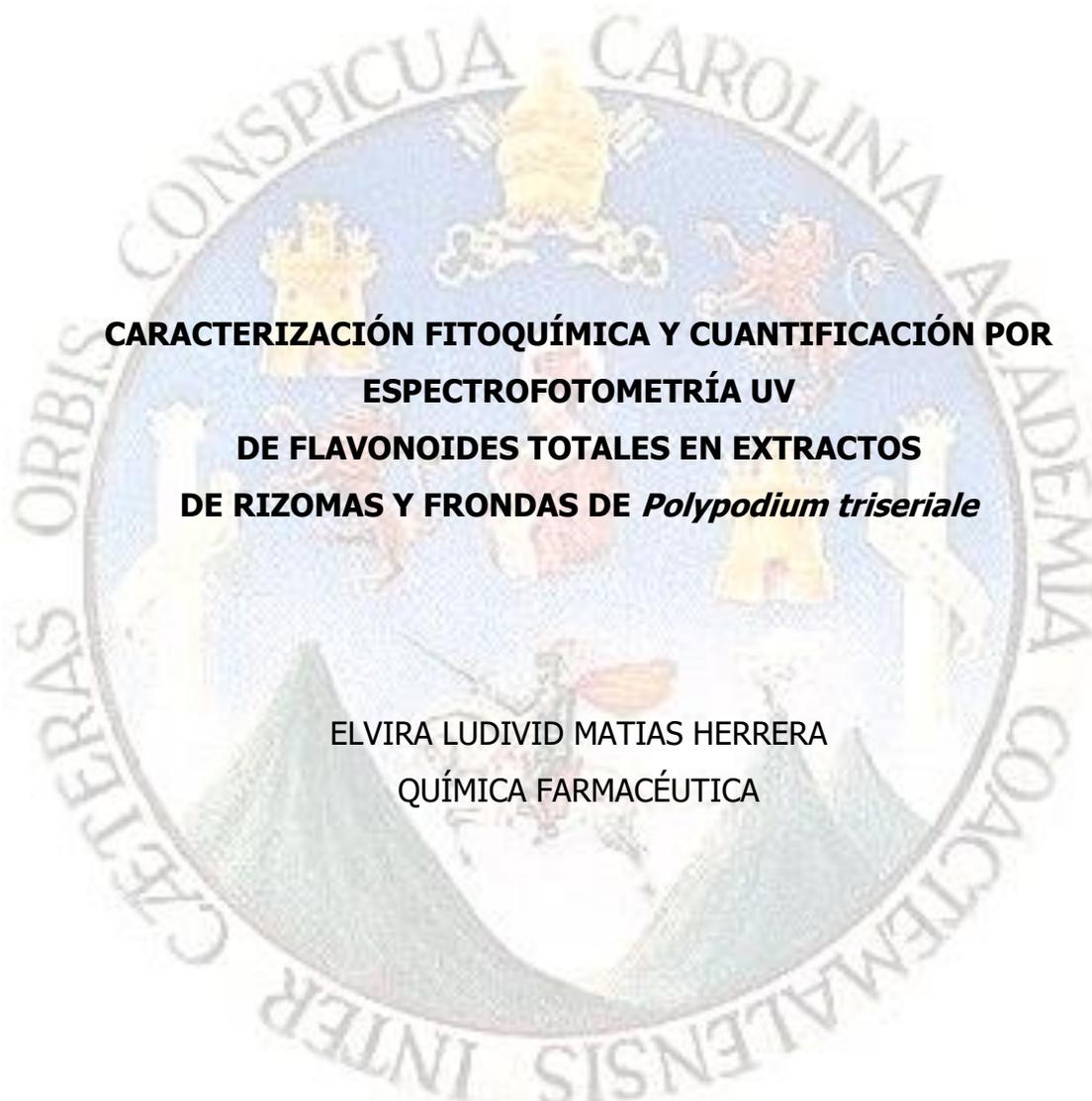


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

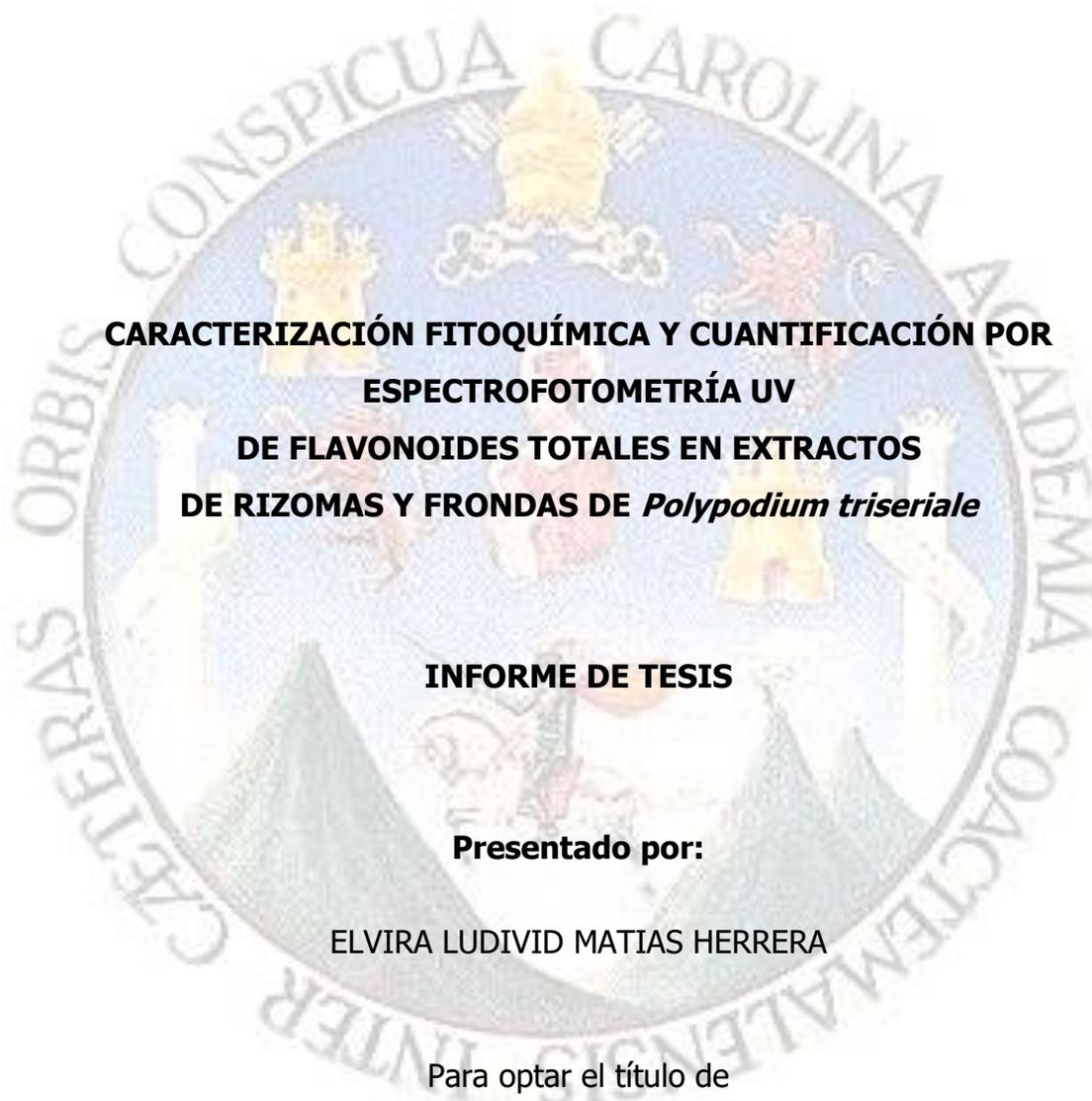


**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV
DE FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS
DE RIZOMAS Y FRONDAS DE *Polypodium triseriale***

ELVIRA LUDIVID MATIAS HERRERA
QUÍMICA FARMACÉUTICA

GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2008

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV
DE FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS
DE RIZOMAS Y FRONDAS DE *Polypodium triseriale***

INFORME DE TESIS

Presentado por:

ELVIRA LUDIVID MATIAS HERRERA

Para optar el título de

QUÍMICA FARMACÉUTICA

Guatemala, Octubre del 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

ÍNDICE

	No. Pagina
1. Resumen.....	01
2. Introducción.....	03
3. Antecedentes.....	04
4. Justificación.....	17
5. Objetivos.....	18
6. Materiales y Métodos.....	19
7. Resultados.....	31
8. Discusión de Resultados.....	37
9. Conclusiones.....	41
10.Recomendaciones.....	42
11.Referencias.....	43
12.Anexos.....	45

1. RESUMEN

Guatemala es un país con tierra fértil y clima apropiado para una gran variedad de plantas, los bosques con los que cuenta son unos de los principales hábitats en los que hay una gran variabilidad de ambientes y ecosistemas, y por ello el tipo de vegetación. Entre este tipo de vegetación se puede encontrar la familia Polypodiaceae, las cuales crecen en lugares húmedos y sombreados. Esta familia posee numerosas especies, conocidas con el nombre común de calahualas, con propiedades terapéuticas como antiinflamatorios y para mantener un buen riego sanguíneo, disminuyendo el colesterol.

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de caracterizar el perfil fitoquímico y determinar si existen diferencias fisicoquímicas y diferencias cuantitativas en el contenido de flavonoides totales en las frondas y rizomas de *Polypodium triseriale*, proveniente de los departamentos de Alta Verapaz y Petén. De esta manera se generó información fitoquímica de *P. triseriale*, perteneciente a las tres especies que conforman el complejo calahuala (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*), en los cuales se determinó que presentan los mismos metabolitos secundarios. Esto con el fin de brindar materia prima que pueda constituir una alternativa para el mejoramiento de la salud de la población guatemalteca.

Inicialmente se realizó la caracterización fitoquímica mediante un tamizaje fitoquímico utilizando ensayos macro, semimicro y técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) que evidenciaron la existencia de ciertos metabolitos en frondas y rizomas de los dos departamentos, siendo estos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, antocianinas, saponinas y principios activos amargos. Sin embargo el rizoma del departamento de Petén no presentó ninguna banda en la CCF.

A continuación se realizó un procedimiento de extracción por reflujo, con acetona y otros reactivos, partiendo nuevamente de droga vegetal seca; se obtuvieron las muestras para realizar la determinación espectrofotométrica de flavonoides totales, de acuerdo al procedimiento referido por la Farmacopea Brasileña.

Al realizar la cuantificación de flavonoides totales, se determinó que las frondas de *P. triseriale* presentaron un 1.71% +/- 0.5274 expresado como porcentaje de quercetina para la proveniente de Alta Verapaz y 2.01% +/- 0.0774 para la proveniente de Petén. A diferencia de los rizomas que presentaron 0.07% +/- 0.017 como porcentaje de quercetina para los dos departamentos.

Del estudio se evidenció que no existe diferencia cualitativa entre la composición química de *P. triseriale* de los dos departamentos de Guatemala, Alta Verapaz y Petén, y las otras dos especies pertenecientes al complejo calahuala (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*). Las tres especies presentan los mismos metabolitos según lo reportado por la literatura de las especies *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*.

Además se puede concluir que son las frondas de *P. triseriale* las que contienen una mayor presencia de flavonoides, por lo que si existe diferencia cuantitativa en el contenido de flavonoides totales en fronda y rizoma de *P. triseriale*.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país que posee gran variedad de flora, así como condiciones climáticas y agrícolas que favorecen el crecimiento de especies con distintas propiedades terapéuticas; esto representa una alternativa importante para el tratamiento curativo de diversas enfermedades, con el fin de proporcionar mejoría a la salud del ser humano.

La utilización de las plantas medicinales por el hombre se remonta al principio de su evolución, ya que la historia de la fitoterapia demuestra que el hombre trataba enfermedades por medio de las prácticas empíricas y de la observación. *Polypodium triseriale* (Calahuala) es una de estas plantas usadas popularmente. Pertenece al grupo de las Polipodiáceas, sin embargo en Guatemala no existen estudios sobre esta y es importante evaluar la composición química de sus frondas y rizomas que justifican las propiedades que se le atribuyen, como lo es con las demás especies.

La cuantificación de los flavonoides totales en *Polypodium triseriale* (Calahuala), como uno de los objetivos del estudio, tiene un papel muy importante en beneficio de la salud, debido a que a estos metabolitos se les atribuyen las propiedades de ser antiinflamatorios y muy útiles para mantener un buen riego sanguíneo, disminuyendo el colesterol⁽¹⁾.

En Guatemala el complejo calahuala posee tres especies (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*), de las cuales existen estudios únicamente de las primeras dos, las cuales han evidenciado la presencia de flavonoides. En este estudio se analizó la tercera especie de este complejo, *Polypodium triseriale*, mediante un tamizaje fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de extractos etanólicos de rizomas y frondas utilizando la espectrofotometría UV para poder establecer si las tres especies pertenecientes al complejo poseían los mismos componentes químicos y se determinó si la concentración de flavonoides totales en *P. triseriale* justifica su aplicación y posible actividad terapéutica.

3. ANTECEDENTES

3.1 Las Pteridofitas

Las Pteridofitas (*Pteris*=filicies, *phyta*=planta) son plantas que se han adaptado al medio terrestre, aunque de forma incompleta. Han desarrollado un tejido epidérmico con cutícula y estomas, lo que evita la desecación y controla el intercambio de gases. Presentan tejidos conductores que transportan agua, sales y sustancias elaboradas por la planta, lo que permite su distribución en zonas húmedas y umbrosas. El poseer dichos tejidos conductores, que actúan como tejidos de sostén, les permite elevarse incluso varios metros del suelo, con lo que pueden captar la luz con más facilidad que las briofitas. Sin embargo, como éstas últimas, necesitan el agua de lluvia o del rocío para reproducirse ⁽²⁾

(Ver Anexo No.1).

3.2 Los Helechos

Los helechos fueron los primeros vegetales que se adaptaron a vivir fuera del agua, colonizando los continentes. Durante la era Paleozoica, especialmente durante el período carbonífero, llegaron a constituir enormes bosques, con especies de hasta 30 metros de alto, cuyos restos han dado lugar a la mayoría de los yacimientos de carbón que ahora se explotan ⁽³⁾.

El nombre común "helecho" es utilizado para referirse a cualquiera de los miembros de los 3 grupos monofiléticos: Polypodiopsida, Marattiales y Ophioglossaceae, antiguamente agrupados en el taxón Pterophyta. Las características morfológicas más sobresalientes, que hicieron creer durante mucho tiempo que pertenecían a un mismo grupo monofilético dentro de las plantas vasculares sin semilla, son sus características hojas grandes ("megafilos" o "frondas"), usualmente pinnadas, con prefoliación circinada, es decir que las hojas se enrollan sobre sí mismas desde el ápice hacia la base^(ver anexo 2). Estas 3 líneas suelen agruparse en dos grupos, en base a la estructura y desarrollo de los esporangios:

Las marattiales y ofioglosáceas son llamadas en conjunto "helechos eusporangiados" (pero también son eusporangiados los equisetos y los psilotos), y los polypodiales son llamados "helechos leptosporangiados", que hoy en día luego de los análisis moleculares de ADN se determinó que forman un clado (grupo monofilético según la escuela cladista) ⁽⁴⁾.

A los helechos les gusta crecer en un entorno húmedo donde el sol sólo tiene la posibilidad de enviar luz filtrada al suelo. Es decir, en bosques donde también abunda toda clase de musgos en troncos vivos o muertos. Los helechos suelen crecer en bosques y allí el sol tiene pocas oportunidades. La estructura interna de las hojas de esta planta está totalmente adaptada a estas condiciones: el limbo foliar (parénquima) posee grandes espacios intercelulares; de ahí que la evaporación pueda ser tan abundante. Éste es el motivo por el que los helechos crecen generalmente en lugares muy húmedo ^(3,5).

3.3 Calahuala

3.3.1 Descripción Botánica de las tres especies pertenecientes al complejo calahuala:

- *Phlebodium pseudoaureum*

Es una especie perteneciente a la familia de las Polypodiaceae, de nombre científico *Phlebodium pseudoaureum* y comúnmente llamada Calahuala; es reconocida también por sus sinónimos: *Goniophlebium areolatum*; *Phlebodium aureum*; *Polypodium aureum*; *Polypodium areolatu* y *Polypodium areolatum* ⁽⁴⁾.

En Mesoamérica a *Phlebodium pseudoaureum* se le ha llamado *P. aureum*, sin embargo la primera es sólo conocida en Florida, Sudamérica, las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, ambas diploides, se han hibridizado dando origen a *P. aureum*, una tetraploide. También se señala que *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* (tratada como *P. aureum*) se ha entrecruzado en Honduras produciendo un

híbrido (posiblemente *P. dictyocallis*) con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 pequeños ⁽⁴⁾.

El rizoma es de 0.7-1.5 cm de ancho, generalmente farinoso, con escamas de 5-8 mm subenteras a moderadamente denticuladas, la harina blanca, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas; hojas monomorfas, pinnatisectas, a menudo glaucas en el envés articuladas al rizoma; con ápice atenuado, agudo o acuminado; pinnas de 10-33 x 1-3 cm, glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilagosos, enteros o casi enteros; nervaduras areoladas, las aréolas con o sin nérvulos incluidos; soros redondeados, sin parafisos, dispuestos en el ápice fusionado de 2 nérvulos incluidos, en 1-7 series entre la costa y el margen; esporas hialinas; $x = 37.4$ especies ⁽⁴⁾.

- *Phlebodium decumanum*

Es una especie perteneciente a la familia de las Polypodiaceae, es la única especie de phlebodium en Norteamérica, de nombre científico *Phlebodium decumanum*, *Polypodium leucotomos* y comúnmente llamada calahuala.⁽⁴⁾

Es una epífita helecho, nativo de regiones tropical y subtropicales de América. Está confinada en el este de los continentes, extendiéndose al norte en EE.UU., Florida, extremo sudeste de Georgia, sur del Caribe (Bahamas, Puerto Rico, Antillas Menores), y norte y este de Sudamérica a Paraguay.⁽⁴⁾

Es un helecho rizomatoso, con rizomas de 8-15 mm (raramente de 30 mm) de diámetro, densamente cubierto de escamas doradas pardas que le da a la especie su nombre. Las frondas son grandes y pinnatifidas (profundamente lobuladas), de 3-13 cm de largo y 1-5 cm de ancho, con más de 35 pinnas; variando en color de brillante verde a glauco y con márgenes ondulados. Varios soros redondos corren a lo largo de cada lado de las pinnas, y los diminutos esporos se dispersan anemófilamente (por el viento). Las frondas son siempre verdes en áreas lluviosas todo el año, ligeramente deciduas donde se marca una estación seca.⁽⁴⁾

Phlebodium aureum, se cree que ha surgido a través de la hibridación entre las siguientes *P. Pseudoaureum* y *P. Decumanum* (Willdenow) J. Smith, un amplio especies en la América tropical.⁽⁴⁾

- *Polypodium triseriale*

Es una especie perteneciente a la familia de las Polipodiáceas, de nombre científico *Polypodium triseriale* y comúnmente llamada Calahuala; es reconocida también por sus sinónimos: *Goniophlebium triseriale*, *Polypodium brasiliense*, *Polypodium neriifolium* y *Anglevein fern* ⁽⁴⁾.

Helecho epífita o rupícola con rizoma rastrero no pruinoso, 8-15mm de grueso, las escamas 4-6 X 2-3mm, lanceoladas u ovadas con el ápice acuminado, numerosas y densas, ligeramente patentes, subclatradas, anaranjadas, grisáceas o negruzcas con el borde más claro; filipodios 1-2 veces el ancho del rizoma; peciolo 0.4 – 0.9 veces el largo de la lámina, pajizo a pardo, sin alas; lámina 30-100 X 20-50 cm, 1-pinnada, anchamente oblonga, glabra, el ápice similar en forma a las pinnas laterales^(6,7).

3.3.2 Hábitat:

Crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde Florida, México y Centro hasta Sur América en alturas de 500-2,600 msnm³ ^(7, 8). En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa ^(8,9).

3.3.3 Condiciones Climáticas:

Las condiciones climáticas bajo las cuales se encuentra la calahuala (*P. triseriale*) se caracterizan por un clima templado, por época lluviosa no bien definida, alta nubosidad que favorece la precipitación horizontal a partir de una altitud de 800 hasta los 1200 msnm, estableciéndose las condiciones típicas de un bosque nuboso donde la precipitación

horizontal es mas frecuente en época seca, esta ultima condición se da en la posición noreste de las montañas ⁽¹⁰⁾.

La humedad relativa promedio requerida por la calahuala es de al menos el 80%, esta condición ambiental es la que presenta menor variación a lo largo del tiempo, esta característica de variación se relaciona con el hábito y las condiciones de bosque nuboso. La nubosidad atmosférica predominante tiene mayor influencia en la distribución húmeda ambiental como precipitación horizontal y no como condicionante de la luminosidad, ya que la calahuala requiere de condiciones particulares de cobertura de dosel para su establecimiento, crecimiento y desarrollo. La presencia de calahuala inicia a la altitud de 800 msnm y a partir de los 1000 msnm hasta los 1225 msnm, la presencia y abundancia de calahuala aumenta considerablemente en relación a los otros estratos altitudinales ⁽¹⁰⁾.

3.3.4 Propiedades Medicinales Atribuidas

Con el mismo nombre se designan varias especies de la familia Polypodiaceae que abundan en sitios húmedos y sombreados de los bosques de la región, en Guatemala la más común es *P. pseudoaureum* aunque medicinalmente se utilizan también las otras especies del complejo calahuala (*P. attenuatum* HBK, *P. decumanum* Willd. Y *P. triseriale* Sw.).

La infusión y decocción del rizoma se usan oralmente para tratar afecciones respiratorias y cardíacas, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre y afecciones genitourinarias ⁽¹⁾.

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores y psoriasis ^(1,11). La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias ⁽¹⁾.

Se le atribuye propiedad depurativa, diurética, desinflamante, espasmolítica, expectorante, febrífuga, inmunomoduladora, laxante, pectoral, purgante y sudorífica ^(1,11).

3.3.5 Farmacognosia de la *Polypodium triseriale*

La materia médica son los rizomas verdosos en estado fresco y café dorado cuando secos, son cilíndricos, tortuosos, escamas moreno ferruginosas, sin un olor especial; deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de las otras materias primas usadas para la elaboración de productos fitofarmacéuticos. Si bien es una planta que empieza a usarse en Europa, su uso aún no es oficial, por lo que no se encuentra en las farmacopeas. Existen productos fitofarmacéuticos del extracto crudo y purificado en forma de rizoma seco, polvo, comprimidos, tintura, extracto fluido, extracto seco y cápsulas ⁽¹²⁾.

3.4 Flavonoides

3.4.1 ¿Qué son los Flavonoides?

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo de los daños producidos por sustancias o elementos oxidantes como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y de sustancias nocivas presentes en los alimentos. Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Györgyi cuando en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina que regulaba la permeabilidad de las pequeñas arterias. A partir de allí se han identificado más de 5000 flavonoides, ampliamente distribuidos en plantas, frutas y verduras y en diversas bebidas como el vino, la cerveza el té negro y el verde.^(12,13).

El organismo humano no puede producir estas sustancias, por lo cual debemos obtenerlos de la alimentación o en forma de suplementos farmacológicos ^(12,13).

3.4.2 Estructura Química de los Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se ubican dentro del grupo de compuestos aromáticos y fenólicos, su estructura química se basa en el anillo flavona sustituido. Poseen dos anillos bencénicos (A y B) que están juntos por una unidad de tres

carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C₍₁₃₎.

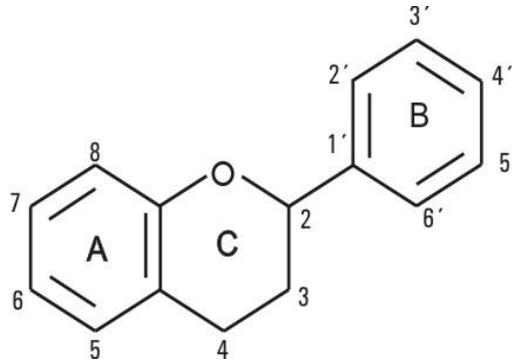


Figura No. 1 Estructura Básica de los Flavonoides⁽¹³⁾.

3.4.3 Clasificación de los Flavonoides

Se conocen unos 200 flavonoides naturales. Se encuentran distribuidos entre las plantas, tanto libres como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Los flavonoides presentan todos los matices de solubilidad, desde totalmente solubles en agua hasta insolubles en ella pero solubles en éter etílico (las agliconas muy eterificadas), pasando por los solubles en etanol (agliconas). Por regla general los flavonoides son insolubles en éter de petróleo, lo que permite desengrasar un material antes de extraerlos ⁽¹⁴⁾.

3.4.3.1 Clasificación de los flavonoides según la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

Pueden clasificarse, según su esqueleto y vía metabólica, en:

- ✓ Flavonoides, derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona) ⁽¹⁴⁾.

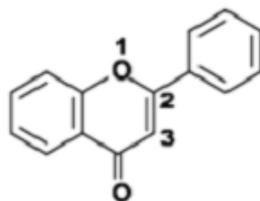


Figura No.2

Esqueleto de los Flavonoides

- ✓ Isoflavonoides, derivados de la estructura 3-

fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona) ⁽¹⁴⁾.

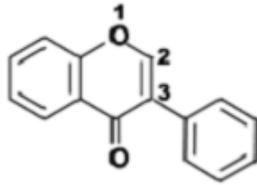


Figura No. 3

Esqueleto de los Isoflavonoides

- ✓ Neoflavonoides, derivados de la estructura 4-fenilcumarina (4-fenil-1,2-benzopirona)⁽¹⁴⁾.

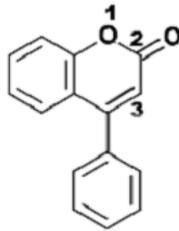


Figura No.4

Esqueleto de los Neoflavonoides

3.4.3.2 Clasificación de los flavonoides según su grupo funcional:

Dentro de los flavonoides, se reconocen 6 y quizás 7 clases principales, según los grupos funcionales que posean: ^(ver Anexo No.3)

1. Las chalconas están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen el desarrollo de colores en el espectro de lo visible y en el UV que atraen a insectos (mariposas y abejas) ⁽¹⁴⁾.
2. Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus spp.*); apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos, para lo cual se ha empleado la retama de los tintoreros (*Genista tinctoria*) ⁽¹⁴⁾.
3. Los flavonoles suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: quercetina, es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus sp.*); miricetina, presente en la uva; y

kaempferol, está presente en las inflorescencias y las protege de la luz ultravioleta. La fisetina es un flavonol que se extrae de la planta del género *Amphipterygium*⁽¹⁴⁾.

4. Hay tres flavandioles característicos: leucocianidina, presente en algunas plantas, como en el plátano, o en el muérdago criollo (*Ligaria cuneifolia*); leucopelargonidina, presente como tal en cierta concentración en la alfalfa de secano (*Medicago truncatula*); y leucodelphinidina, que es activa en el castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*)⁽¹⁴⁾.
5. Las antocianinas, son los pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolar de las células responsables de la mayoría de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas⁽¹⁴⁾.
6. Los taninos condensados son macromoléculas constituidas por unidades de flavonoides llamadas antocianidina. Los taninos están muy ampliamente distribuidos en las plantas como en el té, donde contribuyen al sabor astringente⁽¹⁴⁾.
7. Las auronas son responsables de la coloración de algunas plantas. A pesar de que se ha sugerido que estos compuestos están relacionados estrechamente con las chalconas, hay pocos indicios acerca de sus vías biosintéticas⁽¹⁴⁾.
8. Las flavanonas son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos. Las más importantes son naringenina, presente en el zumo de naranja, limón o pomelo, dándole un sabor amargo; liquiritigenina, presente en el regaliz; y eriodictiol, se presenta en el guisante actuando como quimioatrayente para interactuar con agrobacterias⁽¹⁴⁾.
9. Los dihidroflavonoles son los precursores directos de flavandioles y flavonoles, pero también tienen cierta actividad como tales en algunas plantas. Hay tres importantes: dihidromiricetina, presente en las partes aéreas de los brezos (*Erica spp.*), dihidroquercetina, en las uvas blancas o en la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia*); y dihidrokaempferol⁽¹⁴⁾.

3.4.4 Actividad biológica de los flavonoides

Propiedades: Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones, están la de los glicósidos de dihidrochalconas como edulcorantes, de rotenona como insecticida, etc ⁽¹⁵⁾.

Acción Farmacológica: Es extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género *Citrus*: rutina y derivados), dilatadores de las coronarias (proantocianinas de *Crataegus*, *Arnica* y *Gingko*), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatotóxica (silimarina de *Silybum*), colerética, estrógena y diurética. Destaca asimismo la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas, como las de algunas especies de *Lupinus* ⁽¹⁵⁾.

3.5 Tamizaje Fitoquímico

El Tamizaje (screening) fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo⁽¹⁶⁾.

3.6 Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc)

distribuido sobre una placa de vidrio o aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluente migra por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla. Después que ha ocurrido, se evapora el eluente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada⁽¹⁶⁾.

El Rf: *Factor de retención*, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado.

$$\text{Rf: } \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

3.7 Métodos Espectroscópicos De Análisis

Los métodos de análisis que se basan en la medición de la luz y otras formas de radiación electromagnética son los que más se utilizan en la química analítica. La *espectroscopia* es una ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia. Los métodos espectroscópicos de análisis miden la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan. Estos métodos también se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que se utiliza para hacer la medición. Estas regiones incluyen los rayos γ , X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), las microondas y radiofrecuencias (RF) ⁽¹⁷⁾.

3.7.1 Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un

espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma ⁽¹⁷⁾.

3.7.1.1 Absorción de la Luz

En espectroscopia el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm) ⁽¹⁷⁾.

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores -como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio ⁽¹⁷⁾.

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm ⁽¹⁷⁾.

Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia frecuencia característica de la radiación electromagnética. Este proceso transfiere energía a la molécula y provoca una disminución en la intensidad de la radiación electromagnética incidente. Por consiguiente, la absorción de la radiación atenúa el rayo incidente de acuerdo con la Ley de Lambert y Beer⁽¹⁷⁾.

3.7.1.2 La Ley de la Absorción

La ley de la absorción, también conocida como Ley de Lambert y Beer, o simplemente Ley de Beer, da información cuantitativa de cómo es que la atenuación de la radiación depende de la concentración de las moléculas que la absorben y de la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente. Cuando la luz atraviesa una solución de analito, la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del analito. Cuanto mayor sea la trayectoria del rayo en la solución de analito de una concentración dada, habrá más especies que absorban la radiación y la atenuación será mayor ⁽¹⁷⁾.

La *transmitancia* T de la solución, es la fracción de radiación incidente que transmite la solución y la *absorbancia* A de una solución está relacionada con la transmitancia en forma logarítmica, pues el aumento de la absorbancia de una solución se acompaña de una disminución en la transmitancia. Los primeros instrumentos venían equipados con escalas lineales de transmitancia; los instrumentos modernos traen escalas lineales de absorbancia y algunos tienen una computadora que calcula la absorbancia a partir de mediciones ⁽¹⁷⁾.

3.7.1.3 Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible y ultravioleta: espectrofotómetro UV-visible

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros^(Ver Anexo No.4). Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan de:

1. Una fuente estable de energía radiante
2. Un selector de longitud de onda que aísla un región limitada del espectro para hacer la medición
3. Uno o más recipientes para la muestra
4. Un detector de radiación, que convierte la energía radiante en una señal eléctrica que puede medirse
5. Un sistema que procesa y lee la señal que consta, actualmente, de una computadora⁽¹⁷⁾.

4. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la población guatemalteca, recurre al uso de plantas a las que popularmente se les atribuyen propiedades curativas para el tratamiento de dolencias o enfermedades, el uso de estas plantas se debe principalmente al bajo costo, la alta accesibilidad que poseen, así como las propiedades populares atribuidas, tal es el caso de la calahuala.

Esta planta se encuentra dentro de la diversidad de flora que posee Guatemala. *Polypodium triseriale*, esta incluida con otras dos especies (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*) en el complejo conocido como calahuala, las tres pertenecientes al grupo de las Polipodiáceas. Este complejo se utiliza popularmente como antiinflamatorios y para mantener un buen riego sanguíneo disminuyendo el colesterol.

La evaluación para la comparación de los componentes químicos de las dos diferentes partes de la planta seleccionada en la realización de los extractos se justifica debido a que es de gran interés determinar si los componentes, concentración y tipos de metabolitos presentes en los extractos obtenidos de la raíz de la calahuala (*Polypodium triseriale*) son iguales o diferentes en relación con los obtenidos de la fronda de la calahuala (*P. triseriale*) sin variar la metodología utilizada para la preparación de los extractos.

El análisis de la tercera especie de este complejo, *Polypodium triseriale* es de gran importancia para poder establecer si poseen el mismo componente químico las tres especies y confirmar sus particularidades medicinales especificando qué parte de la planta contiene mayor cantidad de estos metabolitos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar fitoquímicamente y cuantificar flavonoides totales por medio de espectrofotometría UV, en el extracto etanólico de rizoma y fronda de *P. triseriale*.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Caracterizar mediante tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios presentes en las especie *P. triseriale* del complejo calahuala.
- 5.2.2 Cuantificar los flavonoides totales presentes en rizoma y fronda de *P. triseriale*.
- 5.2.3 Determinar si los metabolitos secundarios presentes en *P. triseriale* son los mismos que se encuentran en las otras dos especies pertenecientes al complejo calahuala (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Universo de trabajo:

Se seleccionará el rizoma y la fronda de *P. triseriale*, la cual se colectó de poblaciones silvestres, bajo manejo e identificación de un botánico especialista de FAUSAC (Ing. Vicente Martínez).

6.2 Población:

Fronas y Rizomas de *P. triseriale* silvestre de Alta Verapaz y Petén.

6.3 Muestra:

Una Fronda y Rizoma de *P. triseriale* silvestre de Alta Verapaz y Petén.

6.4 Unidad Experimental:

Extractos etanólicos de rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala).

6.5 Diseño de Estudio:

6.5.1 Tipo de estudio: Descriptivo.

6.5.2 Diseño del muestreo: Muestreo *por conveniencia*.

6.5.3 Análisis de Resultados: El análisis de los datos se hará de forma descriptiva. Se hará una replica por triplicado de la fronda y rizoma de la calahuala (*Polypodium triseriale*) para determinar la concentración y tipos de metabolitos presentes en estas mediante un análisis de la media y desviación estándar.

Los resultados obtenidos se compararán con estudios previos elaborados para las otras dos especies pertenecientes al complejo (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*), determinando de este modo si los metabolitos presentes en las tres especies son los mismos.

6.6 Recursos:

6.6.1 Humanos:

6.6.1.1 Autora:

Br. Elvira Ludivid Matías Herrera

6.6.1.2 Asesora:

Licda. Sully Cruz

6.6.1.3 Revisora:

Licda. Beatriz Eugenia Medinilla Aldana

6.6.2 Institucionales:

- Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- Laboratorio de Productos Naturales (LIPRONAT)
- Facultad de Agronomía (Colección de especies de calahuala)

6.7 Materiales y Equipo:

6.7.1 Equipo:

- Tamiz
- Percolador de acero inoxidable
- Evaporador rotatorio BÜCHI
- Bomba de vacío BÜCHI
- Balón para evaporador rotatorio de 500ml con boquilla No. 29/32
- Balanza analítica digital DENVER
- Balanza semianalítica digital DENVER
- Campana de extracción de gases marca LABCONCO
- Espectrofotómetro UV-visible
- Desecadora
- Lámpara de luz ultravioleta de ondas corta y larga
- Manta Eléctrica
- Reflujo
- Estufa
- Termómetro
- Manguera de vacío
- Embudo
- Cámara Cromatográfica
- Cromatofolios de silicagel 60 F₂₅₄

- Micropipetas de 5 μ L
- Atomizadores para cromatografía en capa fina
- Refrigeradora
- Papel filtro Whatman No. 1
- Balones aforados de 100 y 50ml
- Baño de Maria
- Cristalería y material de laboratorio en general

6.7.2 Reactivos:

- Reactivos cromógenos diversos.
- Estándares para cromatografía y espectrofotometría UV-VIS.
- Disolventes para extracciones, cromatografía en capa fina y análisis en espectrofotometría UV-VIS.

6.8 Métodos:

6.8.1 Selección de Material:

Seleccionar y cosechar material sano de rizoma y fronda de *P. triseriale*, obtenido de la colección de calahualas de FAUSAC.

6.8.2 Secado y Almacenamiento:

Colocar la planta en bandejas con papel Kraft y ponerlas en horno de convección de aire forzado, remover la planta cada cierto tiempo, la humedad de almacenamiento no debe ser mayor de 10% para rizomas y no mayor de 12% las frondas. Guardar en bolsa plástica e identificar las bolsas adecuadamente ⁽¹⁸⁾

6.8.3 Cortado:

Cortar con tijeras el rizoma en partes pequeñas aproximadamente de 1 cm de largo y colocar el material en una bolsa plástica debidamente identificada⁽¹⁸⁾.

6.8.4 Tamizado:

Pasar las frondas secas por el tamiz No. 5. Y colocar el material vegetal en una bolsa plástica debidamente identificada.

6.8.5 Percolación:

En percolador previamente preparado con algodón y papel filtro colocar la planta cortada y tamizada, agregar el solvente extractor, en este caso etanol al 50%, dejar por encima de la planta y dejar reposar por el tiempo necesario (24 horas) ⁽¹⁸⁾.

6.8.6 Preparación del extracto:

Se concentrará en rotavapor hasta obtención del extracto.

6.9 Tamizaje Fitoquímico A Través De Ensayo Macro y Semimicro⁽¹⁹⁾:

Se realizan ensayos macro y semimicro en los que se evalúa la formación de precipitado y complejos coloreados. Se utilizan técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) convencionales para la caracterización fitoquímica.

6.9.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Pesar 1g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego añadir 25mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's. (Color blanco a crema).

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff. (Color rojo a naranja).

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner. (Color marrón).

Tubo 4: testigo.

Usar como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Preparación de Reactivos:

Mayer's (yoduro de mercurio y potasio)

- a. 1.36g de HgCl_2 / 60mL H_2O
- b. 5g KI / 10mL H_2O
- c. Mezclar y diluir a 100mL.

Dragendorff (yoduro de bismuto y potasio)

- a. 8g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 20mL HNO_3
- b. 27.2g KI / 50mL H_2O
- c. Mezclar, reposar, decantar sobrenadante. Diluir a 100mL.

Wagner (yodo-yoduro de potasio)

- a. 1.27 g I_2 + 2 g KI / 5mL H_2O
- b. Diluir a 100mL.

Cromatografía en capa fina: Pesar 1g de material vegetal seco y molido, agregar 1mL de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y extraer con 5mL de metanol. Colocar en baño maría a 60°C durante 5 minutos. Filtrar y concentrar. Aplicar en una placa de sílica gel 60 F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo- dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3)

Detección:

- ✓ Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365nm algunos fluorescen azul o amarillo.
- ✓ Reactivo de Dragendorff: zonas cafés o naranjas en visible, los colores no son estables.

6.9.2 Investigación de saponinas:

Test de espuma:

Tubo 1: 100mg de material vegetal pulverizado y seco.

Tubo 2: 2mL de control de saponinas (0.5 %).

Tubo 3: 2mL de agua.

A cada tubo se le adiciona 10mL de agua destilada. Calentar en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos, observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas.

Cromatografía en capa fina: 2g de material vegetal seco, se extraen con 10mL de etanol al 70% con reflujo por 10 minutos. Evaporar a 5mL y proceder a aplicar 25-40µL en una cromatoplaqueta de silicagel 60 F₂₅₄. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10), n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40).

Detección:

- ✓ Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.
- ✓ (Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides).
- ✓ (Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas).

6.9.3 Investigación de taninos:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 10g de material vegetal pulverizado con 30mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y evaporar a sequedad. Añadir 25mL de agua caliente al residuo y agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y filtrar. Adicionar 3mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Detección:

- ✓ Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.
- ✓ Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol.

6.9.4 Investigación de flavonoides y antocianinas:

Ensayos macro y semimicro: Extraer 3g de material vegetal pulverizado con 10mL de etanol o metanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar. Enfriar a temperatura ambiente y triturar el residuo con 15mL de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30mL de metanol al 80 por ciento, filtrar y dividir en 5 tubos:

Tubo 1: agregar 0.5mL de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: agregar 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: agregar 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: agregar magnesio metálico y 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: agregar un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: agregar solución de ácido bórico en anhídrido acético.

Tubo 7: testigo.

Detección:

- ✓ Evaluar las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.
- ✓ Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Cromatografía en capa fina: Extraer 1g de material vegetal seco pulverizado con 10mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Filtrar la solución y aplicar sobre las

cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10)

Detección:

- ✓ Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.
- ✓ Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Fluorescencia intensa en UV-365nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas.

6.9.5 Investigación de antraquinonas:

Prueba de Bornträger: Extraer 3g de material vegetal pulverizado con 10mL de etanol al 80 por ciento, filtrar y concentrar en baño de maría (60°C). Disolver el residuo con 30mL de agua destilada y filtrar. Extraer con 10mL de benceno. A la fase bencénica añadir 5mL de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Prueba de Bortränger modificado: Calentar 0.3g de material vegetal pulverizado con 10mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1mL de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento y calentar 10 minutos en baño de maría a 60°C. Añadir 10 gotas de ácido acético glacial para acidificar. Extraer con 10mL de benceno. A la capa bencénica adicionar 5mL de solución de prueba de amonio y agitar. Observar cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo).

Cromatografía en capa fina: Extraer 0.5g de material vegetal seco pulverizado con 5mL de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Filtrar y aplicar 10µL en la cromatoplasma de silicagel 60 F₂₅₄.

Estándar: solución al 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas (10 μ L). (Aloína, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto de sen)

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:17:13), acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección:

- ✓ Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.
- ✓ Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento.
- ✓ Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm.
- ✓ Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm.

6.9.6 Investigación de cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: Medir 5 mL de extracto vegetal metanólico. Agregar 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha agregar 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N, observar bajo luz UV de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

6.9.7 Investigación de principios amargos:

Cromatografía en capa fina: Calentar 1g de material vegetal con 10mL de metanol en baño de María a 60°C por 10 minutos. Evaporar y filtrar a 2mL. Aplicar en la cromatopla. Estándar: artemisina al 1 por ciento en metanol (20 μ L).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5).

Detección:

- ✓ Vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafés-rojas, azules-verdes.
- ✓ (Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365nm: gris, café; VIS: café oscuro, gris).

6.10 Cuantificación de flavonoides totales:

Según Farmacopea Brasileña: ⁽²⁴⁾

Preparación de la solución de ácido acético en Metanol (5%)

Añadir 5 ml de ácido acético a 100ml de metanol.

Preparación de la solución de cloruro de aluminio SR (2%)

Disolver 2 g de cloruro de aluminio en 100 ml de una solución de ácido acético en metanol.

Preparación de la solución acuosa de metenamina (0.5%)

Pesar 5 g de metenamina y disolver en 1 litro de agua.

Preparación de la solución madre

- ✓ Pesar exactamente 0.4 g de droga pulverizada (800µm)
- ✓ Colocar la muestra en un balón de fondo redondo de 100 ml para reflujo.
- ✓ Añadir 1 ml de solución acuosa de metenamina SR, 20 ml de acetona y 2 ml de ácido clorhídrico.
- ✓ Calentar en baño maría, bajo reflujo durante 30 minutos.
- ✓ Filtrar la mezcla con algodón en baño volumétrico de 100 ml.
- ✓ Regresar el residuo de la droga y el algodón al balón de fondo redondo y adicionar 20 ml de acetona.
- ✓ Calentar hasta ebullición bajo reflujo durante 10 minutos, filtrar con algodón en el balón de fondo redondo para reflujo y adicionar 20 ml de acetona.
- ✓ Calentar nuevamente bajo reflujo por 10 minutos.
- ✓ Filtrar de nuevo recibiendo el filtrado en el mismo balón volumétrico de 100 ml (junto con los demás filtrados).
- ✓ Llevar estos filtrados a temperatura ambiente y ajustar el volumen hasta 100 ml con acetona (solución A).
- ✓ En una ampolla de decantación tratar 20 ml de la solución A con 20 ml de agua y extraer con 15 ml de acetato de etilo.
- ✓ Extraer 3 veces más con porciones 10 ml de acetato de etilo.
- ✓ Reunir las porciones de acetato de etilo y lavarlas con 2 porciones de 50 ml de agua fría.

- ✓ Transferir las porciones de acetato de etilo a un balón aforado de 50 ml y llevar hasta el volumen con acetato de etilo.

Preparación de la Muestra:

- ✓ Transferir 10 ml de la solución madre a un balón aforado de 25 ml.
- ✓ Adicionar 1 ml de reactivo de cloruro de aluminio SR y completar el volumen con solución metanólica de ácido acético.

Preparación de Solución Blanco:

Transferir 10 ml de acetato de etilo en un balón aforado de 25 ml y llevar a volumen con una solución metanólica de ácido acético.

Procedimiento:

Medir la absorbancia de la solución muestra a 425 nm 30 minutos después de su preparación, utilizando la solución blanco para ajuste de cero. Calcular el contenido de flavonoides totales, según la ecuación:

$$Q = \frac{A * 62500}{500 * m * (100 - Pd)}$$

Donde:

Q = Flavonoides totales, expresados como quercetina (%)

A = Absorbancia de la solución muestra

m = Peso de la droga vegetal

Pd = Porcentaje de humedad (%)

7. RESULTADOS

7.1 Secado de muestras y contenido de humedad

TABLA No.1 Porcentaje de humedad residual de frondas y rizomas después de su tratamiento en el secador; medido con la balanza de humedad. (Ver Anexo No.4, Fig.

No.2)

Muestra	Humedad en Rizoma	Humedad en Fronda
<i>Polypodium triseriale</i> (Alta Verapaz)	7.86%	12.18%
<i>Polypodium triseriale</i> (Petén)	6.65%	11.86%

7.2 Tamizaje fitoquímico

7.2.1 Alcaloides en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.1.1 Ensayo Macro y semimicro:

En la prueba de alcaloides se observó una leve turbidez que con el tiempo se fue minimizando en los cuatro extractos analizados (frondas y rizomas de los departamentos de Alta Verapaz y Petén), por lo que las muestras dieron negativo para la prueba preliminar, sin embargo en el cromatograma se detectaron dos alcaloides en las frondas de Alta Verapaz y dos en las frondas de Petén.

TABLA No.2 Prueba de Alcaloides en *Polypodium triseriale* (Ver Anexo No.4, Fig. No.3 y No.4)

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación			Rf determinado en Cromatografía en capa fina	Existencia de alcaloides dentro de su composición
	Mayer´s	Dragendorff	Wagner		
Fronda de Alta Verapaz	Negativo	Negativo	Negativo	0.14; 0.40	Sí hay alcaloides presentes
Rizoma de Alta Verapaz	Negativo	Negativo	Negativo	No se observó ninguna banda	No hay alcaloides presentes
Fronda de Petén	Negativo	Negativo	Negativo	0.37; 0.47	Sí hay alcaloides presentes
Rizoma de Petén	Negativo	Negativo	Negativo	No se observó	No hay alcaloides

				ninguna banda	presentes
--	--	--	--	---------------	-----------

Negativo: No se observo cambio de coloración y/o formación de precipitado.

7.2.2 Taninos en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.2.1 Ensayo Macro y semimicro:

En la prueba de taninos existió un tenue cambio de coloración pero no se formó precipitado, por lo que las muestras dieron negativo para esta prueba. (Ver Anexo No.4, Fig. No. 5)

TABLA No.3 Prueba de Taninos en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación		
	Gelatina al 1 %	Gelatina-sal (1%, 10 %)	Cloruro férrico al 10 %
Fronda de Alta Verapaz	Negativo	Negativo	Negativo
Rizoma de Alta Verapaz	Negativo	Negativo	Negativo
Fronda de Petén	Negativo	Negativo	Negativo
Rizoma de Petén	Negativo	Negativo	Negativo

Negativo: No se observo cambio de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

7.2.3 Flavonoides y Antocianinas en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.3.1 Ensayo Semimicro y flavonoides detectados por cromatografía en capa fina

(Ver Anexo No.4, Fig. No.6 y No.7)

TABLA No.4 Prueba de Flavonoides y Antocianinas en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Rf determinado en Cromatografía en capa fina	Posibles Flavonoides dentro de su composición
Fronda de Alta Verapaz	Positivo	0.19; 0.70; 0.92	Hiperósido; Acido Clorogénico; Rutina
Rizoma de Alta Verapaz	Positivo	No se observó ninguna banda	No hay flavonoides presentes
Fronda de Petén	Positivo	0.20; 0.58; 0.65; 0.71; 0.89	Hiperósido; Acido Clorogénico; Quercetina; Rutina
Rizoma de Petén	Positivo	No se observó ninguna banda	No hay flavonoides presentes

Positivo: Existió cambio de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

7.2.4 Antraquinonas en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.4.1 Ensayo Macro y semimicro (Ver Anexo No.4, Fig. No.8)

TABLA No.5 Prueba de Antraquinonas en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Rf determinado en Cromatografía en capa fina
Fronda de Alta Verapaz	Negativo	No se observó ninguna banda, únicamente la del estándar (Hojas de sen)
Rizoma de Alta Verapaz	Negativo	
Fronda de Petén	Negativo	
Rizoma de Petén	Negativo	

Negativo: No se observó cambio de coloración en fase alcalina, no hubo coloración roja o rosada.

7.2.5 Cumarinas en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.5.1 Ensayo Macro y semimicro (Ver Anexo No.4, Fig. No.9)

TABLA No.6 Prueba de Cumarinas en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Color de Fluorescencia
Fronda de Alta Verapaz	Positivo	Verde claro
Rizoma de Alta Verapaz	Positivo	Ligeramente Celeste
Fronda de Petén	Positivo	Verde claro
Rizoma de Petén	Positivo	Ligeramente Celeste

Positivo: Se observó fluorescencia azul o verde al observar bajo luz UV de 365nm

7.2.6 Saponinas en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.6.1 Ensayo semimicro y saponinas detectadas por cromatografía en capa fina.

En la identificación semimicro de saponinas, los extractos de las frondas de *P. triseriale* presentaron abundante espuma que permaneció por lo menos después de 1 hora. Capa de espuma de 1.5 cm para fronda de Alta Verapaz y 1.3 cm para fronda de Petén. (Ver Anexo

No.4, Fig. No. 10 y No.11)

TABLA No.7 Prueba de Saponinas en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Rf determinado en Cromatografía en capa fina	Existencia de Saponinas dentro de su composición
Fronda de Alta Verapaz	Positivo	0.18; 0.81; 0.95	Sí hay saponinas presentes
Rizoma de Alta Verapaz	Negativo	0.20; 0.95	Sí hay saponinas presentes
Fronda de Petén	Positivo	0.18; 0.36; 0.59; 0.80; 0.95	Sí hay saponinas presentes
Rizoma de Petén	Negativo	0.20; 0.95	Sí hay saponinas presentes

7.2.7 Principios Amargos en fronda y rizoma de *Polypodium triseriale*:

7.2.7.1 Principios amargos detectados por cromatografía en capa fina. (Ver Anexo No.4,

Fig. No.12)

TABLA No.8 Prueba de Principios Amargos en *Polypodium triseriale*

Muestra de <i>Polypodium triseriale</i>	Rf determinado en Cromatografía en capa fina	Principios Amargos dentro de su composición
Fronda de Alta Verapaz	0.05; 0.29; 0.39; 0.51; 0.57; 0.63; 0.69; 0.99	Sí hay principios amargos presentes
Rizoma de Alta Verapaz	0.10	Sí hay principios amargos presentes
Fronda de Petén	0.04; 0.27; 0.37; 0.43; 0.47; 0.54; 0.62; 0.69; 0.78; 0.99	Sí hay principios amargos presentes
Rizoma de Petén	No se detectó ninguna banda	No hay Principios amargos presentes

7.2.7 Metabolitos presentes en las especies pertenecientes al complejo calahuala
(*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*):

TABLA No. 9 Comparación de metabolitos presentes las tres especies pertenecientes al complejo calahuala:

		METABOLITOS SECUNDARIOS EVALUADOS						
Especie del complejo calahuala		Alcaloides	Taninos	Flavonoides y Antocianinas	Antraquinonas	Cumarinas	Saponinas	Principi amargo
experimentalmente en el estudio	<i>P. pseudoaureum</i> ^{19,23}	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<i>P. decumanum</i> ^{19,23}	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<i>P. triseriale</i> (rizoma)	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	<i>P. triseriale</i> (fronda)	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

7.3 Cuantificación de flavonoides

Una vez obtenidas las muestras de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 6.7, se procedió a hacer las lecturas, iniciando por el blanco para calibrar al aparato a cero y concluyendo con las muestras.

Las tablas No.10, No.11, No.12 y No.13 reúnen los elementos necesarios para obtener el contenido total de flavonoides y presenta los resultados, luego de haber sido aplicada la ecuación correspondiente.

TABLA No.9 Porcentaje de flavonoides totales en fronda de *Polypodium triseriale* expresados como quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo. (región de Alta Verapaz)

Muestra	Tipo	Región de especie <i>Polypodium triseriale</i>	Absorbancia	Muestra de corrección	Peso de la Muestra	% de Humedad
A	Fronda	Alta Verapaz	0.9519	0.3991	0.4017	12.78
B	Fronda	Alta Verapaz	0.9322	0.6146	0.4126	12.78
C	Fronda	Alta Verapaz	1.0146	0.4288	0.4084	12.78

Media de Flavonoides totales expresados como quercetina (%) = 1.7104% +/- 0.5274

TABLA No.10 Porcentaje de flavonoides totales en fronda de *Polypodium triseriale*, expresados como quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo. (región Petén)

Muestra	Tipo	Región de especie <i>Polypodium triseriale</i>	Absorbancia	Muestra de corrección	Peso de la Muestra	% de Humedad
A	Fronda	Petén	0.9591	0.4122	0.4037	11.86
B	Fronda	Petén	1.0792	0.4885	0.4106	11.86
C	Fronda	Petén	1.0169	0.4302	0.4026	11.86

Media de Flavonoides totales expresados como quercetina (%) = 2.0095% +/- 0.0774

TABLA No.11 Porcentaje de flavonoides totales en rizoma de *Polypodium triseriale* expresados como quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo. (región Alta Verapaz)

Muestra	Tipo	Región de especie <i>Polypodium triseriale</i>	Absorbancia	Muestra de corrección	Peso de la Muestra	% de Humedad
A	Rizoma	Alta Verapaz	0.0471	0.0310	0.4027	7.86
B	Rizoma	Alta Verapaz	0.0482	0.0294	0.4100	7.86
C	Rizoma	Alta Verapaz	0.0357	0.0094	0.4058	7.86

Media de Flavonoides totales expresados como quercetina (%) = 0.0682%

+/- 0.0176

TABLA No.12 Porcentaje de flavonoides totales en rizoma de *Polypodium triseriale* expresados como quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo. (región Petén)

Muestra	Tipo	Región de especie <i>Polypodium triseriale</i>	Absorbancia	Muestra de corrección	Peso de la Muestra	% de Humedad
A	Rizoma	Petén	0.0350	0.0154	0.4141	6.65
B	Rizoma	Petén	0.0425	0.0235	0.4014	6.65
C	Rizoma	Petén	0.0488	0.0211	0.3989	6.65

Media de Flavonoides totales expresados como quercetina (%) = 0.0731% +/- 0.0171

8. DISCUSION DE RESULTADOS

En la presente investigación se realizó la caracterización fitoquímica de los extractos de frondas y rizomas de *Polypodium triseriale* (calahuala) a nivel de laboratorio, para determinar si hay o no diferencia en la composición química de la *P. triseriale* proveniente de dos departamentos de Guatemala (Alta Verapaz y Petén), así como también se realizó la cuantificación por espectrofotometría UV de flavonoides totales presentes en dichos extractos para establecer si las tres especies del complejo calahuala (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*) poseen estos metabolitos secundarios que son los responsables de la actividad biológica atribuida a la planta. El material se obtuvo de dos departamentos de Guatemala, siendo éstos Alta Verapaz y Petén, estos departamentos poseen el suelo característico para el crecimiento de este helecho.^(1,3)

El análisis de la humedad de la materia prima muestra no solo el contenido de agua, sino de toda materia volátil que se elimina por calentamiento, esto conduce a la pérdida de peso de la muestra. En la tabla No. 1 se muestran los resultados de contenido de humedad de las frondas y rizomas de *P. triseriale*, en las cuales se observa que fueron las frondas las que presentaron mayor porcentaje de humedad para los dos departamentos estudiados. Este dato es de utilidad para los procesos siguientes, especialmente para la cuantificación del contenido total de flavonoides.

Como se puede observar en la tabla No.2, las frondas y rizomas de *P. triseriale* reportaron resultados negativos en los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para alcaloides, sin embargo al realizar la cromatoplaque en capa fina, prueba más sensible para detección de metabolitos, se evidenció la presencia de dos alcaloides para las frondas de los dos departamentos. Este resultado coincide con lo reportado para las otras dos especies del complejo calahuala (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*).⁽¹⁹⁾

En la tabla No.3 se puede observar que tanto las frondas como los rizomas de la *P. triseriale* de los departamentos de Alta Verapaz y Petén, no presentaron taninos dentro de su composición, tras el análisis macro y semimicro de coloración y precipitación, lo cual no

coincide con las otras dos especies del complejo (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*) según lo reportado por la literatura.

La tabla No.4 muestra los resultados del análisis macro y semimicro para la detección de flavonoides y antocianinas en *P. triseriale*, los cuales fueron positivos en frondas y rizomas de los dos departamentos en estudio. Estos resultados se confirmaron en la cromatografía en capa fina que se realizó, donde se observó que únicamente las frondas de los departamentos en estudio, Alta Verapaz y Petén, presentaban bandas características para los estándares de flavonoides: rutina, hiperósido, ácido clorogénico, y quercetina. Los rizomas de ambas regiones no presentaron ninguna banda en la cromatografía en capa fina. Los resultados que presentaron las frondas de *P. triseriale* de los dos departamentos en estudio, Alta Verapaz y Petén, coincidieron con lo que se ha publicado anteriormente para las especies *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*.^(19,23)

La importancia de dichos resultados refiere a los flavonoides identificados en las frondas de *P. triseriale*, perteneciente al complejo calahuala (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*), ya que justifican las propiedades medicinales atribuidas.

La literatura reporta para los flavonoides que el ácido clorogénico ha sido referido por Stommel y Whitaker en el año 2,003⁽²⁰⁾, como uno de los agentes secuestradores de radicales libres más potentes con propiedades, antimutagénica, antimicrobiales, antivirales y reductores del colesterol LDL. Muy importante también la rutina, entre cuyas actividades, destacan las descritas por Mozobuchi et al. en 1,969⁽²¹⁾, relacionadas con la prevención de la hipertensión e infartos. Y por su parte, el hiperósido, a sido reportado por Zhiyong Liu, et al. en el año 2005⁽²²⁾ como un efectivo antioxidante en células cerebrales. Estos datos son importantes debido a que en este estudio se determinó la presencia de estos tres tipos de flavonoides en las frondas de *P. triseriale* de los dos departamentos, Alta Verapaz y Petén.

En la tabla No.5 se muestra que según los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para la determinación de antraquinonas en frondas y rizomas de *P. triseriale* de los dos departamentos en estudio, los resultados fueron negativos al realizar la prueba

de Bornträger, y esto pudo ser confirmado al realizar la cromatografía en capa fina y no observarse ninguna banda. Este resultado coincide con lo reportado en la literatura para las otras dos especies pertenecientes al complejo calahuala (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*).⁽¹⁹⁾

La tabla No.6 muestra que las frondas y los rizomas de *P. triseriale* de las regiones de Alta Verapaz y Petén reportaron presencia de cumarinas dentro de su composición fitoquímica, lo cual coincide con lo reportado para las especies *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*.⁽¹⁹⁾

Según lo muestra la tabla No.7 en la identificación de saponinas todas las muestras de *P. triseriale* (frondas y rizomas de los departamentos de Alta Verapaz y Petén) evidenciaron la espuma característica del ensayo, y en la cromatografía en capa fina ambos rizomas de las regiones en estudio, presentaron dos bandas con Rf de 0.20 y 0.95. La fronda de la región de Alta Verapaz presentó tres bandas (Rf de 0.18, 0.81 y 0.95), mientras que la de Petén presentó cinco bandas 0.18, 0.36, 0.59, 0.80 y 0.95 respectivamente. Estos resultados afirman que tanto frondas como rizomas contienen saponinas, lo cual coincide con lo reportado en la literatura para las otras dos especies del complejo calahuala.

En la tabla No.8 se muestran los resultados del ensayo macro y semimicro para la detección de principios amargos utilizando como estándar de referencia *Neurolaena lobata*, contenida en hojas de tres puntas, la cual presenta principios amargos. Las frondas de *P. triseriale* provenientes de los departamentos en estudio y el rizoma del departamento de Alta Verapaz sí contienen principios amargos debido a que presentaron bandas que coincidieron con el estándar. Por el contrario el rizoma de *P. triseriale* del departamento de Petén no reportó ninguna banda en la cromatografía en capa fina, por lo que no contiene principios amargos. Según lo reportado para las especies *P. pseudoaureum* y *P. decumanum*, estas contienen principios amargos dentro de su composición fitoquímica, por lo que no existe diferencia para las tres especies pertenecientes al complejo calahuala.

En las tablas No. 10, No.11, No.12 y No.13 se expresan los resultados para la cuantificación de flavonoides totales expresados como porcentaje de quercetina mediante

espectrofotometría ultravioleta, de extractos de frondas y rizomas de *P. triseriale* de las dos regiones en estudio. Estas revelan que son las frondas de *P. triseriale* las que tienen una presencia mayor de flavonoides totales expresados como % de quercetina: frondas de la región de Alta Verapaz (1.71% +/-0.5274); frondas de la región de Petén (2.01% +/- 0.0774), el porcentaje de quercetina en estas frondas no varían significativamente una con respecto a la otra, sin embargo la diferencia es comprensible al relacionar el valor de la absorbancia con el contenido de humedad de cada una de las muestras; ya que mientras mayor fuera la humedad, menor contenido de materia seca se aportó en el proceso de extracción y fue precisamente *P. triseriale* de la región de Petén la que contenía menor humedad, y por lo tanto evidenció mayor % de flavonoides totales expresados como quercetina.

Los rizomas de *P. triseriale* de las dos regiones en estudio Alta Verapaz (0.068% +/- 0.0176) y Petén (0.073% +/- 0.0171), presentaron porcentajes muy bajos comparados con los de las frondas, por lo que hay muy poca presencia de flavonoides en esta parte del helecho.

Las frondas y rizomas de *P. triseriale* de las dos regiones en estudio (Alta Verapaz y Petén) contienen flavonoides, sin embargo son las frondas de esta especie las que contienen un porcentaje de 1-2% de flavonoides, metabolitos que justifican las propiedades medicinales atribuidas.

Con el presente trabajo se confirma que *P. triseriale*, perteneciente al complejo calahuala (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *P. triseriale*), contiene alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, saponinas y principios amargos como metabolitos secundarios, lo cual ha sido reportado en la literatura para las especies de (*P. pseudoaureum*, *P. decumanum*), por lo que esta planta puede ser utilizada popularmente sin distinción entre las tres especies pertenecientes al complejo.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Se identificó la presencia de alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides y principios amargos en las muestras de los extractos etanólicos de frondas y rizomas de *Polypodium triseriale*.
- 9.2 Al comparar la composición química de las frondas de *P. triseriale* de las dos regiones estudiadas, Alta Verapaz y Petén, se observó que coincidían en el hecho que ambas presentaron alcaloides, sin embargo difieren en el tipo de los mismos.
- 9.3 Los rizomas de *P. triseriale* de la región de Petén, no presentaron principios amargos en su composición química.
- 9.4 En la fronda de *Polypodium triseriale* se encontró hiperósido, ácido clorogénico, quercetina y rutina, todos ellos flavonoides, con importante actividad biológica.
- 9.5 La fronda de *P. triseriale* proveniente de Alta Verapaz presentó 1.71% de flavonoides expresados como quercetina, y la proveniente de Petén presentó 2.01%, por lo que no existe una mayor diferencia entre los departamentos.
- 9.6 El contenido de los compuestos fenólicos (flavonoides) encontrados en las frondas, difiere del encontrado en los rizomas, ya que en este último, se encontró menor porcentaje (0.07%) de los detectados en las frondas.
- 9.7 El extracto de *Polypodium triseriale*, al igual que las otras dos especies pertenecientes al complejo calahuala (*P. pseudoaureum* y *P. decumanum*) contienen los mismos metabolitos, ya que se confirmó lo reportado por la literatura, se identificaron alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, saponinas y principios amargos en su composición, sobre todo la presencia de flavonoides en sus frondas.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Realizar validaciones metodológicas de diferentes métodos de extracción, purificación y cuantificación de flavonoides para las especies de Calahuala.
- 10.2 Realizar la evaluación farmacológica de los extractos alcohólicos de fronda y rizoma de *P. pseudoaureum* con el propósito de validar las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente.
- 10.3 Continuar con el estudio de las especies pertenecientes al complejo, ya que son de gran utilidad para la población.

11. REFERENCIAS

1. Cáceres A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Edit. Universitaria. Guatemala, 287-289 p.
2. Jones Jr. Samuels B. (1987) Sistemática Vegetal. México. 2da Ed. McGraw-Hill Mexico. pp. 281-295.
3. Solomon Eldra P.(2001) Biología. México. 5ta Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 560-563.
4. Stolze RG. (1981). Ferns and Fern Allies of Guatemala. Fieldiana: Botany New Series 6:374-377.
5. Fuller JH. (1976). Botánica General México. 5ta. Ed. CECST pp. 229-232.
6. Morán R. (1996). Polypodiaceae. En: Davidse, G; Sousa, M& Chater, A. (Eds) Flora Mesoamericana. Vol 5 Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México pp. 356-357.
7. Davidse G et al. (1995) Flora Mesoamericana 1:346
8. Morton JF. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America Springfield, Charles C. Thomas pp. 12.
9. García CL. (2005). Estudio de las condiciones ambientales de la calahuala (*Phlebodium* spp.) en la Sierra Caral, municipio de Morales, departamento de Izabal, Guatemala. Tesis de Maestría. USAC. 63 p
10. Morán R. (1996). Polypodiaceae. En: Davidse, G; Sousa, M& Chater, A. (Eds) Flora Mesoamericana. Vol 5 Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México pp. 356-357.
11. Sharapin Nikolai. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Bogota.
12. Guerra A. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Guatemala USAC Facultad de Ingeniería (tesis de Graduacion Ingenieria Quimica). P 43
13. Del Cid H. (2004) Extracción a nivel de laboratorio, de los pigmentos colorantes del tipo Flavonoides contenidos en la flor del Subín (*Acacia farnesiana L.Willd*)

- proveniente de un bosque silvestre Guatemalteco. Guatemala USAC Facultad de Ingeniería (tesis de Graduación Ingeniería Química). P 43
14. World Health Organization. (2000). Quality Control Methods for Medicinal Plant Material. Geneva: WHO. pp9-18, 88.
 15. Lock O. (1994). Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2da Edición Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo editorial. Pp. 72-75, 80-81, 114-121.
 16. Medinilla B. (2001). Manual de Laboratorio de Fitoquímica USAC Guatemala pp. 27.
 17. Skoog D. (2001) Análisis Instrumental. 7ma ed. Editorial Mc Graw-Hill. México. pp 562-592.
 18. Vargas, JM y Roselvira Barillas. 2002. Práctica No.1 Técnicas de Herbario. Departamento de Botánica, recursos naturales renovables y conservación. Escuela de Biología. USAC
 19. Zuleta R. (2005) Perfil Fitoquímico de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger provenientes de 5 regiones de Guatemala. Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación Químico Farmacéutico). p44
 20. Stommel J, Whitaker B. Scientists Get Under Eggplant's skin. Agricultural Research 2004;52(1):16-19
 21. Mizobuchi, K., et al. Studies on kuko. Part 6, seasonal variation of vitamin C and rutin contents in *Lycium chinense* leaves. Tokushima Daigaku Yakugaku Kenkyu Nempo 1969;18:27-30
 22. Zhiyong Liu, et al. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-*o*-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. 2005;59(9):481-490
 23. Aldana F. (2007) Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger; Tres especies de calahuala nativas de Guatemala. Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (Tesis de maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales). 18-34pp
 24. Farmacopeia Brasileira, 4ta edición. São Paulo. Atheneo Editora, 1996.

12. ANEXOS

Anexo No. 1 Ciclo de Reproducción de los Pteridofitas

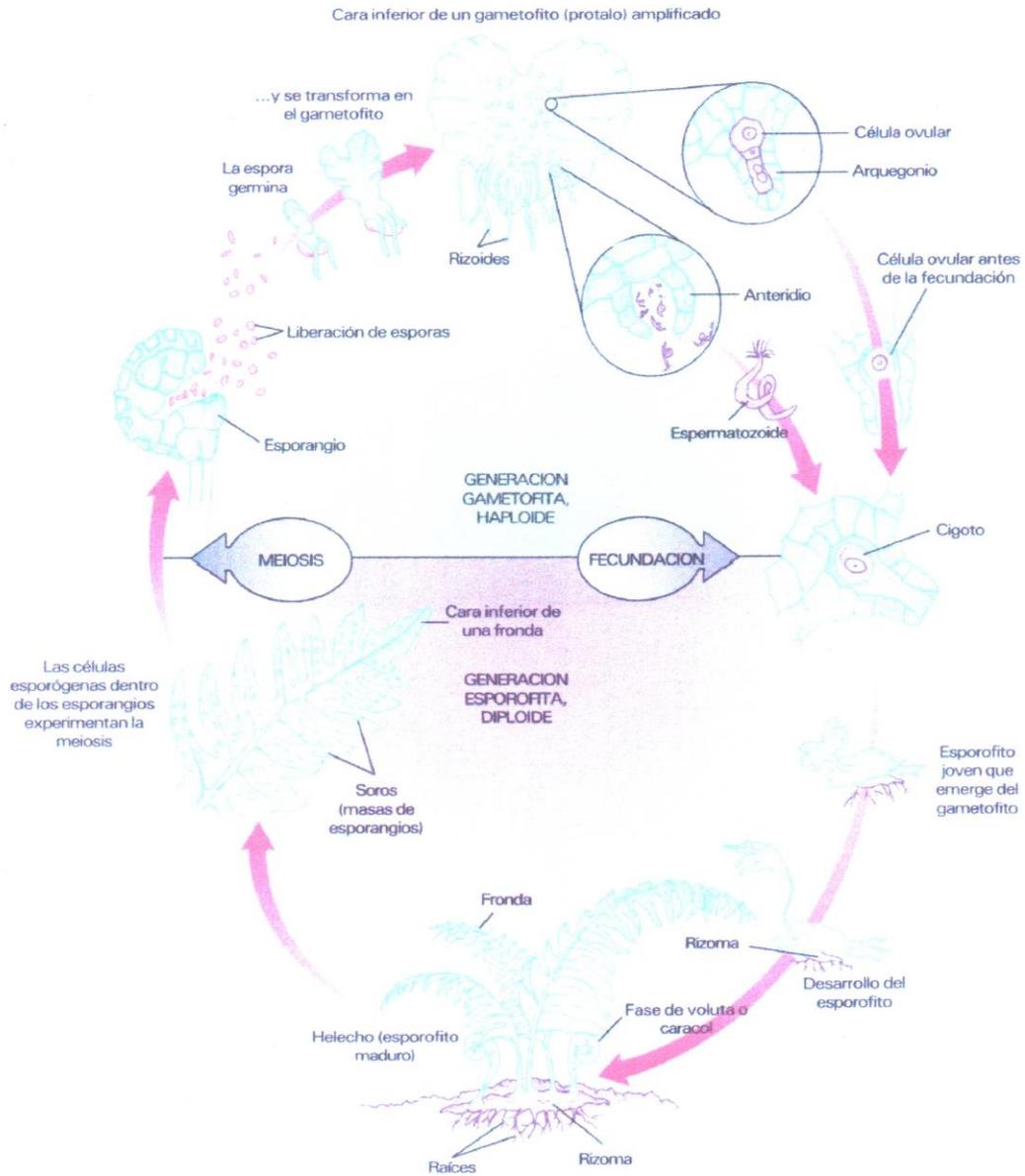
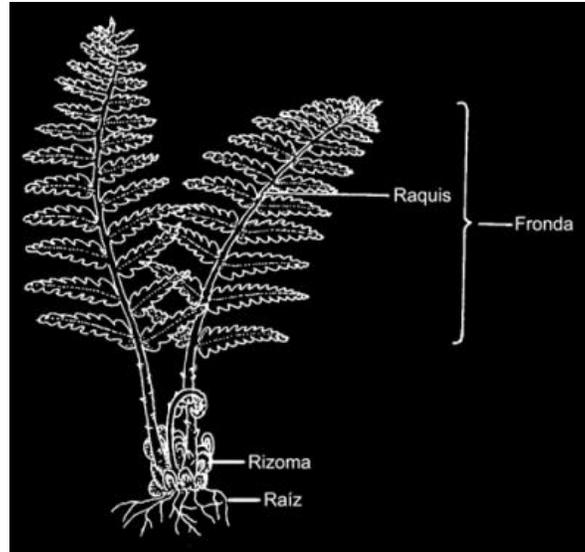


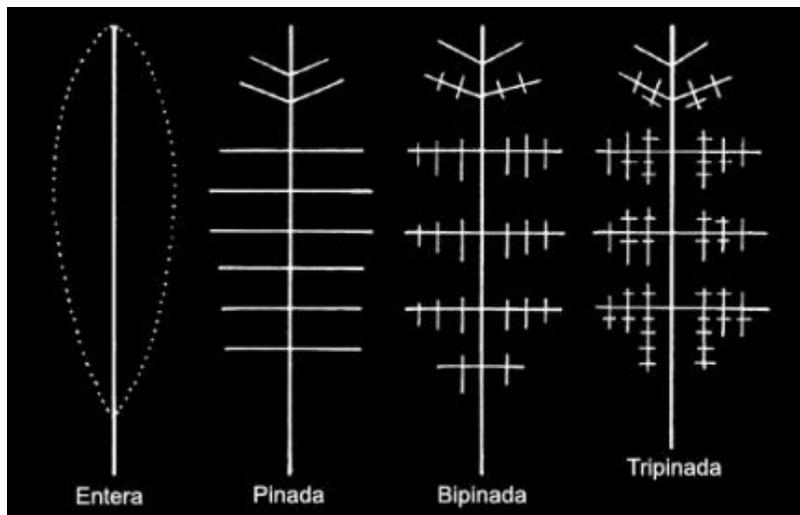
Fig. 26-11. Ciclo vital de los helechos. Nótese la alternancia de generaciones muy bien definida entre las generaciones gametofita (protalo) y esporofita (planta con hojas). En los helechos, en la fecundación se requiere agua como medio de transporte para los espermatozoides.

Anexo No.2 Helechos y sus partes

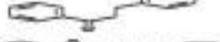
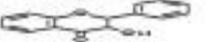
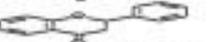
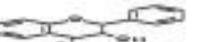
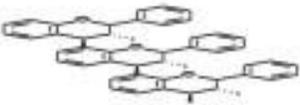
Partes de un Helecho:



Tipos de Frondas:



Anexo No. 2 Clasificación de los Flavonoides

Flavonoide	Estructura básica	
Chalconas		
Dihidrochalconas		
Auronas	 	
Flavonas		
Flavonoles		
Dihydroflavonoles		
Flavanonas		
Flavanol		
Flavandioles o Leucoantocianidinas		
Antocianidina		
Isoflavonoides	 	
Biflavonoides		
Proantocianidinas o Taninos condensados		

Anexo No. 3 Espectrofotómetro AGILENT 8453



Anexo No. 4 Tamizaje Fitoquímico de *Polypodium triseriale*

Figura No. 1 *Polypodium triseriale*



(a) Vista de la planta desde el haz de las frondas *P. triseriale*



(b) Fronda *P. triseriale*



(c) Vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros.

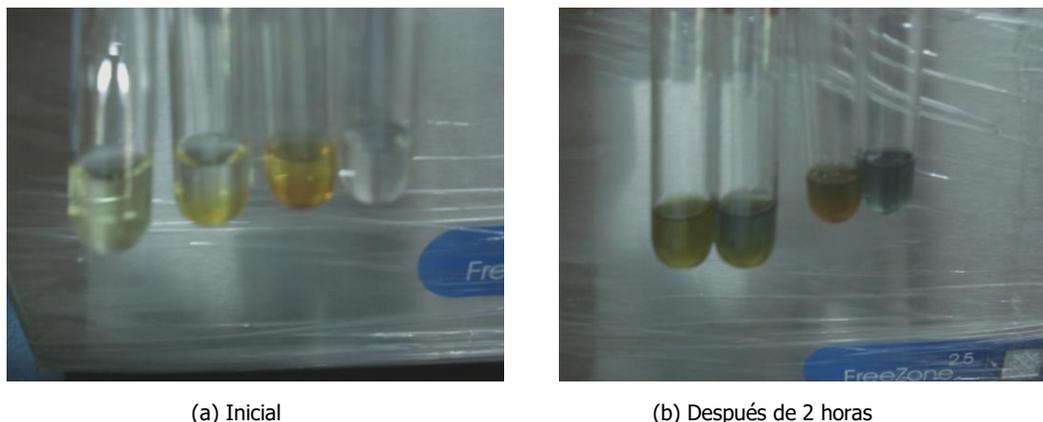


(d) Rizomas de *P. triseriale*

Figura No. 2 Secado de muestras *P. triseriale*



Figura No. 3 Ensayo macro y semimicro para detección de alcaloides en *P. triseriale*



(a) Inicial

(b) Después de 2 horas

Figura No. 4 Cromatografía en capa fina para detección de alcaloides en *P. triseriale*
 Fase Móvil: tolueno-acetato de etilo-dietilamina(70:20:10),Revelador: Reactivo de dragendorff y ácido sulfúrico concentrado para intensificar el color de las manchas.



A continuación se presenta la interpretación de la cromatopla, para la descripción de los extractos de frondas y rizomas de *P. triseriale* (Alta Verapaz y Petén).

Fronda *P. triseriale* Alta Verapaz presentó dos bandas con los siguientes Rfs:

Rf	1=0.14	2=0.4
Coloración	Naranja	Naranja

Fronda *P. triseriale* Petén presentó dos bandas con los siguientes Rfs:

Rf	3=0.37	4=0.47
Coloración	Naranja	Naranja

Los dos estándares produjeron un Rf cada uno con coloración naranja, atropina = 0.19 y papaverina=0.47

Figura No. 5 Ensayo macro y semimicro para detección de taninos en *P. triseriale*



Figura No. 6 Ensayo macro y semimicro para detección de flavonoides y antocianinas en *P. triseriale*

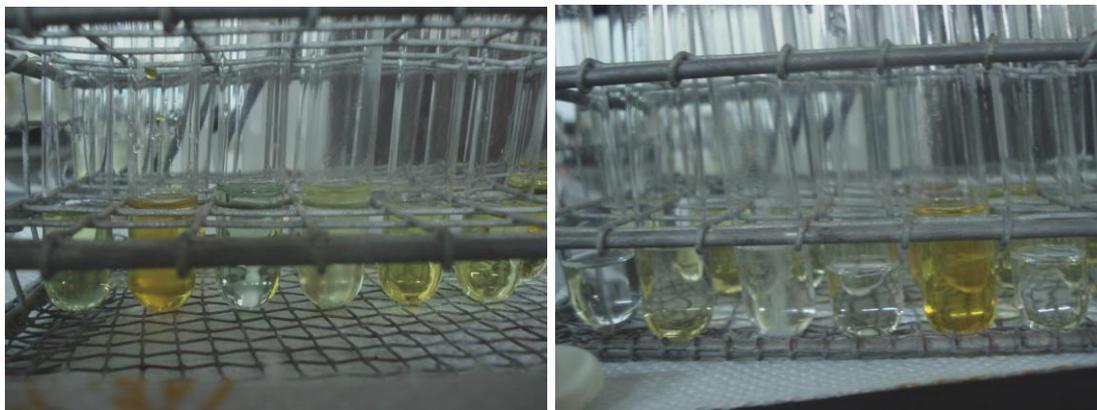
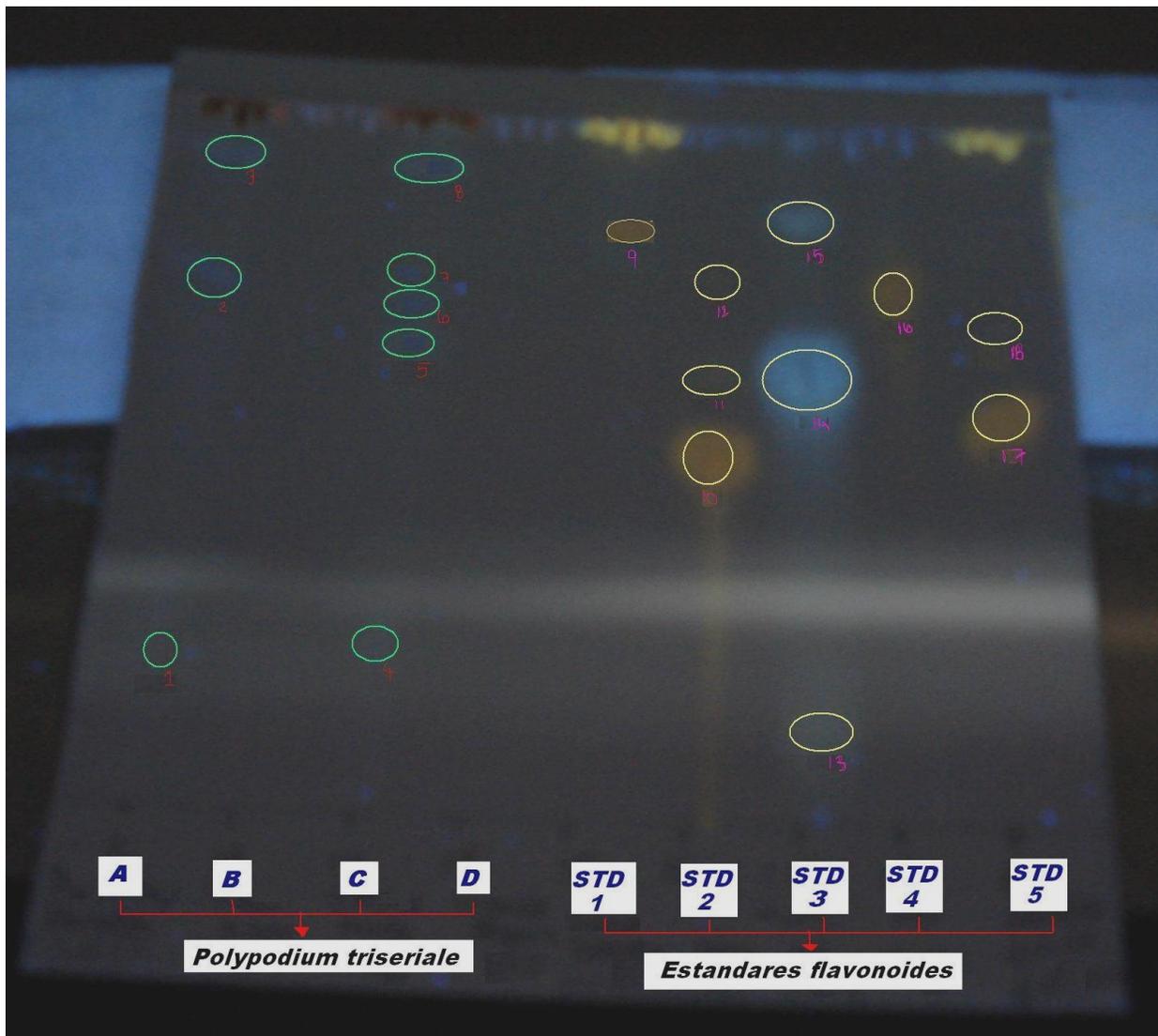


Figura No. 7 Cromatografía en capa fina para detección de flavonoides en *P. triseriale*

Fase Móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), Revelador: Reactivo de productos naturales (NP/PEG) y Vapores de amoniaco para intensificar el color de las manchas.



A= *P. triseriale* fronda Alta Verapaz; B= *P. triseriale* rizoma Alta Verapaz; C= *P. triseriale* fronda Petén; D=*P. triseriale* rizoma Petén; STD 1= Estándar Quercetina; STD 2= Estándar de Rutina; STD 3= Estándar de Acido clorogénico, STD 4= Estándar de Hiperósido, STD 5= Estándar Mezcla de Rutina e Hiperósido.

A continuación se presenta la interpretación de la cromatoplaque, para la descripción de los extractos de frondas y rizomas de *P. triseriale* (Alta Verapaz y Petén).

Las muestras produjeron los siguientes Rfs:

(A)= Fronda *P. triseriale* Alta Verapaz, presentó tres bandas con los siguientes Rfs

Rf	1=0.19	2=0.70	3=0.89
Coloración	Celeste	Celeste	Celeste

(C)= Fronda *P. triseriale* Petén, presentó cinco bandas con los siguientes Rfs

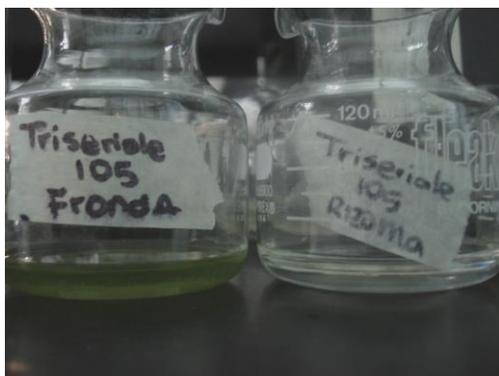
Rf	4=0.20	5=0.58	6=0.65	7=0.71	8=0.89
Coloración	Celeste	Celeste	Celeste	Celeste	Celeste

Los Rizomas de *P. triseriale* de la región de Alta Verapaz (B) y Petén (D) no presentaron ninguna banda en la cromatoplaca.

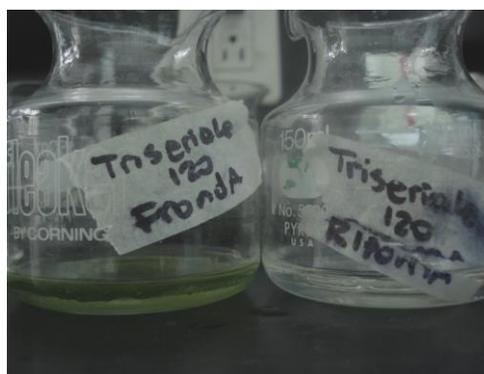
Los 5 estándares produjeron los siguientes Rfs:

ESTANDAR	RF	COLORACIÓN
STD 1= quercetina	9= 0.79	Naranja fluorescente
STD 2= rutina	10=0.46	Naranja fluorescente
	11=0.58	Naranja tenue
	12=0.73	Naranja tenue
STD 3= ácido clorogénico	13=0.10	Celeste fluorescente
	14=0.59	Celeste fluorescente
	15=0.85	Celeste fluorescente
STD 4= hiperósido	16=0.71	Naranja
STD 5= mezcla de Rutina e Hiperósido	17=0.51	Naranja
	18=0.66	Naranja tenue

Figura No. 8 Ensayo macro y semimicro para detección de Antraquinonas en *P. triseriale*

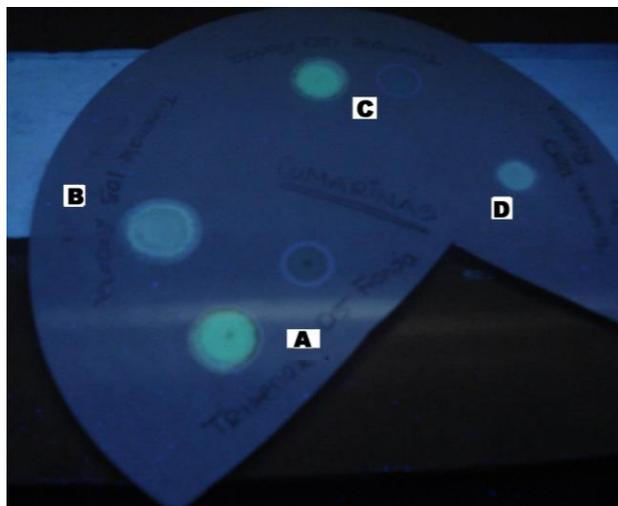


(a) *P. triseriale* de la región de Petén



(b) *P. triseriale* de la región de Alta Verapaz

Figura No. 9 Ensayo macro y semimicro para detección de cumarinas en *P. triseriale*



A= fronda *P. triseriale* región Alta Verapaz

B= rizoma *P. triseriale* región Alta Verapaz

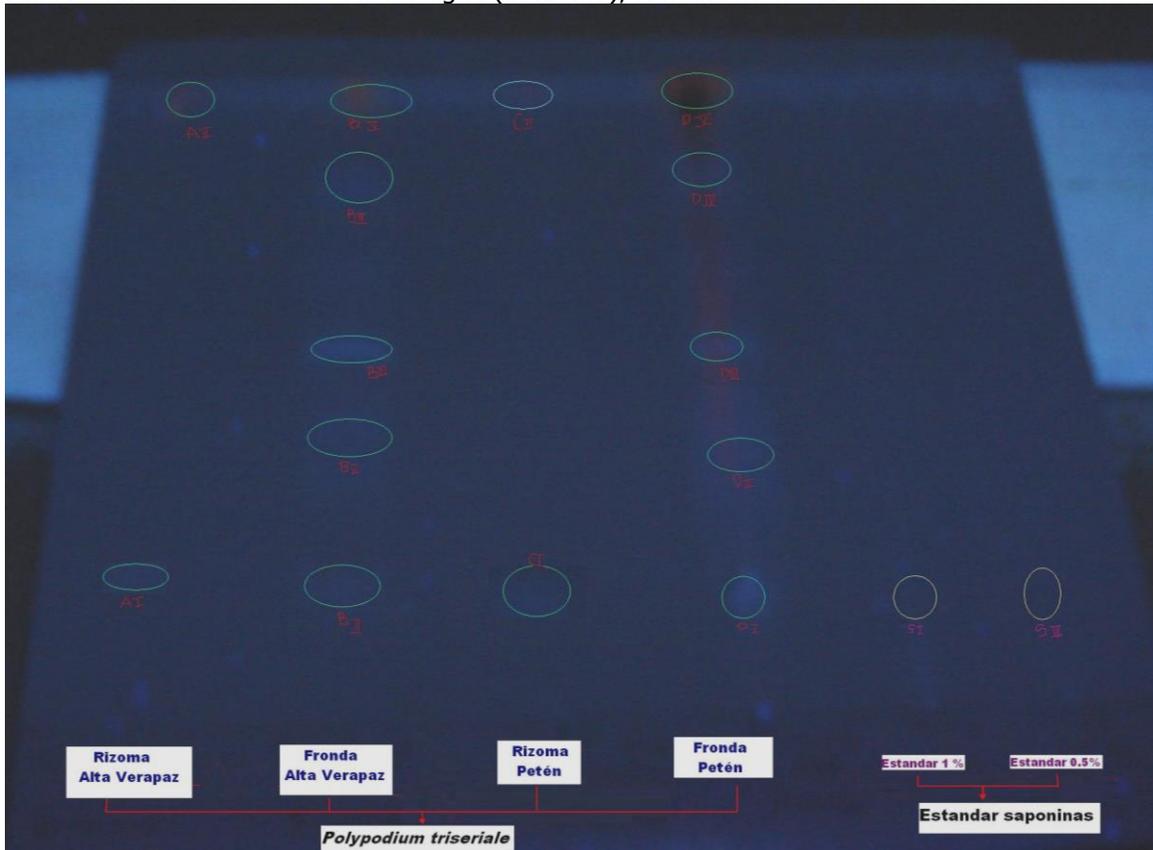
C= fronda *P. triseriale* región Petén

D= rizoma *P. triseriale* región Petén

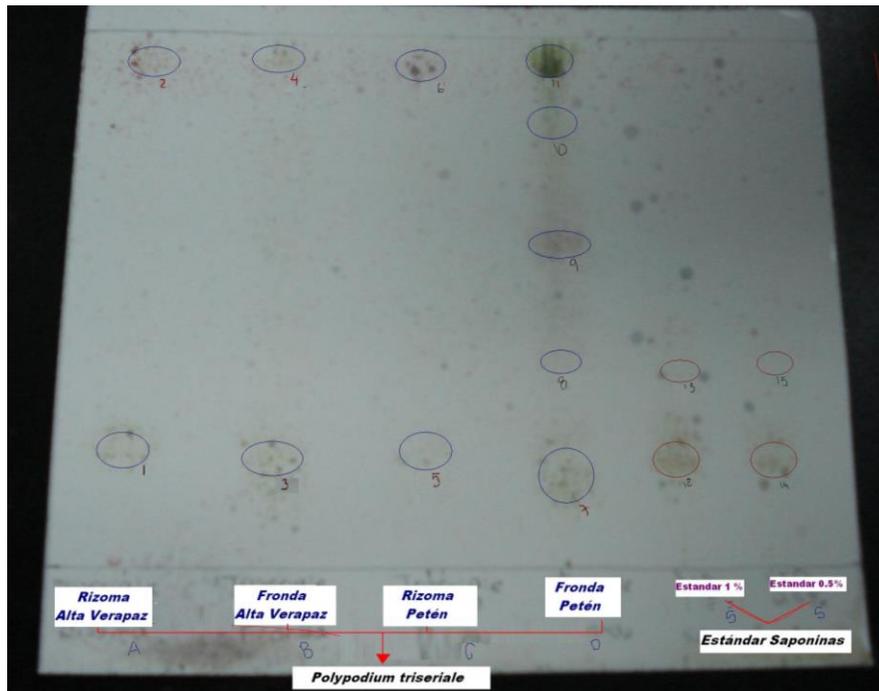
Figura No.10 Ensayo macro y semimicro para detección de Saponinas en *P. triseriale*



Figura No. 11 Cromatografía en capa fina para detección de saponinas en *P. triseriale*
 Fase Móvil: n-butanol-ácido acético-agua (50:10:40), Revelador: anisaldehído-ácido sulfúrico



(a) Cromatopla de Saponinas en UV



(b) cromatopla de saponinas

A continuación se presenta la interpretación de la cromatoplaqa, para la descripción de los extractos de frondas y rizomas de *P. triseriale* (Alta Verapaz y Petén). La altura del frente alcanzó un desplazamiento de 8.4 cm.

(A)= Rizoma *P. triseriale* Alta Verapaz, presentó dos bandas con los siguientes Rfs

Rf	1=0.20	2=0.95
Coloración	Violeta	Violeta

(B)= Fronda *P. triseriale* Alta Verapaz, presentó tres bandas con los siguientes Rfs

Rf	3=0.18	4=0.81	5=0.95
Coloración	Violeta	Violeta	Violeta

(C)= Rizoma *P. triseriale* Petén, presentó dos bandas con los siguientes Rfs

Rf	6=0.20	7=0.95
Coloración	Violeta	Violeta

(D)= Fronda *P. triseriale* Petén, presentó cinco bandas con los siguientes Rfs

Rf	8=0.18	9=0.36	10=0.59	11=0.80	12=0.95
Coloración	Violeta	Violeta	Violeta	Violeta	Verde-violeta

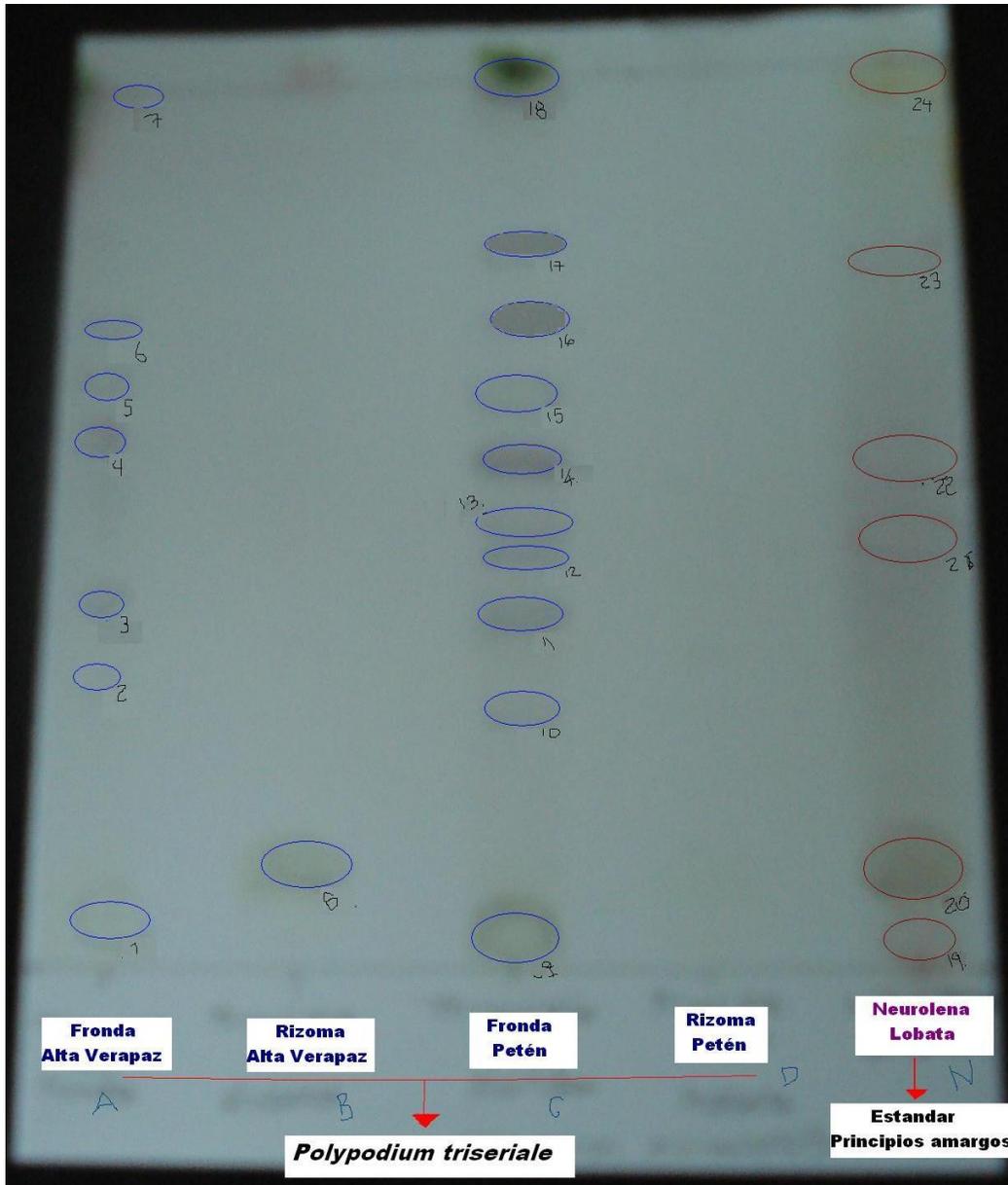
Los estándares produjeron los siguientes Rfs:

(S)= Estándar de saponinas 0.5% presentó dos bandas con los siguientes Rfs 13=0.19, 14=0.37, con coloración violeta.

(S)= Estándar de saponinas 1.0% presentó dos bandas con los siguientes Rfs 15=0.19, 16=0.37, con coloración violeta.

Figura No. 12 Cromatografía en capa fina para detección de principios amargos en *P. triseriale*

Fase Móvil: acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8), Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico



A continuación se presenta la interpretación de la cromatopla, para la descripción de los extractos de frondas y rizomas de *P. triseriale* (Alta Verapaz y Petén).

Las muestras produjeron los siguientes Rfs:

(A)= Fronda *P. triseriale* Alta Verapaz, presentó siete bandas con los siguientes Rfs

Rf	1=0.05	2=0.2	3=0.39	4=0.51	5=0.63	6=0.69	7=0.99
----	--------	-------	--------	--------	--------	--------	--------

Coloración	Café tenue	Café-roja						
------------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

(B)= Rizoma *P. triseriale* Alta Verapaz, presentó una banda con Rf 8=0.010 y coloración café tenue.

(C)= Fronda de *P. triseriale* Petén, presentó 10 bandas con los siguientes Rfs

Rf	9=0.0 4	10=0.2 7	11=0.3 7	12=0.4 3	13=0.4 7	14=0.5 4	15=0.6 2	16=0.6 9	17=0.7 8	18=0.9 9
Coloración	Café tenue	Café-roja	Café-roja	Café-roja	Café-roja	Roja-violeta	Café tenue	Café tenue	Café tenue	Café-verde

(D)= Rizoma *P. triseriale* Petén, no presentó banda.

El estándar produjo los siguientes Rfs:

(N)= Estándar *Neurolena lobata*, presentó seis bandas con los siguientes Rfs 19=0.19, 20=0.10; 21=0.44, 22=0.53; 23=0.76 y 24=0.99, todos con coloración café-roja.