



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES EN *Notholaena sulphurea*
(PTERIDACEAE), EN FUNCIÓN DE VARIANTES EDÁFICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

PALACIOS ROBLEDO KARLA PATRICIA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

ASESOR INTERNO:

RAMIRO RÍOS GÓMEZ

2015



México, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Botánica	2
2.1.1. Familia Pteridaceae	2
2.1.2. Descripción botánica del género <i>Notholaena</i>.	3
2.1.3. <i>Notholaena sulphurea</i> (Cav.) J. Sm.	3
2.2. Metabolitos secundarios.	5
2.2.1. Flavonoides.	8
2.2.2. Funciones de los flavonoides en las plantas.	9
2.2.3. Flavonoides identificados en el género <i>Notholaena</i>.	12
2.3. Adaptaciones de los helechos a zonas áridas.	13
2.3.1. Adaptaciones a la sequía.	13
2.3.2. Respuestas a la desecación.	14
2.3.3. Fotoinhibición y fotoprotección.	14
2.4. Importancia del suelo para el desarrollo de las plantas.	14
3. JUSTIFICACIÓN.	18
4. HIPÓTESIS.	18

5. OBJETIVOS.	19
5.1. Objetivo general.	19
5.2. Objetivos particulares.	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	19
6.1. Colecta e identificación del material vegetal.	19
6.2. Obtención de extractos.	21
6.3. Identificación preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) de los flavonoides presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>Notholaena sulphurea</i>	21
6.4. Identificación y cuantificación de flavonoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de los extractos hidroalcohólicos de <i>Notholaena sulphurea</i>.	21
6.5. Análisis químico de los componentes del suelo.	22
6.5.1 pH.	22
6.5.2 Materia orgánica (MO).	23
6.5.3 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).	23
6.5.4 Determinación de sulfatos (SO₄²⁻).	23
6.5.5 Determinación de nitrógeno total.	23
6.5.6 Determinación de potasio y magnesio.	24
6.5.7 Determinación de fósforo.	24
6.5.8 Determinación de hierro y zinc.	25
6.6. Análisis estadístico.	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	26
7.1. Análisis fitoquímico.	26
7.1.1. Rendimiento de los extractos.	26
7.1.2. Detección de flavonoides por CCF.	27

7.1.3. Análisis de flavonoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para determinar su concentración.	28
7.2. Análisis estadístico.	31
7.2.1 Correlación de Spearman.	31
7.2.2 Análisis de varianza.	33
7.3. Análisis fisicoquímico del suelo.	35
7.4. Discusión de resultados.	36
7.4.1 pH.	36
7.4.2. Conductividad eléctrica (CE).	36
7.4.3. Materia orgánica (MO).	37
7.4.4. Nitrógeno total (NH_4^+ y NO_3^-).	38
7.4.5. Zinc (Zn).	38
7.4.6. Potasio (K^+).	39
7.4.7. Calcio (Ca^{2+}).	39
7.4.8. Fósforo (P).	40
7.5. Discusión final.	40
8. CONCLUSIONES.	41
9. BIBLIOGRAFÍA.	42
9.1 Recursos electrónicos.	48
10. ANEXO.	49

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Flavonoides identificados en la harina de <i>Notholaena</i>.	12
Cuadro 2. Función de los nutrimentos en las plantas.	16
Cuadro 3. Descripción de las zonas de recolecta.	20
Cuadro 4. Rendimiento flavonoides totales en los extractos de <i>N. sulphurea</i>.	26
Cuadro 5. Concentración de flavonoides en <i>Notholaena sulphurea</i> colectado en cuatro localidades.	30
Cuadro 6. Correlación de Spearman de los flavonoides vs parámetros del suelo.	32
Cuadro 7. Análisis de varianza de los flavonoides vs parámetros edáficos	34
Cuadro 8. Análisis físicos y químicos de las muestras de suelo de localidades donde se desarrolla <i>N. sulphurea</i>.	35
Cuadro B1. Criterios de evaluación del pH.	49
Cuadro B2. Criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en su conductividad eléctrica.	49
Cuadro B3. Interpretación del contenido de materia orgánica en el suelo.	50
Cuadro B4. Criterios para evaluar un suelo con base en su contenido nitrógeno total.	50
Cuadro B5. Clasificación de la fertilidad de suelos de acuerdo a la CIC.	51
Cuadro B6. Clasificación de los niveles de calcio, magnesio y potasio	51
Cuadro B7. Interpretación de resultados de Fósforo.	52
Cuadro B8. Clasificación de los niveles de Hierro y Zinc.	52
Cuadro B9. Nutrientes esenciales para las plantas. Contenido total en el suelo (Plantas silvestres).	52

Índice de figuras.

Fig 1. Mapa de la República Mexicana que muestra los estados donde se ha registrado <i>N. sulphurea</i>.	4
Fig. 2. <i>Notholaena sulphurea</i> E. Habito. F. Escama del rizoma. G. Detalle de la hoja.	5
Fig. 3. Principales vías biosintéticas en la producción de compuestos secundarios.	6
Fig. 4. esqueleto básico de un flavonoide.	8
Fig. 5. Clasificación de flavonoides.	10
Fig. 6. Flavonoides identificados en la familia Pteridaceae.	13
Fig.7. <i>Notholaena sulphurea</i> en su hábitat natural.	20
Fig. 8. Detección de flavonoides por Cromatografía de Capa Fina (CCF) de los extractos hidroalcohólicos de <i>N. sulphurea</i>.	27
Fig. 9. Cromatogramas donde se observa la detección de flavonoides por CLAR de los extractos hidroalcohólicos de <i>N. sulphurea</i>.	29

RESUMEN

México tiene una de las más amplias variedades de helechos del mundo. *N. sulphurea* es una especie adaptada a zonas xéricas; sus células epidérmicas presentan tricomas en la lámina que secretan exudados (farina). Dicha farina está constituida químicamente por flavonoides como chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, dihidroflavonoles, flavonas y flavonoles. La síntesis de flavonoides en las hojas está estrechamente relacionada con la protección contra los efectos estresantes ocasionados por la luz UV, la protección contra el ataque de depredadores, soportar largas temporadas de sequía, entre otros. La concentración de dichos flavonoides varía dependiendo de factores climáticos y edáficos. El suelo es el medio de desarrollo de la raíz de las plantas y con excepción del C, H, O y algo de nitrógeno, las plantas dependen del suelo para adquirir los demás nutrimentos esenciales y el agua. El suelo aporta los nutrimentos requeridos por la planta de forma natural para su crecimiento y la disponibilidad de estos está influenciada por factores como el pH, el contenido de materia orgánica, la actividad de los microorganismos y el contenido de agua. En el presente estudio, el objetivo fue determinar la concentración de flavonoides en *Notholaena sulphurea* colectados en diferentes localidades con variantes climáticas y edáficas. Las frondas de cada uno de los especímenes se secaron a temperatura ambiente y se molieron para obtener el extracto hidroalcohólico (70:30). El análisis de los flavonoides en cada extracto se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Previamente se construyeron curvas estándar para identificar y cuantificar Kaempferol, quercetina, rutina, luteolina, naringenina, isoquercetina y naringina en cada una de las muestras analizadas. Se tomaron muestras compuestas del suelo donde se desarrollaba cada helecho. Posteriormente se evaluó el pH, materia orgánica (MO), capacidad de intercambio catiónico (CIC) sulfatos (SO_4^{2-}), nitrógeno total (NH_4^+ y NO_3^-), potasio (K^+), fósforo (PO_4^{3-}), magnesio (Mg^{2+}), Hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}) y zinc (Zn^{2+}). Con fines estadísticos, cada una de las pruebas se realizó por triplicado; para encontrar la relación entre los factores climáticos, las propiedades del suelo y la composición de flavonoides en las diferentes poblaciones de *N. sulphurea*. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas sucesivas. La naringina no se identificó en ningún ejemplar, por otro lado la naringenina fue el flavonoide con más alta concentración. De acuerdo a los coeficientes de correlación realizados se encontró que algunos parámetros fisicoquímicos del suelo influyen significativamente en la concentración de los flavonoides detectados en *N. sulphurea*, donde el ejemplar de Hierve el Agua, Oaxaca mostró una mayor concentración de estos compuestos. Por otro lado el helecho colectado en la localidad de Tepezala, Aguascalientes tuvo la menor concentración. En este sentido la composición de flavonoides en las frondas de *N. sulphurea* se ve afectada por una serie de variaciones climáticas y edáficas, por lo tanto, la concentración de estos compuestos de los helechos en cada localidad fue diferente.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se estima la existencia de 10,000 especies de helechos en el mundo, concentradas en áreas tropicales con diversidad de ambientes. México tiene una de las más amplias variedades de helechos del mundo, pues está compuesta aproximadamente por 124 géneros y 1,008 especies y 16 infraespecies. Del total de especies, 186 son endémicas (Mickel y Smith, 2004).

Entre los helechos, los hay terrestres, rupícolas, epífitos, acuáticos y arborescentes. Por lo general se encuentran en zonas húmedas y umbrosas como bosques tropicales, de niebla y templados. Sin embargo, algunos taxa están bien adaptados a zonas xéricas como los géneros *Argyrochosma*, *Cheilanthes* y *Notholaena*. Las células epidérmicas de algunas especies de estos géneros presentan tricomas en la lámina que secretan exudados (farina). Dicha farina está constituida químicamente por flavonoides como chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, dihidroflavonoles, flavonas y flavonoles. Estos compuestos han sido identificados en forma de agliconas, glicosidos, acetilados, hidrolizados o unidos a ésteres, éteres o metilos (Wollenweber y Schneider, 2000).

Los flavonoides son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios presentes principalmente en los vegetales y se han reportado más de 10, 000 estructuras diferentes de estos. La diversidad estructural refleja el grado de polimorfismo genético y la expresión selectiva de diferentes genes que codifican a enzimas importantes en la producción de flavonoides específicos en respuesta a diferentes estímulos ambientales. La concentración de dichos compuestos en las plantas varía cualitativa y cuantitativamente entre órganos, en las diferentes etapas de su desarrollo, época del año, entre otros. (Hare, 2002). Así también, la síntesis de flavonoides está relacionada como un mecanismo de defensa de la planta contra algún tipo de estrés, por lo tanto, estos compuestos desempeñan funciones ecológicas importantes, tales como actividad antibactericida, antifúngico, antioxidante, antiherbivoría y actúan también, como filtros ultravioleta y generando resistencia a la toxicidad por metales pesados (Chaves *et al*, 2001; Kidd *et al.*, 2001).

La síntesis de flavonoides en las hojas está estrechamente relacionada con la protección contra los efectos ocasionados por la luz UV, la fotoinhibición, protección contra el ataque de depredadores y organismos patógenos y para soportar temporadas largas de sequía. (Chaves *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1997; Hietz, 2010).

La cantidad de flavonoides se ve influenciada entre otros factores por el suelo. El suelo es un producto natural formado a partir de roca meteorizada por la acción del clima y de los organismos vivos, conformado de una mezcla de materiales minerales y orgánicos capaz de soportar la vida vegetal. Proporciona a las plantas elementos esenciales para su crecimiento. Entre ellos, los principales son el soporte mecánico, los nutrimentos, el agua y el oxígeno para la respiración de las raíces. Solo una pequeña parte de cada nutrimento presente en el suelo se encuentra disponible para las plantas, el resto se halla firmemente ligado a la fracción mineral y a la materia orgánica lo que los hace inaccesibles mientras no sean afectados por procesos de descomposición (Thomson y Troeh, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1. Botánica

2.1.1. Familia Pteridaceae

La familia Pteridaceae está constituida por las subfamilias: Ceratopteridoideae, Cryptogrammoideae, Cheilantheoideae, Pteridoideae y Vittarioideae. La subfamilia Cheilantheoideae está formada por aproximadamente 278 especies, algunas de las cuales tienen preferencia por habitar ambientes áridos o semiáridos (Christenhusz, 2011; Eiserhardt *et al.*, 2011). Especies xerófitas-epipétricas de los géneros *Cheilanthes*, *Notholaena*, *Pellaea* han desarrollado una gran variedad de adaptaciones morfológicas para sobrevivir en hábitat áridos (Rothfels *et al.*, 2008).

2.1.2. Descripción botánica del género *Notholaena*.

El género *Notholaena* R.Br. está constituido por aproximadamente 30 especies en el mundo (ninguna cultivada), de las cuales 24 se encuentran en México.

Hierbas terrestres o epipétricas. **Rizomas** corto-rastreros a erectos, escamosos, las escamas bicoloras o concoloras. **Hojas** monomorfas, fasciculadas; **peciolos** $\frac{1}{4}$ - $\frac{3}{4}$ del largo de la hoja, teretes o acanalados adaxialmente, pardo-amarillentos a negruzcos, lustrosos u opacos, glabros, pilosos o escamosos, a veces farinosos, con un haz vascular en la base; **láminas** 1-pinnadas a 2-pinnado-pinnatífidas, lineares, linear-lanceoladas, ovado-lanceoladas, lanceolado-elípticas, oblongo-lanceoladas, ovado-pentagonales, pentagonales o elípticas, coriáceas o subcoriáceas; **raquis** terete, acanalado o aplanado adaxialmente, pardo-amarillento a negruzco, glabro, puberolento, escamoso, piloso, farinoso o sin harina; pinnas sésiles, adnatas a corto-pecioululadas, equiláteras o inequilateras, haz glabro o piloso, glandular farinoso o sin harina, envés blanco o amarillo, farinoso, a menudo escamoso y/o piloso, **venas** libres, simples o ramificadas, los extremos claviformes. Soros ausentes; **indusios** ausentes, rara vez el margen reflexo, similar en textura al resto de la lámina; **esporangios** dispuestos cerca del margen, en los extremos de las nervaduras, cubiertos o no por escamas; **esporas** 32 o 64 por esporangio, rara vez 16, tetraédricas, globosas, negruzcas, granuladas a crestadas (Velázquez, 2010).

2.1.3. *Notholaena sulphurea* (Cav.) J. Sm.

Se distribuye en México y Centroamérica. En México se ha registrado en los estados de Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Puebla y Oaxaca (Figura 1).



Fig 1. Mapa de la República Mexicana que muestra los estados donde se ha registrado *N. sulphurea*.

De acuerdo con Velazquez (2010), *N. sulphurea* son hierbas terrestres. Rizomas 2.0 mm diámetro, corto-postradas, escamas 2.0-3.0 mm largo, linear-lanceoladas, margen angosto, pardo, glandular-ciliado, el centro pardo oscuro a negro, esclerosado, bicoloras, caedizas. Hojas 9.0-14.0 cm largo, 3.2-7.0 cm ancho; pecíolos 3/4 del largo de la hoja, teretes, negruzcos, opacos, glabros, algunas escamas basales ovado-lanceoladas, 2.0 mm largo, 1.0 mm ancho, la región central esclerosada, angosta, margen pardo, glandular-ciliado, caedizas; láminas 1-pinnadas a 1-pinnado-pinnatífidas, pentagonales, subcoriáceas; raquis glabro, cilíndrico; pinnas 1-4 pares, el primer par de pinnas suprabasales 1-pinnado-pinnatífido más pequeño que las basales pero más grande que las pínulas subsecuentes, inequiláteras, la pínula basal basiscópica más grande que las demás, haz glabro o con glándulas farinosas esparcidas, envés densamente blanco a amarillo- farinoso, venas simples a 2 bifurcadas. Esporangios visibles; esporas 32 o 64 por esporangio, pardas a negras (Figura 2).

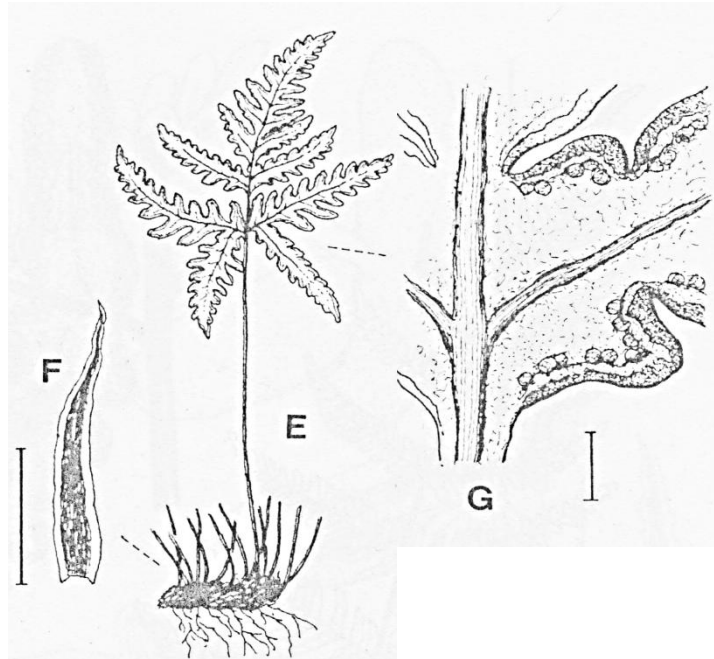


Fig. 2. *Notholaena sulphurea* E. Habito. F. Escama del rizoma. G. Detalle de la hoja (Mickel y Smith, 2004).

2.2. Metabolitos secundarios.

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo, estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales.

Dichos compuestos se caracterizan por tener una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

El metabolismo primario provee un cierto número de pequeñas moléculas que son empleadas como materiales precursores de todas las vías metabólicas secundarias importantes (Seigler, 1981).

El amplio rango de características químicas de los metabolitos secundarios deriva de un grupo de precursores sorprendentemente reducido. Según Anaya (2003), existen tres precursores principales de los metabolitos secundarios (Figura 3):

1. El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles.
2. Los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides, y los antibióticos peptídicos incluyendo las penicilinas y las cefalosporinas.
3. El acetato, precursor de los poliacetilenos, las prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides), a través de dos caminos biosintéticos totalmente separados.

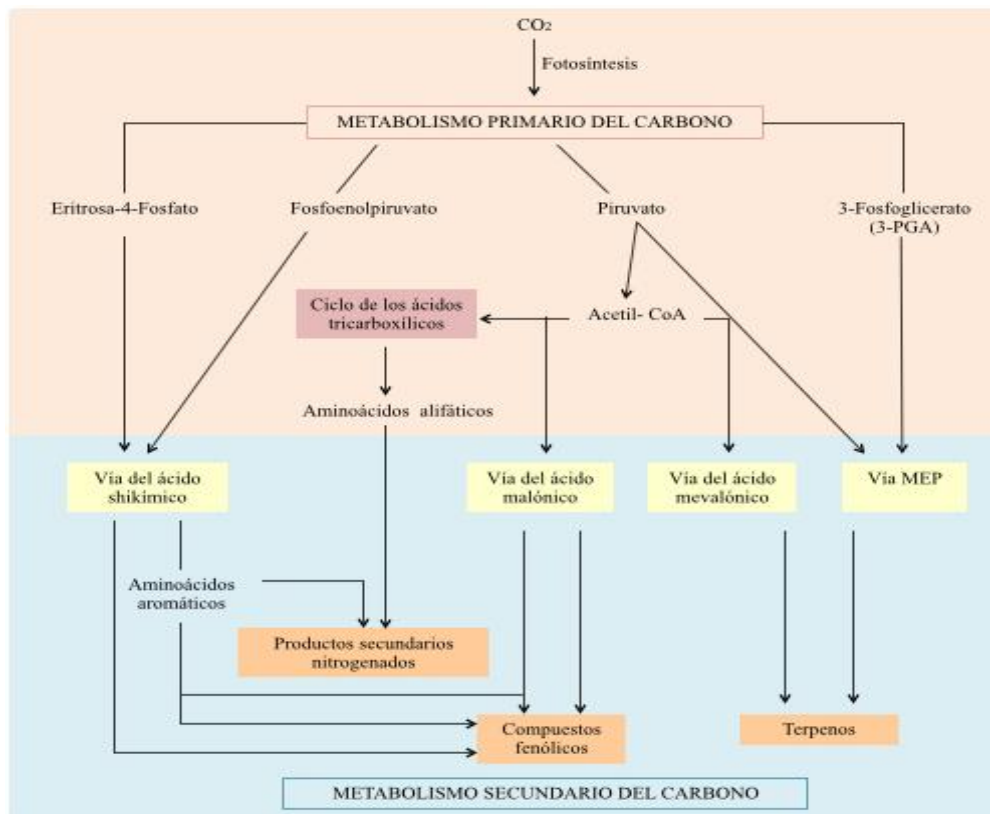


Fig. 3. Principales vías biosintéticas en la producción de compuestos secundarios (Taiz y Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales (Anaya, 2003):

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos. Cumarinas, **flavonoides**, lignina y taninos.
- Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides

La estrecha relación que tienen los metabolitos secundarios con el metabolismo primario, de los grupos químicos que pueden formar parte de su molécula y los cambios que esta puede experimentar, y considerando el número y clase de precursores, enzimas y coenzimas que intervienen en su síntesis, se puede entender que numerosos factores físicos, químicos y biológicos, externos e internos pueden afectar su producción (Anaya, 2003).

Entre los factores ambientales más importantes se encuentran (Anaya, 2003; Bryant *et al.*, 1995):

- Radiación.
- Intensidad de la luz.
- Edad, estado fenológico y órgano de la planta.
- Deficiencias minerales (nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, boro y calcio)
- Condiciones físicas y químicas del sustrato.
- Temperatura.
- Estrés hídrico.
- Interacciones bióticas.
- Contaminantes

2.2.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios presentes principalmente en los vegetales y se han reportado más de 10, 000 estructuras diferentes de

estos (Ferrer, *et al.*, 2008; Williams y Grayer, 2004). La síntesis de los flavonoides tiene lugar en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares, esto se lleva a cabo a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y p-hidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Escamilla, *et al.*, 2009).

Los flavonoides, poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos, la mayoría se presentan como moléculas de tipo C₆-C₃-C₆ con dos anillos aromáticos (A y B) y un heterociclo (C) con oxígeno (Figura 4). Se conocen diferentes clases de flavonoides, los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidas a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos. Es común que se encuentren mezclas de agliconas y glicósidos, siendo estos últimos los más frecuente (Lock, 1994).

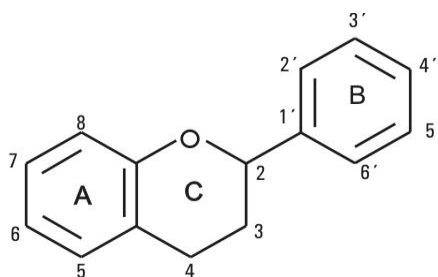


Fig. 4 esqueleto básico de un flavonoide

Los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base (Figura 5); así, cuando la estructura posee un carbonilo en la posición 4, el esqueleto se denomina **flavanona**, cuando además se hidroxila en la posición 3 se denomina **dihidroflavonol**, cuando en este último se reduce el grupo carbonilo de la posición 4 se denomina **flavan- 3,4- diol**. La adición de un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 de las flavanonas y de los dihidroflavonoles origina los esqueletos de **flavona** y **flavonol**

respectivamente. Por otro lado, el esqueleto de las **antocianinas** posee un sistema conjugado de dobles ligaduras que le confieren características coloridas típicas. Cuando el anillo C se une a través del carbono 3 o 4 del esqueleto general se forman **isoflavonas** y **neoflavonas** respectivamente. Cuando el esqueleto de 15 átomos no forma un heterociclo se conoce como **chalcona**; cuando el heterociclo C formado es de 5 miembros se denomina **aurona** (Romo, 2006).

Algunos flavonoides se encuentran más ampliamente distribuidos en las plantas que otros, siendo más comunes las flavonas y flavonoles y menos abundantes las isoflavonas, chalconas y auronas (Lock, 2001).

2.2.2. Funciones de los flavonoides en las plantas

Existe una estrecha relación entre la síntesis de flavonoides y el estrés en las plantas. Los factores estresantes pueden ser bióticos y abióticos, tales como animales, herbívoros, hongos, virus, bacterias, temperaturas extremas, alta incidencia de luz, radiación ultravioleta, desbalance de nutrimentos minerales, sequia, salinidad, anoxia, exposición al ozono y herbicidas. Dichos factores pueden causar que la concentración de flavonoides se incremente en hojas, tallos y raíces.

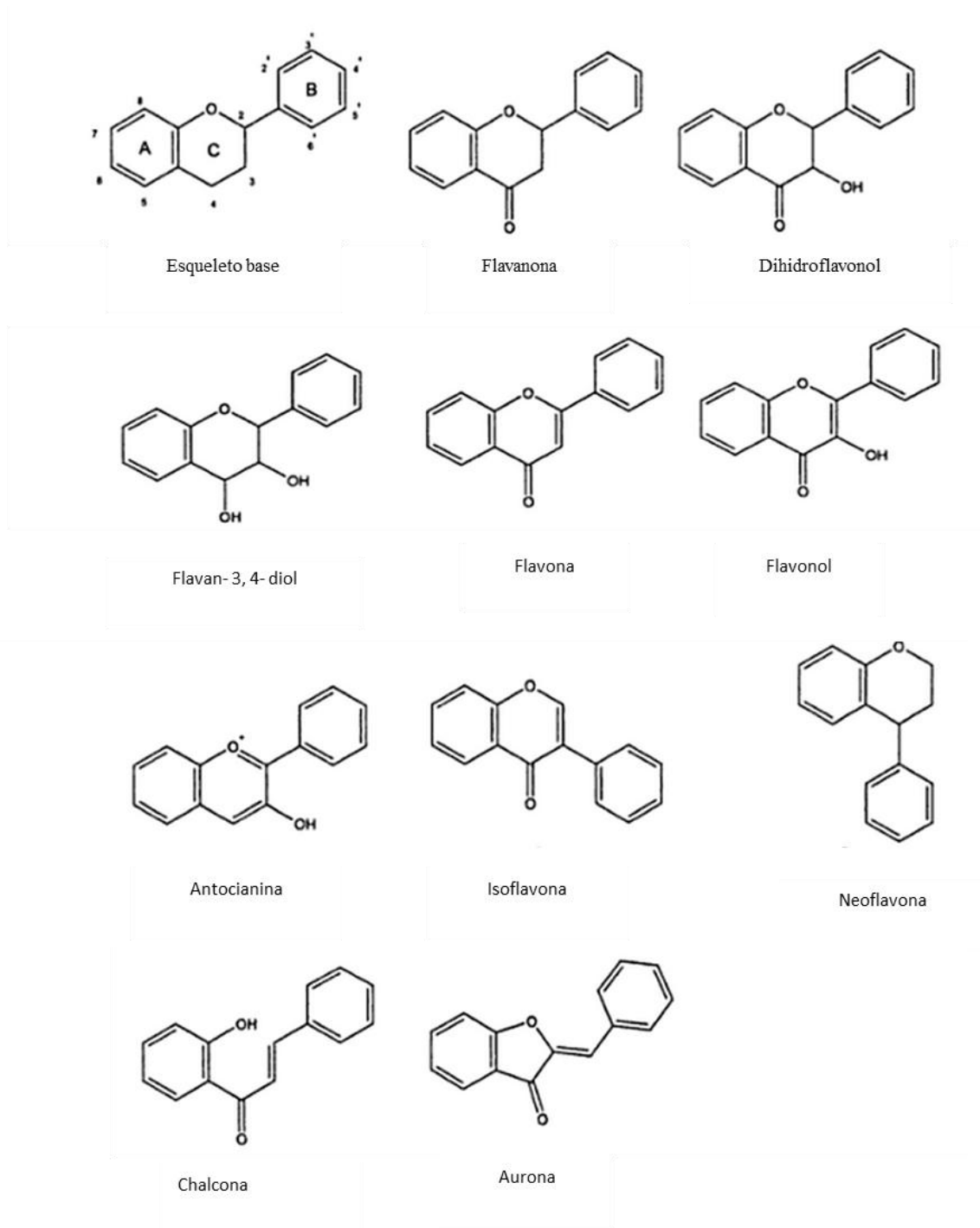


Fig. 5. Clasificación de flavonoides (Romo, 2006)

De acuerdo a Andersen y Markham (2006), los flavonoides cumplen diversas funciones en las plantas tales como:

- Defensa contra ataques de herbívoros y patógenos.
- Protección de la luz ultravioleta; absorben la luz ultravioleta entre 270 y 290 nm y se encuentran en mayor concentración en las células de la epidermis y tricomas para proteger a los tejidos fotosintéticos.
- Fotoprotección; cuando las plantas reciben más energía luminosa de la que pueden usar para la fotoquímica, muestran una disminución en la eficiencia cuántica de la fotosíntesis denominado fotoinhibición.
- Actividad antioxidante; los flavonoides en el citoplasma neutralizan el pH del citoplasma y en la vacuola disipan el exceso de energía absorbida por la luz ultravioleta y actúan como atrapadores de radicales libres.
- Tolerancia a los metales pesados.
- Señalización química como atrayente para la polinización y protección de las semillas ya que los flavonoides contribuyen a mantener la latencia del embrión y evitar daños ocasionados por virus, bacterias y hongos.
- Reproducción sexual de las plantas; algunos flavonoides se acumulan en los órganos masculinos y femeninos de la flor, incluyendo los granos de polen, esto ayuda a regular el desarrollo del tubo polínico.
- Mensajeros químicos; particularmente estas señales son utilizadas en interacciones planta-rizósfera.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente estudiados por su importancia biológica. En varios trabajos se reporta la estrecha relación que existe entre la presencia y concentración de estos compuestos con respecto a factores estresantes bióticos y abióticos. Al respecto, se menciona la síntesis de flavonoides por estrés a radiaciones UV, por deficiencia de nitrógeno y otros minerales en el suelo, por defoliación, por sequía y protección ante plagas (Reay y Lancaster, 2001; Stewart *et al.*, 2001; Laitinen, *et al.*, 2000; Lancaster *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 1993).

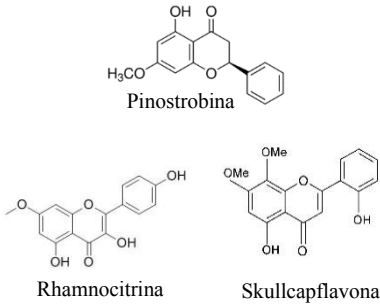
Laitinen, *et al.* (2000) mencionan la variación de tipos y concentraciones de flavonoides en diferentes estados fenológicos de la planta.

2.2.3. Flavonoides identificados en el género *Notholaena*.

La mayoría de los estudios realizados sobre la composición de flavonoides en los helechos ha sido enfocada a la identificación de éstos en la harina (sustancia localizada en la superficie abaxial de la fronda), producida por tricomas glandulares; sin embargo son pocos los estudios que hablan sobre la constitución de estos compuestos en toda la fronda. Según Wollenweber y Schneider (2000) la mayoría de los compuestos exudados en *Argyroschisma*, *Cheilanthes* y *Notholaena* son Chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, dihidroflavonoles, flavonas, flavonoles (Cuadro 1). Algunos de estos compuestos presentan en su estructura algunos sustituyentes (ésteres, metilos, hidroxilos, etc.)

Los flavonoides identificados en la familia Pteridaceae (Fig. 6) son: luteolina, apigenina, quercetina y kaempferol tanto libres como glucosilados (Salatino y Prado, 1998).

Cuadro 1. Flavonoides identificados en la harina de *Notholaena*.

Género/especie	Flavonoides	Estructuras
<i>Notholaena</i> sp.	Chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavonas (hidroxiladas y metiladas).	(Fig. 5)
<i>N. sulphurea</i>	Chalconas hidroxiladas, flavanona (pinostrobina), flavonol (ramnocitina), flavona (skullcapflavona o panicolina) y dihidrochalconas acompañadas por metil éteres de kaempferol y apigenina.	 <p>Pinostrobina</p> <p>Rhamnocitrina</p> <p>Skullcapflavona</p>

Salatino y Prado 1998; Wollenweber y Schneider, 2000; Wollenweber 1989; Roitmain *et al.*, 1992

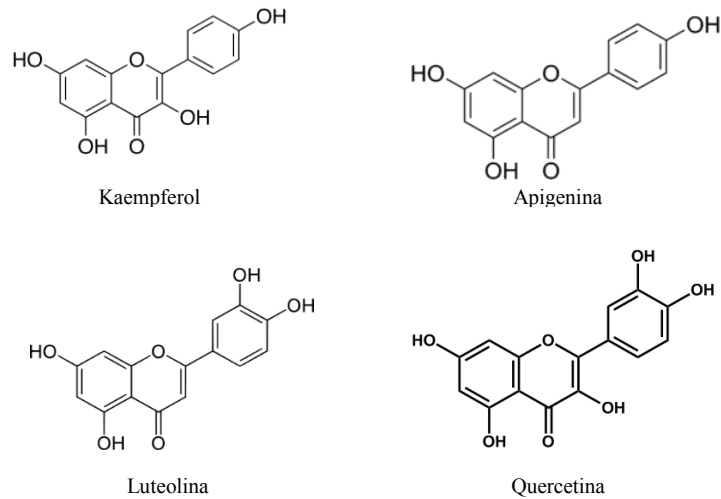


Fig. 6. Flavonoides identificados en la familia Pteridaceae

2.3. Adaptaciones de los helechos a zonas áridas.

Según Hietz (2010), los helechos en zonas áridas han adoptado ciertos mecanismos de adaptación que son:

2.3.1. Adaptaciones a la sequía.

En zonas áridas, los helechos tienen un potencial hídrico negativo y bajos niveles de transpiración. Estos helechos se caracterizan por tener una gran cantidad de indumentos como escamas o tricomas particularmente en el lado abaxial de la lámina para reflejar la luz y reducir la temperatura y la transpiración de las frondas. También presentan cutícula gruesa, revestimientos céreos o resinosos.

Otra adaptación es el enrollamiento de las frondas para de esta manera proteger por involución y reducción del movimiento del aire cercano al estoma.

2.3.2. Respuestas a la desecación.

En respuesta a la desecación, los helechos reducen el tamaño de la célula y superficie, incrementan el parénquima en empalizada, adquieren venación compacta, presentan estomas hundidos y disminuyen su número. Las pinnas particularmente de especies glabras presentan una epidermis cutinizada, efectiva en la reducción de la transpiración (Hevly, 1963). Asimismo, han desarrollado mecanismos como la síntesis de proteínas y carbohidratos para la protección de membranas y macromoléculas de la oxidación y daños mecánicos. También el ácido abscísico (ABA) regula varias respuestas al estrés por sequía.

2.3.3. Fotoinhibición y fotoprotección.

Muchas plantas en ambientes xéricos están expuestas a altos niveles de luz. El exceso de luminosidad promueve la elevación de la tasa fotosintética, y como consecuencia la planta es dañada por el proceso de fotoinhibición. Los pigmentos y compuestos antioxidantes funcionan como defensas bioquímicas para proteger el aparato fotosintético. Los indumentos epidérmicos reducen la luz que absorben los cloroplastos ayudando también a eliminar la fotoinhibición. Algunas especies de helechos presentan en la superficie abaxial de la lámina una cubierta farinosa compuesta de flavonoides que son secretados por glándulas especializadas, que proveen protección contra la luz ultravioleta y también reducen la transpiración y son una defensa contra herbívoros y microorganismos. Dentro de estos helechos se encuentran algunas especies de los géneros *Argyrosma*, *Pityrogramma*, *Pentagramma*, *Notholaena*, *Cheilanthes* y *Pellaea*.

2.4. Importancia del suelo para el desarrollo de las plantas.

El suelo es un recurso natural dinámico, integrado por tres componentes: mineral, orgánico y biológico (micro y macro organismos) cuyas funciones proveen de alimento a las plantas (Cepeda, 1991). Las plantas son organismos que tienen la capacidad de sobrevivir en un medio exclusivamente inorgánico. Adquieren nutrimentos del suelo, el agua o la atmósfera, integrándolos a las más variadas moléculas orgánicas. Las necesidades nutricionales de las

plantas se analizan tradicionalmente en dos tópicos separados: nutrición orgánica y nutrición inorgánica o mineral. La primera se enfoca en la incorporación de carbono inorgánico y su transformación a moléculas orgánicas. Por otro lado, la nutrición mineral estudia la absorción, el transporte, la asimilación y el papel que desempeñan los elementos minerales en el metabolismo vegetal.

En el suelo se encuentra una gran cantidad de elementos minerales, por lo que una planta puede contener trazas de la mayoría de ellos debido a que los mecanismos de absorción pueden no diferenciarlos completamente, y si están en forma disponible, las plantas los pueden tomar fácilmente del suelo. Debe hacerse una distinción entre los elementos disponibles y los elementos totales, ya que el suelo puede ser rico en determinados nutrimentos, pero los mismos pueden no estar en una forma química asimilable por la planta (Márquez, *et al.*, 2013)

En el ecosistema el suelo promueve el crecimiento de las plantas. El suelo es el medio de desarrollo de la raíz de las plantas y con excepción del C, H, O y algo de nitrógeno, las plantas dependen del suelo para adquirir los demás nutrimentos esenciales y el agua. Hasta hace poco solo las propiedades físicas y químicas del suelo se consideraron importantes para el sostenimiento de la fertilidad del suelo; sin embargo, hoy se reconoce la interdependencia de las actividades biológicas con las características físicas y químicas del suelo en el mantenimiento de su fertilidad (Suzuki *et al.* 2005; Manlay *et al.* 2007). El suelo aporta los nutrimentos esenciales de forma natural a las plantas para su crecimiento y su disponibilidad está afectada por factores como el pH, el contenido de materia orgánica, la actividad de los microorganismos y el contenido de agua.

La materia orgánica (MO) es un conjunto de restos de origen animal y/o vegetal que se incorporan al suelo y están sujetos a la biodegradación, la cantidad y calidad de MO determina la diversidad microbiológica, añade fertilidad al suelo, retiene agua y tiene una gran influencia sobre el crecimiento de la vegetación. Una vez transformada en humus, que es el mejor coloide del suelo, favorece ciertas propiedades en él, principalmente la capacidad de intercambio catiónico (CIC), elevación del pH, retención de humedad, etc. Por lo tanto una gran CIC del suelo es importante, ya que supone la posibilidad de tener un depósito de iones minerales que pueden ser cedidos a la solución del suelo y asimilados

por las plantas, además un pH cercano a la neutralidad va a actuar directamente con la disponibilidad de nutrimentos y la facilidad con que estos puedan ser asimilados por los organismos (Kass, 2007).

Los elementos con funciones específicas y esenciales en el metabolismo de la planta se clasifican, según su concentración de la misma, en macro y micronutrimentos (Cuadro 2). Los macronutrimentos incluyen elementos que las plantas asimilan por medio de reacciones químicas que incluyen la carbonización y la oxidación-reducción y que son requeridos en grandes cantidades (Kirkiby, *et al.*, 2007). Los micronutrimentos incluyen elementos que las plantas asimilan por medio de reacciones de almacenamiento de energía o mantenimiento integral y estructural de la planta y que son requeridos en menores cantidades (Taiz y Zeiger, 2006). La deficiencia, carencia o exceso de estos compuestos provoca un mal desarrollo en los vegetales (Arauz, 1998).

Cuadro 2. Función de los nutrimentos en las plantas.

Nutrimento	Función	Deficiencias y excesos
Nitrógeno	Las plantas lo obtienen preferentemente por absorción radicular del nitrato (NO_3^-) y del amonio (NH_4^+). Más del 50% del N de la planta se halla en proteínas y ácidos nucleicos, el resto en moléculas solubles orgánicas (aminoácidos, amidas, aminas) con distintas funciones (coenzimas, osmolitos, etc.) o inorgánicas (nitrato y amonio).	Su deficiencia provoca clorosis y necrosis de hojas. En exceso aumenta el follaje y el desarrollo de la raíz.
Fósforo	Las plantas lo toman del suelo como ion fosfato preferentemente como H_2PO_4^- en suelos ácidos y en su forma divalente $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ en suelos básicos. Permanece como fosfato formando ésteres en los ácidos nucleicos o en moléculas estructurales como los fosfolípidos y como nucleótido, ATP, UDP, GTP, siendo clave en todo el metabolismo.	La deficiencia provoca enanismo y retraso en la madurez. En exceso provoca un gran desarrollo radicular.
Potasio	Se toma en forma catiónica, K^+ . Es el catión más abundante de la vacuola y el principal osmolito de la planta. Además es activador de sistemas enzimáticos (oxidoreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetasas, etc.)	Su deficiencia debilita el tallo y retrasa el crecimiento por pérdida de turgencia. En exceso interfiere en la absorción y disponibilidad de otros cationes como el Mg^{2+} o Ca^{2+}

Calcio	Su absorción es pasiva, como ion divalente Ca^{2+} . Promueve la elongación celular, toma parte en la regulación estomática, participa en los procesos metabólicos de absorción de otros nutrientes, forma compuestos de pectato de calcio que dan estabilidad a la pared celular. Participa en los procesos enzimáticos y hormonales, protege la planta contra el estrés de temperaturas altas, ayuda a proteger la planta contra las enfermedades.	La carencia de calcio se reconoce por la presencia de manchas amarillas/marrones en las hojas, retraso en el crecimiento. El exceso de calcio provoca un retraso en el crecimiento que conduce a una coloración más oscura de la planta, puede llevar también a una deficiencia de B^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Cu^{2+} .
Magnesio	Se absorbe y permanece como catión Mg^{2+} y no suele ser limitante. También se encuentra en forma libre en el espacio intratilacoidal del cloroplasto, donde al iluminarse este, pasa al estroma, pudiendo activar a enzimas tan importantes para la fotoasimilación como la RuBisCo, la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa y la glutamato sintasa y forma complejos con el ATP.	Su deficiencia provoca degradación de la clorofila, se manifiesta con clorosis entre las venas. En exceso, la absorción del calcio se retrasa y provoca un exceso de sal, un retraso en el crecimiento y un color verde oscuro en la planta.
Azufre	Se absorbe por la raíz en forma de anión sulfato (SO_4^{2-}). El S forma parte de aminoácidos como la cisteína y la metionina o se integra en coenzimas como la tiamina, la biotita o el CoA.	Las deficiencias son raras, normalmente hay sulfato disponible en todos los suelos y llevan a plantas rígidas y quebradizas.
Zinc	Como catión divalente (Zn^{2+}) está implicado en al menos 80 sistemas enzimáticos redox (NADH-deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa). También está implicado en la síntesis de triptófano, precursor de AIA.	Su deficiencia conduce a la falta de auxinas, con la disminución de la elongación.
Hierro	Se requiere en cantidad prácticamente de macronutriente, aunque se puede absorber como Fe^{3+} es más soluble como ion ferroso Fe^{2+} . Forma parte de hemoproteínas y forma parte del complejo Fe-S que es clave en la fotosíntesis	Su deficiencia modifica la estructura del cloroplasto y provoca la llamada clorosis férrica. En suelos básicos su disponibilidad es reducida.

(Lampkin, 2001; Gliessman, 2000; Thompson y Troeh, 1988)

Las variaciones edáficas explican parcialmente la diversidad de especies. Existen evidencias de que algunas especies de Pteridofitas están altamente especializadas en colonizar suelos específicos en composición y topografía (Young y León, 1989). Al respecto, Seigler y Wollenweber (1983) reportan que *Notholaena standleyii* habita sustratos formados por rocas ígnea, volcánicas y sulfato de calcio y mediante análisis químicos demuestran que existe una estrecha relación entre el sustrato y el tipo de metabolitos secundarios sintetizados por dicha especie.

Wollenweber y Schneider (2000), menciona que existe una estrecha correlación entre el ámbito geográfico, altura y requerimientos edáficos con el color y la química de los exudados ceráceos presentes en algunos helechos.

3. JUSTIFICACIÓN.

Los flavonoides son compuestos con una amplia distribución en el reino vegetal, implicados en diversas funciones, y cuya síntesis es una estrategia de defensa de las plantas contra condiciones de estrés biótico y abiótico. En la literatura existen estudios enfocados a la variación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides en gimnospermas y angiospermas bajo factores ambientales estresantes como bajas y altas temperaturas, desecación, intensidad luminosa, deficiencias de nutrimentos y contaminación por metales pesados, pero poco se sabe sobre la composición de estos compuestos en Pteridofitas. Asimismo, es escasa la información acerca de la influencia de las propiedades químicas del suelo en la síntesis de compuestos secundarios. Por ello en el presente trabajo se llevó a cabo un estudio fitoquímico de *Notholaena sulphurea* colectada en diferentes localidades con variantes edáficas.

4. HIPÓTESIS.

Si las variaciones climáticas y edáficas influyen en la concentración de los metabolitos secundarios en las plantas, entonces habrá diferencias en la composición de flavonoides en los helechos recolectados en las diferentes localidades.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general

- Determinar la concentración de flavonoides en *Notholaena sulphurea* colectados en diferentes localidades con variantes climáticas y edáficas.

5.2. Objetivos particulares

- Identificar los flavonoides presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas de los helechos de los diferentes sitios de colecta mediante cromatografía en capa fina (CCF).
- Determinar la concentración de flavonoides de los helechos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).
- Evaluar la composición nutrimental y elementos químicos de los suelos donde se desarrollan los ejemplares colectados.
- Evaluar la relación existente entre la concentración de los flavonoides sintetizados por los helechos y las propiedades físicas y químicas del suelo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Colecta e identificación del material vegetal.

Para ubicar los sitios de recolecta de la especie en estudio se realizó una revisión en las bases de datos de la Comisión Nacional de la Biodiversidad (CONABIO) y el Herbario del Instituto de Biología (MEXU). Las muestras de helechos y los ejemplares de herbario fueron recolectados en los meses de septiembre y octubre del 2013 (Cuadro 3 y Fig. 7) y su identificación se realizó mediante claves dicotómicas de Mickel y Smith (2004) con ayuda del especialista M. en C. Ernesto Velázquez del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM. La localización, tipo de vegetación y condiciones ambientales de las muestras de helechos recolectados se describirán posteriormente.

Cuadro 3. Descripción de las zonas de recolecta

Especie	Zona de recolecta	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Precipitación (mm)	Temperatura media anual (°C)*	Tipo de vegetación
<i>N. sulphurea</i> .	Laguna de Atexcac, Puebla.	19° 20' 06"	97° 26' 43"	2482	1270	17.5	Matorral xerófilo
<i>N. sulphurea</i> .	Cascadas petrificadas de Hierve el agua, Oaxaca.	16° 51' 56"	96° 16' 32"	1742	1550	22	Matorral xerófilo
<i>N. sulphurea</i> .	Laguna de Alchichica, Puebla.	19° 25' 11"	97° 24' 38"	2336	1270	17.5	Matorral xerófilo
<i>N. sulphurea</i>	Tepezala, Aguascalientes.	22° 13' 20"	102° 09' 11"	2120	526	17-18	Matorral xerófilo

* INEGI 2010

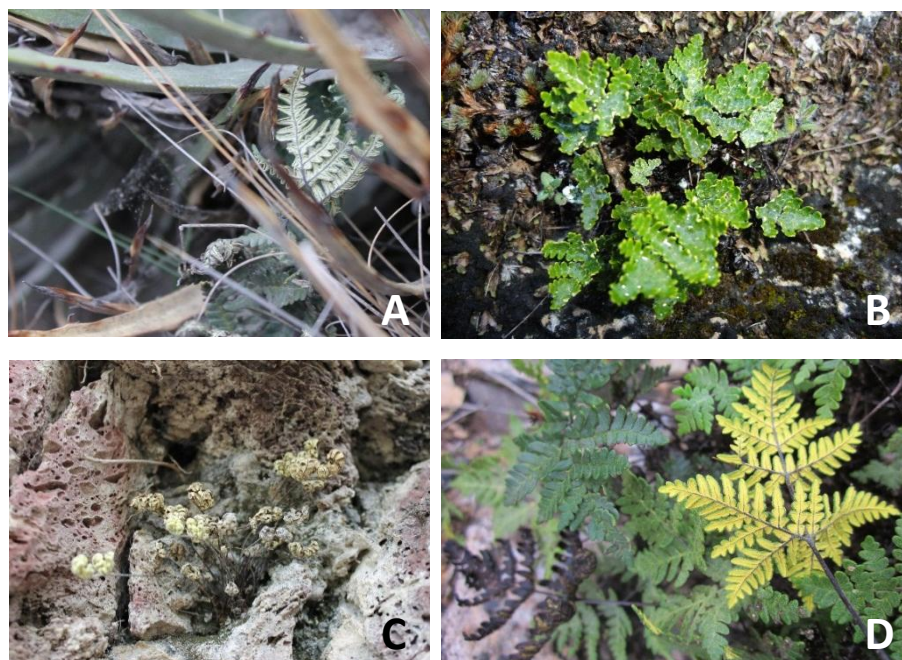


Fig.7 *Notholaena sulphurea* en su hábitat natural. A) Laguna de Atexcac, Puebla. B) Cascadas petrificadas de Hierve el agua, Oaxaca. C) Laguna de Alchichica, Puebla. D) Tepezala, Aguascalientes.

6.2. Obtención de extractos.

Las frondas fértiles de los helechos se secaron a temperatura ambiente y se molieron finamente. El polvo de las hojas se sometió a tres extracciones con etanol-agua (70:30). El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida para la obtención de los extractos, los cuales se pesaron para calcular su rendimiento en porcentaje.

6.3. Identificación preliminar por cromatografía en capa fina (CCF) de los flavonoides presentes en los extractos hidroalcohólicos de *Notholaena sulphurea*.

Los flavonoides presentes en los extractos de los helechos se detectaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron placas de sílica gel (Merck) de 10 x 10 cm y 0.1 cm de espesor. Las muestras de cada uno de los extractos se aplicaron en las placas cromatográficas y éstas se eluyeron en una cámara de vidrio con 10 mL de una mezcla de cloroformo-acetato de etilo-ácido fórmico (7:2:1). Posteriormente, las placas se revelaron con el reactivo de Productos Naturales (Anexo A) y se observaron en una lámpara de luz UV (onda larga 365 nm).

6.4. Identificación y cuantificación de flavonoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de los extractos hidroalcohólicos de *Notholaena sulphurea*.

El análisis de los flavonoides agliconas y glicosilados presentes en los extractos hidroalcohólicos de las frondas de los helechos se realizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con un cromatógrafo Agilent 1100 provisto con un detector de UV, columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mLmin⁻¹ y consistió de acetonitrilo-agua, pH 2.5, en proporción 15:85, a una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 350 nm. Se prepararon las muestras de cada especie tomando 5 mg de extracto en 1 mL de metanol grado HPLC posteriormente 20 µL de cada muestra fueron inyectados y analizados durante 14 minutos.

Para identificar y cuantificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de kaempferol, quercetina, rutina, luteolina, naringina, naringenina e isoquercetina de la marca Sigma. Se prepararon soluciones estándar de tal forma que se inyectaron 5 puntos desde 0.048 µg hasta 0.4 µg de cada flavonoide. Se obtuvo la curva estándar correspondiente y las interpolaciones se hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co.

6.5. Análisis químico de los componentes del suelo

La colecta del suelo se realizó en cada una de las localidades donde se obtuvieron las especies de *Notholaena sulphurea*, en septiembre de 2013. Se tomaron muestras compuestas a una profundidad entre 0-30 cm, de aproximadamente 500 g y se colocaron en bolsas de plástico. Posteriormente se procedió a secar las muestras en charolas de plástico a temperatura ambiente, evitando humedad y luz solar. Una vez secas las muestras se pasaron por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro de acero inoxidable.

En las muestras de suelo se evaluó el pH, materia orgánica (MO), capacidad de intercambio catiónico (CIC) sulfatos (SO_4^{2-}), nitrógeno total (NH_4^+ y NO_3^-), potasio (K^+), fósforo (PO_4^{3-}), magnesio (Mg^{2+}), hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}) y zinc (Zn^{2+}). Con fines estadísticos, cada una de las pruebas se realizó por triplicado.

6.5.1 pH.

Para la determinación del pH se utilizó el método potenciométrico, 1:2 con agua (Willard *et al.*, 1974). Con este método se mide el potencial de un electrodo sensitivo a los iones H^+ (electrodo de vidrio). Se usa como referencia un electrodo cuya solución problema no se modifique cuando cambie la concentración de los iones por medir, en este caso se utilizaron soluciones amortiguadoras de pH conocido (buffers) para calibrar el instrumento y luego compara, ya sea el potencial eléctrico o el pH directamente de la solución por evaluar (SEMARNAT, (2002), (AS-02 NOM 021- SEMARNAT- 2000)).

6.5.2 Materia orgánica (MO).

El método utilizado Walkley y Black (1934), el cual consiste en hacer una digestión en la cual la materia orgánica del suelo, se digesta con $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 . El calor externo liberado por la reacción, al diluirse el H_2SO_4 ayuda al proceso de oxidación. El exceso de $K_2Cr_2O_7$ sin reducir es determinado por valoración con $Fe_2(SO_4)_3$ (SEMARNAT, (2002). (AS-07 NOM 021-SEMARNAT-2000)).

6.5.3 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

La determinación de la CIC se realizó empleando el método (SEMARNAT, (2002). (AS-12 NOM 021-SEMARNAT-2000)). El método para la determinación, consiste en la saturación de la superficie de intercambio con un catión índice, el ion amonio, empleando acetato de amonio 1N, pH 7.0; lavado de exceso de saturante con alcohol; desplazamiento del catión índice con potasio y determinación del amonio mediante destilación.

6.5.4 Determinación de sulfatos (SO_4^{2-}).

El método utilizado para la determinación de sulfatos fue el turbidimétrico. Este método consiste en la medida de la disminución de la intensidad de la radiación cuando un haz de luz pasa a través de una suspensión (sólido-líquido) de una concentración dada. En este caso la suspensión se obtiene con una solución extractora que ayuda a la eliminación de la contaminación de los sulfatos. Posteriormente se realiza una curva patrón a partir de una solución de 100 ppm de SO_4^{2-} diluyendo hasta obtener estándares de 10 a 50 ppm y por último se leen en un turbidímetro a 400 nm. (Fernández, *et al.*, 2006).

6.5.5 Determinación de nitrógeno total.

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método Kjeldahl (modificado por Bremner, 1965). Este método comprende tres fases: 1) digestión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico y un catalizador que facilita la oxidación de la materia orgánica y las formas orgánicas de nitrógeno se transforman en minerales. 2) destilación. Una vez transformado el nitrógeno en amonio (NH_4^+), se expone a una base fuerte como el hidróxido de sodio para formar hidróxido de amonio, que por la acción del calor se descompone en amoníaco (NH_3) y agua. 3) valoración. El amonio desprendido por la

reacción se recoge en un volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación de un blanco se determina la cantidad de ácido que reacciona con el NH_3 (SEMARNAT, (2002). (AS-08 NOM 021-SEMARNAT-2000)).

6.5.6 Determinación de potasio y magnesio.

La determinación de K^+ y Mg^{2+} se realizó empleando el método (SEMARNAT, (2002). (AS-12 de la NOM 021-SEMARNAT-2000)). El método para la determinación, consistió en la saturación de la superficie de intercambio con un catión índice, el ion amonio, empleando acetato de amonio 1N, pH 7.0; lavado de exceso de saturante con alcohol; desplazamiento del catión índice con potasio y determinación del amonio mediante destilación. La determinación de Mg^{2+} se realizó mediante la medición de series estándar, el blanco y la muestra por espectrofotometría de absorción atómica a una longitud de onda de 285.2 nm usando una flama de aire-acetileno y la determinación de K^+ se realizó mediante espectrofotometría de emisión de flama.

6.5.7 Determinación de fósforo.

La determinación del fósforo se realizó dependiendo del pH del suelo ya que si es alcalino se determina mediante el método (SEMARNAT, (2002). (AS-10 NOM 021- SEMARNAT-2000)), por el procedimiento de Olsen y colaboradores que consiste en extraer el fósforo mediante una solución de NaHCO_3 0.5 M ajustada a un pH de 8.5. Este extractante disminuye la concentración de calcio en solución a través de una precipitación del CaCO_3 , por tanto la concentración de fósforo en solución se incrementa. Si el suelo es ácido el fósforo se determinó mediante el método (SEMARNAT, (2002). (AS-11 NOM 021-SEMARNAT-2000)) por el procedimiento de Bray y Kurtz que consiste en extraer el fósforo con una solución de HCl y NH_4F la cual remueve formas de fósforo ácido solubles como los fosfatos de calcio y una porción de fosfatos de aluminio y hierro.

6.5.8 Determinación de hierro y zinc.

La determinación de hierro y zinc se realizó mediante el método (SEMARNAT, (2002). (AS-14 NOM 021-SEMARNAT-2000) que consiste en emplear compuestos con la capacidad para formar complejos estables como el DTPA (ácido del dietilen-triaminopentaacético). Tiene la finalidad de recuperar elementos metálicos que se encuentran en forma intercambiable, ligados a la materia orgánica y disolver formas precipitadas.

6.6. Análisis estadístico.

Con la finalidad de encontrar la relación entre los factores climáticos, las propiedades del suelo y la composición de flavonoides en las diferentes poblaciones de *N. sulphurea* se hizo un análisis estadístico que constó de las siguientes pruebas no paramétricas: comparación múltiple de muestras independientes cuyo objetivo es saber si, globalmente, dichas muestras difieren significativamente entre sí; prueba de Kruskal-Wallis, que permite decidir si puede aceptarse la hipótesis de que “r” muestras independientes proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana; correlación de Spearman, que es una medida de la correlación entre dos variables aleatorias que indican las asociaciones negativas o positivas entre las variables; correlación lineal y ANOVA, que sirven para explorar y cuantificar la relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes, así como para desarrollar una ecuación lineal con fines predictivos; estas pruebas se realizaron en los programas Statistica 8, Table Curves y para saber si había diferencia significativa en la concentración de los flavonoides en las diferentes localidades, se realizó una prueba de Tukey con el programa Sigma (Badii, M.H., *et al.*, 2012).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Análisis fitoquímico.

7.1.1. Rendimiento de los extractos.

Se calculó el rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de las frondas de los helechos colectados en septiembre del 2013, con base en el peso seco de las hojas (Cuadro 4). En general hubo un buen rendimiento de los extractos hidroalcohólicos, aunque se observa que el ejemplar recolectado en la laguna de Alchichica tiene el mayor porcentaje de rendimiento, por otra parte el recolectado en la laguna de Atexcac tiene el menor rendimiento.

Cuadro 4. Rendimiento flavonoides totales en los extractos de *N. sulphurea*.

Frondas (peso seco)	Extractos hidroalcohólicos	
	Peso (g)	(%)
<i>Notholaena sulphurea</i>		
Atexcac, Puebla 4.6 g	1.0	21
<i>Notholaena sulphurea</i>		
Hierve el Agua, Oaxaca. 3.6	0.9	25
<i>Notholaena sulphurea</i>		
Alchichica, Puebla. 1.2g	0.46	38
<i>Notholaena sulphurea</i>		
Tepezala, Aguascalientes 0.94g	0.35	37

7.1.2. Detección de flavonoides por CCF.

El perfil cromatográfico de cada uno de los helechos colectados en diferentes localidades permite ver que existen diferencias en la composición de flavonoides entre los individuos. Se puede observar que hay un mayor número de flavonoides y en más intensidad en el primer ejemplar. También se puede observar que el ejemplar 3 y 4 tienen cierta similitud aunque una menor intensidad en sus flavonoides. Los ejemplares 1 y 2 son los que poseen mayor intensidad pero no poseen tanta similitud entre ellos ni entre los otros ejemplares (Fig. 8).



Fig. 8. Detección de flavonoides por Cromatografía de Capa Fina (CCF) de los extractos hidroalcohólicos de *N. sulphurea* (1) colectado en la laguna de Atexcac, Pue.; *N. sulphurea* (2) colectado en Herve el agua, Oax.; *N. sulphurea* (3) colectado en la laguna de Alchichica, Pue. y *N. sulphurea* (4) colectado en Tepezala, Ags.

7.1.3. Análisis de flavonoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para determinar su concentración.

Para identificar y cuantificar los flavonoides se usaron estándares de kaempferol, quercetina, rutina, luteolina, naringina y naringenina de la marca Sigma. Se obtuvieron las curvas estándar correspondientes y las interpolaciones se hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co. Cada una de los extractos de *Notholaena sulphurea* se sometió al análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Figura 9). Los resultados del análisis cromatográfico indican la presencia de los flavonoides: isoquercetina, quercetina, luteolina, naringenina y kaempferol en todos los helechos.

En las figuras B, C y D, se observa la presencia de rutina, mientras que la figura A es la única que no presenta dicho flavonoide.

En cada una de las figuras se pueden observar fluctuaciones que representan la concentración de flavonoides en los especímenes colectados. En el cuadro 5 se pueden observar las concentraciones de cada flavonoide según el análisis CLAR.

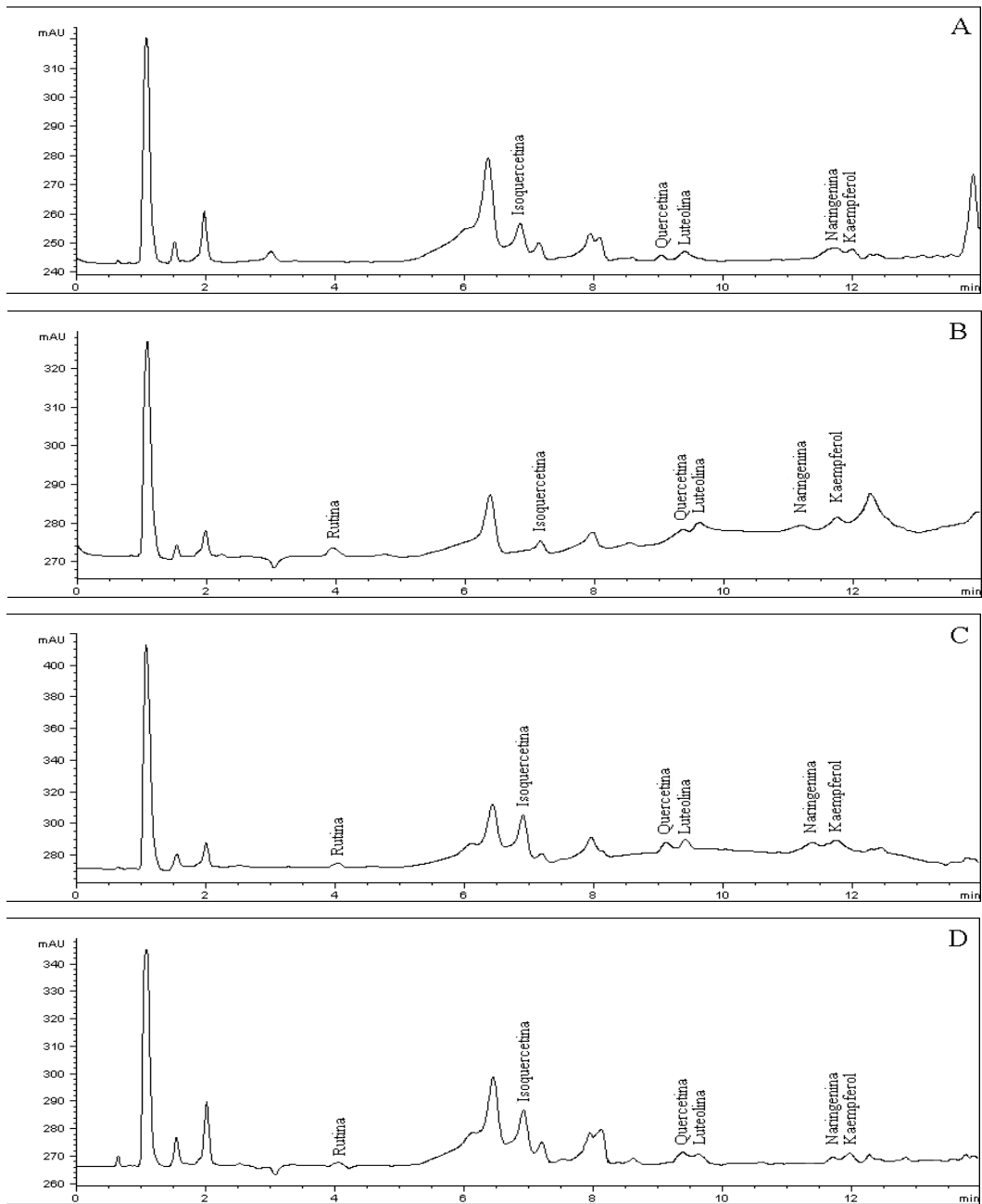


Fig. 9. Cromatogramas donde se observa la detección de flavonoides por CLAR de los extractos hidroalcohólicos de *N. sulphurea* (A) colectado en la laguna de Atexcac, Puebla.; *N. sulphurea* (B) colectado en Herve el agua, Oaxaca.; *N. sulphurea* (C) colectado en la laguna de Alchichica, Puebla. y *N. sulphurea* (D) colectado en Tepezalá, Aguascalientes.

Cuadro 5. Concentración de flavonoides en *Notholaena sulphurea* colectado en cuatro localidades.

Concentración de flavonoides obtenidos por CLAR ($\mu\text{g}/\text{mg}$)							
Flavonoide	Quercetina	Kaempferol	Luteolina	Naringenina	Rutina	Isoquercetina	Naringina
Especie							
<i>N. sulphurea</i> Atexcac, Puebla. (A)	0.79 \pm 0.038b	1.22 \pm 0.04b	0.23 \pm 0.036b	11.92 \pm 0.36a	Nd	1.78 \pm 0.043c	Nd
<i>N. sulphurea</i> Hierva el agua, Oaxaca. (B)	0.46 \pm 0.06c	1.15 \pm 0.13b	0.14 \pm 0.004c	14.57 \pm 0.11a	0.07 \pm 0.005b	0.61 \pm 0.03d	Nd
<i>N. sulphurea</i> Alchichica, Puebla. (C)	1.21 \pm 0.048a	3.09 \pm 0.15a	0.22 \pm 0.014b	4.214 \pm 3.88b	0.09 \pm 0.014b	5.19 \pm 0.12a	Nd
<i>N. sulphurea</i> Tepezala, Aguascalientes. (D)	0.61 \pm 0.02b	0.61 \pm 0.01c	0.27 \pm 0.009*	0.65 \pm 0.032c	0.14 \pm 0.007a	3.16 \pm 0.17b	Nd

Los datos representan la media \pm el error estándar de la concentración de flavonoides.

Las letras (a,b,c,d) en cada una de las columnas indican la diferencia significativa en la concentración de los flavonoides en los diferentes sitios de colecta con $P=0.05$

nd= no detectado

La composición de flavonoides en las frondas de *N. sulphurea* colectados en las cuatro localidades mostró que la naringenina fue el compuesto más abundante en los ejemplares A, B y C (11.92, 14.57, 4.214 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivamente) siendo A y B los valores de mayor significancia en el estudio, por otro lado la rutina fue el flavonoide con menor concentración en las localidades B, C y D (0.07, 0.09, 0.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivamente) y en la localidad A no se detectó. No se identificó naringina en ninguna de las localidades.

El ejemplar C muestra una mayor significancia de quercetina (1.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$) con respecto a las otras localidades, siendo el ejemplar B el de menor concentración (0.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

El kaempferol se encuentra en mayor concentración en el ejemplar C (3.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y en menor concentración en el D (0.61 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

La luteolina se presenta en bajas concentraciones en las cuatro localidades aunque la localidad B muestra la concentración más baja con (0.14 µg/mg).

Se identificó que la isoquercetina tiene altas concentraciones en el ejemplar C y D (5.19, 3.16 µg/mg), siendo el ejemplar B el que presenta la menor concentración (0.61 µg/mg).

En general, el ejemplar C mostró una concentración de flavonoides más alta que los demás ejemplares, siendo el ejemplar D el que tuvo menor concentración de flavonoides.

Los resultados de los helechos estudiados indican que la presencia y concentración de los flavonoides varía en relación a los sitios en que se colectaron. Según algunos estudios realizados en angiospermas, la presencia de estos flavonoides indica que existe estrés, sobre todo, la quercetina y la rutina que incrementan su concentración cuando la planta se encuentra bajo la influencia de rayos UV.

La quercetina al poseer un grupo hidroxilo más que el kaempferol, posee una actividad antioxidante mayor; esta actividad de los flavonoides es una adaptación de las plantas que utilizan para disipar la energía solar y evitar daños al aparato fotosintético y al ADN (Chaves, *et al.*, 1993; Olsson, *et al.*, 1998)

7.2. Análisis estadístico.

7.2.1 Correlación de Spearman.

El coeficiente de correlación de Spearman, es una prueba no paramétrica que mide la asociación o interdependencia entre dos variables. Los valores que se presentan oscilan entre -1 y +1. Los valores próximos a 1 indican una correlación fuerte y positiva, si una variable aumenta, la otra también. Los valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa, si una variable aumenta, la otra disminuye. Los valores próximos a 0 indican que no hay correlación lineal (Tomás, 2009).

En el cuadro 6 se observan las correlaciones entre los factores de suelo y la concentración de los flavonoides. Las correlaciones positivas más representativas fueron: CE-naringenina, quercetina y kaempferol; MO- naringenina; N-naringenina, kaempferol, CE y MO; P- naringenina, kaempferol, CE y N; K-kaempferol, CE y P; Mg-rutina, isoquercetina y MO; Ca- naringenina, kaempferol, CE, MO, N, P; CIC- naringenina, kaempferol, CE, MO, N, P, Ca; SO₄- naringenina, quercetina, kaempferol, CE, N, P, Ca, K, CIC; Fe-MO, Ca, CIC; Zn-quercetina, CE, P, K, SO₄. Por otro lado las correlaciones negativas más significativas fueron: pH- luteolina y kaempferol; CE-pH; MO-pH; N-pH, P-pH; K-rutina; Ca-pH; CIC-pH; SO₄-pH; Zn-rutina.

Cuadro 6. Correlación de Spearman de los flavonoides vs parámetros del suelo.

Variable	L	N	R	Q	K	I	F. T	pH	CE	MO	N	P	K	Mg	Ca	CIC	SO4	Fe	Zn
Luteolina	1.000000	-0.587413	0.281697	0.251748	-0.328671	0.447552	-0.539792	0.538462	-0.269703	-0.392295	-0.577934*	-0.091714	-0.055944	0.094571	-0.524476	-0.503497	-0.139860	-0.622378*	0.041958
Naringenina		1.000000	-0.267612	0.447552	0.818182	0.188811	0.971625	-0.944056*	0.784590*	0.791595*	0.938705*	0.754879*	0.377622	0.395797	0.951049*	0.909091*	0.741259*	0.545455	0.279720
Rutina			1.000000	-0.140849	-0.429588	0.429588	-0.239187	0.232400	-0.423286	0.292773	-0.179897	-0.486679	-0.859176*	0.641984*	-0.225358	-0.211273	-0.457758	0.232400	-0.711285*
Quercetina				1.000000	0.629371	0.720280	0.431834	-0.398601	0.767076*	0.276708	0.444834	0.786627*	0.531469	0.308232	0.433566	0.426573	0.804196*	-0.342657	0.657343*
Kaempferol					1.000000	0.356643	0.842075	-0.797203*	0.907182*	0.560421	0.774082*	0.888923*	0.671329*	0.224168	0.832168*	0.846154*	0.888112*	0.230769	0.545455
Isoquercetina						1.000000	0.194325	-0.202797	0.371279	0.381787	0.185640	0.391550	0.006993	0.725045*	0.160839	0.202797	0.370629	-0.195804	0.125874
Flav. Total							1.000000	-0.971625*	0.811107*	0.800292*	0.973329*	0.784185*	0.388650	0.432590	0.971625*	0.971625*	0.777300*	0.582975*	0.259100
pH								1.000000	-0.760071*	-0.767076*	-0.963224*	-0.751352*	-0.384615	-0.455342	-0.937063*	-0.916084*	-0.706294*	-0.559441	-0.293706
CE									1.000000	0.463158	0.794737*	0.918751*	0.658495*	0.201754	0.809108*	0.844134*	0.949213*	0.108582	0.602453*
MO										1.000000	0.778947*	0.441707	-0.136603	0.722807*	0.767076*	0.767076*	0.430824	0.739055*	-0.175132
N											1.000000	0.735001*	0.339755	0.443860	0.945711*	0.942208*	0.753066*	0.563924	0.280211
P												1.000000	0.772517*	0.215553	0.744297*	0.772517*	0.963000*	-0.010582	0.663165*
K													1.000000	-0.343258	0.363636	0.363636	0.741259*	-0.370629	0.881119*
Mg														1.000000	0.367776	0.406305	0.196147	0.395797	-0.308232
Ca															1.000000	0.944056*	0.755245*	0.601399*	0.286713
CIC																1.000000	0.790210*	0.580420*	0.202797
SO4																	1.000000	0.013986	0.664336*
Fe																		1.000000	-0.461538
Zn																			1.000000

*Datos significativos para el estudio.

7.2.2. Correlación lineal y ANOVA

Se realizó un análisis de correlación lineal y ANOVA para comprobar que la relación entre los factores de suelo y las concentraciones de flavonoides que resultaron significativas en la correlación de Spearman se comportan de manera lineal (Cuadro 7), la r^2 representa el coeficiente de correlación lineal que mide el grado de intensidad de esta posible relación entre las variables. Este coeficiente se aplica cuando la relación que puede existir entre las variables es lineal, es decir, si representáramos en un gráfico los pares de valores de las dos variables la nube de puntos se aproximaría a una recta.

El valor de P se usa para determinar si los resultados del experimento se encuentran dentro del rango normal de valores para los eventos observados. Si $p \leq 0,05$, se rechaza la hipótesis nula (H_0), que descarta la hipótesis en la cual las variables del experimento no tienen un efecto significativo en los resultados.

Cuadro 7. Análisis de varianza de los flavonoides vs parámetros edáficos

Variables	r^2	P value
pH- Naringenina	0.8062	< 0.00001
pH- Kaempferol	0.7135	< 0.0001
CE- Naringenina	0.9597	< 0.00001
CE- Quercetina	0.7409	< 0.0001
CE- Kaempferol	0.9791	< 0.00001
MO- Naringenina	0.8984	< 0.00001
N- Naringenina	0.9098	< 0.00001
N- Kaempferol	0.9688	< 0.00001
P- Naringenina	0.9314	< 0.00001
P- Quercetina	0.8183	< 0.00001
P- Kaempferol	0.9719	< 0.00001
K- Rutina	0.7760	= 0.00001
Mg- Isoquercetina	0.7015	< 0.0001
Ca- Naringenina	0.8560	< 0.00001
Ca-Kaempferol	0.8536	< 0.00001
CIC- Naringenina	0.9469	< 0.00001
CIC-Kaempferol	0.9611	< 0.00001
SO ₄ - Kaempferol	0.8645	< 0.00001
SO ₄ -Naringenina	0.8395	< 0.00001
SO ₄ -Quercetina	0.8098	< 0.00001

r^2 = Coeficiente de correlación

P < 0.05 significativo para el estudio

7.3. Análisis fisicoquímico del suelo.

El análisis de laboratorio de las muestras de suelo en donde crece *N. sulphurea* (Cuadro 8) tienen pH ligeramente alcalinos, no son salinos, aunque en Hierve el Agua, tenemos la mayor concentración de electrolitos. Generalmente esta especie crece en suelos pobres en MO, pero puede establecerse en suelos con muy alto porcentaje de MO. Por otra parte, es importante señalar que el análisis nutrimental practicado a estos suelos, indica que se trata de suelos pobres o con baja disponibilidad de nutrimentos.

Cuadro 8. Análisis físicos y químicos de las muestras de suelo de las localidades donde se desarrolla *N. sulphurea*.

Localidad	Tepezala, Aguascalientes.	Alchichica, Puebla.	Hierve el agua, Oaxaca.	Atexcac, Puebla.
Factor del suelo				
pH	8.180± 0.025	7.760± 0.047	7.470± 0.020	8.340±0.028
CE, dS m ⁻¹	0.535±0.01	0.514±0.01	1.017±0.01	0.322±0.01
M.O. %	1.436±0.05	3.898±0.06	9.573±0.17	1.573±0.04
N, %	0.228±0.01	0.263±0.00	0.767±0.03	0.158±0.01
P, ppm	0.347±0.00	0.289±0.00	0.963±0.01	0.193±0.00
K int, meq 100 ⁻¹	0.323±0.02	0.200±0.01	0.247±0.01	0.171±0.01
Mg int, meq 100 ⁻¹	1.250±0.14	2.800±0.10	6.900±0.61	3.300±0.30
Ca int, meq 100 ⁻¹	14.55±1.46	19.80±0.81	28.4±1.45	11.15±0.93
CIC, meq 100 ⁻¹	25.323±1.77	30.316±0.35	57.065±1.03	17.833±0.29
SO ₄ ⁻² , ppm	79.940±2.14	52.994±1.05	117.665±1.54	35.030±0.58
Fe, ppm	11.999±1.39	92.095±1.98	39.372±3.03	27.99±2.65
Zn, ppm	144.423±4.35	2.108±0.53	7.389±0.90	1.631±0.28

Los valores representan la media y ± el error estándar de tres repeticiones de muestras de suelo analizadas

7.4. Discusión de resultados.

7.4.1 pH.

De acuerdo con el análisis de varianza la concentración de kaempferol y naringenina tiene una correlación negativa con respecto al pH lo que quiere decir que a mayor valor de pH la concentración de dichos flavonoides será menor. Así mismo, se encontró una buena correlación entre el pH y los contenidos de MO, CE, N y P, estas disminuyen a medida que el pH se incrementa.

El pH (Anexo B1) más alto de 8.34 afecta la fijación biológica del N, la precipitación del P, la productividad primaria y con ello la cantidad de MO en el suelo y desde luego, la solubilidad de las sales que quedan a disposición de *N. sulphurea*, esto genera condiciones estresantes a la planta, lo que motiva la cantidad de metabolitos secundarios que se producen.

Por otro lado a medida que el pH se reduce, se eleva la cantidad de SO_4^{2-} indicando que estos pueden estar unidos al calcio (Ca^{2+}), elemento que también se incrementa; siendo esta sal $\text{Ca}(\text{SO}_4)$ relativamente importante en la solución del suelo. El radical SO_4^{2-} al estar soluble, también puede estar en equilibrio con el ion H^+ en una buena parte, lo cual motiva la disminución del pH, al ser el H^+ un ion importante en la carga variable del suelo.

7.4.2. Conductividad eléctrica (CE).

De acuerdo con Vázquez y Bautista (1993), se encontró un bajo contenido de sales solubles indicado por la baja conductividad eléctrica (Anexo B2), esta es esencialmente menor a 0.6, excepto para la localidad de Hierve el Agua donde aproximadamente alcanza el valor de 1. Se trata de suelos no salinos.

Este parámetro se correlaciona positivamente con el contenido de N, P, K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} y SO_4^{2-} y con las concentraciones de los flavonoides naringenina, quercetina y kaempferol ya que a medida que se incrementa la CE también lo hacen estos nutrimentos y los flavonoides, sin embargo, la CE es baja en el ambiente donde se establece y desarrolla *N. sulphurea*.

7.4.3. Materia orgánica (MO).

Los suelos en que se desarrolla *N. sulphurea* tienen contenidos variables de materia orgánica ya que se encuentra tanto en suelos volcánicos como no volcánicos. Para los suelos volcánicos se tienen valores que van desde 1.57 hasta 3.89 y para los suelos no volcánicos de 1.4 a 9.57 (Según SEMARNAT, (2002) estos valores son muy bajos para suelos volcánicos y bajos y muy altos para suelos no volcánicos) (Anexo B3).

Se encontró una correlación positiva entre los contenidos de MO y los niveles del flavonoide naringenina y nutrimentos, particularmente el nitrógeno, calcio, magnesio y hierro; esto es de esperarse pues las concentraciones de estos nutrimentos son producto de la mineralización de la MO, cabe señalar que *Notholaena sulphurea* se ve más favorecida en su establecimiento y desarrollo bajo estas condiciones en que los nutrientes disponibles tienen un origen orgánico pues es sabido que los nutrimentos de origen orgánico son preferidos por las especies vegetales en comparación con aquellos de origen mineral producto del intemperismo de los materiales geológicos, en este caso se encontró que el hábitat en que se establece y desarrolla *Notholaena sulphurea* no tiene suelos maduros, más bien se trata de suelos en procesos de formación, poco profundos, con alta pedregocidad y materiales con alto contenido de arena; lo cual los hace poco fértiles. En todos los casos un alto contenido de materiales orgánicos poco alterados forman parte del hábitat en el que este helecho se establece.

Estos residuos orgánicos aportados por la vegetación dominante o codominante del hábitat representan año con año un almacén de nutrimentos que se pone a disposición de *N. sulphurea* y otras especies vía mineralización de esta MO durante la época húmeda, momento en que el helecho tiene su máxima actividad metabólica.

Cabe señalar que los suelos donde crece *N. sulphurea* se clasifican como de mediana a muy alta capacidad de intercambio catiónico (anexo B5), es decir se cuenta con un complejo de cambio representado por la MO capaz de almacenar los nutrimentos y ponerlos a disposición de las especies vegetales.

7.4.4. Nitrógeno total (NH_4^+ y NO_3^-).

Se tiene que el contenido de nitrógeno en el suelo va de alto a muy alto (Anexo B4).

Con base en los resultados del análisis de suelo practicado particularmente a los nutrimentos, se encontró una correlación positiva entre el nitrógeno y los flavonoides naringenina y kaempferol y los nutrimentos fósforo, calcio y azúfre. De estas interacciones el nitrógeno presenta sinergismo con el fósforo (Navarro y Navarro, 2013), es decir, el N tiene una fuerte influencia en la absorción y metabolismo del P en la planta. Una correlación equivalente se presenta entre el N y los nutrimentos K^+ y S, sin embargo en la literatura no se señala una relación sinérgica entre estos, pero indica que tampoco se trata de un antagonismo, bloqueo o precipitación nutrimental; en este sentido estos nutrimentos son absorbidos por la planta en función de sus necesidades y desde luego de su disponibilidad en el suelo en la zona radical. Los resultados indican que tanto el potasio como el azufre constituyen un factor limitante para el desarrollo de *N. sulphurea*, en la medida en que existen en el hábitat de esta especie factores de estrés, como una estrategia de supervivencia sintetiza metabolitos secundarios, en este caso flavonoides. Estos metabolitos favorecen a la planta contra factores como: ataques de herbívoros y patógenos, luz ultravioleta, metales pesados, y protección de las semillas o esporas (Andersen y Markham, 2006), de esta forma la planta puede completar su ciclo de vida y producir esporas maduras para colonizar nuevos hábitats.

7.4.5. Zinc (Zn^{2+}).

El mismo análisis realizado a las muestras de suelo indica muy bajos niveles de Zn^{2+} disponibles para la planta excepto para la localidad de Tepezalá donde se alcanzan 144 ppm; en este sentido, solo esta localidad reúne los niveles de este nutrimento que demanda la planta, en las otras tres localidades existe un permanente estrés nutrimental de Zinc que del mismo modo altera en la planta la síntesis de farina, además según la correlación de Spearman nos muestra que hay una correlación positiva entre la concentración de zinc y la quercetina y por otro lado una correlación negativa entre la concentración de la rutina respecto a la del zinc.

7.4.6. Potasio (K⁺).

Con relación al contenido de K⁺ en las muestras de suelo estudiadas, se encontró que Tepezalá es la localidad con mayor contenido de este nutrimento alcanzando una concentración de 0.32 meq 100⁻¹, opuesto a esta localidad está la localidad de Atexcac con la más baja concentración (0.17 meq 100⁻¹). Además según el análisis ANOVA existe una correlación negativa entre el contenido de potasio y la concentración del flavonoide Rutina. Este nutrimento tiene una correlación positiva con los contenidos de SO₄²⁺ y Zn²⁺ registradas en este estudio, de este modo cuando mayor es la cantidad de K⁺ en el suelo se incrementan los contenidos de estos. Atendiendo a las funciones del Zn²⁺, micronutrimento cofactor de enzimas, es claro que en Tepezalá el Zn²⁺ juega un papel importante en la síntesis de flavonoides; mientras que las menores cantidades de K⁺ fueron registradas en Atexcac en donde a la par se encuentran las menores cantidades de Zn²⁺, concuerdan con los menores rendimientos del extracto metanólico; aquí la síntesis de estos flavonoides se ve restringida por la disponibilidad del K⁺ y del Zn²⁺.

7.4.7. Calcio (Ca²⁺).

El contenido de calcio en todas las localidades fue alto ya que todos los valores se encuentran por arriba de 10 meq 100⁻¹(Anexo B6)

Se encontraron correlaciones positivas entre los contenidos de Ca²⁺ con la CIC y SO₄²⁺ y las concentraciones de naringenina y kaempferol indicando que el complejo de cambio esta marcadamente saturado por el Ca²⁺ y que el CaSO₄ es una de las sales determinantes en Hierve el Agua, seguida por el MgSO₄ en esta localidad; esto le confiere al ambiente edáfico un excelente poder buffer de manera que el pH se mantiene muy cerca de la neutralidad, efectivamente se comprueba por los valores obtenidos en este parámetro en las cuatro localidades. Estas condiciones tienen influencia en el establecimiento y desarrollo de *N. sulphurea*.

7.4.8. Fósforo (P).

Los contenidos de fósforo en los cuatro sitios estudiados en los que habita *N. sulphurea* son bajos, no mayores a 1 ppm; de acuerdo con SEMARNAT (2002). (Anexo B7), el nivel de P para suelos se considera bajo cuando este oscila entre 0 y 15 ppm. Los resultados indican que *N. sulphurea* se desarrolla en ambientes edáficos calcáreos, ahí la presencia de CaCO_3 y de MgCO_3 y particularmente la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} interactúan con el radical PO_4^{3-} para formar fosfatos de calcio y magnesio, compuestos poco solubles que reducen la disposición del P para los organismos.

De acuerdo con Gaucher, 1971; la presencia de cationes divalentes particularmente Ca^{2+} y Zn^{2+} producen el antagonismo nutrimental con el P, de manera que estos nutrimentos también disminuyen la disponibilidad del P. Sin embargo, Ca^{2+} y Zn^{2+} no son nutrimentos deficientes al encontrarse formando parte de sales más solubles como sulfatos y cloruros.

Se encontraron correlaciones positivas entre el P y el K, lo cual indica la formación de la sal K_3PO_4 que tiene un kps más alto que hace posible la disposición de los dos nutrimentos; por otra parte el radical SO_4^{2-} favorece el intercambio de cationes con el radical PO_4^{3-} , esta es la razón por la cual no se encuentran deficiencias de P; sin embargo, *N. sulphurea* debe tener mecanismos para hacer un uso eficiente de este nutrimento y hacer frente a su baja disponibilidad.

7.5. Discusión final.

La capacidad de las plantas para colonizar nuevas regiones se basa en su adaptabilidad a los factores abióticos y bióticos como el suelo y comunidades microbianas con quienes interactúan (Richardson *et al.* 2000; Klironomos 2002; Callaway *et al.* 2004; Wandrag *et al.* 2013).

Por esta razón podemos decir que *N. sulphurea* tiene una tendencia a desarrollarse en suelos con pH medianamente alcalinos que van de 7.4 a 8.5 (Anexo B1); la adaptabilidad de esta especie como vimos en los resultados expuestos en el cuadro 8 es muy alta puesto que los valores en las concentraciones de los nutrimentos y los otros factores analizados son muy distintas en cada localidad, lo que podría significar que *N. sulphurea* tiene una amplia

plasticidad para establecerse y desarrollarse en diferentes suelos de ambientes xéricos; esta misma plasticidad se refleja en cuanto a la disponibilidad de recursos nutrimentales.

La especie en estudio produce una mayor cantidad de flavonoides cuando se desarrolla sobre materiales geológicos calcáreos, pH más cercano a la neutralidad y cuando la disponibilidad de nutrimentos es mayor. Esta disponibilidad se ve favorecida cuando el contenido de MO es mayor y el suelo tiene un complejo de cambio también más alto, particularmente nos referimos a la localidad de Hierve el Agua.

Opuesto a esto, está el ejemplar de la localidad de Tepezala, donde la concentración de flavonoides y la disponibilidad de nutrimentos son las más baja de las cuatro localidades estudiadas

Comparativamente hablando la cantidad de flavonoides extraída de los tejidos vegetales de *N. sulphurea* procedente de las cuatro localidades es proporcional a la disponibilidad de los nutrimentos analizados y al pH.

8. CONCLUSIONES.

- Las variaciones climáticas y edáficas influyen en la concentración de los metabolitos secundarios en las plantas, por lo tanto, la composición de flavonoides de los helechos en cada localidad fue diferente. Esto es congruente con la hipótesis planteada.
- La disponibilidad de nutrientes para la planta y su cantidad estimulan la producción de flavonoides al no constituir una barrera fisiológica para su síntesis.
- *N. sulphurea* es eficiente en el uso de nutrimentos.
- El papel funcional de cada uno de los nutrimentos favorece o inhibe la síntesis de los flavonoides
- *N. sulphurea* tiene una amplia plasticidad para establecerse y desarrollarse en diferentes suelos de ambientes xéricos.
- A mayor cantidad de reservas nutrimentales en el suelo, mayor síntesis de flavonoides en *N. sulphurea*

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anaya, L. A. 2003. Ecología Química. Ed. Plaza y Valdez. México. 349 pp.
- Andersen, O. M. y Markham, K. R. 2006. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Ed. Taylor and Francis Group. U.S.A. p. 397-416.
- Arauz, C. L. F. 1998. Fitología un enfoque agroecológico. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. p. 43, 44.
- Badii, M. H., Guillen, A., Araiza, L. A., Cerna, E., Valenzuela, J. y Landeros J. 2012. Métodos no paramétricos de uso común. International Journal of Good Conscience. 7:132-155.
- Bremner, J. M. 1965. Nitrogen availability indexes. En: Fernández, L.L.; *et al.* 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. SEMARNAT. México, D.F. p. 35-40.
- Bryant, J. y Julkunen Tiitts, R. 1995. Ontogenetic development of chemical defense production. Journal of Chemical Ecology 21:883-896.
- Callaway, R. M., Thelen, G. C., Rodriguez, A. y Holben, W. E. 2004. Soil biota and exotic plant invasion. Nature 427: 731-733
- Cepeda, J.M. 1991. Química de Suelos. Ed. Trillas. México, D.F. 167 pp.
- Chaves, N., Escudero, J. C. y Gutiérrez, M. C. 1993. Seasonal variation of exudates of *Cistus ladanifer*. Journal Chemical Ecology 19: 2577-2591.
- Chavez, N., Sosa, T. y Escudero, J. C. 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudates of *Cistus ladanifer* and in associated soil. Journal of Chemical Ecology 27:623-631.
- Christenhusz, M. J., Zhang, X. C. y Schneider, H. 2011. A linear secuencia of extant families and genera of lycophytes and ferns. Phytotaxa 19:7-54.

- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Grisse, W. y Jones, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. p. 1250–1318.
- Eiserhardt, W. L., Rohwer, J. G., Sussell, S. J., Resilyurt, J. C. y Schbeuderm, H. 2011. Evidence for radiation of cheilanthoid ferns in the Greater Cape Floristic Region. *Taxon* 60:1269-1283.
- Escamilla, J. C., Cuevas, M. E. y Guevara F. J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista Facultad de Medicina, UNAM. México* 52:73-74.
- Fernández, L., Rojas, G., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., y Arce, J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México. SEMARNAT.
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C. y Noe, J. P. 2008. Structure and function of enzymes involved in biosynthesis of phenylpropanoids. *Plants physiology and biochemistry* 46:356-370.
- Gaucher, G. 1971. Tratado de pedología agrícola. El suelo y sus características agronómicas. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Gliessman, S. R. 2000. Agroecology. Ecological process in sustainable agriculture. Lewis Publishers. E.U.A. p. 36, 37.
- Hare, J. D. 2002. Seasonal variation in the leaf resin components of *Mimulus aurantiacus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 30:709-720.
- Herrera, M. C. 1993. Anatomía de dos especies de *Cheilanthes*, Swartz. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillo. México. 107 pp.
- Hevly, R. H. 1963. Adaptations of Cheilantoid ferns to desert environments. *Journal of Arizona Academy of Science* 2:165-175

- Hietz, P. 2010. Fern adaptations to xeric environments. p. 140-173. En: Mehlter, K.; Walter, L.R.; J.M. Sharpe. Fern Ecology. Cambridge University Press. London, Great Britain.
- Jhonson, L. J. 1979. Introductory soil science. A study guide and laboratory manual. Ed. Macmillan. New York, EUA. p. 191
- Kass, D. C. 2007. Fertilidad de suelos. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 41pp.
- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B. y Barceló, J. 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three variety of maize (*Zea mays* L.). Journal of Experimental Botany 52: 1339-1352.
- Kirkiby, E. A. y Römheld, V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. The international fertilizer society. United Kingdom. p. 6-11.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. Nature 417: 67-70.
- Laitinen, M. L.; Julkunen-Tiitto, R. y Rousi, M. 2000. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. Journal of Chemical Ecology 26: 1609-1621.
- Lampkin, N. 2001. Agricultura ecológica. Grupo Mundi-prensa. 2ª ed. Madrid. p. 50-84.
- Lancaster, J. E., Reay, P. F., Norris, J. y Butler, R. 2000. Introduction of flavonoids and phenolic acids in apple by UV-B and temperature. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 142-148.
- León, A. R. y Aguilar, S. 1987. Materia orgánica. p. 85-91. En: Aguilar, S.A., J. P. Etchevers B. y J. Z. Castellanos R. Análisis químico para evaluar la fertilidad del

suelo. Publicación especial No. 1. Sociedad mexicana de la ciencia del suelo. Chapingo, Estado de México, 217pp.

- Lock, O. 1994. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2ª ed. Fondo editorial PUCP. Lima, Perú. Pp. 114-130.
- Lock, O. 2001. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. En: Villar L. M., Villavicencio V. O. 2001. Manual de fitoterapia. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Lima, Perú. p. 50.
- Manlay, R. J., Feller C., Swift M. J. 2007. Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 119:217–233
- Márquez, G. J., Collazo, O. M., Martínez, G. M., Orozco, S. A. y Vázquez, S. S. 2013. Biología de angiospermas. UNAM, Facultad de ciencias: coordinación de la investigación científica. México. 632 pp.
- Mickel, J. T. y Smith, A. R. 2004. The pteridophytes of Mexico. *Memories New York Botanical Garden*. 1054 pp.
- Navarro, G. G. y Navarro, G. S. 2013. Química agrícola. Química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas. 3ª ed. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 255
- Olsson, L. C., Veit, G. y Weissenböck, J. F. 1998. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49:1021-1028.
- Reay, P. F.; Lancaster, J. E. 2001. Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in Gala and Royal Gala apple fruit with UV-B visible irradiation; modifying effects of fruit maturity, fruit side and temperature. *Scientia Horticulturae* 90: 57-68
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. 2ª ed. Academic Press, Inc. New York. 421 pp.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. y Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.
- Richardson, D. M., Allsopp, N., D' Antonio, C. M., Milton, S. J. y Rejmánek, M. 2000. Plant invasions- the role of mutualisms. *Biol. Rev.* 75:65-93.
- Roitman, J. N., Mann, K. y Wollenwebwer, E. 1992. Two dibenzoylmethanes from the frond exudate of *Notholaena* species. *Phytochemistry* 31:985-987.
- Romo, A. 2006. Química de la flora mexicana. Investigaciones en el instituto de química UNAM. México, D.F. p.63-64.
- Rothfels, C. J., Windham, M. P., Grusz, A. L., Gastony, G. J. y Pryer. K. M. 2008. Toward a monophyletic *Notholaena* (Pteridaceae): resolving patterns of evolutionary convergence in xeric-adapted ferns. *Taxon* 57:712-724.
- Salatino, M. L. F. y Prado, J. 1998. Flavonoid glycosides of Pteridacea from Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:761-769.
- Seigler, D. S. 1981. Secondary metabolites and plant systematics. En P.K. Stumpf y E.E. Conn (ed.). *Biochemistry of plants. Vol. 7. Secondary plant products.* p. 139-176
- Seigler, D. S. y Wollenweber, E. 1983. Chemical Variation in *Notholaena standleyi*. *American Journal of Botany* 70:790-798.
- SEMARNAT. (2002). Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis (NOM-021-SEMARNAT). *Diario Oficial de la Federación.* Vol. 31
- Stewart, A. J., Chapman, W., Jenkins, G. I., Graham, I., Martin, I. y Crozier, A. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell and Environment* 24:1189-1197
- Suzuki, C., Kunito, T., Aono T., Liu, C. T. y Oyaizu, H. 2005. Microbial indices of soil fertility. *Journal of applied microbiology* 98:1062–1074

- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal I. 3^a. ed. Publicaciones de la Universidad Jaume. España. p. 529-536.
- Thompson, L. M. y Troeh, F. R. 2002. Los suelos y su fertilidad, 4^a ed. Ed. Reverté. Barcelona, España. 649 pp.
- Tomas, S. J. 2009. Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. Universidad Autónoma de Barcelona. España. p. 104.
- Vázquez, A. A. y Bautista, N. 1993. Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Departamento de suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Velázquez, M. E. 2010. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 80. Instituto de Biología. UNAM. México. 96 pp.
- Wagner, H y S. Bladt. 1996. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 384 pp.
- Walkley, A. y Black, I. A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37:29-38.
- Wandrag, E. M., Sheppard, A., Duncan R. P. y Hulme, P. E. 2013. Reduced availability of rhizobia limits the performance but not invasiveness of introduced *Acacia*. J. Ecol. 101:1103-1113.
- Williams, C. A. y Grayer, R. J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. Natural Products Reports. 21:539-573.
- Willard, H. H., Merrit, L. L. y Dean, J.A. 1974. Instrumental methods of analysis. 5^a Ed. Van Nostrand. Nueva York. 796 pp.
- Wollenweber, E. 1976. Flavonoid exudations in farinose ferns. Phytochemistry 15:2013.

- Wollenweber, E. 1989. Exudate flavonoids in ferns and their chemosystematic implication. *Biochemical Systematics and Ecology*. 17:141-144.
- Wollenweber, E. y Schneider, H. 2000. Lipophilic exudates of Pteridaceae chemistry and chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28:751-777.
- Young, K. R. y León, B. 1989. Pteridophyta species diversity in the central Peruvian Amazon: importance of edaphic specialization. *Brittonia*. 41:388-395.

9.1 Recursos electrónicos.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).(2010)
<http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/default.aspx?tema=me>
(Consultada febrero 2015)

10. ANEXO

A. Revelador de Productos Naturales (NP) (Wagner y Bladt, 1996)

Se prepara una solución al 1% en metanol (10 mL) de β -etil-amino-éster del ácido difenil bórico (NP). La placa se asperja con la solución.

B. Criterios de evaluación para análisis de suelo

Cuadro B1. Criterios de evaluación del pH.

Categoría	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

SEMARNAT (2002). (AS-02 NOM 021- SEMARNAT- 2000).

Cuadro B2. Criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en su conductividad eléctrica.

Categoría del suelo	CE (dS m ⁻¹)
No salino	0 – 2.0
Poco salino	2.1 – 4.0
Moderadamente salino	4.1- 8.0
Muy salino	8.1 – 16.0
Extremadamente salino	> 16

Vázquez y Bautista, 1993.

Cuadro B3. Interpretación del contenido de materia orgánica en el suelo.

Factor del suelo	Materia orgánica (MO %)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.1	> 6.0

León y Aguilar, 1987.

Cuadro B4. Criterios para evaluar un suelo con base en su contenido de nitrógeno total.

Nutrimiento	(%) de nitrógeno en el suelo
Muy bajo	< 0.05
Bajo	0.05 - 0.10
Medio	0.10 - 0.15
Alto	0.15 - 0.25
Muy alto	> 0.25

Fernández, *et al.*, 2006

Cuadro B5. Clasificación de la fertilidad de suelos de acuerdo a la CIC.

Factor del suelo	CIC meq 100 ⁻¹
Clase	
Muy alta	< 40
Alta	25 – 40
Media	15 – 25
Baja	5 – 15
Muy baja	> 5

Fernández, *et al.*, 2006

Cuadro B6. Clasificación de los niveles de calcio, magnesio y potasio

Nutrimento	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺
	meq 100 ⁻¹		
Muy baja	< 2	< 0.5	< 0.2
Baja	2 – 5	0.5 -1.3	0.2 – 0.3
Mediana	5 – 10	1.3 – 3.0	0.3 – 0.6
Alta	> 10	> 3	> 6

Fernández, *et al.*, 2006

Cuadro B7. Interpretación de resultados de Fósforo.

Clase	ppm
Bajo	< 15
Medio	15 – 30
Alto	> 30

SEMARNAT (2002). (AS-10 NOM 021- SEMARNAT-2000 y AS-11 NOM 021-SEMARNAT-2000).

Cuadro B8. Clasificación de los niveles de Hierro y Zinc.

Clase	Nutrimento	Fe ²⁺ y Fe ³⁺	Zn ²⁺
		ppm	
Bajo		<2.5	<0.5
Medio		2.5 - 4.5	0.5- 1.0
Alto		>4.5	>1.0

SEMARNAT (2002). (AS-14 NOM 021-SEMARNAT-2000)

Cuadro B9. Nutrientes esenciales para las plantas. Contenido total en el suelo (Plantas silvestres)

Nutriente	Contenido en el suelo (ppm)
Nitrógeno	200-5,000
Fosforo	45-900
Azufre	100-500
Potasio	1,700-20,000
Magnesio	120-16,000
Calcio	70-35,000
Hierro	12,000-43,000
Zinc	100

Jhonson, 1979