

## CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE FRONDAS Y RIZOMAS DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Phlebodium* PROVENIENTES DE HONDURAS Y GUATEMALA

Sully M. Cruz<sup>1</sup>, Nilka de Solís<sup>2</sup>, Pablo N. Solís<sup>3</sup>, Mahabir P. Gupta<sup>3</sup>, Armando Cáceres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; <sup>2</sup>Instituto Especializado de Análisis y

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN), Universidad de Panamá, Panamá

### RESUMEN

El complejo calahuala son especies de la familia Polypodiaceae, (*Phlebodium pseudoaureum* y *P. decumanum*) utilizadas comúnmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias, cardíacas, renales, reumatismo, diabetes, hipertensión, tópicamente se usa en psoriasis, eczema, úlceras y como protector solar.

Se ha demostrado por pruebas farmacológicas actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora, fotoprotectiva, y estimuladora de la actividad cerebral.

En el presente trabajo se comparó el perfil cromatográfico de extractos de frondas y rizomas de *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* mediante cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el objetivo de determinar diferencias fitoquímicas entre las especies y proponer algunas moléculas que pudieran usarse para estandarizar sus extractos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en HPLC se determinó que los extractos de frondas y rizomas de *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* presentan diferencias fitoquímicas significativas, demostrándose mayor cantidad de metabolitos en las frondas, en las cuales se identificó ácido clorogénico en *P. decumanum* y ácido caféico en *P. pseudoaureum*. Por TLC se evidencian como metabolitos característicos, la presencia de flavonoides en las frondas y la de saponinas en los rizomas.

### INTRODUCCION

Con el nombre de calahuala se designan varias especies de helechos de la familia Polypodiaceae (1), distribuidas en Mesoamérica, donde las más comúnmente utilizadas son *Phlebodium pseudoaureum* y *P. decumanum* para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias, cardíacas, renales, reumatismo, diabetes e hipertensión. Tópicamente se usa en psoriasis, eczema, úlceras y como protector solar (2,3).

Entre las actividades demostradas farmacológicamente se mencionan: Actividad antiinflamatoria *in vitro* por inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF) (4,5,6); acción inmunomoduladora medida por proliferación con Con A (2); actividad fotoprotectiva contra daño celular por rayos UV (7); inducción de hipoactividad cerebral por variación en los niveles de IL-1 $\beta$  hipotalámica y actividad diurética (8). Diversas preparaciones han sido utilizadas en desórdenes inmunológicos (dermatitis atópica, psoriasis, vitiligo) y procesos neurodegenerativos (Alzheimer) (9,12-14). El rizoma de *P. pseudoaureum* contiene esteroides, taninos, triterpenos, flavonoides, y ácidos orgánicos (11,15).

De estos helechos se usa principalmente el rizoma, sin embargo estudios recientes demuestran que las frondas podrían tener efecto farmacológico y su obtención es más ecológica que la producción de rizomas.

### METODOLOGÍA

#### Muestras:

Se analizaron rizomas y frondas de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum* provenientes de Honduras y Guatemala. Las muestras de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum* provenientes de Honduras se obtuvieron de cultivos establecidos en las cercanías del Lago de Yojoa; las muestras de *P. pseudoaureum* provenientes de Guatemala se obtuvieron de diversas poblaciones silvestres del Altiplano y un espécimen cultivado en el departamento de Guatemala.

Todas las especies se secaron a la sombra, se molieron y se prepararon extractos etanólicos al 70% por percolación que se concentraron en rotaevaporador.

#### Cromatografía en capa fina (TLC)

Fase móvil 1: cloroformo, metanol, agua (14:6:1), detector ácido sulfúrico 5%.

Preparación de la muestra: los extractos de frondas y rizomas de *P. pseudoaureum* se disolvieron en etanol al 70%, a una concentración de 2, 5, y 10 mg/mL.

Preparación de estándares: 1 mg/mL en metanol.

Fase móvil 2: tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico (50:40:10), detector ácido sulfúrico 5%.

Preparación de la muestra: los extractos de frondas y rizomas de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum* se disolvieron en etanol al 70%, a una concentración de 10 mg/mL.

Preparación de los estándares: 1 mg/mL en metanol. Fase móvil 3: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua, detector: reactivo de productos naturales (difenilboriloxietilamina/policetilenglicol)

Preparación de la muestra: los extractos de frondas y rizomas de *P. pseudoaureum* y *P. decumanum* se disolvieron en etanol al 70%, a una concentración de 10 mg/mL.

Preparación de estándares: 1 mg/mL en metanol.

Se realizó una hidrólisis ácida, utilizando ácido clorhídrico 4N durante 1 hora, se extrajo con acetato de etilo y se analizaron los extractos por TLC utilizando la fase móvil 3 y el detector de productos naturales.

Se realizó una identificación utilizando la metodología descrita por ASAC Pharmaceutical.

Fase móvil: ácido acético glacial, agua, metanol y acetato de etilo (10:15:20:50), detector: ácido sulfúrico al 5% en etanol.

Preparación de los extractos: disueltos en agua (10 mg/mL).

Preparación de estándar: lactosa en agua (0.5 mg/mL).

#### HPLC:

#### Químicos:

Se utilizaron diferentes disolventes y ácidos tales como: cloroformo, tolueno, acetato de etilo, metanol, etanol, ácido sulfúrico, ácidos fórmico, acético y clorhídrico grado reactivo (Merck), para el desarrollo de la TLC y acetonitrilo, metanol grado HPLC y ácido fosfórico 0.3% (Merck) para el perfil cromatográfico por HPLC.

Los estándares utilizados fueron: quercetina, rutina y ácidos caféico, clorogénico y p-cumárico disueltos en metanol (0.1 mg/mL), también se realizó una disolución de los estándares en agua a partir de una solución madre metanólica, hasta obtener una concentración final de 0.1 mg/mL.

#### Condiciones del Equipo.

Los análisis se realizaron utilizando un HPLC Shimadzu SCL-10 A VP y un detector con arreglo de diodos SPD-M 10 A VP. La columna utilizada fue una Supelcosil LC-18-DB [(5-9164) 266195AA] de 30 cm x 4.0 mm de 5 mm. Longitud de onda de

210 nm. Fase móvil una mezcla de 3 volúmenes de acetonitrilo, 72 volúmenes de agua y 25 volúmenes de disolución de ácido fosfórico al 0.3% en agua, a un flujo de 0.85 mL/minuto, durante 25 minutos. También se realizó una prueba en gradiente de 60 minutos.

#### Perfil cromatográfico por HPLC

Se inyectaron 20 mL de extractos etanólicos (60 mg/mL). Fase móvil: acetonitrilo, agua, ácido fosfórico 0.3% (3:72:25), flujo de 0.85 mL por minuto, detector ajustado a 210.

#### RESULTADOS

En el análisis realizado por TLC utilizando la FM1 se observa que en las frondas coincide con el Rf presentado por el ácido clorogénico aunque, con una fluorescencia muy tenue.

FM2 no se observa diferencia entre las especies utilizando esta fase móvil y coincide la banda superior de los extractos con el ácido caféico, más marcado en las frondas.

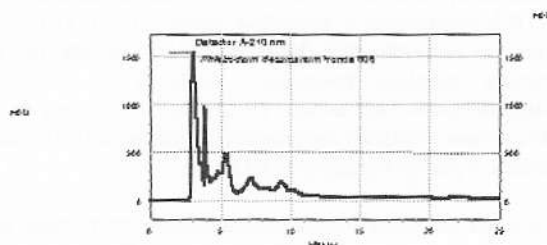
FM 3 se presenta mayor número de bandas en el extracto de *P. pseudoaureum* fronda y coincide el Rf con el ácido clorogénico.

Al realizar la hidrólisis coinciden las bandas presentadas en las frondas con el ácido clorogénico, aunque su coloración es muy tenue.

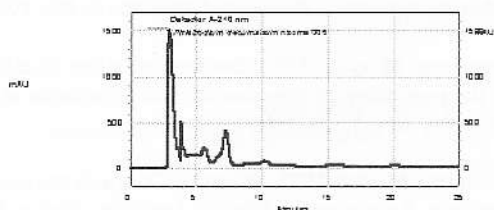
Utilizando la metodología descrita por ASAC Pharmaceutical el cromatograma obtenido presenta dos manchas grises situadas por encima de la mancha obtenida con el estándar y una mancha de color crema situada por debajo de ésta.

En el análisis realizado por HPLC se obtuvieron los siguientes cromatogramas:

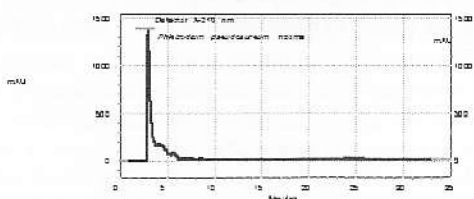
*P. decumanum* fronda



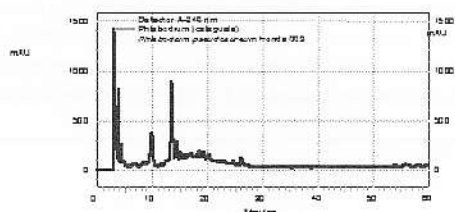
*P. decumanum* rizoma



*P. pseudoaureum* rizoma



*P. pseudoaureum* fronda



### CONCLUSIONES

Los perfiles cromatográficos de frondas y rizomas de *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* presentan diferencias mediante el análisis por HPLC.

Se presenta mayor cantidad de metabolitos en las frondas que en los rizomas de ambas especies de acuerdo a los cromatogramas obtenidos.

En los extractos del rizoma de *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* no corresponden los tiempos de retención, ni los espectros a los de los estándares utilizados, por lo que no fue posible identificar los constituyentes presentes.

En el extracto de la fronda de *P. decumanum* se identificó dentro de sus componentes el ácido clorogénico el cual corresponde con el tiempo de retención y su espectro.

En el extracto de las frondas de *P. pseudoaureum* se identificó el ácido caféico dentro de su composición.

### RECOMENDACIONES

Continuar con el análisis cromatográfico, y conseguir mayor cantidad de patrones para identificar los constituyentes presentes en los extractos.

Purificar los extractos para aislar los flavonoides e identificarlos mediante HPLC y TLC.

Buscar los marcadores propuestos en muestras de diferentes procedencias.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del proyecto "Desarrollo de Fitoterápicos" financiado por AICD/OEA y del proyecto PROMFI financiado por el CYTED (Subprograma X), así como de Jorge Mendoza y Giovanna Ruiz de EXVECAN, Honduras, quienes proveyeron varios de los extractos de este estudio

### REFERENCIAS

1. Moran, R. 1996. Polypodiaceae. En: Davidse, G. *et al.* (Eds.) *Flora Mesoamericana*. Vol 5. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum. México, p. 130-133.
2. Cáceres, A. 1996. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Ed. Universitaria. Guatemala, po. 287-289.
3. PLANTER, 1989. *Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña*. San Salvador, Universidad de El Salvador, 468 p.
4. Manna, S.K. *et al.* 2003. Calagualine inhibits nuclear transcription factors-kB activated by various inflammatory and tumor promoting agents. *Cancer Letters*. (190) 171-182.
5. Punzon, C. *et al.* 2003. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *Internat. Immunopharmacol.* 3: 1293-1299.
6. Alonso Lebrero, J.L. *et al.* 2003. Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* (70) 31-37.
7. Anton, A. *et al.* 1992. Effects of anapsos on behaviour and brain cytokines in rats. *Ann. Psychiat.* 3:329-341.

8. Alcaraz, M.V. *et al.* 1999. An extract of *Polypodium leucotomos* appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model. A pilot study. *Photodermatol, Photoimmunol. & Photomed.* 15(3-4), 120-6.
9. Gomez, A.J. *et al.*, 2001. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 1487-1494.
10. Horvath, A. *et al.* 1975. Triterpenes from rhizomes of *Polypodium leucotomos*. *Phytochemical reports. Phytochem.* 14: 1641-1642.
11. Lui, B. *et al.* 1998. Quantitative determination of anti-inflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization. *Phytomed.* 5:187-194.
12. Sempère-Ortells, J.M. *et al.* 2002. Anapsos (*Poly-podium leucotomos*) modulates lymphoid cells and the expresión of adhesión molecules. *Pharmacol. Res.* 46 (2):185-190.
13. Tuominen, M. *et al.* 1991. Enhancing effect of calaguala on the prevention of rejection on skin transplants in mice. *Phytothe. Res.* 5:234-236.
14. Tuominen, M. *et al.* 1992. Effects of Calaguala and an Active Principle, Adenosine, on Platelet Activating Factor. *Planta Med.* 58:307-310.
15. Vasagne, M. *et al.* 1997. The flavonoid constituents of *Polypodium* species (Calaguala) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta Med.* 63:511-517.