

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADOS**

**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**

**Francisco David Aldana Cerna**

**MAESTRÍA MULTIDISCIPLINARIA EN PRODUCCIÓN Y USO DE  
PLANTAS MEDICINALES**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2,007**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADOS**

**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**

**Informe de tesis  
Presentado por**

**Francisco David Aldana Cerna**

**Para optar al título de**

**MAESTRÍA MULTIDISCIPLINARIA EN PRODUCCIÓN Y USO DE  
PLANTAS MEDICINALES**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2,007**

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

## **JUNTA DIRECTIVA**

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>Óscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.</b>             | <b>DECANO</b>     |
| <b>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto</b>               | <b>SECRETARIO</b> |
| <b>Licda. Lilliam Raquel Irving Antillón, M.A.</b> | <b>VOCAL I</b>    |
| <b>Licda. Liliana Vides de Urizar</b>              | <b>VOCAL II</b>   |
| <b>Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez</b>    | <b>VOCAL III</b>  |
| <b>Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso</b>        | <b>VOCAL IV</b>   |
| <b>Br. José Juan Vega Pérez</b>                    | <b>VOCAL V</b>    |

## **CONSEJO ACADÉMICO SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**Óscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.**

**Anne Liere de Godoy, M.Sc.**

**Dr. Jorge Luís de León Arana**

**Dr. Jorge Erwin López Gutiérrez**

**Félix Ricardo Véliz Fuentes, M.Sc.**

## Dedicatoria

Dedico a mis seres queridos, el esfuerzo que ha representado el tiempo invertido y el empeño puesto para alcanzar este reconocimiento académico. Ellas y ellos han sido el motivo y el apoyo, el ejemplo y el impulso, para emprender y concluir esta travesía del conocimiento. Les expreso que el tiempo que le he restado a nuestra convivencia, hoy rinde su primer logro, de cuya satisfacción, quiero hacerles partícipes; particularmente a:

*Ofelia*, mi adorada Madre; luminaria del firmamento, ejemplo de amor y entrega.

*Paco*, mi afectivo y estoico Padre; por su gran amor por la vida y la naturaleza.

*Alice*, la mujer con quien compartimos la vida; por su amor, comprensión y paciente apoyo en la consecución de este objetivo.

*David*, nuestro querido hijo; a quien especialmente dedico este momento por haberme prestado sin reclamo, buena parte del tiempo que le correspondía.

*A mis hermanas, cuñados sobrinas y sobrinos*. Con agrado y especial cariño, pues los logros de cada uno, siempre han sido compartidos.

*A mis familiares y amigos*; por el gran afecto que nos une.

*A mis compañeros de promoción*, por el apoyo incondicional.

*A mi patria Guatemala*; en cuyo seno alberga y produce los recursos que constituyen la fuente de salud, en este escenario de la medicina natural.

A todas aquellas personas que creen, practican o se han esforzado por mantener vigente el enfoque natural, como una actitud sensata en la procura de la salud.

La naturaleza es el gran  
médico y el hombre posee  
a este en sí mismo.

*Paracelso*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios Creador de la naturaleza, eterna y generosa fuente de sabiduría, equilibrio y armonía.* Gracias por haberme dado la oportunidad de participar y concluir esta etapa de preparación académica

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Química y Farmacia. Centro facilitador del proceso de enseñanza aprendizaje.

A Licenciado Benito Soler. Padrino de Promoción y Catedrático. Sincero agradecimiento por sus enseñanzas y el estímulo recibido.

A Licenciada Sully Cruz M.A. Asesora en la realización del presente trabajo de investigación. Gracias por su valiosa colaboración, orientación y apoyo.

A Licenciado Rodolfo Orozco M.A. y Licenciado Rony Ayala, Revisores del documento final. Gracias por los valiosos aportes recibidos de su experiencia, los que contribuyeron a mejorar la estructura y presentación del estudio.

Al Claustro de Catedráticos y especialmente al Licenciado Armando Cáceres, por sus enseñanzas en el área de Fitoterapia.

A todas aquellas personas de quienes recibí el apoyo oportuno a lo largo de mi trayectoria estudiantil.

"La naturaleza es una esfera infinita cuyo centro está en todas partes y su circunferencia en ninguna."

**Pascal**

| <b>INDICE GENERAL</b>  | Pag. |
|--|------|
| INDICE DE TABLAS   | iii  |
| INDICE DE FIGURAS  | iv   |
| RESUMEN  | vi   |
| <br>   |      |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 1    |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA  | 2    |
| 3. JUSTIFICACIÓN   | 2    |
| 4. MARCO TEÓRICO   | 3    |
| 4.1 LA FAMILIA POLYPODIACEAE   | 3    |
| 4.2 DESCRIPCIÓN DE GÉNEROS Y ESPECIES INVOLUCRADAS<br>EN EL ESTUDIO  | 3    |
| 4.2.1 Género <i>Phlebodium</i>   | 3    |
| 4.2.2 <i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm.  | 4    |
| 4.2.3 <i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Cav.) Lellinger  | 4    |
| 4.2.4 Género <i>Polypodium</i>   | 5    |
| 4.2.5 <i>Polypodium triseriale</i> SW.   | 5    |
| 4.3 LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LOS FLAVONOIDES   | 6    |
| 4.4 ALGUNAS APLICACIONES DE LOS FLAVONOIDES  | 8    |
| 4.5 CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LAS CALAGUALAS  | 9    |
| 4.6 ANTECEDENTES   | 9    |
| 5. OBJETIVOS   | 11   |
| 5.1 GENERAL  | 11   |
| 5.2 ESPECÍFICOS  | 11   |
| 6. HIPÓTESIS   | 12   |
| 7. METODOLOGÍA   | 12   |
| 7.1 RECOLECCIÓN Y SECADO DE MUESTRAS   | 12   |
| 7.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS   | 13   |
| 7.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA   | 13   |
| 7.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES<br>EXPRESADOS COMO QUERCETINA (%)  | 15   |
| 7.4.1 Proceso de Extracción  | 15   |
| 7.4.2 Detección por Espectrofotometría UV-visible  | 16   |
| 7.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN   | 17   |
| 8. RESULTADOS  | 18   |
| 8.1 SECADO DE MUESTRAS Y CONTENIDO DE HUMEDAD  | 18   |
| 8.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA   | 19   |
| 8.2.1 Capa Fina 1  | 19   |
| 8.2.2 Capa Fina 2  | 22   |
| 8.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS<br>COMO QUERCETINA (%)  | 25   |
| 8.4 RESULTADOS GENERALES DE LA CUANTIFICACIÓN DE<br>FLAVONOIDES TOTALES DE LAS FRONDAS DE CALAHUALAS,<br>EXPRESADOS COMO QUERCETINA EN % | 29   |

|  |    |
|--|----|
| 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS   | 30 |
| 9.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA   | 30 |
| 9.1.1 Capa fina 1(frondas)   | 30 |
| 9.1.2 Capa fina 2 (rizomas)  | 31 |
| 9.1.3 Comentarios generales de las capas finas 1 y 2   | 32 |
| 9.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS<br>COMO QUERCETINA (%)                            | 33 |
| 10. CONCLUSIONES   | 34 |
| 11. RECOMENDACIONES  | 35 |
| 12. BIBLIOGRFIA  | 36 |
| 13. ANEXOS   | 39 |
| ANEXO 1. COLECCIÓN DE CALAHUALAS Y PLANTAS<br>COSECHADAS (Figuras 1, 2, 3 y 4)                         | 40 |
| ANEXO 2. EQUIPO EMPLEADO EN EL SECADO DE LAS<br>MUESTRAS Y EXTRACCIÓN POR REFLUJO (Figuras 5, 6 y 11). | 42 |

| <b>INDICE DE TABLAS</b>  |  | Pag. |
|--|--|------|
| <b>TABLA 1.</b> Contenido de humedad de frondas y rizomas después de su tratamiento en el secador; medido con la balanza de humedad. |  | 18   |
| <b>TABLA 2.</b> Rfs encontrados en las bandas producidos por los extractos de frondas.   |  | 22   |
| <b>TABLA 3.</b> Rfs encontrados en las bandas producidos por los extractos de rizomas.   |  | 25   |
| <b>TABLA 4.</b> Contenido de flavonoides totales expresados como Quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo.     |  | 29   |



| <b>INDICE DE FIGURAS</b>  | <b>Pag.</b> |
|---|-------------|
| <b>FIGURA 1 “A”.</b> Panorámica de la colección de Calagualas, de donde fueron obtenidas las muestras para el presente estudio.   | 40          |
| <b>FIGURA 2 “A”.</b> <i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Cav.) Lellinger. A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros. C. Identificada con el número 89, fue colectada en Montaña Suchitán, Santa Catarina Mita, del departamento de Jutiapa. | 40          |
| <b>FIGURA 3 “A”.</b> <i>Polypodium triseriale</i> Swartz. A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. Identificada con el número 99, fue colectada en la Aldea El Milagro, Izabal. C. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros.  | 41          |
| <b>FIGURA 4 “A”.</b> <i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm. A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. Identificada con el número 115, fue colectada en cerca de Ziquín Zacán, Petén, en palmas de corozo. C. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros.                      | 41          |
| <b>FIGURA 5 “A”.</b> A. Muestra el equipo de secado. B. puede observarse a la derecha en verde, la temperatura de secado (45 °C). C. Condiciones del interior de la cámara de secado con 3 tramos, donde se colocaron rizomas y frondas por especie.  | 42          |
| <b>FIGURA 6 “A”.</b> Balanza de humedad. A. muestra pesando 0.514 gramos lista para ser analizada. B. pérdida porcentual de humedad después de 15 minutos a 105 °C (6.61 %), valor que refleja el contenido de humedad de la muestra; en este caso corresponde al rizoma de <i>Polypodium triseriale</i> .                | 42          |
| <b>FIGURA 7.</b> Fotografía de la capa fina 1. Se hacen evidentes las bandas de las frondas y manchas de los estándares, mientras que las de los rizomas no aparecen con claridad.  | 19          |
| <b>FIGURA 8.</b> Interpretación de la cromatoplaqueta 1. Únicamente se presentan la parte correspondiente a las siembras de las frondas.  | 21          |
| <b>FIGURA 9.</b> Fotografía de la capa fina 2. Se aprecian las bandas de los rizomas y manchas de los estándares, aunque su definición es inferior a la de las bandas de las frondas, aun después de haber concentrado el extracto.   | 22          |
| <b>FIGURA 10.</b> Interpretación de la cromatoplaqueta 2 correspondiente a las siembras de los rizomas.   | 24          |

\*Figuras identificadas con “A”, se ubican en anexos.

|   | Pag. |
|---|------|
| <b>FIGURA 11 “A”.</b> Preparación de muestras para determinación del contenido total de flavonoides. A, reflujo de la droga vegetal. B, extracción con acetato de etilo.                                | 43   |
| <b>FIGURA 12.</b> Espectro de frondas de <i>Phlebodium pseudoaureum</i> identificada con el número 89. Nótese que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.50931.        | 26   |
| <b>FIGURA 13.</b> Espectro de frondas de <i>Polypodium triseriale</i> identificada con el número 99. Puede apreciarse que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.32195 | 27   |
| <b>FIGURA 14.</b> Espectro de frondas de <i>Phlebodium decumanum</i> identificada con el número 115. Obsérvese que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.51670.       | 28   |

**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**

**RESUMEN**

En las especies *Phlebodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaureum* y *Polypodium triseriale*, pertenecientes a una colección de helechos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se evaluó la presencia de 9 compuestos fenólicos, 7 pertenecientes a la familia de los flavonoides (Rutina, Hyperósido, Quercetina, Quercitrina, Naringina, Naringenina y Kaempferol) y 2 correspondientes a la serie cinámica de la sub familia de los Ácidos Benzóicos, que forman parte la familia de los no flavonoides (Ácido Caféico y Ácido Clorogénico). Inicialmente se realizó una extracción metanólica a 60 °C de un gramo de muestra vegetal seca, tanto de frondas como de rizomas, para obtener 6 extractos en total (2 de cada especie correspondientes a rizoma y fronda). Con los extractos obtenidos se corrieron las placas de cromatografía en capa fina, comparándolos con los estándares de los referidos compuestos fenólicos. A continuación se realizó un procedimiento de extracción por reflujo, con acetona y otros reactivos, partiendo nuevamente de droga vegetal seca; mediante una serie de lavados, se obtuvieron las muestras para realizar la determinación espectrofotométrica de flavonoides totales, de acuerdo al procedimiento referido por la Farmacopea Brasileña.

En las frondas se detectó: Rutina, Hyperósido, Quercitrina y Ácido Clorogénico en las 3 especies. Para el caso de los rizomas, se detectó Ácido Clorogénico en las 3 especies evaluadas; adicionalmente, *Polypodium triseriale* registró presencia de Hyperósido y *Phlebodium decumanum* presencia de Rutina.

El estudio de cuantificación de flavonoides totales de las frondas, expresados como Quercetina, reportó el mayor contenido para *Phlebodium pseudoaureum* con 1.8094 %; *Phlebodium decumanum* mostró 1.7524% y *Polypodium triseriale*, registró el menor valor con 1.1404%. Los extractos de rizomas no registraron niveles medibles de flavonoides con la metodología empleada.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, ha cobrado vigencia y gran interés, la utilización de los productos naturales, dentro de los cuales se encuentran las plantas medicinales, no solo para tratar padecimientos ya existentes, si no también para prevenir la aparición de los desórdenes de la salud; esto, fundamentalmente guiado por la existencia de numerosas evidencias de su actividad terapéutica y porque en la mayoría de los casos, son más seguros en función de presentar menores contraindicaciones y efectos secundarios, que los encontrados en los productos de síntesis.

La familia Polypodiaceae posee numerosas especies, varias de ellas conocidas con el nombre común de calahualas, con actividad biológica promisorias, en la que destacan sus propiedades antioxidantes, recomendándose su empleo para el tratamiento de psoriasis, eczema y recuperación física después del deporte.

La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala cuenta con una colección de varias especies de calahualas, la cual se encuentra situada en el Centro Experimental Docente. Las plantas fueron obtenidas de diferentes localidades del territorio nacional, en donde estas crecen en forma silvestre. La colección contiene 107 entradas, dentro de las que fueron seleccionadas al azar, 3 especímenes, con el criterio de que fuesen incluidas las especies *Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* y *Polypodium triseriale*, para realizar en sus extractos, la detección de compuestos fenólicos y cuantificación del total de flavonoides; constituyentes químicos de variada actividad biológica y de gran importancia para el mantenimiento de la salud. El estudio aportó información sobre el contenido de estos compuestos químicos en las 3 especies objeto de interés.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de la flora guatemalteca, cuyo origen está situado en el área mesoamericana, han llamado la atención, sobre todo en los últimos años, las especies conocidas con el nombre común de Calahualas, las cuales contemplan varios helechos de la familia Polypodiaceae. Estas especies han cobrado relevancia fundamentalmente por sus actividades inmunológicas, antitumorales y antioxidantes (1,2), así como por sus beneficios en relación con el acondicionamiento físico y la fatiga muscular. En Guatemala se han conducido algunas investigaciones sobre sus constituyentes químicos y ensayos de diferente índole, pero no se ha realizado una comparación a nivel de las especies *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger y *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Polypodium triseriale* Swartz, todas presentes en el territorio nacional.

## 3. JUSTIFICACIÓN

Los flavonoides presentes en las Calahualas son constituyentes que participan en su actividad biológica, teniendo aplicaciones diversas en la medicina, agricultura e industria. Con respecto a la salud humana, muchas de las propiedades terapéuticas encontradas en las Calahualas, corresponden a aquellas atribuidas a los flavonoides, lo cual pone a estas plantas y metabolitos en una posición de interés, ante la posibilidad de la generación de información que pueda conducirnos a entender en mejor forma su aplicabilidad y funcionalidad, en el campo de la fitoterapia y en la obtención de metabolitos aislados para propósitos particulares. Se consideró oportuno, realizar una búsqueda de compuestos fenólicos específicos, y una cuantificación del total de flavonoides de las tres especies de Calahualas, lo cual constituye un aporte para enriquecer el conocimiento en relación a su composición fitoquímica, ante el enfoque de la búsqueda de alternativas naturales, para favorecer la salud humana.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 LA FAMILIA POLYPODIACEAE

Plantas generalmente epífitas, ocasionalmente rupícolas; rizomas generalmente dorsiventrales con dos series de hojas en la superficie dorsal, larga a cortamente rastreros, escamosos, las escamas generalmente peltadas o pseudopeltadas, clatradas o no clatradas; las hojas estériles y fértiles monomorfas o dimorfas, articuladas a folípodios cortos (La articulación no es funcional en *Laxogramme*); lámina generalmente simple, pinnatisecta o 1-pinnada, raramente 1-pinnado pinnatifida a 3-pinnada o subdicotómicamente bifurcada; nervaduras libres o anastomosadas, con o sin nérvulos incluidos; soros generalmente redondeados, ocasionalmente alargados o lineares, sin inducios; esporangios con 2-3 pedículos alineados, los anillos verticales e interrumpidos en el pedículo; esporas reniformes y amarillas o (en *Lexogramme*) tetraédricas y verdes, sin una perispora prominente;  $x = 25, 34, 35, 36, 37$ . Aproximadamente 40 géneros y 600 especies. Cosmopolita.

Polypodiaceae es una familia grande y diversa que no puede ser definida por la presencia de una sola característica. Sin embargo, varias características están relacionadas; por ejemplo, numerosas especies de la familia tienden a presentar rizomas rastreros escamosos, dorsiventrales, con hojas dispuestas en dos series en la superficie dorsal. Las hojas están articuladas a folípodios cortos y caen en la madurez sin dejar rastro (la zona de articulación se evidencia por un cambio brusco de color entre el pecíolo y los folípodios). Los soros son a menudo amplios y redondeados con esporas amarillas.

Se cree que esta familia está relacionada con las Grammitidaceae, ya que ambas presentan soros generalmente redondeados, láminas simples a 1-pinnadas (no marcadamente disectadas), hábito principalmente epífita y muchas especies con  $n = 37$ . *Pecluma* y *Loxogramme* parecen ser intermedios y estudios subsecuentes pudieran probar que ambas familias debieran combinarse, tal como lo han hecho algunos pteridólogos; por ejemplo Kramer en Kramer y Green (1,990), citado por Gerrit D. et al (3).

### 4.2 DESCRIPCIÓN DE GÉNEROS Y ESPECIES INVOLUCRADAS EN EL ESTUDIO

#### 4.2.1 Género *Phlebodium*

Descrito como un pequeño y conflictivo género de los trópicos del nuevo mundo, los pteridólogos le han asignado distinto valor taxonómico. Algunos incluyéndolo como una sección de *Polypodium*, otros como sinónimo de *Polypodium* y otros como un sub-género (4). Gerrit, D. et al (3), hacen la siguiente descripción:

*Phlebodium* (R. Br.) J. Sm. N.v.: Epífitas, rupícolas o terrestres; rizoma rastrero, generalmente farinoso, de farina blanca, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas, denticuladas; hojas monomorfas, pinnatisectas, a menudo glaucas en el envés, articuladas al rizoma; pinnas escamosas o glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilagosos, enteros o casi enteros; nervaduras areoladas, las areolas 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 spp. SE. Estados Unidos, México, Mesoamérica, Sudamérica y Antillas. (3).

Los 2 nérvulos incluidos en la areola que abastecen al soro distinguen a *Phlebodium* de los otros géneros de Polypodiaceae. Los rizomas de las especies de este género son fragmentados y vendidos en los mercados de México, Guatemala y Honduras. Se preparan en una infusión que, según se cree, alivia trastornos renales y otros males (3).

La diferencia notable entre *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* es que la primera cuenta con 3-7 series de soros entre la costa y el margen, mientras que *P. pseudoaureum* posee solo una serie de soros en esta misma ubicación. Debe tenerse cuidado de no confundir a *P. pseudoaureum* que posee lámina glabra en el envés, con *P. araneosum*, que aunque solo posee una serie de soros, presenta la lámina escamosa en el envés (3).

#### **4.2.2 *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.**

Epífitas; rizoma 1-3 cm de ancho, las escamas 6-15 mm, dénsamente denticuladas; lámina glabra en el envés; pinnas 15-35 x 3.5-5, el ápice atenuado, acuminado. Selvas altas perennifolias. 0-200 m. (S. Florida, México, Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Guayanas, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay, Argentina, Antillas) (3).

Gómez (1,980) señaló que *Phlebodium decumanum* y *P. pseudoaureum* (tratada como *P. aureum*) se entrecruzan en honduras, produciendo un híbrido con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 son pequeños. Desafortunadamente, no se citaron ejemplares de referencia. Gómez señaló además que el nombre *P. dictyocalis* (Fée) Mett. representaba el híbrido, pero no se mencionó haber visto el tipo (3).

#### **4.2.3 *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger**

Epífitas, ocasionalmente rupícolas o terrestres. Rizoma de 0.7 a 1.5 cm de ancho. Las escamas 5-8 mm, subenteras a moderadamente denticuladas; lámina glabra en el envés; pinnas 10-33 x 1-3 cm, el ápice atenuado, agudo o acuminado. Selvas húmedas, bosques de Pinus-Liquidambar-Quercus, bosques de neblina,

cafetales. (500-) 1,000-2300(-2600) m. (Florida, México, Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Guayanas, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Argentina, Antillas). (3).

En Mesoamérica *Phlebodium pseudoaureum* previamente ha sido llamada *P. aureum*, especie solo conocida de Florida, Sudamérica, las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. De acuerdo con Proctor y Evans, (comunicación verbal en Mickel y Beitel 1,988), *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, ambas diploides, han hibridizado dando origen a *P. aurerum*, una tetraploide. La evidencia morfológica que sustenta este parentesco es que *P. aureum* tiene un número intermedio de series de soros (2-3) entre ambas. También señalaron la existencia de un híbrido triploide retrocruzado, estéril. (5).

#### 4.2.4 Género *Polypodium*

Epífitas, rupícolas o raramente terrestres; rizoma largamente rastrero o rara vez cortamente rastrero, generalmente ramificado, a menudo pruinoso, escamoso, sin raíces prolíficas; escamas del rizoma clatradas o no clatradas, peltadas o pseudopeltadas; hojas estériles y fértiles monomorfas o raramente dimorfas, pecíolo articulado o con un filopodio corto, desprendiéndose en la madurez, surcado adaxialmente; lámina pinnatisecta a 1-pinnada, raramente más dividida, glabra, pelosa o escamosa; caquis surcado adaxialmente, glabro o peloso; nervaduras libres o areoladas, las areolas en 1-10 hileras entre la costa y el margen, conteniendo un solo nérvulo excurrente; soros redondeados u ocasionalmente elípticos, dispuestos en los ápices de las nervaduras; cápsulas esporangiales glabras o setulosas; esporas amarillas (al menos cuando frescas), reniformes;  $x = 37$ . Aproximadamente 120 spp. Canadá, Estados Unidos, México, Mesoamérica, Sudamérica, regiones templadas de Europa, Asia y África.

Las especies de *Polypodium* tienen, típicamente láminas pinnatisectas a 1-pinnadas, rizomas largamente rastreros y pecíolos y caquis surcados adaxialmente. Aquí se reconocen 4 grupos de especies, algunos e los cuales tal vez, finalmente, ameriten reconocimiento taxonómico. México es el centro de diversificación e 3 de los grupos. (5).

#### 4.2.5 *Polypodium triseriale* SW.

Epífitas o rupícolas; rizoma de 8-15 mm de ancho, no pruinoso, las escamas 4-6 x 2-3 mm, lanceoladas u ovadas con el ápice acuminado, numerosas y densas, ligeramente patentes, subclatradas, anaranjadas, grisáceas o negruzcas con el borde más claro; filopodios 1-2 veces el ancho del rizoma; pecíolo 0.4-0.9 veces el largo de la lámina, pajizo o pardo, sin alas; lámina 30-100 x 20-50 cm, 1-pinnada, anchamente oblonga, glabra, el ápice similar en forma de las pinnas laterales; pinnas 2-12 (-17) pares, 1.5-2.5 (-3.3) cm de ancho; areolas (3-)4-5(-6) hileras entre la costa y el margen; soros en (1-)2-3 hileras entre la costa y el margen. Selvas altas peregñifolias, potreros, bosques de *Pinus-Quercus*, rocas cubiertas de musgo. =-2,000 m. (S. México, Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Guayanas, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Antillas, Trinidad.) (5).



### 4.3 LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LOS FLAVONOIDES

De acuerdo con Tsimidou (1,998), Los compuestos fenólicos están conformados por un anillo aromático y un anillo benceno con uno o más grupos hidroxilados, que incluye derivados funcionales, tales como: ésteres, metilésteres, glucósidos, entre otros. La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Kinsella (1,993), manifiesta que en su mayoría estos compuestos son potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de protones o electrones. Sahahidi (1,995) expresa que los polifenoles se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glucósidos siendo solubles en agua y solventes orgánicos. (5)

Muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas principalmente a la actividad antioxidante, están relacionadas con la presencia y el contenido de compuestos fenólicos. De acuerdo con Martínez (2,000), citado por García (5) un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con un papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, así como en procesos de envejecimiento, por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* (5).

Entre los compuestos fenólicos existentes en los alimentos, se pueden distinguir dos grandes familias (no flavonoides y flavonoides), constituidas cada una de ellas por diferentes subfamilias de compuestos.

**-La familia de los no flavonoides se subdivide a su vez en 3 subfamilias:**

- **Estilbenos.**
- **Taninos hidrolizables.**
- **Ácidos benzóicos:** De acuerdo con Belitz, citado por García (5) esta subfamilia está formada a su vez por **la serie benzóica** y **la serie cinámica**. A la **serie benzóica** pertenecen el fenol, cresol, timol. Resorcinol; los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, p-hidroxibenzoico y los aldehídos como la vainillina. En el caso de **la serie cinámica**, los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) raramente se encuentran libres ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, **el ácido caféico** se encuentra esterificado con el ácido quínico dando lugar a los ácidos **clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico**

**-La familia de los flavonoides:**

Incluye a los flavonoles, flavanoles, monómeros, oligómeros, polímeros o taninos condensados, antocianos, flavonas, isoflavonas y flavanonas (5).

Flavonoide es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas cuyo nombre proviene del latín *flavus*, que significa amarillo. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como ruta biosintética de los flavonoides, cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados, más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides (6).

Los flavonoides se biosintetizan en todas las plantas, que aunque comparten la ruta biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del Sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores (7).

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre, que los consume con los vegetales. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos. También son conocidos por los cultivadores de plantas ornamentales, que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de flavonoides que dan el color a las hojas y a las flores (7).

#### 4.4 ALGUNAS APLICACIONES DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides consumidos por el hombre lo protegen del daño de los oxidantes, como los rayos UV (cuya cantidad aumenta en verano); la contaminación ambiental (minerales tóxicos como el plomo y el mercurio); algunas sustancias químicas presentes en los alimentos (colorantes, conservantes, etc.). Como el organismo humano no tiene la capacidad de sintetizar estas sustancias químicas, las obtiene enteramente de los alimentos que ingiere (2).

Al limitar la acción de los radicales libres (que son oxidantes), los flavonoides reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan los incendios en la menopausia y combaten otros síntomas (2).

En general el sabor es amargo, llegando incluso a provocar sensaciones de astringencia dependiendo de lo condensados que sean los taninos. El sabor puede variar dependiendo de las sustituciones presentadas en el esqueleto llegando incluso a usarse como edulcorantes cientos de veces más dulces que la glucosa (2).

Sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

- **Propiedades anticancerosas:** muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas (2)
- **Propiedades cardiotónicas:** tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina. Se ha estudiado que los flavonoides reducen el riesgo de enfermedades cardíacas (8,9).
- **Fragilidad capilar:** mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.
- **Propiedades antitrombóticas:** la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.
- **Disminución del colesterol:** poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos.
- **Protección del hígado:** algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

- **Protección del estómago:** ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.
- **Antiinflamatorios y analgésicos:** la hesperidina por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides (10).
- **Antimicrobianos:** isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.
- **Propiedades antioxidantes:** Los flavonoides contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (11)

#### 4.5 CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LAS CALAHUALAS

Alonso (1) refiriéndose al rizoma de *Polypodium leucotomos* Poir, menciona que posee los esteroides ecdisterona y ecdisonas (como la polipodoaureína). La  $\alpha$  ecdisona se aisló inicialmente del gusano de seda. También posee saponinas como la Calagualina y las Polipodinas A y B; mucílago, oleorresina, nitrato de potasio, osladina y almidones. En el Vademecun Nacional de Plantas Medicinales de Guatemala (12) se menciona que del rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* se aisló adenosina y que además posee azúcares. Cáceres et al. (13) menciona además para *P. decumanum*: flavonoides, triterpenos y almidón en rizomas; expresa que la composición de rizomas coincide con la de las hojas.

#### 4.6 ANTECEDENTES

Se incluyen a continuación algunos estudios relacionados con la actividad de los flavonoides, actividades encontradas en *Plebodium decumanum* y algunos estudios sobre la cuantificación de flavonoides en diferentes especies.

De acuerdo con Sánchez et al (1,996), Galvez et al (1,997), Crespo et al (1,999) y Ocete et al (1,998), citados por Ballester et al (21) la función absorptiva del colon se encuentra profundamente alterada en el proceso de inflamación intestinal, de forma que su restauración puede contribuir, conjuntamente a los efectos beneficiosos manifestados por los flavonoides en los modelos de colitis experimental. De los distintos flavonoides estudiados, la Quercitrina, la Rutina, la Hesperidina y la Morina han demostrado su capacidad de promover la mejora de la funcionalidad de absorptiva colónica en los animales colícticos. No obstante, únicamente la **Quercitrina** fue capaz de restaurar completamente el transporte hidroelectrolítico colónico, lo que se tradujo en una reducción de la incidencia de diarrea, uno de los síntomas que caracterizan la inflamación intestinal, en comparación con el correspondiente grupo control (sin tratamiento con el flavonoide).

Stommel y Whitaker (2,003), encontraron que el Ácido Clorogénico es un compuesto predominante en una serie de muestras de berenjena analizadas. Este hallazgo es considerado de mucha importancia porque el Ácido Clorogénico conjuntamente con los ésteres asociados del Ácido Caféico se encuentran entre los secuestradores de radicales libres de mayor potencia encontrados en tejidos vegetales, entre cuyos beneficios se pueden mencionar las actividades antimutagénica, antimicrobial, antiviral y reductor de los niveles de colesterol LDL (18).

Zhiyong Liu, et al. En el año 2005 (25), desarrollaron un estudio en el que se encontró que el Hyperósido era efectivo para proteger a las células PC12 contra la citotoxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno y el ter-butil hidroperóxido en concentraciones de 160 µg/mL y 100 µg/ mL respectivamente. El estudio también demostró que no había efecto nocivo en el rango de concentraciones evaluado y que el Hyperósido podía fácilmente entrar a las células PC12.

Tiberti L, et al, (2007), realizaron la primera investigación sobre la estructura química de los flavonoides presentes en las cáscaras de las 3 variedades de manzana más cultivadas en el Brasil: Gala, Golden y Fuji. Los análisis fueron hechos por cromatografía líquida de alto desempeño con detector UV con arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas, usando adición post-columna de reactivos de dislocación UV, así como espectrometría de masas de múltiples estados, con ionización electrospray en el modo negativo. La identificación "on line" demostró la presencia de Rutina, Hyperósido, Isoquercitrina, Quercitrina y otros 3 derivados de Quercetina-3-O-pentósidos. Los resultados mostraron perfiles similares para las 3 variedades, pero los compuestos relevantes en el cromatograma fueron el Hyperósido, Quercetina-3-O-pentósidos y Quercitrina (20).

De las especies de Calahualas evaluadas en el presente estudio, la que ha recibido mayor atención en los temas de investigación es *Phlebodium decumanum*. García C (26) en el año 2,007, encontró que el extracto de *P. decumanum* es capaz de mantener el estado redox tras la sobrecarga del ejercicio físico. Para postular su trabajo de investigación, se apoyó en la premisa de que las repercusiones que el ejercicio físico tiene en el sistema inmunitario, son la causa para estudiar el efecto inmunomodulador de esta especie, pues el ejercicio produce un estado inflamatorio que ocasiona alteraciones del sistema inmune. En su documento, hace referencia a estudios en los que se han utilizado los extractos de *P. decumanum* para tratar el sida y el vitíligo. También se refiere al trabajo realizado por De Teresa et al. (2003), quien estudió el efecto de *P. decumanum* sobre el rendimiento deportivo de ciclistas. Sus resultados mostraron un mejoría significativa en el nivel máximo (vatios, lactato y cociente respiratorio máximo en cicloergómetros) y sub-máximos (reducción de la frecuencia cardiaca a nivel sub-máximo: 250 voltios) en comparación con placebo; asimismo encontró que los registros obtenidos sobre el daño oxidativo, (ADN mitocondrial) y la disfunción inmune (IL-1, IL-6, TNT, TNF-rs, IL-1ra), son mejores con *P. decumanum* que con placebo.

Con relación a la evaluación cuantitativa de flavonoides en diferentes especies, se presentan los siguientes:

Mozobuchi et al. (1,969) encontraron que las hojas de *Lycium chinense* (solanaceae), conocida comúnmente como caja de espinas, contiene entre el 1.2 y el 2,7% de de Rutina en base a peso seco, flavonoide que es considerado como un fitoquímico preventivo de la hipertensión e infartos (19)

Fieschi, Codignola y Luppy (1,989) encontraron el total de glucósidos flavónicos y agliconas de diferentes tipos de infusiones de té negro, usando cromatografía en papel seguida de mediciones espectrofotométricas. El contenido total de flavonoides varió de 46 a 86 mg por litro (22).

Koo Hui Mian y Suhaila Mohamed (2,001) condujeron estudios sobre el contenido de flavonoides de 62 plantas tropicales comestibles. El contenido más alto de flavonoides totales, se encontró en las hojas de cebolla (1497.5 mg/kg Quercetina, 391.0 mg/kg Luteolina, y 832.0 mg/kg kaempferol), seguido por las hojas de Semambú, una plnlma nativa de Sumatra y Malasia, (2041.0 mg/kg), bird chili (1663.0 mg/kg) el cual es un *Capsicum frutescens*, té negro (1491.0 mg/kg), papaya shoots (1264.0 mg/kg), y guayaba (1128.5 mg/kg) (24).

Raffo et al. (2,004), evaluaron la variación estacional de los componentes antioxidantes de tomates Cherry cultivados en invernadero y se comparó el perfil de la composición estacional de los frutos, cultivados en 6 diferentes épocas. Entre los compuestos fenólicos la Rutina varió entre 1,79 a 6.71 mg/100 g (23).

## 5. OBJETIVOS

### GENERAL

Contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios de las especies *Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* y *Polypodium triseriale*, generando información sobre la composición de flavonoides presente en los extractos obtenidos de sus frondas y rizomas.

### ESPECÍFICOS

Establecer la presencia o ausencia de los compuestos fenólicos: **Quercetina, Naringenina, Ácido Caféico, Kaempferol, Hyperósido, Rutina, Ácido Clorogénico, Naringina y Quercitrina**; en los extractos de rizomas y frondas de las 3 especies de calahualas.

Establecer cual de los dos órganos (frondas y rizomas) posee mayor concentración de flavonoides.

Cuantificar el total de flavonoides de cada uno en las tres especies de Calahualas.

## 6. HIPÓTESIS

Es posible encontrar distintos compuestos fenólicos, o diferente contenido de flavonoides totales, en las especies de Calahuala *Phlebodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaureum* y *Polypodium triseriale*, nativas de Guatemala.

## 7. METODOLOGÍA

El proceso a que fueron sometidas las muestras vegetales, comprende varias actividades, las cuales iniciaron con la colecta y secado de las plantas, seguido de una extracción alcohólica de los fitoconstituyentes de las 3 especies: *Phlebodium pseudoaureum* (identificada con el número de registro 89), *Phlebodium decumanum* (número de registro 115) y *Polypodium triseriale* (número de registro 99). A continuación se procedió a realizar la búsqueda de los flavonoides por cromatografía en capa fina y por último, la cuantificación del contenido total de los mismos, por medio de espectrofotometría. Para ello, se procederá a la realización de las etapas que a continuación se presentan.

### 7.1 RECOLECCIÓN Y SECADO DE MUESTRAS

Se colectaron muestras de follaje (frondas) y rizomas de los 3 especímenes (aproximadamente 50 gramos de peso fresco de cada planta por órgano). Las muestras vegetales fueron tomadas de la colección de Calahualas existente en los campos experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. De estas Polipodiáceas ya se han realizado estudios de ADN y se encuentran identificadas con número de entrada a la colección, la que está conformada por 107 especímenes provenientes de diferentes localidades del territorio nacional. La Figura 1 (anexo 1), muestra la colección de Calahualas.

La colecta se realizó en forma aleatoria estratificada, siendo la especie el elemento de estratificación, con la idea de que cada una correspondiera a una de las 3 especies de interés. Las plantas cosechadas pueden verse en las Figuras 2, 3 y 4 (anexo 1).

Luego de ser colectadas, las muestras vegetales fueron trasladadas de inmediato al laboratorio en bolsas plásticas, para ser lavadas con agua, eliminando las sustancias extrañas que puedan contener en su superficie. Posteriormente se secaron por convección de aire caliente a una temperatura de 45 °C (Figura 5, anexo 2), por un periodo que permitió alcanzar un contenido de humedad alrededor del 12% o menos, lo cual se determinó con la balanza de humedad (Figura 6 anexo 2). Las muestras secas fueron almacenadas en frascos de vidrio ámbar con tapa para su posterior uso.

Para esta actividad se utilizó el siguiente material y equipo:

- Bolsas plásticas para guardar las muestras.
- Tijeras de podar.
- Frondas de calahuala.
- Rizomas de calahuala.
- Agua potable.
- Horno de secado con aire caliente.
- Frascos color ámbar con tapa.

## 7.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos pueden ser preparados utilizando diferentes solventes; Cáceres et al. (2,006), recomiendan utilizar para calahualas, una mezcla de etanol agua en proporción de 70:30 (13). Para la extracción de flavonoides, Lin et al. (2,006), emplearon una mezcla de metanol – agua de 60:30 a 70:30 (14). Lock, O, (15), recomienda realizar una sucesión entre solventes polares y no polares. El método general de extracción de flavonoides descrito por Wagner y Bladt (1,996), el cual se decidió utilizar por su aplicación práctica, consistente en pesar un gramo de planta pulverizada, el cual es extraído con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño María a 60 grados centígrados. Este método rápido es capaz de extraer tanto los flavonoides lipofílicos como los hidrofílicos (16).

En esta etapa se empleó el siguiente material y equipo:

- 1 gramo de rizomas seco y pulverizado de c/u de las 3 especies de calahuala.
- 1 gramo de frondas seco y pulverizado de c/u de las 3 especies de calahuala.
- Metanol grado analítico.
- Beakers de 50 mL (6 unidades).
- Baño maría.
- Termómetro.
- Viales ámbar con tapa para guardar los extractos (6 unidades).
- Probetas de 10 mL.
- Balanza analítica.

## 7.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los extractos fueron sometidos a cromatografía en capa fina, para verificar la presencia o ausencia de los flavonoides y ácidos cinámicos correspondientes a los estándares siguientes: Quercetina, Naringenina, Kaempferol, Hyperósido, Rutina, Naringina, Quercitrina, Ácido Caféico y Ácido Clorogénico. Las soluciones estándar se prepararon a partir de estándares puros de los compuestos fenólicos citados, disolviéndolos en metanol a una concentración del 0.05%. Se utilizaron cromatofolios de aluminio con sílica gel 60F254. Se aplicaron con capilares, 10 µL de cada uno de los extractos de frondas y rizomas, así como de cada una de las



soluciones estándar. Como fase móvil se empleó una mezcla de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua en proporción 100:11:11:26. (16).

Las cromatoplasmas se dejaron desarrollar entre 7 y 8 cm, punteando cada muestra o estándar a 1.5 cm a partir de la base.

Para la detección, la placa se dejó secar y posteriormente fue rociada con una disolución etanólica al 5% de polietilén glicol 4,000 (Merck) y con disolución de 2-aminometil-difenil-borinato (SIGMA) al 1% en metanol; esta última conocida como **Reactivo NP** (natural products reagent). La aplicación de estas soluciones permite hacer más evidentes y brillantes las manchas de los flavonoides. Se dejó secar al aire por 30 minutos y se examinó con luz ultra violeta a 365 nm. (13, 16).

Se utilizó el siguiente material y equipo:

- Extractos metanólicos de frondas y rizomas de las 3 especies de calahuala.
- Disoluciones de estándares de flavonoides.
- Capilares de 5 µl para aplicar muestras y estándares.
- Cromatofolios de aluminio con sílica 60F254 (Merck, Alemania).
- Fase móvil de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua en proporción 100:11:11:26
- Disolución etanólica al 5% de polietilén glicol 4,000 (Merck).
- Reactivo NP.
- Cámara para desarrollo cromatográfico.
- Bomba para aspersion de reveladores
- Lámpara UV de 365nm.
- Mascarilla.
- Guantes de látex,
- Pinzas.
- Lápiz de grafito
- Campana de eliminación de gases.
- Probetas de 25 mL.
- Pipetas de 5 mL.

**NOTA:** Se realizaron 2 cromatoplasmas de capa fina: La primera incluyó los 9 estándares y los extractos de frondas y rizomas. Debido a que la parte correspondiente a rizomas no se pudo observar con claridad por la baja concentración de flavonoides, hubo que realizarse otra cromatografía, para lo cual se concentraron los extractos de rizomas, obteniéndose 2mL de extracto concentrado, de 5 mL de extracto original, calentando en baño maría a 60 °C por un periodo aproximado de 6 minutos.

En un primer cromatofolio se sembraron del lado izquierdo los 3 extractos obtenidos de las frondas, cada uno correspondientes a una de las especies de Calahuala, iniciando con *Phlebodium decumanum*, seguida de *Polypodium triseriale* y luego *Phlebodium pseudoaureum*; al centro nueve siembras de los estándares Rutina, Hyperósido, Quercetina, Quercitrina, Ácido Caféico, Ácido

Clorogénico, Naringina, Naringenina y Kaempferol, en el orden mencionado; finalmente, se sembraron los extractos de rizomas de en el mismo orden en que se procedió con las frondas (*P. decumanum*, *P. triseriale* y *P. pseudoaureum*).

En el segundo cromatofolio se sembraron del lado izquierdo 5 estándares (Rutina, Hyperósido, Quercetina, Quercitrina, Ácido Caféico), al centro extractos de rizoma de cada una de las tres especies de calahuala, iniciando con *Phlebodium decumanum*, seguida de *Polypodium triseriale* y luego *Phlebodium pseudoaureum*; al lado derecho cuatro siembras de los estándares, Ácido Clorogénico, Naringina, Naringenina y kaempferol, en el orden mencionado. Esta fue la cromatoplaque que se sembró con los extractos ya concentrados.

#### 7.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA (%)

Este procedimiento, obtenido de la farmacopea brasileña (17) comprende dos procesos fundamentales, el primero es el proceso de extacción de los flavonoides, el cual involucra varias etapas. El segundo es el proceso de detección por espectrofotometría.

##### 7.4.1 Proceso de Extracción

Este proceso implica la preparación de varias soluciones, tal como se detalla a continuación.

- a) **Preparación de la solución de ácido acético en metanol (5%):** añadir 10 mL de ácido acético en 200 mL de metanol (**Solución 1**).
- b) **Preparación de la solución de cloruro de aluminio SR (2%):** disolver 0.2 g de cloruro de aluminio en 10 mL de la solución de ácido acético en metanol (o sea, la solución anterior o **Solución 1**).
- c) **Preparación de la solución acuosa de metenamina (0.5%):** pesar 0.05 g de metenamina y disolver en 10 mL de agua.

**NOTA:** Las cantidades se han ajustado para trabajar 6 muestras (3 de rizomas y 3 de frondas).

- d) **Preparación de Solución Madre:** Pesar exactamente 0.4 g de droga pulverizada (800  $\mu\text{m}$ ); colocar la muestra en un balón de fondo redondo de 100 mL para reflujo; añadir un mL de solución acuosa de metenamina, 20 mL de acetona y 2 mL de ácido clorhídrico; calentar en baño María a 60 a.C. bajo reflujo por 30 minutos; filtrar la mezcla con algodón depositando el filtrado en balón volumétrico de 100 mL; **regresar el residuo de la droga y el algodón de filtrado al balón de reflujo de fondo redondo, agregando 20 mL de acetona para reflejar por 10 minutos en el baño María a 60 °C y depositar el extracto así obtenido en el balón redondo**

**de 100 mL donde se colectó el primer filtrado;** repetir este último paso una vez más, de manera que al final se hallan realizado 3 colectas filtradas, una de 30 minutos y 2 ve diez minutos.

-Llevar los filtrados a temperatura ambiente y ajustar el volumen hasta 100 mL con acetona (**solución A**).

-En una ampolla de decantación tratar 20 mL **de solución A** con 20 mL de agua y extraer con 15 mL de acetato de etilo.

-Extraer 3 veces más con porciones de 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 (Esta constituye la **Solución Madre**)

**e) Preparación de la Muestra:** Transferir 10 mL de solución madre a un balón aforado de 25 mL; adicionar **un mL de solución de cloruro de aluminio SR (2%)** y completar el volumen con solución metanólica de ácido acético (o sea con la **Solución 1**).

**f) Preparación del Blanco:** Transferir 10 mL de solución madre en un balón aforado de 25 mL y llevar a volumen con solución metanólica de ácido acético (con la **Solución 1**)

#### 7.4.2 Detección por Espectrofotometría UV-visible

Después de haber preparado las soluciones blanco y muestra, a los 30 minutos se procedió a hacer una corrida inicial con la solución blanco a 425 nm para ajuste a cero. Una vez realizado el ajuste a cero, inmediatamente se midió la absorbancia de la muestra a los mismos 425 nm.

Los flavonoides totales se calculan de acuerdo a la siguiente ecuación.

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

**Donde:**

Q = Flavonoides totales expresados en Quercetina

A = Absorbancia de la solución muestra

m = Peso de la droga vegetal

Pd = Determinación de agua de la droga cruda en %

Para el desarrollo de de las actividades descritas anteriormente, se requirió del siguiente material y equipo

- Metanol.
- Ácido acético.
- Cloruro de aluminio.
- Metenamina.
- Agua desmineralizada.
- 0.4 g de droga seca y pulverizada (800  $\mu\text{m}$ ) para cada evaluación.
- Acetona.
- Ácido clorhídrico.
- Acetato de Etilo.
- Guantes de látex.
- Algodón.
- Tijeras.
- Hielo.
- Baño María.
- Termómetro.
- Equipo para Reflujo.
- Probetas de 100 mL.
- Probetas de 25 mL.
- Pipetas volumétricas de 1 mL.
- Pipetas volumétricas de 2 mL.
- Balones de 100 mL.
- Balones de 50 mL.
- Balones de 25 mL.
- Beackers para coleccionar lavados.
- Espátula.
- Varilla de vidrio.
- Refrigerador.
- Reloj.
- Embudo.
- Ampolla e decantación.
- Soporte.
- Campana para eliminación de gases.
- Equipo de Espectrofotometría
- Balanza analítica.
- Balanza de humedad

## 7.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el caso de la cromatografía en capa fina, se hicieron comparaciones entre las manchas resultantes después de haber desarrollado y revelado los cromatofolios sembrados con las muestras (extractos de frondas y rizomas) y los

estándares de los flavonoides. Se realizó una descripción de los colores y bandas encontradas en cada una de las siembras.

Los resultados de la evaluación espectrofotométrica, fueron completados con la aplicación de la ecuación correspondiente, la que fundamentalmente, en función de la máxima absorbancia observada en el punto cercano a los 425 nm y el contenido de humedad de la muestra, permitió establecer el total de flavonoides expresado como Quercetina (%) de cada muestra analizada. Las comparaciones entre los datos obtenidos de esta manera, constituyen el elemento de análisis para establecer las diferencias cuantitativas entre las muestras, cada una de las cuales, se relacionada con una de las 3 especies de calahuala objeto de estudio en esta evaluación.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 SECADO DE MUESTRAS Y CONTENIDO DE HUMEDAD

El tiempo de secado varió entre las diferentes especies, principalmente en lo referente a las frondas, ya que los rizomas se secaron con mayor prontitud y uniformidad (24 horas).

Mientras que las frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Polypodium triseriale* requirieron alrededor de 36 horas para secarse, las de *Phlebodium decumanum* necesitaron 42 horas para ello, por lo que se puede pensar en que esta especie es más tolerante a condiciones de sequía. La temperatura de secado fue de 45 °C.

La tabla 1 presenta los contenidos de humedad de las muestras después de haber salido del secador de aire caliente, medido con la balanza de humedad. Este dato es de utilidad para los procesos siguientes, especialmente para la cuantificación del contenido total de flavonoides.

**TABLA 1. Contenido de humedad de frondas y rizomas después de su tratamiento en el secador; medido con la balanza de humedad.**

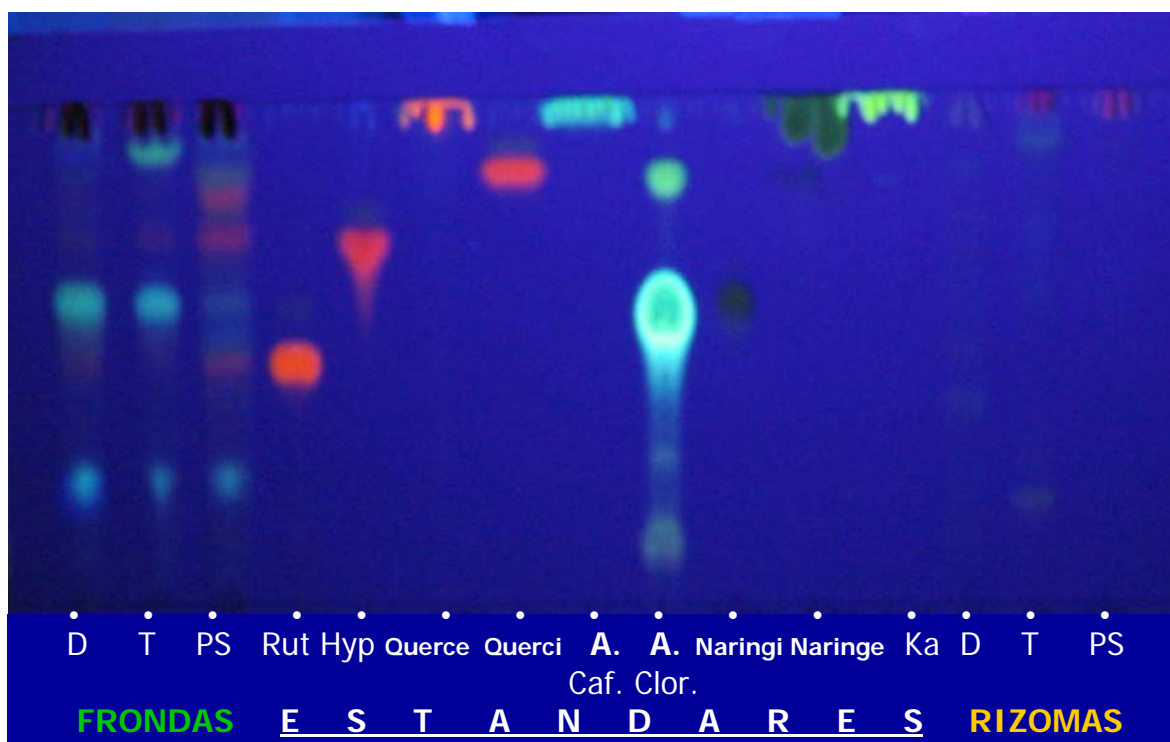
| MUESTRA               | HUMEDAD EN RIZOMA | HUMEDAD EN FRONDA |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Pseudoaureum (No. 89) | 11.57%            | 12.04%            |
| Triseriale (No. 99)   | 6.61%             | 11.78 %           |
| Decumanum (No. 115)   | 10.71 %           | 7.86%             |

## 8.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Luego de haber obtenido los extractos metanólicos descritos en el inciso 7.2 se procedió a realizar la cromatografía en capa fina, siguiendo los pasos indicados en el inciso 7.3. Se realizaron 2 cromatografías, las que se presentan a continuación:

### 8.2.1 Capa Fina 1

La figura 7 presenta la placa luego de revelada y siendo iluminada con luz ultravioleta a 365nm; en ella se encontraron bandas principalmente en los extractos de las frondas, unas de las cuales coincidieron con las manchas de algunos de los estándares. Las bandas de los rizomas fueron bastante tenues, por lo que hubo necesidad de hacer una nueva placa para ellos.



**FIGURA 7. Fotografía de la capa fina 1. Se hacen evidentes las bandas de las frondas y manchas de los estándares, mientras que las de los rizomas no aparecen con claridad.**

A continuación se presenta la interpretación de la cromatoplaque 1, para la descripción de los extractos de frondas. En esta placa no se analizan los rizomas. La altura del frente alcanzó un desplazamiento de 7.5 cm (Figura 8).

Se utilizaron 9 estándares:

**Rut = Rutina:** se desplazó 3.8 cm, produciendo una mancha anaranjada intensa, con un Rf de 0.51.

**Hyp = Hyperósido:** se desplazó 5.3 cm produciendo una mancha anaranjada fuerte, con un Rf de 0.71.

**Querce = Quercetina:** produjo una mancha anaranjada intensa hasta prácticamente el final del frente.

**Querci = Quercitrina:** se desplazó 6.3 centímetros con una mancha anaranjada fuerte y un Rf de 0,84.

**A. Caf. = Ácido caféico:** produjo una mancha verde menta hasta prácticamente el final del frente.

**A. Clor. = Ácido clorogénico:** produjo una mancha principal y otra secundaria hacia arriba, ambas verde menta. La mancha principal, por su magnitud, se desplazó 4.4 cm con un Rf de 0.59 y la secundaria a 6.4 cm (Rf 0.85).

**Naringi = Naringina:** produjo una mancha anaranjada a simple vista, pero parda bajo la luz ultra violeta (365 nm) tal como se aprecia en la figura 7; con un desplazamiento de 4.4 cm y un Rf de 0.59

**Naringe = Naringenina:** produjo una mancha a simple vista de color anaranjada pero parda-verdosa bajo la luz ultra violeta. Se desplazó prácticamente hasta el final del frente.

**Ka = Kaempferol:** produjo una mancha verde limón prácticamente al final del frente.

**D = *P. decumanum* fronda:** Presentó seis bandas:

- a. Con Rf. 0.24, celeste - verdosa. No coincide con ningún estándar.
- b. Corresponde a estándar Rutina pero tenue (color anaranjada)
- c. Corresponde a Ácido Clorogénico (color verde menta).
- d. Corresponde a Hyperósido pero muy tenue (anaranjado).
- e. Corresponde a Quercitrina, (anaranjada), aunque muy tenue
- f. Mancha de color verde menta difusa, (corresponde a mancha secundaria de Ácido Clorogénico, Rf = 0.85)

**T = *P. triseriale* fronda:** Presentó seis bandas.

- a.1 Con Rf. 0.24, celeste - verdosa. No coincide con ningún estándar.
- b.1 Corresponde a estándar Rutina pero muy leve tenue, menos que en *P. decumanum* (color anaranjada)
- c.1 Corresponde a Ácido Clorogénico (color verde menta).
- d.1 Corresponde a Hyperósido, tenue pero más evidente que en *P. decumanum* (color anaranjado).
- e.1 Corresponde a Quercitrina, (anaranjada), aunque muy tenue.

f1. Mancha de color verde menta (semejante a mancha secundaria de Ácido Clorogénico, pero con  $R_f = 0.90$ . cinco puntos por encima de la del estándar)

**PS = *P. pseudoaureum* fronda:** Presentó seis bandas.

a.2 Con  $R_f$ . 0.24, celeste - verdosa. No coincide con ningún estándar.

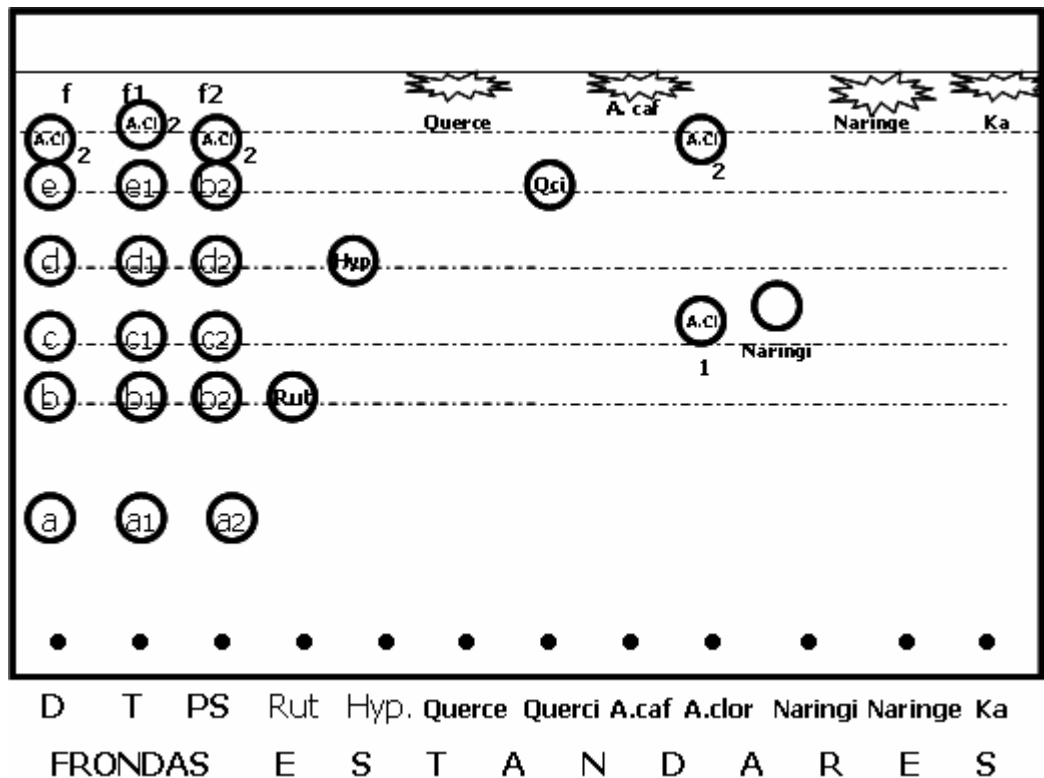
b.2 Corresponde a estándar Rutina con mayor intensidad que en *P. decumanum* y *P. trisereale* (color anaranjada).

c.2 Corresponde a Ácido Clorogénico (color verde menta).

d.2 Corresponde a Hyperósido, más intensa que en *P. decumanum* y *P. trisereale* (color anaranjado).

e.1 Corresponde a Quercitrina, (anaranjada).

f2. Mancha de color verde menta difusa, (corresponde a mancha secundaria de Ácido Clorogénico,  $R_f = 0.85$ )



**FIGURA 8. Interpretación de la cromatopla 1. Únicamente se presentan la parte correspondiente a las siembras de las frondas.**

Los  $R_f$ s de esta placa se agrupan en la tabla2, la cual se presenta a continuación:



**TABLA 2. Rfs encontrados en las bandas producidos por los extractos de frondas.**

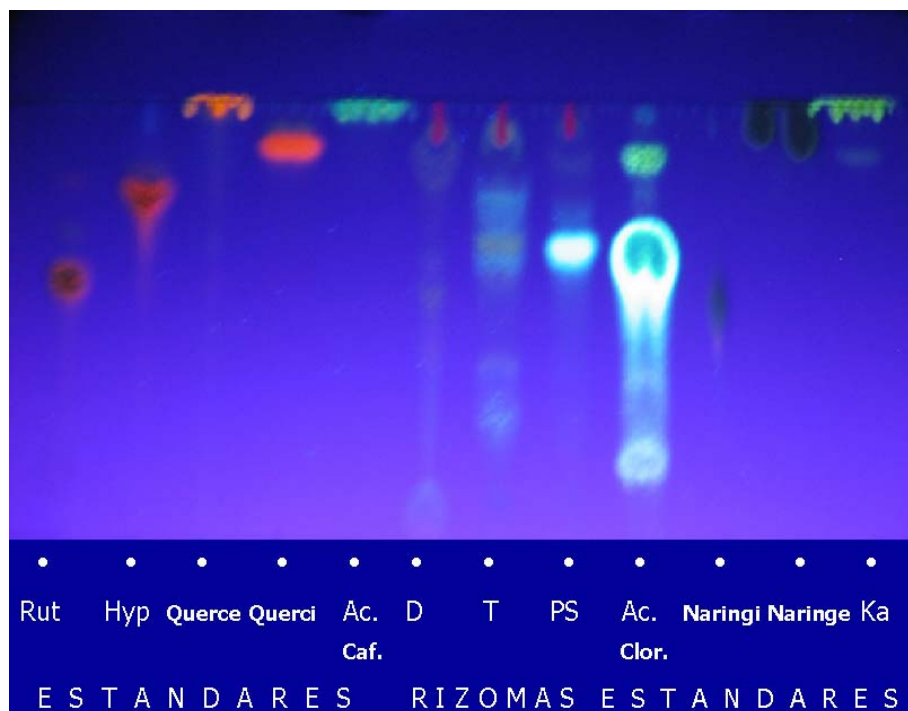
|                                |                | Rfs encontrados y manchas correspondientes |            |            |            |            |            |
|--------------------------------|----------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| ESPECIE                        | IDENTIFICACIÓN | *a   | *b         | *c         | *d         | *e         | *f         |
| <i>Phlebodium decumanum</i>    | 115            | 0.24<br>a                                  | 0.51<br>b  | 0.59<br>C  | 0.71<br>d  | 0.84<br>e  | 0.85<br>f  |
| <i>Polypodium triseriale</i>   | 99             | 0.24<br>A1                                 | 0.51<br>b1 | 0.59<br>C1 | 0.71<br>D1 | 0.84<br>e1 | 0.90<br>f1 |
| <i>Phlebodium pseudoaureum</i> | 89             | 0.24<br>A2                                 | 0.51<br>b2 | 0.59<br>C2 | 0.71<br>D2 | 0.84<br>e2 | 0.85<br>f2 |

\*a = manchas que no corresponden a estándar evaluado; \*b = corresponde a Rutina; \*c = corresponde a primera mancha producida por Ácido Clorogénico; \*d = corresponde a Hyperósido; \*e = corresponde a Quercitrina; \*f = corresponde a segunda mancha producida por el estándar de Ácido Clorogénico.

Las manchas solo identificadas con una letra, corresponden a *Phlebodium decumanum*; las identificadas con una letra y el numero 1 corresponden a *Polypodium triseriale*; las identificadas con una letra y el número dos, corresponden a *Phlebodium pseudoaureum*. Estas manchas aparecen plasmadas en la **FIGURA 8. Interpretación de cromatopla 1** y corresponden a los extractos de frondas.

### 8.2.2 Capa Fina 2

La figura 9 presenta la fotografía de la placa en donde se sembraron los extractos concentrados de los rizomas luego de revelada y siendo iluminada con luz ultravioleta a 365nm.



**FIGURA 9. Fotografía de la capa fina 2. Se aprecian las manchas de los estándares y las bandas de los rizomas, aunque su definición es inferior a la de las bandas de las frondas, aun después de haber concentrado el extracto.**

A continuación se presenta la interpretación de la cromatoplaque 2, para la descripción de los extractos de rizomas. La altura del frente alcanzó un desplazamiento de 7.2 cm (Figura 10).

Los 9 estándares produjeron los siguientes Rfs:

**Rut = Rutina:** Se desplazó 3.9 cm con Rf de 0.54 (mancha anaranjada).

**Hyp = Hyperósido:** 0.72 (anaranjada).

**Querce = Quercetina:** mancha anaranjada intensa hasta el final del frente.

**Querci = Quercitrina:** mancha anaranjada fuerte y un Rf de 0,85.

**A. Caf. = Ácido caféico:** mancha verde menta hasta el final del frente.

**A. Clor. = Ácido Clorogénico:** Produjo una mancha principal (Rf = 0.60) y otra secundaria hacia arriba (Rf = 0.83), ambas verde menta.

**Naringi = Naringina:** mancha anaranjada a simple vista, parda bajo la luz ultra violeta (365 nm) tal como se aprecia en la figura 9; con Rf de 0.57

**Naringe = Naringenina:** Produjo una mancha al final del frente, a simple vista de color anaranjada pero parda-verdosa bajo la luz ultra violeta.

**Ka = Kaempferol:** Produjo una mancha verde limón al final del frente.

**D = *P. decumanum* rizoma:** Presentó seis bandas:

- g. Con Rf. 0.1, celeste - verdosa. No coincide con ningún estándar.
- h. Color amarillenta muy tenue a 2.9 cm con Rf de 0.40. No corresponde a ningún estándar.
- i. Mancha naranja amarillenta muy tenue levemente perceptible a 3.9 cm (Rf = 0.54) corresponde a trazas de Rutina.
- j. Mancha muy tenue con Rf 0.60 correspondiente a mancha primaria de Ácido Clorogénico (verde menta).
- k. Mancha difusa color verde limón (Rf = 0.83) corresponde con segunda impresión de Ácido Clorogénico.
- L. Mancha roja lineal, con halo amarillo. Ubicada al frente del solvente. No corresponde a ningún estándar.

**T = *P. triseriale* rizoma:** Presentó siete bandas.

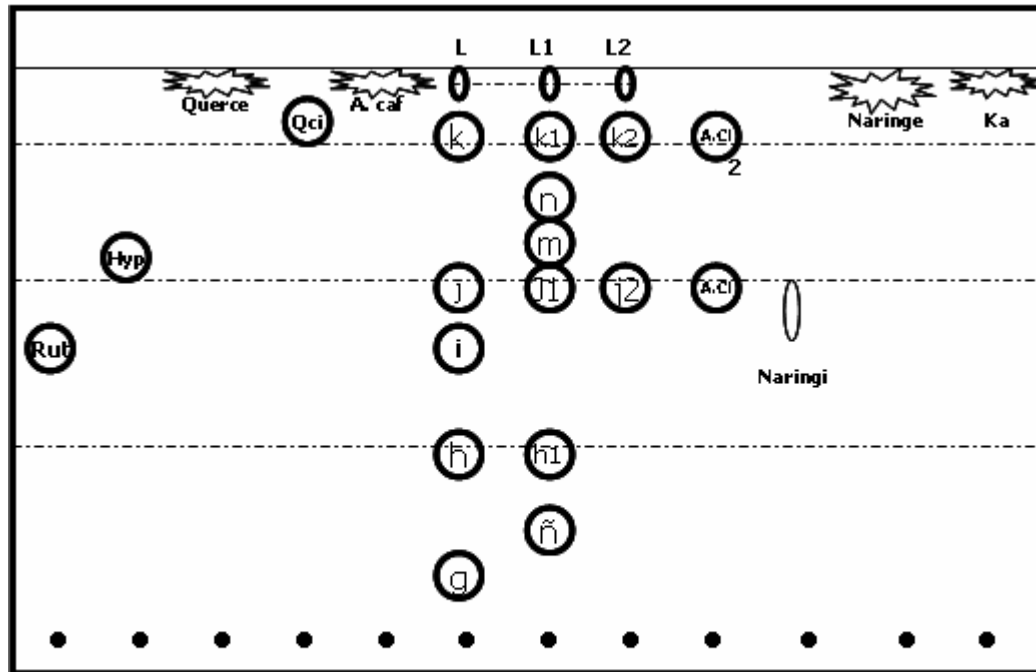
- ñ. Con Rf. 0.29, celeste - verdosa. No coincide con ningún estándar.
- h.1 Color amarillenta muy tenue a 2.9 cm, con Rf de 0.40. No corresponde a ningún estándar.
- J1. Corresponde a estándar de Ácido Clorogénico mancha primaria, Rf = 0.60. Un poco más intensa que en *P. decumanum* (verde menta)
- m. Mancha muy leve anaranjada. Corresponde a trazas de Hyperósido.
- n. Mancha verde menta con Rf de 0.78. No se encontró correspondencia con ninguno de los estándares.
- k.1 Mancha difusa color verde limón (Rf = 0.83) corresponde con segunda impresión de Ácido Clorogénico.
- L1 Mancha roja lineal, con halo amarillo. Ubicada al frente del solvente. No corresponde a ningún estándar.

**PS = *P. pseudoaureum* rizoma:** Presentó tres bandas.

**j.2** Corresponde a estándar de Ácido Clorogénico mancha primaria,  $R_f = 0.60$ . Este extracto presenta la mancha más clara de este compuesto, en comparación con los otros rizomas.

**k.2** Mancha difusa color verde limón ( $R_f = 0.83$ ) corresponde con segunda impresión de Ácido Clorogénico.

**L2** Mancha roja lineal, con halo amarillo. Ubicada al final del frente del solvente. No corresponde a ningún estándar.



Rut Hyp. Querce Querci A.caf D T PS A.clor Naringi Naringe Ka  
E S T Á N D A R E S R I Z O M A S E S T Á N D A R E S

**FIGURA 10.** Interpretación de la cromatopla 2 correspondiente a las siembras de los rizomas.

La tabla 3 presenta reunidos los  $R_f$ s de las bandas producidas por los rizomas de las 3 especies de Calahualas, correspondientes a la cromatopla 2.

**TABLA 3. Rfs encontrados en las bandas producidos por los extractos de rizomas.**

| ESPECIE                 | IDENTIFICACIÓN | Rfs encontrados y manchas correspondientes |            |           |            |            |         |           |           |           |
|-------------------------|----------------|--|------------|-----------|------------|------------|---------|-----------|-----------|-----------|
|                         |                | *g   | *h         | *i        | *j         | *k         | *L      | *m        | *n        | *ñ        |
| Phlebodium decumanum    | 115            | 0.10<br>G                                  | 0.40<br>h  | 0.54<br>i | 0.60<br>J  | 0.83<br>k  | 1<br>L  |           |           |           |
| Polypodium triseriale   | 99             |  | 0.40<br>h1 |           | 0.60<br>j1 | 0.83<br>k1 | 1<br>L1 | 0.72<br>m | 0.78<br>n | 0.29<br>ñ |
| Phlebodium pseudoaureum | 89             |  |            |           | 0.60<br>j2 | 0.83<br>K  | 1<br>L2 |           |           |           |

\*i = corresponde al estándar de Rutina, \*j= corresponde a primer mancha producida por el estándar del Ácido Clorogénico, \*k = corresponde a segundar mancha producida por el estándar del Ácido Clorogénico, \*m = corresponde a estándar de Hyperósido. Las demás manchas: \*g, \*h, \*L, \*n, \*ñ, no corresponden a ningún estándar.

### 8.3 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA (%)

Una vez obtenidas las muestras de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 7.4.1, cuyo proceso se ilustra con la figura 11 (anexo 2), se procedió a hacer las lecturas, iniciando por el blanco para calibrar al aparato a cero y concluyendo con las muestras.

Para el caso de los rizomas, el método aplicado tal y cual lo sugiere la fuente, no fue capaz de registrar ninguna absorbancia, resultando la lectura a 425 nm (relacionada con la Quercetina) en un valle total.

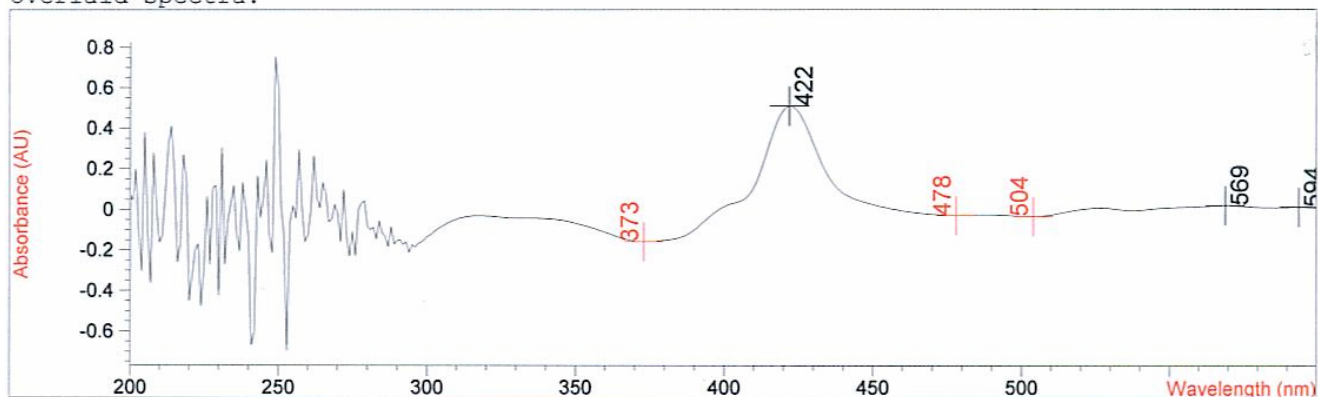
Sí fue posible obtener valores de absorbancia para las 3 muestras de frondas, las que registraron todas ellas su máximo pico a los 422 nm, cuyos espectros se presentan a continuación.

Spectrum/Peak Report

Date 10/4/2007 Time 18:16:46 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\PSEUDO.SD Created : 10/4/07 18:05:49

Overlaid Spectra:



| # | Name | Peaks (nm) | Abs (AU)  | Valleys (nm) | Abs (AU)   |
|---|------|------------|-----------|--------------|------------|
| 1 |      | 422.0      | 0.50931   | 373.0        | -0.15707   |
| 1 |      | 569.0      | 2.0082E-2 | 504.0        | -3.1789E-2 |
| 1 |      | 594.0      | 1.1932E-2 | 478.0        | -2.7041E-2 |

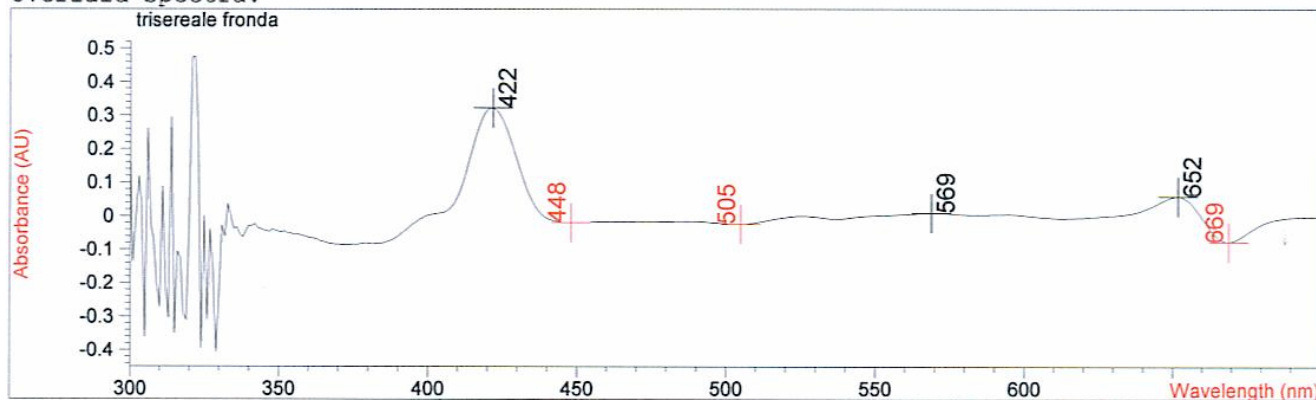
**FIGURA 12. Espectro de frondas de *Phlebodium pseudoaureum* identificada con el número 89. Nótese que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.50931.**

Spectrum/Peak Report

Date 10/4/2007 Time 10:53:15 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\TRISEFRO.SD Created : 10/4/07 10:47:54

Overlaid Spectra:



| # | Name             | Peaks (nm) | Abs (AU)  | Valleys (nm) | Abs (AU)   |
|---|------------------|------------|-----------|--------------|------------|
| 1 | trisereale frond | 422.0      | 0.32195   | 669.0        | -7.6093E-2 |
| 1 |                  | 652.0      | 5.9278E-2 | 505.0        | -2.2948E-2 |
| 1 |                  | 569.0      | 9.6908E-3 | 448.0        | -1.8059E-2 |

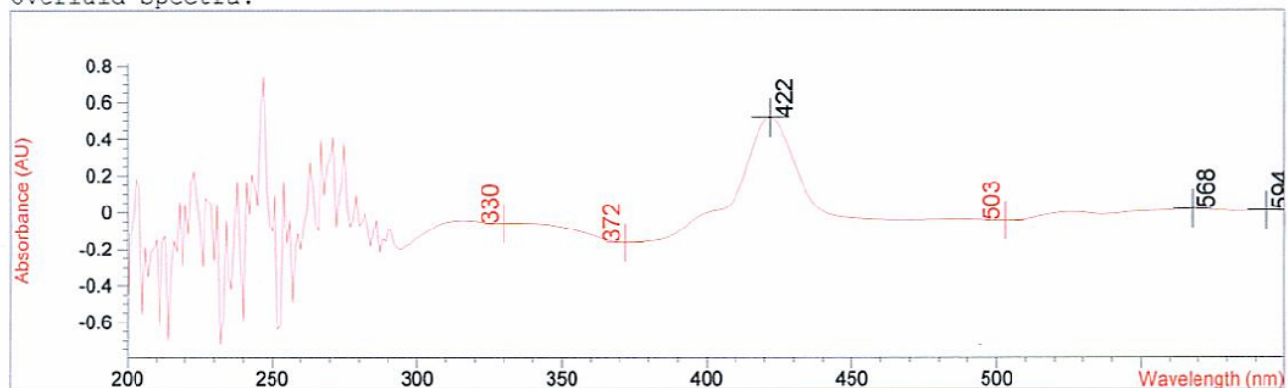
**FIGURA 13. Espectro de frondas de *Polypodium triseriale* identificada con el número 99. Puede apreciarse que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.32195.**

Spectrum/Peak Report

Date 10/4/2007 Time 18:29:56 Page 1 of 1

Method file : <untitled>  
 Information : Default Method  
 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\DECUM.SD Created : 10/4/07 18:26:34

Overlaid Spectra:



| # | Name | Peaks (nm) | Abs(AU)   | Valleys (nm) | Abs(AU)    |
|---|------|------------|-----------|--------------|------------|
| 1 |      | 422.0      | 0.51670   | 372.0        | -0.16116   |
| 1 |      | 568.0      | 1.8570E-2 | 330.0        | -5.9515E-2 |
| 1 |      | 594.0      | 1.0508E-2 | 503.0        | -4.3277E-2 |
| 2 |      | 422.0      | 0.51670   | 372.0        | -0.16116   |
| 2 |      | 568.0      | 1.8570E-2 | 330.0        | -5.9515E-2 |
| 2 |      | 594.0      | 1.0508E-2 | 503.0        | -4.3277E-2 |

**FIGURA 14. Espectro de frondas de *Phlebodium decumanum* identificada con el número 115. Obsérvese que el pico en la mayor absorbancia se ubica a 422 nm, siendo la misma de 0.51670.**

Para obtener los resultados de contenido de flavonoides totales expresados como Quercetina, es necesario sustituir en la ecuación que se presenta a continuación, los valores de la absorbancia encontrada, porcentaje de humedad y peso de la muestra.

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

**Donde:**

Q = Flavonoides totales expresados en Quercetina

A = Absorbancia de la solución muestra

m = Peso de la droga vegetal

Pd = Determinación de agua de la droga cruda en %

#### 8.4 RESULTADOS GENERALES DE LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES DE LAS FRONDAS DE CALAHUALAS, EXPRESADOS COMO QUERCETINA EN %

La tabla 4 reúne los elementos necesarios para obtener el contenido total de flavonoides y presenta los resultados, luego de haber sido aplicada la ecuación correspondiente.

**TABLA 4. Contenido de flavonoides totales expresados como Quercetina (%) y elementos necesarios para realizar su cálculo.**

| No. de colección | Especie correspondiente        | Peso de muestra | Absorbancia | % de Humedad | Flavonoides Totales como Quercetina |
|------------------|--------------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------------------------------------|
| 89               | <i>Phlebodium pseudoaureum</i> | 0.4 g           | 0.50931     | 12.04        | 1.8094 %                            |
| 98               | <i>Polypodium triseriale</i>   | 0.4 g           | 0.32195     | 11.78        | 1.1404%                             |
| 115              | <i>Phlebodium decumanum</i>    | 0.4 g           | 0.51670     | 7.86         | 1,7524%                             |



## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

De aquí se desprenden dos análisis fundamentales:

-La discusión en cuanto a las observaciones realizadas en la capa fina 1, en la cual se sembraron los extractos de las frondas y de los rizomas, conjuntamente con los estándares de los compuestos fenólicos utilizados como referencia.

-La discusión de las apreciaciones realizadas en la capa fina 2, que incluyó únicamente las siembras de los extractos de los rizomas conjuntamente con los estándares de referencia.

#### 9.1.1 Capa fina 1 (frondas)

La apreciación inicial de la cromatoplaca bajo la luz ultravioleta después del proceso de revelado, permite fácilmente advertir que la presencia de flavonoides es evidente en los extractos de las frondas, pero muy leve o poco detectable en los extractos obtenidos de los rizomas.

Concentrándose en las bandas resultantes de la siembra de extractos de frondas, se evidencian diferencias en la composición de polifenoles y flavonoides entre las 3 especies evaluadas, pero fundamentalmente en lo referente a la intensidad de las manchas, lo cual se relaciona con la concentración relativa de los compuestos presentes.

Se encontraron en los extractos de frondas 4 de los nueve estándares buscados, siendo estos: Rutina, Hyperósido, Quercitrina y Ácido Clorogénico (Figura 7).

Por el contrario, los extractos de las frondas no permitieron advertir la presencia de Quercetina, Ácido Caféico, Naringina, Naringenina ni Kaempferol.

En la tabla 2 se aprecia que los 3 extractos metanólicos, uno de cada especie, presentan igual número de bandas o manchas en la cromatopla de extractos de frondas, es decir, 6 bandas para cada especie. En las manchas identificadas con la letra “f”, puede advertirse que aunque presentan una coloración y ubicación similar (figuras 7 Y 8), la mancha f1 tiene un Rf más alto que la mancha f y que la mancha f2 (que entre sí tienen el mismo Rf). En este caso se interpretaron como equivalentes las 3 a la segunda mancha producida en la cromatopla por el Ácido Clorogénico debido a su coloración y proximidad (ya que de este estándar se desprendieron 2 manchas), aunque se hace la salvedad de que pudiesen ser compuestos diferentes.

Cáceres et, al. (13) encontraron 4 bandas en la capa fina al evaluar el extracto de una mezcla de etanol - agua (70:30) de frondas de *Phlebodium decumanum*, lo cual difiere con los hallazgos del presente estudio en el que se encontraron 6 con la extracción metanólica. Los Rfs encontrados en esa oportunidad, fueron de 0.21, 0.42, 0.77 y 0.90. Se encontró coincidencia con el estudio actual únicamente con el Rf de 0.90 (mancha f1 de *Polypodium triseriale*), que para el caso, se asumió similar a la segunda mancha producida por el estándar de Ácido Clorogénico con Rf de 0.85, la cual si aparece replicada con ese mismo Rf en las manchas “f” y “f2” de *Phlebodium decumanum* y *P. pseudoaureum* respectivamente, en la presente evaluación. Con Rfs muy similares se encuentran el de 0.21 encontrado por Cáceres et al. con el de 0.24 de esta evaluación.

### 9.1.2 Capa fina 2 (rizomas)

La Figura 9 muestra que aun después de haber concentrado los extractos de rizomas para realizar las siembras, las bandas que mostraron son bastante difusas; con excepción de la presentada por el extracto de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*, que mostró bastante acentuada la mancha correspondiente al estándar del Ácido Clorogénico; esto resulta contrario a lo observado en la cromatopla del extracto de las frondas para esta especie, en donde las otras dos (*Phlebodium decumanum* y *Polypodium triseriale*), mostraron manchas más intensas para el mismo estándar.

En la Figura 10 se muestra que se encontraron en los extractos de rizomas 6 bandas para *Phlebodium decumanum*, 7 bandas para *Polypodium triseriale* y 3 bandas para *Phlebodium pseudoaureum*. Aunque no en las 3 especies de Calahuala, se encontraron manchas correspondientes a 3 de los 9 estándares sembrados. **La tabla 3** muestra el resumen de los Rfs y manchas encontradas en los extractos de rizomas. El Ácido Clorogénico al igual que en la placa 1, se disoció en 2 bandas identificadas con las letras **j** y **k**, las que aparecieron en los extractos de rizomas de las 3 especies; Rutina, identificada con la letra **i**, se manifestó en el extracto de rizoma de *Polypodium triseriale* e Hyperósido, identificada con la letra **m**, en el de *Phlebodium decumanum*. Adicionalmente se

encontraron bandas que no correspondieron a los estándares; estas son: la banda identificada con la letra **g**, con un Rf de 0.1 en *P. decumanum*; banda identificada con la letra **h** con Rf de 0.40 en *P. decumanum* y *P. triseriale*; banda identificada con la letra **l** al final del frente del solvente, presente en las 3 especies; banda identificada con la letra **n** en *P. triseriale* con un Rf de 0.78; banda **ñ** en *P. triseriale* con Rf de 0.29

Cáceres et. al. (13) encontraron 3 Rfs para los extractos de rizomas de *Plebodium decumanum*, obtenidos a partir de una mezcla etanol: agua 70:30. Estos fueron de =.24, 0.41 y 0.77. De estos puede decirse que hay una coincidencia práctica con los correspondientes a las letras ñ(0.29), h(0.40) y n(0.78).

### 9.1.3 Comentarios generales de las capas finas 1 y 2

Por la intensidad de las manchas, el Ácido Clorogénico parecería ser el más abundante de los compuestos fenólicos de las calahualas estudiadas. Las manchas en frondas fueron de mayor intensidad en al menos para *Phlebodium decumanum* y *Polypodium triseriale*. En los rizomas, contrario a lo ocurrido en frondas, fue de mayor intensidad en *Phlebodium pseudoaureum* y aunque presentes, muy tenues en las otras dos especies. La importancia de este hecho estriba en que el Ácido Clorogénico ha sido referido por Stommel y Whitaker en el año 2,003 (18), como uno de los agentes secuestradores de radicales libres más potentes con propiedades antimutagénica, antimicrobiales, antivirales y reductores del colesterol LDL.

Las frondas de *Phlebodium pseudoaureum*, aparecen con mayor definición las manchas producidas por Rutina, Hyperósido y Quercitrina, las cuales se muestran de color anaranjado en la figura 7. Aunque en menor Intensidad, también aparecen en las frondas de las otras dos especies. En los rizomas solo se encontró Rutina en *P. decumanum* e Hyperósido en *P. triseriale*. De estos compuestos, la Rutina y la Quercitrina, pero fundamentalmente la Quercitrina, tiene gran influencia en la reducción de la diarrea como consecuencia de su efecto antiinflamatorio en el colon, lo cual ha sido descrito por Ballester et al (21). Muy importante también la Rutina, entre cuyas actividades, destacan las descritas por Mozobuchi et al. en 1,969 (19), relacionadas con la prevención de la hipertensión e infartos. Por su parte, el Hyperósido, a sido reportado por Zhiyong Liu, et al. en el año 2005 (25) como un efectivo antioxidante en células cerebrales. La presencia de estos flavonoides en las 3 especies de Calahualas estudiadas, puede contribuir a su actividad biológica, de la cual ya se han hecho estudios que han mostrado resultados satisfactorios, aunque estos se han realizado Principalmente con *P. decumanum*.

## 9.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA (%)

Los espectros presentados en las figuras 12, 13 y 14, para las especies *Phlebodium pseudoaureum* (registro de colección 89) con una absorbancia de 0.50931, *Polypodium triseriale* (registro 99) con absorbancia de 0.32195 y *Phlebodium decumanum* (115) con absorbancia de 0,51670 respectivamente, mostraron picos bien definidos, todos alcanzando su máximo a los 422 nm.

Aunque a primera impresión, de acuerdo al valor de la absorbancia encontrada (ver cuadro 2), pareciera que *P. decumanum* resultaría con el mayor porcentaje de flavonoides expresados como Quercetina, resultó con un valor de 1.7524%, correspondiéndole el segundo lugar en función de este resultado, contando al inicio del proceso, con 7.86% de humedad. El contenido más alto de flavonoides lo alcanzó, *P. pseudoaureum*, con 1.8094% cuyo material sujeto a extracción contenía al inicio del proceso 12.04% de humedad. La especie que menos contenido de flavonoides reportó fue *P. triseriale*, ya que únicamente alcanzó 1.1404% de flavonoides totales, teniendo al inicio 11.78% de humedad.

Lo anterior es claramente comprensible cuando se relaciona 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. decumanum* la que contenía menor humedad, por lo tanto, aportó mayor materia seca, para un rendimiento medido en función de la absorbancia, muy similar al alcanzado por *P. pseudoaureum*.

Cuando los resultados finales se asocian con la intensidad de las bandas presentes en la cromatoplaqueta 1 (figura 7), también se pueden entender estos resultados, ya que en general, las bandas de mayor intensidad las presentó *P. pseudoaureum*.

Los rendimientos en flavonoides totales registrados por las Calacuales del presente estudio, se encuentran entre el 1 y 2%, expresados como Quercetina, superiores a los de varias especies evaluadas por Koo Hui Mian y Suhaila Mohamed en el año 2001 (24), referido en la sección de antecedentes de este documento. Por su parte, Mozobuchi et al. (19) en 1,969, encontrando niveles solo de Rutina en hojas de *Lycium chinense* (solanaceae) desde 1.2 hasta 2.7%. Lo anterior ejemplifica la variabilidad en contenido de flavonoides encontrada en las diferentes especies vegetales.

Es de suma importancia establecer las mejores épocas para realizar las cosechas, ya que aun bajo condiciones de invernadero, han sido encontradas variaciones en la concentración de los metabolitos primarios, tal como la observada Raffo et al. en 2004 (23), en 6 diferentes épocas, en las que el contenido de Rutina en tomates varió desde 1.79% a 6.71%. Las plantas evaluadas en el presente estudio, fueron cosechadas en época de abundante lluvia, lo que puede incidir en

la dilución de principios activos en los órganos. De hecho, se pudo observar sobre todo en los rizomas, una consistencia bastante succulenta, indicadora de alto contenido de agua. Esta podría ser una razón de la escasa detección de flavonoides en este órgano en la cromatografía de capa fina y la imposibilidad de poder registrar concentración alguna con el método de cuantificación de flavonoides totales expresados como Quercetina (%).

## 10. CONCLUSIONES

De los resultados encontrados en el presente estudio, se desprenden las siguientes conclusiones:

- a) En las frondas de *Phlebodium decumanum*, *P. pseudoaureum* y *Polypodium triseriale* se encontró Rutina, Quercetina, Hyperósido, y Ácido Clorogénico, todos ellos, con importante actividad biológica. Si bien, el Ácido Clorogénico no constituye un flavonoide de acuerdo a su clasificación química, está incluido dentro la familia de los compuestos fenólicos no flavonoides de la serie cínámica, derivado del ácido caféico, que ha mostrado importante actividad antioxidante.
- b) En los rizomas de las 3 especies evaluadas se encontró Ácido Clorogénico. Adicionalmente, *Polypodium triseriale* registró presencia de Hyperósido y *Phlebodium decumanum* presencia de Rutina.
- c) El contenido de los compuestos fenólicos encontrados en las frondas, difiere del encontrado en los rizomas, ya que en este último, se encontró menor número de los detectados en las frondas.
- d) Por la intensidad de las manchas detectadas en las cromatoplacas, y por la falta de registro de flavonoides en los rizomas mediante el método empleado para la cuantificación de los mismos, se deduce que los rizomas poseen menor concentración de flavonoides que las frondas.
- e) De acuerdo con los datos encontrados en la cuantificación de flavonoides totales, expresados como Quercetina (%), *Phlebodium pseudoaureum* presentó el mayor contenido de flavonoides totales (1.8094 %), seguida de *Phlebodium decumanum* (1.7524%). *Polypodium triseriale*, registró el menor valor de flavonoides totales (1.1404%)

## 11. RECOMENDACIONES

Si bien es cierto que hay aun un largo camino que recorrer debido a la amplia distribución de las 3 especies y las características propias de las mismas, las siguientes recomendaciones pueden ayudar a establecer prioridades o líneas de investigación a seguir.

- a) Realizar validaciones metodológicas de diferentes métodos de extracción y purificación y cuantificación de flavonoides para las especies de Calahuala.
- b) continuar con la evaluación de flavonoides del resto de entradas de la colección de calahuales, para ir seleccionando aquellas más promisorias para la obtención de estos metabolitos secundarios.
- c) Una vez seleccionadas las especies con mayor potencial de producción de flavonoides, se sugiere realizar una evaluación de su producción estacional, lo cual aportará valiosa información relacionada con el momento apropiado para realizar la cosecha.
- d) Para cuantificar el contenido de flavonoides de los rizomas mediante el método empleado en este estudio, se debe considerar la realización de pruebas preliminares que permitan establecer la cantidad requerida de muestra, con el fin de poder hacer la detección espectrofotométrica.
- e) Relacionar los resultados del contenido de flavonoides, con la producción de biomasa que se registre para las diferentes entradas de la colección.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Argentina: Editorial Corpus. 2004. 1,359p. (p.244-246).
2. Graf, BA; Mulbury, PE; Blumberg, JB: Flavonols, flavones, flavanones, and human health:epidemiological evidence. J Med Food. 2,005;8:281–290.
3. Gerrit, D. et al. Flora mesoamericana. México: Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México/Missouri Botanical Garden/The Nacional History Museum (London). Vol. 1, 1995. (p.333-366).
4. Meza E, de la Sota E, Ferrucci M. *Phlebodium aureum* (Polypodiaceae, Pteridophyta): Su Presencia en Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 2006;41(1-2): 71 - 76.
5. García B. Absorción in vivo de oligómeros de epicatequina. Tarragona: Universitat Rovira I Virgili (tesis doctoral, Programa de Doctorado de Nutrición y Metabolismo bienio 1999-2001, Facultad de Química de Tarragona) 2005. 254p.
6. Winkel-Shirley, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. Plant Physiology. 2001; 126:485-493.
7. Winkel-Shirley, B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. Plant Physiology. 2001;27:1399-1404.
8. Hertog M, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Archives of Internal Medicine. 1995;155(4).
9. Yochum, L. et al. Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. American Journal of Epidemiology. 1999;149(10):943-949.
10. Palazón, J; Cusidó, R; Morales, C. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino, Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. ACE, Revista de enología. 2001;9.
11. Martínez S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 2002;17(6):271-278

12. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Universidad de San Carlos de Guatemala. Vademécum Nacional de Plantas Medicinales. Guatemala: 2006. 262p.
13. Cáceres, A. et al. 2,006. Propuesta de monografías farmacopéicas de 10 especies vegetales de Centroamérica. Guatemala. 262p. (p.50-63)
14. Lin Z, et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican Oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. Journal of Food Composition and Analysis 2007;20:361-369.
15. Lock O. Investigación Fotoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, 1,994. 300p. (p111-144).
16. Wagner H, Blatt S. Plant Drug Análisis. A thin Layer Chromatography Atlas; Flabonoids Drugs including Gingko biloba and Echinaceae Species. 2 ed. Alemania: Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1996. 284p. (p.195-197).
17. Farmacopeia brasileira. 4 ed. Monografías, fascículo 1. Saõ Paulo: Atheneo Editora, 1996. pt.2.
18. Stommel J, Whitaker B. Scientists Get Ander Eggplant's skin. Agricultural Research 2004;52(1):16-19
19. 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.
20. Tiberti L, et al. On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 2,007;18(1)100-105.
21. Ballester I, et al. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. Ars Pharm 2006; 47 (1): 5-21.
22. Tiberti L, et al. On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 2007;18(1)100-105.
23. Raffo et al. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). Journal of Food composition and analysis 2006;19(1):11-19.



24. Koo Hui Mian and Suhaila Mohamed. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Alignin) Content of Edible Tropical Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:3106-3112
25. 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
26. García M. Efectos de la melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium decumanum* sobre el estrés oxidativo en el ejercicio físico intenso. España: Universidad de Granada (tesis doctoral, Departamento de enfermería, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) 2007. 322p.

## **13. ANEXOS**

### 13.1 ANEXO 1. COLECCIÓN DE CALAHUALAS Y PLANTAS COSECHADAS (Figuras 1, 2, 3 y 4)



**FIGURA 1 “A”.** Panorámica de la colección de Calahualas, de donde fueron obtenidas las muestras para el presente estudio.



**FIGURA 2 “A”.** *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger. A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros. C. Identificada con el número 89, fue colectada en Montaña Suchitán, Santa Catarina Mita, del departamento de Jutiapa.

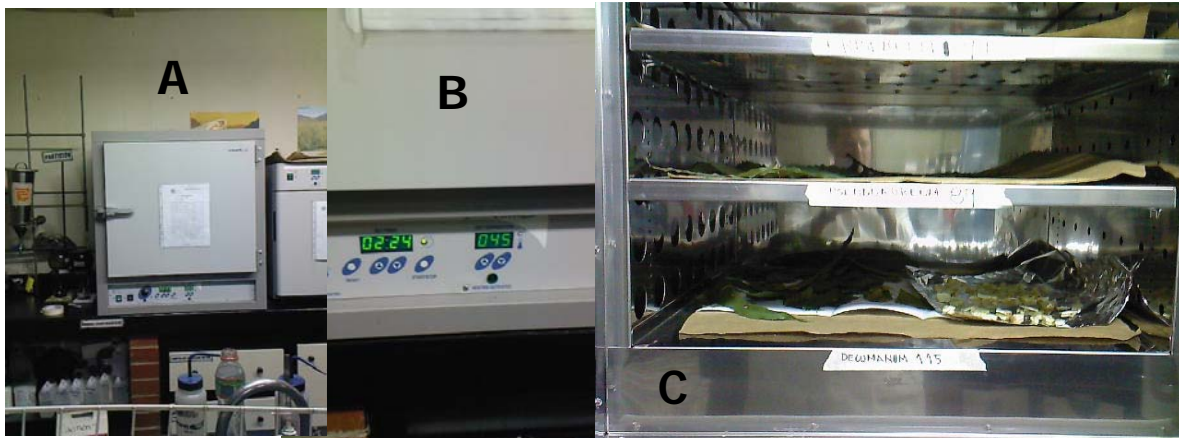


FIGURA 3 “A”. *Polypodium triseriale* Swartz A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. Identificada con el número 99, fue colectada en la Aldea El Milagro, Izabal. C. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros.



FIGURA 4 “A”. *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. A. vista de la planta desde el haz de las frondas. B. Identificada con el número 115, fue colectada en cerca de Ziquín Zacán, Petén, en palmas de corozo. C. vista del envés de la fronda; se pueden apreciar las hileras de soros.

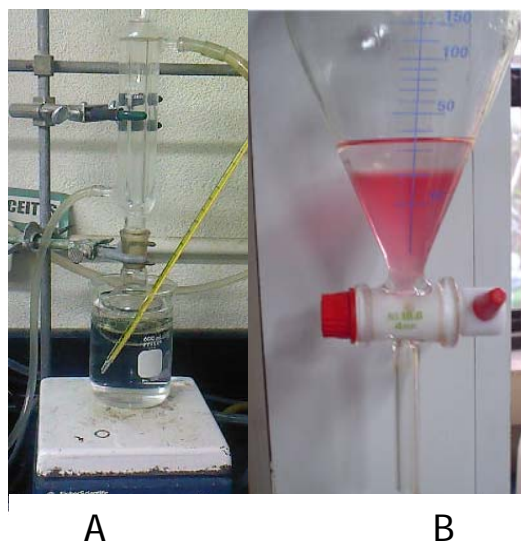
### 13.2 ANEXO 2. EQUIPO EMPLEADO EN EL SECADO DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN POR REFLUJO (Figuras 5, 6 y 11).



**FIGURA 5 “A”.** A. Muestra el equipo de secado. B. puede observarse a la derecha en verde, la temperatura de secado (45°C). C. Condiciones del interior de la cámara de secado con 3 tramos, donde se colocaron rizomas y frondas por especie.



**FIGURA 6 “A”.** Balanza de humedad. A. muestra pesando 0.514 gramos lista para ser analizada. B. pérdida porcentual de humedad después de 15 minutos a 105 °C (6.61 %), valor que refleja el contenido de humedad de la muestra; en este caso corresponde al rizoma de *Polypodium triseriale*.



**FIGURA 11 “A”. Preparación de muestras para determinación del contenido total de flavonoides. A, reflujo de la droga vegetal. B, extracción con acetato de etilo.**

Después de preparar las soluciones necesarias para desarrollar el proceso de extracción y de preparación de las muestras para la medición espectrofotométrica, se procedió a realizar el reflujo en acetona y demás reactivos químicos, de 0.4 gramos de cada una de las 3 especies de calaguala, tanto de frondas como de rizomas, empleando para el efecto un matraz balón de 100 mL, conectado al equipo de reflujo, a una temperatura de 60 °C tal como se aprecia en la fotografía A de la figura 11, de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 7.4. La misma figura también presente en la fotografía B, una de las etapas de extracción con acetato de etilo en la ampolla de decantación, previo a la preparación de la solución madre, a partir de la cual se prepara la muestra para el análisis de espectrofotometría.