


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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated on a throne. The figure is surrounded by a blue and gold border. The Latin text "UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS" is inscribed around the top, and "ACADEMIA COACTEMALENSIS" is at the bottom. The words "ORBIS" and "INTER" are also visible on the left and right sides respectively.

Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante
de *Polypodium triseriale* SW
(calahuala)

INFORME DE TESIS

Presentado por:
LESLY ADYARY GUDIEL CASTILLO

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2009

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	5
4. Justificación	17
5. Objetivos	18
6. Hipótesis	19
7. Materiales y métodos	20
Universo y muestra	20
Metodología	22
8. Resultados	37
9. Discusión de resultados	65
10. Conclusiones	61
11. Recomendaciones	63
12. Referencias	64
13. Anexos	68

1. Resumen

La calahuala (*Poyipodium triseriale*) es un helecho epífita de la familia Polypodiaceae. Su hábitat es en zonas boscosas y de clima cálido. Los extractos etanólicos obtenidos de esta especie presentan metabolitos secundarios, a los cuales se les han atribuido propiedades medicinales tales como: anticancerosas, cardiotónicas, antioxidante^(2,4).

En el presente trabajo de investigación se colectaron al azar especies de *Poyipodium triseriale* (calahuala), en los departamentos de Alta Verapaz (Fray Bartolomé de las casas) y Escuintla (Santa Lucia Cotzumalguapa), con el fin de evaluar el perfil fitoquímico y capacidad antioxidante, para determinar si existe diferencia en la composición química y actividad biológica entre rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala).

Los especímenes colectados fueron identificados botánicamente en el herbario BIGU.

Inicialmente se realizaron las pruebas físicas determinando la humedad no mayor del 10 por ciento, dando un pH levemente ácido, con una densidad comprendida entre 0.9348. La extracción se realizó mediante percolación con etanol al 50% utilizando el rotavapor, de la cual se obtuvieron tinturas y extractos secos, los extractos acuosos se obtuvieron por liofilización. Y de los extractos obtenidos los que presentaron mayor rendimiento fueron los extractos secos de las frondas provenientes de Alta Verapaz (35.63%) y Escuintla (30.05%).

En la investigación de los metabolitos secundarios se realizó el tamizaje fitoquímico mediante ensayos macro y semi-micro en cromatografía de capa fina (CCF) en los extractos obtenidos del rizoma y fronda provenientes de Alta Verapaz y Escuintla, evidenciando la presencia de flavonoides y antocianinas, saponinas, principios amargos y cumarinas.

Seguidamente se realizó la cuantificación de los flavonoides presentes mediante el método espectrofotométrico a 394nm, en los extractos secos del rizoma y la fronda de ambas localidades, obteniendo mayor contenido en la fronda proveniente de Alta Verapaz con 7.00%, seguido de la fronda de Escuintla con 3.55%, los rizomas en ambas localidades resultaron con menor porcentaje (0.84% y 1.55%) respectivamente. La prueba

estadística análisis de varianza de dos vías (ANOVA) realizada determinó que si existe diferencia significativa de la presencia de flavonoides entre rizoma y fronda del espécimen *P. triseriale* (calahuala) colectadas en ambas localidades. También determinó que no existe diferencia significativa entre los rizomas de ambas localidades.

Se determinó la actividad antioxidante mediante ensayos cromatográficos y espectrofotométricos utilizando como radical libre el difenilpicrilhidrazilo (DPPH), en los extractos etanólicos obtenidos del rizoma y de la fronda. El ensayo en cromatografía en capa fina (CCF) evidenció que si muestra capacidad antioxidante el espécimen colectado. Los resultados del ensayo en el espectrofotómetro ultravioleta-visible a λ 517nm se expresan como IC_{50} ; siendo mayor en las frondas de Alta Verapaz (0.158) y Escuintla (0.195) que en el IC_{50} de los rizomas de ambas localidades (0.056 y 0.116) respectivamente. La prueba estadística análisis de varianza de dos vías (ANOVA) realizada para el ensayo espectrofotométricos muestra que si existe diferencia estadísticamente significativa entre todas las muestras, y no entre réplica, para la capacidad antioxidante entre rizoma y fronda del espécimen *P. triseriale* (calahuala) colectadas en ambas localidades.

La investigación evidenció que si existe diferencia significativa en la composición química y actividad antioxidante entre rizoma y fronda del espécimen *P. triseriale* (calahuala) colectadas en las diferentes localidades.

2. Introducción

En el mundo hay aproximadamente 10,000 especies de helechos, los cuales se encuentran en hábitats tan diferentes como los bosques húmedos y desiertos. La geografía física de Guatemala es en gran parte montañosa, esto favorece en general a la distribución de las especies de helechos epífitos, los cuales habitan en bosques y zonas montañosas, donde suelen crecer en rocas.

La abundancia de helechos epífitos que crecen en Guatemala y los estudios realizados para determinar sus actividades biológicas ha permitido enriquecer el valor fitoterapéutico con el cual cuenta nuestro país. Fue importante efectuar un análisis fitoquímico sistemático, ya que esto dio a conocer nuevas drogas que podrán ser de utilidad en terapéutica. Se recolectó una planta la cual no ha sido estudiada previamente, y se caracterizó sus componentes químicos mediante un bioensayo determinado, el cual demostró la enorme variedad de productos naturales o metabolitos secundarios; taninos, esteroides, aceites esenciales, saponinas etc., y así contribuir a la estandarización de extractos que permitan dar lugar al desarrollo de nuevos productos fitoterapéuticos.

La calahuala (*Phlebodium aureum*, *Polypodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaurium*) son helechos epífitos por excelencia y de estos se ha mostrado que son especímenes de mucha utilidad como medicina alternativa. En la presente investigación se realizó la caracterización fitoquímica, así como también la evaluación de la capacidad antioxidante en los extractos etanólicos de *Polypodium triseriale* SW (calahuala) provenientes de dos regiones de Guatemala: Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz y Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. (Ver anexo # 6).

3. Antecedentes

3.1 Las plantas medicinales

El empleo de las plantas con fines terapéuticos ha estado siempre presente en la vida del hombre, y mantiene aún una amplia validez a pesar del poderío y de la competencia de la química farmacéutica, basada fundamentalmente en principios activos de síntesis. Sin embargo, la fitoterapia no es una actividad que pueda improvisarse, posee características muy peculiares, sobre todo por lo concreto de sus indicaciones y por la experimentada solidez de éstas, que han pasado la criba de una tradición más que antigua ⁽¹⁾.

La fitoterapia es en primer lugar necesidad de recuperar la capacidad de reconocer y distinguir, basándonos en la experiencia de nuestros antepasados y no abandonándonos a la actuación, a menudo dudosa, de quien se dedica comercialmente a las plantas; por consiguiente, y dentro de lo posible, hay que proceder personalmente a la recolección de las plantas de utilidad, a su conservación y a la extracción de los principios activos, reconstruyendo una comunión con la naturaleza que es el fundamento primordial de una vida mejor. En efecto, hay que admitir que gran parte de las denominadas prácticas médicas alternativa o heterodoxas se basan en principios teóricos a menudo bastante disparatados y que, en cualquier caso, contrastan con las posturas más ampliamente aceptadas de la ciencia moderna; además, una parte nada despreciable de sus recursos operativos están caracterizados por una gratuidad difícilmente aceptable en el plano racional ^(1, 2, 3, 4,5).

La fitoterapia no consiste tanto en recurrir al herbolario más que a la farmacia, sino más bien en aceptar y alimentar un nuevo planteamiento de la propia existencia, basada esencialmente en una recuperación de la naturaleza y de sus recursos, entre los cuales se encuentran también, aunque no sólo, las plantas medicinales. Se trata, en definitiva, de romper con los estereotipos de la sociedad consumista para apreciar las cosas que nos rodean y sus aplicaciones ^(1,4, 5).

3.1.1 Recolección

- La recolección debe llevarse a cabo en la época en que las plantas, considerando su uso, presentan la mejor calidad posible y contienen los principios activos en sus niveles más altos. Teniendo en cuenta que la presencia de partes de la planta diferentes a la prescrita resulta en un material de calidad inferior, se deben recoger sólo los órganos de la planta que constituyen la droga vegetal, en el sentido más estricto.
- La recolección debe hacerse en días secos (tierra húmeda, rocío, lluvia o humedad del aire excepcionalmente alta son condiciones desfavorables para la recolección).
- Los equipos usados deben estar limpios en condiciones operacionales perfectas. Las partes del equipo que entran en contacto con la planta deben limpiarse con regularidad y mantenerse libres de aceite y otros contaminantes, incluyendo los restos de las recolecciones anteriores.
- Las plantas en mal estado o muertas deben ser retiradas de la plantación y deben ser destruidas inmediatamente.
- Deben evitarse los daños mecánicos de las plantas. Deben tomarse cuidados para evitar que los sacos queden demasiado llenos o que los sacos se apilen de manera tal que aplanten las plantas. El uso de sacos plásticos en la recolección debe evitarse.
- El período entre la cosecha y el transporte de la planta hasta las instalaciones de secado debe reducirse al mínimo, para evitar de esta forma cambios indeseables en la apariencia externa, la pérdida del contenido de las sustancias activas y el aumento de la carga microbiana.
- Las plantas recolectadas deben protegerse de plagas y animales domésticos. La eliminación de plagas debe de hacerse exclusivamente por personas especializadas y los productos químicos utilizados deben estar registrados ⁽⁶⁾.

3.1.2 Secado

- Al llegar a las instalaciones donde se efectuará el secado, las plantas deben ser retiradas inmediatamente de los empaques en los cuales se realizó la recolección. No debe exponerse directamente al sol y deben protegerse contra la lluvia.

- Las instalaciones usadas para el secado deben estar siempre limpias y bastante aireadas y nunca deben haber sido utilizadas para albergar animales.
- Las instalaciones deben estar construidas de tal modo que protejan las plantas recogidas de los pájaros, insectos, roedores y de animales domésticos.
- El equipo utilizado para el secado y las bandejas de los secadores deben estar siempre limpias y con un mantenimiento periódico.
- En el caso de secado al aire libre, las plantas deben extenderse en capas finas. Se debe asegurar la circulación del aire, las bandejas deben estar a una distancia adecuada del suelo. Para prevenir la formación de moho, el proceso de secado debe ser uniforme.
- Cuando el secado se realiza en secadores, debe establecerse las condiciones de funcionamiento (temperatura, duración, etc.) considerando el tipo de material (hoja, raíces, flores, etc.) y la clase de principios activos (aceites esenciales y otros) presentes en la droga bruta.
- Debe evitarse el secado de plantas directamente en el suelo y con exposición directa a la luz solar.
- El material seco debe examinarse y las partes que no sirven deben ser eliminadas. El material debe ser tamizado para eliminar la arena y otros contaminantes. Los tamices deben tener mantenimiento constante.
- Para proteger las plantas secas y reducir el riesgo de ataque de plagas, las plantas deben empacarse rápidamente ⁽⁶⁾.

3.1.3 Métodos para extracción de materiales vegetales

El término “extracción” desde el punto de vista farmacéutico se refiere a la separación de porciones medicinales activas provenientes de tejidos vegetales o animales, de todos aquellos componentes inactivos o inertes, mediante el uso de solventes selectivos. Los productos así obtenidos son líquidos relativamente impuros, semisólidos o sólidos, utilizados como elixires, extractos pululares, extractos pulverizados o fluidos, jarabes tinturas, decocciones o infusiones ⁽⁷⁾.

Existen diferentes métodos para la extracción de drogas crudas para la obtención de la porción terapéuticamente activa y eliminar el material inerte mediante el tratamiento con un solvente selectivo, conocido como “menstruo”.

- *Percolación:*

Este es el procedimiento más utilizado para extraer los ingredientes activos en la preparación de tinturas y extractos fluidos. Se utiliza un percolador, es decir, un recipiente con forma de cono, más o menos estrecho, con dos extremos abiertos. Los ingredientes sólidos son humedecidos con una cantidad apropiada de solvente, se deja en reposo durante aproximadamente 4 horas en un recipiente bien cerrado, y luego se coloca dentro del percolador.

Se añade suficiente solvente para saturar el material vegetal, y se tapa la parte superior del percolador. En el momento en que el líquido comienza a gotear a través del cuello del percolador, se cierra el orificio de salida. Se añade solvente adicional de manera que haya una capa superficial de solventes sobre el material vegetal, y la mezcla se deja en maceración dentro del percolador cerrado, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se abre el orificio del percolador, y se deja gotear lentamente el líquido, añadiéndose suficiente solvente extra, según se requiera. El material sólido que ha quedado, se filtra a través de manta o gasa, presionando fuertemente, y el líquido obtenido se añade al percolador, el cual posteriormente es clarificado mediante filtración o decantación. Luego que se ha obtenido una solución de los constituyentes activos, puede utilizarse para producir ciertas tinturas o extractos fluidos, o puede ser procesado posteriormente para producir el extracto sólido o semisólido⁽⁷⁾.

- *Decocción.*

La operación consiste en cocer la parte rica en principios activos (flores, hojas, frutos, semillas, raíces o la planta entera) durante unos minutos. Para preparar la Decocción o tisana, se pone la parte de la planta escogida en el agua hirviendo y se deja cocer a fuego moderado, en un recipiente cubierto, durante el tiempo indicado en cada caso en la receta. Cuando se utilizan raíces, maderas y cortezas, es necesaria la maceración previa en agua templada durante 12-24 horas. El líquido de maceración se usará para la decocción⁽⁷⁾.

- *Infusión.*

Se aplica generalmente a aquellas plantas cuyos principios activos podrían alterarse por ebullición. La infusión se obtiene vertiendo sobre la planta el disolvente (agua, vino, vinagre, etc.) a temperatura de ebullición. Es conveniente tapar inmediatamente el recipiente para evitar que las esencias de la planta se evaporen. Se deja al fuego durante el tiempo indicado en la receta. Cuando se usan cortezas, maderas y raíces, se aconseja mantener la infusión durante 10-15 minutos al baño María, con objeto de facilitar la extracción de los principios activos ⁽⁷⁾.

- *Maceración.*

La operación consiste en dejar la planta sumergida en un disolvente durante un periodo de tiempo más o menos largo. Generalmente se usa la maceración cuando la planta contiene principios activos que se perderían o quedarían modificados por acción del calor, o bien al alterarse el disolvente con el calor. Un producto de la maceración es la tintura, que se prepara dejando durante unos días en alcohol fino (no desnaturalizado) o en vino (tinte vinoso) las plantas bien secas y reducidas a polvo grueso en un recipiente de vidrio cerrado herméticamente. Cabe mencionar a tal respecto zumos de verduras y de frutas (verdaderos cócteles de alto poder energético-vitamínico) de hierbas y plantas medicinales, que pueden prepararse fácilmente en casa ⁽⁷⁾.

3.1.4 Preparados Galénicos obtenidos a partir de extractos vegetales.

Después de haber obtenido una solución de los constituyentes activos de una droga cruda mediante algún método de extracción, puede utilizarse como agente medicinal, tal como sucede con ciertas tinturas y extractos fluidos, o puede someterse a posterior procesamiento para producir un extracto sólido o semisólido ⁽⁷⁾.

- *Extractos.*

Los extractos son definidos por la USP como preparados concentrados de drogas vegetales o animales obtenidos mediante remoción de los constituyentes activos de las drogas con solventes adecuados, evaporación de todo o casi todo el solvente, y ajuste de las masas residuales o polvos a los estándares prescritos ⁽⁷⁾.

Se conocen tres tipos de extractos: semilíquidos, o líquidos de consistencia como jarabe, masas plásticas, conocidas como extractos pilulares o sólidos, y polvos secos, conocidos como extractos pulverizados.

La USP establece que los extractos pilulares y los extractos pulverizados de cualquier droga son intercambiables desde el punto de vista medicinal, pero cada uno tienen sus propias ventajas. Los extractos pilulares, llamados así debido a su consistencia, que les permite ser utilizados en masas de las cuales pueden elaborarse píldoras, son especialmente útiles en la fabricación de ungüentos y supositorios. Los extractos pulverizados, se emplean en formulación de pulverizados, tales como en cápsulas, polvos, o tabletas.

Los extractos semilíquidos o extractos con consistencia de jarabe pueden utilizarse en la manufactura de algunas preparaciones farmacéuticas. La mayor parte de extractos se preparan mediante percolación. El percolador es concentrado, generalmente por destilación o presión reducida; siempre que sea posible se evita el uso de calor, debido al potencial efecto dañino que pueda inducir sobre los constituyentes activos ⁽⁷⁾.

- *Extractos fluidos.*

La USP define los extractos fluidos como preparados líquidos de drogas vegetales, conteniendo alcohol como solvente o preservante, o ambos, a una concentración tal que 1 mL contiene los constituyentes terapéuticos de 1 g de la droga estándar que representa. Los extractos fluidos se preparan mediante percolación. De acuerdo al procedimiento usual de manufactura, la porción más diluida del percolador se concentra mediante destilación al vacío, manteniéndose la temperatura por debajo de 60 grados centígrados ⁽⁷⁾.

- *Extractos secos.*

Los extractos secos son preparaciones sólidas, obtenidas por evaporación del disolvente utilizado para su producción. En general, los extractos secos tienen una pérdida por desecación o un contenido de agua no superior al 5 % m/m. Ensayos: **Pérdida por desecación;** Cuando proceda, el extracto seco satisface los límites prescritos en la monografía ⁽⁷⁾.

- *Tinturas.*

La USP las define como soluciones alcohólicas o hidro-alcohólicas preparadas a partir de materiales vegetales o sustancias químicas (ejemplo la tintura de yodo). Tradicionalmente las tinturas de drogas vegetales potentes representan la actividad de 10 g de la droga en 100 ml de tintura. Existen dos procesos generales para preparar tinturas: la percolación y la maceración ⁽⁷⁾.

3.2 Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico o screening fotoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios 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. El tamizaje fitoquímico 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 sensible, reproducibles y de bajo costo. ^(8, 9, 10,11)

3.2.1 Metabolitos secundarios.

Gran parte de los principios activos presentes en las plantas se denominan productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, de distribución limitada y características de fuentes botánicas específicas, ejemplos; alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, taninos etc. El estudio de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la cromatografía, la espectroscopía para dilucidar su estructura, y entre otras metodologías de síntesis que hoy constituyen la fundación de la química orgánica contemporánea. El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. ^(1, 7,12)

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos (ver anexo #1) ⁽¹³⁾ :

- **Terpenoides.** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros ⁽¹³⁾.
- **Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados.** Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato ⁽¹³⁾.
- **Compuestos nitrogenados o alcaloides.** Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estriquina ⁽¹³⁾.

3.2.2 Métodos para la identificación y evaluación de drogas.

3.2.2.1 Cromatografía:

Es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas, en el cual el flujo de un solvente líquido o gas promueve la separación de sustancias mediante migración diferencial, en un medio poroso absorbible. Esta técnica depende del principio de adsorción selectiva ^(6, 7, 13, 14).

Tipos de Cromatografía: Cromatografía en papel, Cromatografía en columna, Cromatografía en capa delgada, Cromatografía de gases, Cromatografía líquida de alta resolución ⁽⁷⁾.

- *Fundamento del método de cromatografía de capa fina (TLC)*

La cromatografía de capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina absorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un absorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido sobre una placa de vidrio o de 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 va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de 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 ^(6, 7, 9, 11, 14).

Rf: Factor de retención, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado (Ver anexo #2) ^(6, 7, 9, 11, 14).

3.2.2.2 La espectrofotometría

Se refiere a los métodos, cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como espectrofotometría de adsorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja, según sea la radiación utilizada, se usa para diversas aplicaciones, como: análisis cuantitativo y cualitativo de soluciones desconocidas en un laboratorio de investigación, estandarización de colores de diversos materiales, como plásticos y pinturas, detección de niveles de contaminación en aire y agua, y determinación de trazas de impurezas en alimentos y en reactivos. El espectrofotómetro es de gran utilidad en análisis cuantitativo de proteínas, en la determinación de ácidos nucleicos incluyendo ADN / ARN, enzimas ⁽¹³⁾.

- El espectrofotómetro:

Es el instrumento que permite medir la radiación absorbida o transmitida por una solución, en función de una longitud de onda. ^(Ver anexo 18). Hay varios tipos de espectrofotómetros, puede ser de absorción atómica o espectrofotómetro de masa. Este

instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Esto le permite al operador realizar dos funciones: Dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra e Indicar indirectamente que cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra ^(13.).

Los espectrofotómetros consisten en cuatro grandes sub-unidades:

- Una unidad que genera la radiación electromagnética; como fuente de radiación. El Espectrofotómetro Agilent 8453 utiliza una lámpara de deuterio y una de tungsteno. La lámpara de deuterio emite radiación en longitudes de onda entre 190 y 800nm y la de tungsteno en el rango de 370 y 1100nm. Esto permite leer los espectros de absorbancia en el rango de longitudes de onda UV y visibles.
- Un dispositivo de dispersión; que selecciona una longitud de onda particular de una amplia banda de fuentes de radiación
- Un área de muestreo.
- Un detector; para medir la intensidad de la radiación ⁽¹⁶⁾.

3.3 Descripción botánica

3.3.1 CALAHUALA

(Ver anexo # 3)

- *Nombre popular:* polipodio, yerba del lagarto, calahuala, vilcún.
- *Nombre Científico:* *Phlebodium aureum* John Smith, *Polypodium decumanum* Willd. (Polypodiaceae).
- *Sinonimias:* *Polypodium triseriale* SW. *P. leucotomos*, *P. calahuala*.
- *Parte utilizada medicinalmente:* El rizoma y/o frondas.
- *Descripción botánica:* El espécimen *Polypodium triseriale* SW: Son epífitas o rupícolas; rizoma de 8-15 mm de ancho, no pruinoso, las escamas 4-6 x 2-3 mm, lanceoladas y 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 las costa y el margen; soros en (1-) 2-3 hileras entre la costa y el margen ^(2, 19).

- *Hábitat y Distribución:* Selvas altas pergnifolias, potreros, bosques de pinus-Quercus, rocas cubiertas de musgo = 2,000 m. (Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Antilla, Trinidad) ^(16,18).
- *Usos medicinales atribuidos:* Las especies *Phlebodium aureum*, *Polypodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaurium* tienen las siguientes propiedades: En afecciones gastrointestinales (dolor de estómago, gastritis, diarrea y estreñimiento), respiratorias (asma y tos ferina) y cardíacas (hipertensión), contra la diabetes, como purificador de la sangre, y en afecciones renales (cálculos) ⁽²⁰⁾. En forma tópica, emplastos y cataplasma elaborados en base a la infusión para lesiones contusas, reumatismo, úlceras de la piel, psoriasis, y eczemas. Para tenias se usa un cocimiento más concentrado ^(17, 18,20).
- *Composición Química:* Las especies *Phlebodium aureum*, *Polypodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaurium* contienen: flavonoides, cumarinas, azúcar, aceites esenciales, mucílago, almidón, nitrato de potasio, calagualina, polipodina, aceites grasos, taninos, esteroides (ecdiserona, polipodaureina), un colorante rojo, principios amargos, resinas ^(2,16, 17,18).
- *Toxicología:* En estudios realizados se demostró que los extractos acuoso y etanólico del rizoma (500mg/kg) no produce toxicidad en peces del género *Mollinesia* 2,3. La bibliografía no reporta datos de toxicidad en humanos ⁽¹⁷⁾. La dosis letal media es de 27,775mg/kg ^(16,20).
- *Descripción de géneros y especies más conocidas y estudiadas en Guatemala dentro de la familia Polypodiaceae:* ^(2, 4, 13, 18, 19)

Género *Phlebodium*: (R. Br.) J. Sm. N.v.: Epífitas, rupícolas o terrestres; rizoma rastrero, generalmente farinoso, de farina blanda, las escamas concoloras, generalmente anaranjadas, no clatradas, denticuladas al rizoma; pinnas escamosas o glabras en el envés, los márgenes engrosados y cartilaginosos, 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 Las Antillas. Los dos

nervulos 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 ^(4,18).

***Phlebodium decumanum* y *Phlebodium pseudoaureum*:** Son especies muy populares de este género donde la diferencia notable entre ellas es que la primera cuenta con 3-7 series de soros entre la costa y el margen, mientras que *P. pseudoaureum* posee solamente 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. (Gómez 1980) señaló que *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* se entrecruzan en Honduras, produciendo un híbrido con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 son pequeños. En Mesoamérica *P. pseudoaureum* previamente ha sido llamada *P. aureum*, especie solo conocida de Florida, Sudamérica, Las Bahamas, Puerto Rico y las Antillas Menores. El acuerdo con Proctor y Evans, *Phlebodium decumanum* y *P. pseudoaureum* ambas dipoides, han hibridizado dando origen a *P. aureum*, una tetraploide. La evidencia morfológica que sustenta este parentesco es que *P. aureum* tiene un número intermedio de series de soros (2-3) entre ambas. También señalaron la existencia de un híbrido triploide retrocruzado, estéril ^(2, 4, 13,18).

Usos Medicinales y Constituyentes químicos de otros especímenes de calahualas: del extracto acuoso de los rizomas de *Polypodium decumanum*, y *Phlebodium pseudoaurium* se obtiene una saponina llamada Anapsos® (ASAC Pharmaceutical, España) ⁽³⁴⁾, compuesta por un cetosteroide y una desoxihexosa. Se utiliza para el tratamiento de dermatitis atópica, psoriasis y vitiligo. También se le atribuyen propiedades para la cura de la enfermedad de alzheimer y artritis reumatoide ⁽²³⁾. Se ha encontrado que la actividad biológica favorece la regeneración de tejidos afectados por las enfermedades mencionadas, mediante la capacidad de incrementar el número de linfocitos DC8 (citotóxicos/supresores)⁽²³⁾. Los estudios aún son incompletos. El rizoma de las especies *Polypodium decumanum*, *Phlebodium pseudoaurium* contiene azúcar, aceite esencial, mucílago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo; además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos, taninos y esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la plipodaureina) ^(18, 24,25).

4. Justificación

La diversidad ecológica de Guatemala y principalmente la conformada por dos terceras partes de territorio montañoso, ha llamado la atención de investigadores para realizar estudios a los helechos de la familia Polypodiaceae, los cuales han mostrado sus actividades inmunológicas, diuréticas, antitumorales y antioxidantes, entre otras. Esto sugiere evaluar la actividad biológica de las distintas especies existentes de helechos epífitos.

La importancia como medicina alternativa que han mostrado éstos, fue la motivación de realizar el tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante del helecho *Polypodium triseriale* SW (calahuala) ^(16,3,22,20,24,1,18,25). De la realización de esta investigación se obtuvo toda la información de sus metabolitos secundarios que muestra de mejor forma su aplicabilidad y funcionalidad, en el campo de la fitoterapia, un ejemplo de ello son los flavonoides que reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C. También, brinda información necesaria para posteriores investigaciones, de manera que se desempeñe un papel competitivo a nivel internacional, exportando no solamente materias primas, sino productos ya elaborados.

Debido a la información con la cual se cuenta, de la descripción botánica de diversas especies de la familia Polypodiaceae, y estudios de caracterización en algunas especies de esta familia realizados en otros países como México, se ha enriquecido la información fitoterapéutica, de las cuales podemos mencionar a *Polypodium decumanum* y *Phlebodium pseudoaureum*, popularmente conocidas como calahuala ^(18, 24,25).

Otra especie perteneciente a esta familia es *Polypodium triseriale* SW (calahuala), de la cual se ha demostrado a través de la caracterización fitoquímica que sus metabolitos secundarios son: flavonoides, saponinas, principios amargos y esteroides insaturados. Y que tiene actividad antioxidante en los extractos secos obtenidos del rizoma y fronda de los espécimen recolectados en nuestro país. Por lo cual la realización de la presente investigación de tesis permitió generar información valiosa sobre su capacidad antioxidante y de sus componentes activos presentes en el espécimen *Polypodium triseriale* SW (calahuala) de la familia Polypodiaceae.

5. Objetivos

5.1 General:

Generar información Fitoquímica y biológica utilizando el rizoma y fronda de la especie *Polypodium triseriale* SW (calahuala) procedente de dos regiones de Guatemala.

5.2 Específicos:

5.2.1 Determinar a partir de pruebas fisicoquímicas la identidad y pureza de *Polypodium triseriale* SW (calahuala).

5.2.2 Caracterizar mediante análisis fitoquímicos de tipo macro, semi-micro y en cromatografía de capa fina, el rizoma y fronda de *P. triseriale* SW (calahuala) a través de extractos acuosos, secos y tinturas de *P. triseriale* SW (calahuala).

5.2.3 Cuantificar los flavonoides totales presentes en el rizoma y fronda de *P. triseriale* SW a través de los extractos secos, mediante espectrofotometría ultravioleta-visible expresados como rutina.

5.2.4 Evaluar la actividad antioxidante en el rizoma y fronda de *P. triseriale* SW (calahuala) a través de los extractos secos, mediante cromatografía de capa fina y espectrofotometría ultravioleta-visible utilizando 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

6. Hipótesis

Existe diferencia en el contenido de metabolitos secundarios y actividad antioxidante entre rizoma y fronda del espécimen *P. triseriale* SW (Calahuala) colectados en las localidades de Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz y en Santa Lucía Cotzumalguapaumalguapa, Escuintla.

7. Materiales y Métodos

7.1 Universo y Muestra:

Universo: Polypodium triseriale SW. (calahuala) de Guatemala.

Muestra: Extractos y tinturas de rizoma y fronda de *P. triseriale*. Colectados en dos localidades diferentes; Santa Lucía Cotzumalguapaumalguapa, Escuintla y Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz.

7.2 Materiales:

7.2.1 Materiales y Equipos en general:

- Agitador magnético.
- Algodón.
- Ampolla de decantación.
- Asperjador de vidrio.
- Balanza analítica.
- Baño de maria
- Bomba de vacio.
- Campana de extracción de gases.
- Cámaras cromatográficas.
- Cromatoplasas de silica gel 60 F254.
- Evaporador rotatorio.
- Espectrofotómetro CARY -50
- Estándares según el ensayo.
- Estufa.

- Gradilla para tubos de ensayo.
- Lámpara de luz UV.
- Molino o tamiz.
- Papel filtro.
- Percolador de vidrio o acero inoxidable.
- Perillas de succión.
- Potenciómetro
- Regla.
- Soporte de metal.
- Tijeras.
- Vasos de precipitar
- Vortex

7.2.2 Cristalería en general:

- Beaker
- Balones volumétricos de 100ml.
- Balones volumétricos de 50ml.
- Erlenmeyers
- Frascos de vidrio color ámbar.
- Micropipetas de 5 μ L o capilares.
- Mortero
- Pipetas

- Pistilo
- Probetas
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Varilla de Agitación
- Vidrio de reloj

7.2.3 Reactivos:

- Reactivos específicos para la determinación de metabolito secundarios.
- Disolventes para extracciones y para cromatografía en capa fina.
- Reactivos químicos para el ensayo de la actividad antioxidante.

7.3 Métodos:

7.3.1 Recolectar, secar, preparar extractos y realizar pruebas físicas:

Recolección:

Se colecto muestras del rizoma y fronda totalmente al azar provenientes de dos localidades de Guatemala. La fronda y el rizoma de la droga vegetal *Polypodium triseriale* estuvo exenta de enmohecimiento, de insectos y de otras contaminaciones de origen animal. El nivel de elementos extraños no fue superior al 2%. (m/m). Se pesó de 100 a 500 g de la muestra, y se colocó en una capa delgada sobre un papel filtro. Los elementos extraños se detectaron por inspección a simple vista y con ayuda de una lupa (x 6). Se separó los elementos extraños, se pesaron y calculó el porcentaje que representan ⁽⁷⁾.

Secado artificial:

Se colocó la planta en un horno de convección de aire forzada a 40°C por varias semanas lo necesario para que la planta obtenga un porcentaje de humedad no mayor del 10 por ciento. Luego se molió la muestra agregando poco a poco en un tamiz número 5 para obtener un polvo semi-fino, se guardó en bolsa plástica. Se identificó las bolsas adecuadamente ⁽⁴⁾.

Preparación del extracto:

- PERCOLACIÓN: En un percolador de acero inoxidable se colocó algodón y papel filtro, luego se transfirió el material vegetal al percolador y se agregó el disolvente adecuado hasta cubrir toda la droga, se dejó reposar por 24 horas y se recogió el líquido en un erlenmeyer, esta solución se utilizó para producir extractos y tinturas (Ver anexo # 4) ^(5,6,7).
- EXTRACTO: El mensturo o líquido obtenido de la percolación se concentró en rotavapor y se repitió la operación hasta que se agota la droga con el disolvente recuperado. Luego se prepararon los extractos secos ^(5,7,26).
- TINTURA: El mensturo o líquido obtenido de la percolación se ajustó al volumen de la concentración deseada de soluciones alcohólicas o hidro-alcohólicas (1:5, 1:8 o 1:10) ^(5,7,26).

Pruebas Físicas:

- Se determinó la humedad residual de la droga: se lavó, se secó y se colocó una cápsula de porcelana en el horno a 105°C por 15 minutos, luego en la desecadora por 20 minutos. Se pesó 1 gramo del material vegetal y se agregó en la cápsula previamente tarada. Se colocó en el horno a 105°C por 30 minutos. Se introdujo la cápsula en una desecadora para luego ser pesada. Se calculó el porcentaje de humedad. Para utilizar una balanza de humedad se trituro el material vegetal en trozos pequeños y se agregó 1g de la droga vegetal al platillo con homogeneidad, se cerró la tapadera de la balanza y se presionó tara y el botón enter, luego se leyó el resultado de la humedad de la muestra la cual no fue mayor del 10 por ciento ⁽²⁶⁾.
- Se determinó el pH: Se sumergió el electrodo y el probador de temperatura dentro de la muestra (extractos obtenidos de la fronda y rizoma de *P. triseriale*), se mantuvo dentro de la solución el tiempo necesario para estabilizar el electrodo, mínimo 30 segundos. Inmediatamente apareció un pH levemente ácido ⁽²⁶⁾.
- Densidad: se utilizó un picnómetro limpio y seco, se determinó la densidad de los extractos de fronda y rizoma de *P. triseriale*, primero se pesó el picnómetro vacío a 20°C, luego se pesó el picnómetro con agua a 20°C, se agregó la muestra al picnómetro y se pesó de nuevo. Se calculó el peso específico para determinar la densidad ^(5,7,26).

Pruebas fisicoquímicas

- Sólidos totales: Se pesó 1g de fronda y rizoma de la droga vegetal *Polypodium triseriale*, Se agregó a cada frasco metanol al 50%, 70% y 95% y se dejó reposar por un día, luego se colocó 3 cápsulas al horno a 105°C por una hora, se desecó y se pesó las cápsulas. Al siguiente día, después de 24 horas de extracción, se colocó en cada cápsula el extracto obtenido de cada frasco al 50%, 70% y 95%, se llevó a sequedad con una estufa, se introdujo en el horno a 105°C por una hora, se desecó y se pesó las cápsulas. Se calculó el porcentaje de extracción o eficiencia del solvente (5, 6, 7,26)

7.3.2 Tamizaje fitoquímico

Se realizó la extracción de la planta con disolventes apropiados, se prepararon los extractos acuosos, fluidos y tinturas y se aplicó reacciones de precipitado, coloración y análisis por cromatografía en capa fina para cada uno de los extractos, se adecuó la metodología en los mismos. (5, 6, 8,9, 10,11, 14, 26, 27, 28, 29,30)

7.3.2.1 Investigación de alcaloides:

- *Ensayos macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego se añadió 25 mL de metanol a 60°C. Se Filtró con papel filtro Whatman 1 y se acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera:

Tubo 1: se agregó 5 gotas de reactivo de Mayers.

Tubo 2: se agregó 5 gotas de reactivo de Dragendoff.

Tubo 3: se agregó 5 gotas de reactivo de Wagner.

Tubo 4: Testigo.

Se utilizó como estándar soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

Solución estándar: solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10µL).

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

Fase estacionaria: placa de silica gel 60 F₂₅₄,

Detección: sin tratamiento químico en UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo. Con Reactivo Dragendorff en Visible se ven zonas cafés o naranjas, los colores no son estables ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.2 Determinación de Flavonoides y Antocianinas:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 3g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción se tornó 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 agregó 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

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

Tubo 3: Se agregó 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 evaluó las reacciones: Cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. 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, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

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

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

Fase Estacionaria: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60 F₂₆₄

Detección: Spray revelador: Reactivo de productos naturales (NP/PEG). Un típico color fluorescente intenso en UV-365 nm es producido inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg. (NP: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG; Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000).

Aplicar a la placa vapores de amoníaco para intensificar el color de las manchas ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.3 Investigación de Antraquinonas:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%, se concentro en baño de maría a una temperatura cerca de 60 grados centígrados, Se disolvió el residuo con 30 ml de agua destilada y se filtró. Se extrajo con 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 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, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 10 µL que son utilizados para la cromatografía.

Solución estándar: solución 0.1 por ciento en metanol de antraquinonas 10 µL

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

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F₂₆₄

Detección: Sin tratamiento químico fluorescente en UV 254, fluorescente color amarilla o rojo-café en 365 nm, spray revelador; solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento, para antraquinonas: zona rojas en visible y fluorescencia roja en UV- 365 nm, para antronas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV-365nm ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.4 Investigación de Cumarinas:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 1 ml de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar 2 manchas en papel filtro. A una mancha se agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N. Se observó bajo luz ultravioleta de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo) ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 20 µL en la cromatoplaça.

Solución estándar: Preparar una solución de 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 son mezclados durante 5 minutos con 50 mL de ácido acético al 10%, se filtra y se descarta la fase de abajo, y la mezcla de tolueno-éter es usada)

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F₂₆₄

Detección: Sin tratamiento químico; UV 245nm fluorescencia, todas las cumarinas muestran una intensa fluorescencia azul o verde-azul a UV 365 nm. Spray revelador:.

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento, a UV 365 nm fluorescencia azul o verde-azul (5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.5 Investigación de Cardenólidos y bufadienólidos:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Presencia de lactonas insaturadas: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se colocó tres manchas del extracto (0.1, 0.2, 0.3 ml) sobre un papel filtro. Se secó y se agregó unas gotas del reactivo Kedde. Se secó el papel filtro y se observó cambios de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Se usó como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80 por ciento.

Presencia de azúcares 2-desoxigendas: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se eliminó los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Se secó el residuo y se agregó 3 ml del reactivo Keller-Killiani. Se pasó a un tubo, se mezcló y se resbaló 1 – 2 ml de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Se observó la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo) (5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaca.

Solución estándar: digoxina 5 mg / 2 ml de metanol (20µL), lanatósido, A, B, C; oleandrin, K-strophanthin.

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) acetato de etilo-metanol-agua (81:11:8), acetato de etilo-metanol-etanol-agua (81:11:4:8).

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F₂₆₄

Detección: Sin tratamiento químico; fluorescencia por cardenólicos en UV-265 nm, la mayor fluorescencia es debida a los bufadienólidos spray revelador reactivo de Kedde; Detección del anillo lactónico de los cardenólidos, zonas rosas o azul violeta en vis, los

bufadienólidos no reaccionan. (Reactivo de Kedde: 5 ml de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 3% en etanol, mezclado con 5ml de NaOH 2M.) ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.6 Investigación de esteroides o triterpenoides:

- *Ensayo macro y semi-micro:* Reacciones de color

1. Liebermann Burchard:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se aplicó unas gotas de ácido acético y 3 ml de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1) en las que las saponinas triterpenoidales dieron color rosado ó púrpura.

Resultados. (verde, azul, verdoso) posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

2. Acido tricloroacético:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se añadió unos cristales de ácido tricloroacético.

Resultados: Color naranja, rojo oscuro, triterpenos tetracíclicos y esteroides derarrollan color a 60°C, triterpenos pentacíclicos a 110°C.

3. Carr- Price:

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con cloroformo, se agregó 2 ml de tricloruro de antimonio al 30% en cloroformo.

Resultados: Color azul, posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillo A y B ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.7 Investigación de Saponinas:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Prueba de espuma:

Tubo 1: 100 mg de extracto seco vegetal.

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

Tubo 3: 2 ml de agua.

A cada tubo se adicionó 10 mL de agua destilada. Se calentó en baño María a 60°C durante 30 minutos. Se enfrió, tapar los tubos, se agitó vigorosamente 30-40 segundos. Se dejó reposar los tubos durante 30 minutos. Se observó la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3 cm persistente en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 25 - 40µL de esta solución en la cromatoplaça.

Solución estándar: una solución al 0.1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: Cloroformo-metano/agua (64:50:10), n-butanol-acético-agua (50:10:40)

Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F₂₅₄

Detección: Spray revelador: 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, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.8 Investigación de Principios Amargos:

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en la cromatoplaça.

Solución estándar: Artemisina al 1 por ciento en metanol 20µL. Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (77:15:8) y cloroformo-metanol (95:5). Fase Estacionaria: Silica gel de 60 F₂₆₄

Detección: Spray revelador: vainillina-ácido sulfúrico, anisaldehído-ácido sulfúrico. Zonas rojas-violetas, cafés-rojas. Azul-verdes. (Reactivo de Liebermann-Buchard: UV-365 nm: gris, café; VIS:café oscuro, gris) ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.9 Investigación de Taninos:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50% y se evaporó a sequedad. Se añadió 25 ml de agua caliente al residuo y se agitó con varilla y se dejó enfriar. Se Agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: Testigo

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

Tubo 3: Se agregó 4-5 gotas de gelatina –sal (1 % de gelatina y cloruro de sodio al 10 ciento).

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

Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración. Cloruro férrico: grisáceo-negro; catecol; negro-azulado: pirogalol ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.10 Investigación de Glicósidos Cianogénicos:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Prueba de Guignard: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%, se adicionó 1 ml de cloroformo. Por aparte, se introdujo una tira de papel whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente se secó. La tira de papel húmedo se insertó en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y se dejó a una distancia de 1 cm de La muestra. Se dobló el papel y se tapó el erlenmeyer con un corcho. Se calentó en baño de maria a 37°C durante 3 horas o más. Se observó cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo ó rojo-café) ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.11 Investigación de Aceites Volátiles:

- *Ensayo en cromatografía de capa fina:*

Método A: Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó 20-50 μ L en la cromatoplaça.

Solución estándar: solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3 μ L) Fase Móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7) Fase Estacionaria: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60 F₂₅₄

Detección: Spray revelador: anisaldehído-ácido sulfúrico, vanillina-ácido sulfúrico, zonas azules verdes, rojas y cafés en visible ^(5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.12 Investigación de Esteroles insaturados:

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50% y se concentró a sequedad. Se removió pigmentos vegetales con porciones de 10 ml de éter de petróleo hasta que el éter salga incoloro. Se adicionó 10 ml de benceno y se agitó durante unos minutos. Se descartó en un tubo y se secó con sulfato de sódio anhidro. Se filtró y se dividió en 3 tubos:

Tubo 1: Se agregó 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 usó como estándar una solución de colesterol en cloroformo 0.1 por ciento. Se observó cambios de coloración 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, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27).

7.3.2.13 Investigación de Sesquiterpenlactonas

- *Ensayo macro y semi-micro:*

Prueba de Legal: Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%, agregar 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 α y β insaturada.

Prueba de Baljet: a) 1 g de ácido pícrico en etanol al 95%, b) 10 g de NaOH en 100 ml de agua. Se mezcló a) y b) y se añadió a la muestra (Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50%.) unas gotas del reactivo, se presenta un color rojo claro a oscuro (5, 6, 8,9, 10, 14, 26, 27)

7.3.3 Evaluación de actividad Antioxidante

7.3.3.1 Procedimiento para la cuantificación de flavonoides expresados como rutina

- *Solución Madre:* Se preparó en un balón de 10ml el extracto seco a una concentración de 1/10 en solución etanólica al 50 % (el mejor disolvente).
- *Preparación de referencia:* Se pesó 10mg de la sustancia de referencia de rutina y se disolvió en metanol absoluto, se llevó al aforo de 10ml
- *Solución 1:* Se colocó 2ml de solución madre y 2ml de $AlCl_3$ al 2% m/v en un matraz aforado de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Solución 2:* Se colocó 2ml de solución madre en un matraz aforado de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Solución 3:* Se colocó 2ml de la preparación de referencia y 2ml de cloruro de aluminio al 2% m/v en un matraz aforado de 25ml. Se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Solución 4:* Se colocó 2ml de la preparación de referencia en un matraz aforando de 25ml y se llevó al aforo con metanol absoluto.
- *Procedimiento:* Se midió la absorbancia de la solución 1, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 2. se Midió la absorbancia de la solución 3, después de 25 minutos a 394nm, usando como blanco la solución 4.

- Cálculos: % de flavonoides totales expresados como Rutina donde $(A_1 = \text{Absorbancia de la muestra} * P_2 = \text{peso del estándar de referencia} * V_2 = \text{Volumen del aforo de referencia}(10\text{ml})) / (A_2 = \text{Abs de la preparación de referencia} * P_1 = \text{Peso de la muestra} * V_1 = \text{Volumen de aforo de la muestra}(250\text{ml}))$ ^(20,25,29,31,32,35).

7.3.3.2 Procedimiento del ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) para la detección de actividad antioxidante

- Se aplicó 10µl de muestra y 5µl del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ) en una placa cromatográfica de silicagel 60F254.
- Se colocó la placa en una cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26).
- Se secó y se asperjó con 2,2 –difencil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/ml en metanol)
- Detección: Si los extractos presentan actividad antioxidante se observó la decoloración de DPPH (2,2 –difencil-2-picrilhidrazilo) en las bandas respectivas ^(27, 32,33).

7.3.3.3 Procedimiento del ensayo mediante espectrofotometría UVv para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difencil-1-picrilhidrazilo).

- **Preparación de las soluciones:**
 - a. Solución Madre: Se pesó 0.1g del extracto seco y se agregó 5ml de metanol absoluto luego se introdujo al sonicador y se obtuvo la solución madre, de la cual se realizó una serie de diluciones (1:5,1:10,1:20,1:30), y se encontró la dilución, en donde el porcentaje de inhibición estuvo entre (60% - 70%).
 - b. Solución de 2,2-difencil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 500µM en metanol: Se Pesó 0.00219g de reactivo 2,2-difencil-1-picrilhidrazilo con una espátula plástica y se disolvió en 10 ml de metanol, se agitó la solución y se conservó en un recipiente color ámbar. Por que fue una solución inestable, se debió preparar el día en que se realizó el ensayo.
 - c. Buffer de acetato: Se preparó una solución acuosa de acetato de sodio 0.2M de la siguiente forma: se disolvió 1.6406 g de acetato de sodio anhidro en 100 ml de agua

desmineralizada. En caso de no contar con acetato de sodio anhidro puede utilizarse acetato de sodio trihidratado. Se disolvió 25.07g de éste último reactivo en 800ml de agua desmineralizada. Se preparó una solución acuosa de ácido acético 0.2M: se adicionó 1.201g de ácido acético al 96% en 100 ml de agua.

El buffer: Se agregó 1 ml de ácido acético 0.2M y 19 ml de acetato de sodio 0.2M. Se llevó a pH6 mediante el empleo de NaOH 6N. El NaOH 6N (se disolvió 24g de NaOH en 100 ml de agua desmineralizada).

- **Preparación de los tubos de reacción:** Se utilizó tubos de vidrio con capacidad de 10 ml, de preferencia nuevos. Se emplearon tubos que se lavaron correctamente, se agregó agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran las sustancias contenidas en el agua del chorro. Se recubrieron los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Se preparó una serie de tubos que contienen los reactivos que se citan a continuación: (ver anexo # 7). Se agitaron los tubos preparados de esta forma (ver anexo # 7) en un vortex durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se leyó a una longitud de onda de 517nm.
- **Preparación de la curva de lectura:** Se realizó una serie de diluciones del extracto de la siguiente forma, se conservó siempre las mismas proporciones: (ver anexo # 8).

Se realizó las mediciones de cada una de estas diluciones siguiendo el paso anterior en el que se cita como se prepararon los tubos de reacción. Cada dilución correspondió a una muestra. Se realizaron cuatro réplicas para cada uno de los ensayos de las diluciones.

Registro de los resultados de la curva y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia: Se registró los valores obtenidos de la curva en base al siguiente esquema:(ver anexo #9) En la casilla promedio de absorbancias, se estimó la media de la absorbancia 1 y 2. Y se calculó el porcentaje de inhibición de la concentración. Se utilizó la siguiente fórmula: (ver anexo #10). Luego se graficó la concentración del extracto (eje x) vrs % disminución de la absorbancia (eje y). Se interpoló el valor de IC_{50} .⁽³⁴⁻³⁷⁾ Se expresó la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50 por ciento de disminución de la absorbancia de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)⁽³²⁾.

7.3.4 Análisis Estadístico

6.3.4.1 Tipo de Estudio: Descriptivo y experimental

6.3.4.2 Diseño del Muestreo: Se colectaron las muestras en las localidades de Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla y Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz, según fuente proporcionada por el ingeniero Vicente Martínez de la Facultad de Agronomía (ver anexo 7). Se identificaron las muestras colectadas llevando las muestras al herbario donde se determinaron las claves dicotómicas para *Polypodium triseriale* SW (calahuala), con la ayuda del encargado del herbario. Se llevó un espécimen al herbario de Farmacia. Se muestra la siguiente tabla donde se resumió el trabajo de campo: (Ver tabla 1).

Se seleccionaron los extractos obtenidos del rizoma y Fronda de *P. triseriale* SW (calahuala) provenientes de ambas localidades (Escuintla y Alta Verapaz) para la realización de los ensayos en el laboratorio. Se realizó la siguiente tabla con las replicas que se realizaron en el trabajo de laboratorio (ver tabla 25).

7.3.4.3 Análisis de Resultados:

- Cualitativo: Para todo el tamizaje fitoquímico y para la determinación de la propiedad antioxidante por medio de cromatografía, se evaluó la presencia/ ausencia de los metabolitos secundarios del cual se utilizó como método estadístico X^2 .
- Cuantitativo: En la cuantificación del % de flavonoide y para determinar la actividad antioxidante por medio de espectrofotometría UV-visible, se realizó como método estadístico ANOVA (análisis de varianza de dos vías) lo cual indicó que si existe diferencia significativa entre partes de la planta y la localidad, por lo cual, fue necesario determina entre cuales partes existe diferencia significativa por medio de la prueba Tukey HSD (Prueba Post-OH).

8. Resultados

8.1 Trabajo de campo: Los puntos de muestreo del espécimen *P. triseriale* (calahuala) se realizaron en Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz a 335km de la capital, el 04 y 05 de septiembre del 2008, y en Santa Lucía Cotzumalguapaumalguapa, Escuintla a 90 km de la capital, el 15 y 16 de septiembre del 2008, El estado de los especímenes se encontró completo, colectando el rizoma y la fronda en ambas localidades. Se les determinó un código de identificación a cada localidad y a cada parte colectada de la planta para facilitar los ensayos a realizar. ^(Ver anexos 14)

Tabla 1. Datos de la colecta:

Localidad	Estado de la planta	Parte colectada	Código identificación	Código correlativo	Descripción de la localización	Especie vegetal	Coordenadas y altitud	Km. de la Capital	Fecha De Colecta
Fray Bartolomé de las Casas Alta Verapaz	Completa	Rizoma	A1	1	Encontrada en árbol de corozo y en árboles altos "cenicero" Área montañosa. Es muy escaso, de cada 5 árboles en uno, dentro de la misma altitud y solo un espécimen por árbol.	<i>Polypodium triseriale</i>	16 P 193899 1748911	335 Km.	04 y 05 Septiembre 2008
		Fronda	A2	2			1,316 m. sobre el nivel del mar		
Santa Lucía Cotzumalguapa. Escuintla	Completa	Rizoma	B1	3	Encontrada en palmas africanas y en un árbol alto cerca de estas, en árboles donde hay humedad. Es Muy abundante.	<i>Polypodium triseriale</i>	15P 714286 1584665	90 Km	15 y 16 Septiembre 2008
		Fronda	B2	4			347 m. sobre el nivel del mar		

8.1.2 Caracterización Físicoquímica:

Los resultados obtenidos de las muestras de *P. triseriale* (calahuala) que se colectaron en Fray Bartolomé de las Casas, Alta Verapaz y en Santa Lucía Cotzumalguapaulmalguapa, Escuintla fueron: para el rizoma y la fronda el porcentaje de humedad no fue mayor que el 10%, el valor de pH fue levemente ácido. La prueba para sólidos totales dio como mejor solvente etanol al 50% para todas las muestras, como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas físicoquímicas de *Polypodium triseriale* (calahuala)

Código de Muestra	Droga vegetal	Tinturas					
		Humedad %	pH	Densidad (g/ml)	Sólidos Totales (g)		
					50%	70%	95%
A1		6.78	6.55	0.9296	12.8771	6.9349	2.4378
A2		9.92	6.22	0.9418	11.7845	10.0103	2.7301
B1		3.95	6.51	0.9272	12.0273	7.0654	2.5489
B2		8.33	6.38	0.9433	11.9741,	10.3583	2.1482

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

8.1.3 Obtención de extractos:

La tabla 3 muestra los extractos obtenidos de la droga vegetal *P. triseriale* (calahuala) con etanol al 50 %: Para el rizoma en ambas localidades se preparó tintura (1:5), extracto acuoso y extracto seco (1:5). Para la fronda de ambas localidades fueron tintura (1:10), extracto acuoso y extracto seco (1:10). El extracto seco obtenido de cada una de las muestras presentó mayor porcentaje de rendimiento.

Tabla 3. Extractos obtenidos de la droga vegetal (DV) de *Polypodium triseriale* (calahuala)

Código de la muestra	g de la DV/ml de etanol 50%	Extractos obtenidos	(g) obtenidos del extracto	% de rendimiento
A1	110g/500ml (1:5)	ACUOSO	1.3959 g de extracto al 10% en H ₂ O	13.96 %
		SECO	30.7279 g de extracto	27.91 %
A2	80g/800ml (1:10)	ACUOSO	2.1658 g de extracto al 10% en H ₂ O	5.03 %
		SECO	28.5042 g de extracto	35.63%
B1	110g/500ml (1:5)	ACUOSO	0.5033 g de extracto al 10% en H ₂ O	21.66 %
		SECO	24.7804 g de extracto	22.53 %
B2	80g/800ml (1:10)	ACUOSO	2.2758 g de extracto al 10% en H ₂ O	22.76 %
		SECO	24.0433 g de extracto	30.05 %

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

8.2 Tamizaje fitoquímico:

Se realizó la extracción de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de precipitado, coloración y análisis por cromatografía en capa fina (CCF) para determinar los metabolitos secundarios presentes en el espécimen *P. triseriale* (calahuala).

8.2.1 Ensayos macro métricos:

Ver los resultados de las tablas 4, 5, 6, 7 y 8 de las pruebas preliminares realizadas en extractos etanólicos al 50% de *P. triseriale* (calahuala) colectada en Alta Verapaz y en Escuintla.

Tabla 4. Metabolitos secundarios ausentes en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) obtenidos de las pruebas preliminares.

Extracto	Muestra	alcaloides	Antraquinona	Glicósidos cardiatónicos	esteroides o triterpenoides	taninos	saponinas	Glucósidos cianogenicos
SECOS	A1	-	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-	-
	B1	-	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-	-/+ cont. traza

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 5. Ensayo macro para la caracterización de flavonoides y antocianinas en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale*. Figura 16 de los anexos.

Código de Muestra	Ácido sulfúrico concentrado	Cloruro férico al 10%	Ácido clorhídrico concentrado	Magnesio metálico y Ácido clorhídrico	Álcali NaOH
A1	+	+	-	-	+
A2	+	+	-	-	+
B1	+	+	-	-	+
B2	+	+	-	-	+

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 6. Ensayo macro para la caracterización de cumarinas en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale*. Figura 19 de los anexos.

Código de Muestra	Fluorescencia (en papel)	Color
A1	No se detecto	
A2	+	Amarillo
B1	No se detecto	
B2	+	Amarillo

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

Tabla 7. Ensayo macro para caracterizar principios amargos en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale*. Figura 26 de los anexos.

Código de Muestra	Prueba de Legal (color rojo oscuro)	Prueba de Baljet (color rojo claro a oscuro)
A1	+	+
A2	-	-
B1	+	+
B2	-	-

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

Tabla 8. Ensayo macro para caracterizar esteroles insaturados en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale*. Figura 29 de los anexos.

Código de Muestra	Prueba de Liebermann-buchard (color rojo, rosado, violeta o anillo rojo cereza)	Prueba de Salkowski (color rojo, rosado, violeta o anillo rojo cereza)
A1	-	-
A2	+	+
B1	+	+
B2	-	-

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

8.2.2 Ensayos semi-micrométricos en cromatografía de capa fina:

Ver los resultados de las tablas 9, 10, 11, 12 13 y 14 de las cromatografías realizadas en los extractos de *P. triseriale* (calahuala) colectada en Alta Verapaz y en Escuintla.

Tabla 9. Metabolitos secundarios ausentes en los extractos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) obtenidos de la cromatografía en capa fina.

Tipo de Extrato	Muestra <i>Polypodium triseriale</i>	Alcaloides	Antraquinonas	Glicósidos cardiacos	Aceites volátiles
TINTURAS	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	B1	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-
ACUOSO	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	B1	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-
SECO	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	B1	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

Tabla 10. Cromatografía en capa fina para caracterizar flavonoides y antocianinas en los extractos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala). Figura 17 de los anexos.

EXTRACTOS	Código de Muestra	No. Banda	Rf	Fluorescencia Amarillo, verde y azul
TINTURAS	A1	0	No se detecto	-
	A2	6	0.29, 0.45, 0.56, 0.71, 0.83, 0.94	+
ACUOSOS	A1	0	No se detecto	-
	A2	4	0.27, 0.45, 0.58, 0.76	+
SECOS	A1	2	0.25, 0.44	+
	A2	5	0.27, 0.42, 0.53, 0.67, 0.88	+
TINTURAS	B1	0	No se detecto	-
	B2	4	0.27, 0.48, 0.71, 0.85	+
ACUOSOS	B1	2	0.39, 0.48	+
	B2	3	0.36, 0.48, 0.95,	+
SECOS	B1	3	0.35, 0.5, 0.86	+
	B2	6	0.35, 0.42, 0.52, 0.58, 0.71, 0.83	+
ESTÁNDAR	Quercetina	1	0.98	+
	Rutina	1	0.47	+
	Ácido clorogénico	1	0.65	+
	hiperósido	1	0.78	+

Fase móvil= acetato de etilo-ácido formico-ácido acético glacial-agua(100:11:11:27)

Revelador = Productos Naturales (NP/PEG) y vapores de amoniac.

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 11. Cromatografía en capa fina para caracterizar cumarinas en los extractos del rizoma y fronda de *Polypodium triseriale* (calahuala). Figura 19 de los anexos.

EXTRACTOS	Código de Muestra	No.		Fluorescencia azul
		Banda	Rf	
TINTURAS	A1	No se detecto		-
	A2	1	0.36	+
ACUOSOS	A1	No se detecto		-
	A2	1	0.36	+
SECOS	A1	No se detecto		-
	A2	1	0.36	+
TINTURAS	B1	No se detecto		-
	B2	1	0.37	+
ACUOSOS	B1	No se detecto		-
	B2	1	0.39	+
SECOS	B1	No se detecto		-
	B2	1	0.39	+
ESTÁNDAR	Umbelifenona 1%	1	0.07	+
	Ácido p-cumárico	1	0.06	+
	Cumarina	1	0.04	+

Fase móvil = Tolueno-acetato de etilo (93:7)

Revelador = KOH en etanol al 5%

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 12. Cromatografía en capa fina para caracterizar saponinas en los extractos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala). Figura 25 de los anexos.

EXTRACTOS	Código de Muestra	No. Bandas	Rf	En visible Color rojo-violeta
TINTURAS	A1	1	0.84	+
	A2	1	0.78	+
ACUOSOS	A1	1	0.84	+
	A2	1	0.79	+
SECOS	A1	1	0.85	+
	A2	1	0.75	+
TINTURAS	B1	1	0.78	+
	B2	1	0.78	+
ACUOSOS	B1	1	0.84	+
	B2	1	0.81	+
SECOS	B1	1	0.82	+
	B2	1	0.78	+
ESTÁNDAR	Saponinas 0.1% en metanol	1	0.79	+

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

Revelador = Liebermann-Burchard,

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 13. Cromatografía en capa fina para caracterizar principios amargos en los extractos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala). Figura 27 de los anexos.

EXTRACTOS	Código de Muestra	No. Banda	Rf	En visible Color rojo-violeta
TINTURAS	A1	2	0.94	+
	A2	3	0.33, 0.55, 0.94	+
ACUOSOS	A1	2	0.94	+
	A2	2	0.54, 0.94	+
SECOS	A1	4	0.31, 0.93	+
	A2	3	0.31, 0.52, 0.93	+
TINTURAS	B1	1	0.93	+
	B2	3	0.31, 0.35, 0.93	+
ACUOSOS	B1	2	0.93	+
	B2	2	0.35, 0.93	+
SECOS	B1	3	0.30, 0.91	+
	B2	3	0.27, 0.51, 0.93	+
ESTÁNDAR	Neurolaena lobata (tres puntas)	1	0.93	+

Fase móvil = acetato de etilo-metanol-agua (38.5:7.5:4)

Revelador = Vainillina- ácido sulfúrico.

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Tabla 14. Metabolitos secundarios presentes en los extractos del rizoma y fronda de *Polypodium triseriale* (calahuala) obtenidos de la cromatografía en capa fina.

Tipo de Extrato	Muestra <i>Polypodium triseriale</i>	Flavonoides y Antocianinas	cumarinas	Saponinas	Principios amargos
TINTURAS	A1	-	-	+	+
	A2	+	+	+	+
	B1	-	-	+	+
	B2	+	+	+	+
ACUOSO	A1	-	-	+	+
	A2	+	+	+	+
	B1	-	-	+	+
	B2	+	+	+	+
SECO	A1	+	-	+	+
	A2	+	+	+	+
	B1	+	-	+	+
	B2	+	+	+	+

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

8.3 Cuantificación de Flavonoides:

Se muestra la comparación del porcentaje de flavonoides presentes en cada una de las muestras y sus réplicas utilizando el espectrofotómetro ultravioleta-visible. Cada absorbancia reportada fue leída a una longitud de onda de 394nm, como se puede observar en la tabla 15 . (Figura 31 de los anexos)

Tabla 15. Replicas realizadas para determinar el porcentaje de flavonoides en los extractos secos del rizoma y fronda de *Polypodium triseriale* (calahuala).

ID de la Muestra		Absorbancias	Peso en gramos	Volumen de aforo referencia	% de flavonoides	
A1	REPLICAS	1	0.031349	0.2	10 ml	0.68
		2	0.042818			0.97
		3	0.048403			0.88
		4	0.046689			0.82
A2	REPLICAS	1	0.35702	0.2	10 ml	7.79
		2	0.33190			7.52
		3	0.35755			6.51
		4	0.35167			6.16
B1	REPLICAS	1	0.070464	0.2	10 ml	1.54
		2	0.092975			2.11
		3	0.073770			1.34
		4	0.068574			1.20
B2	REPLICAS	1	0.18039	0.2	10 ml	3.93
		2	0.15046			3.41
		3	0.19703			3.59
		4	0.18723			3.28
RUTINA (1/10)			0.22925	0.01	10 ml	
			0.22069			
			0.27441			
			0.28565			

$$\% \text{ de flavonoides} = \frac{\text{Abs de la Muestra} * \text{peso de rutina} * \text{volumen aforo rutina}}{\text{Abs de Rutina} * \text{peso de la muestra} * \text{volumen aforo muestra}}$$

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

En la tabla 16 se muestra el porcentaje de flavonoides presentes para cada uno de los extractos etanólicos de *P. triseriale* (calahuala). El extracto con mayor % de flavonoides fue el de Alta Verapaz con 7.00 % .

Tabla 16. Cuantificación de flavonoides por el método espectrofotométrico con rutina en los extractos secos del rizoma y fronda de *Polypodium triseriale* (calahuala)

ID de la Muestra	% DE FLAVONOIDES				PROMEDIO Flavonoides totales
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	
A1	0.68	0.97	0.88	0.82	0.84 +/- .0813
A2	7.79	7.52	6.51	6.16	7.00 +/- .0751
B1	1.54	2.11	1.34	1.20	1.55 +/- .0513
B2	3.93	3.41	3.59	3.28	3.55 +/- .0135

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

8.4 Actividad antioxidante

En la tabla 17 se puede apreciar los resultados de la actividad antioxidante mediante cromatografía de capa fina, para la cual se utilizó como radical libre DPPH (2,2-difenil-1-piril-hidrazilo), como estándar se aplicó ácido ascórbico y ácido gálico a diferentes concentraciones. (Figura 32 de los anexos)

Tabla 17. Capacidad antioxidante mediante cromatografía de capa fina en los extractos secos del rizoma y fronda de *Polypodium triseriale* (calahuala)

Muestra	Número de bandas	Inhibición del radical libre (DPPH)
A1	2	+
A2	3	+
B1	2	+
B2	3	+
AAD	1	+
AG	1	+

A1= rizoma Alta Verapaz, A2= fronda Alta Verapaz, B1= rizoma Escuintla, B2= fronda Escuintla.

Revelador = DPPH (2,2-difenil-1-piril-hidrazilo), (+) decoloración del DPPH

AAD = ácido ascórbico concentrado, AG = ácido gálico concentrado.

Los resultados de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-piril-hidrazilo), se interpretan como miligramos de materia vegetal seca y como miligramos de extracto seco, los cuales se obtuvieron con las lecturas de la absorbancia con el espectrofotómetro ultravioleta-visible, y a una longitud de onda de 517nm. Los

resultados en miligramos es la concentración a la cual la muestra va inhibir en un 50% al radical libre (DPPH), Como se puede observar en la tabla 18. (Figura 33 de los anexos)

Tabla 18. Capacidad antioxidante mediante el método espectrofotométrico en rizoma y fronda de los extractos secos de *Polypodium triseriale* (calahuala)

ID de la Muestra	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE							
	CI ₅₀							
	mg de material vegetal seco				mg de extracto seco			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
A1	1,364	1,013	1,498	1,081	0,064	0,046	0,067	0,049
A2	1,073	1,107	1,031	1,008	0,161	0,166	0,155	0,151
B1	1,152	1,143	1,224	1,302	0,111	0,110	0,118	0,125
B2	1,270	1,368	1,233	1,229	0,194	0,209	0,188	0,188

CI 50% = concentración inhibitoria media.

ID de la muestra	PROMEDIO DE LAS REPLICAS	
	mg de materia vegetal seca	mg de extracto seco
A1	1.239 +/- .00045	0.056 +/- .00045
A2	1.055 +/- .00081	0.158 +/- .00081
B1	1.205 +/- .00370	0.116 +/- .00370
B2	1.275 +/- .00512	0.195 +/- .00512

A1= rizoma Alta Verapaz,
A2= fronda Alta Verapaz,

B1= rizoma Escuintla,
B2= fronda Escuintla.

8.5 Análisis estadístico

8.5.1 Capacidad antioxidante:

A continuación se muestra la tabla 19 en la cual se observan los resultados de la prueba estadística análisis de varianza de dos vías (ANOVA) de la actividad antioxidante del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) provenientes de Alta Verapaz y Escuintla,

expresados en mg. de extracto seco, dando la f (muestra) = 196.488, siendo éste el valor que establece que existe diferencia significativa entre muestras. Previamente se realizó la prueba de homocedasticidad (ver anexo # 19). Los valores se obtuvieron de la tabla 18.

Tabla 19 ANOVA (análisis de varianza) de dos vías: Prueba de efectos entre-temas para la capacidad antioxidante en los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale* SW (calahuala).

Variable dependiente: valor

Fuente	Tipo III suma de cuadrados	gl	Media de cuadrados	F	Sig. *
Modelo corregido	.040 ^a	6	.007	98.649	.000
Intercepto	.281	1	.281	4.172E3	.000
MUESTRA	.040	3	.013	196.488	** .000
REPLICA	.000	3	5.450E-5	.809	.520
Error	.001	9	6.733E-5		
Total	.321	16			
Total corregido	.040	15			

a. R cuadrado = .985 (ajustando R cuadrados = .975),
gl = grados de libertad, ** P<0.005 * (significancia)

Como se puede observar en la tabla 20 basado en las medias observadas, todas las muestras exhiben diferencias estadísticamente significativas. Evaluando las medias obtenidas, las frondas en ambas localidades presentaron mayor CI50% por lo tanto, menor capacidad antioxidante. (anexo 20)

Tabla 20. Prueba de post HOC: basado en la prueba de tukey para determinar si existe diferencia significativa entre que muestras según la actividad antioxidante.

Capacidad antioxidante: Múltiples comparaciones

(I) Muestra	(J) Muestra	Diferencia de medias (I-J)	Std. Error	***Sig.	95% intervalo de confianza	
					Límite superior	Límite superior
A1	A2	-.0972*	.00580	.000	-.1154	-.0791
	B1	-.0550*	.00580	.000	-.0731	-.0369
	B2	-.1338*	.00580	.000	-.1519	-.1156
A2	A1	.0972*	.00580	.000	.0791	.1154
	B1	.0422*	.00580	.000	.0241	.0604
	B2	-.0365*	.00580	.001	-.0546	-.0184
B1	A1	.0550*	.00580	.000	.0369	.0731
	A2	-.0422*	.00580	.000	-.0604	-.0241
	B2	-.0788*	.00580	.000	-.0969	-.0606
B2	A1	.1338*	.00580	.000	.1156	.1519
	A2	.0365*	.00580	.001	.0184	.0546
	B1	.0788*	.00580	.000	.0606	.0969

Basado en las medias observadas. El término de error es medio cuadrático (Error) = 6.73E-005. * La diferencia de medias es significativo al nivel de 0.05, *** P < 0.005 alta diferencia significativa.

La tabla 21 muestra los resultados de la prueba estadística ANOVA de dos vías para la cuantificación de flavonoides del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) de Alta Verapaz y Escuintla., dando f (Muestra) = 192.495, por lo que se deduce que existe diferencia estadísticamente significativa entre muestras. Previamente se realizó la prueba de homocedasticidad (ver anexo # 19) Los valores se obtuvieron de la tabla 16.

Tabla 21. Análisis estadístico mediante la prueba ANOVA de dos vías para determinar si existe diferencia significativa entre muestras en la cuantificación de flavonoides

Fuente	Tipo II suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	259.766 ^a	7	37.109	234.629	.000
Muestra	91.336	3	30.445	192.495	.000
Replica	1.180	3	.393	2.487	.127
Error	1.423	9	.158		
Total	261.189	16			

a. R cuadrado = .995 (ajustando R cuadrado = .990)

gl = grados de libertad, ** P<0.005 * (significancia)

Como se puede observar en la tabla 22 basado en las medias observadas, existe diferencia estadísticamente significativa entre fronda y rizoma en ambas localidades. Las frondas contienen mayor porcentaje de flavonoides que los rizomas de *P. triseriale* (calahuala) para ambas localidades. Los rizoma no exhiben diferencias estadísticamente significativas ver que P = 0.122 (Anexo 20)

Tabla 22. Prueba de post HOC: basado en la prueba de tukey para determinar si existe diferencia significativa entre que muestras según el porcentaje de flavonoides

% flavonoides: MULTIPLES COMPARACIONES

(I) muestra	(J) muestra	Diferencia de medias (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
A1	A2	-6.16*	.281	.000	-7.04	-5.28
	B1	-.71	.281	.122	-1.59	.17
	B2	-2.72*	.281	.000	-3.59	-1.84
A2	A1	6.16*	.281	.000	5.28	7.04
	B1	5.45*	.281	.000	4.57	6.33
	B2	3.44*	.281	.000	2.56	4.32
B1	A1	.71	.281	.122	-.17	1.59
	A2	-5.45*	.281	.000	-6.33	-4.57
	B2	-2.00*	.281	.000	-2.88	-1.13
B2	A1	2.72*	.281	.000	1.84	3.59
	A2	-3.44*	.281	.000	-4.32	-2.56
	B1	2.00*	.281	.000	1.13	2.88

Basado en las medias observadas

El término de error es medio cuadrático (Error) = .158.

*. La diferencia de medias es significativo al nivel de 0.05

9. Discusión de Resultados

En la tabla 1 se muestran los datos tomados en la realización de la colecta. La descripción de la planta en ambas localidades coincidieron en ser plantas epífitas, las cuales se dan en árboles como las palmas africanas y corozos pertenecientes a la misma familia taxonómica Palmaceae ^(anexo 12).

Como se muestra en la tabla 1 es abundante en Escuintla a unos 347 msnm, es muy escasa en Alta Verapaz a 1,316msnm. Luego del muestreo se llevaron especímenes al herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia BIGU, para su determinación taxonómica el cual fue registrado bajo el número BIGU 44750 ^(ver adjunto al final de los anexos).

La determinación de las pruebas físicas y fisicoquímicas ^(Anexo 13) de la droga vegetal y de las tinturas es de suma importancia para su identidad y pureza. El porcentaje de humedad reportado en la tabla 2 determina el contenido de agua residual en la materia vegetal desecada, así como también, toda materia volátil (agua, aceites, alcoholes, etc) que se elimina por el proceso de calentamiento y el cual no debe exceder del 10%, ya que podría darse hidrólisis de los constituyentes y crecimiento de microorganismos. El porcentaje de humedad del rizoma y la fronda de Alta Verapaz fue de 6.78 y 9.92 respectivamente. En el de Escuintla fue de 3.95 y 8.33, respectivamente. Este dato es de utilidad en los procedimientos posteriores de esta investigación tales como cuantificación de flavonoides y determinación de la actividad antioxidante.

En la tabla 2 se muestra los resultados del pH para las tinturas del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) Alta Verapaz fue de 6.55 y 6.22 respectivamente, en la de Escuintla fue de 6.51 y 6.38 respectivamente. El pH es el valor que representa la concentración de iones hidrógeno de una disolución acuosa, los valores recomendados por la Farmacopea española es entre 6 y 7. También se muestra los resultados de la densidad relativa de las tinturas de *P. triseriale* (calahuala) la cual determina la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a 20°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura, para tinturas del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) en Alta Verapaz fue de 0.93 y 0.94 respectivamente, en la de Escuintla fue de 0.93y 0.94 respectivamente. Estos satisfacen los límites para la monografía de la plana.

Se determinó que el mejor solvente en el cual se extrajo la mayor cantidad de sólidos totales presentes en el rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) provenientes de dos localidades fue el etanol al 50 por ciento. (Ver tabla 2).

Los resultados obtenidos en las propiedades fisicoquímicas se puede decir que son satisfactorios, porque cumplen con las normas establecidas por la farmacopea española. ⁽²⁶⁾

Se realizaron seis extractos por localidad; tres de ellos para la fronda y tres para el rizoma, Los extractos fueron: tinturas, extractos secos, y extractos acuosos (ver resultados en la tabla 3). Las tinturas se extrajeron por percolación, mientras que los extractos secos por percolación, concentrando en el evaporador rotatorio. Los extractos acuosos se concentraron hasta sequedad mediante liofilización ^(anexo 15). Los extractos secos presentaron mayor porcentaje de rendimiento, debido a la afinidad del solvente (etanol al 50%) para extraer los principios activos.

Se realizó el tamizaje fitoquímico con pruebas cualitativas (macro y semi-micro en cromatografía en capa fina) para caracterizar los posibles metabolitos secundarios en los extractos obtenidos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) colectadas en Alta Verapaz y Escuintla. Los ensayos realizados fueron alcaloides, flavonoides y antocianinas, cumarinas, saponinas, antraquinonas, glicósidos cardiacos, glucósidos cianogénicos, esteroides insaturados, esteroides o triterpenoides, taninos, principios amargos, aceites volátiles. En las tablas 4, 5, 6, 7 y 8 se pueden observar los resultados de las pruebas preliminares realizadas. Y en las tablas 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se pueden observar los resultados de las cromatografías realizadas.

En la tabla 4, se muestran los metabolitos secundarios ausentes en rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) colectadas en ambas localidades, los cuales fueron alcaloides, antraquinonas, Glicósidos cardiacos, Esteroides o triterpenoides, taninos, saponinas, glucòcidos cianogénicos.

Los resultados de la tabla 5 muestran que existe presencia de flavonoides y antocianinas en extractos secos de *P. triseriale* (calahuala), bajo las pruebas preliminares, en los cuales se formó precipitado y se observó cambio de coloración al agregar los reactivos correspondientes. En los rizomas de ambas localidades se evidenció la presencia de

flavonas, flavonoles (coloración: amarillo a rojo) y flavononas (rojo), en las frondas de ambas localidades se evidenció la presencia de isoflavonas (amarillo). Las isoflavonas son sustancias vegetales secundarias estrogénicas y antiestrogénicas que permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes que protegen frente al desarrollo de cáncer de mama. Dentro de las isoflavonas podemos mencionar: la daidzeína y la genisteína.

El ensayo macrométrico para caracterizar cumarinas ver tabla 6, reportó fluorescencia amarilla en las frondas de los extractos secos de *P. triseriale* (calahuala) en ambas localidades, lo cual indica que hay presencia de cumarinas. En los rizomas no se detectó fluorescencia.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la pruebas preliminares de Legal y Baljet, en los cuales, sólo los rizomas de *P. triseriale* (calahuala) de ambas localidades (Alta Verapaz y Escuintla) contienen principios amargos, al observarse coloración rojo oscuro.

Como se muestra en la tabla 8 los resultados para la caracterización de esteroides insaturados en extractos secos de *P. triseriale* (calahuala) por medio de la prueba preliminar Liebermann-buchard dieron positivos; la fronda de Alta Verapaz y el rizoma de Escuintla dando una coloración rojo-rosado, y en la prueba de Salkowski dieron positivos la fronda de Alta Verapaz y el rizoma de Escuintla con la presencia de un anillo rojo cereza. Las diferencias observadas de estos resultados, muestran que el contenido de esteroides insaturados presentes en *P. triseriale* (calahuala) varía en cuanto a la parte del espécimen analizado así como también de la localidad de donde se recolectó.

Los metabolitos secundarios ausentes en los extractos de *P. triseriale* (calahuala) de ambas localidades (Alta Verapaz y Escuintla) en base a cromatografía en capa fina fueron alcaloides, antraquinonas, glicósidos cardíacos y aceites volátiles. Ver la tabla 9.

Como se muestra en la tabla 10 la prueba semimicro en cromatografía de capa fina confirma la presencia de flavonoides y antocianinas, debido a las bandas que se observaron bajo la luz ultravioleta, de 365nm, con fluorescencia intensa amarillo y verde al agregar como revelador el reactivo de productos naturales (NP/PEG). Este ensayo confirma las pruebas ya realizadas de coloración y precipitación. También se puede observar que en los

extractos acuosos y tinturas de los rizomas para ambas localidades no se detectaron los flavonoides ni antocianinas (ver tabla 14), en los extractos secos sí se detectó la presencia de estos metabolitos en el rizoma y en la fronda. Existe diferencia en cuanto al contenido de flavonoides presentes en el rizoma y fronda de los extractos secos de *P. triseriale* (calahuala) colectadas en ambas localidades. Las frondas fueron las que presentaron mayor número de bandas.

La tabla 11 muestra que los extractos acuosos, secos y tinturas de la fronda de *P. triseriale* (calahuala) colectadas en ambas localidades contienen cumarinas, debido a que se observó en el cromatograma bandas con leve fluorescencia azul en la luz ultravioleta a 365nm. En los rizomas de todos los extractos para ambas localidades no se evidenció ninguna reacción (ver tabla 14).

La tabla 12 muestra que en el cromatograma realizado corrieron bandas de color rojo para los extractos del rizoma de *P. triseriale* de ambas localidades, y bandas de color violeta para los extractos de la fronda de ambas localidades. Por lo tanto el ensayo evidencia la presencia de Saponinas en rizoma y fronda de todos los extractos de *P. triseriale* (calahuala), para ambas localidades (Alta Verapaz y Escuintla).

En la tabla 13 se observaron varias bandas (mayor de 2) de color rojas-violetas con revelador vainillina – ácido sulfúrico en la cromatografía en capa fina. Por lo tanto si hay presencia de principios amargos en rizoma y fronda de todos los extractos de *P. triseriale* (calahuala) para ambas localidades.

Todo el tamizaje fitoquímico realizado para los extractos de *P. triseriale* (calahuala), colectados en Alta Verapaz y Escuintla revelaron dentro de su composición, como se puede ver en la tabla 14 la presencia de saponinas, principios amargos, cumarinas, flavonoides y antocianinas en las frondas de los extractos acuosos, secos y tinturas de *P. triseriale* (calahuala). Los metabolitos secundarios presentes en el rizoma de las tinturas y de los extractos acuosos fueron saponinas y principios amargos, y en el rizoma de los extractos secos fueron saponinas, principios amargos, flavonoides y antocianinas.

En la tabla 15 y 16 muestran los resultados obtenidos al realizar la cuantificación de flavonoides totales ^(anexo 17). Se realizó la lectura de la absorbancia para cada una de las

muestras con sus cuatro réplicas, y se utilizó como estándar rutina (1/10). La tabla 16 presenta el promedio del porcentaje de flavonoides presente en cada una de las muestras, siendo éste mayor en las frondas de ambas localidades (Alta Verapaz 7.00%, Escuintla 3.55%), y menor en los rizomas de ambas localidades (Alta Verapaz 0.84%, Escuintla 1.55%).

La tabla 17 resume los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina ^(anexo 18). Se observó en los extractos secos de los rizomas de ambas localidades, que la intensidad de inhibir la coloración es parecida y de las cuales se aprecian que corren 3 bandas. En los extractos secos de la fronda de ambas localidades con menor intensidad que los rizomas, se inhibió la coloración producida por el DPPH. Con los estándares aplicados a diferente dilución se observó una disminución en la coloración, la cual indica la concentración mínima a la cual fue capaz de inhibir el DPPH.

El método de cromatografía en capa fina para la determinación de la capacidad antioxidante, no exhibió diferencias significativas entre los extractos aplicados, debido a que todas las muestras presentaron decoloración a la misma dilución evaluada 1mg/ml de la solución madre (0.1g de muestra/5ml metanol).

La tabla 18 resume los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por medio del método espectrofotométrico a 517nm. Las frondas de ambas localidades presentaron mayor concentración inhibitoria media (CI₅₀, Alta Verapaz 0.158 mg de extracto seco y Escuintla con 0.116 mg de extracto seco), Los rizomas presentaron menor CI₅₀ (Alta Verapaz con 0.056 mg de extracto seco y Escuintla con 0.195 mg de extracto seco). Estos resultados son los miligramos del extracto seco de *P. triseriale* (calahuala) necesarios para inhibir al 50 por ciento (CI₅₀) el radical libre (DPPH), y se obtenga la actividad antioxidante. Los rizomas de los extractos secos de *P. triseriale* (calahuala) fueron los que presentaron mayor capacidad antioxidante.

Para determinar si existe diferencia significativa de la composición química (cuantificación de flavonoides) y actividad biológica (antioxidante) entre los rizomas y frondas de *P. triseriale* (calahuala) colectados en Alta Verapaz y en Escuintla, Se utilizó como método estadístico ANOVA de dos vías (ver tabla 19 y 21). Se obtuvo el valor

estadístico “F” el cual indica que existen diferencias significativas entre los extractos, previamente se realizó la prueba de homocedasticidad que indicó que las muestras tienen la misma varianza y se puede continuar con el método estadístico ya establecido.

En las tablas 20 y 22 se observa la prueba post Hoc, basada en la prueba de TUKEY, la cual establece entre que muestras analizadas de *P. triseriale* (calahuala) se exhibe diferencia significativa.

Como se puede observar en la tabla 20 todos los extractos analizados presentaron diferencias estadísticamente significativas para la actividad antioxidante. Se evaluaron las medias observadas, lo cual muestran que los rizomas en ambas localidades presentaron mayor capacidad antioxidante que las frondas (basado a la concentración inhibitoria media).

En la tabla 22 se presentan los resultados para la prueba TUKEY del porcentaje de flavonoides. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las frondas (Alta Verapaz 6.99%, Escuintla 3.55%) y los rizomas (Alta Verapaz 0.84%, Escuintla 1.55%) de ambas localidades. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los rizomas de ambas localidades. Estos resultados permiten afirmar que la fronda de *P. triseriale* (calahuala) contiene mayor porcentaje de flavonoides que el rizoma del mismo. Otros estudios realizados ^(31,37) han mostrado que en las frondas de los helechos calahuala familia Polypodiaceae, existe el mayor porcentaje de flavonoides.

10. Conclusiones

- 10.1** El mejor disolvente para la fronda y el rizoma de *Polypodium triseriale* (calahuala) según la cantidad de sólidos totales extraíbles es etanol al 50%.
- 10.2** En los extractos secos de las frondas de *P. triseriale* (calahuala) fue donde se obtuvo el mayor rendimiento para ambas localidades (Alta Verapaz 35.63% y Escuintla 30.05%).
- 10.3** Los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos, secos y tinturas de las frondas de *P. triseriale* (calahuala) para ambas localidades son saponinas, principios amargos, cumarinas, flavonoides y antocianinas.
- 10.4** Los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos y tinturas de los rizomas de *P. triseriale* (calahuala) para ambas localidades son saponinas, principios amargos, y en los extractos secos de los rizomas son saponinas, principios amargos, flavonoides y antocianinas.
- 10.5** Los extractos secos de la fronda de *P. triseriale* (calahuala) en ambas localidades contienen mayor porcentaje de flavonoides (Alta Verapaz 6.99% y Escuintla 3.55%) que los extractos secos del rizoma (Alta Verapaz 0.84% y Escuintla 1.55%), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($P < 0.05$).
- 10.6** Los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) proveniente de Alta Verapaz, presentaron actividad antioxidante a una CI_{50} de 0.056 y 0.158 respectivamente.

- 10.7** Los extractos secos del rizoma y fronda de *P. triseriale* (calahuala) proveniente de Escuintla, presentaron actividad antioxidante a una CI_{50} de 0.116 y 0.195 respectivamente.
- 10.8** Los extractos secos del rizomas de *P. triseriale* (calahuala) en ambas localidades presentan mayor capacidad antioxidante (Alta Verapaz 0.056, Escuintla 0.116) que los extractos secos de las frondas (Alta Verapaz 0.158, Escuintla 0.195) (Basado a la CI_{50} concentración inhibitoria media), Existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($P < 0.05$).

11. Recomendaciones

- 11.1** Realizar estudios para la elaboración de productos fitoterapéuticos del espécimen *P. triseriale* (calahuala). Utilizando los rizomas como materia vegetal, debido a que estas presentan mayor capacidad antioxidante.

- 11.2** Continuar con investigaciones sobre otras actividades biológicas ejemplo inmunomoduladora, que se le atribuyen a *P. triseriale* (calahuala).

- 11.1** Proporcionar información a la población sobre el valor biológico e importancia para la agroindustrialización de *P. triseriale* (calahuala).

12. Referencias

1. Sosa, R. **El poder Medicinal de las Plantas**, octubre de 1998. Única edición. Asociación Pública Interamericana. Madrid (España), pp 248-249.
2. Aldana, F. **Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* y *P. pseudoaureum*(cav.), tres especies nativas de Guatemala.** 2007. Maestría multidisciplinaria en producción y usos de plantas medicinales. USAC. Guatemala.(tesis de maestría multidisciplinaria en producción y usos de plantas medicinales). pp. 5,9.
3. Véliz, M.; Vargas, J.; **Helechos arborescentes de Guatemala distribución, diversidad, usos y manejo.** Septiembre 2006. Primera edición. Unidad de investigación Herbario BIGU, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala. pp. 10
4. Ocampo, R.; Martínez, J.; Cáceres, A. **Manual de agrotecnología de plantas medicinales Nativas.** 2000. primera edición. Guatemala. pp. 114-119
5. Kuklinski, C. **Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.** 2000. Barcelona, Omega 515p
6. Sharapin, N. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.** 2,000. Cooperación Iberoamericana, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. pp. 205-208, 247.
7. Medinilla, B.; **Manual de laboratorio de Farmacognosia.** 2001. Facultad de ciencias químicas y Farmacia, Escuela de química Farmacéutica, Departamento de Farmacognosia y Fotoquímica. USAC. Guatemala. pp. 13-16 y 27-29
8. Santa C. L. **Manual. Selección fitoquímica.** Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímicas. USAC. Guatemala. pp. 92.
9. WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials.** 1998. Geneva: WHO. pp.115.
10. Lock O. **Investigación Fitoquímica.** 1988. segunda edición. Perú: Universidad Pontificia Católica, pp. 300.
11. Stolze, R. **Ferns and Ferns allies of Guatemala.** 1981. Fieldiana: Botany New Series. 6: pp 374-377.
12. Kuyun, Carlos. **Guía de medicina natural salud y curación** pp. 827.

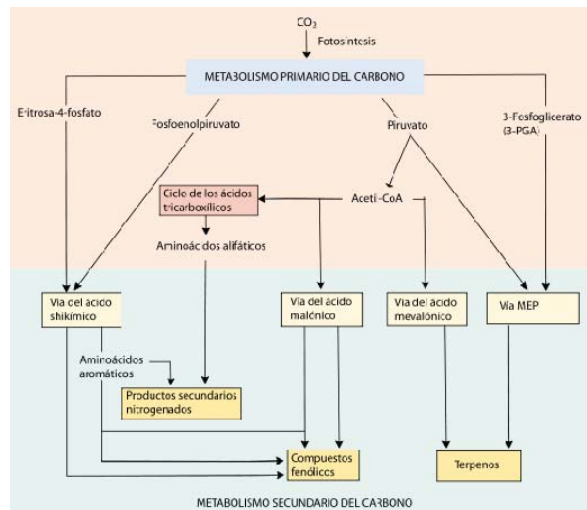
13. Gral Claudia, ***Espectrofotometría visible ultravioleta***. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura 2006. Referencias de Internet: exa.unne.edu.ar/depar/areas/quimica/quimica.analitica/arch_descargas/arch_seminarios2006/EspectrofotometriaGralPasotti.doc - Wikipedia, La enciclopedia Libre. 2008.
14. Vila, R y Reig, M. **Métodos de control de calidad**. 2003. Manaus, UB Virtual, Imicromat. pp. 39
15. Procedimiento Estándar de Operación (PEO), **Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System Operator's Manual**. 2008 Universidad de San Carlos de Guatemala, CCQQ manual de operaciones LIPRONAT.
16. Cáceres, A. **Vademécum nacional de plantas medicinales**. 2006 MSPAS. USAC. Guatemala. pp. 61-62
17. Bezanger B. **Vademécum de prescripción plantas medicinales**, 1998, Tercera edición. Fitoterapia. Masson, S.A. Barcelona, España. pp. 125-126.
18. Cáceres, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. 1996, Edición Universitaria. USAC. Guatemala. pp.105-107.
19. Gerrit D. *et al.* **Flora mesoamericana**. 1995. Volumen 1 Psilotaceae a Salviniaceae. Universidad nacional autónoma de México D.F. Instituto de Biología pp. 345-352.
20. Cáceres, A.; Martínez, J; Bernal, H. (editores). **Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas**, enero del 2,000, primera edición. "CAB-CYTED- Santa Fé de Bogotá. Colombia. pp. 349-346.
21. Palazón, J.; Cusidó, R; Morales, C. **Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino**. 2001. Grupo de biotecnología vegetal, facultad de farmacia, universidad de Barcelona. ACE, Revista de enología. pp 9.
22. Martínez, S. *et.al.* **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. 2002 Nutr. Hosp. España pp 271-278.
23. Rayward J., Villarubia V., Sada G., Alvarez-Mon., 1993 **Aspectos inmunológicos del extracto de Polypodium leucatonos**. Segundo congreso internacional de respuesta biológica modificante. USA.
24. Cáceres, A., Álvarez A., Ovand A., Samayoa B. **Plants used in Guatemala for the treatment pf protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi**

- ando American trupanosomes of 13 native plants.** 1998. *J. Ethnopharmacol.* pp. 195-202.
- 25. Cáceres A, López B., Girón M., Logem H., plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants.** 1993. *J. Ethnopharmacol* pp. 207-213.
- 26. Real Farmacopea Española.** 2002. Segunda Edición, Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. pp. 2801
- 27. Wagner H, Bladt S., Zgainski E.M. Plant Drug Analysis a thin layer chromatography Atlas.** 1984 Berlin Heidelberg New York Tokyo. pp. 299-301.
- 28. De la Cruz B., 2005 Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente.** Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- 29. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos,** 2001. Comisión permanente de la farmacopea de los estado unidos Mexicanos secretaria de la salud. México pp 26-27
- 30. Olga L.S. Investigación fitoquímica. Métodos para el estudio de productos naturales.** 1995. Pontifica Universidad Católica del Perú. pp. 123
- 31. Matías E. Caracterización fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría uv de Flavonoides totales en extractos de rizomas y frondas de polypodium triseriale.** 2008. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. (tesis de graduación Químico Farmacéutico) pp 19-25.
- 32. Zhiyong L. 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.
- 33. Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review,** 2004. Bratislava, Slovakia. *Journal of food composition and analysis* 19(2006)531-537
- 34. Wren, R. Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos.** 1994. Editorial Grijalbo. San Miguel. México. pp. 233-234.
- 35. List, P.H., Schmidt, P.C. Phytopharmaceutical Technology.** 1989. Boca Raton: CRC press. pp. 374.

36. Fürst, P. **The role of antioxidants in nutritional support.** 1998. *Clinical Nutrition*; 17:4-5.
37. Lima S. **Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*).** 2003. USAC. Guatemala. Tesis, pp53.
38. Soares JR *et al.* **Antioxidant activities of some extracts of thymus *Zygis*.** *Free Rad* 1997; 26:469-478.
39. **Real Farmacopea Española.** 3a. edición. Madrid MS y consumo. 2005.

13. Anexos

ANEXO No. 1: La biosíntesis de los metabolitos secundarios, parte del metabolismo primario de las plantas del que se desvía acorde con las vías generales que se muestran en el siguiente cuadro:



ANEXO No. 2: Rf: Factor de retención, es la medida de la migración de una sustancia determinada en un disolvente dado.

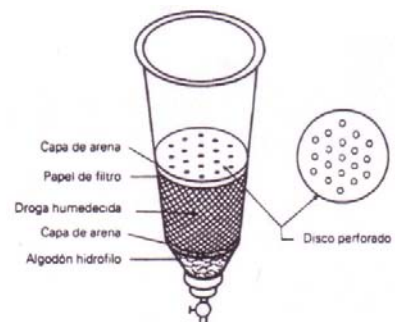
$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

ANEXO No. 3: Familia Polipodiáceas

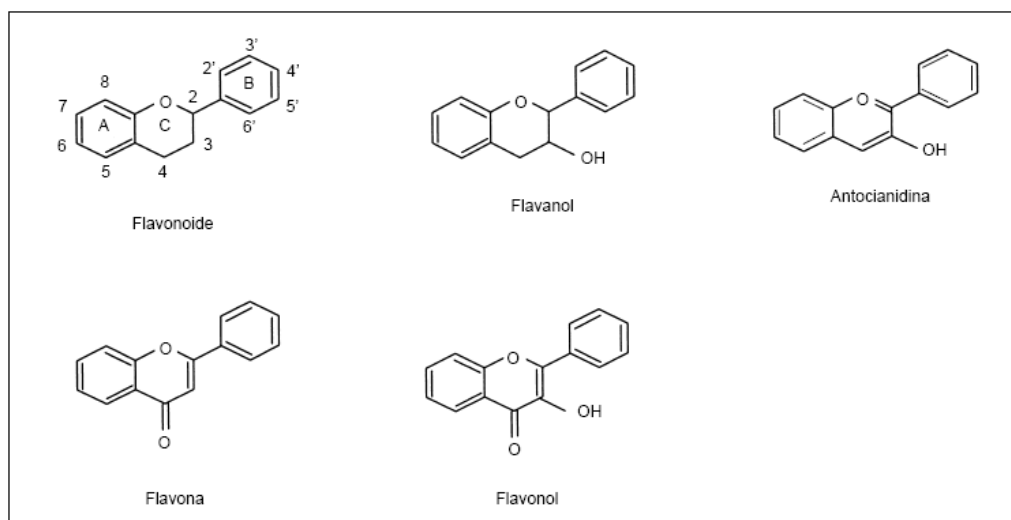
(Helechos) *Polypodium triseriale*.



ANEXO No. 4: Modelo de Percolador



ANEXO No. 5: Estructura básica y tipos de flavonoides



ANEXO No. 6: Guía para la toma de colecta proporcionada por el Ing. Martínez de la Facultad de Agronomía.

INFORMACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO PARA LAS DIFERENTES COLECTAS								
#	Localidad	Código Identificación	Estado de la Planta	Km. de la Capital	Descripción de la localización de la muestra	ESPECIE VEGETAL	Coordenadas UTM *	Fecha colecta
19	El Astillero, San Jerónimo, Baja	Q	Completa	133	Localizada en peñascos, juntamente con la muestra	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)		01/07/2005
7	Reserva Internacional Trfiño. Frontera Guatemala-El Salvador.	J.V. 921	Rizoma		Epífita. Colectada por Jorge Mario Vargas.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)		10/08/2005
8	Reserva Internacional Trfiño. Frontera Guatemala-El Salvador. Sin código	J.V. 919. Sin Código	Completa		Epífita. Colectada por Jorge Mario Vargas.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)		10/08/2005
4	Izabal, Aldea El Milagro.	IZA 3	Rizoma	280	Se encontró en árboles de Corozo. Hábito epífita. Se entrevistó a Candelaria Ochaeta	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)	16P 0300364 1723460*	19/08/2005
9	Aldea Canaleño, camino a Raxhuja	A.V. Canaleño 1	Rizoma	317	Se encontró en árboles de corozo. Entrada camino de terreceria. La presencia es limitada. Hábito epífita.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)	16P 0191697 1749769*	20/08/2005
11	Cuevas de Candelaria, Chisec. Alta Verapaz.	AVCDC 1	Rizoma	315	Se encontró en árbol de palmera a la entrada del Centro Ecológico Cuevas de Candelaria. Hábito epífita.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)	15P 0807186 1757087*	20/08/2005
12	Chisec, Alta Verapaz	AVC 1	Rizoma	287	Se encontró en un árbol el cual s encontraba con otras especies acompañantes de la familia Bromeliaceae. Hábito epífita.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw., J. Bot. (Schrader)	15P 0788907 1748778*	20/08/2005
1	San Juan Dolores, Departamento del	P1	Rizoma		Se encontró en árbol de Manaco, en la entrev. Indican que alivia el dolor de estómago y limpia los riñones.	<i>Polypodium triseriale</i> Sw.,		28/10/2005

	Petén.				Habito epifito.	J. Bot. (Schrader)	
13	Sayaxché, (antes del ferry). Departamento de Alta Verapaz.	P14	Completa	173	Localizada en árboles de corozo, su presencia es escasa. Habito epifita.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	30/10/2005
16	Comunidad de Semococh, camino a Lanquín, A.V.	P17	Rizoma		Habito epifita de árbol a la par de un arroyo camino a la finca Semococh.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	30/10/2005
17	Lanquín, departamento de Alta Verapaz.	P18	Rizoma		Localizada en un rodal de Quercus y pinos con especies acompañantes de la familia Bromeliaceae. Habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	31/10/2005
20	Semuc, Champey, (balneario) departamento de Alta Verapaz.	P21	Rizoma		Localizada en un árbol cerca del río orilla del puente a la entrada del balneario. La presencia de la misma es escasa, habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	31/10/2005
1	Aldea Carolina, camino a la Lachuá	Lach 1	Rizoma	305	Localizada en corozos, su presencia es escasa, terreno perturbado para uso de siembra de maíz y frijol inclusive en áreas de bosque, no la conocen. Habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2006
4	Aldea Tierra Blanca, Cinco Mil, Cruce a la Petrolera.	Lach 4	Rizoma	325	Localizada en corozos terrenos perturbados para ganado, su presencia es moderada. Las dos anteriores se colectaron el mismo terreno. Habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2005
5	Aldea el Limón, camino a la Lachuá.	Lach 5	Completa	330	Localizada en árboles de corozo, su presencia es escasa, terreno perturbado y uso intensivo agrícola, las personas no la conocen, habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2005
7	Ixcán, Playa Grande.	Lach 7	Rizoma		Localizada en árboles de corozo, en las afueras del municipio, habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2005
8	Ixcán-Lachuá	Lach 8	Rizoma	361	Localizada en árbol de corozo, su presencia es escasa. En la salida de la reserva de la Laguna Lachuá, camino a Ixcán. Habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2005
9	Santa Lucía-San Benito	Lach 9	Completa	352	Localizada en árbol de corozo, su presencia es escasa. Habito epifito.	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	15/12/2005
1	San Marcos, Nuevo Progreso	SM1	Completa		Colectada por Paty	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	
2	San Marcos, Agua Blanca	SM3	Completa		Colectada por Paty	<i>Polypodium triseriale Sw., J. Bot. (Schrader)</i>	

Fuente: Colectas realizadas por el Ingeniero Martínez de la facultad de Agronomía.

ANEXO No.7: Preparación de los tubos de reacción para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo
Buffer de acetatos	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Metanol	2 ml	1.5 ml	1.9 ml	1.4 ml
Solución de DPPH	---	0.5 ml	---	0.5 ml
Muestra	---	---	Anexo9	Anexo9

ANEXO No.8: Preparación de la curva de lectura utilizando una serie de diluciones del extracto para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

Ensayos y sus blancos	Extracto	Metanol	Dilución
1	1 (20µl)	4 (80 µl)	0.2
2	2 (40µl)	3 (60µl)	0.4
3	3 (60µl)	2 (40µl)	0.6
4	4 (80µl)	1 (20µl)	0.8
5	5 (100µl)	0 (0µl)	1.0

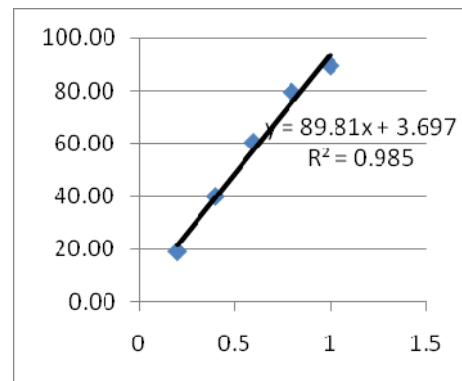
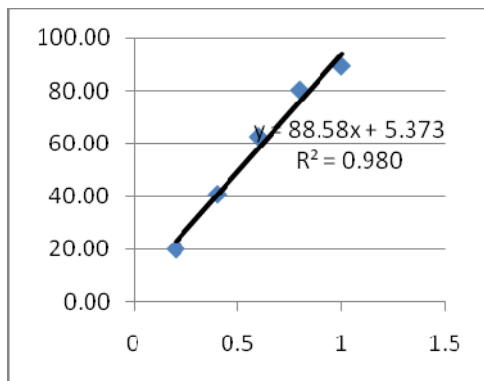
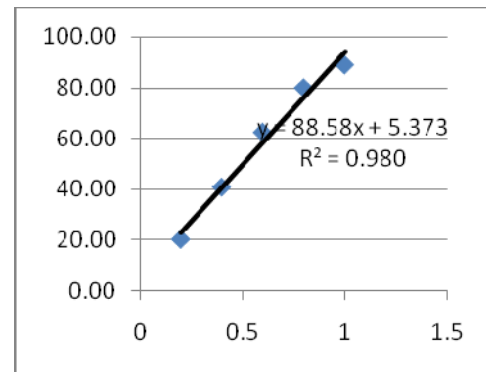
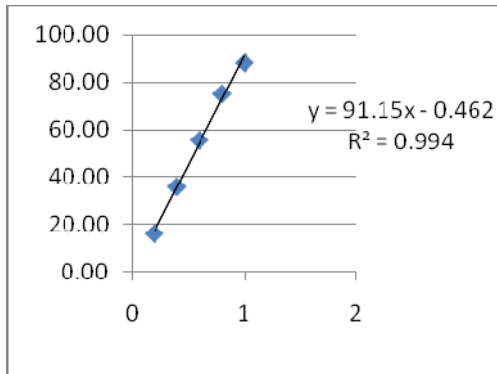
ANEXO No.9: Registro de los resultados de la curva y determinar el porcentaje de inhibición de la absorbancia para la detección de actividad antioxidante mediante el método de DPPH

Dilución o control	Medición de absorbancia 1 (tubos blanco del ensayo)	Medición de absorbancia 2 (tubos ensayos)	Promedio de absorbancias (Abs1-Abs2)	Porcentaje Inhibición de la concentración (Anexo 11)
Control				
1+4 (0.2)				
2+3 (0.4)				
3+2 (0.6)				
4+1 (0.8)				
5+0 (1.0)				

ANEXO No.10: Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración de actividad la antioxidante mediante el método de DPPH.

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ de inhibición}$$

ANEXO No. 11: Regresión lineal para determinar concentraciones de la muestra y la actividad antioxidante mediante el método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). De la fronda de Alta Verapaz, Fray Bartolomé de las casas. Con sus 4 réplicas



Fuente: datos experimentales

ANEXO No. 12: Colecta de *P. triseriale* (calahuala). En palma africana.



Figura 1. Escuintla



Figura 2. Escuintla



Figura 3. Alta Verapaz

ANEXO No. 13: Propiedades físicas y fisicoquímicas



Fig 4. secado.



Fig.5 pH.



Fig.6 Densidad



Fig.7 sólidos totales

ANEXO No. 14: Extractos obtenidos de la droga vegetal *P. triseriale* (calahuala):



Fig. 8. Percolador



Fig. 9. Liofilizador.



Fig. 10. Rotavapor

Tintura.



Extracto Acuoso

Figura 11.

Extracto seco.

ANEXO No. 15: Tamizaje fitoquímico



Figura 12 Macro y semi-micro



Fig. 13. Cromatografía de capa fina (CCF)

ANEXO No. 16: Investigación de Metabolitos secundarios del espécimen *P. triseriale* (calahuala), por métodos macro, semi-micro y en Cromatografía en capa fina (CCF).

CARACTERIZACION DE ALCALOIDES EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

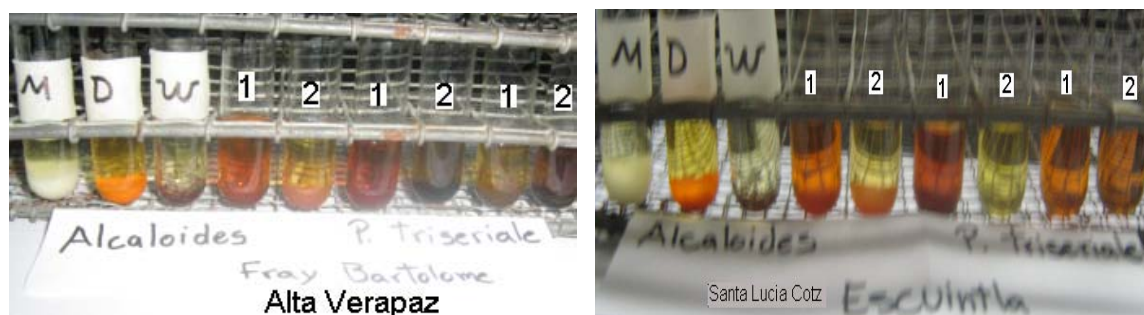


Fig.14. pruebas preliminares. 1=rizoma, 2= fronda, m=mayer's, D=dragendorff, W=wagner

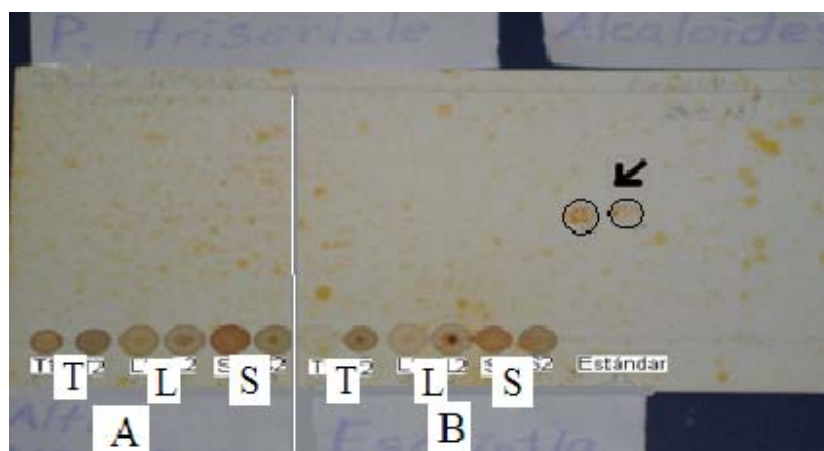


Figura 15. Cromatografía en capa fina. A = Alta Verapaz, B = Escuintla,
 T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco, 1=rizoma, 2=fronda,
 Estándar = papaverina 1 %, revelador= dragendorff
 Fase móvil = acetato de etilo-metanol-agua(100:13.5:10)

**CARACTERIZACION DE FLAVONOIDES Y ANTOCIANINAS EN
EXTRACTOS DE *P. triseriale*.**



Figura 16. Pruebas preliminares 1=rizoma, 2= fronda, T=testigo,
A = NaOH, B = MgHCl, C=HCl, D=FeCl₃ 10% E=H₂SO₄

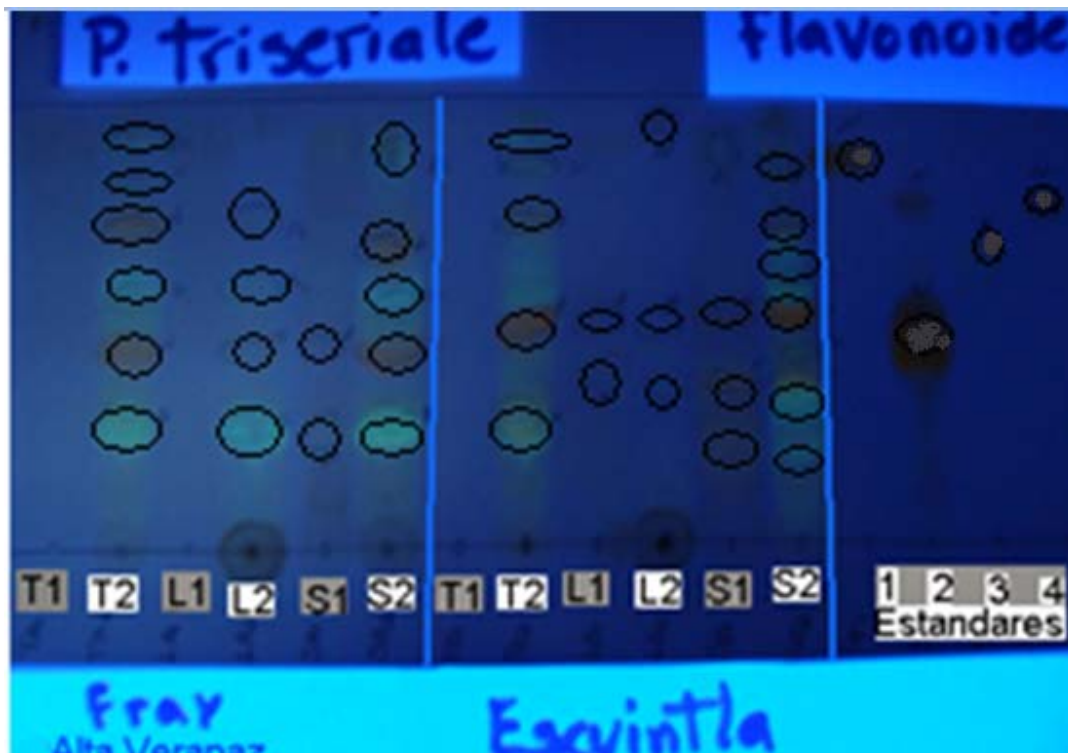


Figura 17. Cromatografía en capa fina. T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco, 1=rizoma,
2=fronda. Estándares: quercetina, rutina, ácido clorogénico, hiperósido, respectivamente.
Revelador = Productos Naturales (NP/PEG), fase móvil= acetato de etilo-ácido fórmico-ácidoacético glacial-
agua (100:11:11:27)

CARACTERIZACION DE ANTRAQUINONAS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

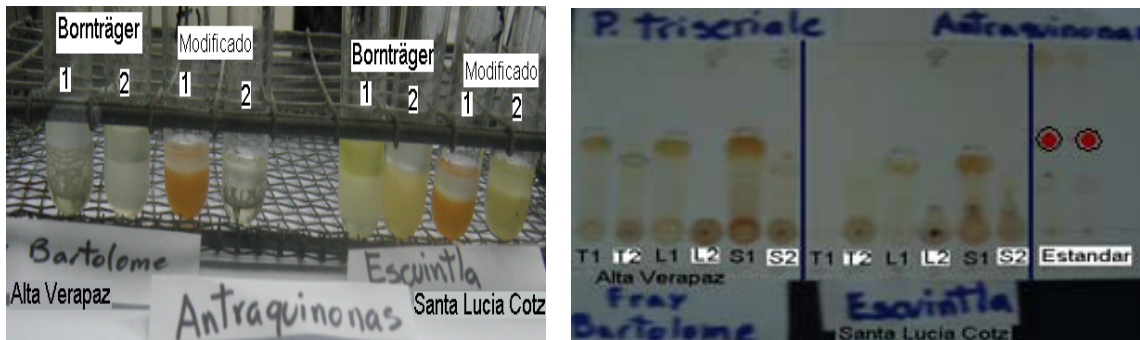


Fig.18. Pruebas preliminares y Cromatografía en capa fina.
1=rizoma, 2=fronda T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco. Estándar =extracto de Sen,
revelador = KOH 5% etanol, fase móvil =acetato de etilo-metanol-agua(100:17:13).

CARACTERIZACION DE CUMARINAS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

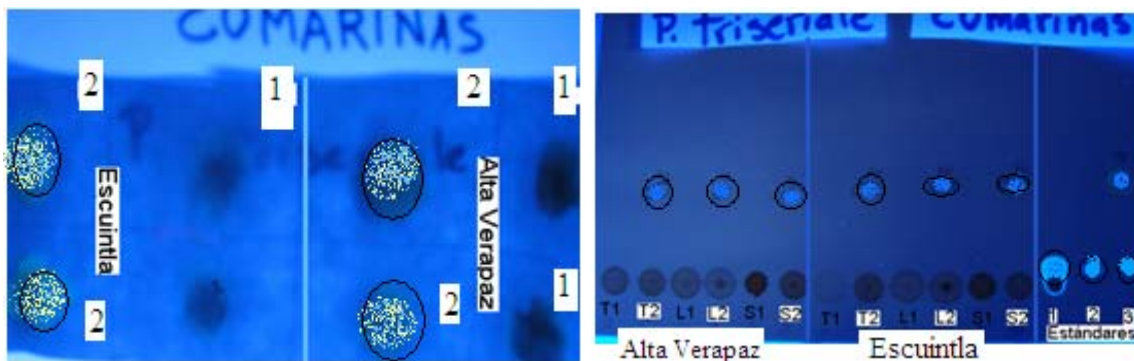


Figura: 19. Pruebas preliminares (papel filtro) y Cromatografía en capa fina.
1=rizoma, 2=fronda T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco. Estándares= unbelifenona 1%, ácido p-cumarico, cumarina, respectivamente. Revelador = KOH 5%, fase móvil= tolueno-acetato de etilo(46.5:3.5)

CARACTERIZACION DE CARDENOLIDOS Y BUFADIENOLIDOS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

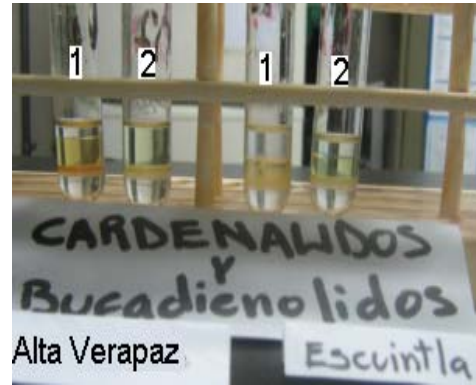


Figura 20. ensayo macro en papel filtro figura 21 pruebas preliminares. 1=rizoma, 2=fronda.



Figura: 22. Cromatografía en capa fina. 1=rizoma, 2=fronda, estándar = digoxina, revelador = Kedde, fase móvil= acetato de etilo-metanol-agua(33:5:3)

CARACTERIZACION DE ESTEROIDES O TRITERPENOIDES EN EXTRACTOS DE
P. triseriale.

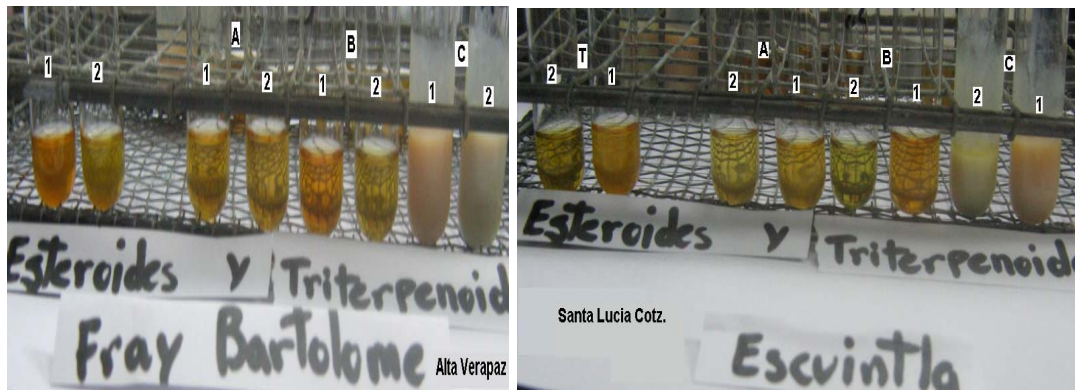


Figura: 23. Pruebas preliminares.

1=rizoma, 2= fronda, T=testigo, A=Libermann-burchard, B=ácido tricloroacético, C=carr-price.

CARACTERIZACION DE TANINOS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

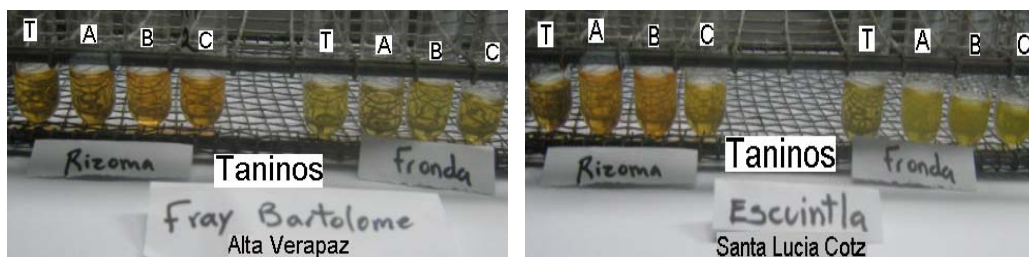


Figura: 24. Pruebas preliminares.

1=rizoma, 2= fronda, T=testigo, A=Gelatina 1%, B=Gelatina-sal, C=Cloruro ferrico.

CARACTERIZACION DE SAPONINAS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

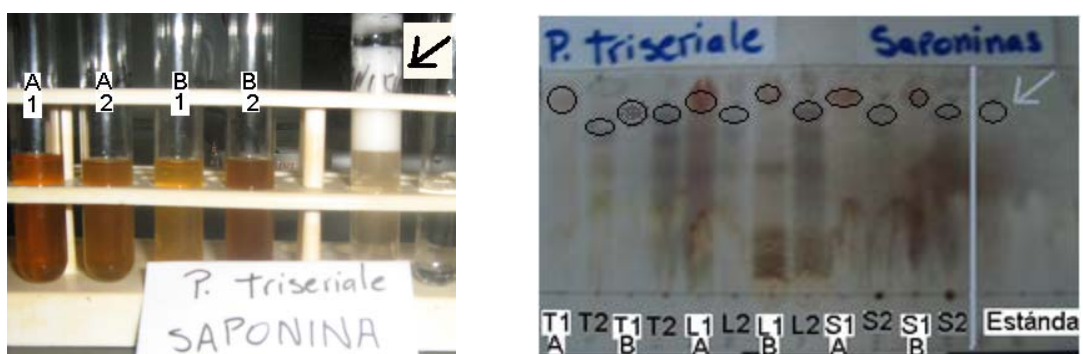


Figura: 25. Pruebas preliminares y Cromatografía en capa fina.

1=rizoma, 2=fronda A=Alta Verapaz, B=Escuintla.

T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco, A=Alta Verapaz, B=Escuintla. Estándar = saponina 0.1%,
 revelador = Liebermann-Burchard, fase móvil=n-butanol-ácidoacético-agua (50:10:40)

CARACTERIZACION DE PRINCIPIOS AMARGOS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

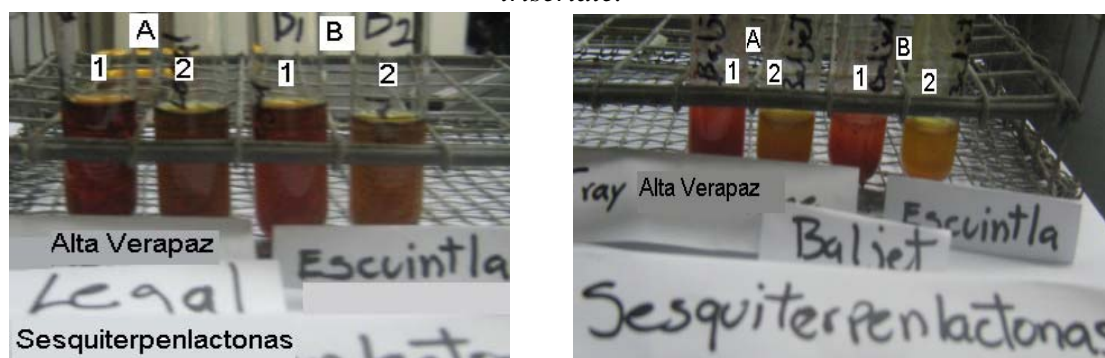


Figura: 26. Pruebas preliminares
 1=rizoma, 2=fronda A=Alta Verapaz, B=Escuintla

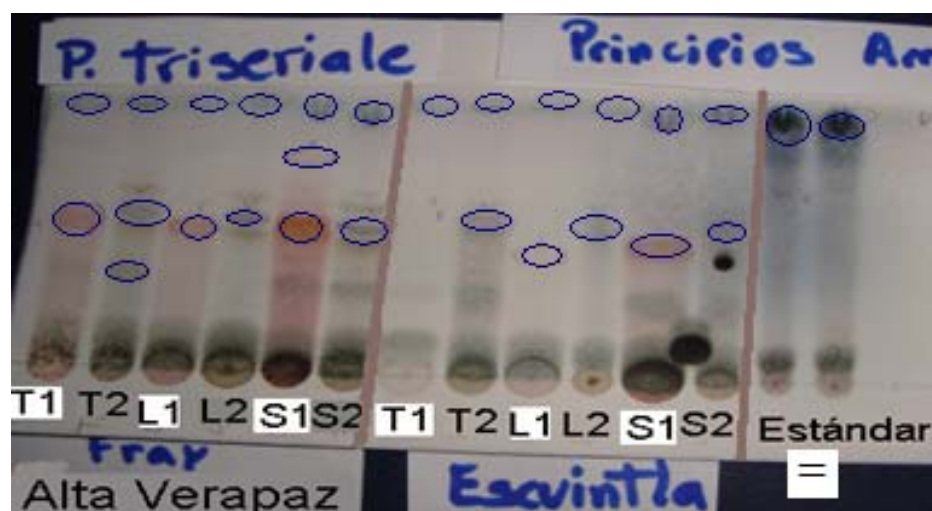


Figura: 27. Cromatografía en capa fina. 1=rizoma, 2=fronda T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco. Estándar = Neurolaena lobata(tres puntas), revelador = vainillina-ácido sulfúrico, fase móvil= acetato de etilo-metanol-agua(39:8:4)

CARACTERIZACION DE GLUCOSIDOS CIANOGENICOS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

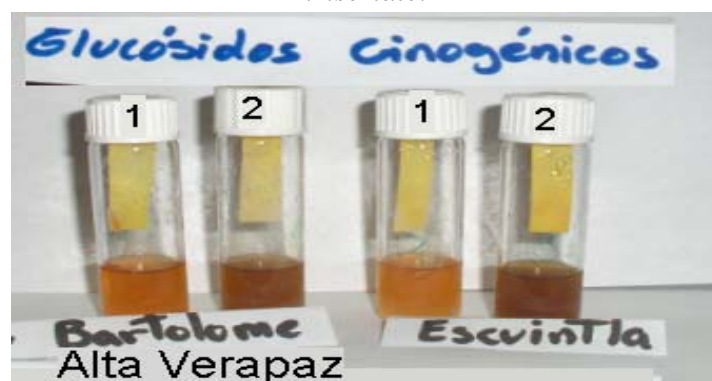


Figura: 28. Pruebas preliminares 1=rizoma, 2=fronda

CARACTERIZACION DE ESTEROLES INSATURADOS EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

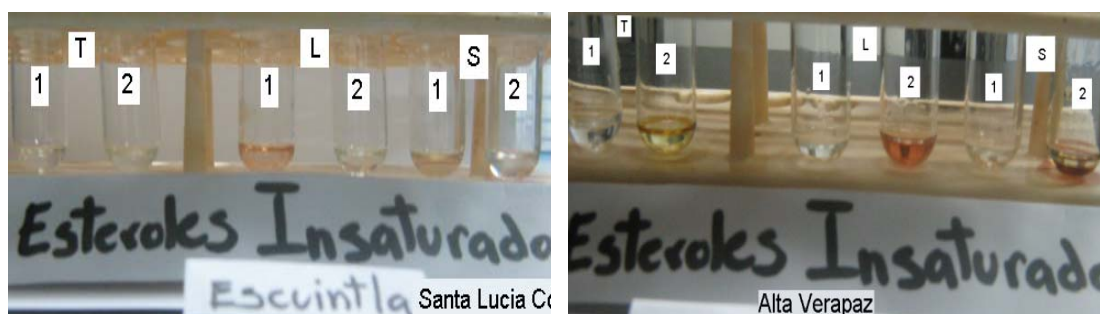


Figura: 29. Pruebas preliminares 1=rizoma, 2=fronda, T=testigo, L=prueba liebermann-burchard, S=Salkowski.

CARACTERIZACION DE ACEITES VOLATILES EN EXTRACTOS DE *P. triseriale*.

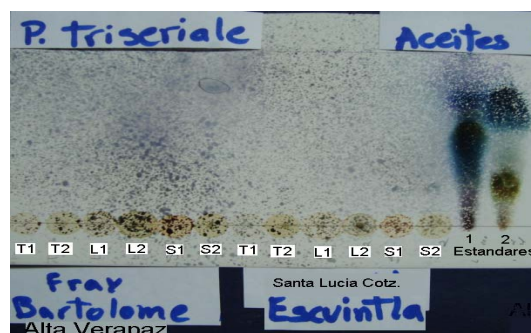


Figura: 30. Cromatografía en capa fina.

1=rizoma, 2=fronda T=tintura, L=extracto acuoso, S=extracto seco.
 Estándar = Limoneno y citral, revelador = vainillina-ácido sulfúrico.
 Fase móvil= tolueno-acetato de etilo (46.5:3.5)

ANEXO No.17: Cuantificación de Flavonoides por el método espectrofotométrico a λ 394nm del espécimen *P. triseriale* (calahuala) colectado en Alta Verapaz y Escuintla.



Figura: 31 Cuantificación de flavonoides.

ANEXO No.18: Capacidad antioxidante mediante Cromatografía en capa fina y mediante métodos espectrofotométricos con DPPH, en los extractos etanólicos obtenidos del espécimen *P. triseriale* (calahuala) colectado en Alta Verapaz y Escuintla.

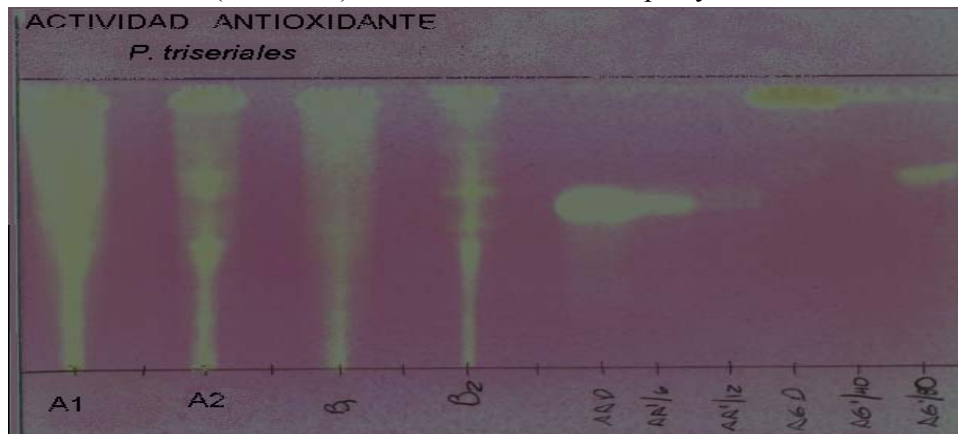


Figura: 32. Cromatografía en capa fina.

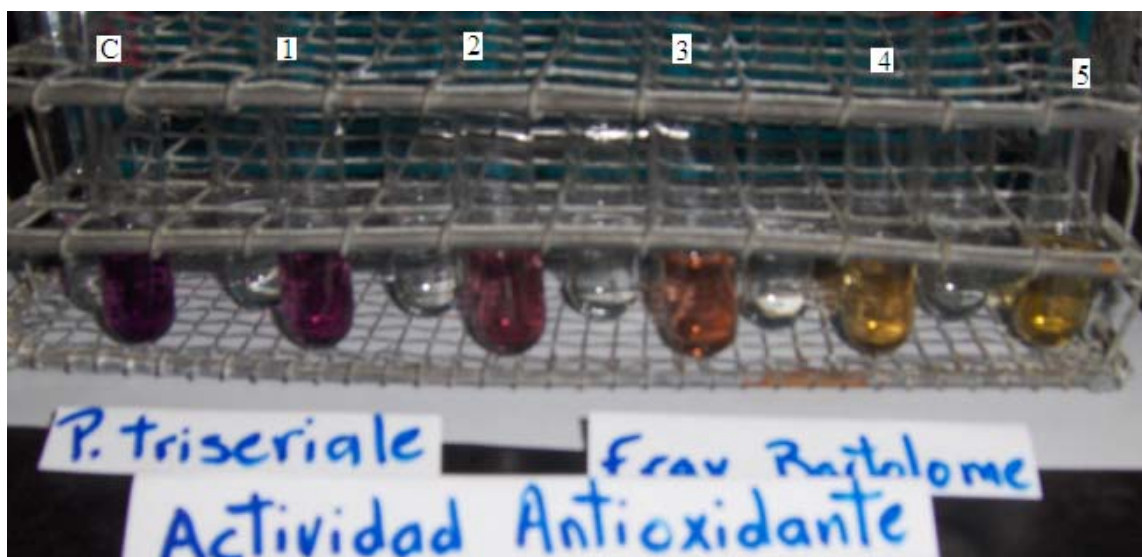


Figura 33. Espectrofotométrico a $\lambda 517\text{nm}$. C= tubo control (DPPH), 1-5= ver anexo No.8 y 9

ANEXO No.19: Análisis de homocedasticidad para contrastar si varias muestras son homocedásticas (tiene la misma varianza).

Prueba de Levene de variantes de error

F	df1	df2	Sig.
.	15	0	.

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos. . Diseño: muestra + replica

ANEXO No. 20: Prueba post Ho. Indica entre que muestras hay diferencias significativas basado en la prueba de TUKEY.

Tabla 22. Prueba de post HOC: basado en la prueba de tucky para determinar la cuantificación de flavonoides

Muestra	N	Subconjunto		
		1	2	3
A1	4	.84		
B1	4	1.55		
B2	4		3.55	
A2	4			6.99
Sig.		.122	1.000	1.000

Medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en medias observadas.

El término de error medio cuadrático es (Error) = .158

Capacidad antioxidante:

Muestra	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
A1	4	.0610			
B1	4		.1160		
A2	4			.1582	
B2	4				.1948
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en medias observadas.

El término de error medio cuadrático es (Error) = 6.73E-005.