monómero vecino, ocasiona valores de ppm más bajos respecto a la luteolina. El protón del carbono C-5' de flavonas 3',4'-dioxigenadas (luteolina) aparece como un doblete entre 6.7 y 7.1 ppm (Seeger, 1992; Salm, 1992) por lo que H-5', H-5''' y H-5''''' fueron asignados para la señal a 6.70 ppm respectivamente, en los cuales el acoplamiento es menor que en H-6'/6'''/6''''' por encontrarse en una posición relativamente externa de la molécula, y no muy cercanos respecto a los protones de los monómeros anexos. No se detectaron las señales correspondientes a los protones de C-2'/2'''/2''''' y C-8/8''/8'''', lo que indica la inexistencia de protones, justificada fácilmente si atendemos a que dichos carbonos son precisamente los que llevan a cabo los enlaces interflavonoídicos.

En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto X es un triflavonoide cíclico, concretamente una triluteolina macrocíclica, que denominamos **Ciclo-Triluteolina**, aunque en honor a la especie donde fue identificada (*Bartramia stricta*), pasamos a denominar dicho compuesto como **Ciclo-Bartramia-Triluteolina (2',8'',2''',8'''',2''''',8 - Triluteolina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.13. Los enlaces interflavonoídicos se llevaron a cabo entre los siguientes carbonos:

1. C-2' (anillo BI) y C-8'' (anillo AII).
2. C-2''' (anillo BII) y C-8'''' (anillo AIII).
3. C-2''''' (anillo BIII) y C-8 (anillo AI).

La **Fig. 6.14** muestra el **Modelo Molecular** del Compuesto X.

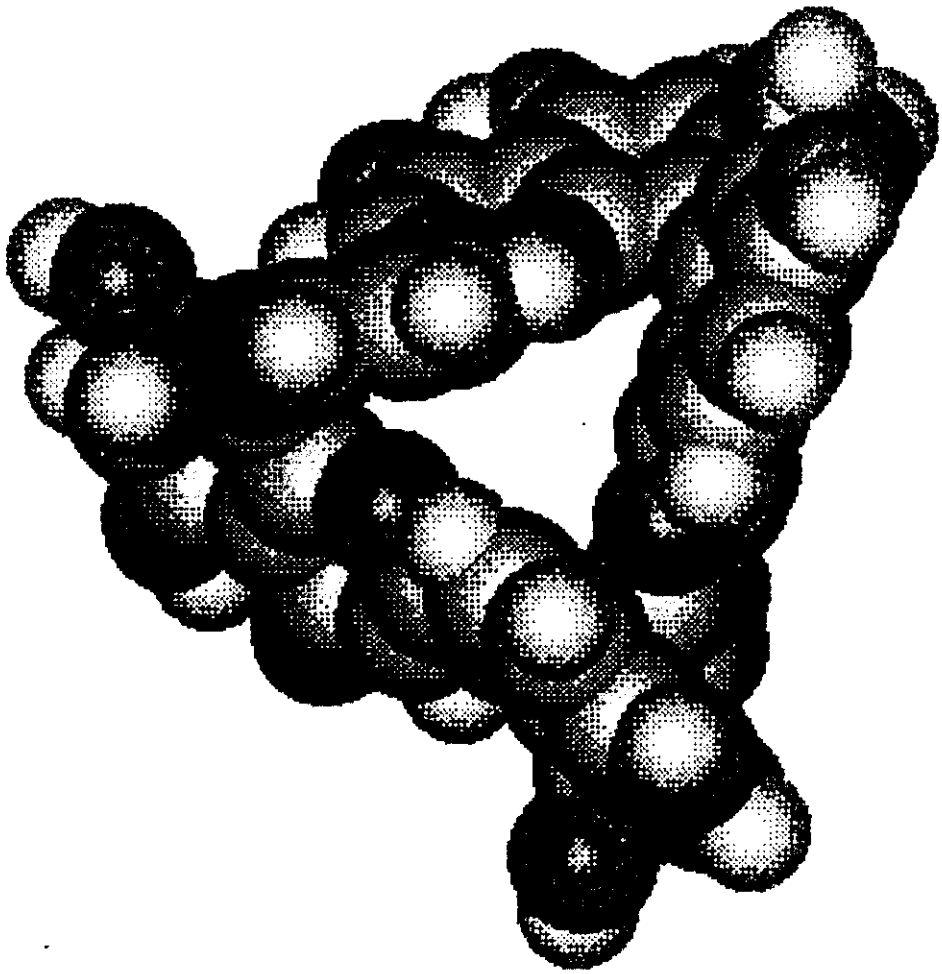


Fig. 6.14.: Modelo molecular de la Ciclo-Bartramia-Triluteolina.

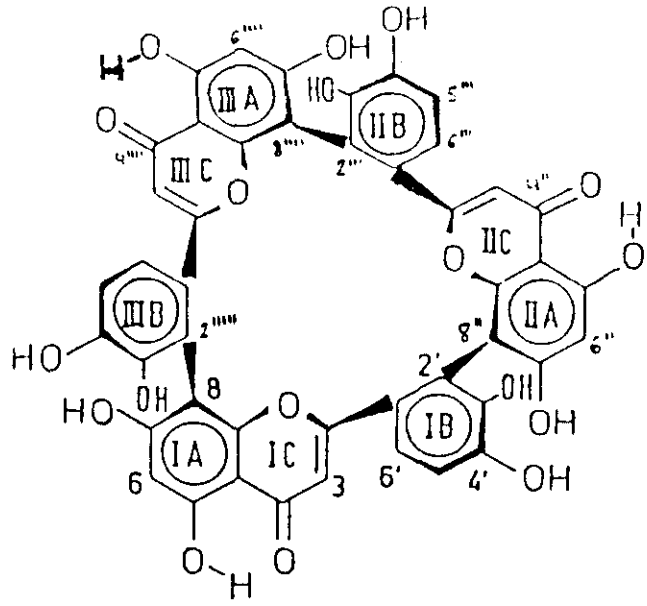


Fig. 6.13.: Ciclo-Bartramia-Triluteolina ($C_{45}H_{24}O_{18}$)
(2',8'',2''',8'''',2''''',8-triluteolina)

Tabla 6.10a.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto X.

Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]	Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]
C-2	164,8	167,1	C-9''''	154,6	—
C-2''	164,8	167,1	C-10	102,8	102,7
C-2''''	164,8	—	C-10''	102,8	102,7
C-3	106,7	108,9	C-10''''	102,8	—
C-3''	106,7	108,9	C-1'	124,9	125,5
C-3''''	106,7	—	C-1'''	124,9	125,5
C-4	181,1	181,8	C-1'''''	124,9	—
C-4''	181,1	181,8	C-2'	**118,9**	**119,1**
C-4''''	181,1	—	C-2'''	**118,9**	**119,1**
C-5	160,4	160,4	C-2'''''	**118,9**	—
C-5''	160,4	160,4	C-3'	144,3	144,4
C-5''''	160,4	—	C-3'''	144,3	144,4
C-6	98,0	98,6	C-3'''''	144,3	—
C-6''	98,0	98,6	C-4'	147,6	147,4
C-6''''	98,0	—	C-4'''	147,6	147,4
C-7	162,4	163,0	C-4'''''	147,6	—
C-7''	162,4	163,0	C-5'	114,6	113,9
C-7''''	162,4	—	C-5'''	114,6	113,9
C-8	103,3	103,1	C-5'''''	114,6	—

Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]	Carbonos	Compuesto X	Anh.[1]
C-8''	**103,3**	**103,1**	C-6'	118,6	118,7
C-8''''	**103,3**	---	C-6'''	118,6	118,7
C-9	154,6	154,6	C-6'''''	118,6	---
C-9	154,6	154,6			

[1] datos de la Anhidrobartramiaflavona según Seeger (1992).

Tabla 6.10b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto X.

Protones	Compuesto X	Anhidrobartramiaflavona[1]	Filonotisflavona[2]
H-3	5,93s	5,74s	6,06s
H-3''	5,93s	5,74s	6,62s
H-3'''	5,93s	---	---
H-6	6,32s	6,26s	6,07d (2)
H-6''	6,32s	6,26s	6,27s
H-6''''	6,32s	---	---
H-8	---	---	5,75d (2)
H-2'''	---	---	7,02d (2)
H-5'	6,70d (8)	6,80d (8)	7,01d (8)
H-5'''	6,70d (8)	6,80d (8)	6,74d (9)
H-5'''''	6,70d (8)	---	---
H-6'	6,34d (8)	6,73d (8)	7,24d (8)
H-6'''	6,34d (8)	6,73d (8)	7,00dd (2;9)
H-6'''''	6,34d (8)	---	---
OH-5	12,66s	12,64s	---
OH-5''	12,66s	12,64s	---
OH-5''''	12,66s	---	---

[1] datos procedentes de Seeger (1992).
[2] datos procedentes de Geiger & Bokel (1989).

6.1.1.11. 5'-OH-AMENTOFLAVONA
(Compuesto XI) (luteolina-(5',8'')-apigenina)

El Compuesto XI que identificamos como la 5'-OH-amentoflavona, fue descrito por primera vez en *Plagiomnium elatum* (Biehl, 1988) de la familia *Mniaceae* y posteriormente, en esta misma especie (Geiger & col., 1988; Anhut & col., 1989a; Anhut, 1992) y *Rhytidiadelphus squarrosus* (Seeger & col., 1990; Seeger, 1992) de *Hylocomiaceae*. La primera cita acerca de la síntesis de este compuesto en especies de la familia *Bartramiaceae*, corresponde a *Bartramia ithyphylla* (BI-6), estudiada en esta Memoria Doctoral.

Exhibe unas características cromatográficas en TLC muy semejantes a las de la luteolina por una parte y a las de la apigenina por otra, así como a las de los tres primeros compuestos referidos (5',3'''-diOH-amentoflavona, 5',3'''-diOH-robustaflavona y filonotisflavona) y el Compuesto V (dicranolomina), ya que se observa a la luz ultravioleta dando un color púrpura que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es muy semejante al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica (Mües, 1988; Seeger, 1992) ya que apenas se desarrolla en el sistema acético-15% y en cambio prácticamente se mueve con el frente en TBA. En el sistema cromatográfico desarrollado en placas de poliamida-6 presenta un Rf relativamente alto en comparación con los compuestos I-III y V en la dimensión del solvente STAHL, que nos hizo pensar que se trataba de la biflavona 5'-OH-amentoflavona (Seeger, 1992). Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto XI debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de una biflavona derivada de la luteolina, aunque no podíamos establecer con seguridad que se tratara de una biluteolina pues su movilidad cromatográfica (Rf) era más alta de lo esperada (Geiger, 1990).

El espectro de absorción ultravioleta del Compuesto XI es semejante al de la luteolina (Tabla 5.42.) (Geiger & col., 1988), aunque parece existir solapamiento con el espectro de otra flavona distinta de ésta (Markham, 1982). El espectro obtenido parece corresponder a la suma de dos espectros distintos procedentes de dos flavonas, siendo una de ellas la luteolina. Analizando los resultados del espectro de ultravioleta del Compuesto XI vemos que de manera general, como en el caso de compuestos anteriores, se corresponde con el típico espectro de un **biflavonoide** (Markham, 1982; Harborne, 1984; Salm, 1992) pues absorbe aproximadamente entre 250-280 nm en la banda II y, entre 310-350 nm en banda I. Siguiendo a Markham (1982), en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +45 (388 por 343 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico tanto en la banda I de +28 nm (371-343) como en la II (+4 nm), indicativo de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH). La adición de H_3BO_3 al NaOAc supone un efecto ipsocrómico de -11 nm (360-371) en la banda I y de -6 nm (263-269) en la banda II. Estos hechos indican la no existencia de grupos o-diOH en el anillo B pues en dicho caso se esperaría un efecto batocrómico de +12 a +36

nm (Markham, 1982). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de MeOH, supone un efecto batocrómico de +7 nm (272/265) en la banda II y de +67 nm (410-343) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH). Por contra, la adición de ClH al tricloruro de aluminio origina sendos efectos ipsocrómicos en ambas bandas, de -17 nm en la banda II (272-255) y de -65 nm en la banda I (410-345). Según esto, se confirman las conclusiones anteriores de que el Compuesto XI no tiene un grupo o-diOH en B, pues entonces se esperaría un efecto batocrómico en la banda I de +30-40 nm (Markham, 1982). En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto XI debía ser una flavona (o dímero de ella) sin un agrupamiento o-diOH en el anillo B, con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es la apigenina. Sin embargo, los resultados de la TLC indicaban por contra que el Compuesto XI debía tener al menos un agrupamiento o-diOH en B, ya sea en posiciones 3',4' o 4',5' y que posiblemente derivaba de la luteolina (5'-OH-apigenina). Sabiendo que el Compuesto XI es un biflavonoide y más concretamente una **biflavona**, es fácil pensar que se trate de un dímero luteolina-apigenina, lo cual explicaría por un lado sus características cromatográficas y por otro, su espectro de absorción al ultravioleta.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto XI muestra un ión $[M-H]^+$ de 553 um, que confirma su estructura de biflavona, ya sospechada por los resultados previos de la espectroscopía de ultravioleta, y que concuerda con resultados ya publicados respecto de la 5'-OH-amentoflavona (Geiger & col., 1988). Dicho espectro de masas se corresponde claramente con él de una **heptahidroxibiflavona** (Seeger & col., 1990) con unión interflavonoídica de tipo C-C entre los anillos BI y AII de ambos monómeros (Seeger, 1988). Este espectro de masas apoyaría además la hipótesis de que el Compuesto XI sea un dímero de luteolina (4 hidroxilos en 5, 7, 3' y 4') y apigenina (3 hidroxilos en 5, 7 y 4').

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & col., 1988; Seeger & col., 1990) (ver Tabla 6.11a al final de la discusión del compuesto). Los cambios químicos observados y las multiplicidades de la gran parte de las señales son idénticos a los de la 5',3'''-diOH-amentoflavona y amentoflavona. La presencia de dos señales a 182.2 y 181.7 ppm son debidas a 2 átomos de carbono correspondientes a dos flavonas, concretamente a C-4 y C-4'', cuya similitud de señales entre ellos, y respecto a las señales correspondientes de la amentoflavona y 5',3'''-diOH-amentoflavona, indica que el Compuesto XI sería una **biflavona derivada de la amentoflavona**. En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina y la apigenina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 a campo menor (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar las señales correspondientes a los carbonos C-6 y C-6'' en 99.0 y 98.9 ppm respectivamente, y a niveles de ppm más bajos la correspondiente a C-8 en 93.9 ppm. Sí se detectó dentro del intervalo mencionado la señal correspondiente a C-6'', lo que indica que en el caso del Compuesto XI, dicho carbono no está implicado en el enlace interflavonoídico. Sin embargo, **la ausencia de una señal en el rango 90 a 96 ppm indica por contra que C-8'' está sustituído**, ya que es el carbono que lleva a cabo el enlace interflavonoídico en una de las dos unidades monoméricas. De hecho esta señal concuerda totalmente con la que ofrece la 5',3'''-diOH-

amentoflavona, lo que indica que como en ésta, C-8'' forma parte en enlace de unión entre ambos monómeros flavónicos. La intensa señal a 104.4 ppm, que no aparece dividida, es asignada a C-8''. Las dos señales a 103.0 y 102.6 ppm son asignadas a C-3 y C-3''. Entre las tres señales más intensas restantes, las dos menos intensas a 120.5 y 120.6 son asignadas a C-1'y C-1'''. La señal a 120.4 ppm corresponde al **carbono C-5'**, y se encuentra influenciada por el efecto de sustitución en el **enlace interflavonoídico**, y no varía sensiblemente respecto de la señal correspondiente de la amentoflavona (121.7 ppm) ni de la 5',3'''-diOH-amentoflavona (120.0), por lo que sospechamos que al igual que en ambas, el carbono C-5' forma parte del enlace interflavonoídico junto con C-8'' (Geiger & Bokel, 1989). El resto de señales del espectro (C-2, C-2'', C-5, C-5'', C-7, C-7'', C-9, C-9'', C-10, C-10'', C-2''', C-3', C-3''', C-4', C-4''', C-5''', C-6 y C-6''') se identificaron y asignaron de acuerdo a la literatura (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992; Markham & col., 1988), respecto a la amentoflavona (5',8''-biapigenina) y la 5',3'''-diOH-amentoflavona. Los carbonos C-2', C-4' y C-6' mostraban una resonancia totalmente de acuerdo a las correspondientes a las mismas señales en la 5',3'''-diOH-amentoflavona, y por contra sensiblemente distintas respecto de las de la amentoflavona, que por regla general ofrecían valores de ppm más elevados. Esto es fácil de entender si atendemos a que uno de los monómeros del Compuesto XI es la luteolina, al igual que en la 5',3'''-diOH-amentoflavona, y por lo tanto sus señales serán idénticas, mientras que en la amentoflavona, que es una biapigenina, no se produce el apantallamiento típico del hidroxilo en posición 3' de la luteolina, de ahí que sus valores de ppm sean más altos. En el caso de C-3', en la luteolina existe acoplamiento entre los hidroxilos en C-3' y C-4', lo que no ocurre en la amentoflavona, de ahí esos valores de ppm superiores respectos a los del Compuesto XI. Por contra, los carbonos C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' y C-6''' tienen resonancias prácticamente idénticas a las de la amentoflavona, lo que indica claramente que el otro monómero del Compuesto XI es la apigenina. De acuerdo a los resultados del espectro de ^{13}C-RMN podemos deducir que el Compuesto XI sería la **luteolina-(5',8'')-apigenina**, cuya denominación actual es **5'-OH-Amentoflavona**.

Si pasamos a analizar ahora el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.11b al final de la discusión del compuesto), observamos que se detectan 3 señales correspondientes a singletes entre 6.38 y 6.78 ppm y 8 dobletes entre 6.25 y 7.66 ppm. En comparación con los espectro de protón de las biluteolinas ya identificadas (compuestos I-III y V), se detectan 11 señales en vez de 10. Esto es debido a la existencia de un protón más en el monómero de apigenina en posición H-3''' como consecuencia de la inexistencia del grupo hidroxilo típico de la luteolina en esa posición. Respecto a las 2 señales que aparecen en el espectro de ^{1}H-RMN sobre 13 ppm, corresponden ambas a cada uno de los protones del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 en cada uno de los monómeros de luteolina, concretamente OH-5 para la señal a 13.09 ppm y OH-5'' para 12.97 ppm. Estos protones en posición OH-5 y OH-5''de los anillos AI y AII respectivamente, establecen sendos *puentes de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición* 4 y 4'' de los anillos CI y CII respectivos. Entre 6.1 y 6.7 ppm aparecen las señales correspondientes a los protones de los anillos A y C (Seeger, 1992) que fueron asignadas de acuerdo a la bibliografía con 6.77 y 6.84 ppm para el protón en C-3 y C-3'' respectivamente que aparecen como singletes al igual que en la luteolina, 6.25 y 6.44 ppm para H-6 y H-6'', y 6.49 ppm para H-8, cuya asignación es sencilla simplemente comparando con los señales propias de la amentoflavona o la 5',3'''-diOH-amentoflavona. Las señales

de los protones correspondientes del anillo B aparecen en cambio hasta el intervalo 9 ppm, y por lo general por encima de los valores de ppm de los protones respectivos de los anillos A y C. La señal para los en protones H-6' aparece por regla general sobre 7.2-7.9 ppm como un doblete (Seeger, 1992), de ahí que de acuerdo a ello se asignaron respectivamente H-6' y H-6''' para las señales a 7.62 y 7.66 ppm. No se detectaron las señales correspondientes a los protones de C-3' y C-5' de la 5',3'''-diOH-amentoflavona, lo que indica la existencia de hidroxilo en posición OH-3' y que C-5' está como en el compuesto anterior implicado en el enlace flavonoídico, lo mismo que C-8'' del que tampoco se detecta ninguna señal en el espectro de protón.

En resumen, podemos deducir finalmente que el Compuesto XI se correspondería con la **5'-OH-Amentoflavona (luteolina-(5',8'')-apigenina)**, cuya fórmula química queda reflejada en la Fig. 6.15. En la 5'-OH-amentoflavona, el monómero correspondiente a la luteolina fue numerado como C y C', mientras que la apigenina lo fue como C'' y C'''.

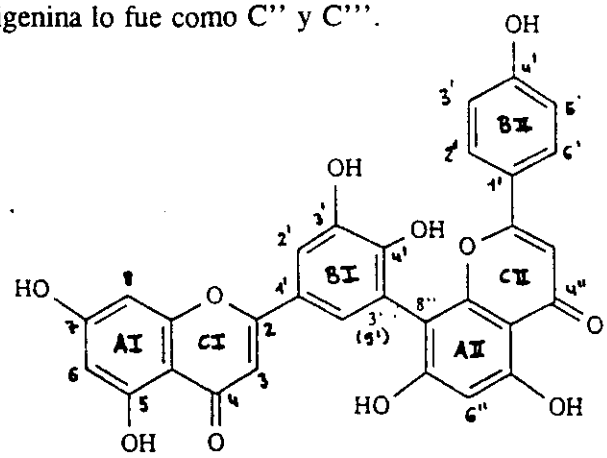


Fig. 6.15.: 5'-OH-Amentoflavona ($C_{30}H_{18}O_{11}$)
(luteolina-5',8''-apigenina)

No obstante, y debido a ciertos problemas de interpretación que surgieron con el Compuesto XI, hemos querido hacer aquí una aclaración para evitar ciertos problemas puramente metodológicos. En la luteolina, los dos hidroxilos del anillo B se sitúan respectivamente en los carbonos 3' y 4'. Por ello, en cualquiera de las biluteolinas identificadas en esta Tesis Doctoral, cuando llevamos a cabo su numeración química respecto de la luteolina, tuvimos muy en cuenta la posición de los grupos OH. Así, en el Compuesto I, la 5',8''-biluteolina, el carbono C-5' es el que realiza el enlace interflavonoídico con el anillo AII del otro monómero y C-3' y C-4' portan sendos hidroxilos. Ahora bien, cuando la denominación de un compuesto biflavonoídico se realiza en base a la amentoflavona, pueden surgir ciertos problemas ya que no se tiene en cuenta a la luteolina sino la posición de los grupos hidroxílicos. Esto ha dado lugar a que inequívocamente se numeren por igual carbonos que son distintos, y el ejemplo más claro lo tenemos en el Compuesto I antes nombrado o en cualquier otro de los también identificados. El Compuesto I, la 5',8''-biluteolina se denomina también como 5',3'''-diOH-amentoflavona, es decir, se supone que C-5' es uno de los carbonos del anillo AI que lleva un grupo hidroxilo y por lo tanto difiere totalmente del mismo caso si realizamos la numeración respecto de la biluteolina, donde interviene en el enlace interflavonoídico. Estos problemas de índole metodológico no tendrían mayor importancia si en la bibliografía no existieran errores de asignación

de las señales correspondientes a cada carbono por lo antes comentado. En el caso de la 5'-OH-amentoflavona, es frecuente encontrar como las señales de la RMN correspondientes a C-5' se asignan a C-3' y viceversa. Algo semejante ocurre con C-2' y C-6'. En ambos casos se trata de carbonos simétricos y por lo tanto sus señales son muy cercanas. Pero en el caso de C-3' y C-5' en la luteolina o en una biluteolina, C-3' porta un hidroxilo y C-5' no, por lo que se pierde tal simetría y los errores de asignación son graves. Así, es frecuente encontrarnos con resultados que comparan C-2' de un compuesto con C-6' de otro, o C-3' de uno con C-5' de otro, entendiendo que se trata del mismo carbono. Para eliminar estos malentendidos, en todo momento seguimos las indicaciones de Agrawal (1989), que en su magnífica recopilación de espectros de ^{13}C-RMN de los tipos flavonoídicos conocidos, infería que en el caso de las biluteolina o de la luteolina misma, C-3' corresponde al carbono que porta el hidroxilo y C-5' al que en la luteolina no lo lleva. De esta manera, las asignaciones respectivas para C-2' y C-6', y C-3' y C-5' se invirtieron respecto de algunas citas de la literatura.

Tabla 6.11a.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto XI.

Carbonos	Compuesto XI	Amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-amento.[1]
2	163,8	164,1	163,9
2''	164,2	164,3	164,0
3	103,0	103,2	102,9
3''	102,6	102,8	102,5
4	182,2	181,9	181,9
4''	181,7	182,2	181,5
5	161,1	161,6	161,4
5''	160,7	160,8	160,4
6	99,0	98,8	98,7
6''	98,9	99,1	98,6
7	164,2	163,9	164,0
7''	162,6	161,9	161,7
8	93,9	94,2	93,8
8''	**104,4**	**104,1**	**104,0**
9	157,5	157,6	157,3
9''	154,7	154,7	154,5
10	103,8	104,0	103,6
10''	103,8	104,0	103,6
1'	120,5	120,3	120,6
1'''	121,6	121,4	121,8
2'	112,0	131,6	112,1
2'''	128,3	128,3	118,6

Carbonos	Compuesto XI	Amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-amento.[2]
3'	146,2	116,4	145,5
3'''	115,8	116,0	145,8
4'	149,0	159,6	148,2
4'''	161,7	161,1	149,4
5'	**120,4**	**121,7**	**120,0**
5'''	115,8	116,0	115,5
6'	122,5	127,9	122,2
6'''	128,3	128,3	118,6

[1] Amentoflavona según Markham & col. (1987).
[2] 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).

Tabla 6.11b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto XI.

Protones	Compuesto XI	Amentoflavona[1]	5',3'''-diOH-amen.[2]
3	6,77s	6,74 s	6,68 s
6	6,25 d (2)	6,22 d (2)	6,21 d (2)
8	6,49 d (2)	6,50 d (2)	6,45 d (2)
2'	7,55 d (2)	8,07 d (2)	7,51 d (9)
3'	---	7,19 d (9)	
5'	---	----	----
6'	7,62 d (2)	7,99 dd (2;9)	7,52 d (2)
3''	6,84 s	6,81 s	6,72 s
6''	6,44 s	6,45 s	6,41 s
2'''	7,66 d (9)	7,57 d (9)	7,09 d (2)
3'''	**6,77 d (9)**	**6,77 d (9)**	-
5'''	6,77 d (9)	6,77 d (9)	6,70 d (8)
6'''	7,66 d (9)	7,57 d (9)	7,07 dd (2;8)
OH-5	13,09 s	-	13,01 s
OH-5''	12,97 s	-	13,14 s

[1] Amentoflavona según Markham & col. (1987).
[2] 5',3'''-diOH-amentoflavona según Geiger & col. (1988).

6.1.1.12. ACIDO BARTRAMICO

(Compuesto XII) (luteolina-(8,2'')-ácido protocatéquico)

El Compuesto XII fue identificado como el **Acido Bartrámico**, y ya con anterioridad se conocía de *Bartramia pomiformis* (Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b), en honor de cuya especie se denominó la luteolina-(8,2'')-ácido protocatéquico. En sí el Acido Bartrámico es un flavonoide un tanto especial, ya que posee por un lado el típico esqueleto monomérico de la flavona luteolina, pero tiene la particularidad de en posición C-8 portar un grupo ácido, y más concretamente el ácido protocatéquico. El compuesto resultante es un ácido con esqueleto de flavonoide, que generalizando, pertenece a los conocidos como **ácidos flavonoídicos**. Además del ácido bartrámico se conoce otro compuesto similar en *Hypnum cupressiforme* (Sievers, 1992), que fue denominado como ácido hípnico. Trennheuser (1992) identificó el ácido protocatéquico en *Anthoceros agrestis*, por lo que no debe extrañarnos la presencia de éste ácido como un sustituyente más en la molécula de luteolina de ciertas especies de musgos.

Exhibe unas características cromatográficas en TLC (Rf, absorción al ultravioleta) muy semejantes a las de la luteolina, ya que se observa a la luz ultravioleta con un color púrpura (violeta oscuro) que vira hacia la típica fluorescencia amarillo-anaranjada tras revelar la placa cromatográfica con NA (Markham & col., 1988). Su Rf es cambio, es sensiblemente diferente al de cualquier aglicona monoflavónica (flavonoide no glicosilado) o biflavónica, ya que sí presenta un desarrollo notable en el sistema acético-15% donde alcanza un Rf de 20, y en cambio en TBA no se mueve con el frente como hacen las agliconas, sino que llega únicamente a alcanzar un Rf de 63. En el sistema desarrollado en poliamida, a menudo aparece solapado con el Compuesto VIII, aunque en celulosa se separan. En ambos casos, la baja concentración en que se presenta hace complicada su identificación por TLC. Los resultados obtenidos mediante la aplicación de reactivos específicos tales como amoniaco, Benedict o NA, nos llevaron a concluir que el Compuesto XII debía poseer grupos o-diOH en 3',4' o bien en 4',5' y que poseía al menos un agrupamiento o-diOH que incluía 4'-OH, por lo que fácilmente debía tratarse de un compuesto relacionado con la luteolina, pero en ningún caso parecía tratarse de una biluteolina ni de la flavona en sí misma. Su retención cromatográfica, sobre todo en el sistema Z_t (acético 15%/celulosa) con un Rf de 20 podría ser indicativo de acuerdo a Seeger (1992) de la existencia de un **ácido orgánico** en la molécula.

Analizando su espectro de ultravioleta, siguiendo a Markham (1982), observamos que en el espectro en NaOMe respecto del de MeOH se observa un efecto claramente batocrómico en la banda I de +58 (404 por 346 nm), lo que es indicativo de flavonas que poseen un hidroxilo libre en posición 4' del anillo B (4'-OH). El espectro en NaOAc respecto al de metanol supone de nuevo un efecto batocrómico pero sólo en la banda II de +13 nm (268/255), mientras que la banda I no se modifica. Estos datos son indicativos de la existencia de hidroxilo libre en posición 7 (7-OH) de una flavona. La adición de H_3BO_3 al NaOAc supone un claro efecto ipsocrómico de -6 nm en la banda II y un efecto batocrómico de +25 nm en la banda I. Estos hechos vienen a confirmar que se trata de una flavona con o-diOH en el anillo B, así como la inexistencia de un grupo 3-OH, es decir, que se trata de una flavona y no de un flavonol (Salm, 1992). El espectro en $AlCl_3$ respecto del de

MeOH, supone un efecto batocrómico de +21 nm (276/255) en la banda II y de +83 nm (429-346) en la banda I, lo que indica la existencia de un grupo hidroxilo libre en posición 5 del anillo A (5-OH) que se confirma tras estudiar el nuevo espectro resultante de añadir ClH. En resumen, y de acuerdo a su espectro de ultravioleta, el Compuesto XII debía tratarse de un compuesto que posee un agrupamiento o-diOH en posición 3',4' del anillo B, y con hidroxilos libres en 5-OH y 7-OH, así como en 4'-OH. La flavona que se ajusta a estos datos es la luteolina, aunque como por Rf en TLC habíamos descartado que se tratara de la propia luteolina, debía tratarse de un compuesto muy cercano a ésta que con seguridad portara un grupo ácido causante de ese relativo alto Rf en acético 15% en celulosa, en comparación con la luteolina y las biluteolinas ya identificadas hasta ahora.

El Espectro de Masas (FAB-EM) del Compuesto XII muestra un ión $[M-H]^+$ de 437 um, con una intensa señal para M-44 ($-CO_2$) típica de un ácido orgánico para 152 um. Estos datos nos hicieron pensar que el Compuesto XII fuese un monómero flavonoídico, **derivado de la luteolina**, que portara un grupo ácido en su molécula.

En el espectro de ^{13}C-RMN la asignación de las señales correspondientes a cada carbono se realizó mediante comparación directa con la bibliografía (Geiger & Bokel, 1989; Seeger, 1992) (ver Tabla 6.12a al final de la discusión del compuesto). En total se detectaron 22 señales, y una de ellas, la señal a 167.7 ppm es típica del carbono carboxílico (-COOH) de los ácidos orgánicos (Seeger & col., 1992b), lo que vino a confirmar lo dicho anteriormente respecto a la existencia de un grupo ácido en la molécula. La señal a 182.0 ppm es debida al átomo de carbono correspondiente a una flavona (Agrawal, 1989), concretamente a C-4, cuya similitud con la señal correspondiente de la luteolina, indica de nuevo que el Compuesto XII debe ser un derivado de ésta. En los espectros de ^{13}C-RMN de los 5,7-dihidroxiflavonoides (como la luteolina), las señales para C-6 y C-8 se encuentran siempre entre 90 y 100 ppm, con la señal para C-6 manifiesta en un nivel inferior (es decir a valores de ppm mayores) respecto de C-8 (Österdahl, 1983). Según lo anterior, dentro de dicho intervalo pudimos asignar la señal correspondiente al carbono C-6 a 98.4 ppm, pero a niveles de ppm más bajos no encontramos la correspondiente a C-8. La intensa señal a 104.8 ppm, que no aparece dividida, se asignó a C-8 en comparación directa con el espectro de la filonotisflavona. Esta señal correspondiente a C-8 es sensiblemente distinta respecto a la de la luteolina (93.8 ppm) pero similar a la de la filonotisflavona (103.5 ppm), por lo que dedujimos que el carbono **C-8** del Compuesto XII debía estar implicado, al igual que en la filonotisflavona (C-8'') en algún tipo de enlace. Por su espectro de masas renunciamos a la posibilidad de que el Compuesto XII fuese una biflavona o más concretamente una biluteolina (569 um), por lo que C-8 no tendría que estar implicado en ningún enlace de tipo interflavonoídico, sino entre un monómero flavonoídico (luteolina) y posiblemente un ácido. Del resto de señales, tanto C-2, C-3, C-5, C-7, C-9, C-10, C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' y C-6', se asignaron sin problemas a las correspondiente de la luteolina y la filonotisflavona (monómero derecho), lo que vino a confirmar la estructura "base" de luteolina del Compuesto XII, y la existencia de un **único enlace en C-8** al igual que en la filonotisflavona. El resto de señales del espectro de ^{13}C-RMN del Compuesto XII, sospechamos que se corresponderían a los carbonos de un **ácido orgánico**, que se encontraría como sustituyente en el carbono C-8 de una luteolina. Dado que restaban aún por asignar 7 señales correspondientes a otros tantos carbonos, dedujimos que dicho ácido podría corresponderse fácilmente con un **derivado del benzoico** (anillo

bencénico de 6 carbonos más 1 carbono del grupo COOH). Revisando la bibliografía al respecto, sobre este tipo de ácidos y aquellos que se habían identificado en briófitos, encontramos una estructura denominada **ácido protocatéquico** que se ajustaba perfectamente a tales planteamientos.

El ácido protocatéquico es un derivado del ácido benzoico con dos grupos hidroxilos en posición m- y p- respecto al grupo ácido (-COOH) y en posición o-diOH entre ellos (Fig. 6.16). Comparando el espectro de ^{13}C-RMN del ácido protocatéquico con esas 7 señales restantes del Compuesto XII pudo llevarse a cabo la asignación de cada uno de los carbonos (Tabla 5.47). Sólamente la señal para C-2 del ácido protocatéquico no encontraba correspondencia con su respectiva en el Compuesto XII (C-2''), por lo que dedujimos que dicho **C-2''** debía ser el que intervenía en enlace entre el ácido y la luteolina.

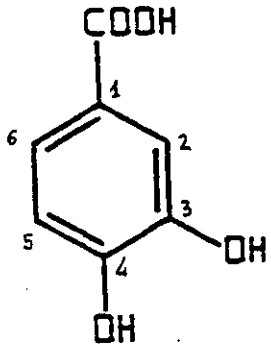


Fig. 6.16.: Acido Protocatéquico ($C_7H_6O_4$).

Si analizamos el espectro de ^{1}H-RMN (ver Tabla 6.12b al final de la discusión del compuesto), observamos que las señales correspondientes a los protones H-3, H-6, H-2', H-5' y H-6' pueden asignarse sin problemas respecto de las correspondientes de la luteolina y la filonotisflavona (monómero derecho), lo que viene a confirmar de nuevo la estructa base de luteolina del Compuesto XII. Respecto a la señal que aparece sobre 13 ppm, a 12.98 ppm como un singlete, corresponde al protón del grupo hidroxilo libre situado en posición 5 de la luteolina, que establece un puente de hidrógeno con el oxígeno correspondiente en posición C-4. La ausencia de la señal correspondiente al protón H-8 de la luteolina, al igual que ocurre en el monómero derecho de la filonotisflavona, indica en concordancia con el espectro de ^{13}C-RMN, que C-8 está implicado en un enlace. Las otras dos señales restantes a 6.88 y 7.39 ppm respectivamente, se asignaron de acuerdo al espectro de ^{1}H-RMN del ácido protocatéquico como H-5'' y H-6''. La ausencia respecto al espectro de éste de la señal para H-2'' indica la existencia de un enlace en dicha posición.

En resumen, podemos concluir que el Compuesto XII sería una luteolina que en posición 8 se une al carbono 2 (C-2'') del ac. protocatéquico, y cuya denominación es **luteolina-(8,2'')-ácido protocatéquico**. Esta estructura identificada ya por Seeger (1992) en la misma especie (*Bartramia pomiformis*, BP-8), se denominó en honor a ella como **Acido Bartrámico**, y su fórmula queda reflejada en la Fig. 6.17. Estas conclusiones concuerdan con la espectrometría de masas ya comentada. El Compuesto XII tiene un ión M^+ de 438 um, que corresponde por un lado a la luteolina ($C_{15}H_{10}O_6$) con 286 um (M^+) y por otro al ácido protocatéquico ($C_7H_6O_4$) con 154 um (M^+). Si sumamos ambas cifras y le restamos 2 H^+ que se pierden como en el enlace entre ambas moléculas tendremos el ión M^+ de 438 um que corresponde al Compuesto XII.

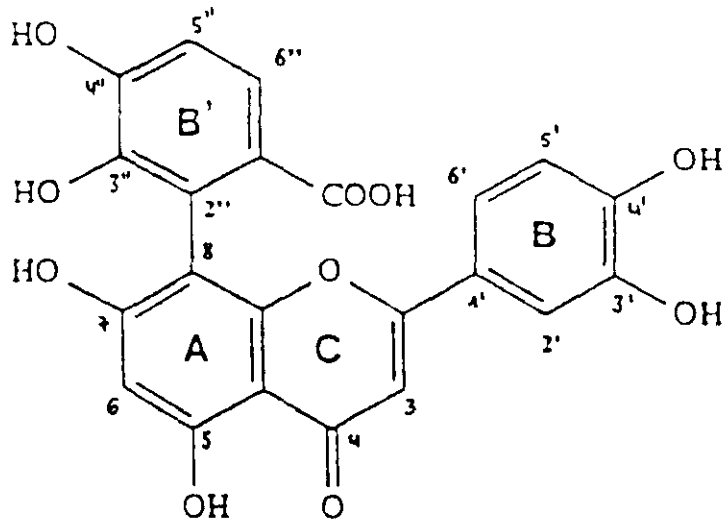


Fig. 6.17.: Acido Bartrámico ($C_{22}H_{14}O_{10}$)
(luteolina-8,2''-ácido protocatéquico)

Tabla 6.12a.: Datos de ^{13}C-RMN del Compuesto XII.

Carbono	Compuesto XII	Filonot.[1] (i)	Filonot.[1] (d)	Luteol.[2]	Ac. Protocatéquico
2/2''	163,6	166,5	163,8	163,9	-
3/3''	102,1	106,4 t.	102,4 t.	102,8	-
4/4''	182,0	181,7	181,1	181,6	-
5/5''	159,7	161,1	160,3	161,4	-
6/6''	98,4	98,6 t.	98,3 t.	98,8	-
7/7''	161,7	163,7	161,4	164,1	-
8/8''	**104,8**	93,0 t.	**103,5**	93,8	-
9/9''	154,3	157,2	154,3	157,2	-
10/10''	103,4	102,9	103,2	103,7	-
1'/1'''	121,9	124,0	121,7	121,5	-
2'/2'''	113,5	118,7	113,5 t.	113,3	-
3'/3'''	145,4	144,3	145,7	145,7	-
4'/4'''	149,3	148,3	149,4	149,6	-
5'/5'''	115,5	114,6 t.	115,5 t.	116,0	-
6'/6'''	118,4	120,5 t.	118,9 t.	118,9	-
1/1'' *	123,3	-	-	-	121,7
2/2'' *	**120,6**	-	-	-	**115,1**
3/3'' *	143,8	-	-	-	144,8
4/4'' *	148,7	-	-	-	149,9
5/5'' *	113,6	-	-	-	116,5
6/6'' *	122,1	-	-	-	121,8
COOH	167,7	-	-	-	167,2

[1] Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989), (d): monomero derecho, (i): monomero izquierdo.
[2] Luteolina según Markham & col. (1982).
* Resonancias correspondientes a los carbonos del ácido protocatéquico.
t. Los carbonos terciarios fueron determinados por el método DEPT.

Tabla 6.12b.: Datos de ^{1}H-RMN del Compuesto XII.

Protón	Compuesto XII	Filonot.[1] (i)	Filonot.[1] (d)	Luteol.[2]	Ac. Protocatéqu.
3/3''	6,56s	6,06s	6,62s	6,69s	-
6/6''	6,25s	5,75 d(2)	6,27s	6,22 d(2)	-
8/8''	—	6,07 d(2)	—	6,47 d(2)	-
2'/2'''	6,98 d(2)	-	7,02 d(2)	7,43 d(2)	-
5'/5'''	6,69 d(8,5)	7,01 d(8,5)	6,74 d(9)	6,92 d(8)	-
6'/6'''	6,93 dd(9;2)	7,24 d(8,5)	7,00 dd(9;2)	7,44 dd(8;2)	-
OH-5/5''	12,98s	12,73s	13,01s	13,00s	-
2	-	-	-	-	7,32 d(2)
5/5''	6,88 d(8,5)	-	-	-	6,77 d(8)
6/6''	7,39 d(8,5)	-	-	-	7,27 dd(8;2)

[1]Filonotisflavona según Geiger & Bokel (1989), (d): monómero derecho, (i): monómero izquierdo.
[2]Luteolina según Geiger & col. (1987).
* Resonancias correspondientes a los protones del ácido protocatéquico.

6.1.1.13. DIOSMETINA-7-O-TRIGLICOSIDO (Compuesto XIII)

(Diosmetina-7-O-[2,4-di-O-(α-L-ramno-piranosil)]-β-D-glucopiranósido)

La identificación del Compuesto XIII se llevó a cabo mediante métodos cromatográficos y cromatografía comparativa con patrón, así como mediante espectroscopía de UV-vis, estableciendo las comparaciones correspondientes entre los datos obtenidos y los aportados anteriormente para este mismo compuesto en la bibliografía por Österdahl (1978b y 1979a), quien lo aisló e identificó por primera vez en la especie *Dicranum scoparium*. No se realizaron pruebas de EM o RMN por ser un estudio auxiliar para completar el espectro flavonoídico de *Dicranum scoparium*, con excepción y como ya se ha manifestado con anterioridad del nuevo compuesto identificado en la mencionada especie, la 5',3'''-diOH-robustaflavona. Estas mismas consideraciones pueden aceptarse para los denominados sucesivamente Compuestos XIV y XV. Su movilidad cromatográfica, sobre todo su escaso desarrollo en la dimensión del TBA, indica la existencia de flavonoides glicosilados. De acuerdo a Markham (1982) y Mabry & col. (1970), la posición cromatográfica en TLC del Compuesto XIII, así como su espectro de UV se corresponden con los de **flavonas glicosiladas**, y más concretamente con él de la **Diosmetina-7-O-triglicósido** (Fig. 6.18).

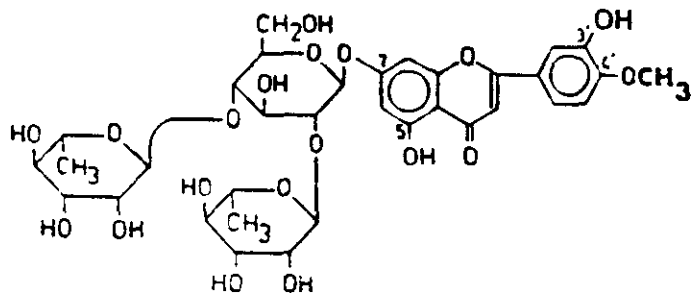


Fig. 6.18.: Diosmetina-7-O-triglicósido.

6.1.1.14. APIGENINA-7-O-TRIGLICOSIDO (Compuesto XIV)
(Apigenina-7-O-[2,4-di-O-(α-L-ramnopiranosil)]-β-D-glucopiranósido)

El Compuesto XIV, que identificamos como la Apigenina-7-O-triglicósido, fue aislado por primera vez por Nilsson & col. (1973) en la misma especie en que nosotros lo hemos hecho (*Dicranum scoparium*), y posteriormente en la misma especie (Österdahl, 1979a) y en *Hylocomium splendens* (Becker & col., 1986). Su movilidad cromatográfica sobre todo en la dimensión del TBA, su coloración mediante el uso de reactivos específicos hacia tonalidades amarillo-verdosas, así como su espectro de ultravioleta, son típicos de flavonas glicosiladas (Markham, 1982; Mabry & col., 1970) y más concretamente de la Apigenina-7-O-triglicósido (Becker & col., 1986). El espectro de ultravioleta en NaOMe muestra un típico efecto batocrómico en la banda I de +51 nm (384/334) respecto al del metanol, propio de flavonas con un hidroxilo libre en posición 4'-OH. El espectro en NaOAc refleja un ligero efecto batocrómico en la misma banda del espectro, ocasionado por la existencia de 7-OH libre. La adición de H_3BO_3 al anterior no modifica la absorbancia en ninguna de las dos bandas, indicando la inexistencia de o-diOH en el anillo B. El espectro en $AlCl_3$ vuelve a mostrar un nuevo efecto batocrómico en la banda I del espectro, indicando la existencia de 5-OH libre en el anillo A, no existiendo modificación alguna en el espectro de ClH. Resumiendo, el Compuesto XIV ha de reunir 5,7 y 4'-OH así como carecer de o-diOH en el anillo B. A estas características se ajusta precisamente la apigenina (5,7,4'-triOH-flavona). Conociendo por los resultados de la TLC que ha de ser una **apigenina glicosilada** y sabiendo por la bibliografía que en *Dicranum scoparium* se había identificado con anterioridad la **Apigenina-7-O-triglicósido,** concluímos que el Compuesto XIV debe corresponderse con dicha flavona triglicosilada, cuya fórmula queda reflejada en la Fig. 6.19.

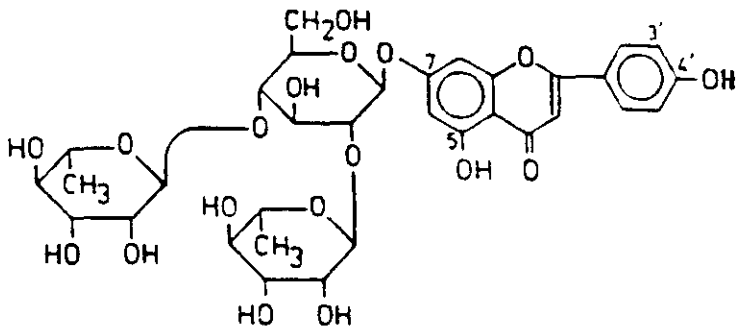


Fig. 6.19.: Apigenina-7-O-triglicósido.

6.1.1.15. LUTEOLINA-7-O-NEOHESPERIDOSIDO

(Compuesto XV)

[neohesperidósido = (2-O-α-L-ramnopiranosil)-β-D-glucopiranósido].

Esta flavona-O-diglicósido, también conocida como **luteolina-7-O-ramnoglucósido**, ya había sido aislada e identificada por primera vez en la misma especie estudiada por nosotros (*Dicranum scoparium*) por Nilsson & col. (1973) y posteriormente por Österdahl (1979a), así como en *Hylocomium splendens* (Becker, 1986; Becker & col., 1986), *Hedwigia ciliata* (Österdahl, 1979 a y b) y *Bryum pseudotriquetrum* y *B. schleicheri* (Stein, 1988b; Stein & Zinsmeister, 1991).).

En su identificación se han seguido básicamente las mismas consideraciones metodológicas que se expusieron para el Compuesto XIII. En general, ésta se llevó a cabo mediante cromatografía comparativa con patrón en los diversos sistemas utilizados, así como con respecto a los datos presentados básicamente por Stein (1988b)

Su movilidad cromatográfica, su coloración amarillo-verdosa a la luz ultravioleta tras el uso de reactivos específicos, así como su espectro de ultravioleta son típicos de flavonas **diglicosiladas** (Stein, 1988b; Markham, 1992; Mabry & col., 1970), e indican posiblemente que el Compuesto XV debe tratarse de un derivado de la **luteolina** sustituído en C-7 (Stein & Zinsmeister, 1990). Resumiento, podemos afirmar que el Compuesto XV es la **Luteolina-7-O-neohesperidósido** (Fig. 6.20.). De hecho, la identificación de dicho compuesto se corroboró mediante cromatografía comparativa con patrón por HPLC, utilizando una muestra patrón de Luteolina-7-O-neohesperidósido, al igual que se hizo para el Compuesto XIV.

El espectro de masas, así mismo, muestra una señal de 595 um, típica de flavonas diglicosiladas (Stein, 1988b), que corrobora lo comentado anteriormente.

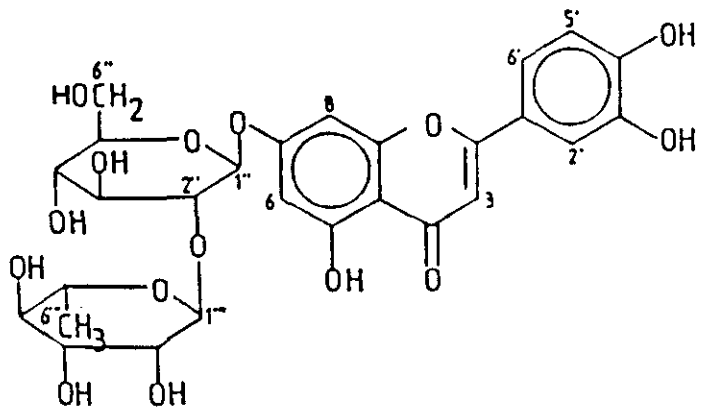


Fig. 6.20.: Luteolina-7-O-neohesperidósido.

6.1.1.16. ACIDOS FENOLICOS Y CUMARINAS

El estudio de los ácidos fenólicos de musgos está adquiriendo cada día un mayor interés, como muestra la existencia de distintos trabajos al respecto (Salm, 1994 en *Fontinalis* spp.; Davidson & col., 1989, etc.).

En nuestro trabajo hemos querido poner de manifiesto su presencia en la especies estudiadas, aunque no hayamos profundizado en su identificación. La mayor parte de las especies estudiadas mediante ensayo por 2D-TLC pertenecientes a la familia *Bartramiaceae*, sintetizan ácidos fenólicos, cuya abundancia varía de unas especies a otras.

Es particularmente interesante el contenido en ácidos fenólicos de las siguientes especies: *Conostomum pusillum*, *Catoscopium nigritum*, *Leiomela bartramioides*, *L. piligera*, *Anacolia intertexta*, *A. menziesii*, *Breutelia azorica*, *B. elongata* y *Philonotis calcarea*.

La acción protectora de los ácidos fenólicos contra la depredación por herbívoros y su posible rol en las propiedades antibióticas de los musgos (Davidson & col., 1989; Harborne, 1988b; Banerjee & Sen, 1979) nos hace pensar en que habrán jugado, al igual que los flavonoides, un papel fundamental en la evolución de los musgos, tanto desde un punto de vista ecológico (competición con microorganismos del suelo) como de autodefensa contra agentes patógenos, principalmente virus y bacterias.

Es por ello que estamos seguros que la química de tales ácidos fenólicos desempeñará un importante papel en la quimiosistemática y filogenia de los briófitos en un futuro no lejano, cuando el número de estudios realizados aumente lo suficiente.

La única diferencia significativa en la composición en ácidos fenólicos de las especies estudiadas es el **ácido clorogénico**, sólo presente en la muestra de *Bartramia pomiformis* procedente de El Escorial (Madrid), identificado de acuerdo a Wagner & col. (1983). Se trata de un ácido fenólico glicosilado (Fig. 6.21), derivado del ácido cinámico, cuya función en las plantas con semilla parece estar relacionada con la regulación del crecimiento, sobre todo con la maduración de frutos (Barceló & col., 1987). Ron & col. (1990) identificaron igualmente este ácido fenólico en 10 especies de musgos españoles, de ahí que no sea rara su presencia en *Bartramia pomiformis*. Por su parte, la molécula precursora, el ácido cinámico, está relacionada con la biosíntesis de lignina y de los flavonoides.

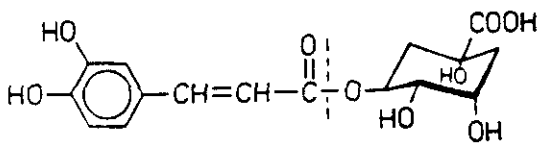


Fig. 6.21.: Acido clorogénico

En cuanto a cumarinas, únicamente queremos mencionar que, las investigaciones acerca de este tipo de compuestos, muy relacionados con los flavonoides y ácidos fenólicos, están prácticamente iniciándose. Conocemos el trabajo de Jung (1993-94) quién identifica cumarinas en los musgos *Tetraphis pellucida*, *Polytrichum formosum*, *P. alpinum*, *P. tenellum*, *P. juniperinum*, *P. commune*, *Atrichum undulatum*, *Pogonatum comossum* y *P. urnigerum*. Curiosamente, dichas especies se caracterizan por no sintetizar flavonoides (Anexo 1), por lo que las cumarinas podrían ser los compuestos que cumplieran las funciones a éstos encomendadas, aunque obviamente debe aún probarse. Unicamente hemos querido hacer mención a su reciente identificación y aislamiento en diversas especies de musgos, por lo importancia taxonómica, fisiológica y médica que pueda tener en un futuro próximo.

6.1.2. Flavonoides en *Bartramiaceae* Schwaegr. y *Dicranaceae* Schimp.

6.1.2.1. Distribución de flavonoides en *Bartramiaceae* Schwaegr.

A continuación presentamos de forma tabulada (Tabla 6.13), una recopilación realizada a partir de los resultados obtenidos mediante ensayo por cromatografía bidimensional en capa fina, que más tarde discutiremos. Estos se presentan, separando los géneros de la familia *Bartramiaceae* por sus respectivas subfamilias, de acuerdo a Griffin III & Buck (1989). Las secciones respectivas proceden de Engler (1924) para *Conostomum*, Corley & col. (1981) para *Bartramia* y, Griffin III & Buck (1989) para *Breutelia* y *Philonotis*.

Tabla 6.13.: Flavonoides en la familia *Bartramiaceae*.

TAXON	B	A	D	F	C	RT	DHF	Ac.F	Flav.
1. Subfamilia Conostomoideae									
1.1. Conostomum									
1.1.1. Sección Cleistocarpidium									
C.cleistocarpum	-	-	+++	-	-	-	-	+	-
1.1.2. Sección Eu-Conostomum									
C.boreale	-	-	++	-	-	-	-	-	+
C.macrotheca	-	-	++	-	?	?	-	++	+++
C.pentastichum	-	-	+++	?	+	+	-	+	+++
C.pusillum	-	-	-	-	?	?	-	+++	?
C.tetragonum	-	-	++	-	-	-	-	-	+
2. Subfamilia Bartramioideae									
2.1. Bartramia									
2.1.1. Sección Bartramia									
B.halleriana	+++	++	+++	++	-	++	-	+	-
B.mossmanniana*	+++	+	+++	++	-	++	-	+	+++

TAXON	B	A	D	F	C	RT	DHP	Ac.F	Flav.
B.pomiformis	+++	++	+++	+++	++	+	-	+	++
2.1.2. Sección Ithyphyllae									
B.afroithyphylla*	-	-	+++	++	++	+	+	?	+++
B.angustifolia*	-	-	+++	-	-	-	+++	++	+
B.ithyphylla	-	-	++	+++	+	+++	++	++	++
B.longifolia	-	-	++	-	-	?	-	+	+
B.mathwesii	-	-	+	-	-	?	-	+	?
B.papillata	-	-	+++	++	++	++	-	+	++
B.patens	-	-	+++	++	++	+	-	+	++
B.polytrichoides	-	-	-	-	-	-	-	?	+
B.potosica	-	-	++	++	++	++	-	++	+
B.pruinata	-	-	-	-	-	?	-	?	++
B.rufescens	-	-	++	++	-	-	-	++	+++
B.ruwenzoriensis*	+	-	+++	++	++	+	+	-	+++
B.vulcanica*	-	-	+++	+++	++	+	+++	-	+++
2.1.3. Sección Strictidium									
B.stricta	-	-	+	+++	++	+++	-	-	+++
2.2. Catoscopium									
C. nigritum	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
2.3. Leiomela									
L.bartramioides*	-	-	++	?	-	+	-	+++	+++
L.deciduifolia	-	-	+++	+	+	+	-	+	+++
L.lopezii*	-	-	+++	+	+	+	++	+	+++
L.piligera	-	-	++	+	?	+	-	+++	+++
2.4. Plagiopus									
P.oederiana	+++	++	++	++	+	+	-	+	+
3. Subfamilia Breutelioideae									
3.1. Anacolia									
A.intertexta**	-	-	+++	++	++	+	-	+++	++
A.laevisphaera**	++	+	++	+	?	+	-	+	+++
Bartramia rosea	++	++	++	+	+	+	+	++	+++
A.menziesii	-	-	+++	++	+	+	-	+++	++
A.subsessilis*	+	+	+	++	+	++	?	+	+++
A.webbii	-	-	+++	++	+	+	?	-	+++
3.2. Breutelia									
3.2.1. Sección Acoleus									
B.allionii	-	-	+	-	-	?	-	++	+
B.chrysea	-	-	++	-	-	?	-	+	+
B.eugeniae	-	-	-	-	-	-	-	+++	?

TAXON	B	A	D	F	C	RT	DHF	Ac.P	Flav.
B.integrifolia	-	-	-	-	-	?	-	++	+
B.mniocarpa	-	-	-	-	-	-	-	++	+
B.pendula	-	-	-	-	+	?	-	+++	+
B.subarcuata	-	-	-	-	-	?	-	+	+
B.tomentosa	-	-	-	-	+	+	-	-	+
3.2.2. Sección Anacoliopsis									
B.affinis	-	-	++	-	-	-	-	+	++
3.2.3. Sección Breutelia									
B.arundinifolia	-	-	+	-	+	++	-	+	++
B.austro-arcuata	-	-	+	-	+	++	-	++	++
B.boliviensis	-	-	-	-	-	-	-	+	?
B.chrysocoma	-	-	+	?	+	++	-	++	++
B.deflexifolia	-	-	+	?	-	?	-	++	++
B.diffracta	-	-	?	-	+	++	?	+	++
B.humbertii	-	-	-	-	-	-	-	+	?
B.patens	-	-	?	-	-	++	-	+	++
B.squarrosa	-	-	?	?	+	-	?	++	?
B.sthulmanni	-	-	+	-	+	++	?	-	+
3.2.4. Sección Lycopodiobryum									
B.azorica	-	-	-	-	+	+	-	+++	++
B.elongata**	-	-	-	-	+	?	?	+++	+
3.2.5. Sección Polyptichium									
B.lorentzii	-	-	-	-	+	+	-	++	+
B.polygastrica	-	-	-	-	+	+	-	++	+
3.3. Philonotis									
3.3.1. Sección Catenularia									
P.scabrifolia	-	-	++	-	-	+	-	+	+
3.3.2. Sección Euphilonotis									
P.andina	-	-	+	++	+	+	-	+	+++
P.australis	-	-	+	++	?	?	-	+	+++
P.caespitosa	-	-	++	+	+	++	-	++	++
P.calcarea*	-	-	+	+	+	++	-	+++	+++
P.capillaris	-	-	+	+++	+	+	-	+	++
P.fontana*	-	-	+	+++	+	+	+	++	++
P.lancifolia	-	-	+	++	?	++	-	++	++
P.marchica	-	-	+	+	+	?	-	+	+++
P.seriata	-	-	+	-	?	?	-	+	+++
P.turneriana	-	-	+	++	?	+	-	+	++
3.3.3. Sección Lelocarpus									
P.tjibodensis	-	-	+	++	+	++	-	+	++

TAXON	B	A	D	F	C	RT	DHF	Ac.F	Flav.
3.3.4. Sección Philonotula									
P.arnelli	-	-	+++	+	-	+	-	++	+
P.glaucescens	-	-	+++	++	-	++	-	+	++
P.hastata	-	-	++	++	+	+	-	++	?
P.heterophylla	-	-	+	+	-	+	-	++	++
P.laxissima	-	-	++	+	?	++	-	+	+
P.revoluta	-	-	+++	+	-	+	-	++	++
P.rigida	-	-	+++	?	-	+	-	++	+
P.secunda	-	-	+++	?	+	?	-	+	+
P.sphaerocarpa*	-	-	+++	++	+	++	-	+	+
P.tenuis	-	-	-	-	-	-	-	++	?
P.thwaitesii	-	-	++	+	?	++	-	+	++
P.tomentella	-	-	+	+	-	+	-	+	+
P.uncinata	-	-	+	?	-	++	-	+	+

B:bartramiaflavona, **A:**anhidrobartramiaflavona, **D:**2,3-dihidro-filonotisflavona, **F:**filonotisflavona, **C:**dicranolomina, **RT:**5',3'''-diOH-amentoflavona y/o 5',3'''-diOH-robustaflavona, **DHF:** otros dihidroflavonoides, **Ac.F:** ácidos fenólicos, **Flav.:** otros flavonoides.
+ presencia, - ausencia, ? dato dudoso/tentativo.
* especie interesante por poseer posibles nuevos compuestos.
** especie interesante por sintetizar posibles nuevos macrociclos.
Concentración: +++ alta, ++ media, + baja (según intensidad de color en TLC).

En todos los géneros investigados de la familia *Bartramiaceae*, y en la mayoría de sus especies, se detectó la presencia de flavonoides, por lo que podríamos afirmar, que la síntesis de compuestos fenólicos tipo flavonoide ocurre en la mayoría de las especies estudiadas en la familia. De los flavonoides identificados, casi todos ellos pertenecieron al tipo estructural de los biflavonoides, flavonoides que parecen ser los que mayoritariamente sintetiza la familia. Markham (1988 y 1990) indica que se observa una tendencia ya sea a nivel de orden o familia, en el rango taxonómico elegido, a especializarse en la producción de un particular tipo de flavonoides (p.e. flavonoles en *Equisetales*, flavonas en *Lycopodiales* e *Isoetales* y, biflavonas en *Selaginellales* y *Psilophytales*). Esta afirmación la basa principalmente en una diferente respuesta respecto a presiones selectivas que conducen a diferentes rutas biosintéticas. En este sentido, se considera que existe un avance en la evolución dependiendo del grado de elaboración de la ruta elegida. La presencia de ciertos tipos flavonoídicos de forma esporádica o en trazas, puede ser relíctica o indicar dicha presencia algún tipo de parentesco evolutivo. Todo ello concuerda en cierta manera con nuestros resultados, y con los que se disponen acerca de la familia, así como lo expuesto en el Anexo 1. Los **biflavonoides**, en este sentido, parecen ser el tipo de flavonoides en los que se ha **especializado** en sintetizar la familia ***Bartramiaceae***, y la presencia de macrociclos bi y triflavonoídicos en ciertas especies de los géneros *Anacolia*, *Bartramia* y *Plagiopus*, parece indicar la existencia de un elevado grado de parentesco entre estos tres taxones.

Si pasamos a analizar ahora la composición flavonoídica de cada taxón, empezando por el mayor rango taxonómico considerado (subfamilia), vemos que no parece existir una diferencia significativa entre las tres subfamilias de *Bartramiaceae*. En todas ellas se sintetizan los biflavonoides

típicos de la mayor parte de las especies de musgos, aunque eso sí, se observa una tendencia a la reducción en la síntesis de biflavonoides en la subfamilia *Breutelioideae*, considerada como la más evolucionada. A diferencia de *Conostomoideae*, tanto en *Bartramioideae* como en *Breutelioideae* se identificaron biflavonoides macrocíclicos.

La **subfamilia *Conostomoideae***, está compuesta por un único género (*Conostomum*) que se divide en dos secciones, cuya composición flavonoídica es sensiblemente distinta. La sección *Eu-Conostomum*, de la que se estudiaron 5 especies, se caracteriza por la ausencia en ella de biflavonoides macrocíclicos y filonotisflavona, mientras que la concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona es relativamente alta en la mayoría de las especies, salvo en *Conostomum pusillum*, que no sintetiza dicho biflavonoide pero sí es rica en ácidos fenólicos. *Conostomum pentastichum*, a diferencia del resto de especies de la sección, sí sintetiza dicranolomina y 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona, siendo tambien rica en otros flavonoides. Por su parte, la sección *Cleistocarpidium*, sintetiza prácticamente los mismos biflavonoides que la sección anterior: alta concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona así como de otros flavonoides, pero no se identificaron ni dicranolomina ni 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona. Griffin III & Buck (1989) consideran al género ***Conostomum*** como **el menos evolucionado de toda la familia**, por tener rizoides lisos (Hirohama & Iwatsuki, 1980) y filidios dispuestos en 5 filas, así como por otra serie de caracteres menores que ya se definieron en el apartado de antecedentes (pelos axilares tricelulares con célula basal coloreada). La composición biflavonoídica del género parece apoyar tales planteamientos, pues no existen flavonoides que supongan ciclación molecular ni otros tipos flavonoídicos definidos en subfamilias hipotéticamente más evolucionadas. En los TLCs realizados en las diversas especies de la familia *Bartramiaceae* se observaron, así mismo, en algunas especies ciertas manchas violetas que cambiaban a tonalidades amarillo-verdosas tras el uso de reactivos específicos. Este tipo de comportamiento y su Rf, son típicos de flavonas posiblemente glicosiladas. Son particularmente abundantes en las diversas especies del género *Conostomum*. De confirmarse en un futuro, sería la primera cita dentro de la familia *Bartramiaceae* de un flavonoide que no se correspondiera a la estructura de bi- o triflavonoide (excepción hecha del ácido bartrámico), y además vendría a apoyar la hipótesis de que el género *Conostomum* y la subfamilia *Conostomoideae* es la menos evolucionada de la familia *Bartramiaceae*, precisamente por sintetizar flavonas.

En la **subfamilia *Bartramioideae***, de la que se estudiaron 4 géneros, pueden, en primera instancia, separarse dos grupos bien definidos: de un lado los géneros que sintetizan flavonoides cíclicos (*Bartramia* y *Plagiopus*) y de otro los que no (*Catoscopium* y *Leiomela*).

En el género ***Bartramia*** se ha diferenciado la existencia de tres secciones, las cuales pueden separarse perfectamente de acuerdo a su composición flavonoídica:

a) sección ***Ithyphyllae***: sintetiza biflavonoides lineares y entre ellos la 5'-OH-amentoflavona, pero ningún otro tipo de flavonoides. La identificación de un dímero apigenina-luteolina en esta sección debe considerarse como un carácter de poca evolución, frente a las otras dos secciones que únicamente sintetizan biluteolinas, lo que supone la existencia de una hidroxilación más respecto a los dímeros apigenina-luteolina. No sintetiza biflavonoides macrocíclicos, ni ácidos flavonoídicos, y tampoco triflavonoides. Es rica de 2,3-dihidro-filonotisflavona y filonotisflavona. Unicamente *B. pruinata* y *B. polytrichoides* parecen no sintetizar flavonoide alguno. Algunas especies sí sintetizan

otros dihidroflavonoides además de la 2,3-dihidro-filonotisflavona, caso de *B. angustifolia*, *B. ithyphylla* o *B. afro-ithyphylla*. La gran mayoría de sus especies sintetizan ácidos fenólicos.

b) sección ***Bartramia***: a la que pertenece *B. pomiformis*, *B. halleriana* y *B. mossmanniana* entre otras, se caracteriza por la síntesis de macrociclos biflavonoídicos, triflavonoides lineares (triluteolinas) y ácidos flavonoídicos derivados de la luteolina. Sus especies sintetizan biflavonoides lineares pero únicamente biluteolinas (o dímeros con flavanona). La ciclación de sus biflavonoides respecto a la sección anterior podría tomarse como un paso evolutivo avanzado. Al igual que la sección anterior, supuestamente menos evolucionada, es rica en 2,3-dihidro-filonotisflavona, pero por regla general, no se identificó en las especies de esta sección ningún otro dihidroflavonoide.

c) sección ***Strictidium***: sintetiza biflavonoides lineares (biluteolinas o dímeros con flavonona), triflavonoides lineares y macrocíclicos. Que la ciclación de la molécula implique un monómero más se podría considerar como un paso evolutivo adelante. La ausencia en esta sección de ácidos flavonoídicos es difícil de comentar, pues exceptuando la sección anterior, sólo se conocen en *Hypnaceae*. Podría ser por ello una especialización de dicha sección *Bartramia*. A diferencia de las secciones anteriores, la concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona es baja. Tampoco sintetiza ningún otro dihidrobiflavonoide.

En resumen, la composición flavonoídica del género *Bartramia* permite separar sin dificultad las tres secciones que lo componen, desde la aparentemente menos evolucionada *Ithyphyllae* (sin moléculas cíclicas) a las supuestamente más evolucionadas *Bartramia* (biflavonoides macrocíclicos) y *Strictidium* (triflavonoides macrocíclicos). Así mismo, de ello pueden obtenerse diversas consideraciones:

1. La ciclación molecular parece ser un paso evolutivo avanzado en la química flavonoídica del género.

2. La adición de un monómero a los compuestos biflavonoídicos, para la síntesis de triflavonoides, supondría, así mismo, un grado de mayor evolución. Lógicamente, la sección *Strictidium* que reune ambas consideraciones, podría ser considerada la más evolucionada del género.

3. Concentracciones relativamente altas de 2,3-dihidro-filonotisflavona, así como la existencia de otros dihidroflavonoides, serían propios de las especies menos evolucionadas del género que, por lo general, pertenecen a la sección *Ithyphyllae*.

El género ***Catoscopium***, del que sólo se conoce una especie en el mundo (*C. nigritum*), perteneciente también a la flora ibérica, es rico en ácidos fenólicos y por lo general pobre en flavonoides. No se conoce en dicha especie la síntesis de biflavonoide alguno típico de musgos, ni siquiera de los del género anterior. Casas (1991) así como los autores de otras floras muscícolas europeas (Engler, 1924; Herzog; 1926; Augier, 1966), consideran que el género *Catoscopium* no pertenece a la familia *Bartramiaceae* sino a *Catoscopiaceae*. Sin embargo, las investigaciones de Griffin III & Buck (1989), vinieron a demostrar que los pelos axilares de *Catoscopium* eran típicos de la familia *Bartramiaceae* y lo incluyeron dentro de ella, pasando a ser la familia *Catoscopiaceae* sinónima de esta última, como ya mucho antes había considerado Flowers (1935) y Lindberg (1879). Incluso Griffin III & Buck (1989) afirmaban el parentesco existente entre este género y *Plagiopus*, ambos con filidios dispuestos en tres filas, por lo que decidieron incluirlo en la misma subfamilia

Bartramioideae. Sin embargo, la composición flavonoídica de *Catoscopium nigritum* es bastante distinta, ya no sólo a la mayoría de especies de la familia *Bartramiaceae*, sino en particular de la subfamilia *Bartramioideae*. Tanto en *Plagiopus* como en *Bartramia*, género de la misma subfamilia que *Catoscopium*, se identificaron biflavonoides macrocíclicos así como otros biflavonoides de los que carece *Catoscopium*. Incluso en el género *Leiomela*, también de la misma subfamilia, aunque no se identificaron macrociclos, sí se detectó la presencia de otros biflavonoides derivados de la biluteolina. Por ello, creemos que se debe revisar de nuevo la ubicación del género *Catoscopium* dentro de la familia *Bartramiaceae*. A diferencia de Griffin III & Buck (1989), que estudiando sus pelos axilares lo incluyen dentro de la subfamilia *Bartramioideae*, creemos más adecuado, en base a su composición flavonoídica, crear dentro de la familia una subfamilia exclusiva del género que se denominaría **subfamilia *Catoscopioideae***, que englobaría a una única especie (*Catoscopium nigritum*) caracterizada por no sintetizar biluteolinas. En cambio, su pertenencia a la familia *Bartramiaceae* la creemos del todo adecuada gracias a las conclusiones expuestas por los autores antes mencionados.

El género ***Leiomela***, no sintetiza macrociclos biflavonoídicos, pero en cambio sí 2,3-dihidro-filonotisflavona en alta concentracción. En todas sus especies, así mismo, se identificaron la filonotisflavona y la 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona, así como otros flavonoides. *L. bartramioides* y *L. piligera* poseían además altas concentracciones de ácidos fenólicos. En conclusión, la no existencia de macrociclos y la alta concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona, nos permitiría considerar al género *Leiomela* como el **menos evolucionado de la subfamilia *Bartramioideae***. Hirohama & Iwatsuki (1980) exponen el parecido que posee la ornamentación de los rizoides de *Leiomela bartramioides* con los de *Bartramia ithyphylla*. Tal parecido microscópico coincide con la composición flavonoídica, ya que ni *Leiomela* ni la sección *Ithyphyllae* del género *Bartramia* a la que pertenece *B. ithyphylla*, sintetiza macrociclos. El parentesco evolutivo de *Leiomela* con *Bartramia ithyphylla* en base a su composición flavonoídica, nos permitiría concluir que se trata posiblemente del género menos evolucionado de la subfamilia, directamente emparentado con la sección *Ithyphyllae* del género *Bartramia*.

En el género ***Plagiopus***, del que sólo se investigó la especie ibérica *P. oederiana*, se detectó al igual que en *Bartramia*, la existencia de biflavonoides macrocíclicos (bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona), así como 2,3-dihidro-filonotisflavona, filonotisflavona, dicranolomina y 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona. La no existencia de dihidroflavonoides en todo el género, así como las manifestaciones de Griffin III & Buck (1989) respecto a las relaciones de este género con *Anacolia*, ya que presenta fuertes afinidades en la ornamentación de los rizoides con respecto a *Anacolia sinensis* (Hirohama & Iwatsuki, 1980), nos permitiría considerar que el género ***Plagiopus*** es posiblemente el **más evolucionado de la subfamilia *Bartramioideae***. No obstante, de la misma manera que en *Catoscopium*, creemos conveniente realizar una revisión sobre la ubicación de este género en la familia, pues cabe la posibilidad de englobarlo dentro de la sección *Bartramia* del género *Bartramia*, por la existencia de biflavonoides macrocíclicos.

Griffin III & Buck (1989) consideran que el género ***Anacolia*** es el menos evolucionado de los que integran la subfamilia *Breutelioideae*, ya que tiene el aspecto típico del género *Bartramia* desde un punto de vista morfológico, y además, su número cromosomático de n= 7,8 es considerado como un carácer plesiomórfico. Sin embargo, lo engloban en dicha subfamilia en base a la presencia

de ciertas innovaciones subflorales, de pelos axilares bicelulares, así como por su peculiar morfología de cápsula y esporas. Sin embargo, analizando la composición flavonoídica del género *Anacolia*, se demostró la síntesis de biflavonoides macrocíclicos al igual que ocurre en el género *Bartramia* de la familia *Bartramioideae*. Hecho semejante ocurre en el género *Plagiopus*. De acuerdo a estos resultados, la acepción del género *Anacolia* como el menos evolucionado de la subfamilia *Breutelioideae* sería totalmente válida, ya que sintetiza macrociclos típicos de una subfamilia menos evolucionada (*Bartramioideae*). Bajo dichos fundamentos, la síntesis de biflavonoides macrocíclicos en la familia *Bartramioideae* debería considerarse como un carácter de menor evolución que tiende a perderse en la subfamilia más evolucionada de todas, sobre todo en los géneros supuestamente más evolucionados (*Philonotis* y *Breutelia*). Sin embargo, habíamos comentado con anterioridad, que la **ciclación molecular** en el género *Bartramia* había que considerarla como un paso evolutivo notable, ya que la sección más primitiva *Ithyphyllae* no sintetizaba flavonoides macrocíclicos, pero sí las secciones *Bartramia* y *Strictidium*. Incluso afirmamos que la evolución de la ciclación molecular de los flavonoides de *Bartramia*, suponía que a medida que se consideraban especies más evolucionadas, dicha ciclación englobaba un mayor número de monómeros flavonoídicos. En resumen, resulta muy difícil, dentro de la sistemática actual de la familia *Bartramiaceae*, establecer si la presencia de macrociclos ha de considerarse como un paso atrás en la evolución, como así lo atestigua su ausencia en *Breutelia*. Más bien podríamos afirmar que la síntesis de macrociclos (bi y triflavonoides) es una **especialización** exclusiva y única en la subfamilia *Bartramioideae* del género *Bartramia*, y como tal debe considerarse tal carácter, sin otorgarle un significado filogenético definitivo.

De las especies investigadas del género *Anacolia*, únicamente *A. laevisphaera* y *A. subsessilis* sintetizaban bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona. Todo el género era rico en 2,3-dihidro-filonotisflavona (carácter hipotéticamente plesiomórfico) y en menor medida en filonotisflavona, dicranolomina y 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona. La mayoría de las especies sintetizaban ácidos fenólicos, siendo especialmente abundantes en *A. intertexta* y *A. menziesii*.

Anacolia laevisphaera posee una composición flavonoídica que incluye dos biflavonoides macrocíclicos (bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona). Atentiendo a tales resultados podríamos fácilmente pensar en la inclusión de este especie dentro de la sección *Bartramia* del género *Bartramia*, caracteriza por la síntesis de dichos macrociclos, o al menos dentro de la subfamilia *Bartramioideae*, junto a *Bartramia* y *Plagiopus*, géneros ambos que sintetizan macrociclos. *Anacolia laevisphaera* es según Flowers (1935), una especie con gran variabilidad en su crecimiento, así como en su tamaño y morfología de los filidios, lo que podría explicar en cierta forma sus relaciones con el género *Bartramia*, ante ciertas restricciones del medio que obligaran a dicha especie a especializarse en la síntesis de macrociclos. Cuando Flowers (1935) describió el género por primera vez, ya englobaba en él tanto *Anacolia laevisphaera* como *A. subsessilis*, lo que posteriormente fue confirmado por Van der Wijk & col. (1959). En base a todo lo anterior, queremos confirmar que la inclusión de ambas especies dentro del género *Anacolia* nos parece correcta, sobre todo por la existencia en ellas de ciertas especializaciones morfológicas (Engler, 1924; Goebel, 1930), de pelos axilares típicos de *Breutelioideae* (Griffin III, 1990), así como por la morfología de su esporófito (Griffin III & Buck, 1989). Sin embargo, dada la síntesis de biflavonoides macrocíclicos en ambas especies, creemos adecuada la creacción de una sección específica dentro del género *Anacolia* que englobe tanto a *A.*

laevisphaera como a *A. subsessilis*, que las separe del resto de especies del género, y emparente a éste directamente con la subfamilia *Bartramioideae*.

Griffin III & Buck (1989) consideran que el género ***Breutelia*** es el más evolucionado de toda la familia así como de la subfamilia *Breutelioideae*, por su gran tamaño y por la presencia de caulidios a menudo divididos, con filidios aplicados y pelos axilares con células alares e intercalares. La ausencia de biflavonoides macrocíclicos confirmaría dichos postulados. La 2,3-dihidro-filonotisflavona es uno de los flavonoides mayormente identificados en la familia *Bartramiaceae*, que además nos permite establecer ciertas diferencias dentro de las diversas secciones del género *Breutelia*. La sección *Acoleus*, de la que se estudiaron 8 especies, no sintetiza macrociclos y por lo general es pobre en 2,3-dihidro-filonotisflavona excepto en *B. allionii* y *B. chrysea*, dicranolomina excepto en *B. pendula* y *B. tomentosa*, y carece de filonotisflavona. La mayoría poseen ácidos fenólicos, sobre todo *B. eugeniae* y *B. pendula*, y únicamente *B. eugeniae* carece de flavonoide alguno. En la sección *Anacoliopsis*, a la que pertenece *B. affinis*, la concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona es relativamente superior a la sección anterior, pero carece de dicranolomina. La sección *Breutelia* se caracteriza porque *B. chrysocoma*, *B. deflexifolia*, *B. arundinifolia*, *B. austro-arcuata*, *B. diffracta* y *B. sthulmanni* poseen 2,3-dihidro-filonotisflavona, pero en baja concentracción. Las seis especies sintetizan también 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona y dicranolomina. El resto sólo ácido fenólicos y otros flavonoides. La cuarta sección, *Lycopodiobryum*, sintetiza dicranolomina en baja concentracción, pero en ninguna de sus especies se identificó 2,3-dihidro-filonotisflavona. Rica en ácidos fenólicos, sintetiza también 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona y otros flavonoides, pero no se identificó la filonotisflavona. La última sección, *Polyptichium*, se caracteriza al igual que la anterior, por no sintetizar 2,3-dihidro-filonotisflavona y sí dicranolomina y 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona, así como otros flavonoides, pero nunca filonotisflavona. La concentracción de ácidos fenólicos en esta sección es inferior a la de la anterior.

Resumiendo, la concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona así como la presencia/ausencia de dicranolomina, nos permite diferenciar la composición flavonoídica de cada una de las secciones del género *Breutelia*:

1. sección ***Acoleus***: síntesis de 2,3-dihidro-filonotisflavona en pocas especies y en baja concentracción, y baja también de dicranolomina.
2. sección ***Anacoliopsis***: concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona media (según intensidad de color en TLC) y no existe la síntesis de dicranolomina.
3. sección ***Breutelia***: síntesis de 2,3-dihidro-filonotisflavona en casi todas las especies en baja concentracción, ocurriendo lo mismo con la dicranolomina.
4. sección ***Lycopodiobryum***: no sintetiza 2,3-dihidro-filonotisflavona y sí dicranolomina en la mayoría de las especies pero en baja concentracción.
5. sección ***Polyptichium***: idéntica a la anterior.

De acuerdo a tales hechos, las secciones *Lycopodiobryum* y *Polyptichium* podrían considerarse como las más evolucionadas del género, por carecer de 2,3-dihidro-filonotisflavona, según los planteamientos ya expuestos con anterioridad.

Algo similar a lo que ocurre en *Breutelia* se advierte en el último género que comentaremos, ***Philonotis***. En la sección ***Catenularia*** del género *Philonotis*, existe en sus especies una alta

concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona, también de 5',3'''-diOH-amentoflavona /robustaflavona, así como baja de ácidos fenólicos y otros flavonoides. La sección ***Euphilonotis***, de la que se estudiaron 10 especies, presenta un comportamiento totalmente distinto: baja concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona, alta de filonotisflavona sobre todo en *P. fontana* y *P. australis*, síntesis de dicranolomina en baja concentracción, así como de 5',3'''-diOH-amentoflavona /robustaflavona, y excepto *P. calcarea* el resto son pobres en ácidos fenólicos. En la sección ***Leiocarpus***, a la que pertenece *P. tjibodensis*, al igual que la sección anterior, la concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona es baja, y también sintetiza filonotisflavona, dicranolomina y 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona aunque en bajas concentracciones. Finalmente, la sección ***Philonotula***, posee una concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona superior a *Catenularia*, sobre todo en *P. revoluta* y *P. sphaerocarpa*, baja en filonotisflavona (a diferencia de *Euphilonotis*), dicranolomina en baja concentracción, y sintetiza también 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona pero no otros dihidrobiflavonoides. Al igual que en *Breutelia*, las secciones del género *Philonotis* pueden separarse entre sí en base a la concentracción en 2,3-dihidro-filonotisflavona, y a la ausencia/presencia de filonotisflavona.

En resumen, la composición flavonoídica de la familia *Bartramiaceae* viene a confirmar en parte la hipótesis filogenética que Griffin III & Buck (1989) establecieron para la familia (Fig. 6.22): la subfamilia *Conostomoideae* podría ser la menos evolucionada, en un término medio y sintetizando biflavonoides macrocíclicos se encontraría la subfamilia *Bartramioideae* y, como la más evolucionada tendríamos a la subfamilia *Breutelioideae*, en la cual la síntesis de macrociclos parece que tiende a perderse en los géneros más evolucionados (*Breutelia*), conservándose en los más primitivos (*Anacolia*).

Sin embargo, el dendrograma que nosotros propondríamos como hipotético (Fig. 6.23), a diferencia del del Griffin III & Buck (1989), establece la existencia de una cuarta subfamilia: *Catoscopioideae*, y se considera el género menos evolucionado de *Bartramioideae* a *Leiomela*. No obstante, aún quedan por investigar la composición flavonoídica de los géneros *Quathlamba*, *Fleischerobryum* y *Flowersia*, por lo que tal dendrograma (Fig. 6.23) puede variar sustancialmente.

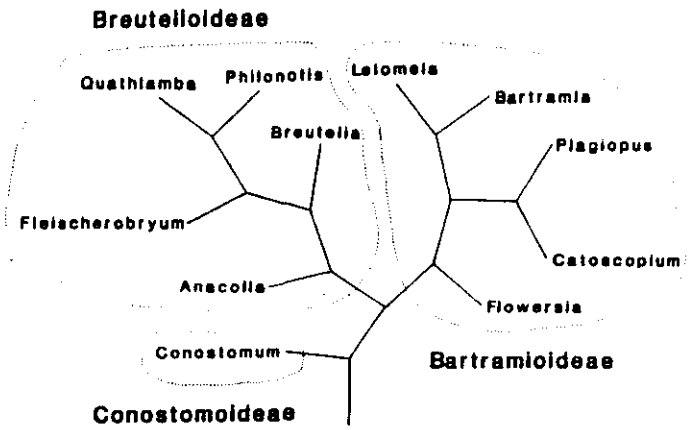


Fig. 6.22.: Dendrograma que postula las interrelaciones filogenéticas en la familia *Bartramiaeae* según Griffin III & Buck (1989), basándose en caracteres anatómicos, morfológicos y microscópicos.

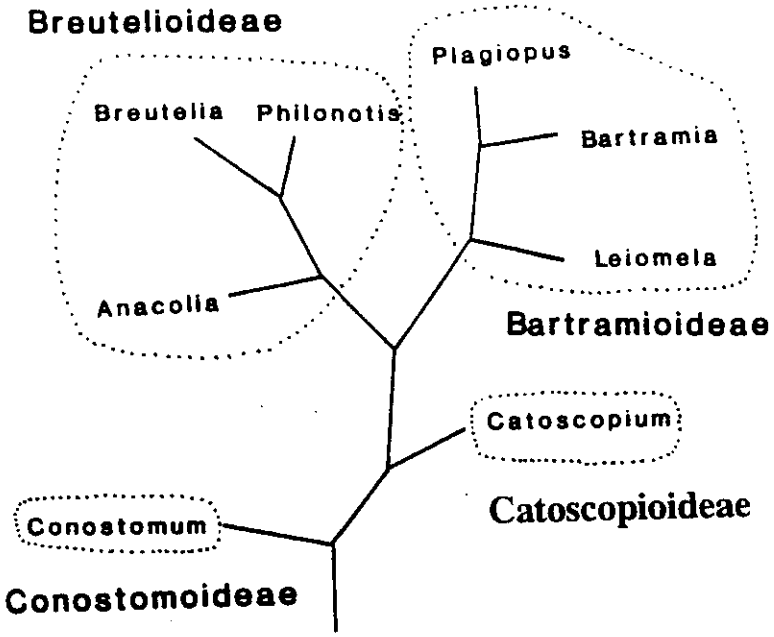


Fig. 6.23.: Dendrograma hipotético que representaría las posibles relaciones filogenéticas existentes en *Bartramiaceae* de acuerdo a la composición flavonoídica.

6.1.2.2. Flavonoides y estatus taxonómico.

En la revisión bibliográfica que acometimos como consecuencia de las investigaciones realizadas en la presente Memoria Doctoral, tuvimos conocimiento de la existencia de ciertos taxones "conflictivos", cuya ubicación dentro de la sistemática de la familia *Bartramiaceae* era confusa. En un intento, de una parte, de poder a través de la composición flavonoídica resolver tales problemas de índole taxonómico, y de otro, de corroborar ciertas hipótesis previamente establecidas a partir de otro tipo de estudios (anatómicos, morfológicos, etc.), iniciamos nuestro trabajo. En cualquier caso, nuestro interés en estos taxones conflictivos, ha sido básicamente comprobar si las apreciaciones que alcanzaban otros autores podrían paralelamente aceptarse mediante el estudio de la composición flavonoídica de dichos taxones. En caso afirmativo, nuestras investigaciones viniero a apoyar y corroborar las apreciaciones de dichos autores procedentes de investigaciones distintas, y en caso contrario, permitieron abrir una línea de debate sobre la ubicación de dichos taxones en la sistemática de la familia, de sus subfamilias o géneros.

A. *Bartramia rosea* Herzog.

En 1909, Herzog describió una especie muy peculiar de la flora andina de la familia *Bartramiaceae*, que denominó *Bartramia rosea*. El color de la planta y particularmente sus filidios, teñidos con tonalidades que variaban desde el rosa pálido hasta el rojo, e incluso en ocasiones rojo anaranjazado, hizo que dicho autor describiera esta especie como nueva para la ciencia. En particular,

Herzog (1909) incluyó *Bartramia rosea* dentro de la sección *Strictidium* del género *Bartramia*, a la cual pertenece entre otras la especie ibérica *Bartramia stricta*. El color de los filidios, y en menor medida el del caulido, era la base que dicho autor sustentaba para su identificación. Tras el material originalmente recolectado por Herzog en Bolivia, se llevaron a cabo otras recolecciones en Ecuador, Colombia y Venezuela (Griffin III, 1990) que pusieron de manifiesto que el hábitat más frecuente de esta especie eran los páramos, donde a menudo quedaba restringida su distribución.

Este tipo de consideraciones de índole taxonómico que Herzog empleó a principio de siglo, han de verse desde otra perspectiva, como lógicamente sustenta Griffin III (1990). De hecho, y exceptuando la coloración, tanto la morfología del vegetal, el hábitat, el detalle de los filidios incluyendo la forma, el margen y la areolación, son similares a los de otro taxón de mayor amplitud geográfica en la región montano-tropical, concretamente la especie *Anacolia laevisphaera* (Tayl.) Hower. En 1990, intentando solucionar esta posible sinonimia, Griffin III llevó a cabo un estudio de los pelos axilares de ambas especies, separándolas, de acuerdo a Herzog (1909), por su coloración. Los pelos axilares de *Anacolia* son significativamente distintos a los del género *Bartramia*, ya que consisten únicamente en dos células, la basal muy corta y pigmentada y la apical globosa, inflada y hialina. El examen que realizó de la especie definida por Herzog como *Bartramia rosea*, demostró que ésta poseía pelos axilares que se ajustaban perfectamente al tipo "*Anacolia*". La conclusión que dedujo finalmente de sus investigaciones fue, que muy posiblemente *Bartramia rosea* era únicamente una variante de color de *Anacolia laevisphaera*, aunque ya expuso que para poder reafirmar tal hipótesis en su justa medida serían necesarias nuevas recolecciones así como nuevas investigaciones acerca del tipo de pelo axilar que presentaban.

Tomando como referencia las apreciaciones de Griffin III (1990) iniciamos un estudio acerca de la composición flavonoídica de las dos especies nombradas, con el fin de comprobar si dichos planteamientos podrían ser ciertos. *Anacolia laevisphaera* es, dentro del género *Anacolia*, una de las especies que se caracteriza por tener un componente biflavonoídico más complejo. A diferencia de tres especies del mismo género investigadas (*A. menziesii*, *A. webbii*, *A. intertexta*), y al igual que *A. subsessilis*, *A. laevisphaera* se caracteriza por sintetizar biflavonoides macrocíclicos del tipo bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona, típicos en la sección *Bartramia* del género *Bartramia*. *A. subsessilis* por su parte únicamente sintetiza bartramiaflavona. El resto de biflavonoides (2,3-dihidro-filonotisflavona, filonotisflavona, dicranolomina, 5',3'''-diOH-amentoflavona, 5',3'''-diOH-robustaflavona) son sintetizados en cambio por las cinco especies de *Anacolia* referidas. Analizando la composición biflavonoíca de *Bartramia rosea* se puso de manifiesto que esta "presunta" especie sintetizaba exactamente los mismos biflavonoides que *Anacolia laevisphaera*, incluyendo ambos macrociclos (bartramiaflavona y anhidrobartramiaflavona). En el género *Bartramia*, la síntesis de biflavonoides macrocíclicos es exclusiva de la sección *Bartramia*, a la que pertenecen dos de las especies estudiadas en esta Memoria Doctoral (*B. halleriana* y *B. pomiformis*). Si como afirmaba Herzog (1909), *Bartramia rosea* se incluía dentro de la sección *Strictidium*, dicha especie no podría llevar a cabo la síntesis de biflavonoides macrocíclicos que no son propios de dicha sección, por lo que difícilmente dicha especie podría pertenecer realmente al género *Bartramia* y menos a la sección *Strictidium*.

Basándonos finalmente en la composición flavonoídica de *Bartramia rosea*, idéntica a la de

sintetizar 2,3-dihidro-filonotisflavona, y sólo *B. pendula* y *B. tomentosa* sintetizan dicranolomina, así como por tener altas concentracciones de ácidos fenólicos y otros flavonoides. Las dos especies de la sección *Lycopodiobryum* estudiadas, *B. elongata* y *B. azorica* tiene una composición idéntica entre ellas y respecto a *B. pendula* y *B. tomentosa*, pero difieren sensiblemente respecto al resto de especies de *Acoleus*. A su vez, Hirohama & Iwatsuki (1980) establecían las grandes semejanzas existentes en la morfología de los rizoides de *B. pendula* y *B. elongata*, que en ambas especies eran del tipo papiloso. En conclusión, las dos especies de la sección *Lycopodiobryum* investigadas, *B. azorica* y *B. elongata*, están íntimamente emparentadas con dos especies de la sección *Acoleus*, *B. pendula* y *B. tomentosa*, pero no con el resto. Tal parentesco podría apoyar la hipótesis de Griffin III & Buck (1989) de transferir *B. elongata* a la sección *Acoleus*, aunque creemos más conveniente de acuerdo a su composición flavonoídica, mantener la sección *Lycopodiobryum* y trasferir *B. pendula* y *B. tomentosa* de la sección *Acoleus* a *Lycopodiobryum*.

D. *Bartramia ruwenzoriensis* Broth.

La especie *Bartramia ruwenzoriensis* fue incluída por Engler (1924), por primera vez, dentro de la sección *Ithyphyllae* del género *Bartramia*, junto a *B. ithyphylla*, por tratarse ambas de especies sinoicas (monoicas con anteridios y arquegonios protegidos por un mismo involucro), y no monoicas autoicas (con involucro distinto) como las especies de la sección *Bartramia* (*Eu-Bartramia*). Posteriormente no se ha utilizado la especie en ningún otro tipo de estudio taxonómico, lo que ha permitido su pertenencia a la misma sección que consideró Engler (1924).

Sin embargo, como consecuencia del ensayo por TLC que realizamos en dicha especie, se puso de manifiesto que su composición flavonoídica era la siguiente: poseía una alta concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona, así como también relativamente altas de filonotisflavona y dicranolomina, y en menor medida de 5',3'''-diOH-amentoflavona/robustaflavona. Carecía de ácidos fenólicos pero en cambio sintetizaba otros dihidroflavonoides así como un biflavonoide macrocíclico, la bartramiaflavona, en baja concentracción. La existencia de macrociclos biflavonoídicos en el género *Bartramia*, parece ser exclusiva de su sección *Bartramia* del género, mientras que en la sección *Ithyphyllae* no se conoce por el momento ninguna especie que los sintetize. Este carácter lo utilizamos además en su momento, como signo de distinción entre ambas secciones. La alta concentracción de 2,3-dihidro-filonotisflavona, y la síntesis de otros dihidroflavonoides emparentan a esta especie con la sección posiblemente menos evolucionada *Ithyphyllae*.

En conclusión creeríamos adecuado transferir la especie *Bartramia ruwenzoriensis* de la sección *Ithyphyllae* a la sección *Bartramia* del género *Bartramia*, en base a que parece ser capaz de sintetizar bartramiaflavona. La existencia una alta concentracción de dihidroflavonoides, y especialmente de 2,3-dihidro-filonotisflavona, nos hacen considerarla posiblemente como una de las especies menos evolucionadas de la sección, y directamente emparentada con la sección *Ithyphyllae*.

Creemos, sin embargo, que sería adecuado una revisión profunda acerca de otros aspectos morfológicos, anatómicos y microscópicos, que pudieran confirmar la hipótesis alcanzada en base a la composición flavonoídica.

6.1.2.3. Flavonoides en *Dicranaceae* Schimp.

Dicranoloma robustum y *Dicranoloma billardieri* fueron trasferidos al género *Dicranum* por Norris & Koponen (1989). Dada la compleja composición flavonoídica de estas especies (Markham & col., 1988), decidimos reinvestigar el patrón flavonoídico de *Dicranum scoparium*, identificando además de la 5',3'''-dihidroxi-amentoflavona una nueva biflavona, la 5',3'''-dihidroxi-robustaflavona. Estas dos biflavonas presentes en *Dicranum scoparium* también habían sido identificadas en las dos especies de *Dicranoloma* citadas. No obstante, en *Dicranoloma* spp. se identificaron además otras biluteolinas 2'-unidas que no lo fueron en cambio en *Dicranum scoparium*.

Esta significativa diferencia en la composición biflavonoídica entre *Dicranum* y *Dicranoloma* es de gran ayuda desde un punto de vista taxonómico, ya que sugiere que lo expuesto por Norris & Koponen (1989) no es del todo correcto, y por lo tanto, consideraríamos que *Dicranoloma* debe permanecer como un género a parte de *Dicranum*. No obstante, debemos admitir que existen problemas taxonómicos con el grupo *Dicranum-Dicranoloma*, que deben reflejarse en una revisión taxonómica concienzuda desde diversos puntos de vista, y entre ellos el fitoquímico.

6.1.2.4. Variación fenológica de la composición flavonoídica.

En referencia a los flavonoides existentes en el esporófito, ya iniciamos un estudio preliminar (López-Sáez, 1992) en el cual se advirtió una variación cualitativa y posiblemente cuantitativa (por la concentracción de las manchas en TLC) respecto de los existentes en el gametófito, en diferentes especies de briófitos de la familia *Bartramiaceae*, concretamente en *Bartramia ithyphylla* y *B. pomiformis*, datos que concordaban con lo hasta entonces expuesto por Markham & col. (1978) y Seeger (1992). Esta diferente composición flavonoídica parece ir directamente relacionada con la fenología del musgo en cuestión, y más concretamente entre las generaciones gametófito y esporófito.

El problema con que contamos, en la mayor parte de los casos fue la imposibilidad de obtener material vegetal suficiente para acometer con garantías el estudio de la composición flavonoídica del esporófito de las especies del género *Bartramia* investigadas. Por norma general, apenas se recolectaron 1-2 g de esporófito por 250 g de gametófito, lo cual dificultó el trabajo y lo redujo a un mero ensayo por TLC acerca de su patrón flavonoídico, sin poder emprender una analítica exhaustiva.

Como antecedentes bibliográficos tenemos los trabajos de Markham & col. (1978), quienes ponen de manifiesto el cambio "drástico" que se produce en la composición flavonoídica de la hepática *Marchantia berteroana* acompañando al proceso de reproducción sexual. Posteriormente, Seeger (1992) lleva a cabo un estudio de la composición biflavonoídica del musgo *Rhytidiadelphus squarrosus*, poniendo de manifiesto en él la variación que sufre la concentracción del biflavonoide 5'-OH-robustaflavona a lo largo del año, encontrando la concentracción máxima durante los meses de abril y junio, y la mínima en noviembre. Tales diferencias las atribuye igualmente al proceso fenológico que sigue el musgo y a la aparición de la generación esporófito y de la reproducción

sexual. Todos estos datos de la literatura vienen a confirmar que la composición flavonoídica de las generaciones esporofítica y gametofítica en briófitos es sensiblemente distinta, al menos cuantitativamente.

En las especies que estudiamos con anterioridad (López-Sáez, 1992) se advirtió que tanto en *Bartramia ithyphylla* como en *B. pomiformis*, la composición flavonoídica del gametófito era sensiblemente diferente de la del esporófito. De hecho, en el esporofito de ambas especies, apenas pudo llegar a identificarse con seguridad la presencia de algún flavonoide, por lo que hemos excluído estas especies de la presente Memoria Doctoral.

En *Dicranum scoparium* se advirtió en cambio, una notable diferencia cualitativa en la composición flavonoídica de esporófito y gametófito. El ejemplo más claro es el compuesto que denominamos **DSe**, exclusivo de la generación esporofítica y, que como ya se comentó con anterioridad parece tratarse de un 2,3-dihidro-biflavonoide, seguramente relacionado con la dicranolomina. El patrón en TLC del esporófito resultó ser además bastante más complejo, sobre todo en el sistema desarrollado en poliamida-6, donde además de diversas flavonas glicosiladas, así como de la 5',3'''-diOH-amentoflavona y 5',3'''-diOH-robustaflavona, pudieron detectarse otros flavonoides con la típica absorción al ultravioleta (púrpura oscuro) e idéntica respuesta al NA (color amarillo) que el resto de flavonoides. Así mismo, y sólo en el esporófito se detectó la presencia de un flavonoide de alto Rf que no cambiaba de color tras utilizar NA, por lo que posiblemente se tratara de una molécula macrocíclica. La TLC del esporófito de *Dicranum scoparium* se complica aún más por la existencia de numerosas manchas azuladas y grisáceas, correspondientes a diversos compuestos fenólicos de naturaleza no flavonoídica, de los que carece el gametófito.

En *Bartramia stricta* la situación era totalmente distinta a la especie anterior, ya que mientras en el sistema desarrollado en poliamida de muestras gametofíticas, se identificaban los compuestos BS-1 a BS-8, en las esporofíticas sólo se hacía con los compuestos BS-2 a BS-7. La ausencia del Compuesto BS-1 en el esporófito puede interpretarse como una isomerización hacia Ciclo-Triluteolina, pero no hay explicación válida que no sea la fenología para explicar la ausencia del Compuesto BS-8. En las TLCs desarrolladas en celulosa la situación era similar. En el gametófito se identificaban los compuestos BS-1 a BS-7 mientras que en el esporófito sólo BS-2, BS-6 y BS-7. Eso sí, la riqueza en ácidos fenólicos del esporófito era muy superior a la del gametófito.

En conclusión, podemos afirmar que la composición flavonoídica de las generaciones esporofítica y gametofítica en musgos alberga sensibles diferencias, básicamente cuantitativas aunque también cualitativas. No se puede decir a ciencia cierta si una u otra generación se caracterizan por sintetizar determinados flavonoides o no, ya que depende en muchos casos de la especie que se esté investigando. Así, en *Dicranum scoparium* la composición flavonoídica del esporófito es mucho más compleja que la del gametófito, sintetizando incluso flavonoides de la que esta última carece. En *Bartramia stricta* en cambio, es el gametófito el que posee una composición flavonoídica más compleja mientras que el esporófito posee siempre los mismos flavonoides que el gametófito con ausencia de alguno de ellos. Esta última situación parece ser la que se repite generalmente en las especies de la familia *Bartramiaceae*. En cualquier caso, la única generalización válida, es que la generación esporofítica es siempre muchísimo más rica que la gametofítica en otros compuestos fenólicos no flavonoídicos, principalmente en ácidos fenólicos.

6.1.2.5. Variación de la composición flavonoídica según la localización geográfica.

Una primera aproximación, a la posible existencia de variaciones en la composición flavonoídica de las especies de la familia *Bartramiaceae* de acuerdo a su procedencia fue la que se obtuvo mediante los 79 ensayos por TLC que realizamos de diversas especies de la familia. En dichos ensayos, ya se manifestó que las principales diferencias eran de tipo cuantitativo y no cualitativo, por lo que decidimos en dicho caso, presentar únicamente una TLC por cada especie y sistema cromatográfico, que podría sin problemas generalizarse para cualquiera de las localidades de procedencia de la especie en cuestión.

En un trabajo preliminar que concluyó con la Memoria de Licenciatura (López-Sáez, 1992) ya llegamos a las mismas conclusiones anteriores, estudiando diversas muestras poblacionales de *Bartramia halleriana*, *B. ithyphylla* y *B.stricta*.

Respecto a las distintas muestras de *Bartramia pomiformis* utilizadas, no se pudieron atestiguar diferencias significativas en el patrón cromatográfico de cada una de ellas (ver Tabla 5.2.). Se puede afirmar por ello, que la composición flavonoídica de la especie, sea cual sea su localización geográfica, es más o menos constante cualitativamente. La única diferencia observable es la ausencia de bartramiaflavona en la muestra procedente de El Atazar, quizás debido a la baja concentración de dicho compuesto más que a una ausencia real. Igual puede afirmarse de la ausencia de anhidrobartramiaflavona en la muestra de Canencia. En la muestra de Ordesa faltan BP-7 y BP-8, aunque tales diferencias cualitativas, al igual que en los casos anteriores, deben proceder de la baja concentracción de tales compuestos en la especie, como se demostró por HPLC. La única diferencia cualitativa sustancial observada es la referente a la identificación del ácido clorogénico exclusivamente en la muestra procedente de El Escorial, ya que esta muestra se recolecto en invierno, precisamente en el momento en que se estaba produciendo la elongación de la seta y los esporófitos aún inmaduros (ricos en ácidos fenólicos) eran numerosísimos. Las diferencias cuantitativas en cambio, si parecen albergar algún resultado positivo en el sentido de que existan diferencias geográficas. Siegel & col. (1989) ofrecen una estimación cuantitativa, de la composición flavonoídica referente a 16 compuestos distintos, para 17 muestras de *Bryum capillare* procedentes de localidades diferentes. Al igual que nuestros resultados, no encuentran diferencias cualitativas notables, pues esos 16 flavonoides se encuentran identificados en las 17 muestras de distinta procedencia. Por contra, si advierten diferencias cuantitativas respecto a algunos de tales compuestos. A las mismas conclusiones llegan Freitag & col. (1986) para *Plagiomnium affine*, no observando diferencia cualitativa alguna en el patrón cromatográfico de la especie, sea cual sea la localización geográfica de la muestra o la estación climatológica de recogida. En cambio, Stein & Zinsmeister (1991), sí advierten diferencias en el patrón flavonoídico de tres especies de *Bryaceae* (*Bryum caespiticum* Hedw., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) Turn., y *Bryum pallescens* Scheleich.ex Schwaegr.) para diferentes hábitats, observables incluso en los cromatogramas realizados a partir de muestras procedentes de distintas localidades. Markham & col. (1976) admiten igualmente la existencia de razas geográficas en el patrón flavonoídico de la hepática *Conocephalum conicum* (L.) Underw.

En *Bartramia stricta*, los resultados que muestra la Tabla 5.3 coinciden con lo expuesto para

Bartramia pomiformis, no existiendo básicamente diferencia cualitativa alguna. Unicamente está ausente el compuesto BS-7 en la muestra de Picadas. El compuesto BS-1 en cambio sólo aparece en la muestra procedente de Villa del Prado. Al tratarse de un posible isómero de la Ciclo-Triluteolina, no es difícil suponer que a menudo se isomerize hacia ésta y por ello sea difícil su identificación, por lo que suponemos que es lo que ocurre con más frecuencia.

En resumen, en las especies ibéricas del género *Bartramia*, y generalizando, en la familia *Bartramiaceae*, la composición flavonoídica no varía sustancialmente desde un punto de vista cualitativo, aunque sí pueden albergarse sensibles diferencias cuantitativas en muestras procedentes de distintas localidades.

6.2.ACTIVIDAD BIOLOGICA.

Basándonos en los resultados previos de Iwu (1986) y McCleary & Walkington (1966), y dada la posibilidad de ensayar los flavonoides aislados en la presente Memoria Doctoral frente al virus del SIDA, acometimos los ensayos de actividad biológica en este sentido. De las 15 muestras flavonoídicas ensayadas, ninguna de ellas pareció tener una fuerte actividad supresiva de la replicación del VIH.

En referencia a la concentración de droga, se observa que con los compuestos 1, 2 y 6 a medida que aquella aumenta en los cultivos infectados, el porcentaje medio de p24 aumenta, es decir existe un aparente aumento del antígeno en los cultivos tratados con la droga frente a los cultivos control. Estos hechos podrían considerarse como un aumento de la replicación viral con la adicción de concentraciones superiores de droga, cuya causa no podemos determinar. Las drogas 2 y 6 son ambas 5',3'''-diOH-biflavonoides (de robustaflavona y amentoflavona respectivamente), por lo que podríamos considerar que este tipo de biflavonoides tan hidroxilados no son nada efectivos en la terapia contra el SIDA (ver Tabla 5.56 pp. 218-219). En el resto de drogas, de manera general, se produce un disminución del porcentaje medio de p24 a medida que aumenta la concentración de droga, lo que parece indicar que existe, en todos los casos, una disminución de la replicación viral, reflejada en una menor producción del antígeno p24 a medida que aumenta la concentración de droga en los cultivos (ver Tabla 5.56 pp. 218-219). Con la droga 8 (amentoflavona) se observa la misma tendencia que acabamos de comentar. Sin embargo, aún con la concentración más alta (20 μM) no se alcanza un promedio de p24 que pueda incluirse dentro de alguno de los niveles de efectividad de la droga considerados, ya que el valor más pequeño alcanzado es de 77 y los límites para una menor efectividad (expresado como *) están entre 50-69 % (ver Tabla 5.56 pp. 218). Con la droga 5 (bartramiaflavona) ocurre un hecho contrario al anterior. A una concentración de 100 μM el % p24 es de -10 (efectividad máxima ***), pero la droga a dicha concentración es tóxica, ya que el promedio de células de los cultivos no infectados que sobreviven al ser tratados con este compuesto es inferior al 70% (ver Tabla 5.56 pp. 218). Sin embargo, a una concentración no tóxica (20 μM) la droga no es en absoluto eficaz.

En base a todo lo anterior, desechamos las drogas 1, 2 y 6 (no producen disminución alguna de la replicación viral), 8 (su efectividad anti-VIH es prácticamente nula a concentraciones no tóxicas) y 5 (sólo es efectiva a concentraciones tóxicas) como válidas para la quimioterapia frente al SIDA, por lo que no las incluímos en la Tabla 5.55 (pp. 217). En el caso de la droga 5 (bartramiaflavona) debemos hacer sin embargo una salvedad, ya que no conocemos cual es su efectividad ni su toxicidad en concentraciones intermedias entre 20 y 100 μM. El valor de efectividad conseguido a estas concentraciones, si resultaran no tóxicas, podría ser el mismo o inferior que el obtenido a 100 μM. La bartramiaflavona (droga 5) es un biflavonoide macrocíclico mientras que la droga 7 (ciclo-triluteolina) es un triflavonoide cíclico. En ambos casos, se trata de macrociclos, por lo que en principio podríamos pensar que su actividad anti-VIH debía ser parecida. Con la droga 7 (ciclo-triluteolina) se consigue un nivel de efectividad * a una concentración 20 μM, pero no conocemos cual es su efectividad a concentraciones superiores. Por ello, podríamos pensar, que al igual que con la droga 7, la droga 5 sí podría ser efectiva a concentraciones inferiores a 100 μM sin ser tóxica. En las drogas **3** (dicranolomina), **4** (2,3-dihidro-filonotisflavona) y **7** (Ciclo-Triluteolina), el nivel de efectividad de droga máximo alcanzado es de * y siempre a una concentración de 20 μM, y en todos los casos sin ser tóxicas. Sin embargo, en las tres drogas, el valor de CC_{50} (concentración citotóxica) es relativamente bajo, ya que por encima de 20 μg/ml son todas tóxicas inhibiendo el 50% del crecimiento de las células que no había sido previamente infectadas por VIH en cultivos controles. Su EC_{50} es en cambio bastante alto, sobre todo en la droga 3, y en los tres casos entra dentro de los valores de toxicidad de dichas drogas. Es decir, sólo inhibirían el 50% de la replicación viral a concentraciones tóxicas. En base a ello, su índice terapéutico es muy pequeño, ya que a concentraciones relativamente altas (20 μM) son poco efectivas y algo más altas son tóxicas.

La droga **9** (saponarina) que es una apigenina-O/C-diglicosilada tiene un índice de efectividad medio (expresado como **) a una concentración 100 μM, mientras que con 20 μM no es nada efectiva. Su CC_{50} es relativamente alta y superior a 100 μg/ml, mientras que su EC_{50} es de 80 μg/ml. En base a ello, inhibiría un 50% de la replicación del virus a concentraciones no tóxicas. Su índice terapeútico en este caso es superior a 1.3, y por ello relativamente bajo, ya que aunque es capaz de inhibir el 50% de la replicación viral a concentraciones no tóxicas, éstas son lo suficientemente grandes como para que la droga no tenga un índice terapeútico alto. Sólo sería efectiva a concentraciones relativamente altas, por lo general cercanas a 100 μM, por lo que no es recomendable en la terapia contra el VIH.

Las drogas **10** (quercetina) y **15** (eriodictiol) alcanzan un nivel de efectividad ** a concentraciones no tóxicas de 4 μM y 0.8 μM respectivamente. Por encima de dichas concentraciones, ambas drogas tienen un índice de efectividad *** pero son tóxicas (ver Tabla 5.55 pp. 374-375). La **droga 10 (quercetina)** es sólo efectiva sin ser tóxica a concentraciones bajas. Su CC_{50} se sitúa precisamente a una concentración de 20 μM, relativamente baja, pero por contra, su EC_{50} es también muy bajo. Es decir, es capaz de inhibir un 50% de la replicación viral a concentraciones relativamente bajas (2 μg/ml = EC_{50}), a las cuales también es tóxica (20 μg/ml = CC_{50}). Esta combinación de ambos factores da lugar a un **índice terapeútico de 10**, que es el mayor que hemos obtenido en todos nuestros ensayos. Este índice terapeútico, sin ser muy alto si lo comparamos con el del ddC establecido en 25.000, es sin embargo significativo. De acuerdo a la Dra.

Ana San Félix (com. per.), una droga puede considerarse que tiene actividad viral significativa siempre y cuando su índice terapeútico sea superior a 10. Según ello, la droga 10 entraría en dicho intervalo y podríamos afirmar que al menos tendría cierta actividad antiviral (anti-VIH). Hay que tener en cuenta que, a la hora de comparar índices terapeúticos, se consideran unidades de magnitud, es decir valores de 1, 10, 100, 1000, 10.000 y así sucesivamente. Es decir, que por ejemplo, dos índices terapeúticos de 10 y 70 podrían considerarse muy parecidos ya que se encuentran dentro del mismo orden de magnitud. En este sentido, el índice terapéutico de la droga 10 (quercetina) sería del orden de 3 unidades de magnitud inferior al de la droga control ddC. La droga 10 o quercetina es un flavonol (3-OH-luteolina). Shu-Chen & col. (1992) demuestran que la quercetina tiene un cierto efecto inhibidor de la transcriptasa inversa, con un CC_{50} de 0.06, pero utilizando otro tipo de cultivos celulares. Estos resultados concuerdan con los nuestros, en el sentido de que podríamos afirmar que la quercetina tiene al menos cierta actividad anti-VIH, inhibiendo ligeramente la actividad de la retrotranscriptasa. Así mismo, Selway (1986) y Vanden Berghe & col. (1986) ya recojen que la quercetina es capaz de inhibir la actividad de ciertos virus tales como los del herpes, parainfluenza, polio, etc.

La droga 15 (eriodictiol), al igual que la anterior droga 10, es sólo efectiva sin ser tóxica, a concentraciones muy bajas, cercanas a 0.8 μM. Su CC_{50} es de 4 μg/ml, muy bajo, pero se compensa con un EC_{50} también muy bajo de 0.8 μg/ml. Es decir, que es capaz de inhibir el 50% de la replicación viral a concentraciones muy bajas, a las cuales puede también llegar a ser tóxica (sobre 4 μg/ml = CC_{50}). Con dichos valores, su índice terapeútico es de 5, y no entra, como sí ocurría con la droga 10, dentro de los valores considerados que ha de reunir una droga con actividad antiviral significativa (índice terapeútico superior a 10). La droga 15 o eriodictiol es la flavanona derivada de la luteolina (2,3-dihidro-luteolina). Shu-Chen & col. (1992) consideran que la flavanona hesperetina (4'-metil-eriodictiol) con CC_{50} de 6.33, tiene un moderado efecto inhibitorio de la actividad de la transcriptasa inversa, mientras que la flavanona y otras flavonas (3-OH y 7-OH) con CC_{50} mayor de 100 tienen muy bajo efecto inhibitorio de la enzima vírica. En cierta forma, estos resultados concuerdan con los nuestros, pues la droga 15 tiene cierto efecto inhibidor de la actividad viral sustentado en un índice terapeútico de 5, pero que en cualquier caso no puede incluirse dentro de los valores de actividad antiviral significativa. Selway (1986) y Vanden Berghe & col. (1986) recogen así mismo la actividad antiviral de ciertas flavanonas frente a ciertos tipos de virus entre los que no se encuentra el VIH.

Las drogas **11** (luteolina-7-O-neohesperidósido), **12** (lucenina-2), **13** (apigenina-7-O-triglicósido) y **14** (isoorientina-3'-O-soforósido) poseen un índice de efectividad *** a una concentración de 100 μM sin ser tóxicas, no siendo nada efectivas a concentraciones inferiores, excepto la droga 11 que tiene un valor de efectividad ** a 20 μM. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la droga 9, es decir, se necesitan concentraciones altas de droga para que esta sea efectiva. En las 4 drogas mencionadas, el valor de CC_{50} es siempre mayor de 100, pero su EC_{50} es también alto, lo que redunda en un índice terapeútico también bajo, excepto la droga 11 cuyo índice terapéutico llega a ser de 5. Generalizando, las drogas 11, 12, 13 y 14 sólo serían tóxicas a concentraciones altas pero sólo serían efectivas a concentraciones también altas, por lo que su valor terapéutico es muy bajo.

Resumiendo la discusión relativa a la actividad anti-viral de las 15 drogas ensayadas podríamos establecer los siguientes puntos:

- Las drogas 1, 2 y 6 (por no inhibir la replicación viral), la droga 8 (cuya efectividad antiviral es prácticamente nula) y la droga 5 (sólo es efectiva a concentraciones tóxicas) no parecen ser recomendables en la quimioterapia contra el SIDA.
- Las drogas 3, 4 y 7 poseen un índice terapeútico bajo, por lo que tampoco son recomendables en una terapida antiviral, incluso a concentraciones cercanas a 20 μM, a las que puede ser tóxicas y por ello poco seguras para la integridad humana.
- Las drogas 9, 11, 12, 13 y 14 tampoco parecen ser recomendables en una terapia contra el VIH, por necesitarse siempre de altas concentraciones de droga para ser algo efectivas.
- La droga 15 inhibe la replicación del virus a concentraciones bajas a las cuales es efectiva, pero a la vez puede ser tóxica, por lo que tampoco parece ser recomendable en una terapia antiviral. No obstante, recomendaríamos el ensayo mediante síntesis de compuestos derivados que aumentaran su índice terapeútico.
- La droga 10 o quercetina es la única que posee un índice terapeútico que permite considerar que esta droga tiene una moderada actividad antiviral. Su índice terapeútico es sin embargo muy bajo en comparación con el establecido para la droga patrón ddC. Al igual que en el caso anterior, recomendaríamos el ensayo mediante síntesis de compuestos derivados que aumentaran su índice terapeútico.

Los 2',3'-dideoxi-nucleótidos (ddN), derivados de adenosina (ddA), guanina (ddG), inosina (ddI) y citidina (ddC) y sus derivados como el AZT (3'-azido-2',3'-dideoxi-timidina) son considerados actualmente, como potentes inhibidores de la replicación viral del VIH, en base al mismo cálculo relativo a la concentración de p24 que nosotros hemos realizado (Mitsuya & Broder, 1986; Perno & col., 1988), por lo que este índice es una manera correcta de medir la actividad viral y con ello la efectividad de una droga. La 2',3'-dideoxi-timidina (ddT), diferencia de los anteriores, parece requerir de mayores concentraciones de droga para conseguir el efecto antiviral del resto de ddN. En el caso de la ddI, el efecto antiviral es teóricamente mediado por su conversión a ddA o ddG.

En resumen, y a pesar de que los resultados no han sido del todo satisfactorios como para poder utilizar los flavonoides identificados en *Bartramiaceae* en la terapia contra el SIDA, podemos afirmar que, aún siendo estructuralmente muy distintos del AZT o ddI, así como de otras drogas hoy efectivas contra el VIH, albergan al menos **cierta actividad inhibitoria de la transcriptasa inversa**. Estos hechos, en principio, podrían explicarse si tenemos en cuenta que los musgos no pueden ser infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana y sería lógico pensar que las estructuras flavonoídicas que sinteticen no sean efectivas contra él. Sin embargo, podríamos hipotetizar, y en un futuro cercano emprenderemos tal estudio, que los biflavonoides y triflavonoides de *Bartramiaceae* serían más efectivos en la defensa del vegetal contra ciertos microorganismos del suelo, tales como bacterias, hongos y ciertos tipos de virus, ya que éstos comparten su hábitat, y por tanto los musgos se habrían especializado en la defensa contra ellos específicamente. De acuerdo a la Dra. Ana San Félix (com. per.), la polaridad de los biflavonoides de musgos (con 8 hidroxilos) y de sus triflavonoides (con 12 hidroxilos), podría ser la causa de su baja actividad anti-VIH, ya que esta relativa alta polaridad les impediría penetrar en la célula y llevar a cabo su actividad antiviral.

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las incógnitas de la evolución se manifiestan en todos los niveles estructurales de los organismos vivos, desde el plano macroscópico hasta el micromolecular. De este último, en concreto, nos hemos ocupado en nuestro trabajo y, en particular, de la composición flavonoídica.

Aunque, como afirmaba Seeligmann (1990), la distribución de los flavonoides en el Reino Vegetal exhibe características que a menudo resultan difíciles de interpretar, justamente cuando pretendemos incorporar a nuestro estudio un componente filogenético y evolutivo, creemos no obstante que los trazadores elegidos en nuestro trabajo pueden utilizarse tanto en la taxonomía como en la filogenia de briófitos, en comparación a otros criterios tradicionales utilizados en la clasificación taxonómica (Zinsmeister & Mües, 1990). Sin embargo, puede constituir un riesgo intentar explicar la evolución de los flavonoides en *Bryophyta* de la misma manera que se hace en Angiospermas (Seeligmann, 1990). Harborne (1977) consideraba la presencia de biflavonoides en 12 familias de Angiospermas como un relicto bioquímico primitivo que, obviamente no podemos admitir en briófitos donde, la complejidad estructural de los biflavonoides alcanza su grado máximo.

Hay que tener en cuenta que, las "decisiones taxonómicas" en general, no se deben basar en un sólo tipo de criterios y, por ende, las consideraciones quimiosistemáticas que se realicen basándose en los flavonoides, puede ser igualmente valiosas, conduciendo a conclusiones ya no sólo más completas, sino más correctas.

De acuerdo a los Anexos I y II, los tipos flavonoídicos más comunes en musgos son las flavonas glicosiladas y los biflavonoides. Las primeras, en la gran mayoría de los casos, están representadas por O-glicósidos, siendo poco comunes los O-glucurónidos y las C-glicósidos (Mües & Zinsmeister, 1988; Mües, 1989). La evidencia sobre la frecuente ocurrencia de biflavonoides en musgos, fue una gran sorpresa, sobre todo tras la primera cita dada en *Dicranum scoparium* referente a una biluteolina (Lindberg & col., 1974). Durante estos últimos años, las referencias sobre la identificación de biflavonoides es musgos han ido aumentando considerablemente, sobre todo tras la puesta en marcha de un adecuado sistema de ensayo por 2D-TLC, de un largo número de especies. Muchos de los biflavonoides hoy conocidos en musgos, supusieron la existencia de compuestos nuevos, hasta ese momento desconocidos, en base a distintos tipos de enlace interflavonoídico entre los dos monómeros en las biluteolinas frecuentes en musgos.

En la presente Memoria Doctoral se estudió la composición flavonoídica de 86 especies:

- De un lado 2 especies del género *Selaginella* de la familia *Selaginellaceae*, caracterizadas por sintetizar únicamente biflavonas. A pesar de no ser briófitos, los compuestos aislados en dichas especies sirvieron como patrones estructurales en la identificación de otros biflavonoides y en los ensayos de actividad biológica.
- Una única especie de la familia *Dicranaceae*, *Dicranum scoparium*, en la que se identificó un segundo y nuevo biflavonoide respecto a la bibliografía (5',3'''-diOH-robustaflavona) así como ciertas flavonas glicosiladas.
- 83 especies de la familia *Bartramiaceae* pertenecientes a 8 géneros: *Anacolia* (5), *Bartramia* (18), *Breutelia* (23), *Catoscopium* (1), *Conostomum* (6), *Leiomela* (4), *Philonotis* (25) y *Plagiopus* (1). Este

Breutelia (23), *Catoscopium* (1), *Conostomum* (6), *Leiomela* (4), *Philonotis* (25) y *Plagiopus* (1). Este estudio incluyó por completo toda la **flora muscícola ibérica** de la familia *Bartramiaceae*, representada por 18 especies pertenecientes a 7 géneros.

Se identificaron 15 estructuras flavonoídicas repartidas de la siguiente manera:

- 8 biflavonoides. De ellos, uno fue un dímero flavona-flavanona denominado 2,3-dihidro-filonotisflavona. Dos eran biflavonoides macrocíclicos derivados de la luteolina, concretamente la bartramiaflavona (formada por dos ciclo-oxo tautómeros) y la anhidrobartramiaflavona. Los 5 biflavonoides restantes eran todos ellos biflavonas: 4 biluteolinas con distintas uniones entre ambos monómeros: 5',8'' (5',3'''-diOH-amentoflavona), 5',6'' (5',3'''-diOH-robustaflavona), 2',8'' (filonotisflavona) y 2',6'' (dicranolomina); y la última biflavona resultó ser un dímero luteolina-apigenina con enlace 5',8'' (5'-OH-amentoflavona).
- 3 triflavonoides. Dos de ellos eran triluteolinas lineares y además diastereómeros (bartramia-triluteolina y epi-bartramia-triluteolina) con uniones interflavonoídicas del tipo filonotisflavona. El otro triflavonoide resultó ser una molécula macrocíclica que se denominó ciclo-bartramia-triluteolina, que supuso la primera cita de este tipo de compuestos (triflavonoides cíclicos) en la química de los productos naturales.
- 1 ácido flavonoídico derivado de la luteolina con un grupo ácido (ac. protocatéquico) en posición C-8.
- 3 flavonas glicosiladas derivadas de la diosmetina, luteolina y apigenina que se identificaron exclusivamente en *Dicranum scoparium*.

La composición flavonoídica resultó ser un marcador quimiosistemático altamente válido, en la separación taxonómica de las distintas especies de *Bartramiaceae* en sus respectivas secciones, al menos en lo que respecta al género *Bartramia*, cuyas secciones pueden separarse sin problemas de acuerdo a sus flavonoides. Así mismo, la composición flavonoídica nos permitió corroborar ciertas hipótesis previamente establecidas sobre las correspondientes sinonimias de *Bartramia rosea* y *Conostomum boreale*, así como sobre una diferente ubicación dentro de las secciones respectivas de sus géneros de *Bartramia ruwenzoriensis* y *Breutelia elongata*.

Muy posiblemente, ese variadísimo elenco de tipos flavonoídicos identificados en musgos, y más en particular los biflavonoides, puede ir directamente relacionado con la coevolución de musgos y microorganismos (bacterias, hongos, virus) que impedirían el crecimiento del vegetal, obligándole a la creación de unas defensas químicas que bien podrían ser los biflavonoides.

Los briófitos constituyen una notable reserva de nuevas y raras estructuras, que suponen nuevos productos naturales. Muchas de ellas poseen una importante y probada actividad biológica, sobre todo farmacológica (Zinsmeister & col., 1987 y 1991; Zinsmeister & Mües, 1987; Becker, 1989; Becker & Wurzel, 1987). La actividad biológica de biflavonoides y triflavonoides abre un amplio abanico de espectativas de estudio desde el punto de vista de sus posibilidades antibióticas, tanto antibacterianas, antifúngicas como antivíricas. No obstante, la función que éstos desempeñan en el vegetal aún no está bien definida, lo que aumenta el interés no sólo por identificar nuevas estructuras (caso de le Ciclo-Triluteolina y la Epi-Bartramia-Triluteolina) sino también por conocer que función cumplen y que significado tanto fisiológico como filogenético albergan.

Dado el poder medicinal y antibiótico de los compuestos estudiados en la presente memoria

previa síntesis química en laboratorio, ya que su extracción del material biológico resulta difícil y posiblemente poco rentable económicamente. En este sentido, Salm (1993, com. per.) refiere la existencia en la actualidad de dos equipos de investigación en Mulhouse (Francia) y Saarbrücken (Alemania) que trabajan en este camino, habiendo iniciado la síntesis en laboratorio de los biflavonoides más sencillos (tipo amentoflavona y/o robustaflavona) y otros algo más complejos (hipnogenoles), siguiendo diversas y variadas vías de síntesis en laboratorio (Muller & Fleury, 1991; Eicher, 1990). La síntesis de macrociclos (bartramiaflavona, anhidrobartramiaflavona y ciclo-triluteolina) resulta por el momento imposible, pues los productos intermedios de síntesis no son los deseados (Salm, 1994). Por el momento, se están llevando a cabo estudios adicionales a los realizados, tales como la elucidación de la estructura por rayos X de los macrociclos antes nombrados (Salm, 1994).

La actividad anti-VIH de las 15 muestras flavonoídicas estudiadas demostró que ninguna de ellas poseían una fuerte inhibición de la replicación viral. Unicamente la droga 10 (quercetina) demostró una moderada actividad antiviral, con un índice terapeútico de 10.

En conclusión, la actividad antiviral (anti-VIH) de los flavonoides estudiados, y de acuerdo a Selway (1986), es limitada. Por ello, el uso de los flavonoides en la terapia antiviral, podría reducirse a su uso clínico en la profilaxis, más que a un tratamiento directo como antivíricos.

En definitiva, las **conclusiones** que podemos extraer de la presente Memoria Doctoral son las siguientes:

1. Se han identificado 15 flavonoides: 8 biflavonoides (2 macrocíclicos), 3 triflavonoides (uno de ellos cíclico), 1 ácido flavonoídico y 3 flavonas-O-glicosiladas.

2. El Compuesto IX (Epi-Bartramia-Triluteolina) es una estructura novedosa para la química flavonoídica de musgos.

3. La identificación de la Ciclo-Triluteolina (Compuesto X) aporta una nueva estructura flavonoídica (triflavonoides macrocíclicos) en la química de los productos naturales.

4. La gran mayoría de las especies de la familia *Bartramiaceae* sintetizan flavonoides, principalmente biflavonas.

5. La subfamilia *Conostomoideae* y el género *Conostomum* son los menos evolucionados de la familia *Bartramiaceae*.

6. La composición flavonoídica permite diferenciar las tres secciones del género *Bartramia*: *Ithyphyllae* (sin macrociclos), *Bartramia* (biflavonoides macrocíclicos) y *Strictidium* (triflavonoides cíclicos).

7. La ciclación molecular parece ser un paso evolutivo avanzado en la química flavonoídica del género *Bartramia*, lo mismo que la adición de un tercer monómero de luteolina.

8. Se propone la nueva subfamilia *Catoscopioideae* para la familia *Bartramiaceae*.

9. Los géneros *Leiomela* y *Plagiopus* son respectivamente, el menos y el más evolucionado de la subfamilia *Bartramioideae*.

10. Los géneros *Anacolia* y *Breutelia* son respectivamente, el menos y el más evolucionado de la subfamilia *Breutelioideae*.

11. Existe una tendencia a la reducción en la síntesis de biflavonoides en la subfamilia *Breutelioideae*, considerada la más evolucionada de la familia *Bartramiaceae*.

12. Concentraciones relativamente altas de 2,3-dihidro-filonotisflavona son propias de las especies menos evolucionadas de la familia *Bartramiaceae*.

13. Se considera *Bartramia rosea* una especie sinónima de *Anacolia laevisphaera*.

14. Se valida *Conostomum tetragonum* y *C. boreale* es considerada sinónima de la anterior.

15. Se propone transferir *Breutelia pendula* y *B. tomentosa* de la sección *Acoleus* a la sección *Lycopodiobryum* del género *Breutelia*.

16. Se propone transferir *Bartramia ruwenzoriensis* de la sección *Ithyphyllae* a la sección *Bartramia* del género *Bartramia* por sintetizar biflavonoides macrocíclicos.

17. La composición flavonoídica es sensiblemente diferente desde un punto de vista cuantitativo, en la generaciones esporofítica y gametofítica, existiendo igualmente ciertas diferencias cualitativas.

18. La composición flavonoídica de las especies ibéricas del género *Bartramia* no varía sustancialmente, desde un punto de vista cualitativo, con la localización geográfica.

19. Ninguno de los flavonoides ensayados frente al virus del SIDA (VIH) parece tener una fuerte actividad inhibitoria de la transcriptasa inversa. Sólo la quercetina y en menor medida el eriodictiol, tienen una actividad moderada.

Los vegetales, y más concretamente los musgos, suponen una fuente de productos naturales inagotable, y aunque en la presente Memoria Doctoral hemos querido poner de manifiesto la amplia variabilidad de compuestos químicos que poseen, podríamos afirmar que, los "principales descubrimientos" están aún por llegar.

8. BIBLIOGRAFIA

ABELLA, L., ALCALDE, M., ESTEBANEZ, B. & RON, E. 1992. Influence of Ambiental Factors of sporeling types in Bryophyta. Comunicación presentada al 8th International Palynological Congress. Septiembre, 1992. Aix-en-Provence.

ABOU-KARAM, M. & THOMAS SHIER, W. 1992. Isolation and characterization of an antiviral flavonoid from Waldsteinia fragarioides. J. Nat. Prod., 55 (10): 1525-1527.

ACON, M. 1988. Inventario Muscícola de la Comunidad Autónoma de Madrid (España). C.A.M. Madrid.

AGRAWAL, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier. Amsterdam.

AGRAWAL, P.K. & RASTOGI, R.P. 1981. ^{13}C NMR-spectroscopy of flavonoids. Heterocycles, 16: 2181-2236.

ALBERT, A. 1971. Relations between molecular structure and biological activity: stages in the evolution of current concepts. Ann. Rev. Pharmacol., 11: 13.

ALCALDE GALEOTE, M. 1994. Contribución al estudio del desarrollo protonemático en Bartramiaceae (Bryopsida, Bryophyta). Memoria de Licenciatura (inédit.). Facultad de C.C. Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

AL-HASAN, R.H., EL-SAADAWI, W.E., ALI, M.A. & RADWAN, S.S. 1989. Arachidonic and eicosapentaenoic acids in lipids of Bryum bicolor Dicks. Effects of controlled temperature and illumination. Bryologist, 92: 178-182.

AL-HASAN, R.H., EL-SAADAWI, W.E., ALI, M. & RADWAN, S.S. 1990. Lipids of the gametophyte and sporophyte of Funaria hygrometrica. Comparison with lipids from leaves of vascular plants. Bryologist, 93(1): 44-49.

AL-HASAN. R.H., KA'WASH, H.H. & RADWAN, S.S. 1991. Enrichment of Mosses with lipids and polyinsaturated fatty acids by nitrogen starvation. Bryologist, 94 (2): 196-200.

ALSTON, R.E. 1968. C-Glycosyl flavonoids. En Mabry, T.J., Alston, R.e. & Runeckles, V.C. (Eds.): Recents Advances in Phytochemistry (vol. 1). Appleton-Century-Crofts. New York.

ANDERSON, L.E., CRUM, H.A. & BUCK, W.R. 1990. List of the mosses of North America and North of Mexico. Bryologist, 93: 448-499.

ANDERSON, W.H., HAWKINS, J.M., GELLERMAN, J.L. & SCHLENK, H. 1974. Fatty acid composition as criterion in taxonomy of mosses. Journ. Hattori Bot. Lab., 38: 99-103.

ANDO, H. & MATSUO, A. 1984. Applied Bryology. In Schultze, M. (Ed.): Advances in Bryology (vol. 2). J. Cramer. Vaduz.

ANHUT, S. 1985. Phytochemische Untersuchungen an Moosen unter besonderer Berücksichtigung der Flavonoide in Bryum capillare. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

ANHUT, S. 1992. Die Verbreitung phenolischer Inhaltsstoffe in der Laubmoosgattung Plagiomnium und Sterilkulture von Bryum capillare. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

ANHUT, S., BIEHL, J., SEEGER, T., MÜES, R. & ZINSMEISTER, H.D. 1992. Flavone-C-glicosides from the Mosses Plagiomnium elatum and Plagiomnium cuspidatum. Z. Naturforsch., 47c: 654-660.

ANHUT, S., SEEGER, T., BIEHL, J., ZINSMEISTER, H.D. & GEIGER, H. 1989a. Phytochemical studies of the moss species Plagiomnium elatum and Plagiomnium cuspidatum. Journ. Hattori Bot. Lab., 67: 377-382.

ANHUT, S., SEEGER, T., ZINSMEISTER, H.D. & GEIGER, H. 1989b. New dihydrobiflavones from the moss Plagiomnium cuspidatum. Z. Naturforsch., 44c: 189-192.

ANHUT, S., ZINSMEISTER, H.D., MUES, R., BARZ, W., MACHENBROK, K., KOSTER, J. & MARKHAM, K.R. 1984. The first identification of isoflavones from a bryophyte. Phytochemistry, 23: 1073-1075.

ANYANWUTAKU, I.O., ZIRBES, E. & ROSAZZA, P.N. 1992. Isoflavonoids from Streptomyces: origins of Genistein, 8-chlorogenistein, and 6,8-dichlorogenistein. J. Nat. Prod., 55 (10): 1498-1504.

ASAKAWA, Y. 1981. Biologically active substances obtained from bryophytes. Journ. Hattori Bot. Lab., 50: 123-142.

ASAKAWA, Y. 1982. Chemical constituents of the Hepaticae. In Herz, W., Grisebach, H. & Kirby, G.W. (Eds.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (vol. 42). Springer-Verlag. Vienna.

ASAKAWA, Y. 1986. Chemical relationships between algae, bryophytes and pteridophytes. J. Bryol., 14: 59-70.

ASAKAWA, Y. 1990. Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

ASAKAWA, Y., TOKUNAGA, N., TOYOTA, M., TAKEMOTO, T. & SUIRE, C. 1979a. Chemosystematics of bryophytes I. The distribution of terpenoids in bryophytes. Journ. Hattori Bot. Lab., 45: 395-407.

ASAKAWA, Y., TOKUNAGA, N., TOYOTA, M., TAKEMOTO, T., HATTORI, S., MIZUTANI, M. & SUIRE, C. 1979b. Chemosystematics of bryophytes II. The distribution of terpenoids in Hepaticae and Anthocerotae. Journ. Hattori Bot. Lab., 46: 67-76.

ASAKAWA, Y., TOYOTA, M. & TAKEMOTO, T. 1978. Biologically active substances of bryophytes. Proc. Bryol. Soc. Japan, 2. 78-80.

ASAKAWA, Y., TOKUNAGA, N., TAKEMOTO, T., HATTORI, S., MIZUTANI, M. & SUIRE, C. 1980a. Chemosystematics of bryophytes IV. The distribution of terpenoids and aromatic compounds in Hepaticae and Anthocerotae. Journ. Hattori Bot. Lab., 47: 153-164.

ASAKAWA, Y., TOYOTA, M., TAKEMOTO, T., FUJIKI, H. & SUGIMURA, T. 1980b. Biologically active substances isolated from liverworts. Planta Medica, 39: 233.

AUDIER, H. 1966. Étude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. Bull. Soc. Chem. France, 9: 2892-2899.

AUGIER, J. 1966. Flores des Bryophytes. Ed. Paul Lechevalier. Paris.

BABA, M., PAUWELS, R., HERDEWIJN, P., DE CLERCQ, E., DESMYTER, J. & VANDEPUTTE, M. 1987. Both 2',3'-dideoxythymidine and its 2',3'-unsaturated derivative (2',3'-di-deoxythymidinene) are potent and selective inhibitors of human inmunodeficiency virus replication in vitro. Biochem. Biophys. Commun., 142 (1): 128-134.

BABA, K., TANIGUCHI, M. & KOZAWA, M. 1992. A spirobiflavonoid genkwanol B from Daphne genkwa. Phytochemistry, 31 (3): 975-980.

BAKER, W., FINCH, A.C.M., OLLIS, W.D. & ROBINSON, K.W. 1963. The structures of the Naturally ocurring Biflavonyls. J. Chem. Soc.: 1477-1490.

BAKER, W. & OLLIS, W.D. 1961. Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds. Pergamon Press. London.

BALZARINI, J., PERNO, C.F., SCHOLS, D. & DE CLERQ, E. 1991. Activity of acyclic nucleoside phosphonate analogues against human inmunodeficiency virus in monocyte/macrophages and peripheral blood lymphocytes. Biochem. Biophys. Commun., 178 (1): 329-335.

BANERJEE, R.D. 1974. Studies on Antibiotic Activity of Bryophytes and Pteridophytes. Ph. D. Thesis. University of Kalyani. Kalyani.

BANERJEE, R.D. & SEN, S.P. 1979. Antibiotic Activity of Bryophytes. Bryologist, 82 (2): 141-153.

BARCELO, J., NICOLAS, G., SABATER, B. & SANCHEZ, R. 1987. Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide. Madrid.

BATE-SMITH, G.C. 1963. Usefulness of Chemistry in Plant Taxonomy as Illustrated by the Flavonoid Constituents. En Swain, T. (Ed.): Chemical Plant Taxonomy. Academic Press. London.

BAUER, B.J., SELWAY, W.T., BATCHELOR, L., TISDALE, M., CALDWELL, C. & YOUNG, DAB. 1981. 4',6-Dichloroflavan (BW683C), a new anti-rhinovirus compound. Nature, 292: 369-370.

BECKER, H. 1989. Bryophytes, a Rich source of Secondary Metabolites. Botanica Acta, 102: 181-182.

BECKER, H., EICHER, T., MÜES, R. & ZINSMEISTER, H.D. 1992. Neue Naturstoffe aus Moosen-Ergebnisse eines interdisziplinären Forschungsprojektes. Magazin Forschung-Universität des Saarlandes, 1: 62-69.

BECKER, H., WILKING, G. & HOSTETTMANN, K. 1977. Separation of isomeric glycoflavones by high pressure liquid chromatography. J. Chromatogr., 136: 174-175.

BECKER, H. & WURZEL, G. 1987. Sind Lebermoose Arzneipflanzen?. Pharmazie in unserer Zeit, 16 (5): 152-156.

BECKER, R. 1986. Biflavonoide in Hylocomnium splendens (Hedw.) B.S.G. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

BECKER, R., MÜES, R., ZINSMEISTER, H.D., HERZOG, F. & GEIGER, H. 1986. A new biflavone and futher flavonoids from the moss Hylocomium splendens. Z. Naturforsch., 41c: 507-510.

BELADI, I., PUSZTAI, R. & BAKAY, M. 1965. Inhibitory activity of tannic acid and flavonols on the infectivity of Herpevirus hominis and Herpervirus suis. Naturwissenschaften, 52: 402-403.

BELADI, I., PUSZTAI, R., MUSCI, I., BAKAY, M. & GABOR, M. 1977. Activity of some flavonoids against viruses. Ann. N.Y. Acad. Sci., 284: 358-364.

BELKIN, M., FITZGERALD, D.B. & FELIX, M.D. 1952/53. Tumor-damaging capacity of plants materials. II. Plants used as diuretics. J. Natl. Cancer Inst., 13: 741-744.

BELL, E.A. & CHARLWOOD, B.V. 1980. Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology. New Sciences (vol. 8). Springer Verlag. Berlin.

BENDZ, G. & MARTENSSON, O. 1961. Moss Anthocyanins. Acta Chem. Scand., 15: 1185.

BENDZ, G. & MARTENSSON, O. 1963. Moss pigments II. The anthocyanins of Bryum rutilans Brid. and Bryum weigeleii Spreng. Acta Chem. Scand., 17: 266-272.

BENDZ, G., MARTENSSON, O. & NILSSON, E. 1966a. Moss pigments IV. An investigation of the occurrence of proanthocyanidins in mosses. Acta Chem. Scand., 20: 277-278.

BENDZ, G., MARTENSSON, O. & NILSSON, E. 1966b. Moss pigments. III. Isolation of some reddish pigments from Sphagnum species. Arkiv för Kemi, 25: 215-221.

BENDZ, G., MARTENSSON, O. & NILSSON, E. 1967. Moss pigments. VI. On the pigmentation of Sphagnum species. Bot. Notiser, 120: 345-354.

BENDZ, G., MARTENSSON, O. & TERENIUS, L. 1962. Moss pigments I. The anthocyanins of Bryum cryophilum O. Mart. Acta Chem. Scand., 16: 1183-1190.

BENESOVA, V. & HEROUT, V. 1972. Components of liverworts. Their chemical structures and biological activity. Bryophytorum Bibliotheca, 13: 355-364.

BERETZ, A., ANTON, R. & STOCLET, J.C. 1978. Inhibition of 3',5'-AMP phosphodiesterase by biflavonoids and xanthones. Planta Medica, 36 (3): 193-195.

BERETZ, A., JOLY, M., STOCLET, J.C. & ANTON, R. 1979. Inhibition of 3',5'-AMP-phosphodiesterase by biflavonoids and xanthones. Planta Medica, 36: 193-195.

BERTRAM, B. 1989. Flavonoide. Eine Klasse von Pflanzeninhaltsstoffen mit vielfältigen biologischen Wirkungen, auch mit karzinogener Wirkung?. Deutsche Apotheker Zeitung, 47: 2561-2571.

B.E.S. (Boletín Epidemiológico Semanal) (1983), nº 1593 / S-24. Madrid.

B.E.S. (Boletín Epidemiológico Semanal) (1989). Informes sobre Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Marzo 1983-Marzo 1988, 175 pp. Madrid.

BESSON, E., CHOPIN, J., MARKHAM, K.R., MUES, R., WONG, H. & BOUILLANT, M.L. 1984. Identification of neoschaftoside as 6-C-ß-glucopyranosyl-8-C-ß-arabinopyranosyl-apigenin. Phytochemistry, 23: 159-161.

BEUTELMANN, P., KOHN, G., EULER, R. & HARTMANN, E. 1992. The uncommon fatty acid pattern of the Bryophytes: a valuable tool for the investigation of lipid biosynthesis. Crypt. Bot., 3. 77-81.

BIEHL, J. 1988. Flavonoide aus Plagiomnium elatum (B.S.G.) Kop. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

BLAND, D.E., LOGAN, A., MENSHUM, M. & STERNHELL, S. 1968. The lignin of Sphagnum. Phytochemistry, 7: 1373-1377.

BOREL, G.A., SCHELLING, J.L. & MAGNENAT, P. 1976. The effect of flavonoid compounds (+)-cyanidanol-3 in acute viral hepatitis. Z. Gastroent., 14: 24-29.

BRACKE, M.E., VYNCKE, B., DE PESTEL, G., VAKAET, L., BOURGOIS, L., LAREBEKE, N.V., BORTIER, H. & MAREEL, M.M. 1990. Effect of Flavonoids on Cancer cell invasiveness. In Das, N.P. (Ed.): Flavonoids in Biology and Medicine III: Current issues in Flavonoids Research. National University of Singapore.

BRASSEUR, T. & ANGELOT, L. 1986. La mélange diphénylborate d'aminoéthanol - PEG 400. Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. J. Chromatogr., 351: 351-355.

BREHM, B.G. & KRELL, D. 1975. Flavonoid localization in epidermal papillae of flower petals: a specialised adaptation for ultraviolet absorption. Science, 190: 1221-1223.

BRIANÇON-SCHEID, F., GUTH, A. & ANTON, R. 1982. High-perfomance liquid chromatography of biflavones from Ginkgo biloba L. J. Chromatogr., 245: 261-267.

BRILL-FESS, C. 1981/82. Die Verbreitung von Flavonoiden in einigen Ordnungen der Bryidae. Staatsexamensarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

BRUCH, P., SCHIMPER, W.P. & VON GÜMBEL, W.T. 1836-1855. Bryologia europeae seu genera muscorum Europaeorum monographiae illustrata (6 vols.). Stuttgart.

BRUNETON, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. Zaragoza.

CAMPBELL, E.O., MARKHAM, K.R., MOORE, N.A., PORTER, L.J. & WALLACE, J.W. 1979. Taxonomic and phylogenetic implications of comparative flavonoid chemistry of species in the family Marchantiaceae. Journ. Hattori Bot. Lab., 45: 185-199.

CARRERAS, A. 1991. Miasmas y Retrovirus. Fundación Uriach 1838. Colección Histórica de Ciencias de la Salud, 2. Barcelona.

CASAS, C. 1991. New checklist of Spanish mosses. Orsis, 6: 3-26.

CASAS, C., BRUGUES, M., CROS, R.M. & SERGIO, C. 1985-1992. Cartografia de Briòfits: Península Ibèrica i les Illes Balears, Canàries, Açores i Madeira. Institut D'Estudis Catalans. Barcelona.

CASTALDO-COBIANCHI, R., VIOLANTE, U., GIORDANO, S. & BASILE, A. 1986. Presenza di sostanze antibiotiche in Conocephalum conicum e Mnium undulatum. Giorn. Bot. Ital., 120 (suppl. 2): 125.

CASTALDO-COBIANCHI, R., GIORDANO, S., BASILE, A. & VIOLANTE, U. 1988. Ocurrence of antibiotic activity in Conocephalum conicum, Mnium undulatum and Leptodictyum riparium (Bryophytes). Giorn. Bot. Ital., 122: 303-311.

C.D.C. 1983. Prevention of acquired inmune deficiency syndrome (AIDS) report of inter-agency recommendations. MMWR, 32: 101-103.

CHAKRAVARTHY, B.K., RAO, Y.V., GAMBHIR, S.S. & GODE, K.D. 1981. Isolation of Amentoflavone from Selaginella rupestris and its pharmacological activity on Central Nervous System, Smooth Muscles and Isolated Frog Heart Preparations. Planta Medica, 43: 64-70.

CHAN, B.G., WAISS JR., A.C., BINDER, R.G. & ELLIGER, C.A. 1978. Inhibition of Lepidopterous larval growth by cotton constituents. Ent. Exp. Appl., 24: 94-100.

CHAPMAN, D.J. 1985. Geological factors and biochemical aspects of the origin of land plants. In Tiffney, B.F. (Ed.): Geological Factors and the Evolution of Plants. Yale University Press. New Haven.

CHARI, V.M., ILYAS, M., WAGNER, H., NESZMELYI, A., CHEN, F.C., CHEN, L.K., LIN, Y.C. & LIN, Y.M. 1977. ^{13}C-NMR Spectroscopy of Biflavonoids. Phytochemistry, 16: 1273-1278.

CHAWLA, H., CHIBBER, S.S. & TIRUVENKATA, R.S. 1974. Volubilin, a new isoflavone-C-glycoside from Dalbergia volubilis flowers. Phytochemistry, 13: 2301-2304.

CHEXAL, K.K., HANDA, B.K. & RAHMAN, W. 1970. Thin-layer chromatography of biflavonyls on silica gel structure-chromatographic behaviour correlations. J. Chromatogr., 48: 484-492.

CHIU, P.L., PATTERSON, G.W. & FENNER, G.P. 1985. Steroles of Bryophytes. Phytochemistry, 24(2): 263-266.

CHOPRA, R.N. & BHATLA, S.C. (Eds.). 1990. Bryophythe Development: Physiology and Biochemistry. Clarendon Press. London.

CILLERO, M. 1944. Aportación a la Flora briológica española. Anales Jard. Bot. Madrid, 5: 365-376.

CLARK, W.D. 1987. Recovery of flavonoids from Dymethyl sulfoxide. Phytochem. Bull., 19 (1): 6-10.

CODY, V., MIDDLETON Jr., E. & HARBORNE, J.B. 1986. Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity relationships. Alan R. Liss., Inc. New York.

CODY, V., MIDDLETON Jr., E., HARBORNE, J.B. & BERETZ, A. (Eds.): 1988. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. Alan R. Liss., Inc. New York.

CONNOLLY, J.D. 1990. Monoterpenoids and sesquiterpenoids from the Hepaticae. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

CONSTANTINOU, A., KIGUCHI, K. & HUBERMAN, E. 1990. Induction of Differentiation and DNA Stranol Breakage in Human HL-60 and K-562 Leukemia Cell by Genistein. Cancer Research, 50 (24): 2618-2624.

COOPER-DRIVER, G. 1980. The role of flavonoids and related compounds in fern Systematics. Bull. Torrey Bot. Club, 197: 116-127.

COOPER-DRIVER, G. & HAUFLER, C. 1983. The changing role of chemistry in fern classification. Fern Gaz., 12 (5): 283-294.

CORDERO, R.M. 1990. Ensayo sobre estructura, presencia de flavonoides y patrón de germinación en el musgo Encalypta vulgaris Hedw. Memoria de Licenciatura (inédit.). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.

CORLEY, M.F.V. & CRUNDWELL, A.C. 1991. Additions and amendments to the mosses of Europe and the Azores. J. Bryol., 16: 337-356.

CORLEY, M.F.V., CRUNDWELL, A.C., DULL, R., HILL, M.O. & SMITH, A.J.E. 1981. Mosses of Europe and the Azores; an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. J. Bryol., 11: 609-689.

CRAWFORD, D.J. 1978. Flavonoid chemistry and angiosperm evolution. Bot. Review, 44: 431-456.

CROSBY, M.R. & MAGILL, R.E. 1981. A Dictionary of Mosses. Missouri Botanical Garden. Missouri.

CRUM, H.A. & ANDERSON, L.E. 1981. Mosses of Eastern North America (vol. 1). Columbia Univ. Press. New York.

CUTTING, W.C., DREISBACH, R.H. & MATSUSHIMA, F. 1953. Antiviral chemotherapy.-VI. Parenteral and other effects of flavonoids. Stanf. med. Bull., 11: 227-229.

CUTTING, W.C., DREISBACH, R.H. & NEFF, B.J. 1949. Antiviral chemotherapy.- III. Flavones and related compounds. Stanf. med. Bull., 7: 137-138.

CZAPEK, F. 1899. Zur Chemie der Zellmembranen bei den Laub- und Labermoosen. Flora, 86: 361-381.

CZYGAN, F.C. 1980. Pigments in Plants. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.

DANI, H.M., SANGEET & MONICA. 1990. Anti-carcinogenicity of flavonoids and other plant pigments as studied by microsomal degranulation and micronucleus techniques. In Das, N.P. (Ed.): Flavonoids in Biology and Medicine III: Current issues in Flavonoids Research. National University of Singapore.

DAS, N.P.(Ed.). 1990. Flavonoids in Biology and Medicine III: Current issues in Flavonoids Research. National University of Singapore.

DAS, N.P. & LAW, K.H. 1990. Production studies on Flavonoids. In Das, N.P. (Ed.): Flavonoids in Biology and Medicine III: Current issues in Flavonoids Research. National University of Singapore.

DAVIDSON, A.J., HARBORNE, J.B. & LONGTON, R.E. 1989. Identification of hydroxycinnamic and phenolic acids in Mnium hornum and Brachythecium rutabulum and their possible role in protection against herbivory. Journ. Hattori Bot. Lab., 67: 415-422.

DEAK, G., MUZES, G., LANG, I., NEKAN, K., GONZALEZCABELLO, R., GERGELY, P. & FEHER, J. 1990. Effects of two Biflavonoids on certain cellular Immune Reactions In vitro. Acta Physiologica Hungarica, 76 (2): 113-118.

DE LEY, J. & KERSTERS, K. 1975. Biochemical evolution in bacteria. In Florkin, M. & Stotz, E.H. (Eds.): Comprehensive Biochemistry. Elsevier. Amsterdam.

DENNO, R.F. & McCLURE, M.S. 1983. Variable Plant and Herbivores in Natural and Managed Systems. Academic Press. New York.

DOMON, B. & HOSTETTMANN, K. 1985. Mass spectrometric studies of underivatized polyphenolic glycosides. Phytochemistry, 24 (3): 575-580.

DOSSAJI, S.F. & MABRY, T.J. 1975. Chromatographic and UV-visible spectral identification of Biflavonoids. Rev. Latinoamer. Quím., 6: 37-45.

EFIMENKO, O.M. & DZENIS, A.J. 1962. Composition chemique des sphaignes. Kompl. Izuchen. Fisiol. Aktivn. Veshchestv. Niz. Rasten., 57: 3786h-3787a.

EICHER, T. 1990. Recent results from the synthesis of chemical constituens of bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryophytes: their chemistry and chemical taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

EKMAN, R. & KARUNEN, P. 1980. Steryl and wax esters in Dicranum elongatum. Phytochemistry, 19: 1243-1244.

ELKINS, E.R., HEUSER, J.R. & CHIN, H. 1988. Detection of adulteration in selectec fruit juices. Food. Sci. Technol., 30: 317-341.

ELLIGER, C.A., CHAN, B.G. & WAISS Jr., A.C. 1980a. Flavonoids as Larval Growth Inhibitors. Naturwissenschaften, 67: 358-360.

ELLIGER, C.A., CHAN, B.G., WAISS, A.C., LUNDIN, R.E. & HADDON, W.F. 1980b. C-Glycosylflavones from Zea mays that inhibit insect development. Phytochemistry, 19: 239-247.

ENGELHARDT, H. 1977. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (2nd. Ed.). Springer-Verlag. Heidelberg.

ENGLER, A. 1924. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 10 Band. Musci (Laubmoose) 1. Hälfte. Duncker & Humbolt. Berlin.

ERDTMAN, H. 1956. Organic chemistry and conifer taxonomy. In Tood, A. (Ed.): Perspectives in Organic Chemistry. Interscience. New York.

ERICKSON, M. & MIKSCHE, G.E. 1974. On the ocurrence of lignin or polyphenols in some mosses an liverworts. Phytochemistry, 13: 2295-2299.

ESTEBANEZ, B. 1991. Apuntes para la biología del musgo Grimmia orbicularis Bruch ex Wils. (Grimmiaceae, Grimmiales, Bryopsida, Bryophyta). Memoria de Licenciatura (inédit.). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.

ESTEBANEZ, B., ABELLA, L., ALCALDE, M. & RON, E. 1992. On the typification of Bartramia spores. (Bryophyta, Musci). Comunicación presentada al 8th International Palynological Congress. Septiembre, 1992. Aix-en-Provence. Francia.

ETIEVANT, P. & SCHILICH, P. 1988. Varietal and geographic classification of French wines in terms of pigments and flavonoid compounds. J. Sci. Food Agric., 42: 39-54.

FARMER, V.C. 1953. The lignin of Sphagnum. Research, 6 (8): A1-A3.

FARMER, V.C. & MORRISON, R.I. 1964. Lignin in Sphagnum and Phragmites and in peats derived from these plants. Geochim. Cosmochim. Acta, 28: 1537-1546.

FELIX, H. 1988. Fungi on bryophytes, a review. Botanica Helvetica, 98 (2): 239-269.

FENSELAU, C. 1984. Fast Atom Bombardment and Middle Molecule Mass Spectrometry. J. Nat. Prod., 47 (2): 215-225.

FERREL, J.E., CHANG-SING, P.D.G., LOEN, G., KING, R., MANSOUR, J.M. & MANSOUR, T.E. 1979. Structure/activity of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indexes. Molec. Pharmacol., 16 (2): 556-558.

FLOWERS, S. 1935. Bartramiaceae. In Grout, A. J. (Ed.): Moss Flora of North America North of Mexico (vol. 2). Hafner Pub. Co. New York.

FOO, L.Y., HELM, R. & KARCHESY, J. 1992. [5',5']-Bisdihydroquercetin: a B-ring linked Biflavonoid from Pseudotsuga menziesii. Phytochemistry, 31 (4): 1444-1445.

FREITAG, P., MUES, R., BRILL-FESS, C., STOLL, M., ZINSMEISTER, H.D. & MARKHAM, K.R. 1986. Isoorientatin 3'-O- sophoroside and 3'-O- neohesperidoside from the moss Plagiomnium affine. Phytochemistry, 25: 669-671.

FRITSCH, R. 1982. Index to plant chromosome numbers- Bryophyta. Regnum Vegetabile, 108 (i-xiv): 1-268.

FUJITA, Y., UEDA, T. & ONO, T. 1956. Essential oils of liverworts I. Essential oli of Bazzania pompeana. Nippon Kagazu Zasshi, 77: 400-401.

GADEK, P.A., QUINN, C.J. & ASHFORD, A.E. 1984. Localization of the biflavonoid fraction in plant leaves, with special reference to Agathis robusta (C. Moore ex F. Muell) F.M. Bail. Aust. J. Bot., 32: 15-31.

GALENSA, R. 1988. Detection of Adulterations of Fruit Juices by HPLC-Determination of Flavonoids. GIT Supplem. Lebensmitt., 4: 18-25.

GALENSA, R. & HERRMANN, K. 1980. Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 189: 217-224.

GAUDETTE, D.C. & HOLUB, B.J. 1990. Effect of genistein, a tyrosine Kinase inhibitor, on V4 6619 - induced phosphosinositide phosphorylation in human platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun., 170 (1): 238-242.

GEIGER, H. 1985. The identification of phenolic compounds by colour reactions. In Sumere, C.F. & Lea, P.J. (Eds.): Ann. Proceed. of the Phytochemical Society of Europe : The Biochemistry of Plant Phenolics (vol. 25). Clarendon Press. Oxford.

GEIGER, H. 1990. Biflavonoids in bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryphytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

GEIGER, H., ANHUT, S. & ZINSMEISTER, H.D. 1988. Biflavones from some mosses. Z. Naturforsch., 43c: 1-4.

GEIGER, H. & BOKEL, M. 1989. The biflavonoid pattern of Philonotis fontana (Hedw.) Brid. (Bartramiaceae). Z. Naturforsch., 44c: 559-562.

GEIGER, H. & MARKHAM, K.R. 1992. Campylopusaurone, an auronoflavanone biflavonoid from the mosses Campylopus clavatus and Campylopus holomitrium. Phytochemistry, 31 (12): 4325-4328.

GEIGER , H. & QUINN, C.J. 1975. Biflavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

GEIGER, H. & QUINN, C.J. 1982. Biflavonoids. In Harborne, J.B. & Mabry, T.J. (Eds.): The Flavonoids: Advances in Research. Chapman & Hall. London.

GEIGER, H. & QUINN, C.J. 1988. Biflavonoids. In Harborne, J.B. (Ed.): The Flavonoids: Advances in Research since 1980. Chapman & Hall. London.

GEIGER, H. & SCHWINGER, G. 1980. Felddesorptions - Massenspektrometrie und thermische fragmentierung von Flavonoidglykosiden. Phytochemistry, 19: 897-901.

GEIGER, H., STEIN, W., MÜES, R. & ZINSMEISTER, H.D. 1987. Bryoflavone and heterobryoflavone. Two new isoflavone-flavone dimers from Bryum capillare. Z. Naturforsch., 42c: 863-867.

GEIGER, H., SEEGER, T., HAHN, H., ZINSMEISTER, H.D., MARKHAM, K. & WONG, H. 1993a. ^{1}H NMR Assignments in Biflavonoid Spectra by Proton-Detectec C-H Correlation. Z. Naturforsch., 48c: 821-826.

GEIGER, H., VOIGT, A., ZINSMEISTER, H.D., LOPEZ-SAEZ, J.A., PEREZ ALONSO, M.J. & VELASCO NEGUERUELA, A. 1993b. The Biflavones of Dicranum scoparium (Dicranaceae). Z. Naturforsch., 48c: 952.

GELLERMAN, J.L., ANDERSON, W.H., RICHARDSON, D.G. & SCHLENK, H. 1975. Distribution of arachidonic and eicosapentaenoic acid in the lipids of mosses. Biochem. Biophys. Acta, 388: 277-290.

GELLERMAN, J.L., ANDERSON, W.H. & SCHLENK, H. 1972. Highly unsaturated lipids of Mnium, Polytrichum, Marchantia and Matteuccia. Bryologist, 75: 550-557.

GERAN, R.I., GREENBERG, N.H., MAC 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 (3rd. ed.). Cancer Chemotherapy Rep., Part. 3 (3): 1-103. USDHEW. Bethesda.

GERSHENZON, J. & MABRY, T.J. 1983. Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. Nordic J. Bot., 3: 5-34.

GHISALBERTI, E.L. 1979. Propolis a rewiew. Bee World, 60: 59-84.

GIANASSI, D.E. & CRAWFORD, D.J. 1986. Biochemical Systematics. II. A reprise. In Hecht, M.K., Wallace, B. & Prance, G.T. (Eds.): Evolutionary Biology (vol. 20). Clarendon Press. London.

GIBBS, R.D. 1974. Chemotaxonomy of Flowering Plants (4 vols.). McGrill-Queens Univ. Montreal.

GNANAMANICKAM, S.S. & MANSFIELD, J.W. 1981. Selective toxicity of wyerone and other phytoalexins to gram-positive bacteria. Phytochemistry, 20 (5): 997-1000.

GOEBEL, K. 1930. Organographie der Pflanzen. G. Fisher Verlag. Jena.

GORNALL, R.J., BOHM, B.A. & DAHLGREN, R. 1979. The distribution of flavonoids in the angiosperms. Bot. Notiser, 132: 1-30.

GRASSO, S.M. & SCHEIRER, D.C. 1981. Scanning electron microscopic observation of a moss-fungus association. Bryologist, 84: 384-530.

GREGER, H. 1985. Vergleichende Phytochemie als biologische Disziplin. Plant Syst. Evol., 150: 1-13.

GRIFFIN III, D. 1990. The use of axillary hairs in the taxonomy of two neotropical Bartramiaceae. J. Bryol., 16: 61-65.

GRIFFIN III, D. & ACUÑA, M.L. 1983. Spore ornamentation studies in Anacolia (Musci;Bartramiaceae). Cryp. Bryol. Lichénol., 4: 155-160.

GRIFFIN III, D. & BUCK, W.R. 1989. Taxonomic and Phylogenetic Studies on the Bartramiaceae. Bryologist, 92 (3): 368-380.

GRIMSLEY, N.H., GRIMSLEY, J.M. & HARTMAN, E. 1981. Fatty acid composition of mutants of the moss Physcomitriella patens. Phytochemistry, 20: 1519-1524.

GROSS, G.G. 1981. Phenolic Acids. In Conn, E.E. (Ed.): The Biochemistry of Plants (vol. 7). Academic Press. New York.

GÜNTHER, H. 1983. NMR-Spektroscopie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.

GUPTA, K.G. & SINGH, B. 1971. Ocurrence of antibacterial activity in moss extracts. Res. Bull. Punjab Univ. Sci., 22 (1/2): 237-239.

GUTTNER, J., VECKENSTEDT, A., HEINECKE, H. & PUSZTAI, R. 1982. Effect of quercetin on the course of mengo virus infection in immunodeficient and normal mice. A histologic study. Acta Virol., 26: 148-155.

HABERLANDT, G. 1886. Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Laubmoose. Jahrb. Wissensch. Bot., 17: 359-498.

HAHN, H. 1993. Dissertation (en prensa). Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

HAHN, H., GEIGER, H. & ZINSMEISTER, H.D. 1994. Phytochemistry (en prensa).

HARBORNE, J.B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press. London.

HARBORNE, J.B. 1975. The Biochemical Systematics of Flavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B. 1977. Flavonoids and the evolution of the Angiosperms. Bichem. Syst. Ecol., 5: 7-22.

HARBORNE, J.B. 1984. Phytochemical Methods. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B. 1986. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In Cody, V., Middleton Jr., E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Alan R. Liss, Inc. New York.

HARBORNE, J.B. 1988a. The Flavonoids- Advances in Research since 1980. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B. 1988b. Introduction to Ecological Biochemistry. (3ª Ed.). Academic Press, London.

HARBORNE, J.B. 1993. (Ed.). The Flavonoids. Advances in Research since 1986. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B. & MABRY, T.J. 1982. The Flavonoids. Advances in Research. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B., MABRY, T.J. & MABRY, H. 1975. The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

HARBORNE, J.B. & TURNER, B.L. 1984. Plant chemosystematics. Academic Press. London.

HARDIN, J.M. & STUTTE, C.A. 1980. Analysis of phenolic and flavonoid compounds by High-Pressure Liquid Chromatography. Anal. Biochem., 102: 171-175.

HARTMANN, E., BEUTELMANN, P., VANDEKERKHOVE, O., EULER, R. & KOHN, G. 1986. Moss cell cultures as sources of arachidonic and eicosapentaenoic acids. FEBS Letters, 198: 51-55.

HARTWELL, J.L. 1971. Plants used against cancer. A survey. Lloydia, 34: 410-411.

HAUTEVILLE, M., CHADENSON, M. & CHOPIN, J. 1973. Un nouveau type de flavonoïdes naturels: les dihydroxy-2,5 flavanones, I. Synthèse du dihydroxy-2,6-méthoxy-4 dibenzoylméthane des bourgeons de Populus nigra et mise en évidence de sa structure cyclique. Bull. Soc. Chem. France, 5: 1781-1788.

HEBANT, CH. 1974. Studies on the development of the conducting tissue-system in the gametophytes of some Polytrichales. II. Development and structure at maturity of the hydroids of the central strand. Journ. Hattori Bot. Lab., 38: 565-607.

HEDENÄS, L. 1991. Ekonomisk bryologi - en översikt över mossornas praktiska användbarhet. Svensk Bot. Tidskr., 85: 347-354.

HEDIN, P.A. & WAAGEA, S.K. 1986. Roles of Flavonoids in Plant resistance to insects. In Cody, V., Middleton Jr., E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Alan R. Liss, Inc. New York.

HEGNAUER, R. 1962-1986. Bryophyta. In Hegnauer, R. (Ed.): Chemotaxonomie der Pflanzen (7 vols.). Birkhaüser. Basel.

HEGNAUER, R. 1986. Phytochemistry and plant taxonomy - an essay on the chemotaxonomy of higher plants. Phytochemistry, 25: 1519-1535.

HEROUT, V. 1990. Diterpenes and higher terpenes from bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

HERZFELDER, H. 1921. Beitrag zur Frage der Moosfärbungen. Beih. Bot. Centralblatt., A 38: 355-400.

HERZOG, F. 1982. Dar Vorkommen von Flavonoiden in den Laubmoos-ordnungen Hypnales, Leskeo-Amblystegiales und Sphagnales. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

HERZOG, T. 1909. Beiträge zur Laubmoosflora von Bolivia. Beih. Bot. Centralbl., 26: 74.

HERZOG, T. 1926. Geographie der Moose. Gustav Fischer Verlag. Jena.

HIROHAMA, T. 1977. Spore morphology of bryophytes observed by scanning electron microscope, II. Bartramiaceae. Bull. Nat. Sci. Mus., B 3: 37-44.

HIROHAMA, T. & IWATSUKI, Z. 1980. Surface ornamentation of rhizoids of the species of Bartramiaceae (Musci). Journ. Hattori Bot. Lab., 48: 259-275.

HORVATH, J. 1977. New artificial host and non-host of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses. I. Historical review. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung., 12: 177-214.

HOSTETTMANN, K. & HOSTETTMANN, M. 1982. Isolation techniques for Flavonoids. In Harborne, J.B. & Mabry, T.J. (Eds.): The Flavonoids: Advances in Research. Chapman & Hall. London.

HOWE, J. & JARMAN, M. 1985. New techniques for mass spectometry of natural products. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (vol. 47). Springer-Verlag. New York.

HUNECK, S. 1963. Zur Chemie des Moose. I. Die erstmalige Isolierung eines natürlich vorkommenden Azulens aus Calypodeia trichomanis (L.) Corda. Z. Naturforsch., 18b: 1126.

HUNECK, S. 1967. Inhaltsstoffe der Moose. IV. Die Isolierung von Drimenol aus Bazzania trilobata (L.) Lindberg. Z. Naturforsch., 22b: 462-463.

HUNECK, S. 1969. Recent literature on the chemistry of liverworts and mosses. Bryol. Lichenol., 5: 49-51.

HUNECK, S. 1983. Chemistry and Biochemistry of Bryophytes. In: Schuster, R.M. (Eds.): New manual of Bryology. The Hattori Botanical Garden. Nichinan.

IEVEN, M., VANDEN BERGHE, D.A., MERTENS, F., LAMMENS, E. & VLIETINCK, A.J. 1979. Screening of higher plants for biological activities. I.: Antimicrobial activity. Planta Medica, 36: 311-321.

INGHAM, J.L. 1983. Naturally Ocurring Isoflavonoids (1855-1981). In Herz, W., Grisebach, H. & Kirby, G.W. (Eds.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (vol. 43). Springer-Verlag. New York.

IWU, M.M. 1985. Antihepatoxic constituents of Garcinia kola seeds. Experientia, 41 (5): 699-700.

IWU, M.M. 1986. Biflavonoids of Garcinia: Pharmacological and Biological Activities. In Cody, V., Middleton Jr., E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. Alan R. Liss, Inc. New York.

JACOBS, M. & RUBERY, P.H. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. Science, 241: 346-349.

JAY, M., GONNET, J.F., WOLLENWEBER, E. & VOIRIN, B. 1975. Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. Phytochemistry, 14: 1605-1612.

JUNG, M. 1993-94. Dissertation (en prensa). Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

JURD, L. 1962. Spectral properties of flavonoid compounds. In Geissmann, T.A. (Eds.): The Chemistry of Flavonoid Compounds. Pergamon Press-Macmillan. New York.

KABIERSCH, W. 1936. Studien über die ostasiatischen Arten einiger Laubmoosfamilien (Mniaceae-Bartramiaceae). Hedwigia, 76: 1-94.

KABIERSCH, W. 1937. Studien über die ostasiatischen Arten einiger Laubmoosfamilien II (Rhizogoniaceae, Bartramiaceae, Aulacomniaceae, Meeseaceae). Hedwigia, 77: 71-136.

KALINOWSKI, H.O., BERGER, S. & BRAUN, S. 1984. ^{13}C-NMR Spektroscopie (S-399). Thieme Verlag. Stuttgart.

KAWAI, I. 1982. Systematic studies on the conducting tissue of the gametophyte in Musci (12). Anatomical characteristics of stems in some species of Bartramiaceae. Science Rep. Kanazawa Univ., 26 (2): 31-50.

KAWAI, I. 1989. Systematic Studies on the conducting tissue of the gametophyte in Musci (16). Relationships between the Anatomical Characteristics of the stem and the Classification system. Asian Jour. Pl. Sci., 1 (2): 19-52.

KINGSTON, D.G.I. 1979. High Performance Liquid Chromatography of Natural Products. J. Nat. Prod., 42: 237-260.

KINZEL, H. & WALLAND, A. 1966. Zum Vorkommen von Shikimisäure bei Moosen und Farnen. Z. Pflanzenphysiol., 54: 371-374.

KOHN, G., DEMMERLE, S., VANDEKERKHOVE, O., BEUTELMANN, P. & HARTMANN, E. 1987. Distribution and chemotaxonomic significance of acetylenic fatty acids in mosses of the Dicranales. Phytochemistry, 26: 2271-2275.

KONIG, B. & DUSTMAN, J.H. 1983. Investigation on the composition and possible virostatic effects of propolis of varied geographic provenance. Apidologie, 14: 278-280.

KOPONEN, A., KOPONEN, T., PYYSALO, H., HIMBERG, K. & MANSIKKAMÄKI. 1990. Composition of volatile compounds in Splachnaceae. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

KOPONEN, T. & NILSSON, E. 1977. Flavonoid patterns and species pairs in Plagiomnium and Rhizomnium (Mniaceae). Bryophytorum Bibliotheca, 13: 411-425.

KOSKIMIES-SOININEN, K. & NYBERG, H. 1987. Effects of temperature and light on the lipids of Sphagnum magellanicum. Phytochemistry, 26: 2213-2222.

KOZLOWSKI, A. 1921. Sur la saponarine chez le Mnium cuspidatum. C.R. Acad. Sci. Paris, 173: 429-431.

KREBS, K.G., HEUSSER, D. & WIMMER, H. 1967. Sprühreagentien. No. 263. In Stahl, E. (Eds.): Dünnschichtchromatographie (vol. 2). Springer. Berlin.

KUBITZKI, K. 1987. Phenylpropanoid metabolism in relation to land plant origin and diversification. J. Plant. Physiol., 131: 17-24.

KUBITZKI, K. & GOTTLIEB, O.R. 1984. Phytochemical aspects of angiosperm origin and evolution. Acta Bot. Neerl., 33: 457-468.

KUBO, I., KLOCKE, J.A., MATSUMOTO, T. & NAOKI, H. 1983. Identification of two insect growth inhibitory biflavonoids in Podocarpus gracilior. Rev. Latinoam. Quím., 14 (2): 59-61.

LAUCK, V. 1984. Flavonoide in der Gattung Rhizomnium. Diplomarbeit. Universität des Saarlandens. Saarbrücken.

LEE, K.H., TAGAHARA, K., SUZUKI, H., WU, R.Y., HARUNA, M., HALL, I.H., HUANG, H.CH., ITO, K., IIDA, T. & LAI, J.S. 1981. *Antitumor agents*, 49. Tricin, *Kaempferol-3-0-ß-D*-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from Wikstroemia indica. J. Nat. Prod., 44 (5): 530-535.

LEIDINGER, G. 1984. Flavonoidchemische Untersuchungen in der Ordnung Bryales unter besonderer Berücksichtingung von Rhizomnium magnifolium. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

LEVIN, D.A. 1971. Plant phenolics: An ecological perspective. Amer. Naturalist, 105:157-181.

LEWIS, N.G. & YAMAMOTO, E. 1990. Lignin: ocurrence, biogenesis and biodegradation. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol., 41: 455-496.

LILJENBERG, C. & KARUNEN, P. 1978. Changes in the content of phytyl and geranylgeranyl esters of germinating Polytrichum commune spores. Physiol. Plant., 44: 369-372.

LIMPRICHT, K.G. 1893. Meeseaceae. In Die Laubmoose Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz (vol. 2). Springer-Verlag. Berlin.

LIN, Y.M. & CHEN, F.C. 1975. TLC Rf values of Biflavonoids and their methylated derivatives. J. Chromatogr., 104: D33-D34.

LINDBERG, G., ÖSTERDAHL, B.G. & NILSSON, E. 1974. Chemical studies on Bryophytes: 5'-8''-Biluteolin, a new biflavone from Dicranum scoparium. Chem. Script., 5: 140-144.

LINDBERG, S.L. 1879. Muscori Scandinavici in Systemate Novo Naturali Dispositi, Uppsala.

LLORET, F. 1986. La vegetación briofítica rupícola en relación con los gradientes altitudinal e hídrico en el Montseny (Barcelona). Orsis, 2: 55-70.

LLORET, F. 1987. Efecto de la altitud sobre la fenología de briófitos en el Pirineo Oriental. Anales Jard. Bot. Madrid, 43 (2): 203-215.

LOHMANN, C.E.J. 1903. Beitrag zur Chemie und Biologie der Lebermoose. Inaugural Dissertation, 1-42. Universität Jena.

LOPEZ-SAEZ, J.A. 1992. Contribución al estudio de trazadores quimiosistemáticos en especies ibéricas del género Bartramia Hedw. (Bartramiaceae Schwaegr., Bryophyta). Memoria de Licenciatura (inédit.). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.

LOPEZ-SAEZ, J.A., PEREZ ALONSO, M.J. & VELASCO NEGUERUELA, A. 1994a. Flavonoids of Selaginella denticulata and S. selaginoides. Fitoterapia (en prensa).

LOPEZ-SAEZ, J.A., PEREZ ALONSO, M.J. & VELASCO NEGUERUELA, A. 1994b. Biflavonoides of Selaginella denticulata growing in Spain. Z. Naturforsch., 49c: 267-270.

LOPEZ-SAEZ, J.A., PEREZ ALONSO, M.J. & VELASCO NEGUERUELA, A. 1994c. The Biflavonoid Pattern of Selaginella selaginoides. Z. Naturforsch., 49c: 265-266.

LOWRY, J.B., JALAN, A. & LEE, D.W. 1983. The origin of land plants: a reply to Swain. Taxon, 32: 101-103.

MABRY, T.J. & MARKHAM, K.R. 1975. Mass Spectrometry of Flavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. & THOMAS, M.B. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. Berlin.

MADSEN, G.C. & PATES, A.L. 1952. Ocurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plants growing in Florida. Bot. Gaz., 113: 293-300.

MAGILL, R.E. 1987. Bryophyta. Part 1 Mosses. Fascicle 2 (Gigaspermaceae-Bartramiaceae). In Leistner, O.E. (Ed.): Flora of Souther Africa (Part. 1(2)). Pretoria.

MANDICH, L., BITTNER, M., SILVA, M. & BARROS, C. 1984. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids. Rev. Latinoamer. Quím., 15 (2): 80-82.

MARKHAM, K.R. 1975. Isolation Techniques for Flavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

MARKHAM, K.R. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Biological Techniques Series. Academic Press. London.

MARKHAM, K.R. 1988. Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In Harborne, J.B. (Ed.): The Flavonoids, Advances in Research since 1980. Chapman & Hall. London.

MARKHAM, K.R. 1990. Bryophyte flavonoids, their structures, distribution and evolutionary significance. In Zinsmeister, H.D. & Mües, R. (Eds.): Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

MARKHAM, K.R. , ANDERSEN, O.M. & VIOTTO, E.S. 1988. Unique biflavonoids types from the moss Dicranoloma robustum. Phytochemistry, 27: 1745-1749.

MARKHAM, K.R., CHARI, V.M. & MABRY, T.J. 1982. Carbon-13 NMR Spectroscopy of flavonoids. In Harborne, J.B. & Mabry, T.J. (Eds.): The Flavonoids-Advances in Research. Chapman & Hall. London.

MARKHAM, K.R. & GEIGER, H. 1993. ^{1}H-NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuteriomethylsulfoxide. In Harborne, J.B. (Ed.): The Flavonoids - Advances in research since 1986. Chapman & Hall. London.

MARKHAM, K.R. & GIVEN, D.R. 1988. The major flavonoids of an Antartic Bryum. Phytochemistry, 27: 2843-2845.

MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. 1968. A procedure for the ultraviolet spectral detection of ortho-dihydroxyl groups in flavonoids. Phytochemistry, 7: 1197-1200.

MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. 1975. Ultraviolet visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

MARKHAM, K.R. & MOORE, N.A. 1980. Comparative flavonoid glycoside biochemistry as a chemotaxonomic tool in the subdivision of the classical "genus" Lycopodium. Biochem. Syst. Ecol., 8: 17-20.

MARKHAM, K.R., MOORE, N.A. & PORTER, L.J. 1978. Changeover in flavonoid pattern accompagning reproductive structure formation in a Bryophyte. Phytochemistry, 17: 911-913.

MARKAHM, K.R. & PORTER, L.J. 1969. Flavonoids in the green algae (Chlorophyta). Phytochemistry, 8: 1777-1781.

MARKHAM, K.R. & PORTER, L.J. 1978a. Chemical constituents of Bryophytes. In Reinhold, L., Harborne, J.B. & Swain, T. (Eds.): Progress in Phytochemistry (vol. 5). Pergamon Press. Oxford.

MARKHAM, K.R. & PORTER, L.J. 1978b. Production of aurone by bryophytes in the reproductive phase. Phytochemistry, 17: 159-160.

MARKHAM, K.R., PORTER, L.J. & CAMPBELL, E.O. 1977. The usefulness of flavonoid characters in studies of the taxonomy and phylogeny of liverworts. Bryophytorum Bibliotheca, 13: 387-398.

MARKHAM, K.R., PORTER, L.J., MÜES, R., ZINSMEISTER, H.D. & BREHM, R. 1976. Flavonoid variation in the Liverwort Conocephalum conicum: evidence for geographic races. Phytochemistry, 15: 147-150.

MARKHAM, K.R., SHEPPARD, C. & GEIGER, H. 1987. 13-C NMR studies of some naturally ocurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. Phytochemistry, 26: 3335-3337.

MARKHAM, K.R. & WILSON, R.D. 1988. Paper chromatographic mobilities of a range of flavone and flavonol O-glycosides. Phytochem. Bull., 20 (1): 8-12.

MARKHAM, K.R. & WILSON, R.D. 1989. Paper chromatographic mobilities of a range of flavonoid c-glycosides. Phytochem. Bull., 21 (1): 2-4.

MARSILI, A. & MORELLI, I. 1968. Triterpenes from mosses-1. The ocurrence of 22(29)-hopene in Thamnium alopecurum (L.) Br. eur. ssp. eu-alopecurum Giac. Phytochemistry, 7: 1705-1706.

MARSILI, A. & MORELLI, I. 1970. Triterpenes from mosses. II. Triterpenes from Thuidium tamariscifolium. Phytochemistry, 9: 651-653.

MARSILI, A., MORELLI, I., BERNARDINI, C. & FACCHIANI, M. 1972. Constituents of some mosses. Phytochemistry, 11: 2003-2005.

MARSILI, A., MORELLI, I. & IORI, A.M. 1971. Triterpenes from mosses. III. 21-hopene and some other constituents of Pseudoscleropodium purum. Phytochemistry, 10: 432-433.

MATTERI, C.M. 1968. Morfología del protonema y formación de yemas en Philonotis (Bartramiaceae). Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. Bernadino Rivadavia, 3 (8): 255-265.

McCLEARY, J.A., SYPHERD, P.S. & WALKINGTON, D.L. 1960. Mosses as possible sources of antibiotics. Science, 131: 108.

McCLEARY, J.A. & WALKINGTON, D.L. 1966. Mosses and antibiosis. Rev. Bryol. Lichénol., 34: 309-314.

McCLURE, J.W. 1975. Physiology and Functions of Flavonoids. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

McCLURE, J.W. 1986. Physiology of flavonoids in plants. In Cody, V., Middleton Jr., E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Alan R. Liss, Inc. New York.

McCLURE, J.W. & MILLER, H.A. 1967. Moss chemotaxonomy. A survey for flavonoids and their taxonomic implications. Nova Hedwigia, 14: 111-125.

McNAIR, J.B. 1935. Angiosperm phylogeny on a chemical basis. Bull. Torr. Bot. Club, 62: 515-532.

MEIER, B. & STICHER, 0. 1986. The use of a high speed spectro photometric detector (diode array) in the HPLC analysis of medicinal plants. Pharm. Ind., 48: 87-91.

MELCHERT, T.E. & ALSTON, R.E. 1965. Flavonoids from the moss Mnium affine Bland. Science, 150: 1170-1171.

MELTS, M.L. & MacGREGOR, J.T. 1981. Note. Mutat. Res., 88: 317.

MENTLEIN, R. & VOWINKEL, E. 1984. Die roten Wandfarbstoffe des Torfmooses Sphagnum rubellum. Liebigs Ann. Chem., 3: 1024-1035.

MIKSCHE, G.E. & YASUDA, S. 1978. Lignin of «giant» mosses and some related species. Phytochemistry, 17: 503-504.

MITSUYA, H. & BRODER, S. 1986. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/ lymphoadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1911-1915.

MITSUYA, H., MATSUKURA, M. & BRODER, S. 1987. Rapid in vitro system for assessing activity of agents against HTLV III/LAV. In Broder, S. (Ed.): AIDS: Modern concepts and therapeutic challenges. Marcel Dekker Inc. New. York.

MITSUYA, H., WEINHOLD, K.J., FURMAN, P.A., CLAIR, M.H.ST., LEHREMAN, S.N., GALLO, R.C., BOLOGNESI, D., BARRY, D.W. & BRODER, S. 1985. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and citopathic effect of humna T-lymphotropic virus type III/lymphoadenopathy-associated virus in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7096.

MOLISCH, C. 1911. Über das Vorkommen von Saponarin bei einem Lebermoss (Madotheca platiphylla). Ber. Deutsch. Bot. Ges., 29: 478-481.

MONTAGNIER, L. 1993. SIDA: Los hechos, La esperanza. Selección OMS-CCE. Instituto Pasteur. Paris.

MORI, A., NISHINO, C., ENOKI, N. & TAWATA, S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against Proteus vulgaris and Staphylococcus aureus. Phytochemistry, 26 (8): 2231-2234.

MÜES, R. 1985. The Relationship between Taxonomy and Chemical Data. Bryological Times, 33: 1-3.

MÜES, R. 1988. Thin-layer chromatography (TLC) of flavonoid compounds from bryophytes. In Glime, T.M. (Eds.): Methods in Bryology. Hattori Bot. Lab. Nichinan.

MÜES, R. 1989. Chemosystematics of Bryophytes. In Das, N.P. (Ed.): Proceedings of 3rd. International Symposium on Flavonoids in Biology & Medicine. Current Issues in Flavonoid Research. National University of Singapore.

MÜES, R. 1990. The significance of flavonoids for the classification of bryophyte taxa at different taxonomic rank. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

MÜES, R., LEIDINGER, G., LAUCK, V., ZINSMEISTER, H.D., KOPONEN, T. & MARKHAM, K.R. 1986. Rhizomnium magnifolium and R. pseudopunctatum, the first Mosses to Yield Flavone Glucuronides. Z. Naturforsch., 41c: 971-975.

MÜES, R. & ZINSMEISTER, H.D. 1988. The Chemotaxonomy of Phenolic Compounds in Bryophytes. Jour. Hattori Bot. Lab., 64: 109-141.

MÜLLER, C. 1874. Musci novo-granatenses Wallisiani adjectis nonnullis aliis muscis novis andinis vel tropico-Americanis vel australasiacis. Linnaea, 38: 572-620.

MÜLLER, C. 1901. Genera Muscorum Frondosorum, Clases Shistocarporum, Cleistocarporum, Stegocarporum complectentia, exceptis Orthotrichaceis et Pleurocarpis. Leipzig.

MÜLLER, D. & FLEURY, J.P. 1991. A New Strategy for the synthesis of Biflavonoids via Arylboronic Acids. Tetrahedron Letters, 32 (20): 2229-2232.

MÜLLER, K. 1905. Beitrag zur Kenntnis der ätherischen Öle bei Labermoosen. Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 45: 299-319.

NAVASQUILLO, A. 1992. La Naturaleza: el mejor laboratorio farmaceútico y cosmético de todos los tiempos. En M.A.P.A. (Ed.): I Jornadas Ibéricas de Plantas Medicinales, Aromáticas y de Aceites Esenciales. MAPA-INIA. Madrid.

NEHIRA, K. 1983. Spore germination, protonema development and sporeling development. In Schuster, R.M. (Ed.): New Manual of Bryology (vol. 1). Nichinan.

NEU, R. 1957. Chelate von Diarylborsäuren mit aliphatischen Oxyalkylaminen als Reagenzien für den Nachweis von Oxyphenyl-benzo-þ-pyronen. Naturwissenschaften, 44: 181-184.

NIEMANN, G.J. 1980. *Phenolics from Larix Needles. XV. Hihg-performance Liquid Chromatography of* L. gmelinii Flavonoids. Z. Naturforsh., C 35: 514-515.

NIEMANN, G.J. & KOERSELMAN-KOOY, J.W. 1977. Phenolics from Larix needles. XIII. Analysis of main Larix flavonoids by high-pressure liquid chromatography. Planta Medica, 31: 297-301.

NIEMANN, G.J. & VAN GENDEREN, H.H. 1980. Chemical relationships between Pinaceae. Biochem. Syst. Ecol., 8: 237-240.

NIENHAUS, F. 1985. Viren, Mykoplasmen and Rickettsien (UTB No. 1361). Ulmer. Stuttgart.

NIKLAS, K.J. & GIANASSI, D.E. 1978. Angiosperm paleobiochemistry of the succor creek flora (miocene) Oregon, USA. Am. J. Bot., 65 (9): 943-952.

NILSSON, E. 1967. Moss pigments. 7. Preliminary investigations of the violet pigments in Sphagnum nemoreum. Acta Chem. Scand., 21: 1942-1951.

NILSSON, E. 1969. Moss pigments.9.Scutellarin-glucoside in Bryum weigelii. Arkiv Kemi, 31: 475-480.

NILSSON, E. 1973. Studies of flavylium compounds. 8. Application of proton NMR spectroscopy to the analysis of anthocyanidin pigments. Chemica Scripta, 4: 1-7.

NILSSON, E. & BENDZ, G. 1973. Flavonoids in bryophytes. In Bendz, G., Santensson, J. & Runnström-Reio, V. (Eds.): Nobel 25 Symposium (1973) Chemistry in Botanical Classification. Academic Press. New York-London.

NILSSON, E., LINDBERG, G. & ÖSTERDAHL, B.G. 1973. Chemical studies on Bryophytes. A new branched apigenin-7-triglycoside from Dicranum scoparium. Chemica Scripta, 4: 66-68.

NILSSON, E. & MARTENSSON, O. 1971. Chemical studies on bryophytes. 11. (-)-16Ó-Hydroxy-kaurane from Saelania glaucescens (Hedw.) Broth. Acta Chem. Scand., 25: 1486-1487.

NILSSON, E. & TOTTMAR, O. 1967. Moss pigments. 5. Studies of phenolic cell wall polymers in Sphagnum nemoreum. Acta Chem. Scand., 21: 1558-1566.

NISHIDA, Y. 1978. Studies on the sporeling types in mosses. Journ. Hattori Bot. Lab., 44: 371-454.

NORRIS, D.H. & KOPONEN, T. 1989. Note. Acta Bryolichenologica Asiatica, 1: 1.

OGISO, A., SATO, A., SATO, S. & TAMURA, C. 1972. Novel macrocyclic flavonoid glycosides, toxic components from Leucothoe keiskei. Tetrahedron Letters, 30: 3071-3074.

ÖSTERDAHL, B.G. 1976. Chemical studies on Bryophytes. 17. A new Luteolin Tetraglycoside from Hedwigia ciliata. Acta Chem. Scand., B 30: 867-870.

ÖSTERDAHL, B.G. 1978a. Chemical studies on Bryophytes. 19. Application of C-13 NMR in Structural Elucidation of Flavonoids C-glucosides from Hedwigia ciliata. Acta Chem. Scand., B 32: 93-97.

ÖSTERDAHL, B.G. 1978b. Chemical studies on Bryophytes. 20. A New Branched flavonoid-O-triglycoside from Dicranum scoparium. Acta Chem. Scand., B 32: 714-716.

ÖSTERDAHL, B.G. 1979a. Chemical studies on Bryophytes. Isolation and identification of flavones and flavone glycosides. Acta Universitatis Upsaliensis. Abstracts of Upsala Dissertations from the Faculty of Sciencies, 516: 1-55.

ÖSTERDAHL, B.G. 1979b. Chemical studies on Bryophytes. 21. Flavonoid Glycosides of Hedwigia ciliata. Acta Chem. Scand., B 33: 119-124.

ÖSTERDAHL, B.G. 1979c. Chemical studies on Bryophytes. 22. Flavonoid C-Glycosides of Mnium undulatum. Acta Chem. Scand., B 33: 400-404.

ÖSTERDAHL, B.G. 1983. Chemical studies on bryophytes. 23. 13-C NMR analysis of a biflavone from Dicranum scoparium. Acta Chem. Scand., B 37: 69-71.

ÖSTERDAHL, B.G., BENDZ, G. & FREDGA, A. 1976. 10th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (IUPAC) (paper No. D 14). Dunedin. New Zealand.

ÖSTERDAHL, B.G. & LINDBERG, G. 1977. Chemical studies on bryophytes. 18. Luteolin-7-O-neohesperidoside-4'-O-sophoroside, another new tetraglycoside from Hedwigia ciliata. Acta Chem. Scand., B 31: 293-296.

PATES, A.L. & MADSEN, G.C. 1955. Ocurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plant growing in Florida. II. Bot. Gaz., 116: 250-261.

PAUL, H. 1908. Die Kalkfeindlichkeit der Sphagna und ihre Ursache, nebst einem Anhang über die Aufnahmefähigkeit der Terfmoose für Wasser. Mitt. Bayer Bot. Ges. (Moorkanst), 2: 63-118.

PELTER, A., WARD, R.S. & GRAY, T.I. 1976. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. J. Chem. Soc. Perkin., 1: 2475-2483.

PERNO, C.F., YARCHOAN, R., COONEY, D.A., HARTMAN, N.R., GARTNER, S., POPOVIC, M., HAO, Z., GARRARD, T.L., WILSON, Y.A., JOHNS, D.G. & BRODER, S. 1988. Inhibition of human inmunodeficiency virus (HIB-1/HTLV-III_{Ba-L}) replication in fresh and cultured human peripheral blood monocytes/macrophages by azidothymidine and related 2',3'-dideoxynucleosides. J. Exp. Med., 168: 1111-1125.

PINCEMAIL, J., DEBY, C., DRIEU, K., ANTON, R. & GOUTIER, R. 1990. Flavonoids as "antioxidants". In Das, N.P. (Ed.): Flavonoids in Biology and Medicine III: Current issues in Flavonoids Research. National University of Singapore.

POPOVIC, M., SARNGARADHARAN, M.G., READ, E. & GALLO, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science (Wash. DC), 224: 497.

PRYDE, A. & GILBERT, M.T. 1979. Applications of High Permomance Liquid Chromatography. Chapman & Hall. London.

QUINN, C.J. & GADEK, P. 1981. Biflavones of Dacrydium sensu lato. Phytochemistry, 11: 1759-1761.

RACOVITZA, A. 1959. *Étude systématique et biologique des champignons bryophiles*. Mem. Mus. Natl. Hist. Nat., ser. B., 10: 1-288.

RADWAN, S.S. 1975. The lipids in plant tissue cultures compared to the lipids of photosynthetic and nonphotosynthetic plants and plant organs. Fette Seifen Anstrichmittel, 77: 181-184.

RAMAUT, J.L. 1959. Autoecologie du genre Sphagnum. Nat. Belges, 40: 9-22.

READHEAD, S.A. 1981. Parasitism of bryophytes by agarics. Can. J. Bot., 59: 63-67.

REZNIK, H. & EGGER, K. 1961. Benedicts Reagens als Indicator für phenolische ortho-Dihydroxygruppen. Zeit. Analyt. Chemie, 183: 196-199.

RICE, E.L. 1984. Allelopathy. Academic Press. Orlando.

RICHARDSON, P.M. 1992. Structure, biosynthesis, evolution and physiological and ecological roles of plant flavonoids and related compounds important in chemoprevention. Cancer Chemoprev., 353-360.

RICHARDSON, P.M. 1983. Flavonoids and Phylogenetic Systematics. En N.J. Platnick & V.A. Funk (Eds.): Advance in Cladistics (vol. 2). Columbia Univ. Press. New York.

ROBBERECHT, R. & CALDWELL, M.M. 1978. Leaf epidermal transmittance of ultraviolet radiation and its implications for plant sensitivity to ultraviolet radiation induced injury. Oecologia, 32: 277-287.

RON, M.E., VELASCO-NEGUERUELA, A., PEREZ-ALONSO, M.J. & CEREZO, J. 1990. Sobre la presencia de flavonoides en musgos. Anales Jard. Bot. Madrid, 46: 421-426. (Comunicación presentada al VII Symposium Nacional de Botánica Criptogámica, Madrid, 1987).

RON, M.E., VELASCO-NEGUERUELA, A., PEREZ-ALONSO, M.J., BUADES, A., ESTEBANEZ, B. & LOPEZ-SAEZ, J.A. 1992. Consideraciones evolutivas sobre los musgos a partir de caracteres anatómicos y fitoquímicos. In Alemany, A. (Ed.): Historia Natural'91. Palma de Mallorca.

RUDOLPH, H. 1963. Präparative Darstellung eines roten Wandfarbstoffs von Sphagnum magellanicum. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 76: 72-73.

RUDOLPH, H. 1964. Zur Frage der Membranochromie bei Sphagnen. I. Welche Faktoren bestimmen den Farbwechsel?. Flora, 155: 250-293.

RUDOLPH, H. 1965. Zur Frage der Membranochromie bei Sphagnen. II. Der Versuch einer Charakterisierung chromatographisch rein dargesteller Kardinalpigmente. Planta (Berl.), 64: 178-185.

RUDOLPH, H. & JOHNK, A. 1982. Physiological aspects of phenolic compounds in the cell walls of Sphagna. Journ. Hattori Bot. Lab., 53: 195-203.

RUDOLPH, H. & VOWINKEL, E. 1969. Sphagnorubin, ein kristallines Membranochrom aus Sphagnum magellanicum. Z. Naturforsch., 24b: 1211-1212.

SAITO, S. 1959. Studies on the germination ot the spore in some mosses. Sci. Rep. Shimane Univ., 9: 55-63.

SAKAI, K., ICHIKAWA, T., YAMADA, K., YAMASHITA, M., TANIMOTO, M., HIKATA, A., IYUIN, Y. & KONDO, K. 1988. Antitumor principles in mosses: the first isolation and identification of maytansinoids, including a novel 15-methoxyansamitocin P-3. J. Nat. Prod., 51: 845.

SALM, R. 1992. Isolierung und Strukturaufläurung von Biflavonoiden aus des Laubmoos Bartramia halleriana. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SALM, R. 1994. Dissertation (en prensa). Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SALM, R., SEEGER, T. & ZINSMEISTER, H.D. 1993. Die Biflavonoidmuster des Laubmooses Bartramia halleriana. Z. Naturforsch., 48c: 531-532.

SARIN, P.S. 1988. Molecular pharmacologic approaches to the treatment of Aids. Ann. Rev. Pharmacol., 28: 411-428.

SATAKE, K. & MIYASAKA, K. 1984. Discovery of bacteria in the cell wall of the aquatic liverwort Jungermannia vulcanicola Steph. in an acid stream having pH 4.2-4.6. J. Bryol., 13: 277-279.

SATAKE, K. & SHIBATA, K. 1986. Bacterial invasion of the cell wall of an aquatic bryophyte Scapania undulata (L.) Dum. in both acidic and near-neutral conditions. Hikobia, 9: 361-365.

SATAKE, K., SHIBATA, K. & TANAKA, A. 1990. Discovery of bacteria in the cell wall of a moss Drepanocladus fluitans in the acid lake Usoriko (Osoresanko), Japan. Lindbergia, 16: 138-142.

SCHEIRER, D.C. & DOLAN, H.A. 1983. Bryophyte leaf epiflora: an SEM and TEM study of Polytrichum commune Hedw. Am. J. Bot., 70: 712-718.

SCHEUER, P.J. 1973. The Chemistry of Marine Natural Products. Academic Press. New York.

SCHILLING, G. 1985. Recent advances in NMR-spectroscopy of plant phenolics. En Sumere, C.F. & Lea, P.J. (Eds.): Ann. Proc. of the Phytochemical Society of Europe (vol. 25): The Biochemistry of Plant Phenolics. Clarendon Press. Oxford.

SCHIMPER, W.P. 1855. Corollarium Bryologiae Europaeae, conspectum diagnosticum familiarum, generum et specierum, adnotationes novas atque emendationes complectens. Stuttgart.

SCHNEIDER, G. 1985. Pharmazeutische Biologie. (2nd. Ed.). BI-Wissenschaftsverlag. Mannheim.

SCHOFIELD, W.B. 1985. Introduction to Bryology. Macmillan. New York.

SCHRÖDER, E. 1991. Massenspektrometrie. Springer Verlag. Berlin.

SCHWAEGRINCHEN, F. 1830. Species muscorum frondosorum. Pars I. In Willdenow, C.L. (Ed.): Caroli a Linnée Species Plantarum (editio quarta, tomus V, p.2, sectio prima). Berlin.

SEEGER, T. 1988. Biflavonoide und Flavonglykoside aus Plagiomnium cuspidatum (Hedw.) T. Kop. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SEEGER, T. 1992. Biflavonoide und strukturverwandte verbindungen aus Laubmoosen unter besonderer berücksichtigung der Bartramiaceae. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SEEGER, T., GEIGER, H., MÜES, R. & ZINSMEISTER, H.D. 1993a. The Biflavonoid Pattern of Anacolia webbii. Z. Naturforsch., 48c: 529-530.

SEEGER, T., GEIGER, H., ZINSMEISTER, H.D. & ROZDZINSKI, W. 1993b. Biflavonoids from the moss Homalothecium lutescens. Phytochemistry, 34 (1): 295-296.

SEEGER, T., GEIGER, H. & ZINSMEISTER, H.D. 1991. Bartramiaflavone, a macrocyclic biflavonoid from the moss Bartramia pomiformis. Phytochemistry, 5: 1653-1656.

SEEGER, T., GEIGER, H., ZINSMEISTER, H.D., FRAHM, J.P. & WITTE, L. 1992a. 3',3'''-Binaringenin, a New Biflavonoid from Pilotrichella cuspidata (Meteoriaceae, Musci). Z. Naturforsch., 47c: 667-669.

SEEGER, T., GEIGER, H. & ZINSMEISTER, H.D. 1992b. Isolierung und Strukturaufklärung von Bartramia-Triluteolin, Bartramiasäure und einigen Biflavonoiden aus dem Laubmoos Bartramia pomiformis. Z. Naturforsch., 47c: 527-530.

SEEGER, T., ZINSMEISTER, H.D. & GEIGER, H. 1990. The biflavonoid pattern of Rhytydiadelphus squarrosus (Hedw.) Warnst. Z. Naturforsch., 45c: 583-586.

SEELIGMANN, P. 1990. Avances en Quimiosistemática Vegetal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat., 5: 89-104.

SEIGLER, D.S. 1981. Secondary Metabolites and Plant Systematics. In Conn, E.E. (Ed.): The Biochemistry of Plants. A comprehensive Treatise (vol. 7) Secondary Plant Products. Academic Press. New York.

SELWAY, J.W.T. 1986. Antiviral Activity of Flavones and Flavans. In Cody, V., Middleton Jr., E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoides in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. Alan R. Liss, Inc. New York.

SENDRA, J.M., NAVARRO, J.L. & IZQUIERDO, L. 1988. C 18 solid phase isolation and high perfomance liquid chromatography / ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in Citrus juices. J. Chrom. Sci., 26: 443-448.

SHAW, J. 1985. Exostomial ornamentation in the Bryales. Journ. Hattori Bot. Lab., 59: 303-324.

SHIMIZU, M., ITU, T., TERASHIMA, S., HAYASHI, T., ARASAWA, M., MORITA, N., KUROKAWA, S., ITO, K. & HASHIMOTO, Y. 1984. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. Phytochemistry, 23 (9): 1885-1888.

SHU-CHEN, C., YIH-SHOU, H. & JUNG-YAN, L. 1992. Inhibitory effects of flavonoids on moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. J. Nat. Prod., 55 (2): 179-183.

SIEGEL, S.M. 1962. The plant cell wall. Pc.M. Press. New York.

SIEGEL, S.M. 1969. Evidence for the presence of lignin in moss gametophores. Amer. J. Bot., 56 (2): 175-179.

SIEGEL, U. 1988. Ein HPLC - Fingerprint System für Flavonoide aus Moosen verschiedener Standorte am Beispiel von Bryum capillare Hedw. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SIEGEL, U., ZINSMEISTER, H.D. & STEIN, W. 1989. A rapid HPLC-Fingerprint System for flavonoids of Bryophytes. Journ. Hattori Bot. Lab., 67: 389-394.

SIEVERS, H. 1992. Inhaltsstoffe und in vitro-Kultur des Laubmooses Hypnum cupressiforme Hedw. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SIEVERS, H., BURKHARDT, G., BECKER, H. & ZINSMEISTER, H.D. 1992. Hypnogenols and other dihydroflavonols from the moss Hypnum cupressiforme. Phytochemistry, 31 (9): 3233-3237.

SIEVERS, H., BURKHARDT, G., BECKER, H. & ZINSMEISTER, H.D. 1994. Further biflavonoids and 3'-phenylflavonoids from Hypnum cupressiforme. Phytochemistry 35 (3): 795-798.

SIMON, E. 1987. Lyophyllum palustre, a parasite on Sphagnum. Symp. Biol. Hung., 35: 165-174.

SMITH, A.J.E. 1980. The moss flora of Britain and Ireland. Cambrigde University Press. Cambrigde.

SMITH, A.J.E. 1986. Bryophyte phylogeny: fact or fiction?. J. Bryol., 14: 83-89.

SOLBERG, Y. 1983. Lipids constituents of the moss Mniobryum wahlenbergii var. glaciale. Cryp. Bryol. Lichénol., 4: 129-144.

SOMERSALO, S., KARUNEN, P. & ARO, E. 1986. The acyl lipid composition of wheat leaves and moss protonemata using a new non-carcinogenin extraction solvent system. Physiologia Plantarum, 68: 467-470.

SPIES, F. 1982. Flavonoidmuster von Plagiomnium affine (Funck) Kop. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

SPILKOVA, J. & HUBIK, J. 1988. Biologische Wirkungen von Flavonoiden. Pharmazie in unserer Zeit, 17 (1): 1-9.

SPILKOVA, J. & HUBIK, J. 1992. Biologische Wirkungen von Flavonoiden. II. Pharmazie in unserer Zeit, 4: 174-182.

SPJUT, R.W., SUFFNESS, M., CRAGG, G.M. & NORRIS, D.H. 1986. Mosses, Liverworts, and Hornworts Screened for Antitumor Agents. Economic Botany, 40 (3): 310-338.

SPJUT, R.W., CASSADY, J.M., McCLOUD, T., SUFFNESS, M., NORRIS, D.H., CRAGG, G. & EDSON, C.F. 1988. Variation in Cytotoxicity and Antitumor Activity among samples of the moss Claopodium crispifolium (Thuidiaceae). Economic Botany, 42 (1): 62-72.

STAFFORD, H.A. 1990. Flavonoid Metabolism. CRC Press. Boca Raton, FL.

STAFFORD, H.A. 1991. Flavonoid Evolution: An Enzymic Approach. Plant Phisiol., 96: 680-685.

STAHL, E. 1967. Dünnschichtchromatographie - Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag. Berlin.

STAHL, E. 1969. TLC - A Laboratory Handbook. (2nd. Ed.). Springer Verlag. Berlin.

STEIN, W. 1985. Flavonoidmalonylester im Gametophyten und Sporophyten von Bryum capillare. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

STEIN, W. 1988a. En Geiger (1990): Biflavonoids in bryophytes. In Zinsmeister, H.D. & Mues, R. (Eds.): Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

STEIN, W. 1988b. Ein Beitrag zur Flavonoidchemie der Laubmoosfamilie Bryaceae. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

STEIN, W., ANHUT, S., ZINSMEISTER, H.D., MUES, R., BARTZ, W. & KOSTER, J. 1985. New flavone glucoside Malonylesters from Bryum capillare. Z. Naturforsch., 40c: 469-473.

STEIN, W. & ZINSMEISTER, H.D. 1990. New flavonoids from the moss Bryum pseudotriquetrum. Z. Naturforsch., 45c: 25-31.

STEIN, W. & ZINSMEISTER, H.D. 1991. The ocurrence of Flavonoids in the moss family Bryaceae. Journ. Hattori Bot. Lab., 69: 195-202.

STRACK, D., FUISTING, K. & POPOVICI, G. 1979. High performance liquid chromatography analysis of oat (Avena sativa) flavone derivatives. J. Chromatogr., 176: 270-273.

STRACK, D. & KRAUSE, J. 1978. Reversed phase high perfomance liquid chromatography separation of naturally ocurring mixtures of flavone derivatives. J. Chromatogr., 156: 359-361.

STRAIN, H.H. 1958. Chloroplast pigments and chromatographic analysis. Annual Priestley Lectures, Penn. State Univ., 32: 1-180.

SUIRE, C. 1975. Les données actuelles sur la chemie des Bryophytes. Rev. Bryol. Lichénol., 41: 105-256.

SUIRE, C. & ASAKAWA, Y. 1979. Chemotaxonomy of Bryophytes: a Survey. In Clarke, G.C.S. & Duckett, J.G. (Eds.): Bryophyte Systematics. Academic Press. London.

SUIRE, C. & ASAKAWA, Y. 1982. Recent Advances in the Chemotaxonomy of Liverworts. Beih. Nova Hedwigia, 71: 39-58.

SWAIN, T. 1974. Biochemical evolution in Plants. En Florkin, M. & Stotz, E.H. (Eds.): Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam.

SWAIN, T. 1975. Evolution of flavonoid compounds. In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (Eds.): The Flavonoids. Chapman & Hall. London.

SWAIN, T. 1977a. Secondary compounds as protective agents. Ann. Rev. Plant Physiol., 28: 479-501.

SWAIN, T. 1977b. Secondary compounds: primary products. Bot. Mus. Leafl. Harv. Univ., 4: 35-57.

SWAIN, T. 1980. Flavonoids as Chemotaxonomic Markers in Plants. In Czygan, F.Ch. (Ed.): Pigments in Plants. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.

SWAIN, T. 1986. The Evolution of Flavonoids. In Cody, V., Middteton, E. & Harborne, J.B. (Eds.): Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships. Alan R. Liss, Inc. New York.

TAYLOR, I.E.P., SHCOFIELD, W.B. & ELLIOT, A.M. 1970. Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis. Canad J. Bot., 48: 367-369.

TERNAI, B. & MARKHAM, K.R. 1976. Carbon-13 NnMR studies of flavonoids. I. Flavones and flavonols. Tetrahedron, 32: 565-569.

TIT, A., GHOGOMU TIH, R., SONDENGAM, B.L., MARTIN, M.T. & BODO, B. 1992. Tetraflavonoids of Lophira alata. Phytochemistry, 31 (3): 981-984.

TOMAS-LORENTE, F., GARCIA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMAS-BARBERAN, F.A. & NAVARRO, G. 1989. Análisis por HPLC de polifenoles en algunos vinos tintos españoles. Rev. Agroquim. Tecn. Aliment., 29: 399-406.

TRAUB, A. & GEIGER, H. 1975. Nachweis von 2.5.7.3'.4'-Pentahydroxy-flavanon-5-glucosid in den Samen von Galega officinalis L. (Fabaceae). Z. Naturforsch., 30c: 823-824.

TRENNHEUSER, F. 1992. Phytochemische Untersuchung and in vitro Kultur ausgewählter Vertreter der Anthocerotopsida. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

TURNER, W.B. 1971. Fungal Metabolites. Academic Press. London.

VAN DER WIJK, R., MARGADANT, W.D. & FLORSCHUTZ, P.D. 1959. Index Muscorum (vol. I). Utrecht.

VANDEN BERGHE, D.A., IEVEN, M., MARTENS, F. & VLIETINCK, A. 1978. Screening of higher plants for biological activities. II: Antiviral activity. Lloydia, 5: 463-471.

VANDEN BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. & VAN HOOF, L. 1986. Plant Products as potential antiviral agents. Bull. Inst. Pasteur, 84: 101-147.

VANDERKERKHOVE, O. 1977a. Isolierug und Charakterisierug eines Dihydroflavonols bei dem Laubmoss Georgia pellucida (L.) Rabh. Z. Pflanzenphysiol., B 82: 455-457.

VANDERKERKHOVE, O. 1977b. Uber die Verbreitung von flavonoiden bei pleurokarpen Laubmossen. I. Apigenin-7-rhamnoglucosid bei Hylocomium splendens (Hedw.) Br. Eur. Z. Pflanzenphysiol., B 85: 135-138.

VANDERKERKHOVE, O. 1978a. Uber die Verbreitung von flavonoiden bei akrokarpen Laubmossen. I. Die Flavonoide von Mnium undulatum (L.) Hedw. Z. Pflanzenphysiol., B 86: 135-139.

VANDERKERKHOVE, O. 1978b. Uber die Verbreitung von flavonoiden bei akrokarpen Laubmossen. II. Luteolin aus dem sporophyten von Ceratodon purpureus (L.) Brid. Z. Pflanzenphysiol., 86 (3): 279-281.

VANDERKERKHOVE, O. 1980. Uber die Verbreitung von flavonoiden bei pleurokarpen Laubmossen. II. Apigenin un Apigenin-7-rhamnoglucosid bei Pleurozium schreberi (Willd.) Mitt. Z. Pflanzenphysiol., B 100: 369-372.

VANDEKERKHOVE, O., EULER, R., KOHN, G. & HARTMANN, E. 1984. Influence of stress conditions on the fatty acid patterns of the moss Leptobryum pyriforme. Journ. Hattori Bot. Lab., 56: 187-193.

VAN HOOF, L., VANDEN BERGHE, D.A., HATFIELD, G.M. & VLIETINCK, A.J. 1984a. Plant antiviral agents.- V. 3-methoxyflavones as potent inhibitors of viral induced block of cell synthesis. Planta Medica, 50: 513-517.

VAN HOOF, L., VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A. 1984b. 3-Methoxyflavones from Euphorbia grantii Oliver as potent recovering agents of virally induced block of host-cell synthesis. Arch. int. Physiol. Biochem., 92: B-110-111.

VAN HOOF, L., VANDEN-BERGHE, D.A., PETIT, E. & VLIETINCK, A.J. 1981. Antimicrobial and antiviral screening of Bryophyta. Fitoterapia, 52: 223-229.

VAN HOOF, L., VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A. 1980. Screening of Poplar Trees for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity. Biologia Plantarum, 22 (4): 265-273.

VECKENSTEDT, A. & PUSZTAI, R. 1981. Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. Antivirol. Res., 1: 249-261.

VELASCO, A., RON, E., PEREZ ALONSO, M.J., BUADES, A., LOPEZ-SAEZ, J.A., ESTEBANEZ, B. & JOVER DE CELIS, M. 1991. Estudio anatómico y presencia de flavonoides en varias especies de musgos acrocárpicos. Comunicación presentada al IX Simposio Nacional de Botánica Criptogámica. Salamanca, 1991. España.

VERGER, G. 1988. Enfermedades infecciosas (vol. I). Antibióticos S.A. Ediciones Doyma. Barcelona.

VIOQUE, E. 1984. Spray reagents for thin layer chromatography (TLC) and paper chromatography (PC). In Zweig, G., Sherma, J. & Mangold, H.K. (Eds.): Handbook of Chromatography. Lipids. (vol. II). Boca Raton.

VITT, D.H. 1984. Classification of the Bryopsida. In Schuster, R.M. (Ed.): New Manual of Bryology (vol. II). Hattori Botanical Laboratory. Nichinan.

VOIGT, A. 1993. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

VOIRIN, B. 1972. Distribution des composés polyphénoliques chez les Lycopodinées. Phytochemistry, 11: 257-262.

VOSS, E. 1975. Totalsunthese des Sphagnorubins. Dissertation. Math.-Nat. Fakultät d. Univ. Kiel.

VOWINKEL, E. 1975. Torfmoosmembranochrome, 2. Die Struktur des Sphagnorubins. Chem. Ber., 108: 1166-1181.

VRIJSEN, R., ROMBOUT, B., VAN HOOF, L., VANDEN BERGHE, D.A. & BOEYE, A. 1984. 3-Methylquercetin, an inhibitor of the early stages of poliovirus replication. Arch. Int. Physiol. Biochem., 92: B-113-114.

WAGNER, H., BLADT, S. & ZGAINSKI, E.M. 1983. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag. Berlin.

WEITZ, S. & IKAN, R. 1977. Bracteatin from the moss Funaria hygrometrica. Phytochemistry, 16: 1108-1109.

WEYAND, J. 1993. Diplomarbeit (en prensa). Univesität des Saarlandes. Saarbrücken.

WILSCHKE, J. & RUDOLPH, H. 1988. HPLC Analysis of Phenolics in Mosses. In Glime, J.M. (Ed.): Methods in Bryology. Hattori Bot. Lab. Nichinan.

WILSON, M.A., SAWYER, J., HATCHER, P.G., LERCH, H.E. III. 1989. 1,3,5- hydroxybenzene structures in mosses. Phytochemistry, 28 (5): 1395-1400.

WOLFBEIS, O.S., FURLINGER, E., CHANDRA JHA, H. & ZILLIKEN, F. 1984. The Absorption and Fluorescence of Isoflavones and the effect of Shift Reagents. Z. Naturforsch., 39b: 238-243.

WOLLENWEBER, E. 1981. Unusual flavanones from a rare american fern. Z. Naturforsch., 36c: 604-606.

WOLLENWEBER, E. 1982. Supplement Chromatographie. GIT-Verlag. Darmstadt.

WOLLENWEBER, E. & DIETZ, V.H. 1979. A table of mass spectral parent ions as an aid in flavonoid analysis. Phytochem. Bull., 12: 48-52.

WOLLENWEBER, E. & DIETZ, V.H. 1981. Ocurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. Phytochemistry, 20 (5): 869-932.

WOLTERS, B. 1964a. Die Verbreitung antifungaler Eigenchaften bei Moosen. Planta, 62: 88-96.

WOLTERS, B. 1964b. Antibiotisch und toxisch wirkende substanzen aus algen und moosen. Planta Medica, 12: 85-99.

WOOD, R.S. & JELLIS, G.J. 1984. Plant Diseases. Blackwell. Oxford.

WREN, R.W. 1956. Potter's New Cyclopedia of Botanical Drugs and Preparations. (7th. ed.). Sir Isaac Pitman & Sons Ltd. London.

WYATT, R., LANE, D.M. & STONEBURNER, A. 1991a. Chemosystematics of the Mniaceae. II. Flavonoids of Plagiomnium Section Rosulata. Bryologist, 94 (4): 443-448.

WYATT, R., LANE, D.M. & STONEBURNER, A. 1991b. Chemosystematics of the Mniaceae. III. Sources of Intraspecific Variation in Flavonoids. Bryologist, 94 (4): 452-456.

YOKOUCHI, Y., SATAKE, K. & AMBE, Y. 1984. Monoterpene composition of the aquatic liverwort Jungermania vulcanicola Steph. Bryologist, 87: 323-326.

ZAPP, J. 1992. Phytochemische Untersuchungen an ausgewählten Lebermoosen der Gattung Anastrophyllum sowie der beiden Laubmoose Dicranum scoparium und Pleurozium schreberi. Dissertation. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

ZEHR, R. 1990. A simplified technique for assaying the production of bacteriostatic compounds by hepatics. Lindbergia, 16: 128-132.

ZINSMEISTER, H.D. & MÜES, R. 1980. The flavonoid chemistry of Bryophytes. Rev. Latinoamer. Quím., 11: 23-29.

ZINSMEISTER, H.D. & MÜES, R. 1987. Moose als Reservoir bemerkenswerter sekundärer Inhalsstoffe. GIT Fachz. Lab., 31: 499-512.

ZINSMEISTER, H.D. & MÜES, R. 1990. Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Clarendon Press. Oxford.

ZINSMEISTER, H.D., BECKER, H. & EICHER, T. 1991. Bryophytes, a source of Biologically Active, Naturally Ocurring Material?. Angew. Chem., 30: 130-147.

ZINSMEISTER, H.D., MÜES, R., BECKER, H. & EICHER, T. 1987. Moose als Reservoir bemerkenswerter sekundärer Inhaltsstoffe. Campus, 6 (extra): 7-10. Universität des Saarlandes. Saarbrücken.

ANEXOS

ANEXO 1 : Relación de especies de musgos en la que ha sido estudiada el componente flavonoídico exceptuando los resultados de la presente memoria doctoral. (+ = presencia de flavonoides, - = ausencia de flavonoides en general sino se especifica un tipo concreto, -P= ausencia de proantocianidinas, (?) = identificación tentativa-dato dudoso o no conocido.) (Sistemática y autorías según Anderson & col., 1990 y Crosby & Magill, 1981):

	flavonoides	tipo (n°)	Referencias
1.Subclase Sphagnidae			
1.1.Orden Sphagnales			
1.1.1.Sphagnaceae			
Sphagnum spp.	+?	antocianidinas	Paul (1908)
	+	antocianidinas (2)	Mentlein & Vowinkel (1984)
Sphagnum fimbriatum	+?		McClure & Miller (1967)
Sphagnum girgensohnii	-P		Bendz & col. (1966a)
	+?		Efimenko & Dzenis (1962)
Sphagnum magellanicum	+		Efimenko & Dzenis (1962)
	+	antocianidinas (1)	Vowinkel (1975)
	+	antocianidinas (1)	Rudolph & Vowinkel (1969)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Sphagnum nemoreum	+	antocianidinas (3)	Rudolph & Johnk (1982)
Sphagnum palustre	+?		Becker (1986)
Sphagnum plumulosum	+	antocianidinas (3)	Rudolph & Johnk (1982)
Sphagnum rubellum	+	antocianidinas (3)	Rudolph & Johnk (1982)
Sphagnum squarrosum	-P		Bendz & col. (1966a)
Sphagnum warnstorfii	+	antocianidinas (3)	Rudolph & Johnk (1982)
2.Subclase Andreaeidae			
2.1.Orden Andreaeales			
2.1.1.Andreaeaceae			
Andreaea rothii	+		Becker (1986)
	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Andreaea rupestris	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		McClure & Miller (1967)
	+		Becker (1986)
Andreaea wilsonii	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
3.Subclase Bryidae			
3.1.Orden Dicranales			
3.1.1.Ditrichaceae			
Ceratodon purpureus	+		McClure & Miller (1967)
	+	flavonas (1)	Vandekerkhove (1978b)
Ditrichum flexicaule	+		Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Ditrichum pallidum	-		McClure & Miller (1967)
3.1.2.Dicranaceae			
Campylopus clavatus	+	biflavonoides (3)	Geiger & Markham (1992)
Campylopus holomitrium	+	biflavonoides (2)	Markham in Geiger (1990)
	+	biflavonoides (3)	Geiger & Markham (1992)
Campylopus introflexus	+	biflavonoides (3,6?)	Weyand (1993)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Chorisodontium mittenii	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Dicranella hochreutineri	-		McClure & Miller (1967)
Dicranoloma robustum	+	biflavonoides (6)	Markham & col. (1988)
	+	biflavonoides (1)	Markham in Geiger (1990)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Dicranoloma billardieri	+	biflavonoides (1)	Markham & col. (1988)
Dicranum bonjeanii	+		Becker (1986)
Dicranum fulvum	+		Becker (1986)
Dicranum longifolium	+		Becker (1986)
Dicranum polysetum	-P		Bendz & col. (1966a)
Dicranum scoparium	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Nilsson & col. (1973)
	+	flavonas-O-triglicósidos (1)	Nilsson & col. (1973)
	+	flavonas-O-glicósidos (4?)	Ron & col. (1990)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Österdahl (1979a)
	+	flavonas-O-triglicósidos (2)	Österdahl (1979a)
	+	flavonas-O-triglicósidos (1)	Österdahl (1978b)
	+	biflavonoides (1)	Österdahl (1979a)
	+	biflavonoides (1)	Ron & col. (1990)
	+		McClure & Miller (1967)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	biflavonoides (1)	Lindberg & col. (1974)
	+	biflavonoides (1)	Österdahl (1983)
	+	biflavonoides (2)	Geiger & col. (1993b)
	+	biflavonoides (2)	Voigt (1993)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Dicranum spurium	+		Becker (1986)
Dicranum tauricum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Dicranum undulatum	+		Becker (1986)
Holomitrium setacalycinum	+		McClure & Miller (1967)
Leucoloma serrulatum	-		McClure & Miller (1967)
Orthodicranum montanum	+		Becker (1986)
Paraleucobryum longifolium	-P		Bendz & col. (1966a)
Pilopogon gracilis	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Pilopogon longirostratum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.1.3.Leucobryaceae			
Leucobryum crispum	-		McClure & Miller (1967)
Leucobryum glaucum	-		McClure & Miller (1967)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Leucobryum martianum	-		McClure & Miller (1967)
3.1.4.Calymperaceae			
Calymperes tahitense	+		McClure & Miller (1967)
Octoblepharum spp.	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Syrrhopodon croceus	-		McClure & Miller (1967)
Thyridium obtusifolium	+		McClure & Miller (1967)
Thyridium constrictum	-		McClure & Miller (1967)
3.1.5.Dycnemonaceae			
Dycnemon calycinum	+	biflavonoides (2)	Voigt (1993)

	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Mesotus celatus	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.1.6.Schistostegaceae			
Schistostega pennata	+		Becker (1986)
3.1.7.Bryoxiphiaceae			
Bryoxiphium norvegicum subsp. japonicum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.1.8.Eustichiaceae			
Eustichia spruceana	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.1.9.Rhabdoweisiaceae			
Amphidium mougeotii	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhabdoweisia fugax	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.2.Orden Fissidentales			
3.2.1.Fissidentaceae			
Fissidens adianthoides	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Fissidens cristatus	-		McClure & Miller (1967)
	+?		Becker (1986)
Fissidens polyphyllos	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.3.Orden Buxbaumiales			
3.3.1.Buxbaumiaceae			
Diphyscium foliosum	-?		McClure & Miller (1967)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.4.Orden Pottiales			
3.4.1.Encalyptaceae			
Encalypta ciliata	+		McClure & Miller (1967)
Encalypta streptocarpa	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Encalypta vulgaris	+	isoflavonas (1?)	Cordero (1990)
	+	biflavonoides (1?)	Cordero (1990)
3.4.2.Pottiaceae			
Anoectangium compactum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Bryoerythrophyllum filiforme	-		Becker (1986)
Leptodontium interruptum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Tortula ruralis	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Tortula subulata	-		Ron & col. (1990)
Tortula tortella	+		Becker (1986)
Trichostomum mauiense	+		McClure & Miller (1967)
Tridontium tasmanicum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Triquetella papillata	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.5.Orden Grimmiales			
3.5.1. Grimmiaceae			
Grimmia hartmanii	-P		Bendz & col. (1966a)
Grimmia orbicularis	+?	flavonoles (1?)	Estébanez (1991)
Grimmia ovalis	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Grimia torquata	+		McClure & Miller (1967)
Racomitrium aciculare	+		Ron & col. (1990)
Racomitrium heterostichum	+		Ron & col. (1990)
Racomitrium lanuginosum	+	biflavonoides (1)	Ron & col. (1990)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	biflavonoides (2)	Geiger & col. (1988)
	+		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Racomitrium ptychophyllum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.5.2.Phychomitriaceae			
Phychomitrium polyphyllum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.6.Orden Funariales			
3.6.1.Funariaceae			
Funaria hygrometrica	+	auronas (1)	Weitz & Ikan (1977)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Funaria subintegra	+		McClure & Miller (1967)
Physcomitriella patens	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Schistidium apocarpum	+?		Becker (1986)
Schistidium maritimum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Schistidium rivulare	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.6.2.Splachnaceae			
Splachnum ampullaceum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Splachnum rubrum	+	antocianidinas (1?)	Nilsson & Bendz (1973)
Splachnum vasculosum	+	antocianidinas (1?)	Nilsson & Bendz (1973)
3.7.Orden Bryales			
3.7.1.Bryaceae			
Anomobryum spp.	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Anomobryum julaceum	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum alpinum	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum argenteum	+	flavonas (2)	Markham & Given (1988)
	+	flavonas-O-glicosidos (6)	Markham & Given (1988)
	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum bimum	+		Stein & Zinsmeister (1991)
Bryum caespiticum	+		McClure & Miller (1967)
	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum capillare	+	flavonas (1)	Stein & col. (1985)
	+	flavonas-O-glicósidos (8)	Stein & col. (1985)
	+	isoflavonas (2)	Stein & col. (1985)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (4)	Stein & col. (1985)
	+	isoflavonas (2)	Anhut & col. (1984)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (2)	Anhut & col. (1984)
	+		McClure & Miller (1967)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Leidinger (1984)
	+	biflavonoides (2)	Geiger & col. (1987)
	+	flavonas (1)	Siegel & col. (1989)
	+	flavonas-O-glicósidos (6)	Siegel & col. (1989)
	+	isoflavonas (2)	Siegel & col. (1989)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (4)	Siegel & col. (1989)
	+	biflavonoides (3)	Siegel & col. (1989)
	+	flavonas (1)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-glicósidos (8)	Stein (1988b)
	+	isoflavonas (2)	Stein (1988b)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (4)	Stein (1988b)
	+	biflavonoides (3)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-glicósidos (4)	Stein (1985)
	+	flavonas (1)	Anhut (1985)
	+	flavonas-O-glicósidos (8)	Anhut (1985)
	+	isoflavonas (2)	Anhut (1985)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (2)	Anhut (1985)
	+	flavonas (1)	Anhut (1992)
	+	flavonas-O-glicósidos (8)	Anhut (1992)
	+	isoflavonas (2)	Anhut (1992)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (4)	Anhut (1992)
	+	biflavonoides (3)	Anhut (1992)

	+	flavonas (1)	Siegel (1988)
	+	flavonas-O-glicósidos (6)	Siegel (1988)
	+	isoflavonas (2)	Siegel (1988)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (4)	Siegel (1988)
	+	biflavonoides (3)	Siegel (1988)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Bryum cryophilum	+	antocianidinas (2)	Bendz & Martensson (1961)
	+	antocianidinas (2)	Bendz & col. (1962)
Bryum flaccidum	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum pallens	+?	antocianinas	Herzfelder (1921)
	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+?	antocianinas	Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum pallescens	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonoles-O-glicósidos (2,1?)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Stein (1988b)
	+	flavonoles-O-glicósidos (2,1?)	Stein (1988b)
Bryum pseudotriquetrum	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+	flavonas-O-glicósidos (6)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+	flavonas-O-diglicósidos (4)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+	flavonoles (1)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+	flavonoles-O-diglicósidos (2)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+	flavonoles-O-glicósidos (4)	Stein & Zinsmeister (1990)
	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-diglicósidos (4)	Stein (1988b)
	+	flavonoles (1)	Stein (1988b)
	+	flavonoles-O-diglicósidos (2,1?)	Stein (1988b)
	+	flavonoles-O-glicósidos (3)	Stein (1988b)
Bryum rutilans	+	antocianidinas (2)	Bendz & Martensson (1963)
Bryum schleicheri	+	biflavonoides (2)	Stein (1988a)
	+	flavonas (1)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonas-O-glicósidos (4)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	flavonas-C-glicósidos (5)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	isoflavonas (1)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (3,1?)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	isoflavonas-O-diglicósidos (1)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	biflavonoides (2)	Stein & Zinsmester (1991)
	+	antocianinas (2?)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+	biflavonoides (2)	Stein (1988b)
	+	flavonas (1)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-glicósidos (4)	Stein (1988b)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Stein (1988b)
	+	flavonas-C-glicósidos (5)	Stein (1988b)
	+	isoflavonas (1)	Stein (1988b)
	+	isoflavonas-O-glicósidos (2,2?)	Stein (1988b)
	+	isoflavonas-O-diglicósidos (1)	Stein (1988b)
Bryum torquescens	+		Stein (1988b)
Bryum truncorum	+		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Bryum turbinatum	+?	antocianinas	Herzfelder (1921)
	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Bryum weigelii	+?	antocianinas	Herzfelder (1921)
	+	antocianidinas (2)	Bendz & Martensson (1963)
	+	flavonas-O-glicósidos (1?)	Nilsson (1969)
Pohlia cruda	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	biflavonoides (1?)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Pohlia nutans	-		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides (1?)	Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Pohlia wahlenbergii	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
Rhodobryum grandifolium	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhodobryum roseum	+		Stein & Zinsmeister (1991)
	+		Stein (1988b)
3.7.2.Mniaceae			
Cinclidium stygium	+		Biehl (1988)
	+		Anhut (1992)
Mnium ambiguum	+?		Biehl (1988)
	+?		Anhut (1992)
Mnium arizonicum	+	flavonoles-O-diglicósidos (1?)	Melchert & Alston (1965)
Mnium cinclidioides	+		Becker (1986)
Mnium hornum	-		Wyatt & col. (1991b)
	+?		Leidinger (1984)
	+?		Anhut (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Mnium marginatum	+		Biehl (1988)
	+		Anhut (1992)
Mnium spinosum	+?		Biehl (1988)
	+?		Becker (1986)
	+?		Anhut (1992)
Mnium stellare	+?		Biehl (1988)
	+?		Anhut (1992)
Plagiomnium acutum	+		Koponen & Nilsson (1977)
Plagiomnium affine	+	flavonas-O-C-glicósidos (2,2?)	Freitag & col. (1986)
	+	flavonas-C-glicósidos (1)	Freitag & col. (1986)
	+	flavonas-C-glicósidos (4,4?)	Melchert & Alston (1965)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (?)	Alston (1968)
	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (6)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+		Anhut (1992)
	+	flavonas-O-C-glicósidos	Brill-Fess (1981/82)
	+	flavonas-C-glicósidos	Brill-Fess (1981/82)
	+		Spies (1982)
Plagiomnium ciliare	+		Koponen & Nilsson (1977)
	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a y b)
	+	flavonas-C-glicósidos (5)	Wyatt & col. (1991a y b)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a y b)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a y b)
	+	chalconas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a y b)
Plagiomnium cuspidatum	+	biflavonoides (4)	Anhut & col. (1989a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (3)	Anhut & col. (1989a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Koponen & Nilsson (1977)
	+		McClure & Miller (1967)

	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Melchert & Alston (1965)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Kozlowski (1921)
	+		Wyatt & col. (1991b)
	+		Biehl (1988)
	+	biflavonoides (4)	Anhut (1992)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (3)	Anhut (1992)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Anhut (1992)
	+	biflavonoides (4)	Seeger (1988)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (3)	Seeger (1988)
	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Anhut & col. (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Plagiomnium drummondii	+		Koponen & Nilsson (1977)
Plagiomnium elatum	+	biflavonoides (1)	Geiger & col. (1988)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
	+		Koponen & Nilsson (1977)
	+	flavonas-C-glicósidos (4,2?)	Anhut & col. (1989a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Anhut & col. (1989a)
	+	biflavonoides (1)	Anhut & col. (1989a)
	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (6)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-glicósidos (2)	Wyatt & col. (1991a)
	+		Biehl (1988)
	+	(9)	Anhut (1992)
	+	flavonas-C-glicósidos (6)	Anhut & col. (1992)
	+	flavonas-C-glicósidos (6)	Biehl (1988)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Biehl (1988)
	+	biflavonoides (1)	Biehl (1988)
	+	flavonas-c-glicósidos (6)	Anhut (1992)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Anhut (1992)
	+	biflavonoides (1)	Anhut (1992)
Plagiomnium ellipticum	+		Koponen & Nilsson (1977)
	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (4)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+		Biehl (1988)
	+		Anhut (1992)
Plagiomnium insigne	+		Koponen & Nilsson (1977)
	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+		Anhut (1992)
Plagiomnium japonicum	+		Koponen & Nilsson (1977)
Plagiomnium medium	+		Koponen & Nilsson (1977)
	+		Anhut (1992)
	+		Biehl (1988)
subsp. medium	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (3)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
subsp. curvatulum	+	flavonas (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-C-glicósidos (4)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Wyatt & col. (1991a)
Plagiomnium rostratum	+		Anhut (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Plagiomnium tezukae	+		Koponen & Nilsson (1977)
Plagiomnium undulatum	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Koponen & Nilsson (1977)
	+	flavonas-C-glicósidos (6)	Österdahl (1979 a y c)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Österdahl (1979 a y c)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	flavonas-C-glicósidos (?)	Harborne (1967)
	+	flavonas-O-C-glicósidos (1)	Vandekerkhove (1978a)
	+	flavonas-C-glicósidos (1)	Vandekerkhove (1978a)
	+		Anhut (1992)
Rhizomnium hattori	+	flavonoles (?)	Koponen & Nilsson (1977)
Rhizomnium magnifolium	+	flavonas-O-glicósidos (3)	Mües & col. (1986)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Mües & col. (1986)
	+		Biehl (1988)
	+		Anhut (1992)
	+	flavonas-O-glicósidos (3)	Leidinger (1984)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Leidinger (1984)
	+	flavonas-O-glicósidos (3)	Lauck (1984)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Lauck (1984)
Rhizomnium pseudopunctatum	+	flavonas-O-glicósidos (3)	Mües & col. (1986)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Mües & col. (1986)
	+	flavonas-O-glicósidos (3)	Lauck (1984)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Lauck (1984)
	+		Leidinger (1984)
Rhizomnium punctatum			
	+		Leidinger (1984)
subsp. chlorophyllosum	+		Wyatt & col. (1991b)
Rhizomnium striatulum	+	flavonoles (?)	Koponen & Nilsson (1977)
3.7.3.Aulacomniaceae			
Aulacomnium androgynum	-		Ron & col. (1990)
	+	biflavonoides (6)	Hahn (1993)
	+	biflavonoides	Hahn & col. (1994)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Aulacomnium heterostichum	+		McClure & Miller (1967)
Aulacomnium palustre	+		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
	+	biflavonoides (5)	Hahn (1993)
	+	biflavonoides	Hahn & col. (1994)
	+	triflavonoides (1)	Hahn (1993)
3.7.4.Bartramiaceae			
Anacolia webbii	+	biflavonoides (5)	Seeger & col. (1993a)
Bartramia halleriana	+	biflavonoides (6)	Salm (1992)
	+	biflavonoides	Salm (1994)
	+	biflavonoides (6)	Salm & col. (1993)
Bartramia ithyphylla	+	biflavonoides (5?)	López-Sáez (1992)
Bartramia pomiformis	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	biflavonoides (2, 1?)	Seeger & col. (1991)
	+	biflavonoides (2,4?)	López-Sáez (1992)
	+	biflavonoides (6)	Seeger & col. (1992b)
	+	triflavonoides (1)	Seeger & col. (1992b)
	+	ácidos flavonoídicos (1)	Seeger & col. (1992b)
	+	triflavonoides (1,1?)	Seeger (1992)

Bartramia stricta	+	biflavonoides (5?)	López-Sáez (1992)
Breutelia chrysocoma	+	biflavonoides (2,2??)	Salm (1994)
Breutelia eugeniae	+		McClure & Miller (1967)
Philonotis fontana	+	biflavonoides (6)	Geiger & Bokel (1989)
	+	biflavonoides	López-Sáez (1992)
Philonotis sphaerocarpa	+		McClure & Miller (1967)
3.7.5.Timmiaceae			
Timmia austriaca	+		McClure & Miller (1967)
	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Timmia megapolitana	+		McClure & Miller (1967)
3.7.6.Rhizogoniaceae			
Cryptopodium bartramioides	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Pyrrhobryum bifarium	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhizogonium distichum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhizogonium spiniforme	-		McClure & Miller (1967)
3.7.7.Hypnodendraceae			
Hypnodendron comatum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypnodendron vescoanum	-		McClure & Miller (1967)
Mniodendron tahiticum	+		McClure & Miller (1967)
3.7.8.Spiridentaceae			
Spiridens balfourianus	-		McClure & Miller (1967)
3.7.9.Leptostomataceae			
Leptostomum inclinans	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Leptostomum macrocarpum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.7.10.Meesiaceae			
Meesia triquetra	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Paludella squarrosa	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.8.Orden Orthotrichales			
3.8.1.Orthotrichaceae			
Macromitrium brevisetum	-		McClure & Miller (1967)
Macromitrium guatemalense	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Macromitrium longipes	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Orthotrichum anomalum	-?		Becker (1986)
Orthotrichum lyellii	+		Becker (1986)
Orthotrichum obtusifolium	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Ulota bruchii	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Ulota phyllanta	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Zygodon spp.	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.Orden Leucodontales			
3.9.1.Fontinalaceae			
Fontinalis antipyretica	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Salm (1994)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Fontinalis novae-angliae	+		McClure & Miller (1967)
Fontinalis squamosa	-		Salm (1994)
3.9.2.Climaciaceae			
Climacium americanum	-		McClure & Miller (1967)
Climacium dendroides	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Vandekerkhove (1980)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.3.Anomodontaceae			
Anomodon attenuatus	-		McClure & Miller (1967)
	-?		Becker (1986)
Anomodon rostratus	-		McClure & Miller (1967)
Anomodon viticulosus	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Vandekerkhove (1980)
	-?		Becker (1986)
3.9.4.Hedwigiaceae			
Hedwigia ciliata	-P		Bendz & col. (1966a)
	+		McClure & Miller (1967)
	+	flavonas-O-diglicósidos (3)	Österdahl (1979 a y b)
	+	flavonas-O-triglicósidos (3?)	Österdahl (1979 a y b)
	+	flavonas-O-tetraglicósidos (2)	Österdahl (1979 a y b)
	+	flavonas-C-glicósidos (2, 1?)	Österdahl (1979 a y b)
	+	flavonas-C-glicósidos (2, 1?)	Österdahl (1978a,1976)
	+?	biflavonoides (?)	Österdahl (1976)
	+?	biflavonoides (?)	Österdahl & col. (1976)
	+	flavonas-O-tetraglicósidos (1)	Österdahl & Lindberg(1977)
	+	flavonas-O-tetraglicósidos (1)	Österdahl (1976)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhacocarpus humboldtii	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.5.Leucodontaceae			
Antitrichia californica	-		Ron & col. (1990)
Antitrichia curtipendula	-		Ron & col. (1990)
	+	biflavonoides (2)	Geiger & col. (1988)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+		Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Leucodon sciuroides	-		Ron & col. (1990)
	+?		Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Pterogonium gracile	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.6.Neckeraceae			
Homalia falcifolia	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Homalia pulchella	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Homalia trichomanoides	-P		Bendz & col. (1966a)
Neckera complanata	-		McClure & Miller (1967)
	-		Vandekerkhove (1977b)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
	-?		Becker (1986)
Neckera crispa	-		Vandekerkhove (1977b)
	+?		Becker (1986)
Neckeradelphus menziesii	+		McClure & Miller (1967)
Neckeropsis lepineana	-		McClure & Miller (1967)
Porotrichum longirostre	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.7.Racopilaceae			
Racopilum capense	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Racopilum cuspidigerum	+		McClure & Miller (1967)
var. cuspidigerum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
var. convolutaceum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Racopilum strumiferum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.8.Pterobryaceae			
Garovaglia tahitensis	+		McClure & Miller (1967)
Myurium hochstetteri	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Trachyloma planifolium	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.9.Meteoriaceae			
Aerobryopsis longissima	+		McClure & Miller (1967)

Floribunda aurea	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Papillaria imponderosa	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Pilotrichella spp.	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Pilotrichella cuspidata	+	biflavonoides (1)	Seeger & col. (1992a)
Squamidium nigricans	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Weymouthia cochleaarifolia	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Weymouthia mollis	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.10.Ptychomniaceae			
Cladomnion ericoides	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Ptychomnion aciculare	-		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.11.Thamniaceae			
Thamnium alopecurum	-		Vandekerkhove (1977b)
	+?		Becker (1986)
3.9.12.Phyllogoniaceae			
Catagonium politum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.13.Prionodontaceae			
Prionodon densus	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.14.Cryphaeaceae			
Cryphaea spp.	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.15.Cyrtopodaceae			
Cyrtopus setosus	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.9.16.Lepyrodontaceae			
Lepyrodon tomentosum var. tunariensis	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.10.Orden Hookeriales			
3.10.1.Hookeriaceae			
Achrophyllum dentatum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Distichophyllum pulchellum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Hemiragis aurea	-		McClure & Miller (1967)
Hookeria lucens	-		Ron & col. (1990)
	+?		Becker (1986)
Hookeria acutifolia	-		McClure & Miller (1967)
Hookeriopsis acicularis	-		McClure & Miller (1967)
3.10.2.Hypopterygiaceae			
Catharomnion ciliatum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Cyathophorum bulbosum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypopterygium filiculaeforme	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypopterygium novae-zelandiae	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypopterygium setigerum	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Lopidium concinnum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.Orden Hypnales			
3.11.1.Leskeaceae			
Haplohymenium longinerve	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Hylocomiopsis spp.	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Leskea polycarpa	+?		Becker (1986)
Leskeella nervosa	-P		Bendz & col. (1966a)
Pterigynandrum filiforme	+?		Becker (1986)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.2.Thuidiaceae			
Myurella julacea	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Thuidiopsis furfurosa	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Thuidium spp.	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Thuidium abietinum	-		Vandekerkhove (1980)
Thuidium delicatulum	+		McClure & Miller (1967)
	-		Vandekerkhove (1977b)
Thuidium philibertii	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	biflavonoides (1)	Sievers (1992)
Thuidium tamariscifolium	-		Vandekerkhove (1980)
Thuidium tamariscinum	-		Ron & col. (1990)
	+	biflavonoides (1)	Sievers (1992)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.3.Amblystegiaceae			
Acrocladium auriculatum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Acrocladium cuspidatum	-		Vandekerkhove (1980)
Calliergon sarmentosum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Calliergonella cuspidata	+		Ron & col. (1990)
	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
Cratoneuropsis spp.	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Cratoneuropsis relaxa	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Drepanocladus spp.	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Drepanocladus aduncus	+	biflavonoides (1)	Sievers (1992)
Drepanocladus pseudo-sarmentosus	+	antocianidinas (1,1?)	Bendz & col. (1962)
Drepanocladus uncinatus	-?		Becker (1986)
Hygroamblystegium irriguum	-		Vandekerkhove (1980)
Palustriella commutata	-		Vandekerkhove (1980)
Sciaromium tricostatum	-		McClure & Miller (1967)
Scorpidium scorpioides	-		Vandekerkhove (1977b)
3.11.4.Brachytheciaceae			
Brachythecium reflexum	-		Vandekerkhove (1977b)
Brachythecium rivulare	-		Vandekerkhove (1980)
Brachythecium rutabulum	-		Vandekerkhove (1980)
	-	biflavonoides	Sievers (1992)
Brachythecium salebrosum	-P		Bendz & col. (1966a)
Bryhnia novae-angliae	-		McClure & Miller (1967)
Cirriphyllum piliferum	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Becker (1986)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Eurhynchium riparioides	+?		Becker (1986)
Eurhynchium rusciforme	-		Vandekerkhove (1977b)
Eurhynchium schleicheri	-	biflavonoides	Sievers (1992)
Eurhynchium striatum	-		Vandekerkhove (1980)
Homalothecium lutescens	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
	+	biflavonoides (3)	Seeger & col. (1993b)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Homalothecium philippeanum	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
Homalothecium sericeum	+		Ron & col. (1990)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+		Becker (1986)
	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Isothecium myosuroides	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Isothecium myurum	-P		Bendz & col. (1966a)
Isothecium viviparum	-		Vandekerkhove (1977b)
Pleuropus wilkesianus	-		McClure & Miller (1967)
Rhynchostegium riparioides	-		Ron & col. (1990)
Scleropodium purum	-		Vandekerkhove (1980)
	+?		Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.5.Entodontaceae			
Entodon concinnus	+	biflavonoides (1)	Sievers (1992)
	+?	biflavonoides	Seeger (1992)

Entodon orthocarpus	+		Becker (1986)
Entodon seductrix	-		McClure & Miller (1967)
3.11.6.Plagiotheciaceae			
Plagiothecium denticulatum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Plagiothecium draytoni	+		McClure & Miller (1967)
Plagiothecium laetum	-P		Bendz & col. (1966a)
	+?		Becker (1986)
	-	biflavonoides	Sievers (1992)
Plagiothecium roseanum	+?		Becker (1986)
Plagiothecium undulatum	-		Vandekerkhove (1977b)
	-	biflavonoides	Sievers (1992)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.7.Hypnaceae			
Ctenidium molluscum	-		Vandekerkhove (1977b)
	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Herzogiella seligeri	+		Becker (1986)
Hyocomium armoricum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypnum andoi	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
Hypnum cupressiforme	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides (5)	Sievers & col. (1992)
	+	biflavonoides (9)	Sievers (1992)
	+	aldehidos flavonoídicos (1)	Sievers & col. (1992)
	+	aldehidos flavonoídicos (1)	Sievers (1992)
	+	ácidos flavonoídicos (2)	Sievers (1992)
	+	*flavonoles (1)*	*Sievers (1992)*
	+	biflavonoides (2)	Sievers & col. (1994)
	+	ácidos flavonoídicos (2)	Sievers & col. (1994)
	+	flavonoles (1)	Sievers & col. (1994)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Hypnum imponens	-		McClure & Miller (1967)
Hypnum jutlandicum	+	biflavonoides (1)	Sievers (1992)
Hypnum lacunosum	+		Becker (1986)
Hypnum lindbergii	+?		Becker (1986)
	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
Hypnum subimponens	-	biflavonoides	Sievers (1992)
Mittenothamnium deminutivum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Orthothecium chryseum	-P		Bendz & col. (1966a)
Ptilium crista-castrensis	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		McClure & Miller (1967)
	-		Vandekerkhove (1977b)
	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
Pylaisia polyantha	-P		Bendz & col. (1966a)
3.11.8.Hylocomiaceae			
Hylocomium splendens	+		Ron & col. (1990)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Vandekerkhove (1977b)
	+		McClure & Miller (1967)
	+	biflavonoides (2,1?)	Becker & col. (1986)
	+	flavonas-O-triglicósidos (1)	Becker & col. (1986)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1?)	Becker & col. (1986)
	+	biflavonoides (1)	Geiger & col. (1988)
	+		Herzog (1982)
	+	flavonas-O-triglicósidos (3?)	Becker (1986)
	+	biflavonoides (2,1?)	Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Hylocomium umbratum	+		Becker (1986)
Pleurozium schreberi	-		Ron & col. (1990)
	-P		Bendz & col. (1966a)
	+	flavonas (1)	Vandekerkhove (1980)
	+	flavonas-O-diglicósidos (1)	Vandekerkhove (1980)
	+		Becker (1986)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhytidiadelphus loreus	-		Vandekerkhove (1977b)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhytidiadelphus squarrosus	+	biflavonoides	Seeger (1992)
	+	biflavonoides (4,1?)	Seeger & col. (1990)
	-		Vandekerkhove (1977b)
Rhytidiadelphus triquetrus	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Vandekerkhove (1977b)
	+		Becker (1986)
	+	biflavonoides (2)	Hahn (1993)
	+	flavonas-O-glicósidos (?)	Hahn (1993)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Rhytidiopsis robusta	+	biflavonoides (2)	Sievers (1992)
	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.9.Rhytidiaceae			
Rhytidium rugosum	-		McClure & Miller (1967)
	-?		Becker (1986)
	+?	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.10.Sematophyllaceae			
Acroporium pungens	-		McClure & Miller (1967)
Sematophyllum amoenum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Wijkia extenuata	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.11.Lembophyllaceae			
Camptochaete arbuscula	+	biflavonoides	Seeger (1992)
Lembophyllum clandestinum	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.11.12.Echinodiaceae			
Echinodium hispidum	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.12.Orden Seligerales			
3.12.1.Seligeraceae			
Blindia acuta	+	biflavonoides	Seeger (1992)
3.13.Orden Tetraphidales			
3.13.1.Tetraphidaceae			
Tetraphis pellucida	+		McClure & Miller (1967)
	+?	dihidroflavonoles (1?)	Geiger in Markham (1988)
	+?	dihidroflavonoles (1?)	Vandekerkhove (1977a)
	+		Becker (1986)
	-		Jung (1993-94)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
3.13.2.Calomniaceae			
Calomnion schistostegiellum	-		McClure & Miller (1967)
3.14.Orden Polytrichales			
3.14.1.Polytrichaceae			
Atrichum angustatum	+		McClure & Miller (1967)
Atrichum undulatum	-P		Bendz & col. (1966a)
	-		Becker (1986)
	-		Jung (1993-94)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)

Dawsonia superba	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Dendroligotrichum dendroides	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Pogonatum comossum	+		Jung (1993-94)
Pogonatum urnigerum	+		Jung (1993-94)
Polytrichadelphus longisetus	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Polytrichum alpinum	-		Jung (1993-94)
Polytrichum commune	-P		Bendz & col. (1966a)
	+		McClure & Miller (1967)
	-		Jung (1993-94)
	-	biflavonoides	Seeger (1992)
Polytrichum formosum	-		Jung (1993-94)
Polytrichum juniperinum	-		Jung (1993-94)
Polytrichum ohiense	+		McClure & Miller (1967)
Polytrichum sexangulare	-		Becker (1986)
Polytrichum tenellum	-		Jung (1993-94)

ANEXO 2: **Relación de flavonoides identificados en musgos** (exceptuando los resultados de la presente Memoria Doctoral). (?)= dato dudoso y/o tentativo. (Autorías según Anderson & col., 1990 y Crosby & Magil, 1981)

1. FLAVONAS

1.1. Flavonas (agliconas).

APIGENINA
(5,7,4'-*trihidroxi-flavona*)
Bryum argenteum (Markham & Given,1988)
Pleurozium schreberi (Vandekerkhove,1980)
Plagiomnium insigne (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium elatum (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium affine (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium ellipticum (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium medium ssp. curvatulum (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium medium subsp. medium (Wyatt & col.,1991a)
Plagiomnium ciliare (Wyatt & col.,1991a y b)
Bibliografía adicional: Geiger & col. (1988), Mabry & col. (1970), Wollenweber & Dietz (1981), Markham & col. (1987).

LUTEOLINA
(3'-hidroxi-apigenina= 5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister,1991;Stein,1988b)
Bryum argenteum (Markham & Given,1988)
Bryum capillare (Siegel & col.,1989;Stein & col.,1985; Anhut,1985 y 1992;Siegel,1988;Stein,1988b)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Jay & col. (1975), Markham (1982), Geiger & col. (1987 y 1988), Wollenweber & Dietz (1981).

1.2. Flavonas C-glicosiladas.

ESCOPARINA
(crisoeriol-8-C-glicósido)
(?)Plagiomnium affine (Melchert & Alston,1965)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970)

VITEXINA
(apigenina-8-C-β-D-glucopiranósido)
(?)Plagiomnium affine (Melchert & Alston,1965)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1989).

VITEXINA 2''-RAMNOSIDO
(ramnosilvitexina= apigenina-8-C-ramnoglucósido)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister,1991;Stein,1988b)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970)

CRISOERIOL-6-C-ARABINOSIDO-8-C-HEXOSIDO
(crisoeriol= luteolina-3'-metiléter= 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona)
(?)Plagiomnium affine (Melchert & Alston,1965)
Plagiomnium undulatum (Östserdahl,1979 a y c)

CRISOERIOL-6-C-HEXOSIDO-8-C-RAMNOSIDO
(?)Plagiomnium elatum (Anhut & col.,1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl,1988)

CRISOERIOL-di-C-GLUCOSIDO
(estellarina-2= crisoeriol-6,8-di-C-glucósido)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister,1990; Stein,1988b)
Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister,1991; Stein,1988b)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

VICENINA-2
(apigenina-6,8-di-C-glucósido= apigenina-6-C-ß-D-glucopiranosil-8-C-ß-D-glucopiranósido)
(?)Plagiomnium affine (Melchert & Alston, 1965)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister,1991; Stein, 1988b)
Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979 a y b, 1978a)
Plagiomnium cuspidatum (Österdahl, 1979 a y c)
Plagiomnium undulatum (Vandekerkhove, 1978a)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister,1990; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1989).

SCHAFTOSIDO
(apigenina-6-C-ß-D-glucopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranósido)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Plagiomnium undulatum (Österdahl, 1979 a y c)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

ISOSCHAFTOSIDO
(apigenina-6-C-α-L-arabinopiranosil-8-C-ß-D-glucopiranósido)
Bryum schleicheri (Stein, 1988; Stein & Zinsmeister,1991)
Plagiomnium undulatum (Österdalh, 1979a y c)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

NEOSCHAFTOSIDO
(apigenina-6-C-ß-D-glucopiranosil-8-C-ß-L-arabinopiranósido)
Plagiomnium undulatum (Österdahl, 1979a y c)
Bibliografía adicional: Besson & col. (1984), Markham & Wilson (1989)

NEOISOSCHAFTOSIDO
(apigenina-6-C-ß-L-arabinopiranosil-8-C-ß-D-glucopiranósido)
Plagiomnium undulatum (Österdahl, 1979a y c)

LUCENINA-2
(luteolina-6,8-di-C-ß-D-glucopiranósido)
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl, 1988)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister,1990; Stein, 1988b)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Hedwigia ciliata (Österdahl,1979 a y b, 1978a)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

ELATINA
(luteolina-6-C-ß-D-glucopiranosil-8-C-α-L-ramnopiranósido)
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl, 1988)

LUTEOLINA-6-C-XILOSIDO-8-C-HEXOSIDO
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl, 1988)

ORIENTINA
(luteolina-8-C-ß-D-glucopiranosil)
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl, 1988)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1989)

ISOORIENTINA
(luteolina-6-C-ß-D-glucopiranosil)
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Biehl, 1988)
Plagiomnium affine (Freitag & col., 1986)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1989)

1.3. Flavonas O-glicosiladas.

APIGENINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO
(apigenina-7-O-[α-L-ramnosil (1-2) glucosa]= roifolina)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister,1991; Stein, 1988b)
Hylocomium splendens (Vandekerkhove, 1977b)
Plagiomnium elatum (Anhut & col., 1989a; Anhut, 1992; Biehl, 1988; Wyatt & col., 1991a)
Pleurozium schreberi (Vandekerkhove, 1980)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)
Hedwigia ciliata (Österdahl,1979 a y b)
Plagiomnium ellipticum (Wyatt & col., 1991a)
Plagiomnium medium subsp. medium (Wyatt & col., 1991a)
Plagiomnium medium subsp. curvatulum (Wyatt & col., 1991a)
Plagiomnium cuspidatum (Anhut, 1992)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970)

APIGENINA 7-O-TRIGLICOSIDO
(apigenina-7-O-[2,4-di-O-(α-L-ramnopiranosil)]-ß-D-glucopiranósido)
Dicranum scoparium (Nilsson & col., 1973; Österdahl, 1979a)
Hylocomium splendens (Becker & col., 1986; (?) Becker, 1986)

DIOSMETINA 7-O-TRIGLICOSIDO
(diosmetina-7-O-[2,4,-di-O-(α-L-ramnopiranosil)]-ß-D-glucopiranósido; diosmetina= 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona)
Dicranum scoparium (Österdahl,1979a y 1978b)

APOMETZGERINA 7-O-GLUCURONIDO
(apometzgerina=5,7,3',4',5'-pentaOH-3',4'-dimetil-flavona)
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986; Leidinger, 1984; Lauck, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)

LUTEOLINA 7-O-RAMNOGLUCOSIDO
a) ramnoglucosil= rutinósido (=O-α-L-ramnosil (1-6) glucosa)
b) ramnoglucosil= neohesperidósido (=O-α-L-ramnosil (1-2) glucosa)
Dicranum scoparium (Nilsson & col., 1973:no especifica ramnoglucosil; Österdahl, 1979a:neohesperidósido)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister,1991; Stein, 1988b: ambos neohesperidósido)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister,1990; Stein, 1988b:ambos neohesperidósido)
(?) Hylocomium splendens (Becker & col., 1986; Becker, 1986:no especifican ramnoglucosil)
Hedwigia ciliata (Österdahl,1979 a y b:neohesperidósido.)
Bibliografía adicinonal: Mabry & col. (1970), Österdahl & Lindberg (1977), Markham & Wilson (1988)

LUTEOLINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

DIOSMETINA 7-O-GLUCOSIDO
(diosmetina 7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Stein, 1988b; Siegel, 1988)

DIOSMETINA 7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1985 y 1988b)

LUTEOLINA 7-O-GLUCOSIDO
(luteolina 7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham (1982), Österdahl & Lindberg (1977), Österdahl (1979b), Markham & Wilson (1988)

6-HIDROXI-LUTEOLINA 7-O-GLUCOSIDO
(6-hidroxhi-luteolina 7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Siegel, 1988; Stein, 1988b; Anhut, 1985 y 1992; Leidinger, 1984)

6-HIDROXI-LUTEOLINA 7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1985 y 1988b)

LUTEOLINA 7-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1985 y 1988b)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)

LUTEOLINA 7,4'-di-O-NEOHESPERIDOSIDO
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979a y 1976)

LUTEOLINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-4'-O-SOFOROSIDO
(soforósido= (2-O-ß-D-glucopiranosil)-ß-D-glucopiranósido)
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979a; Österdahl & Lindberg, 1977)

APIGENINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-4'-O-SOFOROSIDO
Hedwigia ciliata (Österdahl,1979 a y b)

APIGENINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-4'-O-ß-D-GLUCOSIDO
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979b)

LUTEOLINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-4'-O-ß-D-GLUCOSIDO
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979b)

LUTEOLINA 7-O-ß-D-GLUCOSIDO-4'-O-NEOHESPERIDOSIDO
Hedwigia ciliata (Österdahl, 1979b)

APIGENINA 7-O-GLUCOSIDO
(apigenina 7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum capillare (Stein & col., 1985; Stein, 1988b; Anhut, 1985 y 1992)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1988)

APIGENINA 7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum capillare (Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Stein, 1985 y 1988b)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)

APIGENINA 7-O-NEOHESPERIDOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister,1990; Stein, 1988b)

LUTEOLINA 7-O-GLUCURONIDO
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986; Lauck, 1984; Leidinger, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1988)

CRISOERIOL 7-O-GLUCURONIDO
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986; Leidinger, 1984; Lauck, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1988)

LUTEOLINA 7,3'-DI-O-GLUCURONIDO
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986;, Leidinger, 1984; Lauck, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)

SELGINA 7,5'-DI-O-GLUCURONIDO
(selgina= 5,7,3',4',5'-pentaOH-3'-metil-flavona)
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986; Leidinger, 1984; Lauck, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)

TRICETINA 7,3'-DI-O-GLUCURONIDO
(tricetina= 5,7,3',4',5'- pentahidroxi-flavona)
Rhizomnium magnifolium (Mües & col., 1986; Leidinger, 1984; Lauck, 1984)
Rhizomnium pseudopunctatum (Mües & col., 1986; Lauck, 1984)

ESCUTELLAREINA-7-O-GLUCOSIDO
(escutellareina= 5,6,7,4'-tetraOH-flavona)
(?)Bryum weigelii (Nilsson, 1969)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990)

ESCUTELLAREINA-7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

ISOESCUTELLAREINA 7-O-ß-D-GLUCOSIDO
(isoescutellareina= 5,7,8,4'-tetrahidroxi-flavona)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)

HIPOLAETINA 7-O-ß-D-GLUCOSIDO
(8-hidroxi-luteolina-7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum argenteum (Markham & Given, 1988)

1.4. Flavonas O/C-glicosiladas.

SAPONARINA
(apigenina 6-C-ß-D-glucopiranosil-7-O-ß-D-glucopiranósido= isovitexina-7-O-glucósido)
Plagiomnium cuspidatum (Melchert & Alston,1965; Kozlowski, 1921; Anhut & col., 1989a y 1992; Koponen & Nilsson, 1977; Anhut, 1992; Seeger, 1988)
Plagiomnium undulatum (Österdahl, 1979 a y c; Vandekerkhove, 1978a; Koponen & Nilsson, 1977)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Molisch (1911), Markham & Wilson (1989)

ISOORIENTINA 3'-O-NEOHESPERIDOSIDO
Plagiomnium affine (Freitag & col., 1986)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

ISOORIENTINA 3'-O-SOFOROSIDO
Plagiomnium affine (Freitag & col., 1986)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1989)

ISOSCOPARINA 7-O-GLUCOSIDO
(6-C-ß-D-glucopiranosil-crisoeriol-7-O-ß-D-glucopiranósido)
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Seeger, 1992)

LUTONARINA
(6-C-ß-D-glucopiranosil-luteolina-7-O-ß-D-glucopiranósido= Isoorientina-7-O-glucósido)
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y 1992; Anhut, 1992; Seeger, 1988)

2. FLAVONOLES

2.1. Flavonoles (agliconas).

3-METOXI-KAEMPFEROL
(kaempferol= 3-hidroxi-apigenina)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

KAEMPFEROL
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1994)

2.2. Flavonoles O-glicosilados.

QUERCETINA-3-O-DIGLICOSIDO
(quercetina= 3-hidroxi-luteolina)
(?)Mnium arizonicum (Melchert & Alston, 1965)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Markham & Wilson (1988).

KAEMPFEROL 3-O-GLUCOSIDO
Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Markham (1982), Markham & Wilson (1988).

KAEMPFEROL 3-O-NEOHESPERIDOSIDO
(kaempferol-3-O-[α-L-ramnosil (1-2) glucosa])
(?)Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1988)

KAEMPFEROL 3,4'-di-O-GLUCOSIDO
Bryum pallescens (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Markham & Wilson (1988)

KAEMPFEROL 3-O-GALACTOSIDO
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

KAEMPFEROL 3-O-GALACTOSIDO-4'-O-GLUCOSIDO
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

KAEMPFEROL 3-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum pseudotriquetrum (Stein & Zinsmeister, 1990; Stein, 1988b)

3. *ISOFLAVONAS*

3.1. Isoflavonas (agliconas).

OROBOL
(5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavona= 3'-hidroxi-genisteina)
Bryum capillare (Anhut & col., 1984; Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970), Geiger & col. (1987), Markham (1982).

PRATENSEINA
(5,7,3'-trihidroxi-4'-metileter-isoflavona)
Bryum capillare (Anhut & col.,1984; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b; Siegel & col.,1989; Stein & col., 1985)
Bibliografía adicional: Mabry & col. (1970).

3.2. Isoflavonas O-glicosiladas.

OROBOL 7-O-GLUCOSIDO
(orobol-7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum capillare (Anhut & col.,1984; Stein & col.,1985; Siegel & col., 1989; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)

PRATENSEINA 7-O-GLUCOSIDO
(pratenseina-7-O-ß-D-glucopiranósido)
Bryum capillare (Anhut & col., 1984; Stein & col., 1985; Siegel & col., 1989; Anhut, 1985 y 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)

OROBOL 7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)

OROBOL (3'ó 4')-O-GLUCOSIDO
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)

OROBOL (3'ó 4')-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
(?)Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)

OROBOL 7-O-DIGLUCOSIDO
Bryum schleicheri (Stein & Zinsmeister, 1991; Stein, 1988b)

PRATENSEINA 7-O-GLUCOSIDO-6''-MALONILESTER
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Stein & col., 1985; Anhut, 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)

4. BIFLAVONOIDES

4.1. Biflavonas (dímeros flavona-flavona y flavona-flavanona)

5', 3'''- DIHIDROXI- AMENTOFLAVONA
(5',8''- biluteolina)
Racomitrium lanuginosum (Ron & col., 1990; Geiger & col.,1988)
(?)Hedwigia ciliata (Österdahl & col.,1986)
Bartramia halleriana (Salm & col., 1993; Salm, 1992)
Anacolia webbii (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992)
Dicranum scoparium (Lindberg & col., 1974; Österdahl, 1979a y 1983; Ron & col., 1990; Geiger & col., 1993b; Voigt, 1993)
Hylocomnium splendens (Geiger & col., 1988; Becker & col., 1986; Becker, 1986)
Antitrichia curtipendula (Geiger & col.,1988)
Dicranoloma robustum (Markham & col., 1988)
Bryum schleicheri (Stein, 1988 a y b; Stein & Zinsmeister, 1991)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989)
Campylopus holomitrium (Markham in Geiger, 1990; Geiger & Markham, 1992)
Rhytidiadelphus squarrosus (Seeger & col., 1990; Seeger, 1992)
Bartramia pomiformis (Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b; López-Sáez, 1992)
Bartramia ithyphylla (López-Sáez, 1992)
Bartramia stricta (López-Sáez, 1992)
Dycnemon calycinum (Voight, 1993)
Campylopus introflexus (Weyand, 1993)
Breutelia chrysocoma (Salm, 1994)
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993)

5',3'''- DIHIDROXI-ROBUSTAFLAVONA
(5',6''-biluteolina)
Bartramia halleriana (Salm & col., 1993; Salm, 1992)
Anacolia webbii (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992)
Hylocomium splendens (Becker & col., 1986; Becker, 1986)
Antitrichia curtipendula (Geiger & col.,1988)
Racomitrium lanuginosum (Geiger & col., 1988)
Dicranoloma robustum (Markham & col., 1988)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989)
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y b; Seeger, 1988; Anhut, 1992)
Campylopus holomitrium (Markham in Geiger, 1990; Geiger & Markham, 1992)
(?)Rhytidiadelphus squarrosus (Seeger & col., 1990)
Bryum capillare (Siegel & col., 1989; Anhut, 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)
Campylopus clavatus (Geiger & Markham, 1992)
Dycnemon calycinum (Voight, 1993)
Campylopus introflexus (Weyand, 1993)
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993)
Breutelia chrysocoma (Salm, 1994)
Dicranum scoparium (Geiger & col., 1993b; Voigt, 1993)

2,3-DIHIDRO-5'-HIDROXI-ROBUSTAFLAVONA
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y b; Seeger, 1988; Anhut, 1992)

2'', 3''- DIHIDRO-5',3'''-DIHIDROXI-ROBUSTAFLAVONA
(2'',3''-dihidro-5',6''- biluteolina)
Dicranoloma robustum (Markham & col., 1988)
Dicranoloma billardieri (Markham & col.,1988)

5'-HIDROXI-AMENTOFLAVONA
(luteolina-(5',8'')-apigenina)
Plagiomnium elatum (Geiger & col., 1988; Anhut & col., 1989a; Anhut, 1992; Biehl, 1988)
Rhytidiadelphus squarrosus (Seeger & col.,1990; Seeger, 1992)

2,3-DIHIDRO-5'-HIDROXI-AMENTOFLAVONA
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y b; Seeger, 1988; Anhut, 1992)
Rhytidiadelphus squarrosus (Seeger & col., 1990; Seeger, 1992)

2,3-DIHIDRO-5',3'''-DIHIDROXI-AMENTOFLAVONA
(2,3-dihidro-5',8''-biluteolina)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989; López-Sáez, 1992)
Plagiomnium cuspidatum (Anhut & col., 1989a y b; Seeger, 1988; Anhut, 1992)
(?) Bartramia ithyphylla (López-Sáez, 1992)
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993)

5'-HIDROXI-ROBUSTAFLAVONA
(luteolina-(5',6'')-apigenina)
Rhytidiadelphus squarrosus (Seeger & col.,1990)

DICRANOLOMINA
(2',6''-biluteolina)
Anacolia webbii (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992)
Dicranoloma robustum (Markham & col., 1988)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989)
Bartramia pomiformis (López-Sáez, 1992; Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993)

2,3-DIHIDRO-DICRANOLOMINA
(2,3-dihidro-2',6''-biluteolina)
Dicranoloma robustum (Markham & col., 1988)
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993)

FILONOTISFLAVONA
(2',8''-biluteolina)
Anacolia webbii (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992)
Bartramia halleriana (Salm & col., 1993; Salm, 1992)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989; López-Sáez, 1992)
Dicranoloma robustum (Markham in Geiger, 1990; Markham & col., 1988)
Bartramia pomiformis (Seeger & col., 1991 y 1992b; Seeger, 1992)
Bartramia stricta (López-Sáez, 1992)

2,3-DIHIDRO-FILONOTISFLAVONA
(2,3-dihidro-2',8''-biluteolina o eriodictiol-(2',8'')-luteolina)
Anacolia webbii (Seeger & col., 1993a; Seeger, 1992)
Bartramia halleriana (Salm & col., 1993; Salm, 1992)
Philonotis fontana (Geiger & Bokel, 1989; López-Sáez, 1992)
Bartramia pomiformis (Seeger & col., 1992b; Seeger, 1992)
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993)

APIGENINA-(3',3''')-NARINGENINA
Homalothecium lutescens (Sievers, 1992)
Homalothecium sericeum (Sievers, 1992)
Homalothecium philippeanum (Sievers, 1992)
Ptilium crista-castrensis (Sievers, 1992)
Ctenidium molluscum (Sievers, 1992)
Rhytidiopsis robusta (Sievers, 1992)

3',3'''-BIAPIGENINA
Homalothecium lutescens (Seeger & col., 1993b)

2,3-DIHIDRO-3',3'''-BIAPIGENINA
Homalothecium lutescens (Seeger & col., 1993b)

4.2. Biflavanonas (dímeros flavanona-flavanona)

3',3'''-BINARINGENINA
Pilotrichella cuspidata (Seeger & col., 1992a)
Drepanocladus aduncus (Sievers, 1992)
Homalothecium sericeum (Sievers, 1992)
Homalothecium lutescens (Sievers, 1992; Seeger & col., 1993b)
Homalothecium philippeanum (Sievers, 1992)
Entodon concinnus (Sievers, 1992)
Ptilium crista-castrensis (Sievers, 1992)
Ctenidium molluscum (Sievers, 1992)
Rhytidiopsis robusta (Sievers, 1992)
Thuidium tamariscinum (Sievers, 1992)
Thuidium philibertii (Sievers, 1992)

4.3. Dímeros isoflavona-flavona.

BRIOFLAVONA
Bryum capillare (Geiger & col., 1987; Siegel & col., 1989; Anhut, 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b)

HETEROBRIOFLAVONA
Bryum capillare (Geiger & col., 1987; Anhut, 1992; Siegel, 1988; Stein, 1988b; Siegel & col., 1989)
Bryum schleicheri (Stein, 1988a y b; Stein & Zinsmeister, 1991)

4.4. Dímeros aurona-flavanona.

CAMPYLOPUSAURONA
(aureosidina-5',6''-eriodictiol)
Campylopus clavatus (Geiger & Markham, 1992)
Campylopus holomitrium (Geiger & Markham, 1992)
Campylopus introflexus (Weyand, 1993)

4.5. Biauronas (dímeros aurona-aurona).

5',5''- *BIAUREOSIDINA*
Aulacomnium androgynum (Hahn, 1993; Hahn & col., 1994)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993; Hahn & col., 1994)

4.6. Biflavonoides macrocíclicos.

BARTRAMIAFLAVONA
(2-hidroxi-2,3-dihidro-2',8'',8,2'''-biluteolina)
Bartramia halleriana (Salm, 1992; Salm & col., 1993)
Bartramia pomiformis (Seeger & col., 1991 y 1992b; López-Sáez, 1992; Seeger, 1992)

ANHIDRO-BARTRAMIAFLAVONA
(2',8'',8,2'''-biluteolina)
Bartramia halleriana (Salm, 1992; Salm & col., 1993)
Bartramia pomiformis (Seeger & col., 1991 y 1992b; López-Sáez, 1992; Seeger, 1992)

4.7. Dímeros con dihidroflavonol (dihidroflavonol-dihidroflavonol, dihidroflavonol-flavanona, dihidroflavonol-flavonol).

HIPNOGENOL A
(dihidroflavonol-3',3'''-dihidroflavonol)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)
Hypnum lindbergii (Sievers, 1992)
Hypnum andoi (Sievers, 1992)
Hypnum jutlandicum (Sievers, 1992)

HIPNOGENOL B
(dihidroflavonol-3',3'''-naringenina)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)
Hypnum lindbergii (Sievers, 1992)
Hypnum andoi (Sievers, 1992)

HIPNOGENOL B1
(dihidroflavonol-3',3'''-kaempferol)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1994)

HIPNOGENOL B2
(dihidroflavonol-3',3'''-dihidroflavonol)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992)

3,3''-DIHIDROXI-TETRAHIDRO-OCHNAFLAVONA
(3,5,7,4',3'',5'',7''-heptahidroxi-3'-O-4'''-biflavanona)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)

3,3'',3'''-*TRIHIDROXI- TETRAHIDRO-ROBUSTAFLAVONA*
(3,5,7,4',3'',5'',7'',3''',4'''- nonahidroxi - 3'- 6''- biflavanona)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)

HYPNUMBIFLAVONOIDE B
(1''',2''',3''',4'''-tetrahidro-3,5,7,3'',5'',7''- hexahidroxi-4'''- keto - 3'-1''',4'-O-2'''-biflavanona)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)

ALLO-HYPNUMBIFLAVONOIDE B
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992)

HYPNUMBIFLAVONOIDE A
(3,5,4',3'',5'',7''-hexahidroxi- 4'''-keto- (7-O-2'''), (8,1''')- biflavanona)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1994)

5. AURONAS.

BRACTEATINA
(4,6,3',4',5'-pentahidroxi-aurona)
Funaria hygrometrica (Weitz & Ikan, 1977)

6. ANTOCIANIDINAS.

6.1. Antocianidinas (agliconas).

LUTEOLINIDINA
(5,7,3',4'-tetrahidroxi-antocianidina)
(?) Splachnum rubrum (Nilsson & Bendz, 1973)
(?) Splachnum vasculosum (Nilsson & Bendz, 1973)

ESFAGNORRUBINA A
Sphagnum magellanicum (Vowinkel, 1975)
Sphagnum nemoreum (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum plumulosum (Rudolph & Johnk,1982)
Sphagnum warnstorfii (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum rubellum (Rudolph & Johnk, 1982)

ESFAGNORRUBINA B
Sphagnum spp. (Mentlein & Vowinkel, 1984)
Sphagnum nemoreum (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum plumulosum (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum warnstorfii (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum rubellum (Rudolph & Johnk, 1982)

ESFAGNORRUBINA C
Sphagnum spp. (Mentlein & Vowinkel, 1984)
Sphagnum nemoreum (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum plumulosum (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum warnstorfii (Rudolph & Johnk, 1982)
Sphagnum rubellum (Rudolph & Johnk, 1982)
Bibliografía adicional: Bendz & col. (1966b y 1967), Nilsson (1967), Nilsson & Tottmar (1967), Rudolph (1963, 1964, 1965), Rudolph & Vowinkel (1969), Voss (1975).

6.2. Antocianidinas O-glicosiladas.

LUTEOLINIDINA 5-O-GLUCOSIDO
Bryum cryophilum (Bendz & Martensson, 1961; Bendz & col., 1962)
Bryum rutilans (Bendz & Martensson, 1963)
Bryum weigelii (Bendz & Martensson, 1963)

LUTEOLINIDINA 5-O-DIGLUCOSIDO
Bryum cryophilum (Bendz & Martensson, 1961; Bendz & col., 1962)
Bryum weigelii (Bendz & Martensson, 1963)
Bryum rutilans (Bendz & Martensson, 1963)

7. CHALCONAS

7.1. Chalconas O-glicosiladas.

CHALCONA O-GLICOSIDO
Plagiomnium ciliare (Wyatt & col., 1991a y b)

8. ACIDOS FLAVONOIDICOS

ACIDO BARTRAMICO
(luteolina-8,2''-ácido protocatéquico)
Bartramia pomiformis (Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b)

ACIDO HIPNICO
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1994)

ACIDO HIPNICO METILESTER
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1994)

9. ALDEHIDOS FLAVONOIDICOS

HYPNUMALDEHIDO
(3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-(3''-formil-6''-hidroxifenil)-flavanona)
Hypnum cupressiforme (Sievers, 1992; Sievers & col., 1992)

10. TRIFLAVONOIDES

BARTRAMIA-TRILUTEOLINA
(2',8'',2''',8''''-triluteolina)
Bartramia pomiformis (Seeger, 1992; Seeger & col., 1992b)

AULACOMNIUM-TRILUTEOLINA
(5',8'',5''',6''''-triluteolina)
Aulacomnium palustre (Hahn, 1993)