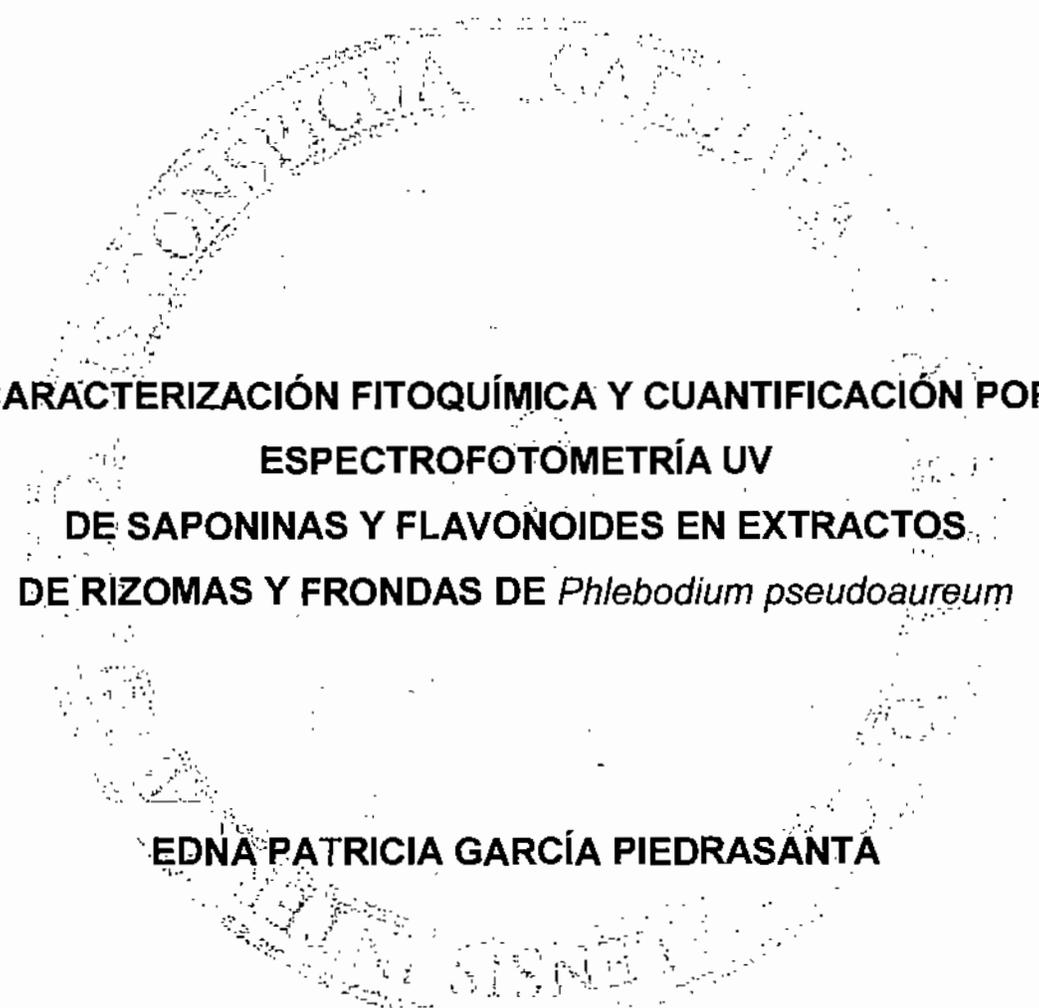


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN POR  
ESPECTROFOTOMETRÍA UV  
DE SAPONINAS Y FLAVONOIDES EN EXTRACTOS  
DE RIZOMAS Y FRONDAS DE *Phlebodium pseudoaureum***

**EDNA PATRICIA GARCÍA PIEDRASANTA**

**Química Farmacéutica**

Guatemala, agosto de 2008

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

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN POR  
ESPECTROFOTOMETRÍA UV  
DE SAPONINAS Y FLAVONOIDES EN EXTRACTOS  
DE RIZOMAS Y FRONDAS DE *Phlebodium pseudoaureum***

**INFORME FINAL**

PRESENTADO POR  
**EDNA PATRICIA GARCÍA PIEDRASANTA**

Para optar al título de

**Química Farmacéutica**

*Guatemala, agosto de 2008.*

## **JUNTA DIRECTIVA**

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

## **ACTO QUE DEDICO A:**

### **A Dios:**

Porque eres el guía de mi vida, mi apoyo en todo momento, la fuerza que me impulsa cada día. Porque nunca me has fallado, sin Ti este logro no sería posible.

### **A mis padres:**

Julio García y Edna Piedrasanta de García; por todo el amor y el apoyo incondicional que siempre me han dado. Por confiar plenamente en mí y darme todas las herramientas para lograr esta meta.

### **A mis hermanos:**

Julio Gustavo y Julio Waldemar; por su apoyo, su amistad y por todo lo que hemos compartido.

### **A mis abuelitos:**

Mami Mary, Mama Zoila (†), Papa Gustavo (†) y muy especialmente a Papi Waldemar (†) por ser ejemplo de lucha y esfuerzo en mi vida. Por todo el amor incondicional. Vivirán siempre en mi memoria y en mi corazón.

### **A mis amigas y amigos:**

Por todos estos años de amistad y de esfuerzo compartidos.

### **A Christian:**

Por estar siempre a mi lado, por compartir sueños y esperanzas. Por todo el apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios**, por darme una vida maravillosa llena de amor y de alegría y permitirme cumplir una meta más.

**A mis padres**, por todos sus consejos, sus enseñanzas, por todo su amor. Gracias por enseñarme el camino correcto, por ser mis mejores amigos, por dejarme la mejor herencia: "mi carrera".

**A mis hermanitos**, por todo su apoyo, su cariño, su amistad, su comprensión.

**A mi familia**, Mami Mary, mi tío Jorge, mi tío Mario, mi tío Luis, mi tía Paty, mis primos y primas; gracias por su amor, su apoyo y todos sus consejos.

**A Christian**, por estar allí cuando más te necesito, por tu amor y apoyo incondicional.

**A mis amigas y amigos de la U**, por la amistad que me han brindado todos estos años, el apoyo y su cariño.

**A mis catedráticos**, gracias por compartir sus conocimientos.

**A mi asesora**, Licda. Sully Cruz, por todo su apoyo y sus consejos en la elaboración de este trabajo. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de conocer y aprender más.

**Al LIPRONAT**, por brindarme el lugar, los recursos y el apoyo necesarios para la elaboración de este trabajo.

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**, por ser mi casa de estudios y de formación profesional.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>41</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>42</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>45</b>

## 1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar si existen diferencias cualitativas en la composición fitoquímica y diferencias cuantitativas en el contenido de flavonoides totales y saponinas esteroidales totales en fronda y rizoma de la especie vegetal *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala). Ya que por medio de la investigación se ha descubierto que muchos de los beneficios medicinales que se le han atribuido a una gran variedad de especies vegetales, se deben principalmente a los metabolitos secundarios conocidos como saponinas y flavonoides; debido a que presentan propiedades medicinales muy interesantes.

El tamizaje (screening) fitoquímico fue la etapa inicial de la investigación. Se realizaron ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para la determinación de los metabolitos: Alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, esteroides insaturados y esteroides y triterpenoides. En los casos donde se obtuvieron resultados positivos, que fue en los ensayos de: Alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos; fue necesario realizar la respectiva cromatografía en capa fina para confirmar la presencia de dichos metabolitos secundarios.

Según el tamizaje fitoquímico, en la fronda de *P. pseudoaureum* se determinó presencia de flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos; y en el rizoma de la misma especie vegetal únicamente se determinó presencia de saponinas y cumarinas.

Al realizar la cuantificación de flavonoides totales, se determinó que la fronda de *P. pseudoaureum* posee un 0.23% de flavonoides totales (con desviación estándar de 0.0030) dentro de su composición, a diferencia del rizoma que reportó únicamente un 0.04% de flavonoides totales (con desviación estándar de 0.0323).

En la cuantificación de saponinas esteroidales según el método de Baccou, se preparó una curva a 4 concentraciones distintas (2, 4, 6 y 8 microgramos por mililitro) a partir del estándar diosgenina. La curva se leyó a 430 nm. En base a la curva se calcularon los mg/ml y el porcentaje de saponinas esteroidales totales por muestra.

De acuerdo a los resultados en la fronda de *P. pseudoaureum* se obtuvo un porcentaje de 0.15% de saponinas esteroidales (con desviación estándar de 0.0050) y en el

rizoma se obtuvo un porcentaje de 0.10% de sapogeninas esteroidales (con desviación estándar de 0.0100).

Se concluye que, si existen diferencias cualitativas en la composición fitoquímica y diferencias cuantitativas en el contenido de flavonoides totales y sapogeninas esteroidales en fronda y rizoma de la especie vegetal *Phlebodium pseudoaureum*.

## 2. INTRODUCCIÓN

En Guatemala los problemas de salud son de los aspectos más importantes y críticos que afectan a la población, siendo la falta de recursos una de las razones principales. Es por esto, que en la actualidad tanto en las empresas farmacéuticas transnacionales como en los pequeños laboratorios de producción y de investigación ha surgido la necesidad de identificar y cuantificar los metabolitos responsables de una actividad farmacológica tradicionalmente atribuida a una planta regional de fácil acceso a la mayoría de la población, como lo es *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala). Dicha especie presenta dentro de su composición flavonoides y saponinas. (1)

Los flavonoides parecen tener un papel muy importante en beneficio de la salud, dado que presentan propiedades medicinales muy interesantes, de las cuales se pueden mencionar: antioxidantes, anticancerosos, cardiotónicos, utilizados para la fragilidad capilar, antitrombóticas, para disminuir el colesterol, para proteger el hígado y estómago, como antiinflamatorios y analgésicos y como antimicrobianos. (2,3)

Las saponinas, utilizadas como tales desde hace mucho tiempo, disminuyen la capacidad de absorción de los alimentos en el tubo digestivo, por lo que se han utilizado en regímenes de adelgazamiento y para eliminar las mucosidades bronquiales. (4)

Considerando la creciente participación de las plantas medicinales y de los medicamentos de origen vegetal en el arsenal terapéutico, hace que cada vez más sea necesario efectuar el control de calidad a través de eficientes técnicas modernas, ya que las plantas poseen variaciones en el contenido de sus principios activos y pueden sufrir deterioro y contaminaciones. En caso de presentar un contenido de componentes activos por debajo de lo prescrito, indica baja calidad de la materia prima vegetal. Por lo tanto, es importante determinar la concentración de flavonoides y saponinas en *Phlebodium pseudoaureum* (calahuala) para establecer su calidad, aplicación y posible actividad terapéutica. (5)

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Los Helechos (Generalidades)

Los helechos crecen en lugares sombreados y húmedos, aunque algunas especies prosperan en hábitats expuestos y secos. El número mayor de individuos y de especies se encuentran en las regiones húmedas de los trópicos, donde los helechos arbóreos alcanzan alturas de 10 a 12m. Algunos están limitados a una gama definida de acidez y alcalinidad del suelo (6).

#### 3.2 Descripción botánica de *Phlebodium pseudoaureum*

Es una especie perteneciente a la familia de las Polypodiaceae y comúnmente llamada Calahuala; es reconocida también por sus sinónimos: *Goniophlebium areolatum*; *Phlebodium aureum*; *Polypodium aureum*; *Polypodium areolatu* y *Polypodium areolatum* (7). (Ver Fig. 1 Anexos)

En Mesoamérica a *Phlebodium pseudoaureum* se le ha llamado *P. aureum*, sin embargo la primera es sólo conocida en Florida, Sudamérica, las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, ambas diploides, se han hibridizado dando origen a *P. aureum*, una tetraploide. También se señala que *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* (tratada como *P. aureum*) se ha entrecruzado en Honduras produciendo un híbrido (posiblemente *P. dictyocallis*) con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 pequeños (7).

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

#### 3.3 Hábitat

Crece silvestre en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad, a la sombra. Se encuentra desde México y Centro hasta Sur América en alturas de 1,200-2,200 msnm. (8,9). En Guatemala se ha descrito en Alta

Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (9,10).

Se caracteriza por un hábito epífita distribuida en un rango de altura de 4 a 12 m sobre el dosel de los árboles y estar acompañada de otras especies vegetales.

### 3.4 Condiciones Climáticas

Las condiciones climáticas bajo las cuales se encuentra la calahuala (*P. pseudoaurum*) se caracterizan por un clima templado, por época lluviosa no bien definida, alta nubosidad que favorece la precipitación horizontal a partir de una altitud de 800 hasta los 1200 msnm, estableciéndose las condiciones típicas de un bosque nuboso donde la precipitación horizontal es mas frecuente en época seca, esta ultima condición se da en la posición noreste de las montañas (11).

La humedad relativa promedio requerida por la calahuala es de al menos el 80%, esta condición ambiental es la que presenta menor variación a lo largo del tiempo, esta característica de variación se relaciona con el hábito y las condiciones de bosque nuboso. La nubosidad atmosférica predominante tiene mayor influencia en la distribución húmeda ambiental como precipitación horizontal y no como condicionante de la luminosidad, ya que la calahuala requiere de condiciones particulares de cobertura de dosel para su establecimiento, crecimiento y desarrollo. La presencia de calahuala inicia a la altitud de 800 msnm y a partir de los 1000 msnm hasta los 1225 msnm, la presencia y abundancia de calahuala aumenta considerablemente en relación a los otros estratos altitudinales (11).

### 3.5 Propiedades Medicinales Atribuidas

La infusión y decocción del rizoma se han utilizado oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis), respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía) (12, 13, 8, 14).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores, psoriasis y eczema. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias. Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante,

emenagoga, espasmolítica, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante. (12, 13, 8, 14)

### 3.6 Farmacología de *P. pseudoaureum*

La materia médica son los rizomas verdosos en su estado fresco y café dorados cuando secos. Son cilíndricos, totuosos, con escamas moreno ferruginosas, sin un olor especial (15). Deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de las otras materias primas usadas para la elaboración de productos fitofarmacéuticos (15).

Si bien *P. pseudoaureum* es una planta que empieza a usarse en Europa, su uso aún no es oficial, por lo que no se encuentra en las farmacopeas. Existen productos fitofarmacéuticos del extracto crudo y purificado en forma de rizoma seco, polvo, comprimidos, tintura, extracto fluido, extracto seco y cápsulas (16).

Entre las indicaciones terapéuticas se encuentra su actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y depurativa. Está indicado su uso en el tratamiento de psoriasis, eczemas, dermatosis, vitiligo y estados de disfunción inmune (17).

Estudios antimicrobianos muestran que el extracto acuoso tiene alguna actividad antibacteriana, aunque en otros estudios los extractos acuosos y etanólicos fueron inactivos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (18). El extracto de hojas es activo contra bacterias filopatógenas (*Xanthomonas campestris*) (19). La calagualina es una saponina aislada del rizoma que tiene actividad antitumoral.

Los resultados iniciales sobre su actividad farmacológica fueron contradictorios, por lo que fue considerada sin ninguna propiedad (8). Sin embargo, posteriormente se encontró que la decocción del rizoma produce moderada actividad diurética en ratas (20). En tejido tumoral, una de sus saponinas (anapsos) reduce la incorporación de nucleoproteínas y precursores por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de citostáticos (20).

La administración oral del extracto acuoso tiene acción inmunomoduladora medida por proliferación del bazo de ratón con concanavalina A. La administración de una fracción del extracto acuoso en ratas produce hipoactividad cerebral dosis-dependiente posiblemente por variación en los niveles de IL-1B hipotalámica (4). El extracto acuoso prolonga la sobrevivencia de aloinjertos cutáneos en ratones, sugiriendo una actividad inmunosupresora (21).

Ensayos clínicos desde principios de siglo le atribuyen eficacia en el tratamiento de cálculos renales e hidropesía (22). En pacientes con neoplasias avanzadas se demostró que la calahualina produce un ligero aumento de la supervivencia sin producir efectos indeseados (23).

En un estudio doble ciego con control con placebo se encontró que el extracto crudo mejora el curso clínico de la psoriasis, comparado con el tratamiento convencional. En voluntarios sanos, la administración de extracto por vía oral disminuye la respuesta linfoblástica a la estimulación con mitógenos, los niveles de inmunoglobulinas séricas y la proporción de linfocitos T OKT8+ (24).

Entre otros estudios están:

- Modulación del anticuerpo responsable contra el parásito nematodo *Trichinella spiralis* por anapsos (25).
- El efecto del extracto de *P. leucotomos* en el anticuerpo específico producido en ratones inmunizados por el antígeno del tercer estadio de la larva de *Anisakis simplex* (26).
- Propiedades fotoprotectoras de un extracto hidrofílico de *P. leucotomos* en células humanas (27).
- Actividad antiinflamatoria In Vitro de *P. decumanum* Modulación del factor de tumor necrótico, receptores soluble TNF (28).

### 3.7 Composición Química

Los estudios de composición química se han realizado en algunas de las especies del género *Phlebodium*, pero aún es incompleto. El rizoma de *P. pseudoaureum* contiene azúcar, aceite esencial, mucilago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo, además contiene calagualina (heterósido compuesto por glucosa, fructosa y una aglicona triterpénica), polipodina, aceites grasos y taninos, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina) (29, 8).

Las especies del género *Phlebodium* usadas medicinalmente en El Salvador contienen sólo alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos (18).

Sin embargo en el año 2005, en Guatemala se realizó un trabajo de tesis donde se concluyó que los extractos fluidos, blandos, secos y tinturas de fronda de *P. pseudoaureum* contiene mayor presencia de flavonoides que saponinas. En cambio, el

rizoma de esta misma especie contiene mayor presencia de saponinas que flavonoides (1).

### 3.8 Flavonoides

Los pigmentos flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antotaxinas, aparecen frecuentemente revisados bajo diferentes aspectos en la literatura científica, especialmente en los últimos 30 años (30).

Son los pigmentos universales de las plantas, solubles en agua y responsables del color de las flores, frutos y en algunos casos de las hojas. Por ejemplo los flavonoides amarillos (chalconas, auronas, y flavonoles amarillos) y los rojos, azules y morados como antocianinas. Cuando los flavonoides no son directamente visibles, ellos contribuyen al color actuando como *copigmentos*: por ejemplo las flavonas y flavonoles que no tienen coloración pero son copigmentos que protegen a las antocianinas. Incluso en algunos casos, estas moléculas absorben radiación cercana al UV, este "color" es únicamente percibido por insectos, que son eficientemente atraídos y guiados hacia el néctar, y de allí estos se encargan de asegurar el transporte del polen, condición necesaria para la sobrevivencia de las especies de plantas (31)

Se conoce como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (Ver Fig. 2 en Anexos) y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C (30).

Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos (30).

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, aún de las diferentes clases siendo esto último más común; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizados. Se hallan presente en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente

distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. Al año 1990 se conocen alrededor de 3000 flavonoides, entre ellos 450 flavonoles, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auronas, etc. (30).

Como características generales de estos compuestos se debe señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura (30).

Los flavonoides se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir de la cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurren en varias etapas. Así mismo, cada una de estas clases puede sufrir posteriores metilaciones, isoprenilaciones o glicosidaciones de los grupos hidroxilos, metilaciones de grupos o-hidroxilos, dimerizaciones, etc. (30). (Ver Fig. 3 en Anexos)

**Propiedades:** Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroixiflavonas. Entre otras aplicaciones, están la de los glicósidos de dihidrochalconas como edulcorantes, de rotenona como insecticida, etc. (30).

**Acción Farmacológica:** Es extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar y actúa sobre las venas como la "vitamina P" (bioflavonoides del género *Citrus*: rutina y derivados), dilatadores de las coronarias (proantocianinas de *Crataegus*, *Arnica* y *Gingko*), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatotóxica (silimarina de *Silybum*), colerélica, estrógena y diurética. Destaca asimismo la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas, como las de algunas especies de *Lupinus* (30, 31).

Los flavonoides poseen generalmente actividad antiinflamatoria, por su interacción con el metabolismo del ácido araquidónico (por ejemplo: apigenina, crisina, taxifolina), y pueden ser antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos. Pueden disminuir el colesterol de la sangre, con actividad diurética, antibacteriana, antiviral y pocos pueden ser citostáticos *in vitro* (31, 32).

También los flavonoides son inhibidores enzimáticos (elastina descarboxilasa, elastasa, hialuronidasa, cAMP fosfodiesterasa, aldosa reductasa) (31).

### 3.9 Saponinas

Las saponinas son un grupo complejo de principios naturales (no nitrogenados), comúnmente coloides y glicósidos de ambos, triterpenos y esteroides, dan soluciones jabonosas, y algunos extractos crudos de plantas han encontrado uso como detergentes, y para la producción de espumas estables (30, 32). Están ampliamente distribuidos en las plantas (32).

Ellos causan hemólisis de la sangre aún en soluciones muy diluidas, una propiedad que ha sido utilizada para su detección en extractos de plantas, además, son tóxicos para animales de sangre fría, especialmente en pescados. Estas propiedades no son comunes en todas las saponinas, por lo que no pueden utilizarse para definir a este grupo, es mejor, utilizar una definición en base a su estructura (31).

Las saponinas no son fáciles de aislar por ello muchas veces se prefiere hidrolizar el extracto crudo de la planta y aislar la sapogenina libre de azúcar. Con pocas excepciones el azúcar está unida a la aglicona a través del grupo  $-OH$  en C-3 (30). (Ver Figura No. 4 en Anexos)

Las saponinas del grupo triterpeno se encuentran extensamente distribuidas, y constituyen la mayoría de las saponinas encontradas en la naturaleza; una gran variedad de ellas difieren únicamente en el número y tipo de unidades de azúcar unidas a las sapogeninas; generalmente pertenecen al grupo de la  $\beta$ -amirina, otras pocas son derivadas de la  $\alpha$ -amirina, del lupeol y del grupo de triterpenos tetracíclicos (30).

Fuentes ricas de saponinas triterpenoidales y sus geninas son el ginseng, la alfalfa, la avena, la quinua y la soya, entre otras (30).

Las saponinas esteroidales son materia inicial para la preparación de varios productos muy potentes y ampliamente usados como productos farmacéuticos, entre ellos: cortisona, anticonceptivos, estrógenos, testosterona, etc. Fuentes ricas de saponinas esteroidales son especies de las familias Dioscoreaceae, Liliaceae y Escrofularaceae (30).

Estructuralmente, las saponinas se pueden clasificar en dos grupos basados en la naturaleza de su aglicona:

Saponinas Esteroidales: Están casi exclusivamente presentes en las angiospermas monocotiledóneas (31).

Saponinas Triterpenoides: Son las más comunes, principalmente presentes en la angiospermas dicotiledóneas(31).

### 3.10 Triterpenoides y Esteroides

Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos, y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides (30).

Los esteroides, biogenéticamente muy relacionados a los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base a igual que los triterpenoides tetracíclicos, pueden ser clasificados como esteroides ( $C_{27}$  o más), saponinas esteroidales (o sus agliconas sapogeninas), glicósidos cardíacos, esteroalcaloides y las llamadas hormonas esteroidales, las que hasta la década del 60 eran consideradas exclusivamente de origen animal, pero que a partir de 1966 se han aislado de tejidos de plantas aunque en concentraciones muy pequeñas, y en algunos casos como trazas. Por poseer estos últimos el grupo hidroxilo en el carbono-3 son considerados por algunos autores dentro del grupo de esteroides y más específicamente como zoosteroides para diferenciarlos de los fitoesteroides, aquellos que desde sus inicios son considerados de origen vegetal (30).

### 3.11 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje (screening) fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (33).

### 3.12 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc) distribuido sobre una placa de vidrio o aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente migra por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla. Después que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada (33).

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

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

### 3.13 Métodos Espectroscópicos de Análisis

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

rayos  $\gamma$ , X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), las microondas y radiofrecuencias (RF) (14).

### 3.14 Absorción de la Luz

Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia frecuencia característica de la radiación electromagnética. Este proceso transfiere energía a la molécula y provoca una disminución en la intensidad de la radiación electromagnética incidente. Por consiguiente, la absorción de la radiación atenúa el rayo incidente de acuerdo con la Ley de Lambert y Beer (14).

### 3.15 La Ley de la Absorción

La ley de la absorción, también conocida como Ley de Lambert y Beer, o simplemente Ley de Beer, da información cuantitativa de cómo es que la atenuación de la radiación depende de la concentración de las moléculas que la absorben y de la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente. Cuando la luz atraviesa una solución de analito, la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del analito. Cuanto mayor sea la trayectoria del rayo en la solución de analito de una concentración dada, habrá más especies que absorban la radiación y la atenuación será mayor (14).

La *transmitancia*  $T$  de la solución, es la fracción de radiación incidente que transmite la solución y la *absorbancia*  $A$  de una solución está relacionada con la transmitancia en forma logarítmica, pues el aumento de la absorbancia de una solución se acompaña de una disminución en la transmitancia. Los primeros instrumentos venían equipados con escalas lineales de transmitancia; los instrumentos modernos traen escalas lineales de absorbancia y algunos tienen una computadora que calcula la absorbancia a partir de mediciones (14).

### 3.16 Componentes de los Instrumentos

La mayoría de los instrumentos espectroscópicos de las regiones UV-visible incluyen cinco componentes principales (14):

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

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala la salud constituye una de las causas de mayor preocupación, siendo uno de los aspectos críticos la falta de acceso a medicamentos. En la actualidad muchos guatemaltecos no cuentan con el ingreso económico mínimo necesario para cubrir sus gastos básicos de salud; razón por la que muchos de ellos han recurrido a la medicina natural en busca de la cura a sus afecciones.

*Phlebodium pseudoaureum*, conocida como Calahuala, es un helecho popularmente conocido por su capacidad de tratar afecciones gastrointestinales ( como diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis), respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis y afecciones renales (cálculos, hidropesía), entre otros.

Por medio de la investigación se ha descubierto que muchos de los beneficios medicinales que se le han atribuido a una gran variedad de especies vegetales, se deben principalmente a los metabolitos secundarios conocidos como *saponinas* y *flavonoides*; pues presentan propiedades medicinales muy interesantes.

Por lo tanto, es importante determinar la concentración de flavonoides y saponinas en rizomas y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* (Calahuala) para así confirmar sus atributos medicinales, especificando qué parte de la planta contiene mayor cantidad de estos metabolitos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

- 5.1.1 Caracterizar fitoquímicamente al extracto etanólico de rizoma y fronda de *Phlebodium pseudoaureum*.
- 5.1.2 Cuantificar los flavonoides y saponinas contenidos en el rizoma y fronda de *Phlebodium pseudoaureum* por medio de espectrofotometría ultra violeta (UV).

### 5.2 Especificos

- 5.2.1 Mostrar mediante un perfil cromatográfico en capa fina, la presencia de los metabolitos secundarios de interés a partir de los extractos etanólicos de rizoma y fronda de *P. pseudoaureum*.
- 5.2.2 Cuantificar los flavonoides totales presentes en el rizoma y fronda de *P. pseudoaureum*.
- 5.2.3 Cuantificar las saponinas presentes en el rizoma y fronda de *P. pseudoaureum*.
- 5.2.4 Comparar la caracterización fitoquímica entre fronda y rizoma de *P. pseudoaureum*.
- 5.2.5 Comparar la cantidad de flavonoides y saponinas entre fronda y rizoma de *P. pseudoaureum*.

## 6. HIPÓTESIS

Existen diferencias cualitativas en la composición fitoquímica y diferencias cuantitativas en el contenido de flavonoides totales y saponinas totales presentes en rizoma y fronda de *Phlebodium pseudoaureum*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Población:

Se seleccionó el rizoma y la fronda de *Phlebodium pseudoaureum*, la cual fue recolectada en Santa Lucía Milpas Altas, bajo manejo e identificado por un botánico especialista de FAUSAC (Ing. Vicente Martínez).

### 7.2 Muestra:

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

### 7.3 Recursos:

#### 7.3.1 Humanos:

- Investigadora Edna Patricia García Piedrasanta
- Asesora Licda. Sully Cruz

#### 7.3.2 Institucionales:

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

#### 7.3.3 Apoyo Financiero:

- Fondo de Desarrollo de Ciencia y Tecnología (FODECYT)

### 7.4 Materiales y Equipo:

#### 7.4.1 Equipo:

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

- Reflujo
- Estufa
- Termómetro
- Manguera de vacío
- Embudo
- Cámara Cromatográfica
- Cromatofolios de silicagel 60 F<sub>254</sub>
- Micropipetas de 5µL
- Atomizadores para cromatografía en capa fina
- Refrigeradora
- Papel filtro Whatman No. 1
- Balones aforados de 100 y 50ml
- Baño de María
- Cristalería y material de laboratorio en general

#### 7.4.2 Reactivos:

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

#### 7.5 Procedimiento:

##### 7.5.1 Colecta:

Se seleccionó y cosechó material sano de rizoma y fronda de *P. pseudoaureum* proveniente de Santa Lucía Milpas Altas.

##### 7.5.2 Secado y Almacenamiento:

Se colocó el material vegetal en bandejas con papel Kraft y se pusieron en un secador solar a la sombra. Se movió la planta cada cierto tiempo, la humedad de almacenamiento no fue mayor de 10%. Se guardó en bolsas plásticas y se identificaron las bolsas adecuadamente. Estos ejemplares no fueron depositados en ningún herbario.

##### 7.5.3 Cortado:

Se cortó con tijeras el rizoma en partes pequeñas aproximadamente de 1 cm de largo y se colocó el material en una bolsa plástica debidamente identificada.

#### 7.5.4 Tamizado:

Se pasaron las frondas secas por el tamiz No. 5, y colocó el material vegetal en una bolsa plástica debidamente identificada.

#### 7.5.5 Percolación:

En un percolador previamente preparado con algodón y papel filtro se colocó la planta cortada o tamizada, se agregó el solvente extractor, en este caso etanol al 50%, dejándolo por encima de la planta. Se dejó reposar el tiempo necesario (24 horas), hasta que se recibió el menstuo que posteriormente se rotaevaporó.

#### 7.5.6 Preparación del extracto:

Se concentró en un evaporador rotatorio hasta la obtención del extracto.

### 7.6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO A TRAVÉS DE ENSAYO MACRO Y SEMIMICRO:

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

Las técnicas utilizadas se basaron en el Manual de Operaciones de Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (5, 30, 33).

#### 7.6.1 Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: Se pesó 1g de materia vegetal. Se agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego se añadió 25ml de metanol a 60°C. Se filtró con papel filtro Whatman 1 y se acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2N. la solución resultante se dividió en 4 tubos evaluando la siguiente manera:

Tubo 1: Se agregaron 5 gotas de reactivo Mayer's

Tubo 2: Se agregaron 5 gotas de reactivo Dragendorff.

Tubo 3: Se agregaron 5 gotas de reactivo Wagner.

Tubo 4: Testigo.

Se utilizó como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos (5, 30, 33).

Cromatografía en capa fina: Se pesó 1g de material vegetal seco y molido, se agregó 1 ml de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y se dio una extracción con 5ml de metanol. Se

colocó en baño de maría a 60°C durante 5 minutos. Se filtró, se concentró y se aplicó en una placa de silica gel 60 F254. Se utilizó como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10µL) (5, 30, 33).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10); acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10), cloroformo- dietilamina (90:10); acetona-agua-amonio concentrado (90:7:3) (5, 30, 33).

Detección:

- Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.
- Reactivo de Dragendorff: zonas cafés o naranjas en vis, los colores no son estables (5, 30, 33).

#### 7.6.2 Investigación de Taninos:

Ensayos macro y semimicro: Se dio la extracción a 10g de material vegetal pulverizado con 30ml de etanol o metanol al 80%, se filtró y evaporó a sequedad. Se añadió 25ml de agua caliente al residuo, se agitó con varilla y se dejó enfriar. Se agregó 1ml de solución de cloruro de sodio al 10% y se filtró. Se adicionó 3ml del filtrado en 4 tubos:

Tubo 1: Testigo

Tubo 2: Se agregaron 4 a 5 gotas de gelatina al 1% (p/v)

Tubo 3: Se agregaron 4 a 5 gotas de gelatina-sal (gelatina 1%, cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: Se agregaron 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10% (p/v).

Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración. Cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol (5, 30, 33).

#### 7.6.3 Determinación de Flavonoides:

Ensayos macro y semi micro: Se dio la extracción a 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol o metanol al 80%, se filtró y se concentró. Se enfrió a temperatura ambiente y se trituro el residuo con 15 mL de éter de petróleo hasta que la extracción quedó incolora. Se disolvió el residuo en 30 mL de metanol al 80 por ciento, se filtró y se dividió en 5 tubos:

Tubo 1: Se agregaron 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

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

Tubo 3: Se agregaron 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y se calentó en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

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

Tubo 5: Se agregó un álcali a un extracto acuoso.

Tubo 6: Testigo.

Se evaluaron las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.

El desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración (5, 30, 33).

Cromatografía en capa fina: Se dio la extracción a 1 g de material vegetal seco pulverizado con 10 mL de metanol por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Se filtró la solución y se aplicó sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Como estándar se empleó una solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 µL). (Quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido) (5, 30, 33).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10) (5, 30, 33).

Detección:

- Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365 nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.
- Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG), fluorescencia intensa en UV-365 nm. Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas (5, 30, 33).

#### 7.6.4 Investigación de Antraquinonas:

##### Ensayos Macro y Semi micro:

- Prueba de Bornträger. Se dio la extracción de 3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de etanol al 80%, se filtró y se concentró en baño de maría (60°C). Se disolvió el residuo con 30 mL de agua destilada y se filtró. Se agregaron 10 mL de benceno. A la fase bencénica se añadió 5 mL de solución de test de amonio y se agitó. Se observó cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo) (5, 30, 33).
- Prueba de Bortränqer modificado: Se calentó 0.3 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% y se calentó 10 minutos en baño de maría a 60°C. Se añadieron 10 gotas de

ácido acético glacial para acidificar. Se agregó 10 mL de benceno. A la capa bencénica se adicionó 5 mL de solución de prueba de amonio y se agitó. Se observaron cambios de color en fase alcalina (color rojo, rosado: positivo) (5, 30, 33).

Cromatografía en capa fina: Se dio la extracción a 0.5 g de material vegetal seco pulverizado con 5 mL de metanol en baño maría (60°C) por 5 minutos. Se filtró y se aplicó 10 µL en la cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Se utilizó como estándar una solución al 0.1% en metanol de antraquinonas (10 µL). (Aloina, flangulina A/B, glucofrangulina A/B y sus agliconas, reina, aloe-emodina, extracto de sen)

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

Detección:

- Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm fluorescencia amarilla o rojo-café.
- Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV-365 nm. Antronas y antranolas: zona amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365 nm (5, 30, 33).

#### 7.6.5 Investigación de Cumarinas:

Ensayos macro y semimicro: Se midieron 5 mL de extracto vegetal metanólico. Se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo. Con un capilar se aplicaron 2 manchas en papel filtro. A una mancha se agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N, se observaron bajo luz UV de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo) (5, 30, 33).

Cromatografía en capa fina: A 1 g de material vegetal se adicionó 10 mL de metanol y se calentó 30 minutos en baño de maría. Se filtró y se evaporó hasta 1 mL. Se aplicó 20 µL en una cromatoplaque de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Se utilizó como estándar canela en metanol al 1 por ciento, umbeliferona, ácido p-cumárico, cumarina.).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7); tolueno-éter (1:1 saturado con 10% de ácido acético, 50 mL de tolueno y 50 mL de éter se mezclaron durante 5 min con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtró y se descartó la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es utilizada).

Detección:

- Sin tratamiento químico UV 254nm fluorescencia. UV 365 nm todas las cumarinas mostraron una intensa fluorescencia azul o verde- azul.

- Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10%. UV-365 nm fluorescencia azul o verde (5,30,33).

#### 7.6.6 Investigación de Esteroides o Triterpenoides:

##### Reacciones de color:

- Liebermann Burchard: Se aplicaron unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en la que las saponinas triterpenoidales dan color rosado o púrpura. Resultados (verde, azul verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico (5, 30, 33).
- Carr-Price: 1 mg de muestra en cloroformo se le agregó 2 mL de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo. Resultado: color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B. (5, 30, 33).

#### 7.6.7 Investigación de Saponinas:

Prueba de espuma: A cada tubo se le adicionó 10 mL de agua destilada. Se calentó en baño de maría (60°C) durante 30 minutos. Se enfrió, se taparon los tubos y se agitó vigorosamente de 30 a 40 segundos. Se dejaron reposar los tubos durante 30 minutos, se observó la formación de capa de espuma. Una capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas (5, 30, 33).

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

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

Tubo 3: 2 mL de agua.

Cromatografía en capa fina: Se extrajo 2 g de material vegetal con 10 mL de etanol al 70%, mediante reflujo por 10 minutos. Se evaporó hasta 5 mL y se procedió a aplicar 25-40  $\mu$ L en una cromatoplaaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Se utilizó estándares de saponinas, sapogeninas y esteroides al 0.1% en metanol (10  $\mu$ L).

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

Detección:

- Reactivo de sangre, zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.
- Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides.

- Reactivo de Komarowsky: zonas azules, amarillas y rojas). (Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: zonas azules, violetas, amarillentas (5, 30, 33).

#### 7.6.8 Investigación de Esteroles insaturados:

Ensayo macro y semimicro: Se dio una extracción de 10 g de material vegetal pulverizado con 30 mL de etanol o metanol al 80%. Se filtró y se concentró a sequedad. Se removieron los pigmentos vegetales con porciones de 10 mL de éter de petróleo hasta que el éter salió incoloro. Se adicionaron 10 mL de benceno y se agitó durante unos minutos. Se decantó en un tubo y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se filtró y se evaporó a sequedad. Se agregaron 10 mL de cloroformo, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y dividió el filtrado en 3 tubos:

Tubo 1: Se agregaron 3 gotas de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (Liebermann-Buchard).

Tubo 2: Ensayo de anillo, se agregó ácido sulfúrico concentrado (Prueba de Salkowski).

Tubo 3: Testigo.

Se utilizó como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1%. Se observaron cambios de colores inmediatos y/o graduales (rojo, rosado, violeta para esteroides insaturados) durante un período de una hora.

Prueba de anillo: En presencia de esteroides insaturados, formación de un anillo rojo cereza en la interfase (5, 30, 33).

#### 7.6.9 Investigación de Sesquiterpenlactonas:

Ensayos macro y semi micro:

- Prueba de Legal: A 1-2 mg de muestra en agua o etanol se le agregó 1 mL de solución fresca de nitroprusiato de sodio 0.5% en agua y 1-4 gotas de KOH 2N. Se presentaron colores característicos rojo oscuro, para lactonas  $\alpha$  y  $\beta$  insaturada.
- Prueba de Baljet: Se añadió a la muestra unas gotas del reactivo. Se presentó un color rojo claro a oscuro (5, 30, 33).

Cromatografía en capa fina:

Fase móvil: Cloroformo: éter etílico (5:1), cloroformo: metanol (99:1), éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo (2:2:1)

Detección: Se pueden emplear diferentes reveladores tales como: Vapores de yodo, solución acuosa de permanganato de potasio al 5%, ácido sulfúrico concentrado o al 50%, vainillina al 1% en etanol, luego del calentamiento de la placa por 5 min a 100 – 105 °C aparecerán manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules (5, 30, 33).

### 7.7 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES (34):

Se hace necesario cuantificar la cantidad de flavonoides presentes en una planta, especialmente cuando éstos son sus principios activos. Con este método se obtiene el porcentaje de flavonoides presentes en determinada planta expresados como el estándar utilizado, que puede ser rutina, quercetina, hiperósido, ácido clorogénico o cualquier otro estándar que se considere afín con el posible flavonoide presente en dicha planta. (34) Para obtener este valor es necesario que la muestra sea previamente preparada, para después medir la absorbancia de ésta, en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, el cual dará un dato de absorbancia que se introducirá en la siguiente fórmula (34):

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

Donde:

- Q** = flavonoides totales expresados como quercetina (% p/p)
- A** = Absorbancia a 425 nm
- m** = Peso de la muestra en gramos
- Pd** = Determinación de agua (%)

#### 7.7.1 Preparación de la Solución Madre (34):

- En un balón de fondo redondo de 100ml (A) se colocó:
  - 0.4g. de droga pulverizada (800 µm)
  - 1ml. De una solución acuosa de metenamina SR (0.5% en agua)
  - 20 ml. De acetona
  - 2ml. De HCl
- Se calentó en baño de maría la mezcla, bajo reflujo por 30 min.
- Se filtró la mezcla a través de un algodón hacia un balón volumétrico de 100ml (B).
- Se regresó el residuo de la droga al balón de fondo redondo (A) y se añadió 20ml de acetona.
- Se calentó nuevamente a ebullición bajo reflujo durante 10 min.
- Se filtró nuevamente con algodón hacia el balón volumétrico de 100ml (B).
- Se repitió nuevamente la operación colocando el residuo de la droga y el algodón en el balón de fondo redondo (A) y se adicionó: 20ml de acetona y se calentó bajo reflujo por 10 min.
- Se filtró de nuevo hacia el mismo balón volumétrico de 100ml (B).
- Se enfrió a temperatura ambiente y se ajustó a un volumen de 100ml con acetona.

- En una ampolla de separación se trató 20ml de solución anterior con 20ml de agua y se dio la extracción con 15ml de acetato de etilo. Este procedimiento se repitió tres veces, con porciones de 10ml de acetato de etilo.
- Se reunieron las fases de acetato de etilo y se lavaron pasando por un embudo de separación 2 porciones de 50ml de agua. Se transfirieron las fases de acetato de etilo hacia un balón volumétrico de 50ml y aforó con acetato de etilo.

#### **7.7.2 Preparación de la Solución Muestra (34):**

- Se transfirieron 10ml de la solución madre a un balón volumétrico de 25ml.
- Se añadió 1ml. de reactivo de Cloruro de aluminio al 2% en solución de Ácido acético en metanol y se completó el volumen con solución metanólica de ácido acético SR (5%).

#### **7.7.3 Preparación de la Solución Blanco (34):**

Se transfirieron 10ml de la solución madre a un balón volumétrico de 25ml y se aforó con una solución metanólica de ácido acético SR.

#### **7.7.4 Análisis Espectrofotométrico (34):**

- Se midieron las absorbancias de la muestra a 425nm después de 30min de su preparación, utilizando el blanco para ajuste de cero.
- Se calculó el contenido de flavonoides totales, a partir de la fórmula mencionada anteriormente.

### **7.8 CUANTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES (35):**

El método de *Bacoou* descrito aquí es simple, específico y sensible para determinar *sapogeninas esterooidales*. Es más eficiente que otros métodos espectrofotométricos, sobre todo con respecto a la posibilidad de determinar todas las *sapogeninas esterooidales* independientemente de sus particularidades estructurales. La determinación se basa en reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo, con lo cual se forma un cromóforo con el mismo espectro de absorción y un único pico a 430nm para todas las siguientes *sapogeninas*: diosgenina, trigogenina, hecogenina, smilagenina, yonogenina, tokorogenina, etc. (33).

#### **7.8.1 Preparación de la Muestra (35):**

Se pesó exactamente 0.125 gramos de material vegetal y se añadió 50ml de etanol al 95%. Se agitó y se calentó en baño maría a 60°C por 20 minutos, luego se filtró. Se

transfirió una alícuota de 4ml en un Beaker y evaporó a sequedad en baño maría. Se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió:

- 2ml de acetato de etilo
- 1ml de reactivo A
- 1ml de reactivo B

Se agitó y se calentó a 60°C en baño maría durante 20 minutos. Se enfrió por 10 minutos y se leyó a 430nm.

#### **7.8.2 Preparación del Reactivo A (35):**

Se mezcló 0.5ml de anisaldehído con 99.5ml de acetato de etilo.

#### **7.8.3 Preparación del Reactivo B (35):**

Se agregó ácido sulfúrico concentrado en acetato de etilo para llegar a una solución al 50%.

**7.8.4 Solución Blanco (35):** 2 ml de acetato de etilo, 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B.

#### **7.8.5 Preparación de Curva de Calibración (35):**

Se preparó una solución madre de diosgenina, a una concentración de 10 microgramos por mililitro de etanol al 95%. A partir de dicha solución se prepararon las soluciones estándares de referencia, a concentraciones de 2, 4, 6 y 8 microgramos por mililitro.

### **7.9 DISEÑO DEL ESTUDIO**

7.9.1 Tipo de estudio: Descriptivo.

7.9.2 Diseño del muestreo: Muestreo *No probabilístico*. Se realizaron 3 replicas a conveniencia por muestra.

7.9.3 Análisis de Resultados: El análisis de los datos se hizo de forma descriptiva-comparativa.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Tamizaje Fitoquímico

**TABLA No. 1:** Alcaloides en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 5 y 6 en Anexos)

MATERIA VEGETAL	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Rf en Cromatografía en Capa Fina	Estándar con que coincide
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	No se observó ninguna banda	No coincide con ningún estándar
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	No se observó ninguna banda	No coincide con ningún estándar

**TABLA No. 2:** Flavonoides y Antocianinas en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 7 y 8 en Anexos)

MATERIA VEGETAL	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación	Rf determinado en Cromatografía en Capa Fina	Posibles Flavonoides dentro de su composición
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	0.31; 0.56; 0.66; 0.82; 0.89; 0.96	Rutina, Hiperósido, Ácido Clorogénico, Quercetina, Ac. Cafeico, Kaempferol y Quercitrin
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	No se observó ninguna banda	la muestra no posee Flavonoides

**TABLA No. 3:** Saponinas en fronda y rizoma del *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 9 y 10 en Anexos)

MATERIA VEGETAL	Test de Espuma	Rf determinado en Cromatografía en Capa Fina	Estándar con que coincide
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo	0.48; 0.60; 0.71; 0.81	No coinciden con ningún estándar
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo	0.43; 0.81	No coinciden con ningún estándar

**TABLA No. 4:** Cumarinas en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 11 y 12 en Anexos)

<b>MATERIA VEGETAL</b>	<b>Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación</b>	<b>Rf determinado en Cromatografía en Capa Fina</b>	<b>Estándar con que coincide</b>
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	0.08	Cumarina, Ácido Cumárico y Umbeliferona
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo	0.08; 0.13	Cumarina, Ácido Cumárico y Umbeliferona

**TABLA No. 5:** Sesquiterpenlactonas en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*.

<b>MATERIA VEGETAL</b>	<b>Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación</b>
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo

**TABLA No. 6:** Taninos en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 13 en Anexos)

<b>MATERIA VEGETAL</b>	<b>Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación</b>
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Positivo
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo

**TABLA No. 7:** Antraquinonas en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*.

<b>MATERIA VEGETAL</b>	<b>Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación</b>
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo

TABLA No. 8: Esteroides y triterpenoides en en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*.

MATERIA VEGETAL	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo

TABLA No. 9: Esteroles insaturados en fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*.

MATERIA VEGETAL	Resultado de Caracterización macro y semi micro, de coloración y precipitación
Fronda de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo
Rizoma de <i>Phlebodium pseudoaureum</i>	Negativo

## 8.2 Cuantificación de Flavonoides

TABLA No. 10: Cuantificación de flavonoides totales a 425 nm en fronda de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 14 y 15 en Anexos):

MUESTRA	ABS	Peso Mx.	% Humedad	FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS EN QUERCETINA
Mx1	0.25145	0.4009g	14.12	0.2282 %
Mx2	0.25075	0.4015g	14.12	0.2272 %
Mx3	0.25643	0.4008g	14.12	0.2328 %

Media: 0.2294%

Desviación Estándar: 0.0030

**TABLA No. 11:** Cuantificación de flavonoides totales a 425 nm en rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 14 y 15 en Anexos)

MUESTRA	ABS	Peso Mx.	% Humedad	FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS EN QUERCETINA
Mx1	0.0302	0.4011g	13.31	0.0271 %
Mx2	0.0819	0.4008g	13.31	0.0737 %
Mx3	0.0129	0.4008g	13.31	0.0116 %

Media: 0.0375%

Desviación Estándar: 0.0323

### 8.3 Cuantificación de Saponinas

**TABLA No. 12:** Curva de absorción del estándar diosgenina a 430 nm (ver Fig. 16 en anexos):

CURVA ESTANDAR DIOSGENINA		
Dilución	Concentración (µg/ml)	Absorbancia a 430 nm
5/25	2	0.0215
10/25	4	0.0429
15/25	6	0.0644
20/25	8	0.0909

Ecuación lineal:  $y = 0.011x - 0.002$

$R^2 = 0.997$

**TABLA No. 13:** Cuantificación de saponinas esteroidales a 430 nm en fronda de *Phlebodium pseudoaureum*. (Ver Fig. 17 en Anexos)

muestra	Absorbancia a 430 nm	Concentración de la solución madre (mg)	concentración (mg/ml)	peso de la muestra (g)	% de saponinas
fronda 1	0.0866	0.1925	0.0077	0.1252	0.1537
fronda 2	0.0880	0.1975	0.0079	0.1252	0.1577
fronda 3	0.0824	0.1850	0.0074	0.1252	0.1478

Media: 0.1531%

Desviación Estándar: 0.0050

**TABLA No. 14:** Cuantificación de saponinas esteroidales a 430 nm en rizoma de *Phlebodium pseudoaum.*

muestra	Absorbancia a 430 nm	Concentración de la solución madre (mg)	concentración (mg/ml)	peso de la muestra (g)	% de saponinas
rizoma 1	0.0604	0.1375	0.0055	0.1251	0.1099
rizoma 2	0.0551	0.1250	0.0050	0.1251	0.0999
rizoma 3	0.0494	0.1125	0.0045	0.1251	0.0899

**Media: 0.0999 %**

**Desviación Estándar: 0.0100**

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como parte del tamizaje fitoquímico que se realizó a la fronda y al rizoma de la especie vegetal *P. pseudoaureum*, se realizaron varios ensayos para determinar presencia de: alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, esteroleos insaturados y esteroides y triterpenoides. En dicho tamizaje se pudieron observar diferencias en la composición fitoquímica entre fronda y rizoma, tal como se reporta en la literatura.

La tabla 1 y fig. 5 se muestra los resultados de los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación obtenidos; los cuales dieron resultado positivo en fronda y rizoma, al agregar los reactivos precipitadores para alcaloides (wagner, dragendorff y mayer). Sin embargo al realizar la cromatografía en capa fina para confirmar dichos resultados, no se observó ninguna banda característica para alcaloides. (Ver fig. 6) De manera que los resultados falso-positivos obtenidos en los ensayos macro se debieron posiblemente a presencia de sustancias interferentes, tales como proteínas, peptonas, purinas, aminas metiladas, sales de amonio, glicósidos, carbohidratos, betaína, colina e incluso taninos.

La tabla 2 y fig. 7 muestra los resultados en la determinación de flavonoides y antocianinas; únicamente la fronda de *P. pseudoaureum* reportó resultados positivos en los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación, siendo éstos confirmados por medio de la cromatografía en capa fina. Se observaron bandas características para flavonoides: rutina, hiperósido, ácido clorogénico, quercetina, ácido cafeico, kaempferol y quercitrina hidratada. (Ver fig. 8)

El rizoma de dicha especie presentó flavonoides y antocianinas dentro de su composición, según la cromatografía en capa fina. Esto confirma lo publicado anteriormente en la literatura, donde la fronda es la más rica en dichos metabolitos secundarios (1).

Según los resultados de la tabla 3 y fig. 9, no se determinó presencia de espuma característica de saponinas en fronda y en rizoma de la especie vegetal *P. pseudoaureum*. Sin embargo, generalmente se prefiere confirmar este tipo de ensayo con cromatografía en capa fina y mediciones espectrofotométricas.

Según los resultados de la cromatografía en capa fina (Ver fig. 10), se determinó posible presencia de saponinas en fronda y en rizoma de dicha especie vegetal; ya que se observaron bandas características. Sin embargo, dichas bandas no coinciden con ninguno de los estándares de saponinas, sapogeninas y esteroides ( $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Ergosterol y Colesterol) que se corrieron. Por lo que se puede considerar la posibilidad de que estas muestras contengan saponinas de otro tipo.

En la tabla 4 y fig. 11 se puede observar que la fronda y el rizoma reportaron presencia de cumarinas dentro de su composición fitoquímica, según los ensayos macro y semi micro, los cuales fueron confirmados mediante la cromatografía en capa fina (Ver fig. 12). Se observaron bandas características de cumarinas, que coincidieron con los estándares: cumarina, ácido cumárico y umbeliferona, por lo que se puede considerar la posibilidad de que las muestras contengan este tipo de cumarinas.

Al realizar los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para determinación de sesquiterpenlactonas (Tabla 5), los resultados fueron negativos para fronda y rizoma de la especie vegetal *P. pseudoaureum*, al realizar tanto la prueba de Legal y Baljet.

En la tabla 6, se pueden observar los resultados de los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para determinación de taninos. Se puede observar que únicamente la fronda de *P. pseudoaureum* presentó taninos dentro de su composición, siendo éste posiblemente del tipo catecol. Estos compuestos fenólicos se encuentran frecuentemente formando glicósidos. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, siendo detectados así por el intenso color negro-azulado (para el pirogalol) o grisáceo-negro (para el catecol) al agregar una solución acuosa o alcohólica de cloruro férrico al 1%.

En las tablas de resultados 7, 8 y 9; se puede observar que tanto la fronda como el rizoma de *P. pseudoaureum* no presentaron antraquinonas, esteroides y triterpenoides y esteroles insaturados dentro de su composición, según los ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación.

Según la literatura, los estudios de composición química que se han realizado en algunas de las especies del género *Phlebodium*, son aún incompletos. Únicamente se conoce que algunas especies del género *Phlebodium* usadas medicinalmente en El Salvador contienen alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos dentro de su

composición. En este proyecto de investigación han sido flavonoides, saponinas, taninos y cumarinas algunos de los metabolitos secundarios detectados en *P. pseudoaureum*.

Los resultados de la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina por ultravioleta visible (U.V), se pueden observar en las tablas 10 y 11. Se encontró un porcentaje mucho mayor de flavonoides totales expresados como quercetina para la fronda de *P.pseudoaureum* (0.23%, con desviación estándar de 0.0030) que para el rizoma (0.04%, con desviación estándar de 0.0323).

Como características generales de estos compuestos se debe señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura.

En la cuantificación de sapogeninas esteroidales según el método de Baccou (tabla 12), se puede observar la curva del estándar diosgenina a cuatro concentraciones: 2, 4, 6 y 8 microgramos por mililitro. La curva se leyó a 430nm, se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.997 y una ecuación lineal donde  $y = 11.48x - 0.002$ . (Ver fig. 16 en anexos)

Por medio de esta curva de calibración se calcularon los porcentajes de sapogeninas esteroidales para fronda de *P. pseudoaureum* que fue de 0.15% (con desviación estándar de 0.0050) y para rizoma que fue de 0.10% (con desviación estándar de 0.0100). (Ver tablas de resultados 13 y 14)

Estos resultados confirman la información obtenida en la literatura, ya que en el año 2005, en Guatemala se realizó un trabajo de tesis donde se concluyó que los extractos fluidos, blandos, secos y tinturas de fronda de *P. pseudoaureum* contienen mayor presencia de flavonoides que saponinas. En cambio, el rizoma de esta misma especie contiene mayor presencia de saponinas que flavonoides (1).

La determinación de saponinas esteroidales se basa en reacciones de coloración con anisaldehído, ácido sulfúrico y acetato de etilo, con lo cual se forma un cromóforo con el mismo espectro de absorción y un único pico a 430nm tanto para el estándar como para la muestra.

Cabe mencionar que las plantas medicinales son productos vegetales de origen natural y de composición variable no totalmente definida. Es decir, son seres vivos que varían constantemente su composición. En el transcurso de la vida de una determinada planta y dependiendo de la naturaleza, del tiempo de exposición al sol, de la calidad y cantidad del agua de riego, de las características del suelo, de la época de recolección, etc. Su composición química varía cualitativamente y cuantitativamente. Además, las distintas partes de una misma planta (hojas, raíces, etc) también tienen distinta composición. Como se pudo observar en el presente proyecto de investigación, donde la fronda de *P. pseudoaureum* presentó mayor porcentaje de flavonoides y saponinas que el rizoma de la misma especie vegetal.

Los analitos presentes en las plantas medicinales se hallan en el interior de su estructura y no de forma aislada como sucede en una mezcla de analitos y excipientes, por lo que éstos deben ser extraídos de su interior, donde la principal dificultad de extracción del analito no radica en el tratamiento del preparado a base de plantas medicinales, sino en el de la propia materia prima. A causa de esta característica, a menudo deben aplicarse tratamientos de muestra largos y agresivos, lo que puede provocar pérdidas importantes de analito. Todo ello hace que los porcentajes de recuperación sean generalmente bajos. Y en muchas ocasiones es imposible separar el propio analito (principio activo) del resto de componentes.

Todos estos aspectos dificultan cada vez más la validación de métodos analíticos de plantas medicinales, ya que se dificulta lograr homogeneidad y representatividad de las muestras. Por tanto es importante realizar un muestreo adecuado y homogeneizar la muestra a analizar al objeto de conseguir la máxima representatividad. Aún cuando se utilizan extractos normalizados de plantas medicinales que han pasado por una fase previa de homogeneización, continúa persistiendo la incertidumbre sobre si su composición química es realmente homogénea.

De manera que se puede decir que la composición química y la calidad de la planta medicinal como materia prima es un factor determinante para la composición y la

calidad final de sus preparados y especialidades farmacéuticas. Por ello, es fundamental el control de calidad de la planta medicinal (materia prima).

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se identificó presencia de flavonoides, saponinas, cumarinas y taninos en los extractos alcohólicos de fronda de *Phlebodium pseudoaureum*, según tamizaje fitoquímico.
- 10.2 Se identificó presencia de saponinas y cumarinas en los extractos alcohólicos de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*, según tamizaje fitoquímico.
- 10.3 La muestra de fronda de *Phlebodium pseudoaureum* posee 0.23% de flavonoides totales expresados como quercetina dentro de su composición.
- 10.4 La muestra de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* posee 0.04% de flavonoides totales expresados como quercetina dentro de su composición.
- 10.5 La muestra de fronda de *Phlebodium pseudoaureum* posee 0.15% de sapogeninas esteroidales dentro de su composición.
- 10.6 El extracto de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* posee 0.10% de sapogeninas esteroidales dentro de su composición.
- 10.7 El extracto de fronda de *Phlebodium pseudoaureum* contiene mayor presencia de flavonoides que sapogeninas esteroidales.
- 10.8 El extracto de rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* contiene mayor presencia de sapogeninas esteroidales que flavonoides.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar con el estudio de la especie vegetal *Phlebodium pseudoaureum*, para poder determinar las estructuras químicas de los flavonoides y saponinas dentro de su composición.
- 11.2 Continuar con el estudio de las otras especies que pertenecen a este género para comparar entre ellas, el porcentaje de flavonoides y saponinas dentro de su composición.
- 11.3 Realizar la evaluación farmacológica de los extractos alcohólicos de fronda y rizoma de *Phlebodium pseudoaureum* con el propósito de validar las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente.

## 12. REFERENCIAS

- 12.1 Guerra C. A. (2005). Obtención, Caracterización y Evaluación de las Propiedades Físico-Químicas de los Extractos Fluidos, Blandos y Secos así como de las Tinturas del Rizoma y de la Fronda de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de Laboratorio. Guatemala USAC. Facultad de Ingeniería (Tesis de graduación Ingeniería Química). Julio, 2005. p131.
- 12.2 Martínez, V. (2006) El Mundo de Las Plantas. Revista gratuita "Botanical". Flavonoides. Htlm.
- 12.3 Martínez, V. (2006) El Mundo de Las Plantas. Revista gratuita "Botanical". Principios Medicinales. Htlm.
- 12.4 Antón A. Franco A. Fernández-Novo L. Cacabelos R. (1992). Effects of anapsos on Behavior and Brain cytokines in rat. *Ann Psychiat* 3:329-341.
- 12.5 Sharapin N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterpéuticos. Bogotá.
- 12.6 Fuller JH. (1976). Botánica General México. 5ta. Ed. CECST pp. 229-232.
- 12.7 Morán R. (1996). Polypodiaceae. En: Davidse, G; Sousa, M& Chater, A. (Eds) Flora Mesoamericana. Vol 5 Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México pp. 130-133.
- 12.8 Morton JF. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America Springfield, Charles C. Thomas pp. 12.
- 12.9 Stolze RG. (1981). Ferns and Fern Allies of Guatemala. *Fieldiana: Botany New Series* 6:374-377
- 12.10 Martínez M. (1992). Las plantas medicinales de México. México Ed. Botas: 55.
- 12.11 García CL. (2005). Estudio de las condiciones ambientales de la calahuala (*Phlebodium* spp.) en la Sierra Caral, municipio de Morales, departamento de Izabal, Guatemala. Tesis de Maestría. USAC. 63 p
- 12.12 Cáceres A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Edit. Universitaria. Guatemala, 287-289 p.
- 12.13 Martínez R. Herrera M. Castillo J. Carrillo E. Villatoro E. *et al* (1990). Plantas Medicinales utilizadas en el área mam de Huehuetenango parte I Memorias V congreso Nacional Plantas Medicinales, Guatemala pp. 22-32.
- 12.14 Skoog D. (2001) Análisis Instrumental. 7ma ed. Editorial Mc Graw-Hill. México. Pp 562-592.
- 12.15 IIN (1978). Aspectos de la Medicina popular en el área rural de Guatemala, Guatemala Indígena 13:1-616
- 12.16 Artech A. (1992). Fitoterapia. Vademecum de Prescripción. Bilbao, CITA, 835 pp.
- 12.17 Padilla HC. Mathak MH. Fitz Patrick TB. (1994). Qral and Topics difurf polypodium L in the therapy of vitíligo. *Int cong Dermatol New Dehli*.
- 12.18 Planter (1989). Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. San Salvador, Universidad de El Salvador, 468 p.

- 12.19 Grainge M. Ahmed S. (1998). Handbook Plant with pest-control properties N.Y. John Wiley&Son, pp. 470
- 12.20 Cáceres A. Girón L. Martínez A. (1987). Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. *J. Ethnopharmacol* 19:233-245.
- 12.21 Tuominen M. Bohlin L. Lindbom L-O. Rolfsen W. (1991). Enhancing effect of calaguala on the prevention of rejection on skin transplants in mice o phytother res 5:234-236.
- 12.22 Roque JM. (1941). Flora Médico Guatemalleca. Guatemala. Tipografía Nacional, pp. 187
- 12.23 Horvath A. Alvarado F. Alvarado ZN. Padilla G. (1967). Metabolic effects of calagualine, an antitumoral saponin of polypodium leucotomos, nature 214:1256-1258
- 12.24 Vargas J. Muñoz C. Orosio C. García O. (1983). Anapsos, an antisoriatric drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheral blood. *Ann Inst Pasteur Immunol* 134: 393-400.
- 12.25 Oea-Ayuela *et al* (1999). Modulación del anticuerpo responsable contra el parásito nematodo *Trichinella spiralis* por anapsos *Phytotherapy research phytother Res.* 13:566-570.
- 12.26 Cuellar C. Rodero M. Bolás F. Fernández A. (1997). El efecto del extracto de *P. leucotomos* en el anticuerpo específico producido en ratones inmunizados por el antígeno del tercer estadio de la larva de *Anisakis simplex* Interna. *J. Pharmacog.* 35:153-160.
- 12.27 Alonso J. *et al.* (2003). Propiedades fotoprotectoras de un extracto hidrofílico de *P. leucotomos* en células humanas. *J. Phytochem. and photobio. B: Biology* 70:31-37.
- 12.28 Punzón C. *et al* (2003). Actividad antiinflamatoria In vitro de *P. decumanum* Modulación del factor de tumor necrótico, receptores soluble TNF. *Interna Immunopharmacol* 3:1293-1299.
- 12.29 Alonso J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Edit. Corpus. Argentina. 1360: 244.
- 12.30 Lock O. (1994). Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2da Edición Pontificia Universidad católica del Peru Fondo editorial. Pp. 72-75, 80-81, 114-121.
- 12.31 Bruneton J. (1995). Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants. Lavoisier Publishing. Paris, Francia. Pp. 266-282,
- 12.32 Macdonald G. Dictionary of Natural Products. Editorial Publishing, Inc. Estados Unidos. Pp 313, 697.
- 12.33 Medinilla B. (2001). Manual de Laboratorio de Fitoquímica USAC Guatemala pp. 27.
- 12.34 Farmacopeia Brasileira. F. Bras.
- 12.35 Baccou, J; Lambert, F; Sauvaire, J. (1977). Spectrophotometric Method for the determination of total Steroidal Saponin Analyl. 102: pp. 458-465.
- 12.36 Porres, C. (1999) Cuantificación de Saponinas Esteroidales en Frutos, Semillas y Corteza de *Sapindus saponaria* (jaboncillo). Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación Químico Farmacéutico). p 31

- 12.37 Quevedo, C. (2000) Cuantificación de Saponinas Esteroidales en Muestras de *Sapindus saponaria* Procedentes de Cuatro Departamentos de Guatemala. Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación Químico Farmacéutico). p39
- 12.38 Zuleta R. (2005) Perfil Fitoquímico de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger provenientes de 5 regiones de Guatemala. Guatemala USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (tesis de graduación Químico Farmacéutico). p44

## 13. ANEXOS

Figura No. 1: *Phlebodium pseudoaureum*

Figura No. 2: Estructura base y algunos ejemplos de flavonoides

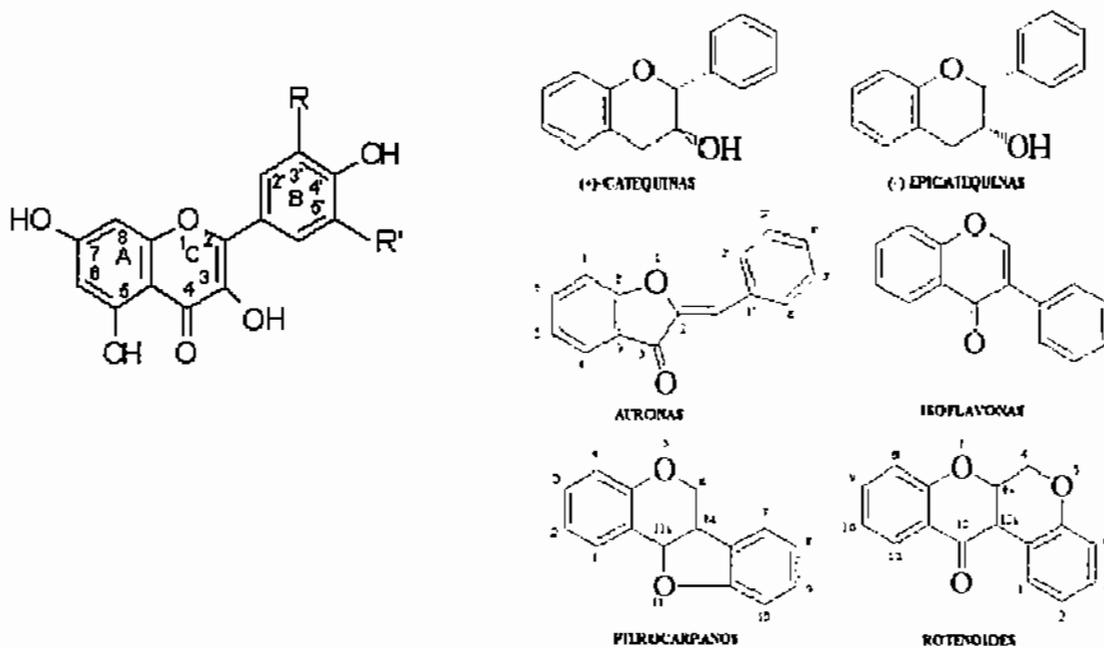


Figura No. 3: Síntesis de flavonoides

RUTA DE LOS POLICÉTIDOS

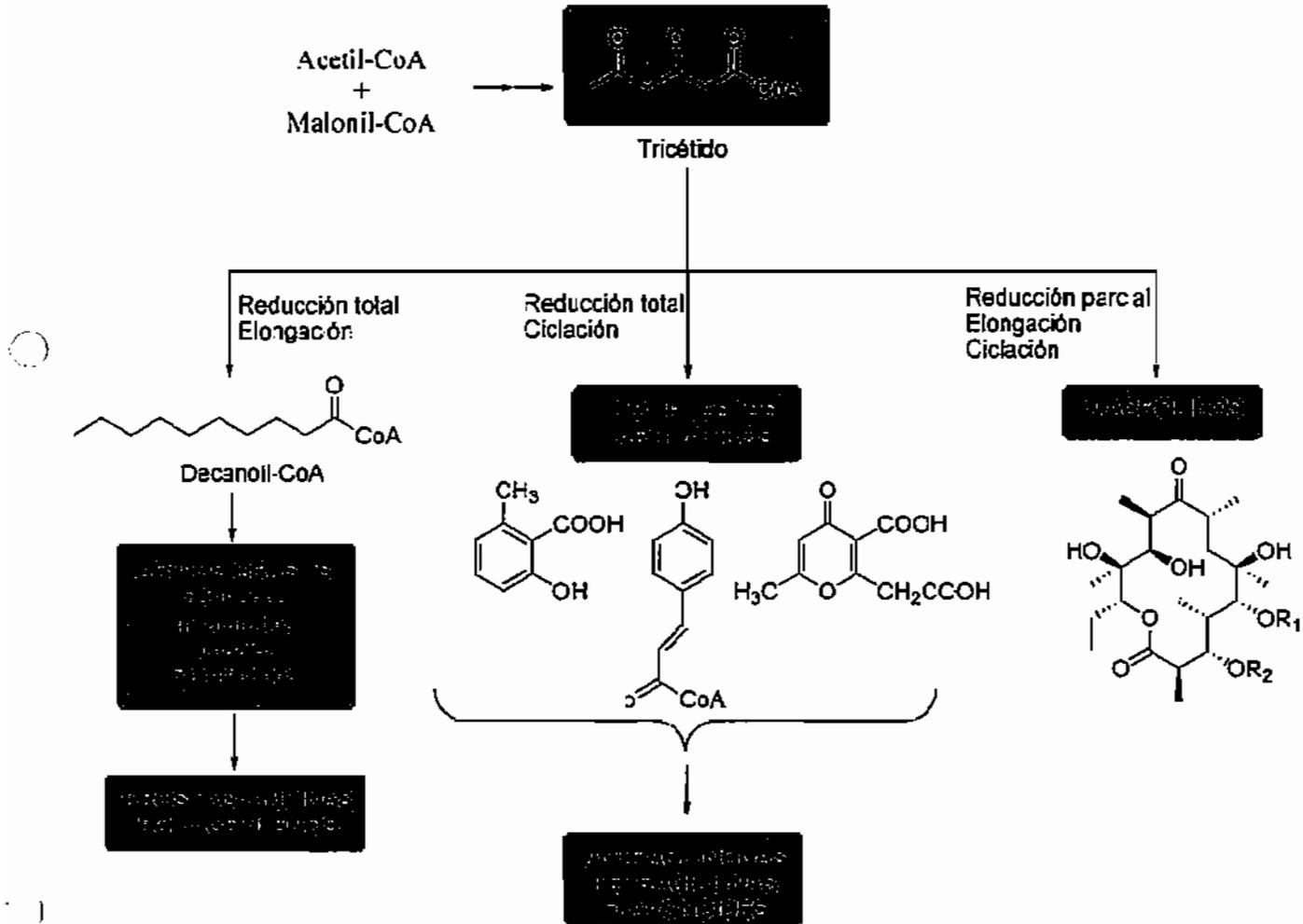
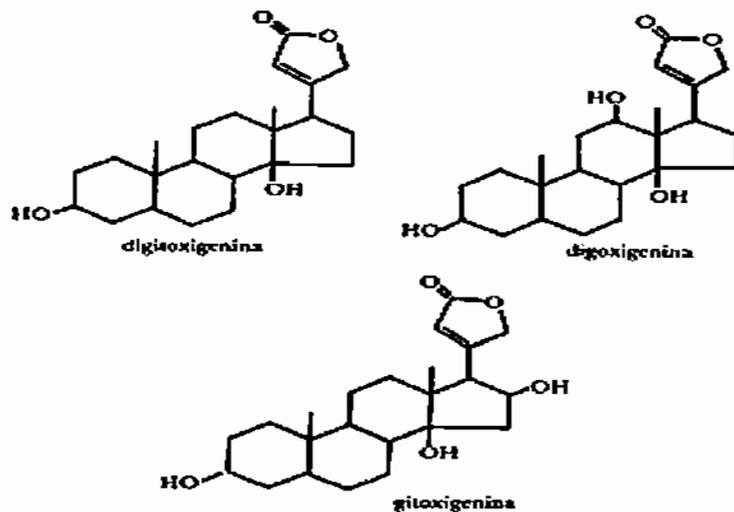
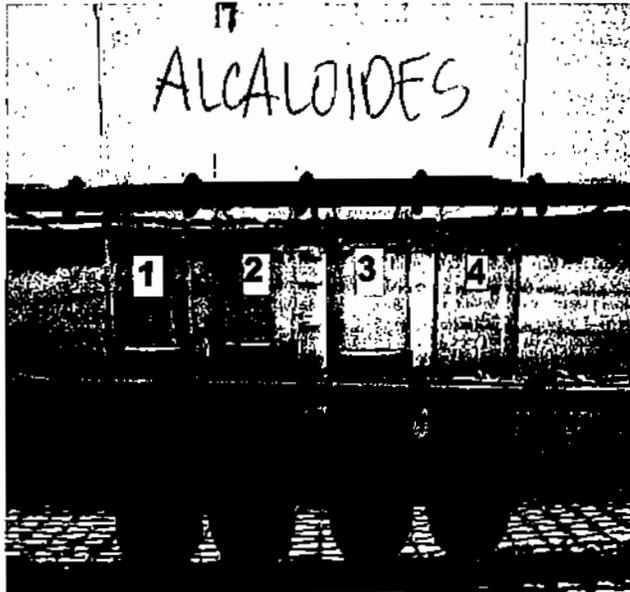


Figura No. 4: Síntesis de triterpenoides

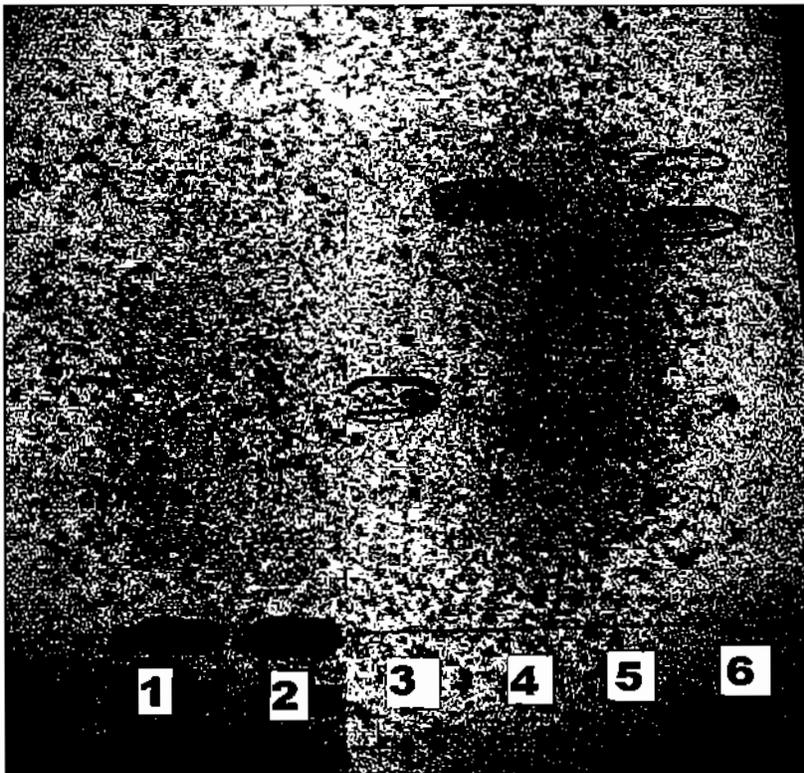


**Figura No. 5:** Ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para determinación de Alcaloides en rizoma de *P. pseudoaureum*



- 1 = Rizoma + Mayer's
- 2= Rizoma + Dragendorff
- 3= Rizoma + Wagner
- 4 = Tubo testigo

**Figura No. 6:** Cromatografía en Capa fina de Alcaloides.



1 = Fronda (no se observó ninguna banda)

2 = Rizoma (no se observó ninguna banda)

3 = Estándar papaverina

4 = Estándar Ajmalina

5= Estándar Atropina

6 = Estándar Reserpina

**Fase móvil:**

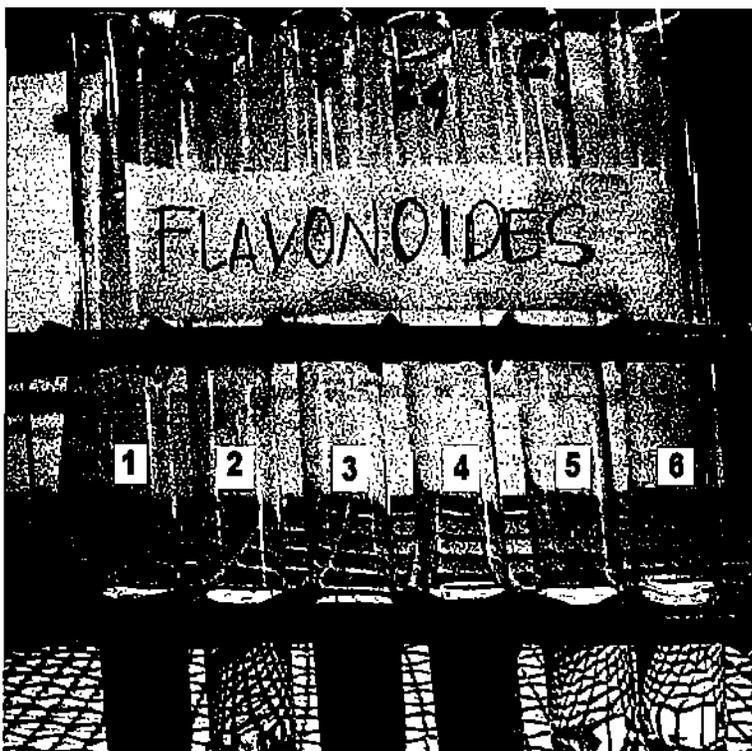
Tolueno-acetato de etilo-dietilamina.

**Detección:** Dragendorff

**Figura No. 7: Ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para determinación de Flavonoides y Antocianinas.**

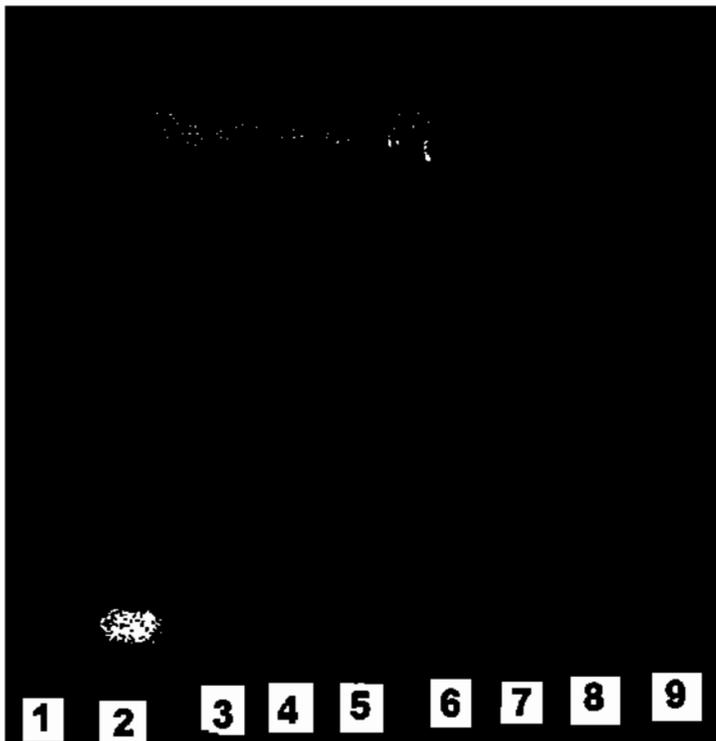


- 1 = Fronda + ácido sulfúrico concentrado
- 2 = Fronda + Cloruro férrico 10%
- 3 = Fronda + ácido clorhídrico concentrado + calor (60°C)
- 4 = Fronda + magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado
- 5 = Fronda + álcali (KOH)
- 6 = Tubo testigo



- 1 = Rizoma + ácido sulfúrico concentrado
- 2 = Rizoma + Cloruro férrico 10%
- 3 = Rizoma + ácido clorhídrico concentrado + calor (60°C)
- 4 = Rizoma + magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado
- 5 = Rizoma + álcali (KOH)
- 6 = Tubo testigo

**Figura No. 8: Cromatografía en capa fina para Flavonoides y Antocianinas**



1 = Rizoma (no se observó ninguna banda)

2 = Fronda

Rf a = 0.31  
 Rf b = 0.56  
 Rf c = 0.66  
 Rf d = 0.89  
 Rf e = 0.96

3 = Quercetina (Rf= 0.96)

4 = Kaempferol (Rf= 0.96)

5 = Quercitrin (Rf = 0.96)

6 = Acido Cafeico (Rf = 0.96)

7 = Hiperósido (Rf = 0.89)

8 = Rutina (Rf= 0.56)

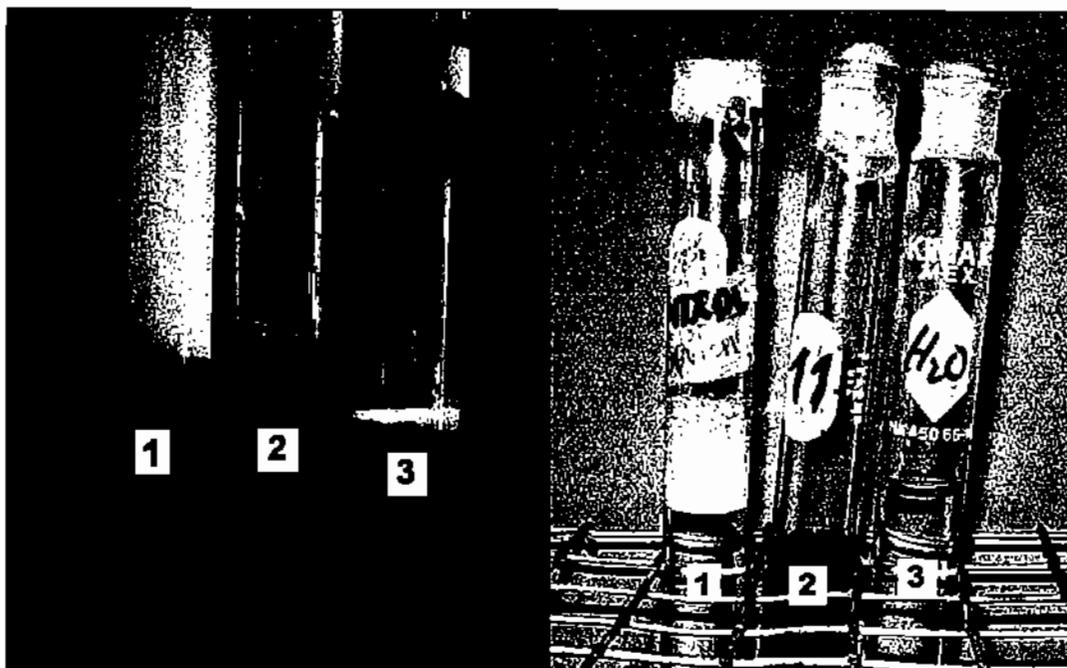
9 = Ácido Clorgénico (Rf= 0.66)

**Fase móvil:**

n-butanol-ácido acético-agua

**Detección:** Reactivo de productos naturales (NP/PEG)

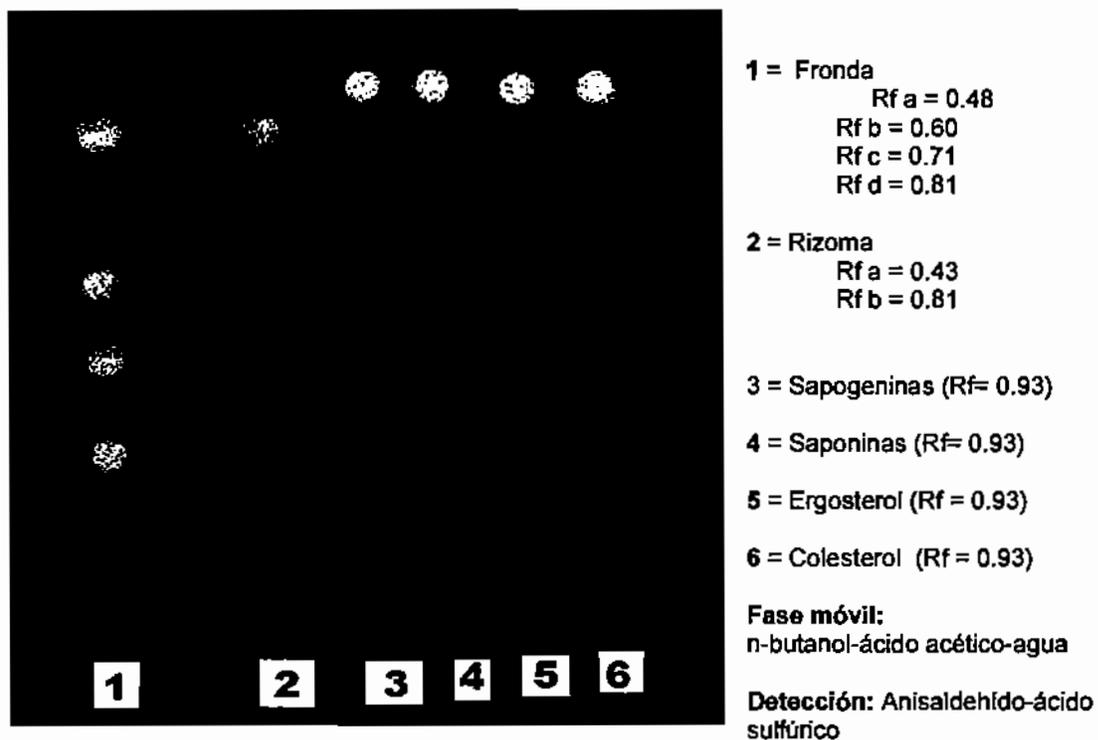
**Figura No. 9: Test de Espuma para determinación de Saponinas.**



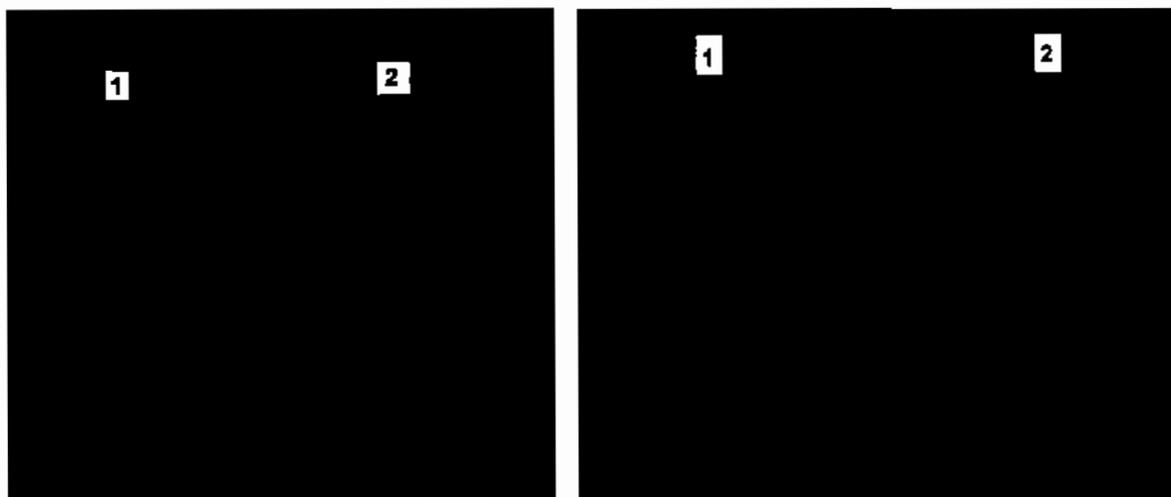
1 = Control positivo (saponinas)  
 2 = Control negativo (agua destilada)  
 3 = Fronda

1 = Control positivo (saponinas)  
 2 = Rizoma  
 3 = Control negativo (agua destilada)

**Figura No. 10: Cromatografía en Capa fina saponinas**

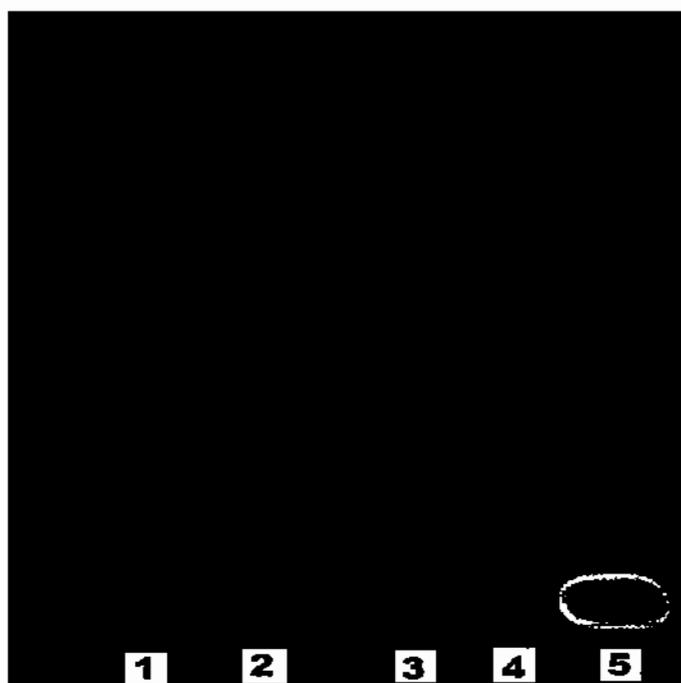


**Figura No. 11: Ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para determinación de cumarinas.**



**1 = muestra sin reactivo**  
**2 = muestra con reactivo (hidróxido de potasio 0.5 N)**

**Figura No 12: Cromatografía en Capa fina para cumarinas.**



**1 = Fronda**

$R_f a = 0.08$

**2 = Rizoma**

$R_f a = 0.08$

$R_f b = 0.13$

**3 = Ácido Cumárico ( $R_f = 0.08$ )**

**4 = Cumarina ( $R_f = 0.08$ )**

**5 = Umbeliferona ( $R_f = 0.08$ )**

**Fase móvil:**

Tolueno-acetato de etilo

**Detección:** Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5%.

**Figura No. 13: Ensayos macro y semi micro de coloración y precipitación para Taninos.**



**1 = Tubo testigo**

**2 = Fronda + gelatina 1%**

**3 = Fronda + gelatina-sal**

**4 = Fronda + cloruro férrico 10%**

Figura No. 14: Espectrofotómetro ultravioleta (U.V.)

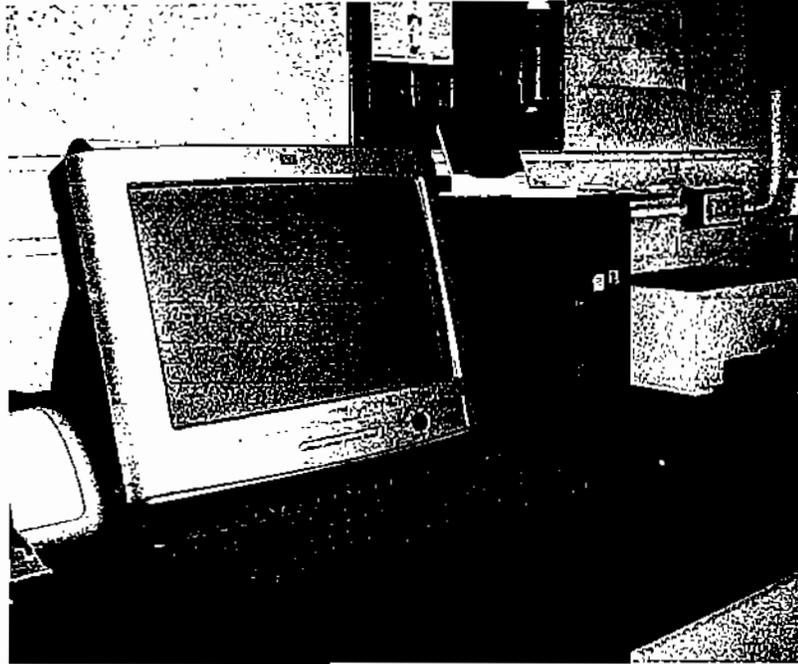


Figura No. 15: Cuantificación de flavonoides.



Figura No. 16: Curva de absorbancias de estándar Diosgenina.

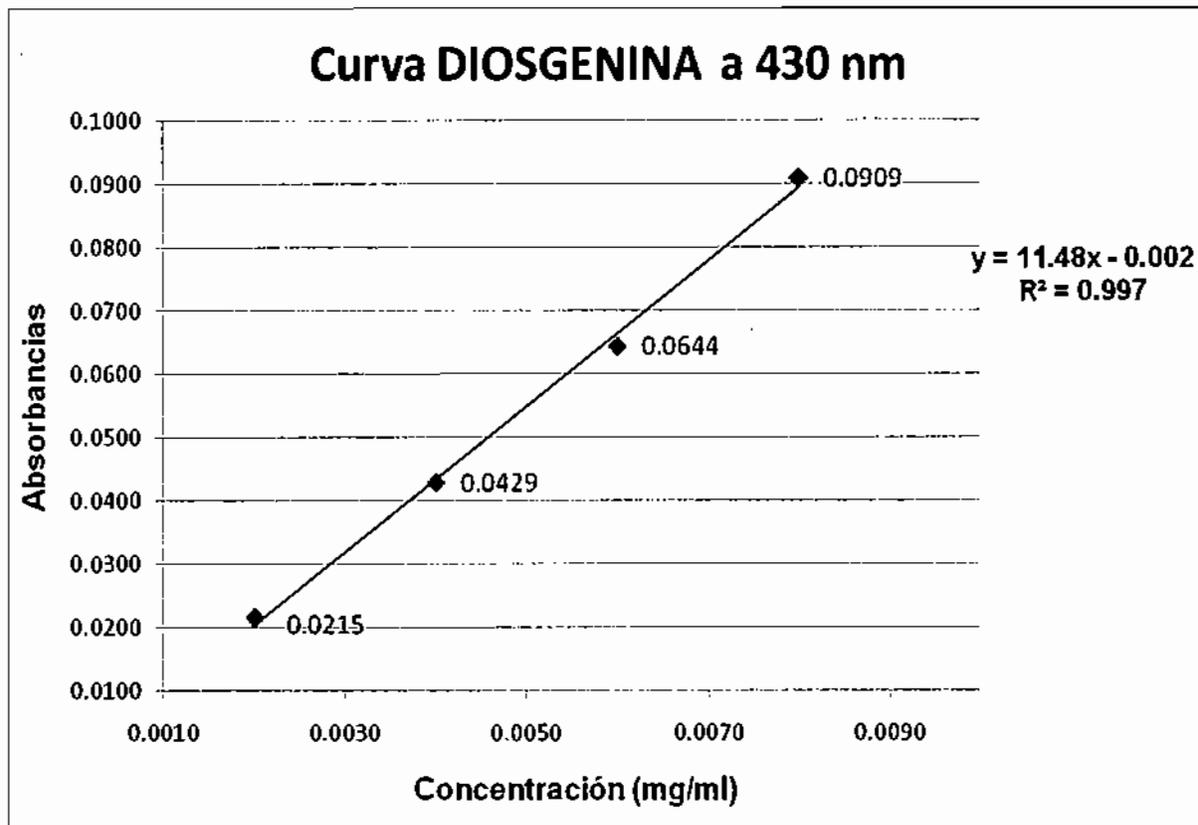


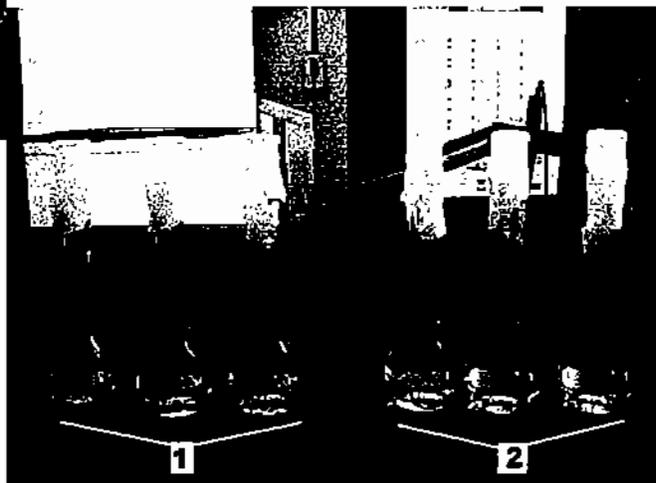
Figura No. 17: Cuantificación de saponinas



Muestras calentándose en baño de maría por 20 minutos a 60°C

1 = Muestras de fronda por triplicado

2 = Muestras de rizoma por triplicado

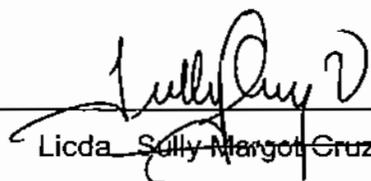




---

By. Edna Patricia Garcia Piedrasanta

**Autora**



---

Licda. Sully Margot Cruz V., M.A.

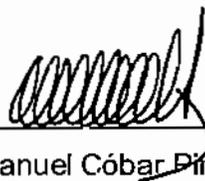
**Asesora**



---

Lic. Francisco Estuardo Serrano Vives

**Director de Escuela**



---

Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto Ph. D.

**Decano**