

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

**PERFIL FITOQUIMICO DE *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger
PROVENIENTE DE 5 REGIONES DE GUATEMALA**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

ERICKA ELVIA IVONNE ZULETA RODAS

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, Octubre de 2005

INDICE

Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	5
Justificación	12
Objetivos	13
Hipótesis	14
Materiales y Métodos	15
Resultados	22
Discusión	31
Conclusiones	34
Recomendaciones	35
Referencias	36
Anexos	40

1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de determinar si existen diferencias cualitativas en la composición química de los rizomas de *Phlebodium pseudoaureum* provenientes de cinco regiones diferentes del país, generando de esta manera información fitoquímica de la especie que permita caracterizar y seleccionar mejor cultivo, con el fin de brindar materia prima que pueda constituir una alternativa para el mejoramiento de la salud y desarrollar un mercado tanto nacional como internacional, contribuyendo de esta manera al desarrollo económico y social de Guatemala.

En esta investigación se analizó el rizoma y las escamas de *P. pseudoaureum* de regiones de El Quiché, Guatemala, Jalapa, Baja Verapaz y Huehuetenango. Se realizaron ensayos fitoquímicos para la determinación de alcaloides tanto macro como por cromatografía en capa fina, presentando tanto para el rizoma y las escamas un resultado positivo para esta prueba. Se analizó la presencia de taninos en las cinco muestras en forma macro, presentando estas un resultado positivo para la misma. Se analizó la presencia de flavonoides, saponinas y sesquiterpenlactonas por medio de cromatografía en capa fina confirmándose la presencia de estos metabolitos secundarios en cada una de las muestras seleccionadas.

De estudio se concluye lo siguiente: Se corroboró la presencia de los cinco metabolitos estudiados, según lo reportado por la literatura y se llega a la conclusión que no existe diferencia en la composición química de *P. pseudoaureum* de las cinco regiones analizadas, al igual que entre las variedades guatemaltecas y las variedades extranjeras.

2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país con tierra fértil y clima apropiado para una gran variedad de plantas. La variabilidad del país en diferentes pisos altitudinales conduce a la variabilidad de climas, fisiografía y suelos, los cuales constituyen factores importantes en la diversidad de ambiente y ecosistemas y por ello en el tipo y variación de vegetación. Entre este tipo de vegetación se puede encontrar las plantas epifitas, las cuales crecen en lugares húmedos y sombreados, tales como los bosques con los que cuenta Guatemala, de las cuales se deriva el género *Polypodiaceae* y la especie *Phlebodium pseudoaureum* a la cual se le atribuyen varias actividades terapéuticas.

En Guatemala *P. pseudoaureum* se encuentra distribuido en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa, por lo que es de vital importancia la formación de un perfil cromagráfico de la especie, proveniente de diferentes regiones para establecer si existen diferencias en la composición química. Los lugares de los que se extraerán las muestras son El Quiché, Jalapa, Huehuetenango, Baja Verapaz y Guatemala y los metabolitos a evaluar son alcaloides, taninos, sesquiterpenlactonas, flavonoides y polipodina (ecdisonas).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades Ecológicas

Guatemala es una república relativamente pequeña, de solamente unos 108,889 km² de extensión territorial, una condición de mucha importancia desde el punto de vista ambiental y además de gran trascendencia ecológica. El país está ubicado entre dos océanos, el Pacífico y el Atlántico, lo cual influye decisivamente en los regímenes de vientos y en la producción de humedad, en cierta forma controla los patrones meteorológicos del país.⁵⁰

El país es también dueño de una extraordinaria diversidad ecológica, la cual sólo es posible explicarse como consecuencia de una serie de factores únicos, tales como la composición que ocupa en el planeta, la singular configuración montañosa del territorio y el escenario histórico que ha representando desde su origen. Sus condiciones difícilmente tienen comparación con las de países de dimensiones equivalentes, y todo ello se refleja plenamente en el hecho de que Guatemala posee cuatro de las 79 provincias biogeográficas que los sabios describen en América (24 norteamericanas o “nepárticas” y 55 sudamericanas o “neotropicales”). La condición de alta representatividad biogeográfica no se repite en ninguna otra parte del istmo centroamericano.⁵⁰

La variabilidad del país en diferentes pisos altitudinales conduce a la variabilidad de climas, fisiografía y suelos, los cuales constituyen factores importantes en la diversidad de ambiente y ecosistemas y por ello en el tipo y variación de vegetación. Guatemala posee una de las floras más ricas del mundo en términos de diversidad y variación, si se le compara con la superficie del país.⁵⁰

3.2 Generalidades sobre los helechos:

Los helechos crecen en lugares sombreados y húmedos, aunque algunas especies prosperan en habitats expuestos y secos. El número mayor de individuos y de especies se encuentran en las regiones húmedas de los trópicos, donde los helechos arbóreos alcanzan alturas de 10 a 12 m. Algunos están limitados a una gama definida de acidez y alcalinidad del suelo.¹⁵

3.3 Descripción botánica de *P. pseudoaureum*

En Mesoamérica a *P. pseudoaureum* (fig.1 anexos) se le ha llamado *P. aureum*. Sin embargo, según Morán (1995) la primera es sólo conocida en Florida, Sudamérica, las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, ambas diploides, han hibridizado dando origen a *P. aureum*, una tetraploide. La evidencia morfológica que sustenta este parentesco es que *P. aureum* tiene un número intermedio de series de soros (2-3) entre el de *P. pseudoaureum* (1) y el de *P. decumanum* (3-7). 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 ²⁹.

El rizoma es de 0.7-1.5 cm de ancho, generalmente farinoso, escamas 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 ²⁹.

3.4 Habitat

P. pseudoaureum crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y Centro hasta Sur América en alturas de 1200 –2,200 msnm ^{31,43}. En Guatemala se han descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa. ^{25,43}

3.5 Propiedades medicinales atribuidas

En Mesoamérica se usa *P. pseudoaureum* ampliamente por sus múltiples virtudes medicinales atribuidas, en Guatemala se usan indistintamente otras especies medicinales (*P. attenuatum* HBK³⁰ y *P. dessimile*²⁶).

La infusión y decocción del rizoma de *P. pseudoaureum* se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento y gastritis)^{4,28,37} respiratorias (asma, tos, tos ferina)^{13,43} y cardíacas^{23,31} dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales(cálculos, hidropesía)^{26,30,41}

Tópicamente se usa la infusión del rizoma de *P. pseudoaureum* en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras^{22,23,31} quebraduras¹², cáncer, cierto tipo de tumores^{19, 26} psoriasis y eczema³². La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias³¹

Se le atribuye a *P. pseudoaureum* propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagoga, espasmolítica, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante^{8,20,23,25,28,31}

3.6 Farmacología de *P. pseudoaureum*

La materia médica son los rizomas verdosos en su estado fresco y café dorados cuando secos. Son cilíndricos, tortuosos, con escamas moreno ferruginosas, sin un olor especial²³; Deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de las otras materias primas usadas para la elaboración de productos fitofarmacéuticos²³

Si bien *P. pseudoaureum* 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 cápsulas³.

Entre las indicaciones terapéuticas se encuentra su actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y depurativa. Está indicado su uso en el tratamiento de psoriasis, eczemas, dermatosis, vitiligo y estados de disfunción inmune³⁴.

Estudios antimicrobianos muestran que el extracto acuoso tiene alguna actividad antibacteriana, aunque en otros estudios los extractos acuosos y etanólicos fueron inactivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*³⁶. El extracto de hojas es activo contra bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas campestris*)¹⁸. La calahualina es una saponina aislada del rizoma que tienen actividad antitumoral⁵.

Los resultados iniciales sobre su actividad farmacológica fueron contradictorios, por lo que fue considerada sin ninguna propiedad³¹. Sin embargo, posteriormente se encontró que la decocción del rizoma produce moderada actividad diurética en ratas⁷. En tejido tumoral, una de sus saponinas (anapsos) reduce la incorporación de nucleoproteínas y precursores por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de citostáticos⁴⁷.

La administración oral del extracto acuoso tiene acción inmunomoduladora medida por proliferación del bazo de ratón con Con A¹⁴(concanavalina A). La administración de una fracción del extracto acuoso en ratas produce hipoactividad cerebral dosis-dependiente posiblemente por variación en los niveles de IL-1 β hipotalámica². El extracto acuoso prolonga la sobrevivencia de aloinjertos cutáneos en ratones, sugiriendo una actividad inmunosupresora⁴⁵.

Ensayos clínicos desde principios de siglo le atribuyen eficacia en el tratamiento de cálculos renales e hidropesía³⁸. En pacientes con neoplasias avanzadas se demostró que la calagualina produce un ligero aumento de la sobrevivencia sin producir efectos indeseados²¹.

En un estudio doble ciego con control con placebo se encontró que el extracto crudo mejora el curso clínico de la psoriasis, comparado con el tratamiento convencional⁹. En voluntarios sanos, la administración de extracto por vía oral disminuye la respuesta linfoblástica a la estimulación con mitógenos, los niveles de inmunoglobulinas séricas y la

proporción de linfocitos T OKT8⁺⁴⁸. Este efecto que es observado en pacientes psoriáticos tratados con extractos acuosos de *P. leucotomos*^{24,35}, podría explicar la mejoría clínica que se presenta³³. La administración oral y tópica de un producto que contiene extracto de la planta (Difur®) induce repigmentación en pacientes con vitiligo³⁴.

Entre otros estudios están:

- Modulación del anticuerpo responsable contra el parásito nemátodo *Trichinella spiralis* por anapsos¹⁰.
- El efecto del extracto de *P. leucotomos* en el anticuerpo específico producido en ratones inmunizados pro el antígeno del tercer estadio de la larva de *Anisakis simplex*⁹
- Propiedades fotoprotectora de un extracto hidrofílico de *P. leucotomos* en células humanas.¹
- Actividad antiinflamatoria In vitro de *P. decumanum* Modulación del factor de tumor necrótico, receptores soluble TNF.³⁷

3.7 Composición Química

Se han realizado ya algunos estudios sobre la composición química de diferentes especies del género *Phlebodium*. El rizoma de *P. pseudoaureum* contiene azúcar, aceite esencial, mucílago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo³⁸, además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos³, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina)^{8,30,31}. Ecdisona: Secretado por el tejido ecdysial y luego es transformado en un compuesto más activo que es la 20-hidroxiecdisona, con peso molecular de 480.63, es inestable en solución alcalina, uv máxima de 243 nm, punto de fusión 240-242°C⁶. Adenosina: Es un nucleósido distribuido en la naturaleza en formas de cristales con punto de fusión entre 234-235°C se observa a 260 nm UV, prácticamente insoluble en alcohol y en terapéutica es utilizado como antiarrítmico.⁶

Las especies usadas medicinalmente en El Salvador contienen alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos³⁶.

Los metabolitos a estudiar son aquellos que se han descrito para la especie, tal es el caso de alcaloides, taninos, sesquiterpenlactonas, flavonoides y polipodina (ecdisonas)⁶ la polipodina será evaluada por el método de saponinas.

3.8 Cromatografía en capa fina (CCF.)

Desde el punto de vista histórico la cromatografía en papel fue la que se utilizó en primer término para realizar separaciones a mediados del siglo pasado. Esta fue desarrollada hacia el final del decenio de los cincuentas y se ha transformado en el más importante de los métodos de cromatografía plana ⁴¹.

Los métodos de cromatografía plana incluyen la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en papel (PC), y la electrocromatografía (EC). En todos los casos se emplea una capa horizontal y relativamente delgada de un material que es a la vez soporte, o que se coloca sobre una superficie de vidrio, plástico o metálica. La fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad, a veces ayudada por gravedad o con un potencial eléctrico. La cromatografía plana en algunas ocasiones se denomina cromatografía bidimensional, aunque esta descripción no es estrictamente correcta puesto que la fase estacionaria tiene un grosor definido. La cromatografía plana se basa en la técnica de la capa fina, que es rápida, tiene una mejor resolución y es más sensible que su alternativa en papel. Es útil en la industria de las drogas para los importantes controles de pureza del producto, útil en los laboratorios clínicos y es la piedra angular de muchos estudios bioquímicos y biológicos ⁴².

Sobre una placa de vidrio de 5 x 20 cm o de 20 x 20 cm se extiende una pasta del adsorbente juntamente con un soporte de almidón o de yeso, formando una capa de espesor uniforme (de 0.15 a 2.0 mm, según los casos), se deja secar esta pasta durante 30 minutos o más para que quede adherida. La capa formada se activa por calentamiento, normalmente en posición vertical a 100-110°C durante diversos periodos de tiempo; las placas se

conservan en un desecador hasta el momento en que se vayan a utilizar. La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas. Luego, cuando la capa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la sustancia con el disolvente⁴.

4. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país reconocido ampliamente por su riqueza natural y un clima apropiado para una gran variedad de plantas. Entre este tipo de vegetación se puede encontrar las plantas epifitas, las cuales crecen en lugares húmedos y sombreados, tales como los bosques. *Phlebodium pseudoaureum*, es un helecho que crece en diferentes regiones del país, se utiliza de manera indistinta con otros helechos para el tratamiento de diversas afecciones y tiene una aplicación industrial inclusive para el mercado de exportación, por lo que es importante establecer el perfil fitoquímico de algunos individuos provenientes de por lo menos cinco diferentes regiones silvestres del país (El Quiché, Jalapa, Huehuetenango, Baja Verapaz y Guatemala) para establecer si existen diferencias en la composición química de éstas e identificar un marcador que permita establecer un control de calidad de la misma. Se espera que la información generada contribuya al conocimiento de la especie, mejorar su control de calidad, brindar una alternativa para el mejoramiento de la salud y desarrollar un mercado tanto nacional como internacional al cultivar esta especie en una forma reproducible y generar un mayor desarrollo económico para Guatemala.

5. OBJETIVOS

5.1 General

5.1.1 Caracterizar fitoquímicamente los extractos etanólicos de los rizomas de *P. pseudoaureum*

5.2 Específicos

5.2.1 Colectar y elaborar extractos etanólicos de rizoma de *P. pseudoaureum* de cinco regiones del país.

5.2.2 Demostrar mediante un perfil cromatográfico en capa fina la presencia de los grupos fitoquímicos de *P. pseudoaureum* provenientes de cinco diferentes regiones del país.

5.2.3 Comparar la composición química entre las cinco muestras en estudio.

6. HIPÓTESIS

Existen diferencias cualitativas demostrables en la composición química de los rizomas de *P. pseudoaureum* de cinco regiones diferentes del país.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Población:

Se seleccionarán los rizomas de *P. pseudoaureum* de las cinco diferentes regiones del país, los cuales serán recolectados de poblaciones silvestres reconocidas, y bajo manejo e identificadas por un botánico especialista de FAUSAC (Ing. Vicente Martínez).

7.2 Muestra:

Extractos etanólicos de los rizomas de *P. pseudoaureum* (calahuala).

7.3 Recursos:

7.3.1 Humanos:

Investigadora Ericka Elvia Ivonne Zuleta Rodas

Asesora Licda. Sully Cruz

Co-asesor Lic. Armando Caceres

7.3.2 Institucionales:

Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia

Facultad de Agronomía

LIPRONAT

Laboratorio de productos farmacéuticos FARMAYA

CEDOFB

7.3.3 Apoyo financiero

Fondo de Desarrollo de Ciencia y Tecnología (FODECYT)

OEA Proyecto Desarrollo de tecnología de cultivo de plantas medicinales y
desarrollo de Fitoterápicos

7.4 Materiales y Equipo:

7.4.1 Equipo:

Molino
 Extractor Soxhlet
 Evaporador rotatorio BÜCHI
 Una bomba de vacío BÜCHI
 Un balón para evaporador rotatorio de 500 mL
 Una balanza analítica digital DENVER
 Una Balanza semianalítica digital DENVER
 Una campana para extracción de gases marca LABCONCO
 Desecadora
 Campana de gases
 Una lámpara de luz ultravioleta de ondas corta y larga.
 Una cámara cromatográfica
 Cromatofolios de silicagel 60 F₂₅₄
 Micropipetas de 5µL
 Atomizadores para cromatografía en capa fina
 Una refrigeradora
 Papel Filtro Whatman No. 1
 Cristalería y material de laboratorio en general.

7.4.2 Reactivos:

Reactivos cromógenos diversos
 Estándares de cromatografía
 Disolventes para extracciones y cromatografía en capa fina.

7.5. PROCEDIMIENTO

- 7.5.1** Colecta: Seleccionar y cosechar material sano del rizoma de *P. pseudoaureum*. El rizoma de colecta después de las últimas lluvias .
- 7.5.2** Secado y Almacenamiento: Colocar la planta en bandejas con papel Kraft, ponerlas en un lugar ventilado en donde los rayos del sol no sean directos,

remover la planta cada cierto tiempo, la humedad de almacenamiento no debe estar mayor de 10 por ciento. Los rizomas se cortan según la necesidad para facilitar el manejo, guardar en bolsa plástica. Identificar las bolsas adecuadamente.⁴⁰

7.5.3 Molienda: Colocar en el molino el tamiz número 44 para un polvo semi-fino, agregar la planta poco a poco, coleccionar el material en una bolsa plástica, sellar la bolsa e identificar con una etiqueta.^{40,53.}

7.5.4 Percolación: En percolador previamente preparado con algodón y papel filtro colocar la planta molida, agregar el solvente extractor, en este caso alcohol, dejar por encima de la planta, dejar reposar por el tiempo necesario.⁴⁰

7.5.5 Preparación de extracto: Se concentrará en rotavapor hasta obtención del extracto seco.

7.6 Tamizaje fitoquímico a través de ensayos macro y simimicro

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 y se harán tres repeticiones de esta técnica para confirmar la hipótesis.

7.6.1. Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: pesar 1 g de material vegetal. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego añadir 25 mL 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 de reactivo de Mayer's.

Tubo 2: agregar 5 gotas de reactivo de Dragendoff.

Tubo 3: agregar 5 gotas de reactivo de Wagner.

Tubo 4: Testigo.

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

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

Fase móvil: acetato de etilo metanol agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético –agua (4:1:1).

7.6.2 Investigación de Taninos:

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

Tubo 1: Testigo

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

Tubo 3: agregar 4-5 gotas de gelatina –sal (1 % 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).

Observar la formación de precipitado y/o cambio de coloración.

Cloruro férrico: grisáceo-negro: cateco; negro-azulado: pirogallol.

7.6.3 Determinación de Flavonoides:

Extraer 1 g de droga en polvo con 10 mL de etanol por cinco minutos en baño de agua a una temperatura cerca de 60°C. Filtrar la solución, el filtrado es usado para cromatografía. Este método rápido es utilizado para ambos extractos lipofílicos e hidrofílicos.

CCF: Solución estándar: Los compuestos estándar son preparados como una solución 0.05 por ciento en metanol y cerca de 10 µL son utilizados para cromatografía. El límite de detección para flavonoides es de 5 a 10 µg.

Fase móvil: n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:50 ó 20:5:25)

Fase Estacionaria: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60 F₂₆₄

Detección: Spray revelador: Reactivo de productos naturales. Un típico color fluorescente intenso en UV-365 nm es producido inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg.³⁰

7.6.4 Determinación de Saponinas:

Test de espuma:

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

Tubo 2: 2 ml de control de saponinas (0.50%).

Tubo 3: 2 ml de agua.

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

Se utilizará el método de saponinas para evaluar la presencia de esteroides o ecdisonas. Preparación de Extractos de drogas para CCF: 2 g del polvo de la droga es extraído por

calentamiento durante 10 min bajo reflujo con 10mL de etanol al 70 por ciento. El filtrado es evaporado a 5mL; 25 - 40μL de esta solución es aplicada para cromatografía.

Cromatografía en capa fina: Solución de Referencia: Cada componente de pruebas es preparado como una solución al 0.1 por ciento en metanol. 10μL son aplicados para cromatografía

Adsorbente: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60F₂₆₄.

Muestra: Extractos de droga 25 - 40μL, Solución de prueba 10μL.

Disolventes Cromatográficos: SP-1 cloroformo-metanol-agua (64:50:10)

SP-1 es conveniente para la separación de toda la mezcla de saponinas de las drogas. La mezcla debe ser preparada exactamente: debe usarse cloroformo grado analítico y la cromatografía debe ser ejecutada a 20°C después de 30 min de saturación de la cámara. A temperaturas elevadas los rangos de R_f son movidos en el cromatograma.

Detección: Spray reactivo Reactivo de sangre: las saponinas hemolíticas son detectadas como zonas blancas sobre un plato rojo, la hemólisis puede ocurrir inmediatamente o después de secar los platos en un aire caliente.

Ácido sulfúrico, vainillina, con este reactivo las saponinas forman principalmente azul o azul violeta y a veces zonas amarillo suaves.

Anisaldehído, ácido sulfúrico, los colores son similares al reactivo anterior. Cloruro de antimonio III, el color rojo violeta es visible, azul y verde fluorescente, en UV a 365 nm.³³¹

7.6.5 Determinación de Sesquiterpenlactonas

Extraer 1 g de material vegetal pulverizado con 5 mL de metanol, sobre baño maria 15 minutos. Filtrar. Aplicar entre 20 a 100 μL de el filtrado es aplicado sobre la cromatoplaca.

Preparación del disolvente: Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10)

Reactivo para detección Vainillina-ácido sulfúrico.

Solución I: Acido sulfúrico al 5 por ciento en etanol. Solución II: Vainillina al 1 por ciento en etanol. Asperjar la placa con 10 mL de la solución I, seguido inmediatamente por 5- 10 mL de la solución II.

Dará positivo una coloración rojo-café ó amarillo-café ^{27,51}

7.7 DISEÑO DEL ESTUDIO

7.7.1 Muestra: Las muestras a trabajar son rizomas de *P. pseudoaureum* de cinco regiones del país (El Quiché, Jalapa, Huehuetenango, Baja Verapaz y Guatemala), recolectadas en regiones silvestres reconocidas e identificadas por un botánico especialista de FAUSAC.

7.7.2 Diseño del Muestreo: Se escogerán las muestras de *P. pseudoaureum* de las cinco regiones del país (El Quiché, Jalapa, Huehuetenango, Baja Verapaz y Guatemala), se hará al azar.

7.7.3 Análisis de Resultados: El análisis de los datos se hará de forma descriptiva-comparativa, con la toma de fotos de las diferentes placas realizadas.

8. RESULTADOS

Se analizaron cinco muestras de *P. pseudoaureum* separando la escama del rizoma y obteniéndose nueve muestras a excepción de la muestra proveniente de Huehuetenango la cual no se separó la escama del rizoma. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado,

8.1 Recolección:

Se recolectaron en los meses de septiembre a noviembre de 2002, obteniéndose entre 2.5 kg a 5.00 kg de cada muestra de *P. pseudoaureum* seleccionando el mejor material presente en los cinco lugares de estudio. Se decidió realizar el estudio por separado de las escamas de los rizomas ya que esta se desprendía fácilmente después del secado realizado a las muestras, lo que podría influir en la composición de la droga vegetal.

8.2 Obtención de extractos:

La obtención de los extractos se realizó por el método de percolación utilizando alcohol al 50 por ciento y se obtuvieron menstrosos que se concentraron en un rotavapor, consiguiéndose extractos a punto de miel de color café, olor dulce característico y de consistencia blanda.

8.3 Extractos:

El porcentaje de rendimiento de los extractos alcohólicos de los rizomas de *P. pseudoaureum* estuvieron en un rango de 35.57 por ciento como mínimo (rizoma del depto. Guatemala) y un máximo de 51.36 por ciento (rizoma de Huehuetenango). De las escamas de *P. pseudoaureum* se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 8.95 por ciento para la escama de Jalapa y un 16.18 por ciento para la escama de Guatemala. La tabla 1 presenta los porcentajes de rendimiento de cada muestra analizada, así como también la sumatoria de los rendimientos de rizoma y escama, considerándolos una sola muestra.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de *P. Pseudoaureum*.

	Peso materia seca (g)	Materia seca (%)	Rendi- miento extracto (g)	Rendi- mento del extracto (%)	Peso materia seca (g)	Materia seca (%)	Rendi- miento extracto (g)	Rendi- mento del extracto (%)	Peso materia seca (g)	Materia seca (%)	Rendi- miento extracto (g)	Rendi- miento del extracto (%)
Quiché	301.49	88.97	139.62	46.31	37.37	11.03	3.38	9.05	338.86	100.00	143.00	55.36
Guatemala	299.90	85.22	97.68	32.57	52.01	14.78	8.42	16.19	351.91	100.00	106.10	48.76
Jalapa	265.33	91.67	118.10	44.52	24.10	8.33	2.16	8.96	289.43	100.00	120.26	53.48
Baja Verapaz	300.37	82.67	113.96	37.94	62.97	17.33	7.48	11.87	363.34	100.00	121.44	49.81
Huehuetenango									298.40	100.00	153.28	51.37

8.4 Tamizaje fitoquímico:

8.4.1 Alcaloides:

8.4.1.1 Ensayo semimicro

En la prueba de alcaloides se formó un precipitado en los nueve extractos analizados muestras que dieron positivo para esta prueba, (Tabla 2).

Muestra	Mayers	Dragendoff	Wagner	Testigo
Rizoma de El Quiché	++	++	++	--
Escama de El Quiché	++	++	++	--
Rizoma de Guatemala	++	++	++	--
Escama de Guatemala	++	++	++	--
Rizoma de Jalapa	++	++	++	--
Escama de Jalapa	++	++	++	--
Rizoma de Baja Verapaz	++	++	++	--
Escama de Baja Verapaz	++	++	++	--
Rizoma y Escama de Huehuetenango	++	++	++	--
Atropina	+++	+++	+++	--

Tabla 2. Prueba de alcaloides en muestras de *P. pseudoaureum*

8.4.1.2 Cromatografía en capa fina:

Para la prueba de cromatografía en capa fina se utilizaron los estándares de atropina que presentó R_f 's de 0.35, papaverina con R_f 's de 0.55, y reserpina con R_f 's de 0.52, las nueve muestras presentaron bandas con R_f en 0.35 (Tabla 3, fig 1 y 2 anexos).

Tabla 3. Alcaloides de *P. pseudoaureum* por cromatografía en capa fina:.

Fase móvil: acetato de etilo, tolueno, dietilamina (4:12:2)

Detección: Dragendorff

Muestra	R_f	Coloración
Rizoma de Quiché	0.35	Naranja
Escama de Quiché	0.35	Naranja
Rizoma de Guatemala	0.35	Naranja
Escama de Guatemala	0.35	Naranja
Rizoma de Jalapa	0.35	Naranja
Escama de Jalapa	0.35	Naranja
Rizoma de Baja Verapaz	0.35	Naranja
Escama de Baja Verapaz	0.35	Naranja
Rizoma y Escama de Huehuetenango	0.35	Naranja
Estándar Atropina	0.35	Naranja
Estándar Papaverina	0.55	Naranja
Estándar Reserpina	0.52	Naranja

8.4.2 Taninos

8.4.2.1 Prueba semimicro de identificación de taninos:

Para la investigación de taninos las nueve muestras estudiadas de *P. pseudoaureum* dieron positivo con intensidades similares para los tres ensayos realizados, (Tabla 4).

Tabla 4. Taninos de *P. pseudoaureum* por tres métodos.

Muestra	Testigo Acido tánico	Gelatina al 1 %	Gelatina-sal (1%, 10 %)	Cloruro férrico al 10 %
Rizoma de El Quiché	+++	+	++	+++
Escama de El Quiché	+++	+	++	+++
Rizoma de Guatemala	+++	+	++	+++
Escama de Guatemala	+++	+	++	+++
Rizoma de Jalapa	+++	+	++	+++
Escama de Jalapa	+++	+	++	+++
Rizoma de Baja Verapaz	+++	+	++	+++
Escama de Baja Verapaz	+++	+	++	+++
Rizoma y Escama de Huehuetenango	+++	+	++	+++

(-): No presenta precipitado

(+): Ligero precipitado

(++): Formación de flóculo

(+++): Formación abundante de precipitado

8.4.3 Flavonoides:

8.4.3.1 Identificación de flavonoides por cromatografía en capa fina:

Para la identificación de flavonoides por cromatografía en capa fina se utilizaron los estándares de rutina con una mancha de R_f 0.41 y quercetina que presentó un R_f de 0.99.

Las muestras que presentaron bandas con Rf similares a rutina fueron los rizomas de El Quiché, Jalapa y Huehuetenango. En cuanto a las escamas provenientes de El Quiché (Tabla 5, esquema 4 anexos) todas las bandas presentaron coloración similar a rutina.

Las escamas provenientes de El Quiché, Jalapa y Baja Verapaz presentaron bandas con Rf similar a quercetina (Tabla 5, fig. 4 anexos). Todas las bandas presentaron coloración similar a quercetina.

Tabla 5. Flavonoides de *P. pseudoaureum* por cromatografía en capa fina.

Fase móvil: n-butanol, ácido acético glacial, agua (40:10:50)

Detección: reactivo de productos naturales.

Muestra	RF	Coloración
Rizoma de El Quiché	0.45, 0.64	Naranja
Escama de El Quiché	0.39 1.00	Naranja Naranja fluorescente
Rizoma de Guatemala	0.88	Verde claro
Escama de Guatemala	0.00	No presento ninguna coloración
Rizoma de Jalapa	0.41, 0.57, 0.91, 0.95	Naranja Verde claro Verde claro Verde claro
Escama de Jalapa	1.00	Naranja fluorescente
Rizoma de Baja Verapaz	0.56	Verde claro
Escama de Baja Verapaz	1.00	Naranja fluorescente
Rizoma y Escama de Huehuetenango	0.44, 0.56, 0.88, 0.92	Naranja Verde claro Verde claro Verde claro
Rutina	0.41	Naranja
Quercetina	0.99	Naranja fluorescente

8.4.4 Saponinas:

8.4.4.1 Prueba de espuma:

La identificación semimicro de saponinas, los extractos de las nueve muestras de *P. pseudoaureum* presentaron abundante espuma que permaneció por lo menos después de 2 horas, (Tabla 6).

Tabla 6. Saponinas de *P. pseudoaureum* por la prueba de espuma.

Muestra	Espuma después de 2 horas
Rizoma de El Quiché	+++
Escama de El Quiché	+++
Rizoma de Guatemala	+++
Escama de Guatemala	+++
Rizoma de Jalapa	+++
Escama de Jalapa	+++
Rizoma de Baja Verapaz	+++
Escama de Baja Verapaz	+++
Rizoma y Escama de Huehuetenango	+++
Estandar de saponinas	+++

8.4.4.2 Identificación de saponinas por cromatografía en capa fina:

Se utilizó como referencia el estándar de saponinas, el cual presentó un Rf de 0.75 y una coloración violeta. Las muestras que presentaron bandas con Rf de 0.75 fueron las escamas de El Quiché, Guatemala y Jalapa; los rizomas de Baja Verapaz, El Quiché y Guatemala presentaron bandas con Rf de 0.76; y los rizomas de Jalapa y Huehuetenango y la escama de Baja Verapaz presentaron bandas con Rf de 0.72. Todas las muestras presentaron bandas de color violeta en la región visible (Tabla 7, fig. 5 y 6 anexos).

Tabla 7. Saponinas de *P. pseudoaureum* por cromatografía en capa fina.

Fase móvil: cloroformo metanol (95:5)

Detección: ácido sulfúrico, vainillina.

Muestra	RF	Coloración
Rizoma de El Quiché	0.76	Violeta
Escama de El Quiché	0.75	Violeta
Rizoma de San José Pinula	0.76	Violeta
Escama de San José Pinula	0.75	Violeta
Rizoma de Jalapa	0.72	Violeta
Escama de Jalapa	0.75	Violeta
Rizoma de Baja Verapaz	0.75	Violeta
Escama de Baja Verapaz	0.72	Violeta
Rizoma y Escama de Huehuetenango	0.72	Violeta
Estandar de saponinas	0.75	Violeta

8.4.5 Sesquiterpenlactonas

8.4.5.1 Identificación por cromatografía en capa fina :

Para la identificación de sesquiterpenlactonas se utilizó el estándar de *Neurolaena lobata* el cual presentó Rf's de 0.4, 0.56, 0.70, 0.74, 0.80 y 0.90. La muestra de el rizoma de El Quiché presentó los Rf's de 0.30, 0.50 y 0.90, la mancha de la escama de El Quiché presentó cuatro RF's los cuales fueron 0.30, 0.50 ,0.70, 0.74 y 0.90, la muestra de el rizoma de Guatemala presentó los siguientes Rf's 0.30, 0.5 y 0.90 la muestra de la escama de Guatemala presentó manchas con los siguientes Rf's 0.22, 0.30, 0.52, 0.70, 0.74 y 0.90, la muestra de el rizoma de Jalapa presentó manchas con Rf's de 0.30 y 0.90 la muestra de escama de Jalapa presentó los siguientes Rf's 0.30, 0.52 ,0.70, 0.74 y 0.90, la muestra de el rizoma proveniente de Baja Verapaz presentó los siguientes Rf's 0.30, 0.50 y 0.90, la escama de Baja Verapaz presentó bandas con Rf's de 0.30, 0.52, 0.74, 0.90, 0.92, la muestra de Huehuetenango presentó las siguientes bandas con Rf's de 0.30, 0.52, 0.90,

0.92 en todas las muestras presentaron manchas de color café lo que demuestra la presencia de estos metabolitos secundarios (Tabla 8, fig 7 y 8 anexos).

Tabla 8. Sesquiterpenlactonas de *P. pseudoaureum* por cromatografía en capa fina .

Fase móvil: cloroformo, éter (4:1)

Detección: ácido sulfúrico, vainillina

Muestra	RF	Coloración
Rizoma de El Quiché	0.30	Café
	0.50	“
	0.90	“
Escama de El Quiché	0.30	Café
	0.50	“
	0.70	“
	0.74	“
	0.90	“
Rizoma de Guatemala	0.30	Café
	0.50	“
	0.90	“
Escama de Guatemala	0.22	Café
	0.30	“
	0.52	“
	0.70	“
	0.74	“
	0.90	“
Rizoma de Jalapa	0.30	Café
	0.90	“
Escama de Jalapa	0.30	Café
	0.52	“
	0.70	“
	0.74	“
	0.90	“
Rizoma de Baja Verapaz	0.30	Café
	0.50	“
	0.90	“
Escama de Baja Verapaz	0.30	Café
	0.52	“
	0.74	“
	0.90	“
	0.92	“
Rizoma y Escama de Huehuetenango	0.30	Café
	0.52	“
	0.90	“
	0.92	“

<i>Neurolaena lobata</i>	0.40	Café
	0.56	“
	0.70	“
	0.74	“
	0.80	“
	0.90	“

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los porcentajes de rendimiento de los extractos de los rizomas de las cinco regiones analizadas fueron bastante altos, hasta de un 51.37 por ciento para las muestras provenientes de Huehuetenango, aunque este valor pudo haber sido elevado ya que fue la primera muestra a analizar y no se separó la escama del rizoma. De los rizomas provenientes de El Quiché y Jalapa se obtuvieron porcentajes similares, los cuales fueron de 46.31 y 44.51 por ciento respectivamente; los rizomas de Guatemala y Baja Verapaz fueron similares pero de menor rendimiento los cuales fueron de 35.57 y 37.90 por ciento, como lo muestra la Tabla 1.

Se observó que el extracto de la escama de Guatemala fue el que tuvo mayor rendimiento con un 16.18 por ciento, al cual le siguió Baja Verapaz y luego de forma similar los extractos de las pelusas de El Quiché y Jalapa. Como se puede observar en la Tabla 1 los rendimientos de los extractos de las escamas se comportaron de manera inversamente proporcional a los rendimientos de los rizomas.

Al hacer la suma de los extractos correspondientes a los rizomas y las escamas de las cinco muestras se puede observar que hay mayor semejanza entre los rendimientos de los mismos obteniéndose una diferencia entre el mayor y el menor de un 5.55 por ciento únicamente, lo que muestra que no existe mayores diferencias en cuanto al porcentaje de rendimiento de los extractos de metabolitos secundarios en las cinco muestras analizadas.

La diferencia entre los rendimientos de rizoma y escama demuestra que se obtiene mayor cantidad de metabolitos secundarios del rizoma ya que este tiene mayor volumen y densidad para el almacenamiento de los mismos que las escamas.

Como se reporta en la literatura la prueba de alcaloides tanto preliminar como por cromatografía en capa fina evidenció la presencia de estos metabolitos, todas las muestras

presentaron un R_f parecido al de la atropina por lo que se puede considerar la posibilidad de que estas muestras contengan alcaloides de este tipo.

Por la formación de precipitado en la prueba de identificación de taninos se puede confirmar la presencia de los mismos en las nueve muestras analizadas, lo cual se esperaba ya que está reportado por la literatura.

Como se puede observar en la Tabla 5, la escama y el rizoma del El Quiché presentan flavonoides similares a la rutina que pertenecen al grupo de los flavonoles, pero el rizoma presenta otra banda que mostró un R_f de 0.64 que es otro tipo de flavonoide, la diferencia entre el rizoma y la escama de El Quiché es que la escama presenta flavonoides del tipo de quercetina el cual pertenece al grupo de los flavonoles y el rizoma no.

En cuanto al rizoma de Guatemala solo presentó una banda que no pertenece a ninguno de los estandares utilizados y la escama no presento ningún tipo de flavonoide. En el caso de la muestra proveniente de Jalapa, el rizoma presenta la banda que pertenece al estándar de rutina más tres bandas pertenecientes a otro tipo de flavonoide, la escama presenta únicamente la banda que pertenece al estándar de quercetina, lo que demuestra que hay diferencias entre el rizoma y escama de Jalapa en el almacenamiento de estos metabolitos secundarios.

Con respecto al rizoma de Baja Verapaz esta presenta solo una banda de flavonoide no identificado y la escama presenta únicamente la banda perteneciente a quercetina, por lo que se evidencia que la muestra proveniente de Baja Verapaz solo contiene 1 de los 2 tipos de flavonoides estudiados.

En cuanto a la muestra de Huehuetenango esta presenta rutina, quercetina y tres bandas de un flavonoide no identificados. Las cinco muestras presentaron flavonoides como se esperaba ya que esta reportado en la literatura la existencia de estos metabolitos en *P. pseudoaureum*.

En la identificación de saponinas todas las muestras presentaron Rf similares a los del estándar por lo que se puede afirmar que tanto rizomas como escamas contiene y almacenan saponinas.

Para la prueba de sesquiterpenlactonas se utilizó como estándar el extracto de *Neurolaena lobata* la cual sí presenta principios amargos. Todas las muestras de *P. pseudoaureum* presentaron sesquiterpenlactonas, las cuales se identificaron por las manchas color café que indican positivo para estos metabolitos, pero ninguno coincidió con los Rf's de *Neurolaena lobata*. Las escamas de las muestras estudiadas presentaron todas cinco Rf's iguales a diferencia que los rizomas solo presentaron tres Rf's muy parecidos por lo que se puede decir que las escamas contienen dos tipos de sesquiterpenlactonas que el rizoma no contiene. La presencia de estos metabolitos en *P. pseudoaureum* esta confirmado por la literatura

Como los rizomas y escamas contienen diferentes metabolitos secundarios según los estudios realizados, éstos deben ser utilizados como materia médica sin distinción ya que se complementan con la presencia de los mismos.

Con el presente trabajo se confirma que *P. pseudoaureum* de las cinco regiones analizadas contienen los cinco metabolitos estudiados, los cuales están reportados en la literatura para las especies extranjeras, por lo que esta planta puede ser utilizada y exportada sin distinción.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se identificó la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides y sesquiterpenlactonas en las cinco muestras de *P. pseudoaureum*.
- 10.2. No existen diferencias en la composición química entre las muestras de *P. pseudoaureum* de las cinco regiones estudiadas.
- 10.3. No existe diferencia entre la especie de *P. pseudoaureum* guatemalteca y las especies extranjeras, ya que se confirmó lo reportado por la literatura sobre la presencia de los cinco metabolitos analizados en su composición.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Realizar el tamizaje fitoquímico de *P. pseudoaureum* proveniente de las regiones que no se analizaron en el presente trabajo.
- 11.2 Identificar las estructuras de los metabolitos estudiados en los extractos de *P. pseudoaureum* de las diferentes regiones del país.
- 11.3 Realizar la evaluación farmacológica de los extractos de *P. pseudoaureum* con el propósito de validar las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 12.1 Alonso J. *et al.* (2003). Propiedades fotoprospectivas de un extracto hidrofílico de *P. leucotomos* en células humanas. J Phytochem. and photobio. B: Biology 70 31 – 37.
- 12.2 Antón Alvarez X, Franco A, Fernández- Novo L, Cacabelos R (1992). Effects of anapsos on Behavior and Brain cytokines in rat. Ann Psychiat 3:329-341.
- 12.3 Arteche A (1992). Fitoterapia. Vademecum de prescripción. Bilbao, CITA, 835 pp.
- 12.4 Ayres G. (1970). Análisis Químico Cuantitativo. 7ma reimpresión Harla S.A. pp184.
- 12.5 Berdy. J. Aszalo A. Bostian M McBih KL (1982). CRC Handbook of antibiotic compounds. Boca Raton CRC Pres, part I 410p part 2 pp. 429.
- 12.6 Budavari S. (1989). The Merck Index Rahway & Co, pp.1606.
- 12.7 Cáceres A. Girón L M, Martínez AM (1987). Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J. Ethopharmacol 19:233-245.
- 12.8 CEMAT- FARMAYA (1992). Fichas populares sobre plantas medicinales serie 2 Guatemala pp. 35.
- 12.9 Cuellar C. Rodero. M. Bolás F. Fernández A.(1997). El efecto del extracto de *P. leucotomos* en el anticuerpo específico producido en ratones inmunizados pro el antígeno del tercer estadio de la larva de *Anisakis simplex* Interna. J. Pharmacog. 35:153-160
- 12.10 Dea-Ayuela *et al* (1999). Modulación del anticuerpo responsable contra el parásito nemátodo *Trichinella spiralis* por anapsos Phytotherapy research phytother Res. 13:566-570.

- 12.11 Del Pino Gamboa J. De Sambricio Guiu F Colamo Gómez C (1982). Comparison of *Polypodium leucotomos* extract with placebo in 37 cases of psoriasis. *Med cutánea Ibero -latinoamericana* 10:203-208
- 12.12 Díaz AN, Titus T (1990). Etnobotánica de uso medicinal en el altiplano occidente de Guatemala Departamento de San Marcos, Memorias V Seminario Nacional Plantas Medicinales, Guatemala, CONAPLAMED pp. 17 – 21.
- 12.13 Díaz JL (1976). Usos de las plantas medicinales de México. México, IMEPLAM, pp. 329.
- 12.14 Fernández D Brieva A Prieto P. Alfonso, M., Guerrero A, Plivel JP (1992). Immunosuppressive and pharmacologically active compounds from *Polipodium leucotomos* L. Book of Abstracts WOCMAP, Maastricht pp. 35.
- 12.15 Fuller JH (1976). Botánica General México 5ta ed. CECST pp. 229-232.
- 12.16 Girón LM, Martinez V. (2,001). Buenas Prácticas de agricultura en el Cultivo, Cosecha y postcosecha de Plantas Medicinales. En: Manual para el Funcionamiento de Formulario de Plantas Medicinales. Guatemala: CONAPLAMED. pp 6-10,47.
- 12.17 Glasby JS (1991). Dictionary of plant containing secondary metabolites. London, Taylor & Francis, pp. 259.
- 12.18 Grainge M, Ahmed S (1988). Handbook Plant with pest- control properties N.Y. John Wiley & Son, pp. 470.
- 12.19 Hartwell JL (1982). Plant used against cancer Lawrence, Quaterman Publications pp. 386
- 12.20 Hirschhorn HH (1981). Botanical remedies of south and C.A. and the Caribbean; an Archival analysis, Part I. J. Ethopharmacol. 4: pp. 129 – 158
- 12.21 Horvath A. Alvarado F szocs J de Alvarado ZN, Padilla G (1967). Metabolic effects of calagualine, an antitumoral saponin of *polypodium leucotomos*, nature 214:1256-1258.
- 12.22 House P- Lagos Witte (1989). Manual de 50 plantas Medicinales de Honduras. Tegucigalpa CONs – H/CIIR/UNAH. Pp. 42.
- 12.23 IIN (1978). Aspectos de la Medicina popular en el área rural de Guatemala, Guatemala Indígena 13:1-616.

- 12.24 Jiménez D, Naranjo R, Doblarè E, Muñoz C , Vargas JF (1987). Anapsos, an antiposriasis drug in atopic dermatitis, *Allergol Immunopathol* 15 :185-189.
- 12.25 Martínez M (1992). Las plantas medicinales de México. México Ed. Botas :55.
- 12.26 Martínez R Herrera M. Castillo J J Carrillo E Villatoro E et Al (1990). Plantas Medicales utilizadas en el área mam de Huehuetenango parte I Memorias V congreso Nacional Plantas Medicinales, Guatemala pp.22 – 32.
- 12.27 Medinilla B (1993). Manual de Laboratorio de Fitoquímica USAC Guatemala pp. 29.
- 12.28 Mejia JV (1927). Geografía de la República de Guatemala, Guatemala, Tipografía Nacional, pp. 141.
- 12.29 Moran,R. (1996). Polypodiaceae. En : Davidse, G.; Sousa, M & Chater, A. (Eds) Flora Mesoamericana. Vol. 5 Universidad Nacional Autonoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México p. 130-133.
- 12.30 Morton JF (1977). Some folk-medicine plants of Central America markets. *Quart. J. Crude Drug* 15:165-192.
- 12.31 Morton JF (1981). Atlas of medicinal plants of middle America Springfield, Charles C. Thomas pp. 12.
- 12.32 Nelson CH (1986). Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa, Ed Universitaria pp. 225.
- 12.33 Padilla HC, Lainez H Pacheco JA (1974). A new agent (Hydrophilic fraction of *polypodium leucotomos*) for management of psoriasis. *Int J Dermatol* 13:276-282.
- 12.34 Padilla HC, Mathak MH, Fitz Patrick TB (1994). Oral and topical difurf polypodium L) in the therapy of vitiligo. *Int Cong Dermatol New Delhi*.
- 12.35 Pineiro, Alvarez B (1983). Two year personal experience in the treatment of various forms of psoriasis with *polypodium leucotomos* extract. *Med cutánea Iberolatinoamericana* 11:6572.
- 12.36 Planter (1989). Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. San Salvador, Universidad de El Salvador, pp. 468.
- 12.37 Punzón C. et al (2003). Actividad antiinflamatoria In vitro de *P. decumanum* Modulación del factor de tumor necrótico, receptores soluble TNF. *Internat Immunopharmacol* 3:1293-1299.

- 12.38 Roque JM (1941). Flora Médico Guatemalteca. Guatemala. Tipografía Nacional, pp. 187.
- 12.39 Santa Cruz L (1986). Manual Selección Fitoquímica : Guía practica para los laboratorios de Química de productos naturales fitoquímicos USAC Guatemala pp. 26.
- 12.40 Sharapin Nikolai. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Bogota.
- 12.41 Skoog D. (1985). Análisis Instrumental. 2da ed. Trad. Mario Calcagno. Mexico pp736-743.
- 12.42 Skoog D. (1994). Analisis Instrumental. 4ta ed. Editorial Mc Graw-Hill. Mexico. Pp 771-75.
- 12.43 Stolze RG (1981). Fems and Ferm Allies of Guatemala Fieldiana. Botany New series 6:374 – 377.
- 12.44 Treanse Evans (1991). Farmacognosia 13 ed Mexico Interamericana McGraw Hill pp 261-280.
- 12.45 Tuominen M Bohlin L, Lindbom L-O, Rolfsen W. (1991). Enhancing effect of calaguala on the prevention of rejection on skin transplants in mice o phytother res 5:234-236.
- 12.46 Tuominen M, Bohlin L, Rolfsen W (1992). Effects of calaguala and an active principle, adenosine on platelet activating factor. Plante Medical 58 :306-310.
- 12.47 Vargas J, García E, Gutiérrez F, Osorio C (1981). Síntesis de ácidos nucleicos y niveles de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento in vitro con anapsos. Arch Facultad de Medicina. Madrid 40:3946.
- 12.48 Vargas J. Muñoz C, Orosio C, García Olivares E (1983). Anapsos, an antisoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells inhuman peripheral blood. Ann Inst Pasteur Immunol 134:393-400.
- 12.49 Veliz M (1983). Acción Diurética de algunas plantas de Guatemala, Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación Químico Farmacéutico.
- 12.50 Villar AL (1998). La flora silvestre de Guatemala. Editorial Universitaria USAC Guatemala pp. 3-4,7.

- 12.51** Wagner, H. S. Blatt, EM. Zgainski.(1984). Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas. Springer- Verlag. Berlin Heidelberg N.Y Tokyo. pp. 225-226.
- 12.52** White A (1985). Hierbas del Ecuador, Quito Ed. Librí Mundi pp. 379.
- 12.53** Word Health Organization. (2,000). Quality Control Methods for Medicinal Plant Material . Geneva: WHO . pp9-18, 88.

13. ANEXOS



CALAHUALA

Phlebodium pseudoaureum (Cav.) Lellinger
(Polypodiaceae)
Polipodio

ALCALOIDES

FIGURA 1: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

No	Muestra
1	Rizoma de Quiché
2	Escama de Quiché
3	Rizoma de Guatemala
4	Escama de Guatemala
5	Rizoma de Jalapa
6	Escama de Jalapa
7	Rizoma de Baja Verapaz
8	Escama de Baja Verapaz
9	Rizoma y Escama de Huehuetenango
A	Estándar Atropina
P	Estándar Papaverina
R	Estandar Reserpina

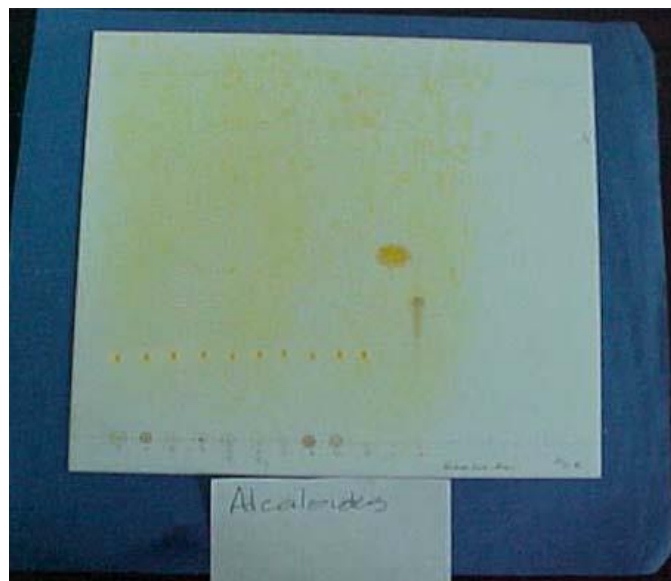
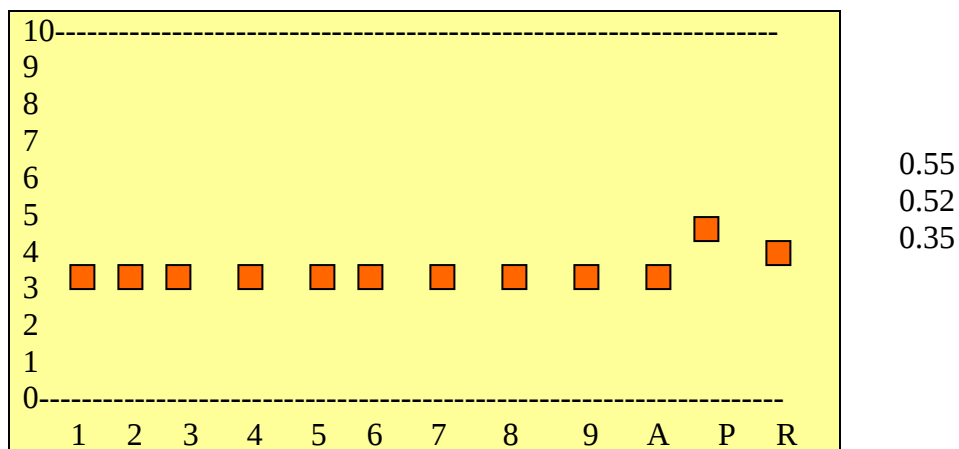


FIGURA 2: ESQUEMA DE CROMATOGRAMA DE ALCALOIDES



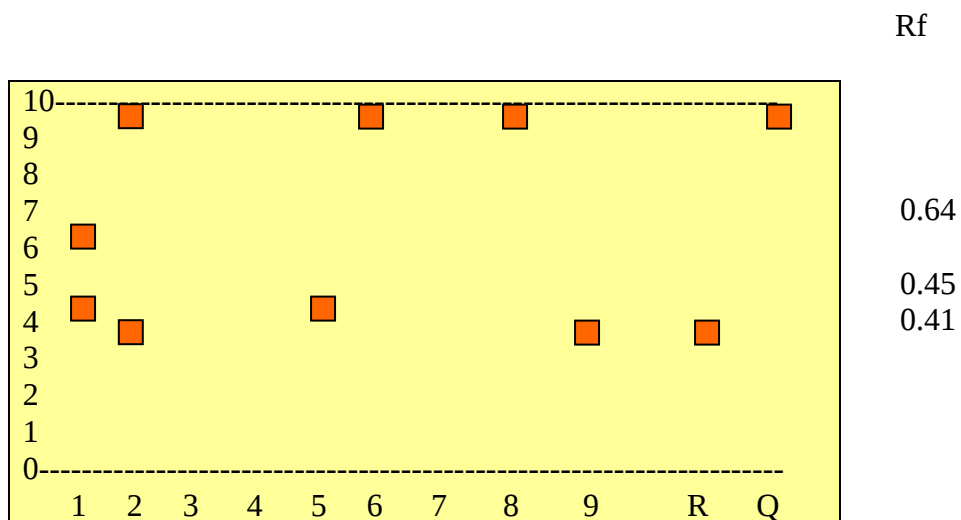
Rf

FLAVONOIDES

FIGURA 3: CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

No	Muestra
1	Rizoma de Quiché
2	Escama de Quiché
3	Rizoma de Guatemala
4	Escama de Guatemala
5	Rizoma de Jalapa
6	Escama de Jalapa
7	Rizoma de Baja Verapaz
8	Escama de Baja Verapaz
9	Rizoma y Escama de Huehuetenango
P	Estándar Papaverina
R	Estandar Reserpina

FIGURA 4: ESQUEMA DE CROMATOGRAMA DE FLAVONOIDES



1.00

SAPONINAS

FIGURA 5: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

No	Muestra
1	Rizoma de Quiché
2	Escama de Quiché
3	Rizoma de Guatemala
4	Escama de Guatemala
5	Rizoma de Jalapa
6	Escama de Jalapa
7	Rizoma de Baja Verapaz
8	Escama de Baja Verapaz
9	Rizoma y Escama de Huehuetenango
P	Estándar de saponinas

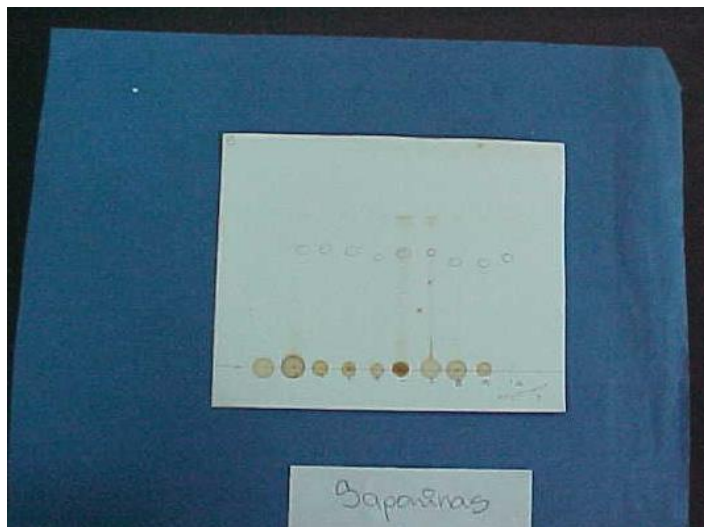
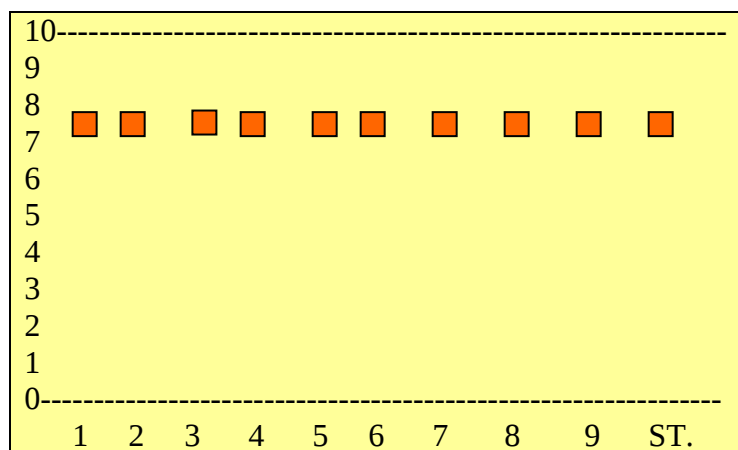


FIGURA 6: ESQUEMA DE PLACA DE SAPONINAS



0.75

**SESQUITERP
ENLACTONA
S**

Rf

FIGURA 7: CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

No	Muestra
1	Rizoma de Quiché
2	Escama de Quiché
3	Rizoma de Guatemala
4	Escama de Guatemala
5	Rizoma de Jalapa
6	Escama de Jalapa
7	Rizoma de Baja Verapaz
8	Escama de Baja Verapaz
9	Rizoma y Escama de Huehuetenango
NL	<i>Neurolaena lobata</i>

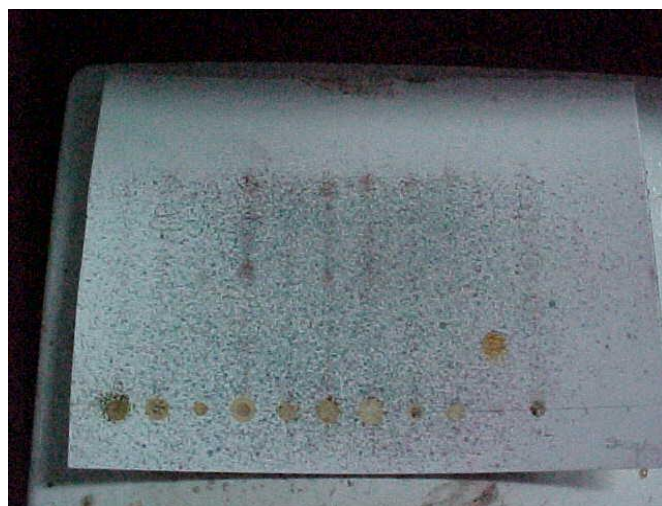


FIGURA 8: ESQUEMA PLACA DE SESQUITERPENLACTONAS

