

“LAS HEPÁTICAS: BIOFACTORÍAS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y SUS APLICACIONES”.

“LIVERWORTS: CELLULAR BIOFACTORIES FOR THE PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES AND THEIR APPLICATIONS”.



(Marchantia polyphorma. Imagen de Phil bendle.)

Trabajo de Fin de Grado

Santiago González Rodríguez

Tutorizado por la Dra. María del Carmen Alfayate Casañas y la Dra. Emma

Suárez Toste. Grado en Biología. Septiembre 2017.

Índice:

	Resumen / Abstract	3
1	Introducción.	3
2	Objetivos.	4
3	Material y métodos	5
4	Revisión bibliográfica.	5
	4.1. Características de los briófitos.	5
	4.2. Clasificación de los briófitos.	8
	4.3. Características de las hepáticas.	9
	4.4. Fitoquímica.	12
	4.4.1. Metabolitos secundarios.	13
	4.4.2. Metabolitos secundarios en hepáticas.	14
	4.4.3. Componentes bioactivos en hepáticas y sus actividades.	16
	Antibacterianos y antifúngicos	16
	Antivirales	18
	Citotoxicidad y antitumorales	19
	Anticathepsin (L y B) y relajantes musculares	21
	Inhibitorios del crecimiento de plantas, antiparasitarios e insecticidas	22
	Olor	23
5	Conclusiones.	24
6	Bibliografía.	25

Resumen:

Las hepáticas, son una división de plantas con gametófito haploide dominante sobre el esporófito diploide, dependientes del agua y de amplia distribución. Este grupo vegetal posee un gran número de metabolitos secundarios, localizados en los denominados “cuerpos oleosos”. Esto las convierte en un excelente material para el estudio de dichos compuestos y sus aplicaciones. En este sentido, se ha conseguido obtener bastante éxito en la búsqueda de metabolitos secundarios con bioactividad. Entre ellos, los grupos con una mayor importancia, en cuanto a diversidad de moléculas y acción/función, son los bis-bibencilos macrocíclicos y los terpenos. Muchos de estos compuestos, además, son productos casi exclusivos de hepáticas, por lo tanto, aún cobra más importancia continuar con el estudio de estas plantas.

Abstract:

The hepatics, are a division of plants with dominant haploid gametophyte on a diploid sporophyte, water dependent and widely distributed. This non-vascular land plant group has a large number of secondary metabolites, located in the so-called "oily bodies". This makes them an excellent material for the study of these compounds and their applications. In this sense, it has been possible to obtain quite successful in the research of secondary metabolites with bioactivity. Among them, the groups with a greater importance, in terms of diversity of molecules and action / function, are macrocyclic bis-bibenzyls and terpenes. Many of these compounds, moreover, are almost exclusive products of liverworts, therefore, it became even more important to continue the study of these plants.

1. INTRODUCCIÓN

Los briófitos son el grupo más antiguo de plantas terrestres, han sobrevivido unos 400 millones de años resistiendo diferentes eventos, como cambios climáticos durante las sucesivas eras. Éstos, a su vez, ocupan el segundo lugar, solo por detrás de angiospermas, en número de especies dentro del reino de las Plantas (Wang *et al.*, 2017)

Durante mucho tiempo, los briófitos han sido los grandes olvidados por los estudios científicos, nunca hubo un gran interés por ellos, debido a que en la mayoría de los casos son demasiado pequeños y tediosos a la hora de trabajar, y además no poseen atractivo culinario (Asakawa, 2001). Sin embargo, a pesar de esto, diversos pueblos alrededor del mundo han

mostrado interés por ellos, durante muchísimos siglos se han aprovechado de sus propiedades, sin comprender realmente su verdadero potencial, que aún hoy en día se desconoce en muchos casos. Se sabe que el uso de plantas con fines medicinales se remonta a más de 5000 años (Tafti, 2017).

En la Edad Media, algunos briófitos fueron usados como medicina para el hígado y otros males viscerales, aunque nunca se demostró su efectividad (Gradstein, 1990). También fueron utilizados para realizar otras labores como: decoración, embalaje o como pegamento (Chandra *et al.*, 2016). En la actualidad, los avances en las técnicas de extracción y separación de compuestos, como la cromatografía de gas (CG) o la resonancia magnética nuclear (RMN), han abierto una nueva ventana de oportunidades para extraer compuestos de los briófitos, en concreto sus metabolitos secundarios. Estas interesantes plantas del grupo denominado “no vasculares” han demostrado tener múltiples productos con propiedades muy diversas, como antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes o antibióticas (Dey y Mukherjee, 2015) que los hacen atractivos en campos como la medicina, la agricultura o la cosmética. A día de hoy aún no se sabe cuántas propiedades más se podrán descubrir de los compuestos sintetizados por los briófitos, ni su número, pero muchos autores tienen grandes esperanzas de futuro puestas en estos pequeños autótrofos.

2. OBJETIVOS

Los briófitos son considerados como los ancestros de las primeras plantas terrestres (Rezanglia *et al.*, 2007) y ocupan ecosistemas diversos desde el Ártico hasta la Antártida. En este grupo de plantas, con diversas morfologías, con una generación matrotrofica diploide dependiente de la haploide dominante, se encuentran las hepáticas. Estas pequeñas plantas autótrofas son uno de los grupos de briófitos más investigados químicamente. Esto es debido a la presencia de los “cuerpos oleosos u oleíferos” presentes en sus células (Vanderpoorten y Goffinet, 2009).

Teniendo en cuenta estos datos el principal objetivo de este TFG es elaborar una revisión bibliográfica sobre la bioquímica de los metabolitos secundarios presentes en hepáticas y sus aplicaciones para el hombre.

Para alcanzar este objetivo se afrontan unas secciones secundarias que conducen a este principal y que son:

- Descripción de la ecología y biología de los briófitos.
- Descripción de la morfología y distribución de las hepáticas.

- Caracterización y determinación de metabolitos secundarios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos publicados en revistas indexadas dedicadas al estudio de metabolitos secundarios en hepáticas y sus actividades. También se ha consultado revisiones y otros estudios científicos sobre el tema objeto de estudio.

- La estrategia de indagación que se ha seguido en este trabajo, ha sido la búsqueda por internet, con las bases de datos de artículos científicos más importantes, como son PubMed, Google Académico o Science Direct, en revistas científicas (Elsevier o Thieme), manuales editados de fitoquímica de plantas y específicamente de briófitos.
- El número de artículos elegidos para este trabajo ha sido de 73 y su elección se ha creído oportuna por su relevancia dentro de la investigación directa de las actividades de estos compuestos o por aportar datos interesantes relacionados con estos compuestos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. - RESULTADOS

4.1. Características generales de los briófitos

Los briófitos son plantas terrestres no vasculares, en general de pequeño tamaño, que han colonizado también el medio acuático, pero ninguna es marina. Poseen una distribución mundial, crecen en los árboles, en el suelo, lagos, ríos e incluso en la Antártida (Asakawa *et al.*, 2013). Abundan en lugares sombríos y húmedos (Fig. 1), pero hay especies xerófilas que pueden crecer sobre medios estacionalmente secos e incluso en desiertos. En estos casos, unidos a períodos estacionalmente lluviosos o a humedades atmosféricas altas. La mayor diversidad y riqueza de estos se encuentra en las regiones tropicales de selvas húmedas y cubiertas, perfectas para su crecimiento, aunque también pueden ser dominantes en regiones boreales y australes, y en algunas comunidades templadas como las turberas. La exigencia de humedad, entre otros factores, es debido a su ciclo reproductor, donde es necesaria una fase acuosa para facilitar el paso de los gametos masculinos (espermatozoides ciliados) desde el anteridio al arquegonio (Bresinsky, 2004).



Figura 1. a) Imagen del suelo de un bosque cubierto por briófitos. b) Hépatica talosa *Asterella californica* creciendo sobre sustrato rocoso. c) Gametófito (Gf) y esporófito (EF) de *Marchantia polymorpha*. Imagen: Morgner (wikipedia) 2002

Todos los briófitos son plantas arquegoniadas que presentan alternancia de dos generaciones heteromórficas: una esporofítica y otra gametofítica (Fig. 1c), siendo esta última la dominante y haploide, a diferencia de en plantas vasculares, formando el aparato vegetativo desde el cual surgirá el esporófito matrotrofico diploide y que vive a expensas del gametófito y cuya misión es la formación de esporas (Bresinsky, 2004).

Los briófitos además atesoran un extraordinario poder de regeneración; es muy frecuente la reproducción vegetativa, ya sea por simple fragmentación de cualquier parte del gametófito o por yemas o propágulos, que pueden formarse en distintas partes del talo, en caulidios, filidios o rizoides y dar lugar a un nuevo gametófito (Bresinsky, 2004).

Los gametófitos en briófitos, se pueden diferenciar en dos tipos, con un talo aparentemente poco diferenciado, lobulado y dotado de rizoides en la cara inferior, denominados briófitos talosos (Figs. 1 y 2), los cuales a veces poseen una gran diferenciación hística (múltiples tejidos, como los asimiladores o almacenadores), y el otro tipo de gametófito que es un tallito erguido o sésil, con hojitas y rizoides, denominado gametófito folioso (Fig. 2). En el gametófito se desarrollan los dos tipos de gametangios, el masculino o anteridio, formaciones globosas sustentadas por un pedicelo en donde se desarrollarán los espermatozoides, y el femenino o arquegonio en forma de botella donde se produce la ovocélula, que tras la fecundación dará lugar al esporófito; ambos gametangios están protegidos por una capa de células estériles a modo de envoltura (Bresinsky, 2004).



Figura 2. a) Hepática talosa del género *Conocephalum* y b) hepática foliosa del género *Bazzania*. (b: ohio moss & lichen association.)

El esporófito dependiente del gametófito, se forma sobre éste, como mencionamos anteriormente, y le suministra los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Suele ser extremadamente simple, no posee ramificaciones y tiene un único esporangio, está formado por la seta, la cápsula y la caliptra, envoltura de protección de la cápsula (Figs. 2-3) (Bresinsky, 2004).



Figura 3. a) Arquegonióforo típico de *Marchantia polymorpha* y b) Esporofito de *Radula complanata*. Imagen: HermannSchachner, 2009.

A diferencia de las plantas vasculares, los briófitos no presentan tejido conductor como el xilema o el floema. Algunos carecen totalmente de células conductoras, absorben agua y nutrientes directamente por toda la superficie de la planta, y la circulación se realiza por conducción externa capilar, en cambio otros poseen un sistema conductor diferenciado (Fig. 4) (Héban, 1979). Esto permite diferenciarlos en ectohídricos (sin sistema conductor) y endohídricos (con sistema conductor). En los talosos, las células conductoras de agua están muy poco diferenciadas, mientras que en los foliosos poseen cordones de células alargadas

conductoras de agua, con el protoplasma no vivo semejantes a traqueidas, llamados hidroides, análogo al xilema en vasculares, y con los tabiques transversales inclinados, atravesados por plasmodesmos y con frecuencia punteados, llamados leptoides, análogos del floema de vasculares, que son células alargadas que rodean a los hidroides y conducen los azúcares elaborados a lo largo del briófito (Fig. 4). Ambos tipos, hidroides y leptoides, carecen de lignina. La gestión del agua no se basa en el aislamiento del exterior mediante una epidermis, como en plantas vasculares, por el contrario, gozan de mecanismos muy diversificados de retención del agua, con el objetivo de dificultar la evaporación capilar.

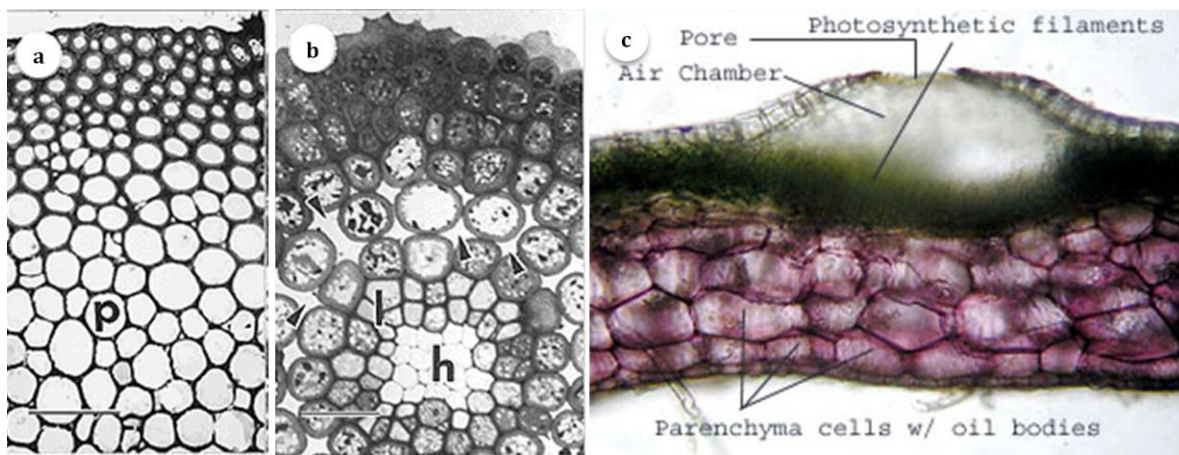


Figura 4. Fotomicrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de musgos: a) sin tejido conductor diferenciado en *Neckera crispa* (P: parénquima) y b) con tejido conductor formado por hidroides (h) y leptoides (l) en *Pogonatum aloides*. c) Fotomicrografía de microscopía óptica de poros en hepáticas. (a-b: Imágenes de Ligrone, Duckett y Renzaglia 2000).

La ausencia de vasos conductores bien desarrollados se explica por su pequeño tamaño, y que no poseen un cormo como tal con raíz, tallo y hojas. Algunos presentan poros aeríferos o estomas sencillos, con los que realizan el intercambio gaseoso, aunque es muy extraño encontrarlos en los gametófitos (sólo en antoceros y el grupo de hepáticas marcantiales) (Fig. 4), son mucho más comunes en los esporófitos, con los que realizan el intercambio gaseoso. La cutícula, cuando existe, es muy fina, y por tanto, la pérdida de agua es cuantiosa en condiciones desfavorables, son poiquilohídricos.

4.2 Clasificación de los briófitos

Los briófitos se describen como un grupo homogéneo de unas 24000 especies, constituido por antoceros (Anthocerophyta; 300 especies), hepáticas (Hepatophyta; 6000 especies) y musgos (Bryophyta; 14.000 especies) (Cavers, 1911; Campbell, 1918, Mishler, 1986; Alfayate, 1995; Asakawa *et al*, 2012). Están taxonómicamente situados entre algas y

pteridofitos (Asakawa, 2000). Si fuésemos capaces de entender su historia evolutiva, sería posible comprender cómo se produjo uno de los grandes acontecimientos en la historia del desarrollo en la tierra, el paso de los organismos autótrofos del medio marino al terrestre, aunque aún existe controversia acerca del origen de este grupo.

Se han propuesto varias teorías para explicar el origen de los briófitos, para unos autores serían el producto de una evolución regresiva de algunos pteridófitos (Héban, 1979), pero para otros se produjeron a partir de un grupo que surgió de un linaje de las primeras algas que conquistaron la tierra y dieron lugar a los embriobiontes. Esto último se apoya en diversos estudios que han demostrado la relación directa de carofíceas (algas verdes) y briófitos, tanto por análisis moleculares, como por la presencia de un espermatozoide diflagelado de estructura microtubular característica o la presencia de compuestos fenólicos comunes en ambos grupos (Estébanez *et al.*, 2011).

4.3 Características de Hepáticas

Marchantiophyta (Hepaticae, hepáticas) incluye 3 clases: Haplomitriopsida, Marchantiopsida y Jungermanniopsida (Tabla 1); distribuidas en 15 órdenes, 82 familias, 316 géneros y 6000 especies (Asakawa, 2013). Para algunos autores como Schuster (1979), Engel (1982), Grolle (1983) y Mishler y Churchill (1985), Hepaticae se divide en seis grupos principales: en Jungermanniidae estarían Calobryales, Jungermanniales, Metzgeriales, y en Marchantiidae, Monocleales, Marchantiales y Sphaerocarpales.

Tabla 1. Características de los tres grupos principales en las que se divide Marchantiophyta.

	Marchantiopsida	Jungermaniopsida	Haplomitriopsida
Gametófito	Taloso	Taloso y folioso	Folioso
Esporófito	Seta corta o inexistente	Seta larga	Seta mediana (≈ 3 cm)
Cuerpos oleosos	Dentro de células específicas (reservantes u oleosas)	Dentro de todas las células fotosintéticas, y varían mucho en cuanto a forma y número por célula	Dentro de células específicas
Rizoides	Lisos o tuberculados	Lisos	Ausentes o poseen rizoma hialino subterráneo (<i>Haplomitrium</i>)
Gamentangióforos	Si	No	No
Cordones conductores	Hidroides y leptoides	Solo hidroides (<i>Symphogyna</i> y <i>Pallaviciniaceae</i>)	Muy desarrollados hidroides y leptoides

La distribución y abundancia de endemismos varía, así en el hemisferio sur (Nueva Zelanda, Argentina, incluyendo Asia) hay una gran riqueza de géneros endémicos, mientras que el hemisferio norte (Europa, Norte América) es relativamente pobre en cuanto a éstos (Fig. 5), lo que hace pensar que los briófitos se debieron originar hace unos 400 millones de años en la región que hoy conocemos como la Antártida (Asakawa, 2013).

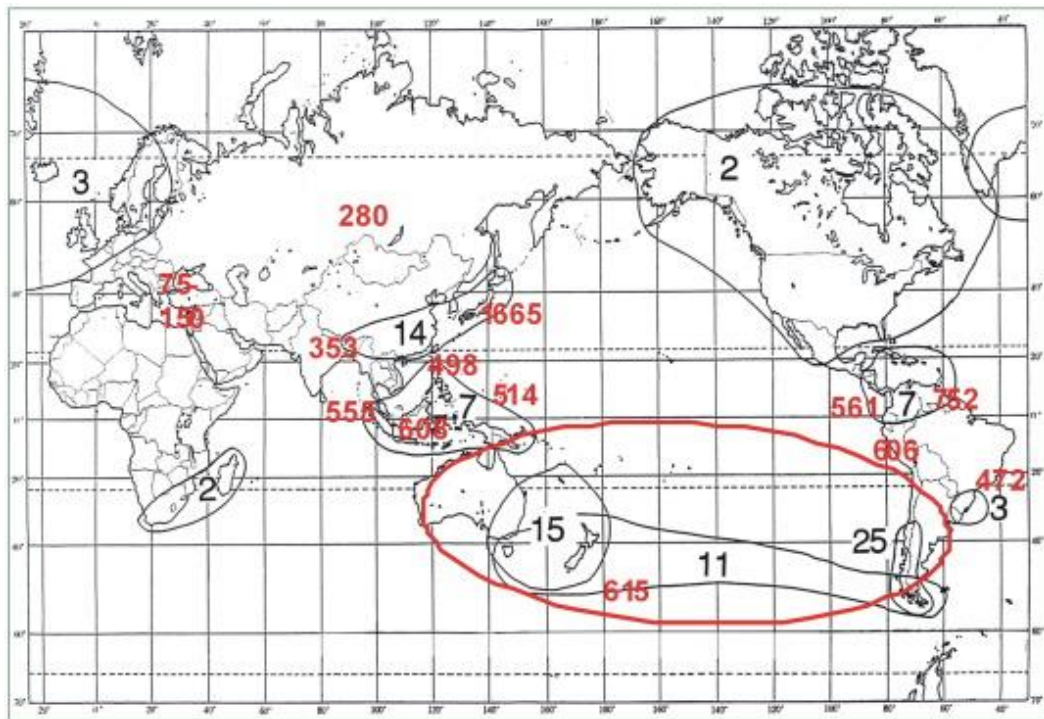


Figura 5: Mapa que muestra la distribución mundial de géneros endémicos de hepáticas (en negro) y su número de especies (en rojo) (Imagen de Asakawa, 2013).

Las hepáticas, al igual que lo mencionado para los briófitos, son plantas con ciclo vital, con alternancia de un gametófito haploide (n) dominante y un esporófito diploide ($2n$) (Fig. 6).

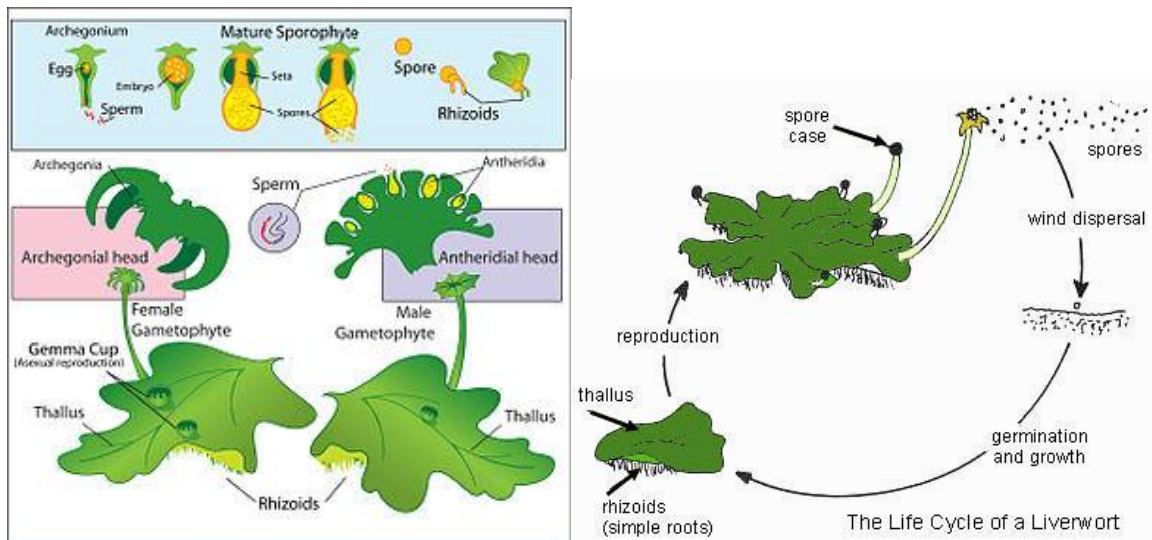


Figura 6. Ciclo de vida de una hepática con gametófito n y esporófito $2n$. Una vez producidas las esporas serán dispersadas y germinarán para volver a dar la generación n . Imagen: LadyoHats (Wikipedia), The Open Door Team 2017.

La morfología de los gametófitos puede ser laminar: hepáticas talosas (Fig. 2), o formado por caulidios y filidios: hepáticas foliosas (Figs. 2 y 7); de un tamaño comprendido entre 1 mm y 20 cm de longitud. Presentan rizoides unicelulares y cuerpos oleosos que contienen aceites y sustancias aromáticas (Fig. 7), responsables del olor característico que desprenden algunas especies. A microscopía óptica, estos cuerpos oleosos se manifiestan como estructuras citoplasmáticas membranosas incoloras, rara vez marrones, con un tamaño de 2 a 20 μm , no visibles cuando los ejemplares están deshidratados, secos (Fig. 7). La existencia de los cuerpos oleosos es muy interesante desde el punto de visto de su fitoquímica, estos cuerpos oleosos contienen terpenoides suspendidos en una matriz de carbohidratos y/o proteínas (Vanderpoorten y Goffinet, 2009)



Figura 7. a) Hepática foliosa con caulidio y filidios. ai) Visión paradermal del filidio. aii) Margen y células del filidio. b) Cuerpos oleosos de la hepática foliosa *Frullania davarica*. (a,ai,aai: Biology 321 webside, b:Imagen de Iwatsuki, 2017).

El esporófito, de vida breve, presenta menor complejidad que el de musgos o antoceros; consta de un pie, una seta incolora, y una cápsula o esporangio que no presenta nunca estomas y se abre usualmente en cuatro valvas (Fig. 3). La seta no se alarga hasta que la cápsula está completamente diferenciada, puede llegar a ser muy corta, e incluso carecer de ésta. En la cápsula, además de las esporas, se encuentran los eláteres, células estériles, que ayudan a su apertura y a la dispersión de las esporas. El protonema, se genera por la germinación de las esporas, es tubular y de vida muy corta (Bresinsky, 2004).

4.4. Fitoquímica

El ser humano utiliza plantas medicinales desde hace varios milenios (Tafti, 2017), como ya se ha comentado. Este hecho se podría considerar el antecedente primitivo de la fitoquímica.

Un método antiguo para determinar las propiedades medicinales de las plantas, es el concepto de Paracelso "la doctrina de las firmas" que trata sobre la similitud de las partes del cuerpo de la planta, con la forma y la estructura del órgano en el cuerpo humano o animal que querían curar. Según esta filosofía, las hepáticas como *Marchantia polymorpha* eran usadas en aquel entonces para curar cualquier trastorno hepático, simplemente por su similitud en la forma (Chandra, 2017). Del mismo modo, *Polytrichum comune*, produce un aceite que fue utilizado por las mujeres de la antigüedad para su cabello, por la similitud de esta con el pelo. El uso de briófitos en la medicina tradicional estuvo especialmente arraigado en china, usándose como diuréticos durante cientos de años (Asakawa, 1995). A lo largo de estos últimos 30 años han sido investigados farmacológicamente, y en muchos casos, los científicos han encontrado una correlación positiva entre el uso tradicional y la bioactividad demostrada científicamente (De Mesquita *et al.*, 2009).

Actualmente la fitoquímica se entiende, como el estudio de la química de las plantas, y las posibles aplicaciones de sus compuestos para los seres humanos, ya sea en la agricultura, la cosmética o la medicina, además, disciplinas como biotecnología y quimiotaxonomía, que se encargan de la investigación de la bioactividad, biosíntesis y las técnicas de extracción de estos compuestos. En las últimas décadas, el desarrollo de estas materias ha provocado un importante impulso en el estudio de los componentes bioactivos en plantas y consecuentemente en briófitos. Ello ha permitido también descubrir estructuras cada vez más

complejas a partir de pequeñas cantidades de producto, lo cual es especialmente importante en briófitos.

Actualmente las principales técnicas que se emplean en el estudio de la fitoquímica de las plantas son, técnicas de separación, purificación e identificación: RMN de protón (RMNH) y de carbono (RMNC), espectrometría de masa (EM), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), rayos X; técnicas cromatográficas, solas o combinadas con métodos espectroscópicos tales como EM-CG, o HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia), frecuentemente acoplado a bases de datos de EM. Las bases de datos también se asocian con los métodos espectroscópicos como UV, IR y RMN (Marcano y Hasegawa, 2002).

4.4.1 Metabolitos secundarios.

Las plantas destinan una parte significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos vitales para las mismas, y que se denominan metabolitos secundarios o productos naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Su síntesis en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. Comienza con la fotosíntesis que realizan tanto las plantas, las algas y algunas bacterias, en la que encontramos tres intermediarios químicos principales a partir de los cuales se biosintetizan la mayor parte de los metabolitos secundarios, estos precursores son: acetyl-CoA, ácido shikímico y ácido mevalónico (Fig. 8). Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades, estando a menudo su elaboración restringida a una determinada familia, género o especie, por lo que durante décadas han servido como marcadores taxonómicos (Gershenzon y Mabry, 1983; Alfayate, 1995). Además, su producción no es continua, estando condicionada a las condiciones ambientales. La clasificación de metabolitos secundarios se puede hacer de acuerdo a varios criterios: estructura, bioformación, acción biológica o fuente de producción. Según la estructura se agrupan en cuatro clases principales: terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales), compuestos fenólicos o aromáticos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos) glicósidos, (saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

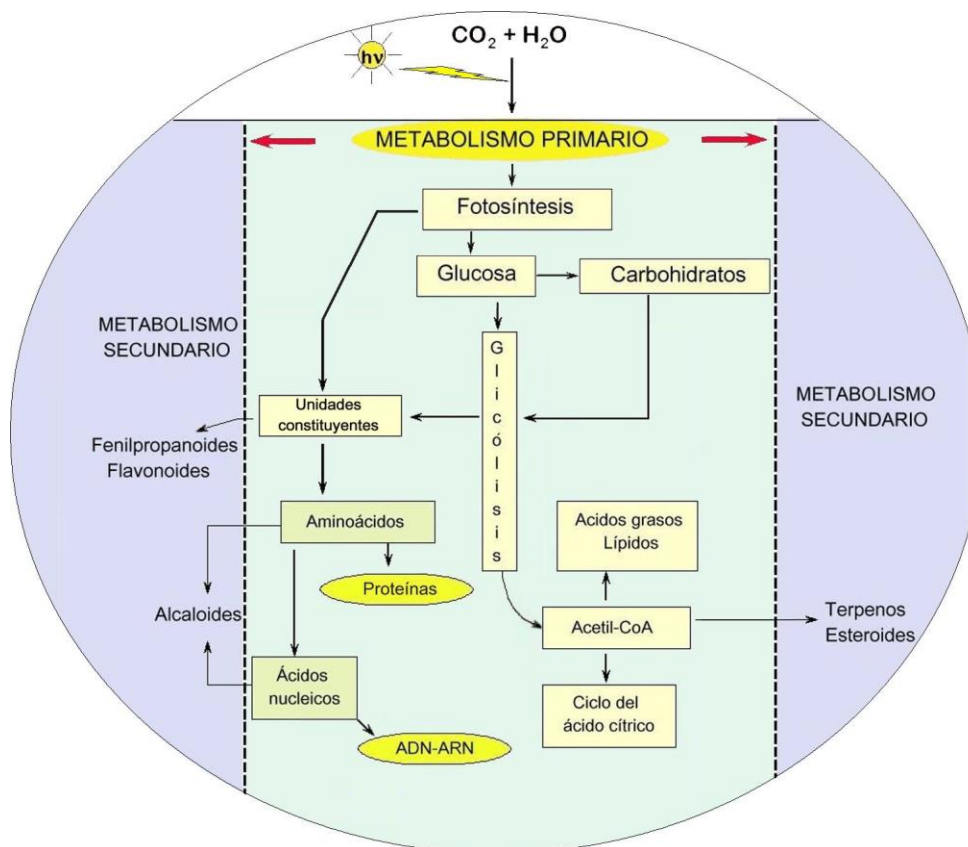


Figura 8. Esquema que muestra la relación entre el metabolismo primario y secundario en plantas. (Imagen de Ávalos y Pérez-Urriá, 2009).

4.4.2. Metabolitos secundarios de hepáticas

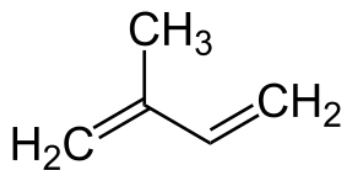
La primera publicación de química de metabolitos secundarios de briófitos fue una disertación de Lohmann de la Universidad de Jena en 1903. Lohmann reconoció que los cuerpos oleosos de numerosas hepáticas acumulaban principalmente aceites esenciales, y que estos aceites funcionaban como inhibidores de caracoles. Un par de años después, el célebre experto en briófitos Karl Müller publicó un artículo acerca de aceites esenciales en las hepáticas *Bazzania trilobata*, *Myliia taylorii*, *Porella arbolis-vitae* y *Nardia scalaris*. Ninguno de estos dos autores fue capaz de aislar los compuestos de la mezcla compleja del aceite. Se necesitaron varias décadas más de estudio para conseguirlo, hasta que en 1956 un grupo de científicos japoneses comenzó con la investigación de aceites esenciales en hepáticas y otro grupo sueco realizó la primera descripción completa de flavonoides y su estructura en 1962. Así se iniciaba la investigación en profundidad de los productos naturales de hepáticas, con la que se ha conseguido el hito de tener un gran catálogo de éstos y una amplia descripción de sus estructuras y bioactividad (Huneck, 1983).

Con el paso de los años y gracias al trabajo de estos investigadores, se ha tenido conciencia de que estas pequeñas plantas son una gran fuente de metabolitos secundarios, con gran potencial biotecnológico y farmacéutico.

La mayor parte de los compuestos aislados en hepáticas pertenecen al conjunto de terpenos y bis-bibencilos.

Los terpenos constituyen uno de los grupos más amplios y biológicamente más importantes entre los metabolitos secundarios, agrupándose en él una gran cantidad de moléculas diferentes que tienen como precursor al ácido mevalónico, el cual proviene del acetyl coenzima A (Fig. 8). Su clasificación se realiza según el número de moléculas de isopreno que contiene su esqueleto carbonado básico (Fig. 9), de forma que los monoterpenos están formados por dos moléculas, los sesquiterpenos por tres, los diterpenos por cuatro, los triterpenos por seis y los tetraterpenos por ocho. La mayor parte de los terpenos encontrados en hepáticas son mono-, sesqui- y diterpenos. Además, un fenómeno muy característico de estas plantas es que un 80% de los sesqui- y diterpenos son enantiómeros de los encontrados en plantas superiores (Asakawa *et al.*, 2013).

Los bis-bibencilos son compuestos aromáticos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, que resultan de la unión de dos unidades de bibencilo (Fig. 9). Las hepáticas son ricas fuentes de bis-bibencilos, encontrándose en la mayoría de las familias (Asakawa *et al.*, 2013). Sin embargo, no son compuestos exclusivos de ellas, ya que se han encontrado en plantas superiores (Kosenkova *et al.*, 2007) e incluso en helechos (Oiso *et al.*, 1999).



Isopreno



Bis-bibencilo

Figura 9: Fórmula estructural de los esqueletos básicos de los dos grupos más abundantes en las hepáticas, el isopreno y el bis-bibencilo.

4.4.3. Componentes bioactivos en hepáticas y sus actividades

Los terpenos y los compuestos aromáticos encontrados en hepáticas son los responsables de la actividad biológica atribuida a estas plantas, como son: antimicrobiana, antifúngica, relajantes musculares, actividad citotóxica frente a las células KB (formadoras de células tumorales), actividad inhibitoria de la ADN polimerasa β , actividad sobre el sistema cardiovascular, anti-VIH y antitumoral. Algunas hepáticas emiten además fragancias características e incluso un intenso sabor amargo.

- Compuestos antibacterianos y antifúngicos

Ciertas especies del género *Marchantia*, *M. chenopoda*, *M. paleaceae* var. *díptera*, *M. plicata*, *M. polymorpha* y *M. tosana*, contienen **marchantina A** (Fig. 10), un bis-bibencilo que presenta actividad antibacteriana contra *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterius*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (Asakawa, 1990) y antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* y *Penicillium chrysogenum* (Asakawa, 1994). Además, de *Marchantia polymorpha* se han extraído otros compuestos similares como: **neomarchantina A**, **marchantina B** y **marchantina E** (Fig. 10), que han demostrado tener efectividad contra el crecimiento de *Candida albicans* (Niu et al., 2006), al igual que otros bis-bibencilos similares, **marchantina H**, **marchantina M** y **marchantina P** (Fig. 10), aislados de *Asterella angusta* (Qu et al., 2007).

La **ricardina C** (Fig. 10), es también un bis-bibencilo extraído de *Reboulia hemisphaerica* (Asakawa y Matsuda, 1982) cuya actividad frente a *Staphylococcus aureus* no fue descubierta hasta hace relativamente pocos años (Morita *et al.*, 2015). Aunque esta bacteria formar parte de la biota natural, en ocasiones puede ser la causante de muchas enfermedades (dermatitis exfoliante, infección de orina, síndrome del shock tóxico, neumonías y meningitis) y de formar biofilms en prótesis y catéteres ocasionando infecciones. La importancia de la **ricardina C** radica en que actúa contra muchas cepas de esta bacteria que han desarrollado resistencia a los antibióticos tradicionales. Además, se ha extraído **ricardina H** de *Marchantia polymorpha* (Niu *et al.*, 2006), **ricardina B** y **ricardina D** (Fig 10) de *Asterella angusta* (Qu *et al.*, 2007) y **ricardifenol C** de *Riccardia crassa* (Perry y Foster, 1995). Todos ellos presentan efectos inhibitorios del crecimiento y desarrollo de *Candida albicans* (Niu *et al.*, 2006; Perry, 1995; Qu *et al.*, 2007) y en el caso del **ricardifenol C** también de *Trichophyton mentagrophytes* (Perry y Foster, 1995).

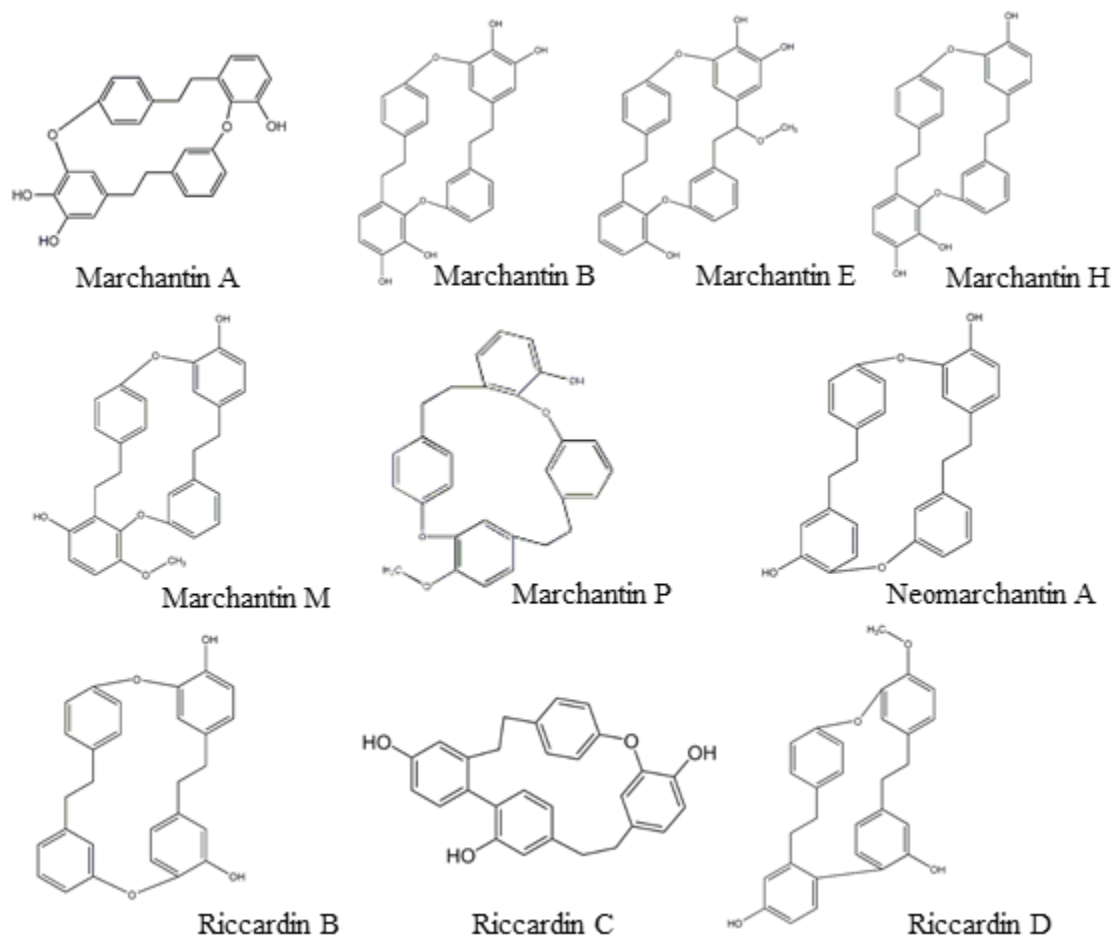


Figura 10: Principales bis-bibencilos extraídos de hepáticas que presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

Diversos terpenos presentes en hepáticas, también han demostrado tener este tipo de actividad. Es el caso del **sacculatal** (Fig. 11), un diterpeno obtenido de la hepática talosa *Pellia endeviifolia* y que exhibió una fuerte actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, agente etiológico de la caries dental (Asakawa *et al.*, 2009). Los sesquiterpenos **viridiflorol** (Fig. 11), obtenido de *Lepidozia chordulifera* y **mastigoforeno C** (Fig. 11), obtenido de *Mastigophora diclados* han mostrado actividad frente a *Staphylococcus aureus* (Gilabert *et al.*, 2015; Harinantenaina y Asakawa, 2004), si bien el **viridiflorol** actúa también contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gilabert *et al.*, 2015).

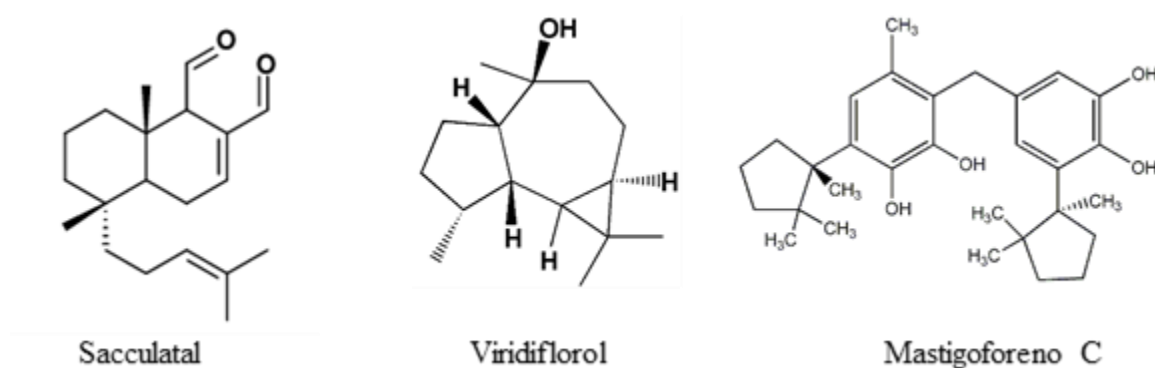


Figura 11: Principales terpenos extraídos de hepáticas que presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

- Compuestos antivirales.

En los últimos años, se han producidos grandes pandemias debido a enfermedades relacionadas con agentes víricos, como la gripe aviar-H5N1 (2004-2006) o la gripe A-H1N1 (2009), encontrar antivirales para ayudar a luchar contra estas enfermedades, que en muchos casos pueden llegar a ser mortales, parece cada vez más crucial.

Así, los influenzavirus A, son un tipo de virus de la familia Orthomyxoviridae, causantes de diferentes gripes en los seres humanos, como las anteriormente mencionadas, o la más grave ocurrida como fue la “gripe española” de 1918, causando 50 millones de muertes en todo el mundo. Esta familia de virus presenta una endonucleasa en la ARN polimerasa, que comprende 3 subunidades: PA, PB1 y PB2. Se ha comprobado que las **marchantinas A, B y E** presentes en hepáticas y otros compuestos relacionados con ellas, como la **plagiochina A** y la **perrottetina F**, que son capaces de inhibir *in vitro* la actividad endonucleasa de la subunidad PA, vital para la capacidad infecciosa de los influenzavirus A (Iwai *et al.*, 2011). Además, tanto las **marchantinas A, B y D**, y la perrottetina F (Nagashima

et al., 1993), así como las **pulsilatinas B y C** (Yoshida *et al.*, 1996) manifestaron una actividad anti-VIH.

Estos compuestos muestran un grupo 3,4-dihidroxifenetilo en común, lo que indica la importancia de este resto para la inhibición de la endonucleasa de PA. Las simulaciones de acoplamiento de **marchantina E** con endonucleasa de PA sugieren un modelo de "ajuste y quelación" (unión y secuestro del metal de la endonucleasa) como el mecanismo que provoca la inhibición de endonucleasa de PA. Los aminoácidos de la enzima de restricción (endonucleasa), son muy similares entre los diferentes subtipos de Influenzavirus tipo A. Por lo que la **marchantina E** es capaz de inhibir el crecimiento de los virus influenza A H3N2 y H1N1, principales causantes de la gripe común, y la **marchantina A, E** y la **perroteína F** mostraron propiedades inhibitorias hacia el influenzavirus B. La **marchantina E** fue la que demostró una mayor condición disminuyendo la capacidad infecciosa del virus.

- Compuestos con actividad citotóxica y antitumoral.

Un gran número de los estudios en hepáticas se han centrado en encontrar nuevos compuestos, que sirvan en la lucha contra el cáncer. Para hacernos una idea, tan solo de hepáticas procedentes de China, se han hallado recientemente 44 diterpenos que poseen esta actividad (Lin *et al.*, 2015). Los bis-bibencilos macrocíclicos, también han ganado mucha notoriedad por su potencial antitumoral, como podemos denotar del número de publicaciones.

De este último grupo, se ha estudiado la capacidad citotóxica contra líneas celulares cancerosas, con diferentes resultados. Las dos moléculas más importantes en este sentido son: las **marchantinas A y C**. La **marchantina A** ha mostrado poseer actividad antitumoral contra células KB (Asakawa *et al.*, 1982), mientras que de la **marchantina C** extraída de *Schistochila glaucescens*, se ha registrado una actividad citotóxica contra células P-388 presentes en un tipo de leucemia linfocítica inducida en ratones (Scher *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado la capacidad de la **marchantina C** (Shi *et al.* 2008) y para detener el ciclo celular en la fase G2, antes de que las células A172 y HeLa entren en mitosis (Shi *et al.*, 2009).

Entre los monoterpenos encontrados en hepáticas con actividad citotóxica tenemos el metil 4-[(5-oxogeranil)oxi]-3-methoxibenzoato, presente en *Trichocolea mollissima* y a partir del cual se han conseguido sintetizar tres compuestos más. De igual modo, se han encontrado monoterpenos citotóxicos en otras especies de este género, como por ejemplo en *Trichocolea tomentella* (Perry *et al.*, 1996) y de otros géneros, como es el caso de *Conocephallum conicum* que posee un monoterpeno éster, 2 alfa, 5 beta-dihidroxibornano-2-cinamato, que ha mostrado cierta citotoxicidad sobre las células HepG2 humanas (línea celular de un cáncer de hígado en humanos HCC) (Lu *et al.*, 2006).

Se ha aislado de hepáticas un gran número de sesquiterpenos con actividad citotóxica. La **Diplofillina**, un ent-eudesmanólido obtenido de las hepáticas *Diplophyllum albicans* y *Diplophyllum taxifolium* y que ha demostrado tener una gran actividad contra el carcinoma epidermoide (Ohta, 1977). La **tulipinolida** y la **custunolida** presentes en gran número de especies, como *Conocephalum supradecompositum*, *Frullania monocera*, *Frullania tamarisci*, *Marchantia polymorpha*, *Porella japonica* y *Wiesnerella denudata* (Asakawa, 1981), otros sesquiterpenos procedentes de *Chiloscyphus rivularis*, *Frullania nisquellensis* y *Porella cordeana* (Gunatilakaa & Kingston, 1997) han mostrado también ser inhibidores del crecimiento de diversos tumores.

A partir del extracto de metil-etil-cetona de la hepática acuática *Chiloscyphus rivularis* se produjo un sesquiterpeno, el 12-hydroxichiloscifón, que fue selectivamente bioactivo en el ensayo de daño a ADN basado en levaduras, y citotóxico para células del carcinoma de pulmón humano (Wu *et al.*, 1997). En la hepática japonesa *Plagiochila ovalifolia*, de los compuestos presentes en el extracto de éter, solo el plagiocillina-A-15-ilo octanoato y 2E 14-hidroxiplagiocillina-A-15-ilo fueron significativamente citotóxicos contra células tumorales P-388 (Toyota *et al.*, 1997).

Otros compuestos aislados de diferentes hepáticas y con actividad citotóxica frente distintas líneas celulares son los siguientes:

- Naviculil caffeato (sesquiterpeno), aislado de: *Bazzania novae-zelandiae*, actividad en: líneas celulares tumorales humanas (Burguess *et al.*, 2000).
- Lactona glaucescenolida (sesquiterpeno), aislado de: *Schistochila glaucescensse*, actividad en: células P-388 (leucemia) (Scher *et al.*, 2002).

- Herbertanos: (-)-alfa-herbertenol, herbertenodiol, mastigoforeno C, mastigoforeno D y Diplofillolida A (sesquiterpenoides), aislados de: *Mastiphore diclados* (de Tahití), actividad en: las líneas celulares cancerígenas HL-60 y KB (Komala *et al.*, 2010).
- Chandolida (sesquiterpeno), aislada de: *Chandonanthus hirtellus*, actividad en: células HL-60 (débil) (Komala *et al.*, 2010).
- Germacrano y pinguisano (sesquiterpenoides), aislado de: género *Frullania* sp. (de Indonesia y Tahití) y *Porella perrottetiana* (Japón), actividad en: células de la leucemia promielocítica humana (HL-60) y las líneas celulares del carcinoma de faringe humana (KB) (Komala *et al.*, 2011)

En los últimos años se ha relacionado la actividad antitumoral de los diterpenos entcaurenoides con la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lin *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de estos diterpenos que actúan vía ROS son **jungermannenona A y B** de la hepática china, *Jungermannia fauriana* (Guo *et al.*, 2016).

- Inhibición de la catepsina (L) y relajantes musculares.

Las catepsinas tienen una importancia fundamental en el recambio proteico de las células de mamíferos, en concreto en la reabsorción ósea (Nomura y Katunuma, 2005), y en el caso de la catepsina L en la osteoporosis (Katsunuma, 1997) y reacciones alérgicas (Matsunaga, 1993). Se han buscado diferentes productos naturales inhibidores de esta enzima para conseguir paliar estas enfermedades y se ha observado que las **marchantinas** y sus derivados sintéticos, citadas anteriormente, mostraron actividad inhibitoria para estas proteínas, siendo **isomarchantina C** la que mostró una mayor actividad (95 % para catepsina L).

Por otro lado, **marchantina A** y los bisbencilos son estructuralmente parecidos a una serie de alcaloides, como el d-tubocurarine, muy importante en la industria farmacéutica por sus propiedades como relajante muscular. Tanto **marchantina A** como el trimetil éter, mostraron dicha actividad (Asakawa, 1993; Taira *et al.*, 1996).

- Compuestos inhibidores del crecimiento en plantas, con acción contra parásitos e insecticidas.

Casi todos los extractos crudos de hepáticas, contienen sustancias amargas o pungentes, muestran efectos inhibitorios en plantas. Un ejemplo de un compuesto extraído de hepáticas que posee este efecto es **poligodial**, inhibe la germinación y la elongación de la raíz del arroz al 100 ppm. En una concentración inferior a 25 ppm, promueve dramáticamente el alargamiento de la raíz de arroz (Asakawa, 1982).

Igualmente, fueron encontrados diez diterpenos, **pedinofillols A-J** (1-10) en la hepática china *Pedinophyllum interruptum* y se procedió a realizar test para demostrar la alelopatía de estos compuestos (capacidad de un organismo de crear sustancias que controlen de alguna forma el crecimiento, reproducción o supervivencia de otro organismo). Se halló que algunos de estos compuestos, son capaces de inhibir la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2013).

Tres compuestos, **marchantina A**, **plagiochina A** y el 2(R) -2-isopropenil-6,7-dihidroxi-4- (2-feniletil) dihidrobenzofurano, demostraron tener una potente actividad contra el parásito que genera la enfermedad del sueño, *Trypanosoma brucei* in vitro. Las propiedades de estos compuestos se compararon con dos fármacos terapéuticos comúnmente utilizados, la eflornitina y la suramina. La **marchantina A** resultó tener mayor actividad contra este protista que estos dos fármacos, mientras que los otros compuestos tuvieron una actividad similar. Esto representó el primer informe prometedor de actividad tripanocida de estos compuestos (Otoguro *et al.*, 2012). La **plagiochillina A** se mostró efectiva contra la oruga de *Spodoptera exempta*, causante de plagas en cultivos en África (Asakawa, 1982).

Una serie de compuestos naturales fueron testeados para comprobar su capacidad para repeler a áfidos (Asakawa *et al.*, 1988). Fue el polygioidal la sustancia más activa en ese sentido, también este compuesto fue capaz de matar larvas de mosquito en concentraciones de 40 p.p.m. y encima actuó como repelente de mosquitos, lo que le hace mejor comercialmente, que productos como el DEET, de los más usados actualmente.

- Olor

Las hepáticas, una vez las rompemos, emiten compuestos volátiles o terpenos hacia el exterior, que escapan por los poros (Figs. 4 y 13). El olor es característico y depende de la especie y por tanto de los compuestos que contengan. Los olores más usuales son a: hongos, zanahoria, olor leñoso dulce, algo parecido al mar (Asakawa, 2007), cedro u olores desagradables como los olores fecales (Salazar Allen *et al.*, 2017).

Estos compuestos se corresponden con grupos de sesquiterpenos germacranos y biciclogermacrano, así como monoterpenos aromáticos con nerolidol (Salazar Allen *et al.*, 2017).

Respecto al olor fecal que desprenden algunas hepáticas, éste está relacionado con el 3-metil-indol o escatol (“skatol”: estiércol). Dicho compuesto es un producto orgánico, cristalino, del metabolismo secundario, y que ocurre naturalmente en las heces (producto del triptófano) en el tracto digestivo de mamíferos. A bajas concentraciones, el escatol, se encuentra formando parte de los olores florales, de los aceites esenciales y se usa en fragancias y como fijador del aroma, también fue usado por los militares americanos como armas no letales (Salazar Allen *et al.*, 2017).

El nerolidol tiene una fragancia floral (Padalia *et al.*, 2015) y es usado en cosmética, jabones, productos de limpieza, etc.; se consumen mundialmente entre 10-100 toneladas/año (Queiroga *et al.*, 2014).

En cuanto a los poros, ya mencionados, y a través de los cuales emiten los compuestos volátiles las hepáticas, Salazar Allen *et al.* (2017) los observaron en especies de hepáticas talosas del género *Cyathodium*, de Panamá y Costa Rica. En este sentido, y aunque el presente TFG se basa en una revisión bibliográfica, no pudimos resistir el hecho de comprobar si otras especies de hepáticas presentaban este mismo tipo de poros. Así preparamos unas muestras de *Lunularia* sp. para su observación a microscopía óptica. Esta hepática mostró el mismo tipo de poro, aunque el número de células que lo constituye parece variar respecto al descrito por esos autores.



Figura 13: a) Fotomicrografía de microscopía óptica del poro en *Cyathodium*. b) Gametófito taloso de *Lunularia cruciata*. c) Visión paradermal del poro de *Lunularia* realizado para este TFG. (a: Imagen de Salazar Allen *et al.*, 2017)

5. CONCLUSIONES

Una vez recopilada y examinada la información expuesta en el presente TFG, el análisis de los resultados bibliográficos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las hepáticas son un grupo muy amplio de plantas, con una alta capacidad de generar metabolitos secundarios únicos, con diversas bioactividades.
2. Los compuestos más importantes de estas plantas, desde el punto de vista de su bioactividad, son los bis-bibencilos y los terpenos, producidos en gran número.
3. Los metabolitos secundarios de hepáticas presentaron capacidad como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios e insecticidas, así como citotóxica, antitumoral y relajantes musculares además de inhibir el crecimiento vegetal.
4. Dentro de las bioactividades, es en la capacidad citotóxica donde se han encontrado un mayor número de compuestos, sobretodo, sesquiterpénicos.
5. El olor en las hepáticas depende de sus metabolitos secundarios localizados en los cuerpos oleosos, entre ellos el nerolidol con uso comercial.
6. Los grupos de investigación, sólo trabajan en ciertas zonas, quedando muchas regiones del planeta sin estudiar, siendo pobres en cuanto a literatura de productos naturales de sus hepáticas, por ejemplo, la región de la Macaronesia.
7. Se debe seguir investigando, ya que, aunque en muchos casos las bioactividades estén demostradas, el producto natural no puede competir en efectividad con productos ya comerciales.

5. CONCLUSIONS

Once the information exposed has been examined and compiled in this FDP, the analysis of the bibliographic results had allowed to obtain the following conclusions:

1. Hepatics are a very broad group of plants, with a high capacity to generate unique secondary metabolites, with various bioactivities.
2. The most important compounds of these plants, from the point of view of bioactivity, bis-benzyls and terpenes, produced in large quantities.
3. Secondary metabolites of hepatics presented capacity as antibacterial, antifungal, antiviral, antipyretic and insecticidal as well as cytotoxic, antitumor and muscle relaxants moreover inhibit plant growth.
4. Within the bioactivities, it is in the cytotoxic capacity where had been found the greater number of compounds, especially , sesquiterpenes.
5. The odor in the liver depends on the secondary metabolites located in the oily bodies, among them the nerolidol with commercial use.
6. The research groups only work in certain areas, leaving many regions of the planet without studying, being poor in literature of natural products of their liverworts, for example, the Macaronesian region.
7. Further research is needed, although in many cases bioactivities are demonstrated, the natural product can not compete effectively with commercial products now.

Bibliografía:

- Alfayate M.**1995.Contribución a la biología de musgos pleurocárpicos canarios: anatomía, palinología y fitoquímica de productos naturales. Editorial: Universidad de La Laguna. 193701.
- Asakawa Y.** 1981. Biologically active substances obtained from bryophytes. *J Hattori Bot Lab*, 50, P. 123-142.
- Asakawa Y.**1982. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 42, W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby (Eds.), Springer, Vienna, P. 1–285.
- Asakawa Y.** 1990. In *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, D. H. Zinsmeister, R. Mues (Eds.), Oxford University Press, Oxford, P. 369–410.
- Asakawa Y.**1993. In *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, S. M. Colegate, R. J. Molyneux (Eds.), CRC Press, Boca Raton, P. 319–347.

- Asakawa Y.** 1994. Highlights in phytochemistry of hepaticae-biologically active terpenoids and aromatic compounds. *Pure Appl. Chem.* 66, P. 2193.
- Asakawa, Y.** 1995. Chemical constituents of the bryophytes. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, Ch. Tamm (Eds.), Springer, Vienna, 65, P. 1–562.
- Asakawa Y.** 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and European liverworts. *Phytochemistry*.56(3), P. 297-312.
- Asakawa Y.** 2007. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry* 79, (4). P.557-580.
- Asakawa Y. y Matsuda R.** 1982. Riccardin C, a novel cyclic bibenzyl derivative from *Reboulia hemisphaerica*. *Phytochemistry*. 21, (8), P. 2143-2144.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A., Nagashima F.** 2013. Chemical Constituents of Bryophytes Bio- and Chemical Diversity, Biological Activity, and Chemosystematics. *Prog. Chem Org Nat Prod*. Springer-verlag Wien, 95 P, 1-796. .
- Asakawa Y, Toyota M, Oiso Y, Braggins JE.** 2001. Occurrence of polygodial and 1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-but-2-en-1-one from some ferns and liverworts: role of pungent components in bryophytes and pteridophytes evolution. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 49(10) P. 1380-1381.
- Asakawa Y., Toyota M., Taira Z., Takemoto T.** 1982. Biologically active cyclic bisbenzyls and terpenoids isolated from liverworts. *Proceeding of the 25th Symposium on Chemistry of Natural Products*. Tokyo, P. 337-344.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F, Toyota M, Hashimoto T.** 2009. Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity. *Bioactivity and Chemosystematics Heterocycles* 77, P. 99.
- Asakawa Y., Dawson G. W., Griffith D.C., Lallemand J.-Y., Ley S. V, et al.** 1988. *J. Chem. Ecol.* 14, P. 1845.
- Ávalos A., Pérez-Urria E.** 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid.
- Basu P.K, Kapoor K.S., Nath S. and Banerjee S.K.** 1987. Allelopathic influence: and assessment on the response of agricultural crops growing near *Eucalyptus tereticornis*. *Indian Journal of Forestry* 10, P. 271-367
- Bresinsky A.** 2004. Briófitos Cap-11. Strasburger: Tratado de Botánica. 35a. ed. Omega. Barcelona.
- Burgess E.J., Larsen L, Perry N.B.** 2000. A cytotoxic sesquiterpene caffate from the liverwort *Bazzanianovae-zelandiae*. *J Nat Prod*, 63, (4), P. 537-539.
- Campbell, D.H.** 1918. The structure and development of Mosses and ferns, New York.

- Cavers, F.** 1911. The inter-relationships of the Bryophyta. *New Phytol.* IX, 193–234.
- Chandra S., Chandra D., Barh A., Pankaj, Pandey R.K., et al.** 2016. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *J Tradit Complement Med*;7, (1), P. 94-98.
- de Mesquita M.L., de Paula J.E., Pessoa C., de Moraes M.O., Costa-Lotufo L.V., et al.** 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*, 123 (3) P. 439-445.
- Dey A. y Mukherjee A.** 2015. Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. *Journal of Acute Disease*. 4, (3). P. 236-248.
- Estébanez B., Draper I. de Atauri D., Medina R.** 2011. Briófitos: una aproximación a las plantas terrestres más sencillas. *Memorias R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 2ª ép., 9. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- Gershenzon, J. y Mabry, T. J.** 1983. Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. *Nordic Journal of Botany*, 3, P 5–34.
- Gilbert M, Marcinkevicius K, Andujar S., Schiavone M., Arena M.E., Bardón A.** 2015. Sesqui- and triterpenoids from the liverwort *Lepidozia chordulifera* inhibitors of bacterial biofilm and elastase activity of human pathogenic bacteria. *Phytomedicine*. 22(1):77-85.
- Glime, J. M.** 2017. Marchantiophyta. Chapt. 2-3. En: Glime, J. M. *Bryophyte Ecology*. Volume 1. *Physiological Ecology*.
- Gradstein S.R.** 1990. Morphology and classification of Hepaticae: an introduction. *Institute of Systematic Botany, University of Utrecht. Heidelberglaan, CS Utrecht, The Netherlands*. 2, P. 3584
- Grolle, R.** 1983. Nomina generica hepaticarum; references types and synonymies. *Acta Bot. Fenn.* 121, P. 1-62.
- Gunatilakaa A.A.L., Kingston D.G.I.** 1997. DNA-damaging natural products with potential anticancer activity. *Stud Nat Prod Chem*, 20 (Part F), P. 457-505.
- Guo YX, Lin ZM, Wang MJ, Dong YW., Niu HM, et al.** 2016. Jungermannone A and B induce ROS- and cell cycle-dependent apoptosis in prostate cancer cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 37(6), P. 814-824.
- Harinantenaina L., y Asakawa Y.** 2004. Chemical constituents of Malagasy liverworts, part II: mastigophoric acid methyl ester of biogenetic interest from *Mastigophora diclados* (Lepicoleaceae Subf. Mastigophoroideae). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 52(11), P. 1382-1384.
- Hebant C.** 1979. Conducting tissues in bryophyte systematics. In: Clarke CJCS, Duckett JG, eds. *Bryophyte Systematics*. Systematics. Association Special. London: Academic Press, 14, P. 365-383.
- Huneck S.** 1983. New manual of bryology. Volume 1. Chemistry and biochemistry of bryophytes. Chapter 1. pp. 3-4. The Hattori Botanical Laboratory. Nichiman, Miyazaki, Japan.
- Iwai Y., Murakami K., Gomi Y., Hashimoto T., Asakawa Y. et al.** 2011. Anti-influenza activity of marchantins, macrocyclic bisbibenzyls contained in liverworts. *PLoS One*. Epub. 6(5):e19825.

- Katsunuma N.** 1997. Molecular mechanisms of bone collagen degradation in bone resorption. *J Bone Miner Metab.* 15:1–8.
- Komala I, Ito T, Nagashima F, Yagi Y, Asakawa Y.** 2011. Cytotoxic Bibenzyls, Germcrane- and Pinguisane-type Sesquiterpenoids from the Indonesian, Tahitian and Japanese Liverworts. *Nat Prod Commun* 6, P.303.
- Komala I, Ito T, Nagashima F., Yagi Y., Kawahata M., et al.** 2010. Zierane sesquiterpene lactone, cembrane and fusicoccane diterpenoids, from the Tahitian liverwort *Chandonanthus hirtellus*. *Phytochemistry*, 71 (11–12), P. 1387-1394.
- Konrat M.V., de Lange P., Greif M., Strozier L., Hentschel J.** 2012. *Frullania knightbridgei*, a new liverwort (Frullaniaceae, Marchantiophyta) species from the deep south of Aotearoa-New Zealand based on an integrated evidence-based approach. *PhytoKeys*. (8), P. 13–36.
- Kosenkova Y.S., Polovinka M.P., Komarova N.I., Korchagina D.V., Kurochkina N. Y. et al.** 2007 Riccardin C, a bisbibenzyl compound from *Primula macrocalyx*. *Chemistry of Natural Compounds*. 43, (6), P. 712–713.
- Lin Z., Guo Y., Gao Y., Wang S., Wang X.** 2015. Ent-Kaurane Diterpenoids from Chinese Liverworts and Their Antitumor Activities through Michael Addition As Detected in Situ by a Fluorescence Probe. *J Med Chem*. 58(9), P. 3944-3956
- Lin Z, Guo Y, Wang S, Wang X, Chang W., et al.** 2014. Diterpenoids from the Chinese liverwort *Heteroscyphus tener* and their antiproliferative effects. *J Nat Prod*. 27;77(6):1336-44.
- Liu N, Li RJ, Wang XN, Zhu RX, Wang L, et al.** 2013. Highly oxygenated ent-pimarane-type diterpenoids from the Chinese liverwort *Pedinophyllum interruptum* and their allelopathic activities. *J Nat Prod*. 76(9), P. 1647-53.
- Lu Z.Q., Fan P.H., Ji M., Lou H.X.** 2006. Terpenoids and bisbibenzyls from Chinese liverworts *Conocephalum conicum* and *Dumortiera hirsuta*. *J Asian Nat Prod Res*, 8 (1–2), P. 187-192.
- Marcano D. y Hasegawa H.** 2002. *Fitoquímica Orgánica: Segunda Edición*. Universidad Central de Venezuela P. 30-32.
- Matsunaga Y., Saibara T., Kido H., Katsunuma N.** 1993. Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS Lett*. 324, P. 325.
- Mishler, B.D., Churchill, S.P.** 1985. Transition to land flora: Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Cladistics*, 1, 305–328.
- Morita D., Sawada H., Ogawa W., Miyachi H., Kuroda T.** 2015. Riccardin C derivatives cause cell leakage in *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta*. 1848(10 Pt A), P. 2057- 2064.
- Nagashima F., Ohi Y., Nagai T., Tori M., Asakawa Y. et al.** 1993. Terpenoids from some German and Russian liverworts. *Phytochemistry* 33, P. 1445-1448.

- Niu C, Qu JB, Lou HX.** 2006. Antifungal bis[bibenzyls] from the Chinese liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Chem Biodivers.* 3(1), P. 34-40.
- Nomura y Katunuma.** 2005. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest* 52(1-2), P 1-9.
- Ohta Y., Andersen N.H., Liu C.B.** 1977. Sesquiterpene constituents of two liverworts of genus *Diplophyllum*: novel eudesmanolides and cytotoxicity studies for enantiomeric methylene lactones. *Tetrahedron*, 33 (6), P. 617-628
- Oiso Y., Toyota M., Asakawa Y.** 1999. Occurrence of a Bis-bibenzyl Derivative in the Japanese Fern *Hymenophyllum barbatum* : First Isolation and Identification of Perrottetin H from the Pteridophytes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 47, (2) P. 297-298.
- Otoguro K, Ishiyama A, Iwatsuki M, Namatame M, Nishihara-Tukashima A, et al.** 2012. In vitro antitrypanosomal activity of bis(bibenzyl)s and bibenzyls from liverworts against *Trypanosoma brucei*. *J Nat Med.* 66(2), P. 377-82.
- Padalia, R.C., Verma, R. S., Chauhan, A., Chanotiya, C. S.** 2015. The Essential Oil Composition of *Melaleuca leucadendra* L. Grown in India: A Novel Source of (E)-Nerolidol. *Industrial Crops and Products*, 69, P. 224-227.
- Perry N.B. y Foster L.M.** 1995. Sesquiterpene/quinol from a New Zealand liverwort, *Riccardia crassa*. *J Nat Prod.* 58(7), P. 1131-5.
- Perry N.B., Foster L.M., Lorimer S.D, May B.C., Weavers R.T.** 1996. Isoprenyl phenyl ethers from liverworts of the genus *Trichocolea*: cytotoxic activity, structural corrections, and synthesis. *J Nat Prod*, 59 (8), P. 729-733.
- Queiroga C.L., Cavalcante M.Q., Ferraz P.C., Coser R.N., Sartoratto A, et al.** 2014. High-speed countercurrent chromatography as a tool to isolate nerolidol from the *Baccharis dracunculifolia* volatile oil. *Journal of Essential Oil Research* 26, (5), 201
- Qu J, Xie C, Guo H, Yu W, Lou H.** 2007. Antifungal dibenzofuran bis(bibenzyl)s from the liverwort *Asterella angusta*. *Phytochemistry.* 68(13), P. 1767-74. Epub.
- Renzaglia K.S., Schuette S., Duff R.J., Ligrone R., Shaw J. et al.** Bryophyte phylogeny: advancing the molecular and morphological frontiers. *Bryologist.* 2007; 110, P.179–213.
- Salazar Allen N., Santana A.I., Gómez N., Chung C.C., Prasad M.** 2017. Identification of volatile compounds from three species of *Cyathodium* (Marchantiophyta: Cyathodiaceae) and *Leiosporoceros dussii* (Anthocerotophyta: Leiosporocerotaceae) from Panama, and *C. foetidissimum* from Costa Rica. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 52 (2), P. 357-370.
- Scher J.M., Burgess E.J., Lorimer S.D., Perry N.B.** 2002. A cytotoxic sesquiterpene and unprecedented sesquiterpene-bisbibenzyl compounds from the liverwort *Schistochila glaucescens*. *Tetrahedron*, 58 (39), P. 7875-7882.
- Shi Y.Q., Liao Y.X., Qu X.J., Yuan H.Q., S Li S., et al.** 2008. Marchantin C, a macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human glioma A172 cells. *Cancer Lett*, 262, P. 173-182.

- Shi Y.Q., Zhu C.J., Yuan H.Q., Li B.Q., Gao J., et al.** 2009. Marchantin C, a novel microtubule inhibitor from liverwort with anti-tumor activity both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Lett*, 276, P. 160-170.
- Schuster, R.M.** 1979. The Phylogeny of the hepaticae. In: *Bryophyte systematics* Ed. G.C.S. Clarke and J.G. Duckett. Academic Pres, London.
- Taira Z., Takei M., Endo K., Hashimoto T., Sakiya Y., et al.** 1996. Marchantin A trimethyl ether: its molecular structure and tubocurarine-like skeletal muscle relaxation activity. *Chem. Pharm. Bull.* 42, P. 52.
- Tafti L. D., Shariatpanahi S.M., Damghani M.M., Javadi B.** 2017. Traditional Persian topical medications for gastrointestinal diseases. *Iran J Basic Med Sci.* 20(3), P. 222-241.
- Toyota M., Tanimura K., Asakawa Y.** 1998. Cytotoxic 2,3- secoaromadendrane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Planta Med*, 64 (5), P. 462-464
- Vanderpoorten, A. y B. Goffinet.** 2009. *Introduction to Bryophyte Biology*. 303 p. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Wang X., Cao J., Dai X., Xiao J., Wu Y., et al.** 2017. Total flavonoid concentrations of bryophytes from Tianmu Mountain, Zhejiang Province (China): Phylogeny and ecological factors. *PLoS One*.12(3):e0173003.
- Wu C., Gunatilaka A.A., McCabe F.L., Johnson R.K., Spjut R.W., et al.** 1997. Bioactive and other sesquiterpenes from *Chiloscyphus rivularis*. *J Nat Prod*, 60 (12), P. 1281-1286.
- Yoshida T., Hashimoto T., Takaoka S., Kan Y., Tori M., et al.** 1996. Phenolic constituents of the liverwort: four novel cyclic bisbibenzyl dimers from *Blasia pusilla*. *Tetrahedron* 52, (46), P.14487-14500.
- .
- .

