



“Análisis fitoquímico de la planta conocida como ‘Guarinbishe’ con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica”

Torres Toledo, Italo Jordy y Velásquez Cedeño, Luis Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

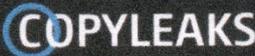
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de ingeniería en Biotecnología

Naranjo Gaybor, Sandra Ph.D.

09 de febrero del 2022

Reporte de Verificación de Contenido



Tesis final_Torres_Velasqu ez.pdf
Scanned on: 16:40 February 8, 2022 UTC



Identical Words	37
Words with Minor Changes	42
Paraphrased Words	175
Omitted Words	3420



Tesis final_Torres_Velasquez.pdf Scanned on: 16:40 February 8, 2022 UTC

Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text in your submitted document.

<p> 11. Productos Naturales Vegetales - Jorge Ringuet - Senia ... https://in.conicet.gov.ar/bizareas/handle/11336/112854/CONICET_Digital</p>		IDENTICAL
<p> Joselyn Alejandra, Lucero Pita. Departamento de Ciencias ... https://library.co/document/ydm4n2p-joselyn-alejandra-lucero-pita-de</p>		Identical matches are one to one exact wording in the text.
<p> Microsoft Word - guion-p6 http://www.dfo.uem.es/ig/practicas/P6-guion.pdf</p>		MINOR CHANGES
<p> Copyleaks Internal Database</p>		Heavily identical with different form, e.g. "lower" becomes "lowly".
<p> 569039167ccha.pdf https://www.csr.gov.co/uploads/files/569039167ccha.pdf</p>		PARAPHRASED
<p> PRINCIPIOS ANTIINFLAMATORIOS DE Teucrium buxifolium S... https://eprints.ucm.es/id/eprint/38161/1/19096.pdf</p>		Close meaning but different words used to convey the same message.
<p> Corral Casas (2).pdf?sequence=1&isAllowed=y https://minerva.usc.es/minia/bitstream/handle/10347/17863/Corral%20C</p>		
<p> Toxicodendron striatum (Ruiz & Pav.) Kuntze http://worldagroecology.org/tacon/info/000409375/sessionid-81298453C</p>		

Unsure about your report?
 The results have been found after comparing your submitted text to online sources, open databases and the Copyleaks internal database. For any questions about the report contact us on support@copyleaks.com.
[Learn more about different types of alterations here](#)

COPYLEAKS Website Education Businesses



Firmado electrónicamente por:
**SANDRA JUDITH
NARANJO GAYBOR**

Naranjo Gaybor, Sandra Ph.D
Directora de proyecto de titulación
C.C. 1709384422



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Análisis fitoquímico de la planta conocida como ‘Guarinbishe’ con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica”**, fue realizado por los señores **Torres Toledo Italo Jordy y Velásquez Cedeño Luis Andrés**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 09 de febrero del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**SANDRA JUDITH
NARANJO GAYBOR**

Naranjo Gaybor, Sandra Ph.D
Directora de proyecto de titulación
C.C. 1709384422



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotros, **Torres Toledo Italo Jordy** y **Velásquez Cedeño Luis Andrés**, con cédulas de ciudadanía 1150732079 y 0804132058, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación de “**Análisis fitoquímico de la planta conocida como ‘Guarinbishe’ con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica**” es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 09 de febrero del 2022

Firmas:

Torres Toledo Italo Jordy
C.C. 1150732079

Velásquez Cedeño Luis Andrés
C.C. 0804132058



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros, **Torres Toledo Italo Jordy** y **Velásquez Cedeño Luis Andrés**, con cédulas de ciudadanía 1150732079 y 0804132058, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" publicar el trabajo de titulación: "**Análisis fitoquímico de la planta conocida como 'Guarinbishe' con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica**" en el repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 09 de febrero del 2022

Firmas:

Torres Toledo Italo Jordy
C.C. 1150732079

Velásquez Cedeño Luis Andrés
C.C. 0804132058

Dedicatoria

Andrés Velásquez

*Quienes se nos adelantaron en
el camino nunca se han ido, les
gusta esconderse en la música,
en la calle, en los sueños, en los
recuerdos...*

Anónimo.

Italo Torres

Este trabajo se lo dedico a Patricia Toledo, mi madre; Telmo Toledo, mi tío; Aura Toledo, mi tía, Paul Toledo, mi primo; y Yessenia Armijos, mi prima, ellos son y serán siempre mis seres más queridos. Sin lugar a duda han sido los partícipes de mi vida, ya que, sin su guía, apoyo, sacrificio y compañía, nunca habría podido tomar las decisiones claves para cumplir esta meta.

*Ningún soñador es pequeño y
ningún sueño es demasiado grande.*

- El principito

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera universitaria y en los momentos más difíciles de mi vida.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas y a sus docentes por el conocimiento brindado todos estos años.

Agradezco a la Dra. Sandra Naranjo, al Dr. Fernando Hurtado, al Dr. Santiago Ulloa y al Dr. Danilo Buñay por haberme apoyado con sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todos mis amigos con los que he compartido gratas experiencias.

Agradezco a Ariana por ayudarme a ser una mejor persona y compartir los momentos más bellos a su lado.

Andrés Velásquez

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por haber sido el pilar necesario para que hoy en día yo me pueda encontrar en el lugar donde estoy, ya que sin su ayuda no habría sido capaz de lograrlo, especialmente a mi mamá que siempre me apoyó y a pesar de las situaciones difíciles que pasamos.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas que me ha permitido crecer como persona y como profesional, gracias a los docentes que conocí.

A la Dra. Sandra Naranjo por aceptar ser nuestra tutora de tesis y haberme guiado en todo este proyecto, por haberme compartido sus conocimientos y por su confianza en el ámbito práctico dentro del laboratorio.

Al Dr. Fernando Hurtado por su ayuda en la identificación de la especie en estudio, al Dr. Santiago Ulloa y al Dr. Danilo Buñay por su ayuda en la interpretación estadística de datos y a la Ing. Sandra Armijos por su ayuda en algunas incertidumbres presentadas.

Agradezco a mis amigos de colegio que me apoyaron como si fueran parte de mi familia y siempre estuvieron conmigo, Jonathan, Hans, Fabian y Edison. También a los nuevos amigos que conocí en esta institución, Kevin, Boris, Katy, Nicole, Andrés.

Y agradezco en especial a Karen Sosa que me ha dado las fuerzas para seguir adelante, sabiendo ser una excelente amiga y compañera de vida.

Italo Torres

Índice de Contenidos

Caratula.....	1
Reporte de Verificación de Contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoria	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	9
Lista de Figuras	12
Lista de Tablas.....	13
Lista de Abreviaturas	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Planteamiento del Problema.....	17
Justificación.....	18
Objetivos.....	19
<i>Objetivo General</i>	19
<i>Objetivos Específicos</i>	19
Capítulo II: Marco Teórico	20
Botánica Sistemática.....	20
Farmacognosia.....	20
Herbario.....	21
<i>Artemia salina</i>	21
Parámetros y Proceso de Eclosión de <i>Artemia salina</i>	22
El Uso de <i>Artemia salina</i> en Investigación y Educación	23
Ensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i>	23

Concentración Letal 50	23
Metabolitos Secundarios.....	24
Alcaloides	25
Saponinas.....	25
Taninos.....	26
Flavonoides	26
Terpenos	27
Cumarinas	27
Resinas.....	28
Métodos de Extracción de Metabolitos.....	28
Solventes Químicos	29
Metanol.....	29
Cloroformo.....	30
Acetato de Etilo	30
Butanol	30
Cromatografía	31
<i>Cromatografía de Capa Fina (TLC)</i>	31
Factor de retención.....	31
Disolvente (fase móvil)	32
Visualización	32
<i>Cromatografía de Columna</i>	32
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	34
Fundamentos básicos de la espectroscopía de RMN.....	34
Aplicaciones de la espectroscopia de RMN	35
Capítulo III: Materiales Y Métodos	36
Localización.....	36
Muestras Colectadas	36
Identificación de la Planta	36
Tratamiento	37

Obtención del Extracto.....	37
Ensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i> (BSLA)	38
<i>Estandarización</i>	38
<i>Determinación de la LC50</i>	39
Screening Fitoquímico	40
<i>Prueba para determinar la presencia de saponinas</i>	40
<i>Prueba para determinar la presencia de flavonoides</i>	40
<i>Prueba para determinar la presencia de taninos y fenoles</i>	40
<i>Prueba para determinar la presencia de alcaloides</i>	40
<i>Prueba para determinar la presencia de terpenoides</i>	41
<i>Prueba para determinar la presencia de cumarinas</i>	41
<i>Prueba para determinar la presencia de resinas</i>	41
Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	41
Cromatografía de Columna.....	42
Espectroscopia de RMN	42
Capítulo IV: Resultados Y Discusión.....	43
Identificación de la Planta	43
Clasificación Taxonómica	49
Rendimiento de los Extractos	50
Screening Fitoquímico	50
Espectroscopía de RMN	52
Ensayo de Letalidad de <i>Artemia salina</i> (BSLA)	54
Cromatografía de Capa Fina y de Columna.....	59
Capítulo V: Conclusiones	65
Capítulo VI: Recomendaciones	66
Capítulo VII: Bibliografía	67

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Partes del nauplio o larva de Artemia</i>	22
Figura 2 <i>Clasificación de los compuestos fitoquímicos</i>	24
Figura 3 <i>Polaridad de los diferentes solventes</i>	29
Figura 4 <i>Esquema de una cromatografía de columna</i>	33
Figura 5 <i>Esquema de obtención del extracto y sus respectivas fracciones</i>	38
Figura 6 <i>Tamaño y apreciación morfológica de la hoja y los folíolos</i>	43
Figura 7 <i>Tamaño y apreciación morfológica del foliolo</i>	44
Figura 8 <i>Distribución de las hojas en el tallo</i>	44
Figura 9 <i>Apreciación morfológica de los frutos</i>	45
Figura 10 <i>Apreciación morfológica de las inflorescencias</i>	45
Figura 11 <i>Distribución de Toxicodendron striatum en el continente americano</i>	47
Figura 12 <i>Reportes de distribución de Toxicodendron striatum</i>	48
Figura 13 <i>Ejemplo de urushiol, compuesto por un catecol y una cadena R en la posición C3</i>	51
Figura 14 <i>Espectro de RMN del extracto E0 y la subfracción E1</i>	53
Figura 15 <i>Espectro 1H RMN de una molécula de urushiol predicho, usando el software MestReNova (v.14.2.0)</i>	54
Figura 16 <i>Ensayo de mortalidad de Artemia salina usando el extracto E0</i>	56
Figura 17 <i>Ensayo de mortalidad de Artemia salina usando la subfracción E1</i>	57
Figura 18 <i>Ensayo de mortalidad de Artemia salina usando la subfracción B1</i>	58
Figura 19 <i>TLC de la fracción E1 con diferentes solventes y relaciones</i>	60
Figura 20 <i>TLC de la fracción E1 utilizando hexano:acetato de etilo (2:1) como fase móvil</i>	60
Figura 21 <i>Esquema del agrupamiento de las fracciones obtenidas en CC.</i>	61
Figura 22 <i>Síntomas de la dermatitis alérgica de contacto por urushiol</i>	63

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Fases estacionarias comunes, mecanismo cromatográfico y aplicaciones.</i>	31
Tabla 2 <i>Concentraciones evaluadas de los extractos en el BSLA</i>	39
Tabla 3 <i>Clasificación taxonómica de la planta</i>	50
Tabla 4 <i>Rendimiento de las fracciones en 200 g de hojas secas</i>	50
Tabla 5 <i>Resultado de las pruebas realizadas en el screening fitoquímico, donde:</i>	52
Tabla 6 <i>LC50 obtenido en el extracto vegetal y sus subfracciones.</i>	55
Tabla 7 <i>Valores de Rf de los compuestos obtenidos en las fracciones usando hexano:acetato de etilo (2:1)</i>	62

Lista de Abreviaturas

PPRL	Laboratorio de Investigación de Plantas Venenosas
BSLA	Ensayo de letalidad de <i>Artemia salina</i>
LC50	Dosis letal 50
TLC	Cromatografía en capa fina
Rf	Factor de retención
CC	Cromatografía de columna
RMN	Resonancia magnética nuclear
mL	Mililitros
mg	Miligramos
E0	Extracto crudo
E1	Extracto acetílico
B1	Extracto butanólico
NaOH	Hidróxido de sodio
H₂SO₄	Ácido sulfurico
HCl	Ácido clorhidrico
KOH	Hidróxido de potasio
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado

Resumen

Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad para la elaboración de medicamentos, aunque algunas pueden provocar reacciones tóxicas. Ecuador es una fuente abundante de recursos vegetales los cuales no son estudiados a profundidad. Para el estudio de estos compuestos biológicos se pueden emplear ensayos como el BSLA para evaluar la citotoxicidad y técnicas fitoquímicas para identificar los compuestos de interés. Por ello, se pretende realizar el análisis fitoquímico de la planta "Guarinbishe" con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica; primero por una identificación de la especie botánica en campo y luego mediante un screening fitoquímico, espectroscopía de RMN y un BSLA. Se logró identificar a nuestra planta de estudio como *Toxicodendron striatum*; mediante el screening se encontró la presencia de flavonoides, saponinas, fenoles, taninos, alcaloides y resinas; el ensayo BSLA indica que la subfracción obtenida con butanol fue más activa en comparación con las otras muestras y finalmente en la espectroscopia RMN se pudo apreciar presencia de señales de urushiol, compuesto al que se le atribuye la toxicidad de la planta, el cual provoca una dermatitis alérgica de contacto. Con toda esta información recopilada se concluye que la planta en estudio pertenece a *Toxicodendron striatum*, conocido por desencadenar una respuesta alérgica de contacto en personas; los extractos obtenidos poseen un alto grado de toxicidad, sobre todo el obtenido con butanol; y el análisis de RMN indica señales de un grupo catecólico con una cadena alifática que corresponde a la estructura del urushiol.

Palabras clave:

- **TOXICODENDRON STRIATUM**
- **GUARINBISHE**
- **ARTEMIA SALINA**
- **SCREENING FITOQUÍMICO**

Abstract

Plants have been used since ancient times to make medicines, although some can cause toxic reactions. Ecuador is an abundant source of plant resources which are not studied. To study these biological compounds, assays such as BSLA can be used to assess cytotoxicity and phytochemical techniques to identify compounds of interest. Therefore, it is intended to carry out the phytochemical analysis of the "Guarinbishe" plant to determine its potential toxicological activity; first by an identification of the botanical species and then by phytochemical screening, NMR spectroscopy and a BSLA. It was possible to identify our study plant as *Toxicodendron striatum*; the presence of flavonoids, saponins, phenols, tannins, alkaloids and resins was found through screening; the BSLA test indicates that the subfraction obtained with butanol was more active compared to the other samples and finally in the NMR spectroscopy it was possible to observe the presence of urushiol signals, a compound to which the toxicity of the plant is attributed and causes an allergic contact dermatitis. With all this information collected, it is concluded that the plant under study belongs to *Toxicodendron striatum*, known to trigger an allergic contact response in people; the extracts obtained have a high degree of toxicity, especially the one obtained with butanol; and NMR analysis indicates signs of a catechol group with an aliphatic chain corresponding to the structure of urushiol.

Keywords:

- **TOXICODENDRON STRIATUM**
- **GUARINBISHE**
- **BRINE SHRIMP**
- **PHYTOCHEMICAL SCREENING**

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del Problema

Las plantas se han utilizado de forma tradicional desde mucho tiempo atrás gracias a un genuino interés por los compuestos bioactivos que estas poseen, empleándose para diversos fines, por ejemplo, en la medicina para la elaboración de medicamentos (Licá *et al.*, 2018). Por otra parte, las plantas también pueden contener constituyentes que las vuelven tóxicas al provocar reacciones dañinas o fatales (Gupta, 2018), por ello es primordial describirlas y entender su actividad biológica.

De acuerdo con Street *et al.* (2019) las plantas venenosas comprenden la tercera categoría más grande de venenos conocida a nivel mundial, reportándose casos de toxicosis por plantas en todo el mundo. El interés por este tipo de plantas ha motivado estudios, por ejemplo, en 1995 las pérdidas económicas debido al envenenamiento de animales por el consumo de plantas venenosas, en especial ganadería, impulsó la creación del Laboratorio de Investigación de Plantas Venenosas (PPRL) con el objetivo de identificar plantas y compuestos tóxicos. (Welch *et al.*, 2012).

Ecuador es un país con una gran biodiversidad al albergar más de 25 000 especies de plantas en su territorio gracias a su geografía, la cordillera de los Andes separa al país en tres regiones naturales, lo que ha generado una gran diversidad de hábitats que son adecuados para el surgimiento de nuevas especies (Guides, 2019). Esta diversidad vuelve al país una fuente potencial de productos biológicos de interés, los cuales pueden tener aplicaciones prácticas en diferentes áreas y ser el punto de partida de diferentes investigaciones (Armijos *et al.*, 2021). No obstante, en el Ecuador se ha dado poca atención a este tema, la información es escasa y no se investiga a fondo los componentes bioactivos de las plantas; durante los últimos 5 años se han escrito alrededor de 100 artículos científicos de más de 120 diferentes plantas

medicinales ecuatorianas basados en estudios fitoquímicos y farmacológicos (Armijos *et al.*, 2021). Además, el 50% de las publicaciones científicas se centran únicamente en 8 familias de plantas de un total de 254 existentes en el país (Malagón *et al.*, 2016).

El PPRL indica que el avance en la comprensión y el tratamiento potencial de enfermedades humanas se ha dado como un resultado de investigaciones de los principios tóxicos derivados de las plantas venenosas (Welch *et al.*, 2012). En la región amazónica del Ecuador se encuentra una planta conocida por los nativos como “Guarinbishe”, cuyo contacto provoca una alergia aguda a los seres humanos y hasta el momento no ha sido descrita ni se encuentra bibliografía específica de ello; por esta razón, se propone el estudio de esta planta silvestre con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica y determinar los compuestos bioactivos en macro que se encuentran presentes.

Justificación

El potencial tóxico de una planta puede provenir de distintos constituyentes que son parte del metabolismo secundario propio de la planta y puede incluir una amplia variedad de especies químicas como alcaloides, saponinas, terpenoides, compuestos fenólicos, entre otros, que pueden encontrarse en sus hojas, frutos, semillas, raíces, tallo y flores. Con la finalidad de evaluar el potencial tóxico de una especie vegetal es necesario emplear diferentes ensayos basados en modelos biológicos (Hamidi *et al.*, 2014); uno de estos ensayos es la cuantificación de la mortalidad de *Artemia salina* (BSLA, por sus siglas en inglés), que presenta varios beneficios al ser un método económico al cual se puede considerar como punto de partida para evaluar la citotoxicidad y actividad antitumoral de varios compuestos (incluidos los extractos de plantas), ya que es fácil de cultivar y está bien estudiado, a diferencia de los métodos tradicionales en el descubrimiento de nuevos fármacos que incluyen pruebas *in vitro* con líneas celulares tumorales y pruebas en mamíferos

pequeños como los ratones que resultan más costosas y complicadas (Ntungwe *et al.*, 2020).

A pesar de que las plantas tóxicas son una causa importante de la morbilidad y mortalidad (Serrano, 2018), es importante investigar los metabolitos causantes de su toxicidad y a mayor profundidad su mecanismo de acción dentro del metabolismo. La investigación que realizan las universidades es en realidad grande, cerca del 32% de estas investigaciones son transferidas a empresas que continúan la investigación con el objetivo de identificar nuevas dianas de interés biotecnológico (Kneller, 2010); en las universidades se ha dado los principales hallazgos de moléculas de interés, especialmente a través de cribados (Coles & Cloyd, 2012), llegando a constituirse como un beneficio para el desarrollo de nuevos productos farmacológicos e industriales.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar el análisis fitoquímico de la planta “Guarinbishe” con la finalidad de determinar su potencial actividad toxicológica

Objetivos Específicos

- Recolectar e identificar la especie vegetal en campo para determinar su identidad botánica.
- Identificar los compuestos mediante pruebas fitoquímicas y cromatografía en capa fina
- Instalar el ensayo de letalidad de *Artemia salina* (BSLA) para determinar el LC50 usando extractos de la especie vegetal.

Capítulo II: Marco Teórico

Botánica Sistemática

La botánica sistemática consiste en la identificación, clasificación y nombramiento ordenado de las plantas según lo establecido en un sistema de reglas, todas las plantas que pertenecen a un grupo en particular comparten cierto número de características o atributos similares tales como formas o estructuras (Huamán, 1980).

La botánica sistemática tiene el objetivo de proveer un sistema de clasificación útil para todos los individuos del reino de las plantas, valiéndose en dos puntos de vista: el primero hace uso de las comparaciones morfológicas, datos de la distribución geográfica y otros tipos de información cuya atención sea lo suficientemente relevante; y segundo menciona como los taxónomos deben tomar de forma imparcial todos los tipos de información obtenida con la finalidad de mejorar, aceptar o rechazar las clasificaciones ya existentes (Keck, 1957).

Farmacognosia

La farmacognosia es la investigación de productos naturales, donde se examina la química, los orígenes y las funciones biológicas de las moléculas pequeñas que se encuentran presentes en la naturaleza. Estas fuentes incluyen plantas, animales, hongos y microorganismos de ambientes terrestres, de agua dulce y marinos en todo el planeta. El origen de la investigación de productos naturales precede por mucho tiempo a la formalización del método científico con el desarrollo de remedios a base de hierbas por parte de los pueblos indígenas (The University of Mississippi, 2021).

Los seres humanos han utilizado a las plantas como fuente medicinal desde los comienzos de la civilización humana y aún en la actualidad se siguen utilizando; se sabe que el 80% de la población en los países en vías de desarrollo aún confían en la medicina tradicional (Orhan, 2014). Además, se conocen muchos medicamentos

que son de origen vegetal como la artemisinina, cafeína, ácido salicílico, vincristina, taxol, colchicina (Perveen & Al-Taweel, 2019), entre los más conocidos.

Herbario

Un herbario es una colección de especímenes de plantas secas, los cuales se encuentran organizados de manera accesible, siendo usados de forma frecuente como una fuente primordial de información en investigaciones taxonómicas orientadas a las ciencias vegetales (Victor *et al.*, 2004).

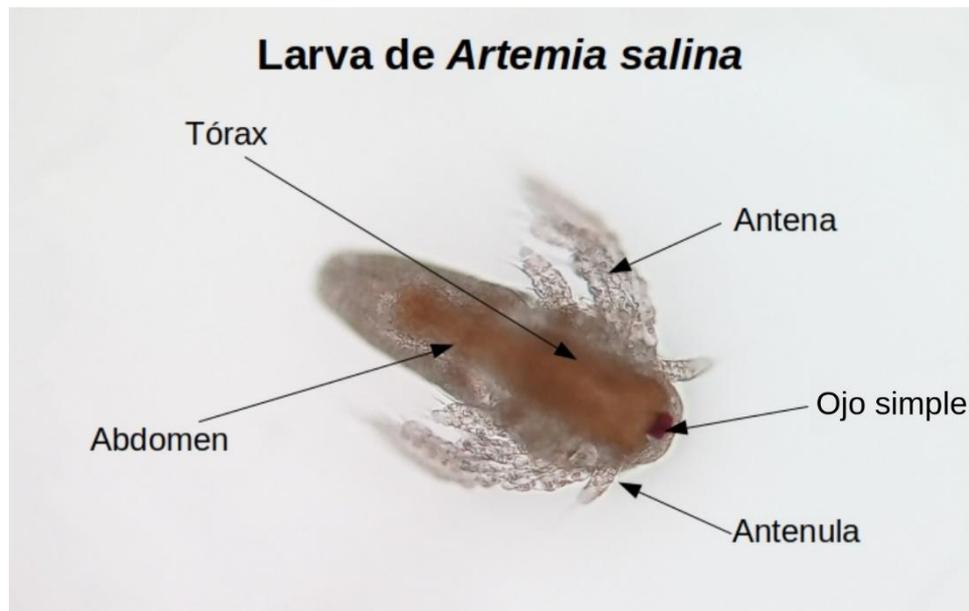
Los herbarios pueden albergar muchas referencias taxonómicas y geográficas, como por ejemplo floras o manuales que resultan muy útiles en la identificación de plantas, asimismo, el almacenamiento computarizado en la base de datos facilita el acceso a la información de todos los especímenes del herbario, e incluso de otros que se encuentran en otros herbarios los cuales han otorgado acceso a sus colecciones de ejemplares (Aggarwal, 2012).

Artemia salina

Las artemias son un género de los crustáceos pertenecientes al subfilo Branchiopoda (ITIS, 2022; Sorgeloos *et al.*, 1986). *Artemia salina* es una especie dentro de esta familia, morfológicamente está conformada por un cuerpo segmentado en tres partes: cabeza, tórax y abdomen; con una longitud de entre 8 y 12 milímetros y un ancho de 4 milímetros (Figura 1). El cuerpo a su vez se encuentra recubierto por un exoesqueleto de quitina al cual los músculos se unen internamente (Abatzopoulos *et al.*, 2013). Este individuo es capaz de soportar un rango de salinidad bastante amplio, sus quistes (huevos de resistencia) son capaces de permanecer en una diapausa bastante prolongada que causan que sea necesario una serie de procesos bioquímicos para el desarrollo luego del periodo de dormancia (Browne, 2018).

Figura 1

Partes del nauplio o larva de *Artemia*



Estas se encuentran de forma natural en los lagos salados y es bastante común verlas en acuarios u otros tipos de cultivo de peces debido a su valor nutricional (Alaş *et al.*, 2017), no obstante, las artemias tienen una gran importancia dentro de la investigación en diferentes ramas de la ciencia.

Parámetros y Proceso de Eclosión de *Artemia salina*

El medio en el cual se realiza la incubación de las artemias es el principal elemento de importancia en el proceso de eclosión; el ingrediente principal de este es el agua de mar y puede ser elaborada de manera artificial al añadir sal no yodada al agua para producir la salinidad (Bahr *et al.*, 2021). El tiempo del proceso de eclosión puede variar de entre 24 a 48 horas según el porcentaje de salinidad y pH del medio, la temperatura ambiente del lugar de incubación, las condiciones de aireación e iluminación y la densidad de quistes sembrados (Rajabi *et al.*, 2015).

El proceso de eclosión de artemia comienza con los quistes secos en estado de criptobiosis los cuales recobran su metabolismo luego de ser hidratados y posteriormente al transcurrir 24 horas el embrión es visible debido a la ruptura de la

membrana exterior del quiste. En las horas siguientes el embrión completará su desarrollo dentro de la membrana de eclosión, de la cual surgirá el embrión que continuará a un estado larvario (nauplio) permitiéndole circular libremente (Sorgeloos *et al.*, 1986).

El Uso de *Artemia salina* en Investigación y Educación

Las artemias han sido utilizadas ampliamente por científicos en varias áreas de estudio ya que son una fuente de animales de fácil manejo y con características que las vuelven adecuadas para diversas investigaciones por parte de ecotoxicólogos, genetistas, biólogos moleculares, farmacéuticos, bioquímicos y radiobiólogos (Abatzopoulos *et al.*, 2013).

Ensayo de Letalidad de *Artemia salina*

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se emplea actualmente para evaluar los efectos citotóxicos de compuestos químicos bioactivos, sirviendo para evaluar de forma preliminar la toxicidad de extractos de plantas, toxinas de hongos, pesticidas, entre otros (Sarah *et al.*, 2017). Michael *et al.* (1956) fueron los primeros en proponer este ensayo el cual fue desarrollado posteriormente por otros investigadores permitiendo emplearlo de forma exitosa como un ensayo guiado para la detección de citotóxicos y agentes antitumorales, de forma rápida, simple, económica y sin la necesidad de emplear equipos especiales.

Concentración Letal 50

La concentración letal 50 (LC50) es la concentración mínima de un compuesto, elemento o material la cual se espera que cause la muerte del 50% de los individuos que han sido expuestos en un ensayo de toxicidad; esta concentración es calculada de forma estadística (Gad, 2014).

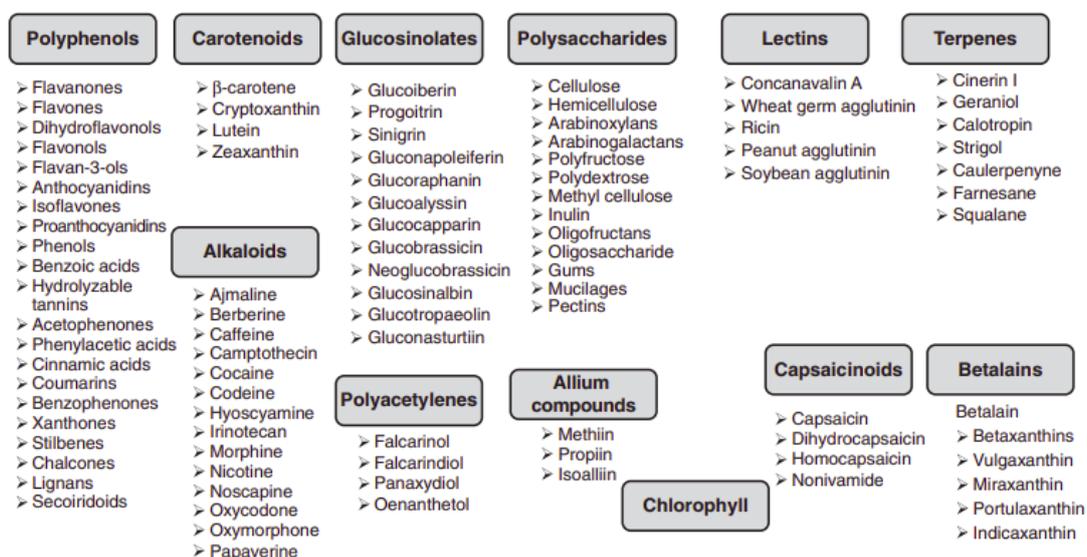
Metabolitos Secundarios

La mayor parte del carbono y nitrógeno que las plantas asimilan, es usado para la síntesis de compuestos que forman parte del metabolismo primario y son indispensables para el correcto funcionamiento del organismo, entre ellos los aminoácidos, carbohidratos y lípidos; como derivados de estos, se sintetizan los metabolitos secundarios, los cuales no son indispensables para la vida de los organismos, sino más bien cumplen funciones específicas como brindar protección contra depredadores o atraer insectos polinizadores, característicos de las plantas superiores. La fitoquímica estudia estos compuestos y su investigación incluye varias etapas (Mendoza & Escamilla, 2018):

- Extracción de los compuestos a analizar a partir de una muestra o espécimen.
- Separación y aislamiento de estos.
- Identificación y/o caracterización de los compuestos aislados.
- Investigación de las rutas biosintéticas de una determinada molécula.
- Determinación o valoración cuantitativa

Figura 2

Clasificación de los compuestos fitoquímicos



Nota. Tomado de Campos-Vega y Dave Oomah, 2013.

Alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en bacterias, hongos y principalmente en plantas superiores (Qiu *et al.*, 2014). Se define como un compuesto orgánico cíclico que contiene nitrógeno en estado de oxidación negativo, lo cual lo vuelve de limitada distribución en los organismos. Existen cerca de 20 000 alcaloides conocidos aislados de plantas; también se han encontrado en hongos, organismos acuáticos como algas, dinoflagelados, peces globo y en animales terrestres como insectos, salamandras, sapos y ranas; los alcaloides se han clasificado en dos grandes grupos: alcaloides de indol y alcaloides de isoquinolina (Verpoorte, 2005).

Dentro de las actividades biológicas atribuidas a estos compuestos, se encuentran: la actividad antitumoral, el efecto sobre el sistema nervioso central, el efecto antiinflamatorio, los efectos antibacteriano, antiviral, insecticida, y el efecto hipoglucémico (Qiu *et al.*, 2014).

Saponinas

Las saponinas son glucósidos de C27 a C30 que se encuentran en las plantas en grandes cantidades, aunque también se ha encontrado en ciertos organismos marinos como los pepinos de mar, erizos de mar y estrellas de mar en cantidades variadas principalmente como una fuente de defensa. Existen 3 principales grupos: glucósidos triterpénicos, glucósidos de esteroides y glucósidos de alcaloides esteroides (Hostettmann & Marston, 2005).

Cuando las saponinas son agitadas en agua forman una especie de espuma jabonosa, presenta además efectos hemolíticos sobre los glóbulos rojos, propiedades de unión al colesterol y sabor amargo (Savage, 2016).

Taninos

Son compuestos fenólicos o polifenoles, que se encuentran abundantemente en el reino vegetal; poseen una estructura comprendida por un anillo aromático de benceno con uno o más sustituyentes hidroxilo, representando un grupo grande y diverso de moléculas que incluye a los hidrolizados, condensados y complejos. Los alimentos y bebidas ricos en taninos poseen un carácter astringente cuando precipitan con las proteínas salivales (Ky *et al.*, 2016). Clásicamente se conoce a los taninos como metabolitos secundarios capaces de convertir la piel fresca de animal en cuero (curtiembre). Actualmente se clasifican de acuerdo con sus características estructurales en: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Sieniawska & Baj, 2017).

Aunque se ha descubierto taninos en algas, se sabe que en las plantas brindan protección ante infecciones microbianas, ataques de insectos y animales; pueden ejercer sus efectos biológicos de dos maneras diferentes: como inabsorbibles, estos suelen ser estructuras complejas con propiedades aglutinantes que pueden producir efectos antioxidantes, antimicrobianos y antimutagénicos en el tracto gastrointestinal, o como absorbibles, generalmente son estructuras de bajo peso molecular que se absorben fácilmente (Ky *et al.*, 2016; Sieniawska & Baj, 2017)

Flavonoides

Son un metabolito secundario que poseen una estructura fenólica, ampliamente distribuido en el reino vegetal; los flavonoides son utilizados por las plantas para su crecimiento, defensa y protección ante el estrés biótico y abiótico como los rayos UV; son responsables del color y aroma de las flores y las frutas (Panche, Diwan & Chandra, 2016). Estos compuestos se subdividen en flavonoles, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y antocianinas (Kaleem & Ahmad, 2018).

Los grupos funcionales hidroxilo de los flavonoides median sus efectos antioxidantes eliminando los radicales libres y/o quelando iones metálicos; muchos estudios han sugerido que, debido a su alta propiedad antioxidante, los flavonoides tienen efecto contra enfermedades infecciosas, degenerativas, cardiovasculares, otras enfermedades relacionadas con la edad y cáncer (Kumar & Pandey, 2013).

Terpenos

Son metabolitos secundarios y corresponden al grupo más grande, están formados por cinco unidades de isopreno que se ensamblan entre sí de varias maneras. Los terpenos son hidrocarburos simples mientras que los terpenoides son una especie de terpenos modificados, con diferentes grupos funcionales y un grupo metilo oxidado movido o eliminado en varias posiciones; de acuerdo a sus unidades de carbono se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos y triterpenos (Perveen, 2018).

Estos isoprenoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y animales, siendo estos últimos terpenos más grandes como los esteroides y el escualeno (Cox-Georgian, Ramadoss, Dona & Basu, 2019); también se encuentran en hongos, organismos marinos, insectos, esponjas, líquenes y ceras protectoras de insectos (Perveen, 2018). Se ha descrito diferentes propiedades biológicas, incluidas la actividad antitumoral, antiinflamatoria, antibacteriana, antimetabólica, efecto antiviral, prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, actividad hipoglucémica, resistencia a insectos, inmunorregulación, antioxidación, antienvjecimiento y neuroprotección (Yang *et al.*, 2020).

Cumarinas

Las cumarinas son una clase de compuestos fenólicos formados por la asociación de anillos de β -pirona con benceno (Gupta & Pandey, 2020). La presencia de un átomo electronegativo permite la formación de enlaces de hidrógeno, aumentando la solubilidad (Penta, 2016). Con base en el patrón de sustitución, las

cumarinas muestran propiedades anticancerígenas, anticoagulantes, antimicrobianas, antioxidantes, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, y actividad antiinflamatoria (Penta, 2016).

Resinas

El término “resina” se usa para describir productos amorfos, más o menos sólidos, de naturaleza química compleja, que al calentarse se ablandan y finalmente se derriten; son insolubles en agua, pero se disuelven más o menos por completo en alcohol, cloroformo y éter. Químicamente, las resinas son mezclas complejas de ácidos de resina, alcoholes de resina (resinoles), fenoles de resina (resinotannoles), ésteres y compuestos químicamente inertes conocidos como resenos. Se asocian también con aceites volátiles (oleorresinas), con gomas (gomorresinas) o con aceite y goma (oleogomorresinas). Sin embargo, no se puede hacer una distinción estricta entre estos grupos, ya que productos como la masilla y el amoníaco, que generalmente se consideran una resina y una resina de goma, respectivamente, contienen aceite volátil. Las resinas también se pueden combinar de forma glucosidal con azúcares, como en la familia Convolvulaceae (Trease G., & Evans WC. (1983).

Métodos de Extracción de Metabolitos

Tradicionalmente se ha obtenido los compuestos de las plantas a través de una extracción sólido-líquido; los métodos incluyen la maceración, infusión, extracción Soxhlet y destilación por vapor, donde todos involucran una difusión del solvente por las células de la planta, solubilización de los fitocompuestos dentro de la matriz vegetal, y finalmente una difusión del solvente rico en fitocompuestos hacia el exterior de las células de la planta (Harbourne *et al.*, 2013).

Solventes Químicos

Figura 3

Polaridad de los diferentes solventes

Índice de polaridad	Disolvente	Viscosidad cP, 20°C	Punto de ebullición °C (1 atm)	Número de miscibilidad (M)	Corte (nm) Lambda
-0.3	N-decano	0.92	174.1	29	
-0.4	Iso-octano	0.50	99.2	29	210
0.0	N-hexano	0.313	68.7	29	
0.0	Ciclohexano	0.98	80.7	28	210
1.7	Éter butílico	0.70	142.2	26	
1.8	Trietilamina	0.38	89.5	26	
2.2	Éter isopropílico	0.33	68.3		210
2.3	Tolueno	0.59	100.6	23	285
2.4	P-xileno	0.70	138.0	24	290
3.0	Benceno	0.65	80.1	21	280
3.3	Éter bencílico	5.33	288.3		
3.4	Cloruro de metileno	0.44	39.8	20	245
3.7	Cloruro de etileno	0.79	83.5	20	
3.9	Alcohol butílico	3.00	117.7		
3.9	Butanol	3.01	177.7	15	
4.2	Tetrahidrofurano	0.55	66.0	17	220
4.3	Acetato de etilo	0.47	77.1	19	260
4.3	1-propanol	2.30	97.2	15	210
4.3	2-propanol	2.35	117.7	15	
4.4	Acetato de metilo	0.45	56.3	15, 17	260
4.5	Metilacetona	0.43	80.0	17	330
4.5	Ciclohexanona	2.24	155.7	28	210
4.5	Nitrobenzeno	2.03	210.8	14, 20	
4.6	Benzonitrilo	1.22	191.1	15, 19	
4.8	Dioxano	1.54	101.3	17	220
5.2	Etanol	1.20	78.3	14	210
5.3	Piridina	0.94	115.3	16	305
5.3	Nitroetano	0.68	114.0		
5.4	Acetona	0.32	56.3	15, 17	330
5.5	Alcohol bencílico	5.80	205.5	13	
5.7	Metoxietanol	1.72	124.6	13	
6.2	Acetonitrilo	0.37	81.6	11, 17	190
6.2	Ácido acético	1.26	117.9	14	
6.4	Dimetilformamida	0.90	153.0	12	
6.5	Dimetilsulfoxida	2.24	189.0	9	
6.6	Metanol	0.60	64.7	12	210
7.3	Formamida	3.76	210.5	3	
9.0	Agua	1.00	100.0		

Nota. Tomado de Cienytech, 2012.

Metanol

El metanol es un producto químico que se produce en todo el mundo, su producción es de interés académico y comercial; sus usos abarcan principalmente para la producción de formaldehído (Chinchen *et al.*, 1988). Es un líquido incoloro, móvil, neutro y de ligero olor alcohólico, es higroscópico, útil como fluido secante, completamente miscible con agua, por ello es muy usado como solvente de sustancias

orgánicas a pesar de que es volátil, inflamable y tóxico (El-Zeftawy, 1995), contribuyendo así con la I+D.

Cloroformo

El cloroformo, también llamado triclorometano, es un líquido claro, denso, incoloro y no inflamable con un olor agradable, de sabor dulce e insoluble en agua, el cloroformo se disuelve fácilmente en alcohol, acetona, gasolina y otros solventes orgánicos. Se utiliza como solvente en laboratorios debido a su relativa falta de reactividad y miscibilidad con la mayoría de los líquidos orgánicos, así como en síntesis orgánica y en la purificación de penicilina y ADN (Fisher Scientific, 2021).

Acetato de Etilo

El acetato de etilo es un líquido transparente e incoloro con olor afrutado. Posee un punto de inflamación a $-4,44\text{ }^{\circ}\text{C}$, es menos denso que el agua y con vapores más pesados que el aire. El acetato de etilo es un éster de acetato formado entre el ácido acético y el etanol; tiene un papel como disolvente aprótico polar, es inhibidor de la piroglutamil-peptidasa I (EC 3.4.19.3), y un metabolito de *Saccharomyces cerevisiae* (PubChem, 2021).

Butanol

El 1-butanol también se conoce como n-butanol o alcohol butílico (a veces también llamado biobutanol cuando se produce biológicamente), es un alcohol con una estructura de 4 carbonos que se utiliza principalmente como disolvente, como intermediario en la síntesis química y como combustible. Hay cuatro estructuras isoméricas para el butanol y se produce en pequeñas cantidades por fermentación microbiana intestinal a través de la ruta metabólica del butanoato, donde se ha encontrado en *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Synechococcus* y *Thermoanaerobacterium* (Human Metabolome Database, 2021).

Cromatografía

Cromatografía de Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (*Thin layer chromatography*, TLC) es una técnica cromatográfica utilizada para separar los componentes de una mezcla utilizando un respaldo inerte (vidrio, aluminio, etc.) que sostiene una fase estacionaria delgada (Tabla 2). La TLC se puede utilizar a escala preparativa para purificar pequeñas cantidades de un compuesto, además es ampliamente utilizada por su simplicidad, bajo costo relativo, alta sensibilidad y velocidad de separación. La TLC funciona según el mismo principio que toda la cromatografía: un compuesto tendrá diferentes afinidades por las fases móvil y estacionaria, afectando la velocidad a la que migra. El objetivo de TLC es obtener puntos bien definidos y separados de los diferentes compuestos (Touchstone, 1992).

Tabla 1

Fases estacionarias comunes, mecanismo cromatográfico y aplicaciones.

Fase estacionaria	Mecanismo cromatográfico	Aplicación típica
Gel de sílice	Adsorción	Esteroides, aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, lípidos, aflatoxina, bilis, ácidos, vitaminas, alcaloides
Gel de sílice RP	Fase inversa	Ácidos grasos, vitaminas, esteroides, hormonas, carotenoides
Celulosa, tierra de diatomeas	Dividir	Carbohidratos, azúcares, alcoholes, aminoácidos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos
Oxido de aluminio	Adsorción	Aminas, alcoholes, esteroides, lípidos, aflatoxinas, ácidos biliares, vitaminas, alcaloides
Celulosa PEI	Intercambio iónico	Ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos, purinas, pirimidinas
Silicato de magnesio	Adsorción	Esteroides, pesticidas, lípidos, alcaloides

Factor de retención

Una vez completada la separación, los compuestos individuales aparecen como manchas separadas verticalmente. Cada mancha tiene un factor de retención

(Rf) que es igual a la distancia migrada sobre la distancia total cubierta por el solvente. El valor de Rf se puede utilizar para identificar compuestos debido a la singularidad de cada uno. Al comparar dos compuestos diferentes en las mismas condiciones, el compuesto con el mayor valor de Rf es menos polar porque no se adhiere a la fase estacionaria tanto tiempo como el compuesto polar, que tendría un valor de Rf más bajo (Touchstone, 1992).

Disolvente (fase móvil)

La selección adecuada de un solvente es importante en el TLC y puede requerir un grado de prueba y error. Un disolvente común es el hexano:acetato de etilo (1:1). La variación de la relación puede tener un efecto pronunciado de Rf. Los valores de Rf varían de 0 a 1, donde 0 indica que la polaridad del solvente es muy baja y 1 indica que la polaridad del solvente es muy alta. Si el valor es 0, se debe aumentar la polaridad del solvente, si el valor es 1, se debe disminuir la polaridad del solvente (Touchstone, 1992).

Visualización

Se puede utilizar placas fluorescentes, para observar varios compuestos iluminando la placa con UV de onda corta. El enfriamiento provoca manchas oscuras en la superficie de la placa. Para los compuestos que no son activos frente a los rayos UV, se pueden utilizar varios colorantes químicos (revelador). Estos pueden ser muy generales o pueden ser específicos para una molécula o grupo funcional en particular (Touchstone, 1992).

Cromatografía de Columna

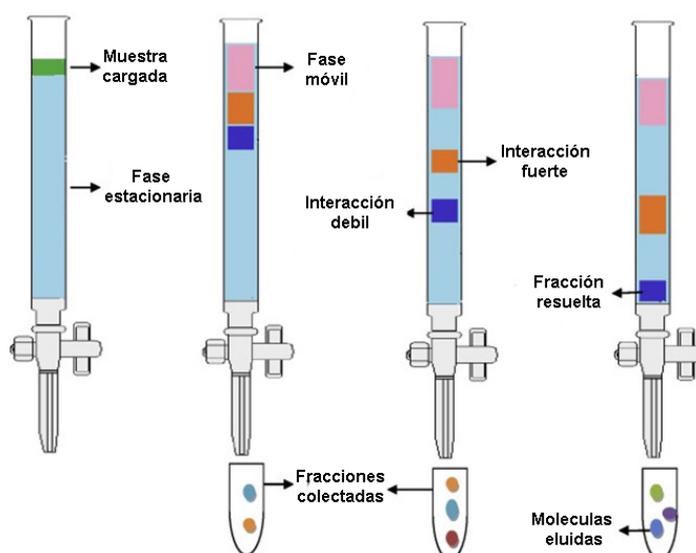
La cromatografía de columna (CC) es la técnica más eficaz utilizada en la separación de extractos de plantas en sus componentes de forma pura. Este es un método cromatográfico preparativo y la fase estacionaria, generalmente con gel de sílice se empaqueta en una columna y la fase móvil (eluyente) se pasa a través de la columna después de cargar la muestra (extracto) en la parte superior de la fase

estacionaria (es decir, junto con gel de sílice). La fase móvil transporta los compuestos presentes en la mezcla a una velocidad diferente según sus afinidades con las fases estacionaria y móvil. Finalmente, los componentes de los compuestos se pueden recolectar junto con la fase móvil. La cromatografía en columna es de dos tipos: la cromatografía de columna normal y la cromatografía de columna ultrarrápida (Singh *et al.*, 2021).

La cromatografía de columna también se utiliza para separar proteínas, para analizar o caracterizar diferentes materiales y/o reacciones, y se puede utilizar para estudiar la cinética de una reacción enzimática. (Regenstein & Regenstein, 1984). En la cromatografía de columna se utilizan varias fases estacionarias, como sílice, alúmina, fosfato de calcio, carbonato de calcio, almidón y magnesia, y diferentes composiciones de disolventes basadas en la naturaleza de los compuestos que se van a separar y aislar. La optimización del método es una tarea importante en la separación de diferentes grupos de compuestos en extractos vegetales (Srivastava *et al.*, 2021).

Figura 4

Esquema de una cromatografía de columna



*Nota. Adaptado de "Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials" (p.16), por Srivastava *et al.*, (2021)*

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN es una técnica que ha sido empleada en la determinación de la estructura de una gran parte de moléculas orgánicas o biológicas, siendo una herramienta de uso general en lo que respecta a la identificación de estructuras presentes en compuestos y mezclas, ya sean estas líquidas o sólidas (Lambert, Mazzola y Ridge, 2019).

La RMN involucra la carga magnética del núcleo cuando estos se encuentran en un campo magnético provisto y los desplazamientos que ocurren en las ondas de radio del espectro que se está observando. Cuando se realiza una espectroscopia se obtiene un espectro el cual presenta características como frecuencia, intensidad o la forma de las líneas espectrales, dependiendo todas estas características de los parámetros moleculares del RMN. De esta manera la realización de una espectroscopia de RMN resultará en un espectro el cual será evaluado e interpretado según los parámetros iniciales utilizando distintos modelos y así obtener datos que pueden servir para evaluar problemas como la determinación de estructuras u otros (Harris, 1986).

Fundamentos básicos de la espectroscopía de RMN

El núcleo de los átomos cuando es afectado por un fuerte campo magnético empieza a comportarse de manera similar a un pequeño magneto, empezando a resonar en una frecuencia específica cuando este es atravesado por múltiples ondas de radiofrecuencia. La frecuencia a la cual resuena el núcleo es medida y convertida en un espectro RMN en el cual las frecuencias de todos los átomos se mostrarán como picos en un gráfico, cuya altura dependerá del número de núcleos que resuena en cierta frecuencia (intensidad de la señal). Los valores de dichas frecuencias también pueden ofrecer información acerca de otros átomos que se encuentran en los alrededores (Zinkel, 2019).

Aplicaciones de la espectroscopia de RMN

La RMN ha encontrado múltiples aplicaciones a través de varias disciplinas en campos como la medicina, la investigación científica y numerosas industrias. Esta es de gran importancia en la biología estructural permitiendo el análisis y la caracterización de macromoléculas orgánicas. Otras de las aplicaciones de la RMN son el diseño y cribado de drogas, análisis de metabolitos, análisis de químicos, dinámicas moleculares, hidratación de proteínas, entre otras (Michigan State University, 2010).

Capítulo III: Materiales Y Métodos

Localización

La ejecución del trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Ciencias Químicas de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Sede Santo Domingo, Km 24 vía a Quevedo.

Muestras Colectadas

La planta conocida como “Guarinbishe” por los habitantes de la zona es descrita como una especie vegetal que provoca reacciones alérgicas, dato que fue compartido como parte del conocimiento ancestral de los habitantes de la zona. Con esta información se decidió realizar un estudio fitoquímico de la planta y determinar el componente causante de la irritación para lo cual se tomaron las hojas maduras en base a la información que aportaron los habitantes. Las muestras se colectaron el 14 de agosto del 2021 a las 13h00 aproximadamente, en el cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe con Latitud (DMS): S 4°44'18,68892" y Longitud (DMS): W 79°8'42,01692", a 1200 m.s.n.m; temperatura ambiental de 31 °C y humedad relativa del 98%.

Se tomaron muestras de las hojas del árbol, evitando tomar folíolos necrosados, con manchas o dañados por mordeduras de insectos; colectando ~10 kg de hojas frescas las cuales fueron lavadas con agua común para eliminar los residuos adheridos (Cornell Nutrient Analysis Laboratory, 2021) y transportadas en sacos de nylon a la ciudad de Loja.

Identificación de la Planta

Para la identificación, se tomó muestras fértiles de la planta, las que fueron llevadas al Herbario de la ESPE Sede Santo Domingo y con la ayuda del botánico Dr. Fernando Hurtado se realizó la determinación de la especie. La descripción morfológica de las hojas, flores y fruto se realizó de acuerdo con lo publicado por Ramírez (2004).

Tratamiento

Luego de 24 horas las muestras colectadas se trasladaron a la ciudad de Loja, donde fueron sometidas a secado a temperatura ambiente y aireación constante durante 7 días, posteriormente en los laboratorios de la Universidad se realizó un secado final a 40 °C en una estufa (Memmert 30-160) durante 48 h.

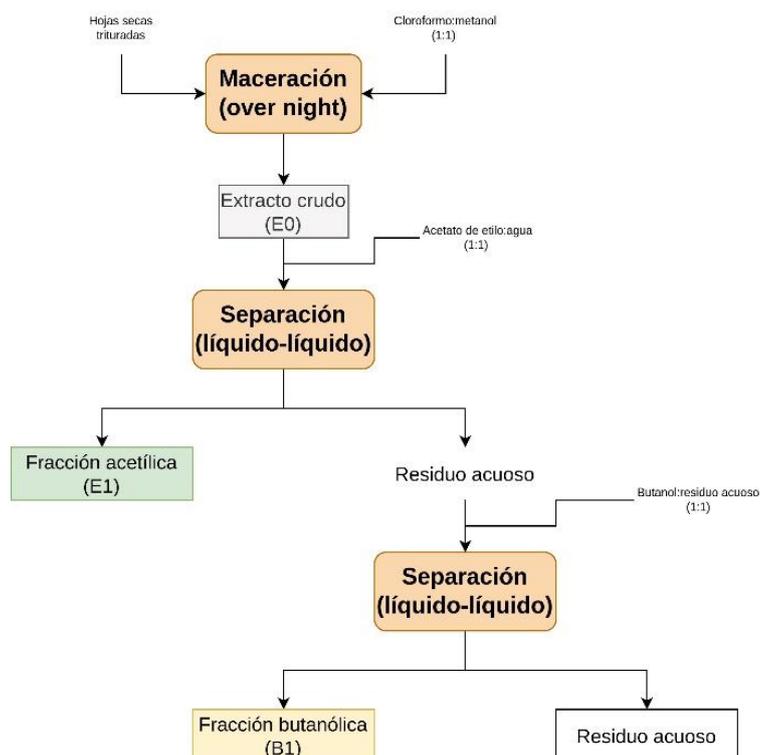
Obtención del Extracto

Se pesaron 200 g de hojas secas, previamente trituradas con un molino común, posteriormente se colocaron en un matraz y se añadió 1,2 L de una solución de metanol:cloroformo (1:1), cubriendo completamente la muestra y dejándola reposar durante la noche (overnight).

El extracto obtenido se filtró y luego se utilizó un rotavapor (LABOCON, modelo LRE-801 Touch) para recuperar los solventes y obtener el extracto crudo (E0). Se obtuvieron aproximadamente 53 g de pasta E0, de la cual se separaron 10 g para pruebas fitoquímicas y el BSLA. ~40 g para otra separación con diferentes solventes y los ~3 g restantes se perdieron en el proceso de trasvase de recipientes. Se resuspendieron ~40 g del extracto y se colocaron en un embudo de separación para proceder con una separación líquido-líquido con 140 mL de una solución de acetato de etilo: agua (1:1); la fase acetílica se colocó en un recipiente y la fase acuosa se lleva nuevamente al embudo de separación con 70 mL de acetato de etilo, se agita y se deja reposar por 30 min, se repite este proceso 1 vez más, sumando un ciclo de 3 repeticiones. La fase acetílica se lleva al rotavapor para recuperar el extracto intermedio (E1). Se tomo la fase acuosa remanente y se realizó el mismo procedimiento (Figura 5), pero usando butanol en esta ocasión, la fase butanolica se lleva al rotavapor para recuperar el extracto (B1).

Figura 5

Esquema de obtención del extracto y sus respectivas fracciones



Ensayo de Letalidad de *Artemia salina* (BSLA)

Estandarización

Se realizó la estandarización del pie de cría de artemias preparando una solución de agua de mar artificial iniciando con una concentración de 3.8 % empleando cloruro de sodio y regulando el pH entre 8 – 8.5 utilizando carbonato de sodio (Na_2CO_3 0.1 N). Se varió la densidad de siembra y se utilizó una bomba de pecera como fuente de oxígeno y una lámpara común como fuente de iluminación (Hamidi *et al.*, 2014).

Para realizar el BSLA se tomaron 10 nauplios recién eclosionados con una pipeta y se colocaron en un pocillo el cual fue aforado hasta lograr un volumen de 1 mL. El extracto E0 obtenido anteriormente fue diluido en solución salina (0.9 %) usando acetona (9.35 %) y Tween 20 (3.74 %) para incrementar la solubilidad. Se prepararon varias concentraciones del extracto (Tabla 3) y se añadió 1 mL de esta a los pocillos, posteriormente se observaron a los nauplios empleando un

estereomicroscopio en intervalos de 1h y se registraron el número de individuos vivos y muertos (Naidu *et al.*, 2014).

Como control positivo se empleó el benfurocarb comercial (Nakar) con una concentración del 0.29 % y como control negativo se usó 1 mL de una solución salina (0.9 %) con de acetona (9.35 %) y Tween 20 (3.74 %) empleada para solubilizar los extractos. Se realizó el mismo procedimiento con el extracto E1 y B1. El experimento se realizó por triplicado.

Tabla 2

Concentraciones evaluadas de los extractos en el BSLA

N°	Concentración [mg/mL]	N°	Concentración [mg/mL]
1	18,06	8	3.40
2	16.26	9	3.17
3	14.45	10	2.94
4	12.65	11	2.72
5	10.84	12	2.49
6	9,03	13	2.26
7	4.53	14	1.13

Determinación de la LC50

Se calculó la mortalidad promedio de cada tratamiento según la siguiente fórmula (Waghulde, 2019):

$$Mortalidad (\%) = \frac{Nauplios\ muertos}{Nauplios\ totales} * 100$$

$$Mortalidad\ total(\%) = mortalidad\ tratamiento - mortalidad\ control$$

El valor del LC50 corresponde a la concentración que es capaz de matar al 50% de los nauplios. Esta fue calculada utilizando el software estadístico R utilizando

un modelo de dosis-respuesta ajustado a una función log-logística de tres parámetros (LL.3).

Screening Fitoquímico

Prueba para determinar la presencia de saponinas

Se colocó una alícuota del extracto en un tubo de ensayo y se añadieron 3 mL de agua destilada para posteriormente agitar el tubo repetidamente. La formación de una capa de espuma durante más de 1 min indica un resultado positivo para saponinas (Muharrami *et al.*, 2020). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de flavonoides

Se elaboró una solución tomando una alícuota de extracto, a continuación, se añadieron unas 5 gotas de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%. La aparición de una coloración amarillenta la cual desaparece al añadir unas 5 gotas de una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) indica un resultado positivo para flavonoides (Pant *et al.*, 2017). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de taninos y fenoles

Se elaboró una solución tomando una alícuota de extracto, a continuación, se añadieron 2mL de una solución de cloruro férrico al 1%. La aparición de una coloración azul oscura indica un resultado positivo para taninos (Nayak *et al.*, 2014). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de alcaloides

Se elaboró una solución tomando una alícuota de extracto, a continuación, se añadieron 2 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% y luego se añadieron 3 gotas del reactivo de Wagner. La presencia de turbidez indica un resultado positivo para alcaloides (López, 2017). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de terpenoides

Se tomó una alícuota de extracto y fue disuelta con 2 mL de cloroformo en un tubo de ensayo, luego se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por las paredes del tubo. La aparición de una coloración café rojiza indica la presencia de terpenoides (Iqbal *et al.*, 2015). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de cumarinas

Se elaboró una solución tomando una alícuota del extracto, a continuación, se añadieron 3 gotas de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%. La aparición de una coloración amarillenta la cual desaparece al añadir 0.5 mL de una solución de ácido clorhídrico 1 N (HCl) indica un resultado positivo para cumarinas (López, 2017). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Prueba para determinar la presencia de resinas

Se tomo una alícuota de extracto y se disolvió en 2.5 mL de éter de petróleo, luego la solución fue filtrada para posteriormente añadir 5 mL de una solución de acetato de cobre al 10 %. La formación de una capa petroléa de color verde esmeralda indica un resultado positivo para resinas (Trease & Evans, 1983). Se aplica el mismo método para cada muestra a analizar.

Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Las placas de cromatografía se preparan colocando una línea a ~0.5 cm del borde inferior (línea de origen) y una línea a ~0.5 cm en el borde superior (línea de frente de solvente) y en esta franja se etiqueta con la muestra correspondiente. A continuación, se disolvió una porción de la muestra en un solvente volátil (acetona, por ejemplo) y con un tubo capilar se coloca pequeñas alícuotas en las placas de cromatografía en la línea de origen, formando una franja de ~4 mm; luego se introducen las placas en una mezcla de hexano y acetato de etilo (2:1), donde el solvente debe estar por debajo de la línea de origen. Se dejó tapado hasta que los

metabolitos migren a la línea de frente de solvente y se extraen del recipiente para su secado.

Finalmente se calcula el R_f mediante la siguiente fórmula (Chemistry Libretext, 2019):

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

Cromatografía de Columna

Se empleó una columna cromatográfica de 50 cm de longitud y 5 cm de diámetro, a la cual se le colocó algodón desengrasado en el extremo inferior a modo de tapón, a continuación, se preparó una solución de hexano:acetato (fase móvil) de etilo en una proporción de 2:1 la cual se mezcló con Silica gel 60 (fase estacionaria) y luego se vertió en la columna dejando unos 10 cm libres. Luego, 1 g del extracto E1 solubilizado en acetato de etilo se colocó cuidadosamente sobre la silica, seguidamente se empezó a añadir la solución de solventes preparada suavemente hasta cubrir ampliamente la muestra. Finalmente, la columna empezó a eluir lentamente y se empezaron a separar fracciones de un volumen similar a las cuales se le realizó un TLC para determinar la similitud entre las fracciones y posteriormente extraer el solvente en el rotavapor para posteriores análisis. Cabe recalcar que es necesario seguir añadiendo la solución de solventes o fase móvil para evitar que la columna se seque.

Espectroscopia de RMN

Una alícuota del extracto E0 y E1 fueron enviados a la Universidad Nacional de Colombia donde se realizó la espectroscopia de RMN.

Capítulo IV: Resultados Y Discusión

Identificación de la Planta

Para la descripción morfológica se utilizaron las hojas, frutos y flores. Las hojas poseen un tamaño de ~87 cm desde la base del peciolo hasta el ápice del foliolo (Figura 6); de acuerdo con su estructura, son compuestas imparipinnadas, peciolada (peciolo visible), de base oblicua, de ápice acuminado, con foliolo mesófilo que mide alrededor de 20 cm de largo y 7 cm de ancho (Figura 7), con limbo lanceolado, borde ondulado, superficie nítida, consistencia coriácea, los foliolos poseen nervio primario, secundario, intersecundario y terciario con disposición cladódroma, la posición de las hojas en el tallo es alterna y espiralada (Figura 8).

Figura 6

Tamaño y apreciación morfológica de la hoja y los foliolos



Figura 7

Tamaño y apreciación morfológica del foliolo

**Figura 8**

Distribución de las hojas en el tallo



En lo que respecta a los frutos, son una drupa de forma ovalada de 1 – 1.5 cm de longitud y 0.8 – 1 cm de ancho, cuyo exocarpo toma una coloración café rojiza estriada al madurar (Figura 9) el cual se desprende con facilidad dejando a la vista un mesocarpo de un color blanquecino que contiene una única semilla. Se obtuvieron

inflorescencias inmaduras, donde se aprecian pocas características como su origen axilar, su disposición es paniculada, cuyas brácteas son de color rojizo en un estadio temprano (Figura 10). Material de flores no disponible.

Figura 9

Apreciación morfológica de los frutos



Figura 10

Apreciación morfológica de las inflorescencias



Cinco características fueron claves para la identificación de la planta en base a su morfología. La primera fue las hojas compuestas imparipinnadas, es decir que terminan en un solo foliolo; un olor a mango; el fruto en forma de drupa con una sola semilla de color blanco en el interior; los botones florales permitieron observar 5 sépalos y un capullo de pétalos blanco; y finalmente su característica más importante, la savia blanquecina que se tornaba marrón oscuro luego de un tiempo de exposición al aire, esto es debido a la oxidación de la savia, también la savia se mantiene adherida y con agua común es difícil de lavar. Mediante la búsqueda bibliográfica con estas características nos encontramos a la familia Anacardiaceae, la cual fuimos derivando hasta llegar a su especie: *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze.

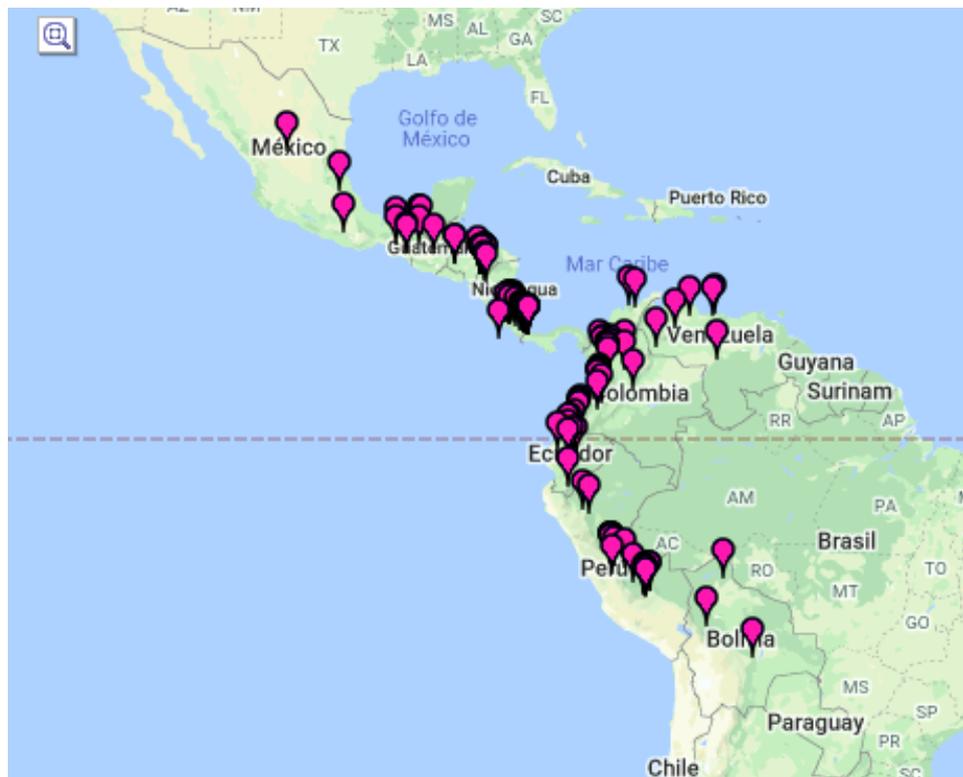
La familia Anacardiaceae posee aproximadamente 700 especies (Aguirre, 2018) que se encuentran distribuidas por diferentes zonas tropicales en todo el mundo, aunque también se encuentra esta familia en zonas templadas. Algunas especies de esta familia son conocidas por provocar alergias de contacto debido a la presencia de compuestos fenólicos en la resina (Martínez-Millán & Cervillos-Ferriz, 2005). Dentro de las anacardiáceas se encuentra el género *Toxicodendron*, el cual contiene árboles, arbustos y enredaderas; las plantas de este género son muy conocidas por causar dermatitis alérgica de contacto, por ejemplo la hiedra venenosa (*Toxicodendron radicans*) omnipresente en América del Norte, el roble venenoso occidental (*Toxicodendron diversilobum*), roble venenoso del este o del Atlántico (*Toxicodendron pubescens* o *quercifolium*), el zumaque venenoso (*Toxicodendron vernix*) y el árbol chino de la laca (*Toxicodendron vernicifluum*) distribuido en muchos países asiáticos, entre los más nombrados (Lofgran & Mahabal, 2021).

En Ecuador existe una sola especie de *Toxicodendron* (eFloras.org, n.d.), que corresponde con la especie objeto de estudio en este trabajo (*Toxicodendron striatum*), aunque ya existen reportes y descripciones botánicas de la planta en muchos herbarios en línea (Herbario JBB en línea, 2022; Schoch *et al.*, 2020; Instituto

de Biología UNAM, 2019; Alzate *et al*, 2013; Red de Herbarios del Noroeste de México, n.d.; SERNEC, n.d.; Universidad EIA, n.d.), no existen estudios fitoquímicos, filogenéticos, metabolómicos o moleculares actuales que incrementen la información acerca de los metabolitos en esta especie en específico. *Toxicodendron striatum* fue descrito por primera vez por Kuntze (1891) y se encuentra distribuido desde México hasta Bolivia (Figura 11), incluido Ecuador, donde existen 16 reportes de esta planta en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi Tunguragua, Bolívar y Zamora Chinchipe; además se encontró que el árbol crece más en zonas tropicales predominantemente entre 1000 – 1500 m.s.n.m (Figura 12), según los datos públicos de Tropicos.org (n.d.).

Figura 11

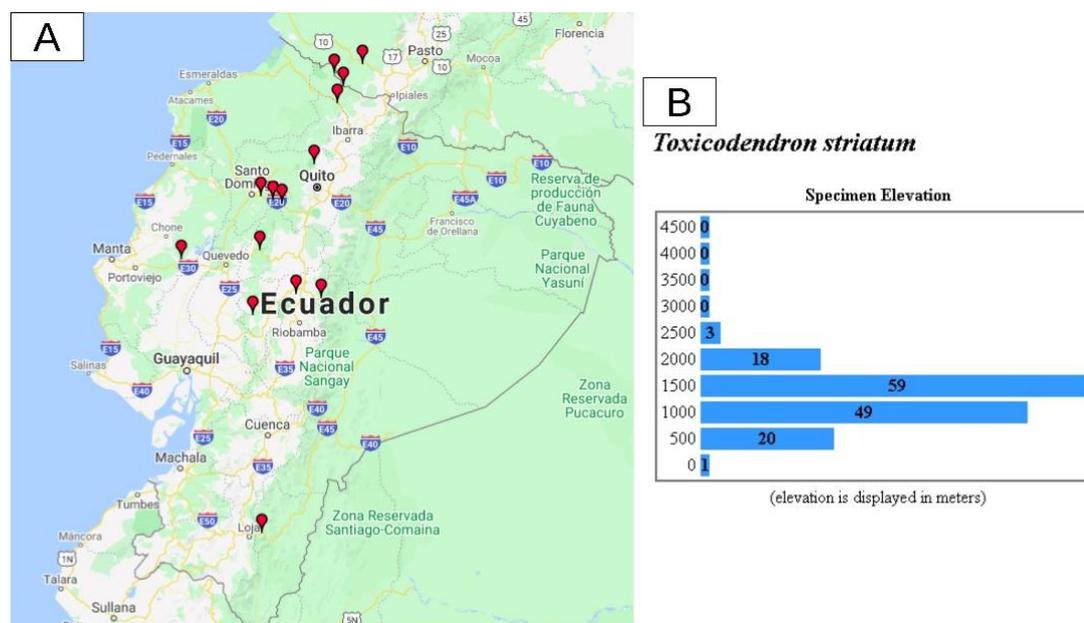
Distribución de Toxicodendron striatum en el continente americano



Nota. *T. striatum* se distribuye por las zonas tropicales. Adaptado de *Tropicos.org* (n.d.)

Figura 12

Reportes de distribución de Toxicodendron striatum



Nota. A) Reportes de la especie vegetal en el país. B) Distribución en las elevaciones (m.s.n.m.) donde se encuentra reportada la planta. Adaptado de *Tropicos.org* (n.d.)

Es compleja la identificación de *Toxicodendron striatum* ya que al realizar la búsqueda bibliográfica algunos autores la nombran como *Rhus striatum*, pero el nombre correcto es *Toxicodendron striatum*, a pesar de que los dos géneros se relacionan por su fruto y su resina; a diferencia de las especies del género *Rhus*, *Toxicodendron* provoca una reacción alérgica (Martínez-Millán & Cevallos-Ferriz, 2005). Además, en campo si no se observan flores o frutos, el investigador puede confundirse al momento de realizar la recolecta de hojas debido a su similitud con *Tapirira guanensis*, *Mauria ferruginea* (no registrada en Ecuador) y *Mauria heterophylla*, pero no poseen el látex que pasa de un color blanquecido a un negro oxidado (Alzate *et al.*, 2013; Smithsonian, n.d.).

Urushiol es un grupo de compuestos conformados por un grupo catecol y una cadena alquilo variable en el carbono 3 (C3) que se encuentra principalmente en las plantas del género *Toxicodendron* (Hodgson, 2012) (Figura 13). La reacción alérgica

de contacto por urushiol provoca inflamación de los tejidos blandos, como los de la cara (angioedema), pabellón de las orejas, epiglotis, glande y testículos, de acuerdo con la información recopilada de los habitantes de la zona, lo cual encaja con lo descrito en modelos con ratones, provocando hinchazón, enrojecimiento y descamación en la piel del oído (Kim *et al.*, 2016); también Moreno (2008) describe un caso clínico donde indica que los síntomas persistieron durante 15 días con presencia de eritemas y micropápulas. La reacción del urushiol se debe a que las glicoproteínas de la piel que no son solubles en agua sirven de disolvente para el urushiol, estabilizando las gotas de savia (Vogl, 2000).

Muchos otros compuestos son capaces de provocar dermatosis, por ejemplo, las saponinas, glucósidos, enzimas proteolíticas cianogénicas y alcaloides son capaces de penetrar la piel dañada, derivando en ampollas (Vaskrsija, 2021). Incluso Waghulde *et al.* (2019) reportó en su ensayo de artemias (BSLA) que la presencia de alcaloides, taninos y flavonoides podría explicar las propiedades citotóxicas del extracto de *Allium fistulosum* que evaluaron.

Clasificación Taxonómica

Luego de haber identificado a la planta “Guarinbishe” como *Toxicodendron striatum* o también aceptada como *Rhus striatum*, se logró realizar su clasificación taxonómica de acuerdo con Global Biodiversity Information Facility (Grant & Niezgoda, 2020):

Tabla 3*Clasificación taxonómica de la planta*

Taxón	Nombre
Reino	Plantae
Filo/División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Toxicodendron</i>
Especie	<i>Toxicodendron striatum</i>
Nombre científico	<i>Toxicodendron striatum</i> (Ruiz & Pav.) Kuntze

Rendimiento de los Extractos

El rendimiento de los extractos, así como una descripción de estos se encuentra indicado en la tabla 4.

Tabla 4*Rendimiento de las fracciones en 200 g de hojas secas*

N°	Fracción	Color	Consistencia	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
1	Cruda	Oscura	Pegajosa	53	26.5
2	Acetífica	Oscura	Pegajosa	9.05	4.53
3	Butanólica	Café claro	Cerosa	0.92	0.46

Screening Fitoquímico

El screening fitoquímico es un método cualitativo que nos permite identificar los metabolitos secundarios presentes en las plantas, las diferentes reacciones de coloración y precipitación indican resultados positivos y negativos a cada prueba realizada, encontrando taninos y fenoles, triterpenos y flavonoides en los extractos evaluados (Tabla 5) lo cual coincide con los resultados presentados por Li *et al.* (2021) en *Toxicodendron vernicifluum*.

Las saponinas se sintetizan como respuesta al estrés biótico y abiótico, su producción es una estrategia costo-efectiva para combatir a los patógenos; en los

insectos, las saponinas aumentan la tasa de mortalidad formando complejos enzimáticos con las proteasas digestivas, influyendo así en los procesos de digestión de los insectos; también pueden tener una actividad insecticida saludable al desarrollar complejos de colesterol que causan toxicidad celular y falla ecdisial del insecto (Zaynab *et al.*, 2021); esto contrasta con la presencia de saponinas en el extracto E0 y las subfracciones E1 y B1, que probablemente brindan protección a la planta. Jaramillo-Jaramillo *et al.* (2016) reportan que a bajas concentraciones las saponinas y los polifenoles pueden ser letales para *Artemia salina*.

Compuestos fenólicos como el urushiol poseen una actividad antifúngica, por lo que podrían ser importantes mecanismos de defensa de la planta previniendo algunas especies de hongos y bacterias (Hostettman *et al.*, 1999); a pesar de ello, es conocido que el urushiol también produce efectos alérgicos de contacto en seres humanos, y esto se debe a la cadena alifática (R). Pacheco *et al.*, (2021) encontraron que los urushioles son más alérgicos en comparación a otros compuestos análogos, debido a las insaturaciones en toda la cadena R (Figura 13). La cadena alifática larga permite la inserción y el tráfico del alérgeno dentro de las membranas biológicas, y la fracción catecólica permite la modificación covalente de las proteínas propias y permite la interacción con humanos.

Figura 13

Ejemplo de urushiol, compuesto por un catecol y una cadena R en la posición C3

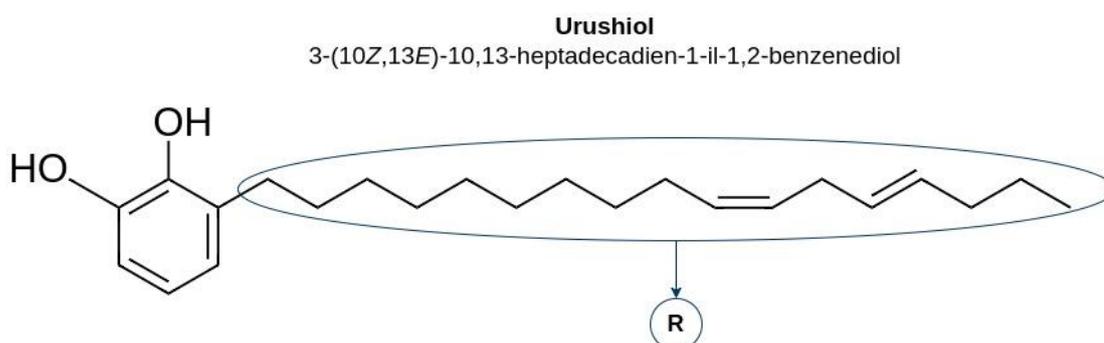


Tabla 5

Resultado de las pruebas realizadas en el screening fitoquímico, donde:

Metabolito	Nombre de la prueba	E0	E1	B1
Saponinas	Ensayo de espuma	+	+	+
Taninos y fenoles	Ensayo de cloruro férrico	+	+	+
Alcaloides	Ensayo de Wagner	+	-	+
Triterpenos	Prueba de Salkowski	+	+	+
Flavonoides	Ensayo de reactivo alcalino	+	+	+
Cumarinas	Ensayo de hidróxido de potasio 10%	-	-	-
Resinas	Ensayo de acetato de cobre	+	+	+

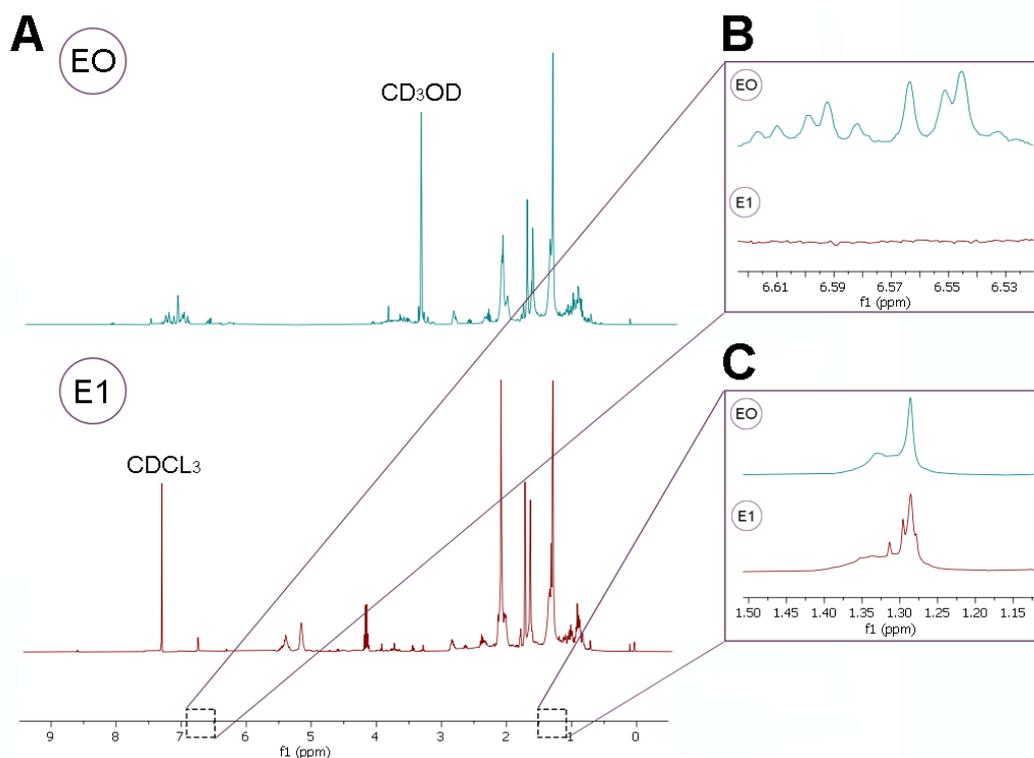
Nota. E0 = Extracto crudo, E1 = Extracto de acetato de etilo, B1 = Extracto butanólico.

Espectroscopía de RMN

La espectroscopía de RMN es capaz de detectar cualquier molécula que posea un átomo con un momento magnético nuclear diferente de 0, por ejemplo, el isótopo del hidrógeno ^1H posee una abundancia natural del 99,98%, haciendo posible detectar al menos una señal en cualquier compuesto biológico que sea relevante (Krishnan *et al.*, 2005). La espectroscopía de RMN en este trabajo se realizó para constatar la presencia del urushiol, compuesto al que se le atribuye la toxicidad causada por *Toxicodendron striatum* (Moreno, 2008). Esta se realizó utilizando metanol deuterado (CD_3OD) para el extracto E0 y cloroformo deuterado (CDCl_3) para el extracto E1 en un espectrómetro (Bruker AVANCE 400) a 400 MHz para ^1H .

Figura 14

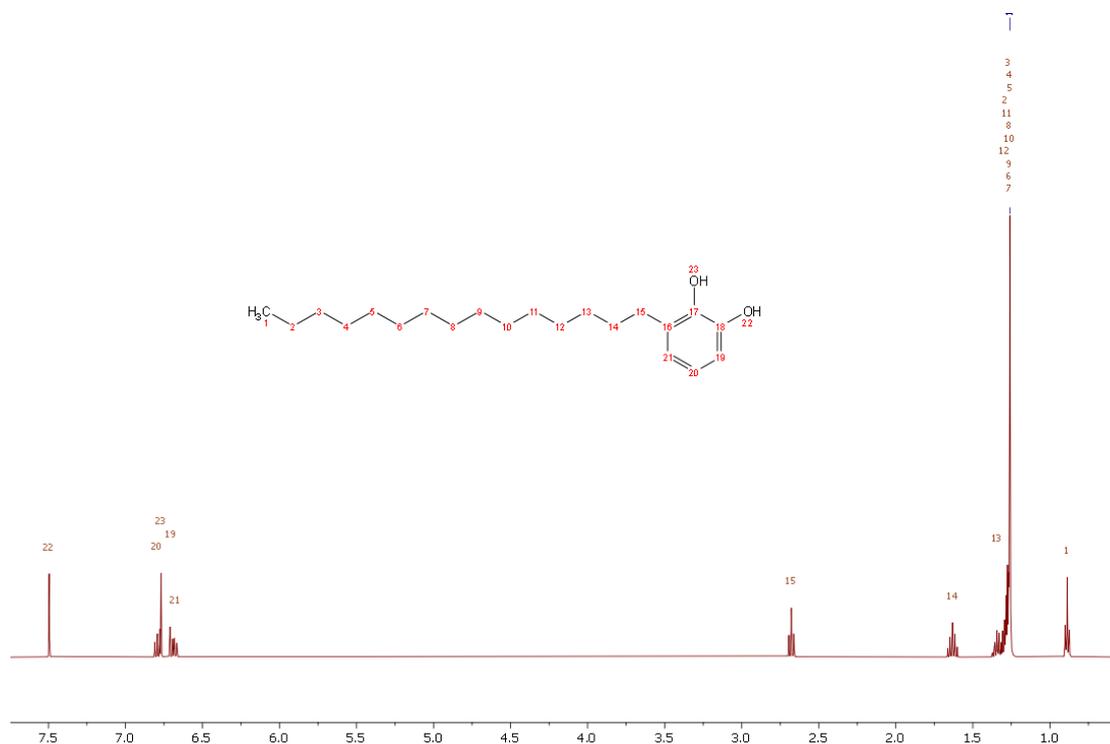
Espectro de RMN del extracto E0 y la subfracción E1



En el análisis de RMN se han podido encontrar dos desplazamientos (Figura 14) que aportan información para suponer que existe la presencia del urushiol en el extracto crudo (E0). En el primer desplazamiento (Figura 14 B) se puede encontrar la presencia del catecol (δ_{H} 6.53 - 6.62), valores que contrastan con Xie *et al.* (2016), sin embargo, no se puede apreciar señales en el espectro de la subfracción E1 (Figura 14 C); el segundo desplazamiento corresponde a una cadena alifática (δ_{H} 1.29) probablemente de 15 - 18 carbonos que se identificó mediante la simulación de un espectro de RMN de urushiol (Figura 15), donde los desplazamientos se asemejan (δ_{H} 1.26) con el extracto E0 y la subfracción E1.

Figura 15

Espectro 1H RMN de una molécula de urushiol predicho, usando el software MestReNova (v.14.2.0)



También podemos observar de forma general la presencia de metilos (δ_H 1.00) (da Costa *et al.*, 2018), triterpenos (δ_H 0.5 – 2) (Wang, 2013), flavonoides (δ_H 6 – 8) (Mabry *et al.*, 1964), glucosa (δ_H 3.45 – 3.95) (Pomin, 2012), saponinas (δ_H 0.9 – 2), taninos (δ_H 7.05 – 7.33) y fenoles (δ_H 6.85 – 7.5), estos últimos identificados utilizando la herramienta de predicción de moléculas del software MestReNova (v.14.2.0).

Ensayo de Letalidad de *Artemia salina* (BSLA)

El BSLA es un ensayo simple y adecuado como primer filtro cuando se busca determinar si un compuesto fitoquímico posee una actividad tóxica, al ser económico y no requerir de equipos complejos. En este estudio hemos evaluado un extracto vegetal de *Toxicodendron striatum* (E0) y dos subfracciones de este, obtenidas mediante un método de extracción líquido-líquido (E1 y B1); donde obtuvimos valores de LC50 en un rango entre 1.14 mg/mL y 23.28 mg/mL de acuerdo con la mortalidad

de los nauplios a lo largo de cuatro horas (Tabla 6). Hostettman *et al.* (1999) indican que el ensayo de letalidad de artemias (BSLA) resultó ser un método simple y eficiente para detectar la presencia de alqu(en)ilcatecoles.

Tabla 6

LC50 obtenido en el extracto vegetal y sus subfracciones.

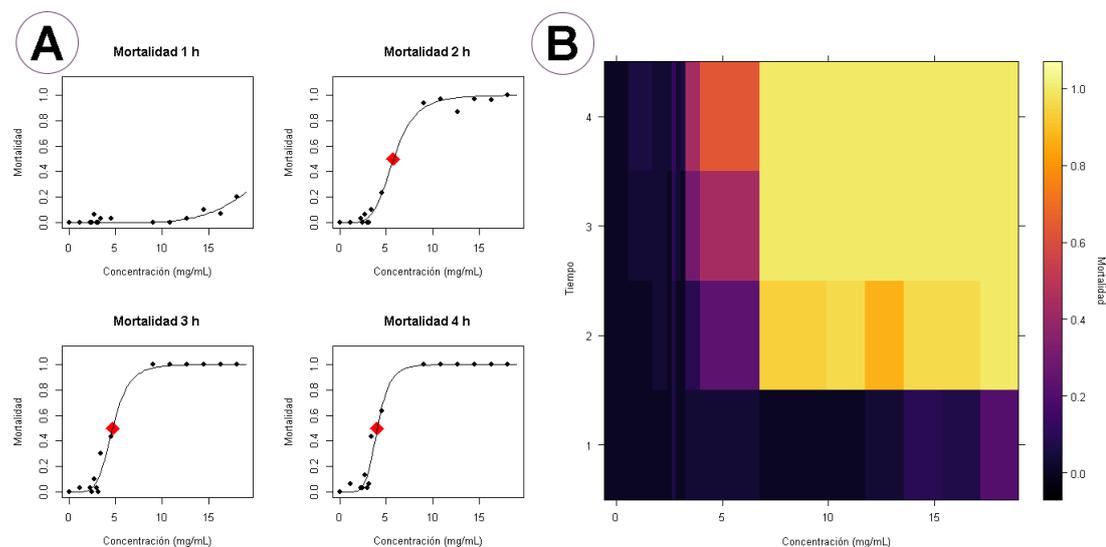
Extracto vegetal	Hora	LC50 (mg/mL)	Error estándar	Significancia
E0	1	23.28	2.23	***
	2	5.77	0.24	***
	3	4.66	0.19	***
	4	4.03	0.15	***
E1	1	4.52	0.12	***
	2	3.61	0.18	***
	3	3.36	0.10	***
	4	3.14	0.06	***
B1	1	2.62	5.84e-4	***
	2	2.56	0.07	***
	3	1.52	0.10	***
	4	1.14	0.13	**

Nota. Valores de significancia: '***' = 0, '**' = 0.001, '*' = 0.01

La mortalidad de los nauplios aumenta conforme aumenta la concentración de los extractos, en el caso del extracto E0, a una concentración de 2.72 mg/mL la mortalidad es del 7% mientras que a una concentración de 18.06 mg/mL la mortalidad es del 20% en la primera hora (Figura 16). El tiempo también es un factor para considerar puesto que una exposición más prolongada naturalmente incrementa la mortalidad de los nauplios, así mismo, esta tendrá un efecto en los valores de LC50

Figura 16

Ensayo de mortalidad de *Artemia salina* usando el extracto E0



Nota. A = Gráfico de dosis-respuesta. B = Gráfico de calor de la mortalidad en función de la concentración y el tiempo

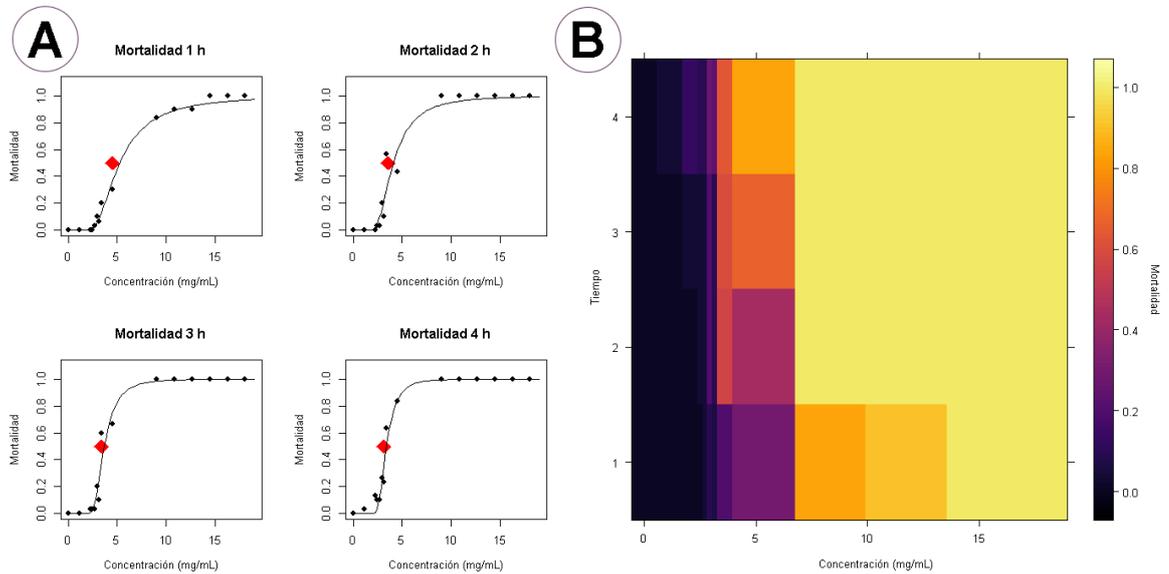
El valor de LC50 varía entre el extracto E0 y las subfracciones E1 y B1, esto es debido a la diferencia de polaridad que existe en los solventes que se emplearon en los procesos de separación, ocasionando que los compuestos bioactivos difieran entre ellas (Truong *et al.*, 2019). De esta manera en la subfracción E1 se concentrará un mayor contenido de los compuestos no polares presentes originalmente en el extracto E0 al emplear acetato de etilo en el proceso de extracción líquido-líquido. Así mismo, la subfracción B1 concentrará un mayor contenido de los compuestos polares que no se separaron hacia la fase acuosa debido al empleo del butanol en la separación por polaridades.

Los valores de LC50 obtenidos se ubican en el siguiente orden luego de cuatro horas: B1(1.14 mg/mL) > E1(3.14 mg/mL) > E0(4.03 mg/mL). Moreno (2008) indica que *Toxicodendron striatum* posee un principio activo conocido como “urushiol”, clasificado como peligroso para la salud. El análisis de RMN realizado en este trabajo indica una posible presencia de este compuesto en el extracto E0, pero la ausencia

en la subfracción E1, por lo tanto, se presume que se separó en conjunto con la subfracción B1, lo cual explicaría una mayor mortalidad o un menor valor de LC50 en el ensayo de mortalidad de artemias realizado usando esta subfracción (Figura 18).

Figura 17

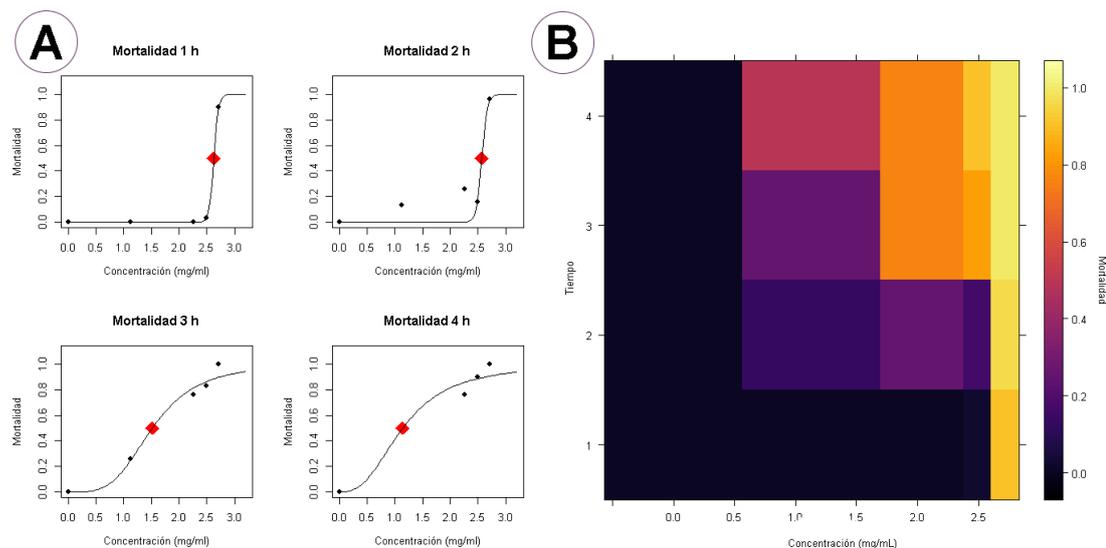
Ensayo de mortalidad de Artemia salina usando la subfracción E1



Nota. A = Gráfico de dosis-respuesta. B = Gráfico de calor de la mortalidad en función de la concentración y el tiempo

Figura 18

Ensayo de mortalidad de *Artemia salina* usando la subfracción B1



Nota. A = Gráfico de dosis-respuesta. B = Gráfico de calor de la mortalidad en función de la concentración y el tiempo

Algunos artículos señalan que algo muy importante a considerar en BSLA es el solvente utilizado (Geethaa *et al.*, 2013; Wu, 2014), donde Geethaa *et al.*, encontraron que el LC50 de Tween 20 se encuentra en una concentración del 2.5 %, por lo que concluyeron que utilizar DMSO como solvente era la mejor alternativa. Sin embargo, en este ensayo se utilizó una mezcla de Tween 20 (3.74 %) y acetona (9.35 %) y no se encontró una mortalidad elevada; esto se debe a que en el trabajo realizado por Geethaa *et al.*, evaluaron la mortalidad en 24 h, y en el presente ensayo se busca una respuesta aguda y como máximo se evaluó después de 4 h, lo cual indica que los metabolitos presentes en E0, E1 y B1 son los que poseen la actividad tóxica; para contrastar esto, se diseñó el control negativo con solo la mezcla de solventes, mostrando una mortalidad del 0 % (datos no mostrados) y con ello se elimina los falsos positivos del ensayo.

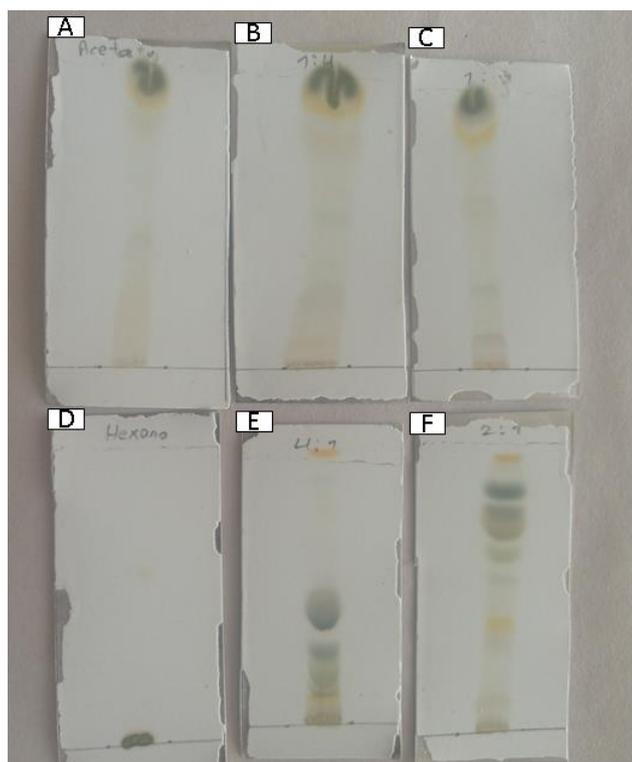
Cromatografía de Capa Fina y de Columna

El primer TLC realizado del extracto E1 permitió determinar la relación de solventes adecuados (Figura 19) para lograr una mayor separación de los compuestos en la muestra, para posteriormente usar esta relación de solventes en la cromatografía de columna. Obteniendo una relación de hexano:acetato de etilo (2:1) como la óptima, donde aproximadamente 13 compuestos son observables en el espectro de luz visible (Figura 20). Un TLC tiene una gran importancia al momento de comprender la polaridad de los compuestos de una muestra y para elegir un sistema de solventes (fase móvil) adecuado que permita separar los compuestos en diferentes fracciones cuando se vaya a realizar la cromatografía de columna (Alebiosu y Yusuf, 2015).

En la práctica no existe una manera para escoger directamente los solventes a usar, sino que es más bien un proceso de prueba y error, donde si se usa un solvente con una polaridad muy alta los compuestos de la muestra no se separaran adecuadamente al desplazarse en conjunto con el solvente, y, al contrario, si se usa un solvente con una polaridad muy baja los compuestos de la muestra no se separaran lo suficiente (Universidad de Massachusetts Amherst [UMass], 2017). Por ello, diferentes solventes y/o mezclas de estos son evaluados hasta que se logra una buena separación, la cual generalmente da valores de R_f entre 0.3 y 0.7 (UMass, 2017).

Figura 19

TLC de la fracción E1 con diferentes solventes y relaciones.



Nota. A = acetato de etilo. B = hexano:acetato de etilo (1:4). C = hexano:acetato de etilo (1:2). D = hexano. E = hexano:acetato de etilo (4:1). F = hexano:acetato de etilo (2:1).

Figura 20

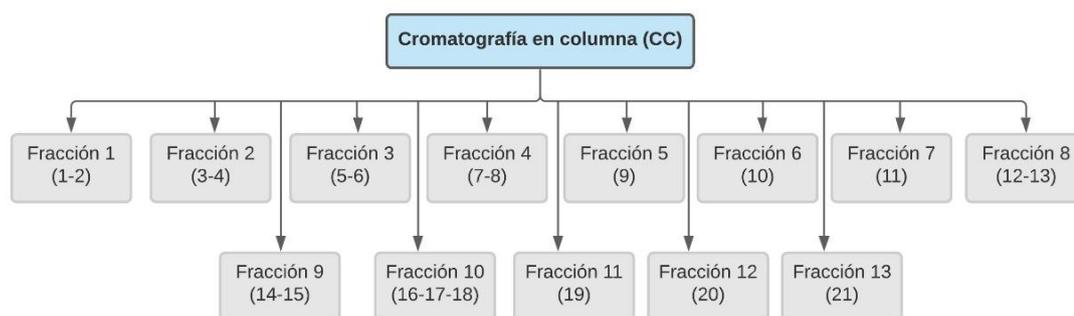
TLC de la fracción E1 utilizando hexano:acetato de etilo (2:1) como fase móvil.



La cromatografía de columna realizada al extracto E1 usando hexano:acetato de etilo (2:1) como fase móvil dio aproximadamente 21 fracciones a las cuales se les realizó un TLC y se agruparon (Figura 21) según la similitud de compuestos encontradas en estas. Los valores de Rf calculados se usan para cuantificar la distancia recorrida por los compuestos, encontrándose estos siempre entre 0 y 1.

Figura 21

Esquema del agrupamiento de las fracciones obtenidas en CC.



La cromatografía de columna es una técnica versátil para separar y purificar compuestos según la naturaleza química, debido a que las moléculas eluirán por la columna a una tasa diferente a causa del sistema de solventes empleado creando una diferencia de polaridades que hace que estas sean más afines por la fase estacionaria o por la fase móvil (Srivastava *et al.*, 2021). Ya que se obtendrán múltiples fracciones eluidas de la columna es necesario determinar si estas poseen los mismos compuestos para agruparlas y que sean analizadas apropiadamente.

El TLC permite obtener valores de Rf de cada compuesto y así agrupar las fracciones, además, el valor del Rf puede ser empleado para identificar el compuesto ya que este va a ser prácticamente constante siempre y cuando se use el mismo sistema de solventes (McPherson *et al.*, 2021). No obstante, la identificación de los compuestos mediante la comparación de los valores de Rf no fue posible debido a que actualmente no existe literatura donde se realicen estudios fitoquímicos de la

especie vegetal tratada en este trabajo, por lo tanto, los valores de Rf presentados (Tabla 7) se considerarán como un reporte.

Tabla 7

Valores de Rf de los compuestos obtenidos en las fracciones usando hexano:acetato de etilo (2:1)

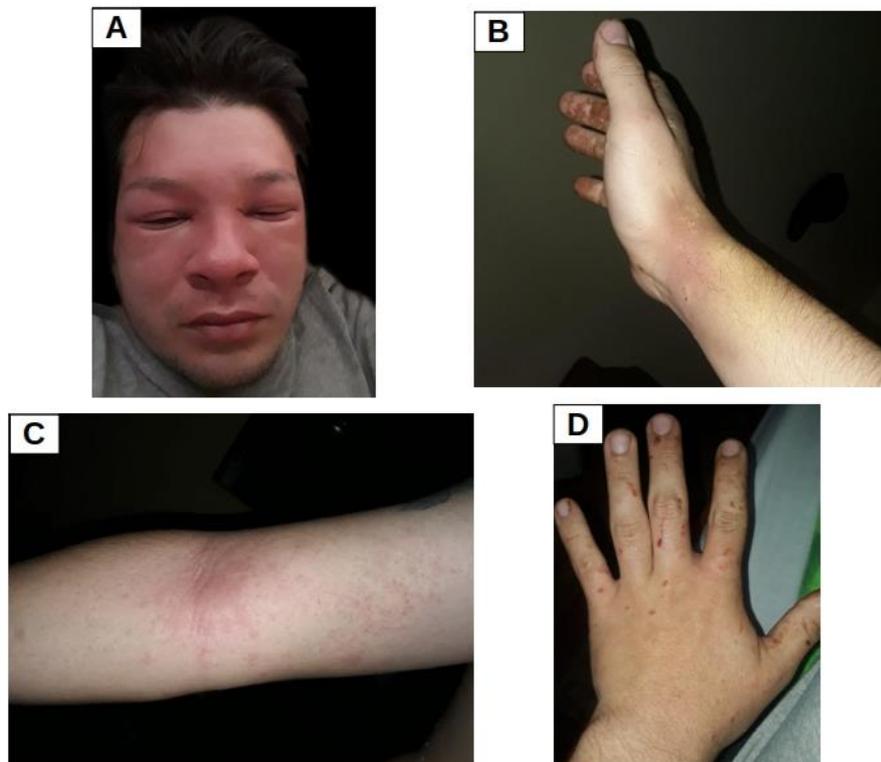
Compuesto	Color	Valor de Rf	Compuesto	Color	Valor de Rf
1	amarillo	0.97	22	verde algo	0.83
2	gris oscuro	0.93	23	gris oscuro	0.76
3	gris claro	0.90	24	verde	0.66
4	verde opaco	0.87	25	verde	0.61
5	gris verdoso	0.83	26	verde oscuro	0.55
6	verde claro	0.78	27	amarillo	0.45
7	verde claro	0.82	28	café verdoso	0.31
8	verde claro	0.68	29	gris	0.95
9	verde claro	0.72	30	verde	0.91
10	café claro	0.90	31	verde claro	0.86
11	café oscuro	0.97	32	verde	0.75
12	café	0.95	33	gris	0.71
13	café claro	0.97	34	verde claro	0.53
14	verde	0.86	35	gris	0.48
15	café oscuro	0.60	36	Sin describir	0.41
16	verde	0.56	37	verde marrón	0.23
17	verde	0.51	38	verde grisáceo	0.19
18	verde grisáceo	0.44	39	gris	0.05
19	verde claro	0.37	40	café	0.58
20	café claro	0.47	41	marrón	0.15
21	café opaco	0.83			

Nota. Se ordenó los diferentes compuestos de acuerdo con el valor de Rf y el color que se apreciaba, por lo que la numeración de 1-41 también indica el orden de polaridad, donde 1 fue el compuesto más apolar que eluyó primero, y 41 el compuesto más polar que eluyó en las fracciones finales.

Caso de Reporte

Figura 22

Síntomas de la dermatitis alérgica de contacto por urushiol



Nota. A = Angioedema presente durante ~7 días. B = Lesión interna similar a una equimosis. C = Eritema, en los primeros días ausente y con el transcurso del tiempo aparece en diferentes zonas del cuerpo. D = Posible eritema multiforme en las zonas donde hubo contacto directo con la savia tóxica. Las diferentes imágenes se tomaron en los 15 días que se presentaron los síntomas, las manchas color café (B) se deben a la savia adherida luego de varios días.

Al momento de realizar la identificación de la planta en campo se observó el látex blanquecino, sin embargo, no fue considerado en un principio que se tratase de *Toxicodendron striatum* por lo que no se tomó ninguna precaución en cuanto al manejo del látex y solamente se dio énfasis a la observación de las hojas, flores y frutos. Al transcurrir ~12 horas empezaron a ser apreciables ciertos síntomas, como el enrojecimiento de la cara y picazón en las manos, además el látex se había

adherido a la piel y ropa con la que se manipuló (Figura 22, D). A las ~24 horas fue apreciable la hinchazón de la cara y una sensación de ahogamiento por un cierre de la garganta, lo cual derivó en un tratamiento con hidrocortisona en el Hospital Isidro Ayora, conforme transcurrieron los días empezaron a aparecer más síntomas (Figura 22, A, B y C) y un letargo durante al menos los 10 días de reacción alérgica.

Capítulo V: Conclusiones

La descripción morfológica en conjunto con la identificación por parte de un experto nos permitió asegurar que la planta que los nativos del cantón de Palanda conocen como “Guarinbishe” pertenece a la especie *Toxicodendron striatum*.

El análisis fitoquímico permitió identificar la presencia de flavonoides, saponinas, fenoles, taninos, alcaloides y resinas.

El ensayo de artemias (BSLA) resultó ser una herramienta muy práctica, económica y versátil para realizar ensayos toxicológicos permitiendo determinar el valor del LC50 de una fracción; en el presente estudio se encontró un LC50 en la subfracción B1 de 1.14 mg/mL.

La cromatografía de columna es una herramienta eficaz para fraccionar los compuestos de una muestra, además al realizarse en conjunto con una cromatografía de capa fina permite identificar compuestos en base a su Rf cuando existe información reportada. El sistema de solventes hexano:acetato de etilo (2:1) permite obtener una separación adecuada de los compuestos en la cromatografía debido a la polaridad media que estos poseen.

El análisis ¹H RMN mostró la presencia de compuestos fenólicos, entre ellos unas señales bien definidas del grupo catecol y cadenas alifáticas con un grupo metilo al final de la cola, probablemente entre 15 a 18 carbonos, además se encontró presencia de otros compuestos que pueden ayudar con el proceso inflamatorio como las saponinas o glucósidos.

En base a la cromatografía de columna y capa fina realizadas, se encontró la presencia de al menos 41 compuestos diferentes en la muestra separada con acetato de etilo (E1).

Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda continuar con los estudios toxicológicos del urushiol empleando líneas celulares, buscando esclarecer el mecanismo de acción inmunológico y determinar si existe un potencial apoptótico contra líneas celulares cancerígenas de diversos tipos.

Realizar el ensayo de letalidad de *Artemia salina* empleando dosis más bajas ($\mu\text{g /mL}$) y un tiempo de evaluación más largo (24 – 36 h).

Es importante definir bien el solvente para diluir los extractos o compuestos activos que se vayan a analizar, ya que estos pueden influir en la mortalidad de los nauplios, resultando en falsos positivos y perdiendo solidez en los reportes finales.

Utilizar un espectrómetro de masas de cromatografía líquida de alta resolución para elucidar la estructura del urushiol y demás compuestos de interés presentes en el extracto de *Toxicodendron striatum*.

Al experimentar *in vivo* los estragos que esta planta produce, se aconseja cautela al momento de manipular cualquier parte de *Toxicodendron striatum* debido a que puede ocasionar una fuerte dermatitis alérgica de contacto.

Capítulo VII: Bibliografía

- Abatzopoulos, T. J., Beardmore, J., Clegg, J. S., & Sorgeloos, P. (2013). *Artemia: basic and applied biology* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Aggarwal, S. K. (2012). Herbaria and Data Information Systems in Plant Taxonomy. *Plant Taxonomy: past, present, and future*, 167.
- Aguirre, Z. (2018). *Principios para el estudio de las familias botánicas del Ecuador*. In Universidad Nacional de Loja. Primera Edición. Loja, Ecuador
- Alaş, A., Kaya, M., & Öktener, A. (2017). Distribution and abundance of *Artemia salina* in the Salt Lake basin (Central Anatolia, Turkey). *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, 19(2), 37.
- Alzate, F., Idárraga, Á., Díaz, O., & Rodríguez, W. (2013). Flora de los bosques montanos de Medellín (1st ed.). *Universidad de Antioquia*. https://www.udea.edu.co/wps/wcm/connect/udea/7e2366b5-36c0-48cb-b86c-c9a389964a12/Flora+de+los+bosques+montanos+de+Medellin_compressed_reduce-comprimido.pdf?MOD=AJPERES&CVID=mMKuMTF
- Alebiosu, C. O., & Yusuf, A. J. (2015). Phytochemical screening, thin-layer chromatographic studies and UV analysis of extracts of *Citrullus lanatus*. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(2), 214-220.
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. I. (2021). Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1145. <https://doi.org/10.3390/PH14111145>
- Bahr, A. S., Isoni, W., & Maulida, N. (2021, March). Hatching and harvesting techniques for *Artemia* cysts with different effects of salinity in the district of Situbondo, East Java. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 718, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.
- Browne, R. A. (2018). *Artemia biology*. CRC press.
- Campos-Vega, R., & Dave Oomah, B. (2013). Chemistry and classification of phytochemicals. In *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction* (pp. 5–48). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118464717.CH2>

- Chemistry libretxts, (2019). Thin Layer Chromatography. https://chem.libretxts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography
- Chinchen, G., Denny, P., Jennings, J., Spencer, M., & Waugh, K. (1988). Synthesis of Methanol: Part 1. Catalysts and Kinetics. *Applied Catalysis*, 36(9), 1–65. [https://doi.org/10.1016/S0166-9834\(00\)80103-7](https://doi.org/10.1016/S0166-9834(00)80103-7)
- Cienytech. (2012). Tabla miscibilidades. <https://es.slideshare.net/jestval/tabla-miscibilidades>
- Coles, L. D., & Cloyd, J. C. (2012). The Role of Academic Institutions in the Development of Drugs for Rare and Neglected Diseases. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(2), 193–202. <https://doi.org/10.1038/CLPT.2012.83>
- Cornell Nutrient Analysis Laboratory. (2021). Instructions for Plant Leaf Sample Collection. Cornell University. URL: <http://css.cornell.edu/cnal-forms/CNAL-Plant-Sample-Instructions.pdf>
- Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., & Basu, C. (2019). Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. *Medicinal Plants*, 333. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15
- da Costa Cordeiro, B. M. P., de Lima Santos, N. D., Ferreira, M. R. A., de Araújo, L. C. C., Junior, A. R. C., da Conceição Santos, A. D., ... & Paiva, P. M. G. (2018). Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1-10.
- eFloras. (n.d.). *Toxicodendron Miller*. Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Retrieved January 29, 2022, from http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=133197
- El-Zeftawy, AM. (1995). Focus on the Chemical Value of Methanol. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*, 7, 209–254. [https://doi.org/10.1016/S1018-3639\(18\)31058-4](https://doi.org/10.1016/S1018-3639(18)31058-4)
- Fisher Scientific. (2021). Chloroform (CHCl₃). <https://www.fishersci.es/es/es/products/I9C8K3RZ/chloroform.html>

- Gad, S.C. (2014). Encyclopedia of Toxicology || LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50). , (), 58–60. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00867-8
- Geethaa, S., Thavamany, P., Chiew, S., & Thong, O. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 182. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.121411>
- Grant, S., & Niezgodna, C. (2020). Field Museum of Natural History (Botany) Seed Plant Collection. Version 11.12. Field Museum. *Global Biodiversity Information Facility*. <https://doi.org/10.15468/nxnqzf>. URL: <https://www.gbif.org/es/occurrence/1228351600>
- Guides, R. (2019). The Rough Guide to Ecuador & the Galapagos (Travel Guide ebook). Apa Publications (UK) Limited.
- Gupta, A., & Pandey, A. K. (2020). Antibacterial lead compounds and their targets for drug development. In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery* (pp. 275-292). Elsevier.
- Gupta, P. K. (2018). *Illustrated toxicology: with study questions*. Academic Press.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Maced pharm bull*, 60(1), 9-18.
- Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J. C., & O'Riordan, D. (2013). Conventional extraction techniques for phytochemicals. In *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction* (pp. 397–411). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118464717.CH17>
- Harris, R. K. (1986). *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*.
- Herbario JBB en línea. (2022). *Toxicodendron striatum* - 5344. Jardín Botánico José Celestino Mutis. <http://herbario.jbb.gov.co/especimen/4493>
- Hodgson, E. (Ed.). (2012). *Toxicology and human environments* (Vol. 112). Academic Press.
- Hostettman, K., Gupta, M., & Marston, A. (1999). *Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas*. Taylor and Francis Group. https://books.google.com.ec/books?id=TM-CDwAAQBAJ&dq=urushiol+brine+shrimp+assay&source=gbs_navlinks_s

- Hostettmann, K., & Marston, A. (2005). SAPONINS. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 205–209. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00548-3>
- Huamán, Z. (1980). *Systematic botany and morphology of the potato*. International Potato Center.
- Human Metabolome Database. (2021). Showing metabocard for 1-Butanol (HMDB0004327). *The Metabolomics Innovation Centre*. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004327>
- Instituto de Biología UNAM. (2019). *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:79086>
- Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
- ITIS. (2022). Report: *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). Integrated Taxonomic Information System. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=83691#null
- Jaramillo-Jaramillo, C., Jaramillo-Espinoza, A., d'Armas, H., Troccoli, L., & Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Biología Tropical*, 63(3), 1171–1184. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v64n3/0034-7744-rbt-64-03-01171.pdf>
- Kaleem, M., & Ahmad, A. (2018). Flavonoids as Nutraceuticals. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*, 137–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00008-X>
- Keck, D. D. (1957). Trends in systematic botany. In *Survey of biological progress* (Vol. 3, pp. 47-107). Elsevier.
- Kim, J. H., Hu, Y., Yongqing, T., Kim, J., Hughes, V. A., le Nours, J., Marquez, E. A., Purcell, A. W., Wan, Q., Sugita, M., Rossjohn, J., & Winau, F. (2016). CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin diseases. *Nature Immunology*, 17(10), 1159. <https://doi.org/10.1038/NI.3523>

- Kneller, R. (2010). The importance of new companies for drug discovery: origins of a decade of new drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(11), 867–882. <https://doi.org/10.1038/nrd3251>
- Ky, I., le Floch, A., Zeng, L., Pechamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2016). Tannins. *Encyclopedia of Food and Health*, 247–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8>
- Krishnan, P., Kruger, N. J., & Ratcliffe, R. G. (2005). Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of experimental botany*, 56(410), 255-265.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kuntze, O. (1891). *Revisio generum plantarum: vascularium omnium atque celliumium multarum secundum leges nomenclaturae internationales cum enumeratione plantarum exoticarum in itinere mundi collectarum ... Leipzig* (Vol. 3). Biodiversity Heritage Library. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/127613#page/311/mode/1up>
- Lambert, J. B., Mazzola, E. P., & Ridge, C. D. (2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons.
- Licá, I., dos Santos, A., de Mesquita, L., & Malik, S. (2018). Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. *Food Research International*, 105, 1039-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11>.
- Li, M.-C., Zhang, Y.-Q., Meng, C.-W., Gao, J.-G., Xie, C.-J., Liu, J.-Y., & Xu, Y. N. (2021). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Toxicodendron vernicifluum* (Stokes) F.A. Barkley - A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113476. doi:10.1016/j.jep.2020.113476
- Lofgran, T., & Mahabal, G. D. (2021). Toxicodendron Toxicity. *StatPearls [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557866/>
- López, M. L. (2017). Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios específicos de *Piper carpubunya*, con acción antifúngica [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/13582>.

- Malagon, O., Ramirez, J., Andrade, J. M., Morocho, V., Armijos, C., & Gilardoni, G. (2016). Phytochemistry and ethnopharmacology of the Ecuadorian flora. A review. *Natural product communications*, 11(3), 1934578X1601100307.
- Mabry, T. J., Kagan, J., & Rösler, H. (1964). Nuclear magnetic resonance analysis of flavonoids. Department of Botany and Cell Research Institute, University of Texas.
- Martínez-Millán, M., & Cervillos-Ferriz, S. (2005). Arquitectura foliar de Anacardiaceae. *Revisa Mexicana de Biodiversidad*, 76(2), 137–190. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532005000200003#a03f27
- McPherson, R. A., Msc, M. D., & Pincus, M. R. (2021). Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book. Elsevier Health Sciences.
- Mendoza, N., & Escamilla, E. M. (2018). Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.78226>
- Michael, A. S., Thompson, C. G., & Abramovitz, M. (1956). Artemia salina as a test organism for bioassay. *Science*, 123(3194), 464-464.
- Michigan State University (2010). NMR Applications. https://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/900mhz/mcsb_nmr_applications.html
- Moreno, M. V. (2008). Dermatitis por Toxicodendron striatum ("manzanillo"). *Acta Medica Colombiana*, 33(3), 135-138.
- Muharrami, L. K., Munawaroh, F., Ersam, T., & Santoso, M. (2020). PHYTOCHEMICAL SCREENING OF ETHANOLIC EXTRACT: a Preliminary Test on Five Medicinal Plants on Bangkalan. *Jurnal Pena Sains Vol*, 7(2).
- Naidu, J. R., Ismail, R., & Sasidharan, S. (2014). Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of Mentha Spicata L (Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 101-107.
- Nayak, B. S., Ramlogan, S., Rao, A. C., & Maharaj, S. (2014). Neurolaena lobata L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 4(2), 106.

- Ntungwe, E., Domínguez-Martín, E., Roberto, A., Tavares, J., Isca, V. M. S., Pereira, P., Cebola, M., & Rijo, P. (2020). Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Current Pharmaceutical Design*, 26(24), 2892–2908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>
- Orhan, I. E. (2014). Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. *BiolImpacts*, 4(3), 110. <https://doi.org/10.15171/BI.2014.001>
- Pacheco, R., Quezada, S. A., Kalergis, A. M., Becker, M. I., Ferreira, J., & de Ioannes, A. E. (2021). Allergens of the urushiol family promote mitochondrial dysfunction by inhibiting the electron transport at the level of cytochromes b and chemically modify cytochrome c1. *Biological Research*, 54(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40659-021-00357-Z/FIGURES/7>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1–15. <https://doi.org/10.1017/JNS.2016.41>
- Pant, D. R., Pant, N. D., Saru, D. B., Yadav, U. N., & Khanal, D. P. (2017). Phytochemical screening and study of antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from stem wood of *Pterocarpus marsupium* Roxburgh. *Journal of inter-cultural ethnopharmacology*, 6(2), 170.
- Penta, S. (2016). Introduction to Coumarin and SAR. In *Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives* (pp. 1-8). Academic Press
- Perveen, S. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *Terpenes and Terpenoids*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79683>
- Perveen, S., & Al-Taweel, A. M. (2019). Introductory Chapter: Pharmacognosy. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*, 8. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86019>
- Pomin, V. H. (2012). Unravelling glycobiology by NMR spectroscopy. In *Glycosylation* (pp. 63-98). London, UK: IntechOpen.
- PubChem. (2021). Ethyl acetate. *National Center for Biotechnology Information*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-acetate>
- Qiu, S., Sun, H., Zhang, A. H., Xu, H. Y., Yan, G. L., Han, Y., & Wang, X. J. (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives.

- Chinese Journal of Natural Medicines, 12(6), 401–406.
[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60063-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60063-7)
- Rajabi, Somayeh; Ramazani, Ali; Hamidi, Mehrdad; Naji, Tahereh (2015). Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 23(1), 20–. doi:10.1186/s40199-015-0105-x
- Ramírez, B. (2004). Botánica. Generalidades, Morfología y Anatomía de plantas superiores (1ra ed.). Editorial Universidad del Cauca. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/305566736_Botanica_Generalidades_Morfologia_y_Anatomia_de_plantas_superiores
- Red de Herbarios del Noroeste de México. (n.d.). *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze. Retrieved January 31, 2022, from <https://herbanwmex.net/portal/taxa/index.php?taxon=173206>
- Regenstein, J. M., & Regenstein, C. E. (1984). Protein functionality for food scientists, in " Food Protein Chemistry". Regenstein, JM and Regenstein, C. E (Ed.), 90
- Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Mir, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. Bangladesh Journal of pharmacology, 12(2), 186-189.
- Savage, G. P. (2016). Saponins. Encyclopedia of Food and Health, 714–716.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00610-3>
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, 1–21. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=690251>
- SERNEC. (n.d.). *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze. Southeast Regional Network of Expertise and Collections. Retrieved January 31, 2022, from <https://sernecportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=173206>
- Serrano, R. (2018). Toxic Plants: Knowledge, Medicinal Uses and Potential Human Health Risks. *Environment and Ecology Research*, 6(5), 487–492.
<https://doi.org/10.13189/eer.2018.060509>

- Sieniawska, E., & Baj, T. (2017). Tannins. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (pp. 199–232). *Academic Press*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X>
- Singh, M., Patra, S., & Singh, R. K. (2021). Common techniques and methods for screening of natural products for developing of anticancer drugs. In *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules* (pp. 323-353). *Academic Press*.
- Smithsonian. (n.d.). *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze. *Tropical Research Institute*. Retrieved January 29, 2022, from <https://panamabiota.org/stri/taxa/index.php?taxon=70502&clid=59>
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Lè, P., Tackaert, W., & Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura. (No. F009. 105). *FAO*.
<https://www.fao.org/3/ab474s/AB474S00.htm#TOC>
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., ... & Kharwar, R. N. (2021). Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. In *Natural Bioactive Compounds* (pp. 409-433). *Academic Press*.
- Street, R., Cele, N., Mhlongo, S., & Baijnath, H. (2019). Poisonous plant exposure, human health harms and the development of culturally relevant public education messaging. *Environmental Epidemiology*, 3, 385.
<https://doi.org/10.1097/01.EE9.0000610284.02984.5D>
- Touchstone, J. C. (1992). *Practice of thin layer chromatography*. John Wiley & Sons.
- The University of Mississippi. (2021). Department of BioMolecular Sciences | Pharmacognosy. *Ole Miss*.
<https://pharmacy.olemiss.edu/bms/divisions/pharmacognosy/>
- Trease G., & Evans WC. (1983). *Textbook of Pharmacognosy* (Elsevier, Ed.; 16th ed.).
- Tropicos. (n.d.). *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze. Retrieved January 29, 2022, from <http://legacy.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=1300289&tab=specimens>
- Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical

- constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of food quality*, 2019.
- Universidad EIA. (n.d.). *Toxicodendron striatum*. Catálogo Virtual de Flora de Alta Montaña. Retrieved January 31, 2022, from <https://catalogofloraaltamontana.eia.edu.co/species/174>
- Universidad de Massachusetts Amherst, (2017). Thin Layer Chromatography [Archivo PDF]. <https://people.chem.umass.edu/samal/269/tlc.pdf>
- Vaskrsija, J. (2021). *Plant-Caused Skin Disorders* (1st ed.). Cambridge Scholars Publishing. <https://www.cambridgescholars.com/resources/pdfs/978-1-5275-6519-7-sample.pdf>
- Verpoorte, R. (2005). ALKALOIDS. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00010-8>
- Victor, J.E., Koekemoer, M., Fish, L., Smithies, S.J., & Mössmer, M. (2004). Herbarium essentials: the southern African herbarium user manual. Southern African Botanical Diversity Network Report No. 25. SABONET, Pretoria.
- Vogl, O. (2000). Oriental lacquer, poison ivy, and drying oils. *Polymer Chemistry*, 38(24), 4327–4335. [https://doi.org/10.1002/1099-0518\(20001215\)38:24%3C4327::AID-POLA10%3E3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1099-0518(20001215)38:24%3C4327::AID-POLA10%3E3.0.CO;2-3)
- Waghulde, S., Kale, M., & Patil, VijayR. (2019). Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants. *Proceedings*, 41(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ECSOC-23-06703>
- Wang F. (2013). ¹H-NMR spectra of common triterpenoids (18 compounds). <http://www.wangfei.ac.cn/article/nmrspectra/7/1/35>
- Welch, K., Panter, K., Gardner, D., & Stegelmeier, B. (2012). The Good and the Bad of Poisonous Plants: an Introduction to the USDA-ARS Poisonous Plant Research Laboratory. *Journal of Medical Toxicology*, 8(2), 153-159. <https://doi.org/10.1007/S13181-012-0215-5>
- Wu, C. (2014). An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 5(1), 58. [/pmc/articles/PMC3960796/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960796/)
- Xie, Y., Zhang, J., Liu, W., Xie, N., Feng, F., & Qu, W. (2016). New urushiols with platelet aggregation inhibitory activities from resin of *Toxicodendron*

verniciifluum. *Fitoterapia*, 112, 38–44.
<https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2016.05.001>

Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3), 1–13. <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>

Zaynab, M., Sharif, Y., Abbas, S., Afzal, M. Z., Qasim, M., Khalofah, A., Ansari, M. J., Khan, K. A., Tao, L., & Li, S. (2021). Saponin toxicity as key player in plant defense against pathogens. *Toxicon*, 193, 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2021.01.009>

Zinkel, B. (2019). What is NMR spectroscopy and how does it work?. Nana lysis.