

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS ORGANICOS
DE *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* Y *Zinowiewia integerrima* DE LA
FAMILIA CELASTRACEAE PERTENECIENTES A LA FLORA SALVADOREÑA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

KARLA CAROLINA FLORES AMAYA

BRENDA LISSETH RODRIGUEZ LEMUS

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2017

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velázquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORAS DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

DOCENTES DIRECTORES

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

Dr. Marvin José Núñez Rivas

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos primeramente a Dios, por habernos acompañado a lo largo de este tiempo, por brindarnos fortaleza y sabiduría, por mostrarnos su amor y permitirnos llegar al final de esta etapa profesional de nuestras vidas.

A nuestros asesores MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz y Dr. Marvin José Núñez Rivas, por dirigir este trabajo de graduación y estar con nosotras en cada momento, y sobre todo por su apoyo, confianza y por habernos incentivado durante todo este trabajo.

A la Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y Lic. Ulises Guardado Castillo, quienes nos brindaron su apoyo incondicional y sus consejos, así mismo, por ayudarnos a crecer profesionalmente.

A la Licda. Jenny Menjívar, Curadora del Museo de Historia Natural de El Salvador, Licda. Maritza Guido Martínez, Coordinadora de Gestión para el Parque Nacional Montecristo de El Salvador y Lic. Fredi Magaña, Guardarecursos del Parque Nacional Montecristo de El Salvador, quienes nos ayudaron en el desarrollo de esta investigación.

Al Departamento del Ecosistemas y Vida Silvestre del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador (MARN) y al Jardín Botánico la Laguna, por su colaboración en este trabajo de investigación.

A la Directora General de Procesos de Graduación MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez, al tribunal calificador del área de Aprovechamiento de Recursos Naturales, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y MSc. Sonia

Maricela Lemus Martínez, por sus consejos, conocimientos y ayuda en la culminación de este trabajo.

A todos los licenciados de la Facultad de Química y Farmacia, por haber contribuido en nuestra formación profesional a lo largo de la carrera.

A la Universidad de El Salvador, nuestra alma máter, que nos permitió desarrollarnos como estudiantes en todos los aspectos académicos.

¡Muchas Gracias!

Karla Flores y Brenda Rodríguez.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, quien lo ha dado todo por mí. He podido ver tu bondad, fidelidad y misericordia para conmigo, gracias por fortalecer mi vida y brindarme sabiduría, por ser mi amigo incondicional, por siempre estar atento a mis suplicas y por permitirme culminar esta etapa de mi carrera profesional, eres “Grande mi Señor”.

A mis Padres, Carmen Elizabeth Amaya de Flores y Orlando Flores Rivera, por su gran esfuerzo, sacrificio y amor, así mismo, gracias por creer en mí, por su paciencia y apoyo incondicional en los momentos más importantes de mi vida, recuerden que siempre fueron mi inspiración “los amo”.

A mi Hermano Orlando y a Papá Calin, de quienes recibí muchos consejos y un gran apoyo a lo largo de esta etapa.

A mis maestros y mentores, Licda. More, Dr. Marvin, Licda. Ana Miriam y Licda. Toledo, por su apoyo, confianza, cariño y sobre todo por permitirme conocerlos, que Dios les bendiga.

A mi compañera Brendita, quien es la persona que Dios escogió para compartir este gran logro.

A mi familia y a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron a llegar a la meta, por motivarme y apoyarme, a ustedes por siempre, mi corazón y agradecimiento.

Karla Carolina Flores Amaya.

DEDICATORIA

Más que una dedicatoria es un agradecimiento de todo corazón a mi Dios por haberme dado la sabiduría, fortaleza y por dirigir mis pasos para que me fuera posible culminar mi carrera.

A mi madre Raquel Lemus Blanco, de manera muy especial por su amor incondicional, cuidados, consejos por ser el pilar fundamental en mi vida, enseñarme a luchar por las cosas importantes y por supuesto a seguir adelante, gracias por creer en mí.

A mi padre Francisco Dagoberto Rodríguez Pérez por su apoyo, confianza hacia mí y animarme a seguir adelante, sus consejos son los que me llevaron hasta donde estoy ahora.

Docentes del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales por brindarme su apoyo, consejos y sus conocimientos en este trabajo de investigación.

Mi tía Esther y mi prima hermana Jacqueline por su apoyo, respeto, cariño y la motivación que me brindaron para seguir adelante pues siempre han estado ahí conmigo a lo largo de la carrera.

Mi compañera de Tesis Karlita por su apoyo, constante trabajo en equipo y por su linda amistad.

Mis amistades y a todas esas personas que confiaron en mí y siempre tuvieron una palabra de aliento.

Brenda Lisseth Rodríguez Lemus.

INDICE

	Pág.
Resumen	
CAPÍTULO I	
1.0 Introducción	xxvii
CAPÍTULO II	
2.0 Objetivos	31
CAPÍTULO III	
3.0 Marco Teórico	33
3.1 Generalidades de la Familia Celastraceae	33
3.1.2 Descripción botánica de la Familia Celastraceae	35
3.2 Metabolitos secundarios aislados de Celastráceas Salvadoreñas	36
3.3 Generalidades de <i>Maytenus segoviarum</i>	48
3.3.1 Historia	48
3.3.2 Descripción	49
3.4 Generalidades de <i>Quetzalia reynae</i>	52
3.4.1 Historia	52
3.4.2 Descripción	53
3.5 Generalidades de <i>Zinowiewia integerrima</i>	55
3.5.1 Historia	55
3.5.2 Descripción	56
3.6 Generalidades de extracción y fraccionamiento	58
3.6.1 Extracción discontinua	59
3.6.2 Extracción continua	60
3.6.3 Método cromatográfico de separación de metabolitos	62

secundarios	
3.6.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	63
3.6.4 Análisis fitoquímico	64
CAPITULO IV	
4.0 Diseño Metodológico	67
4.1 Tipo de estudio	67
4.2 Investigación bibliográfica	67
4.3 Investigación de campo	67
4.4 Parte experimental	70
4.4.1 Preparación previa de las especies vegetales	70
4.4.2 Fracciones y extractos orgánicos de las especies vegetales	71
4.4.3 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de <i>Maytenus segoviarum</i>	72
4.4.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	72
4.4.3.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de <i>Maytenus segoviarum</i>	75
4.4.3.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de <i>Maytenus segoviarum</i>	77
4.4.3.4 Obtención de los extractos orgánicos de los frutos de <i>Maytenus segoviarum</i>	79
4.4.4 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de <i>Quetzalia reynae</i>	81
4.4.4.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de <i>Quetzalia reynae</i>	81
4.4.4.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de <i>Quetzalia reynae</i>	83

4.4.4.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de <i>Quetzalia reynae</i>	85
4.4.5 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de <i>Zinowiewia integerrima</i>	87
4.4.5.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de <i>Zinowiewia integerrima</i>	87
4.4.5.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de <i>Zinowiewia integerrima</i>	89
4.4.5.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de <i>Zinowiewia integerrima</i>	91
4.4.6 Análisis fitoquímico preliminar de las especies en estudio	93
4.4.6.1 Determinación de glicósidos saponínicos	94
4.4.6.2 Determinación de glicósidos cardiotónicos	95
4.4.6.3 Determinación de glicósidos flavonoides	97
4.4.6.4 Determinación de glicósidos antraquinónicos	98
4.4.6.5 Determinación de taninos	99
4.4.6.6 Determinación de alcaloides	99
4.4.6.7 Determinación de sesquiterpenlactonas	100
4.4.6.8 Determinación de cumarinas	100
4.4.6.9 Determinación de esteroides	101
4.4.6.10 Determinación de triterpenos	101
4.4.6.11 Determinación de quinonas en los extractos de raíces de Celastráceas	102
4.4.7 Cálculos para cromatografía en columna de Sephadex LH20	104

CAPÍTULO V

5.0 Resultados y Discusión de Resultados	106
5.1 Redisolución de las fracciones y extractos orgánicos secos	113
5.2 Determinación de glicósidos saponínicos	114
5.3 Determinación de glicósidos cardiotónicos	121
5.4 Determinación de glicósidos flavonoides	123
5.5 Determinación de glicósidos antraquinónicos	130
5.6 Determinación de taninos	131
5.7 Determinación de alcaloides	133
5.8 Determinación de sesquiterpenlactonas	137
5.9 Determinación de cumarinas	138
5.10 Determinación de esteroides	138
5.11 Determinación de triterpenos	144
5.12 Determinación de quinonas en los extractos de raíces.	149
5.13 Resumen de los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar	155

CAPÍTULO VI

6.0 Conclusiones	158
------------------	-----

CAPÍTULO VII

7.0 Recomendaciones	161
---------------------	-----

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Distribución geográfica de la Familia Celastraceae	33
2. Estructuras sesquiterpénicas dihidro- β -agarofuránicos aislados de <i>Celastrus vulcanicola</i>	38
3. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos nuevos y conocidos activos frente al virus del Epstein-Barr aislados de <i>Maytenus chiapensis</i>	39
4. Estructuras estereoquímicas de nuevos alcaloides sesquiterpénicos aislados de <i>Maytenus chiapensis</i>	40
5. Alcaloides sesquiterpénicos activos frente a <i>Spodoptera littoralis</i> "rosquilla negra", aislados de <i>Maytenus chiapensis</i>	41
6. Estructuras diterpénicas aisladas de <i>Crossopetalum uragoga</i> con actividad quimiopreventiva	42
7. Estructuras de triterpenos tetracíclicos con esqueleto D:B-friedobacarano y D:A-friedooleano aislados de la corteza de raíz de <i>Cassine xylocarpa</i> y <i>Celastrus vulcanicola</i>	43
8. Triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de <i>Celastrus vulcanicola</i>	44
9. Uragogin, nuevo triterpeno pentacíclico aislado de las ramas de <i>Crossopetalum uragoga</i>	45
10. Nuevos triterpenos pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de <i>Celastrus vulcanicola</i>	46
11. Triterpenos pentacíclicos procedentes de los tallos de	47

<i>Cassine xylocarpa</i> con potente actividad inhibidora de la replicación del VIH tipo 1	
12. Nuevos triterpenos pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de <i>Cassine Xylocarpa</i> y <i>Celastrus vulcanicola</i>	47
13. Nuevos triterpenos pentacíclicos con esqueleto del oleano aislados de los tallos de <i>Cassine xylocarpa</i>	48
14. <i>Maytenus segoviarum</i> a. árbol; b. hojas; c. raíces; d. frutos	50
15. Distribución geográfica de la especie <i>Maytenus segoviarum</i> en El Salvador	52
16. <i>Quetzalia reynae</i> a. árbol; b. hojas; c. raíces	54
17. Distribución geográfica de la especie <i>Quetzalia reynae</i> en El Salvador	55
18. <i>Zinowiewia integerrima</i> a. árbol; b. hojas; c. raíces	57
19. Distribución geográfica de la especie <i>Zinowiewia integerrima</i> en El Salvador	58
20. Muestras de material vegetal en maceración	59
21. Baño ultrasónico, aparato para realizar la maceración ultrasónica	60
22. Aparato de percolación	61
23. Aparato Soxhlet	62
24. Cromatografía de capa fina	64
25. Preparación previa de las especies vegetales	71
26. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones	74

orgánicas de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	
27. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas <i>Maytenus segoviarum</i>	76
28. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de <i>Maytenus segoviarum</i>	78
29. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de los frutos de <i>Maytenus segoviarum</i>	80
30. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las hojas de <i>Quetzalia reynae</i>	82
31. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas de <i>Quetzalia reynae</i>	84
32. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de <i>Quetzalia reynae</i>	86
33. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las hojas de <i>Zinowiewia integerrima</i>	88
34. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas de <i>Zinowiewia integerrima</i>	90
35. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de <i>Zinowiewia integerrima</i>	92
36. Jardín Botánico La Laguna, El Salvador	106
37. Museo de Historia Natural de El Salvador	106
38. Distribución geográfica de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador	109

39. Parque Nacional Montecristo, El Salvador	110
40. Baño ultrasónico, aparato para realizar la maceración ultrasónica	112
41. Prueba de espuma de la especie <i>Maytenus segoviarum</i>	115
42. Prueba de espuma de la especie <i>Quetzalia reynae</i>	116
43. Prueba de espuma de la especie <i>Zinowiewia integerrima</i>	116
44. Resultados positivos de la prueba de Liebermann-Burchard y Salkowski para saponinas	120
45. Mecanismo de reacción del reactivo de Kedde	122
46. Reacción de Shinoda o de antocianidina	124
47. Resultados representativos de la prueba positiva de Shinoda	125
48. Reacción de vainillina con flavonoides en medio ácido	128
49. Resultados de la identificación de flavonoides en el cromatograma de capa fina utilizando vainillina 5%-HCl concentrado (4:1)	129
50. Resultados representativos de la prueba positiva de taninos en extractos orgánicos de <i>Maytenus segoviarum</i> , <i>Quetzalia reynae</i> y <i>Zinowiewia integerrima</i>	133
51. Reacción general del reactivo de Dragendorff en presencia de alcaloides	135
52. Resultados de la identificación de alcaloides en el cromatograma de capa fina utilizando Dragendorff	136

53. Mecanismo de reacción del reactivo de Baljet	137
54. Mecanismo de reacción del reactivo de KOH en cumarinas	138
55. Mecanismo de reacción del Liebermann-Burchard para generar dímeros	141
56. Mecanismo de reacción del Liebermann-Burchard para producir el ácido colestahexano sulfónico	142
57. Resultados de la identificación de esteroides en el cromatograma de capa fina utilizando Liebermann-Burchard	143
58. Resultados de la identificación de triterpenos en el cromatograma de capa fina utilizando Komarowsky	147
59. Resultados de la identificación de triterpenos en el cromatograma de capa fina utilizando Komarowsky	148
60. Fraccionamiento por columna Sephadex LH20 del extracto acetónico de raíces de <i>Zinowiewia integerrima</i> (ZiRza)	150
61. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina a luz visible	153
62. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina a luz ultravioleta en longitud de onda 254 nm	153
63. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina utilizando el reactivo revelador de óleum	154

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Celastráceas pertenecientes a la Flora de El Salvador	34
2. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios	65
3. Identificación de las especies recolectadas en el Parque Nacional Montecristo de El Salvador	68
4. Órganos recolectados correspondientes a cada especie vegetal	70
5. Codificación de las fracciones y extractos orgánicos correspondientes a cada especie vegetal	71
6. Fracciones y extractos orgánicos correspondientes a cada especie vegetal	93
7. Visitas realizadas a los herbarios de El Salvador	107
8. Distribución departamental de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador	108
9. Fechas de recolección en el Parque Nacional Montecristo de El Salvador	111
10. Solventes utilizados en la redisolución de extractos secos	113
11. Resultados obtenidos de la medición de la espuma en el material vegetal seco de las especies de Celastráceas en estudio	114
12. Resultados obtenidos de la medición de la espuma en las fracciones y extractos orgánicos de las especies de Celastráceas en estudio	117

13. Resultados obtenidos en la prueba de Liebermann-Burchard	119
14. Resultados obtenidos en la prueba de Salkowski	119
15. Resultados obtenidos en la prueba de Shinoda	123
16. Resultados obtenidos de la prueba de flavonoides en cromatografía en capa fina utilizando la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5)	126
17. Resultados obtenidos de la prueba de flavonoides en cromatografía en capa fina utilizando la fase móvil <i>n</i> -hexano-acetato de etilo (7:3)	126
18. Resultados obtenidos en la prueba de taninos	131
19. Resultados obtenidos en la prueba de alcaloides	134
20. Resultados obtenidos en la prueba de esteroides	139
21. Resultados obtenidos en la prueba de triterpenos utilizando la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5)	144
22. Resultados obtenidos en la prueba de triterpenos utilizando la fase móvil <i>n</i> -hexano-acetato de etilo (1:1)	145
23. Fracciones orgánicas obtenidas del extracto acetónico de raíces de <i>Zinowiewia integerrima</i> (ZiRza), en la separación por columna Sephadex LH20	151
24. Fracciones orgánicas que se ensayaron en la determinación de quinonas del extracto acetónico de raíces de <i>Zinowiewia integerrima</i>	151
25. Resultados obtenidos en la prueba de quinonas en las fracciones del extracto acetónico de raíces de <i>Zinowiewia</i>	152

integerrima

26. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis
fitoquímico preliminar

156

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Distribución geográfica a nivel centroamericano de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*
2. Permiso de recolección de especies vegetales
3. Ejemplares de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*
4. Números de voucher de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*
5. Datos consultados en la base de datos de tropicos de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador
6. Estructuras químicas de los compuestos utilizados como testigos en la cromatografía de capa fina
7. Material, cristalería, reactivos y preparación de reactivos

ABREVIATURAS

A-549	Línea celular de carcinoma humano de pulmón
ABTS	Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
AChE	Acetilcolinesterasa
ATCC	American Type Culture Collection (colección americana de cultivos tipo)
ATP	Trifosfato de adenosina
CCF	Cromatografía en capa fina
CE₅₀	Concentración efectiva media
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CIM	Concentración inhibitoria mínima
COSY	Correlation spectroscopy (espectroscopia de correlación homonuclear)
DFT	Density functional theory (teoría de funcionales de la densidad)
DNM	Daunomicina
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FDA	Food and Drug Administration (administración de medicamentos y alimentos)
fMLP/CB	Formilmetionina-leucil-fenilalanina / Citocalasina B
FPP	Pirofosfato de farnesilo
GPS	(Global Positioning System) Sistema de Posicionamiento Global

H-4-IIE	Células de hepatoma
HeLa	Células de carcinoma epitelial de cuello uterino humano
Hep-G2	Células de carcinoma hepatocelular
HL-60	Células de leucemia promielocítica humana
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity (correlación heteronuclear a múltiples enlaces)
HSQC	Heteronuclear Single Quantun Correlation (correlación heteronuclear de un único cuanto)
IL1β	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
IR	Espectroscopia infrarroja
MCF-7	Línea celular de carcinoma humano de pecho
MDR	Multidrug resistance (multirresistencia a fármacos)
MHz	Megahertz
MT-H37Rv	Cepa <i>Micobacterium tuberculosis</i>
MT-MDR	Cepa <i>Micobacterium tuberculosis</i> multirresistente
OEC	Complejo fotolítico productor de oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-gp	P-glicoproteína
PKB	Proteína quinasa B
PN	Parque Nacional

Rf	Coeficiente de reparto
RI	Receptor de insulina
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	Rotating frame Overhauser enhancement Spectroscopy (espectroscopía rotatoria de efecto nuclear Overhauser)
SAR	Structure Activity Relationship (relación estructura actividad)
SK-Mel-28	Línea celular de melanoma humano
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Espectroscopia Ultravioleta
Vero	Línea celular no tumoral de riñón de Mono Verde Africano

RESUMEN

Las Celastráceas fueron reconocidas por la FDA como especies prometedoras para el estudio científico, debido a su naturaleza química, complejidad estructural de los metabolitos aislados y actividades farmacológicas.^(9,40) Estas especies se encuentran distribuidas en regiones tropicales y sub tropicales a nivel mundial.⁽¹²⁸⁾

En el presente trabajo se diseñó un mapa de distribución geográfica de las especies de Celastráceas Salvadoreñas, reportando diez géneros y dieciocho especies.^(5,19,20)

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar de *Maytenus segoviarum* (hojas, ramas, raíces y frutos), *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima* (hojas, ramas y raíces). Este estudio permitió realizar el primer análisis fitoquímico preliminar de frutos y raíces de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*. Se prepararon los extractos de cada órgano recolectado, utilizando como método de extracción la maceración ultrasónica y para lograr extraer el mayor número de metabolitos secundarios se utilizaron diversos solventes (polares y no polares).

Las fracciones diclorometánicas y *n*-butanólicas de hojas y ramas de cada especie vegetal, así mismo, los extractos acetónicos, metanólicos y de *n*-hexano-éter etílico (1:1) de raíces de las tres especies vegetales y de frutos de *Maytenus segoviarum*, fueron sometidos a pruebas cualitativas en tubos y en cromatografía de capa fina. Durante los ensayos fitoquímicos se estudiaron los mecanismos de reacción de los diversos reactivos reveladores frente a los compuestos químicos, plasmándose así, los fundamentos teóricos de las pruebas realizadas.

Los resultados determinaron la presencia de glicósidos saponínicos, flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, triterpenos y quinonas en las fracciones y extractos orgánicos ensayados. Así mismo, se determinó la ausencia de glicósidos cardiotónicos, cumarinas, sesquiterpenlactonas y antraquinonas.

Esta investigación fue realizada durante los meses de Enero a Noviembre del 2017. Sugerimos algunas recomendaciones para continuar los estudios de esta Familia botánica ya que son especies prometedoras en el estudio científico.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Los sistemas de medicina tradicional basados en plantas, han sido utilizados en todo el mundo durante miles de años y continúan jugando un papel esencial en los cuidados de la salud. Desde la presencia de los primeros seres humanos hasta nuestros días, las plantas medicinales se han empleado como tratamiento en distintas enfermedades. Esta capacidad que poseen las plantas de poder ser utilizadas como tratamiento para enfermedades, se debe a que sintetizan una gran diversidad de metabolitos secundarios como parte normal de su crecimiento y desarrollo o como parte de su mecanismo de respuesta. Estos compuestos confieren ciertas ventajas selectivas, como por ejemplo la supresión del crecimiento de las plantas vecinas o la protección frente a patógenos o a condiciones de estrés, por lo que tienen un importante papel fisiológico en las plantas. Los metabolitos secundarios representan así un grupo de compuestos con una gran diversidad estructural, que son valorados y explotados por el hombre por sus numerosas aplicaciones.⁽⁴⁶⁾

Desde mayo de 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza un estudio sobre las plantas medicinales, el cual ha permitido la identificación de 20000 especies a nivel mundial. Muchas de estas plantas provienen de los bosques tropicales y su empleo actual tiene en gran parte origen en las medicinas tradicionales que juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud y el bienestar de las poblaciones rurales y urbanas de los países en desarrollo.⁽¹⁴⁶⁾

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 80% de la población mundial vive en países en vías de desarrollo; estimando que más del 50% de esta población dispone, casi exclusivamente, de la medicina tradicional para cubrir sus necesidades sanitarias primarias y dado que las plantas medicinales

constituyen la “espina dorsal” de la medicina tradicional, más de 4000 millones de personas de los países en vías de desarrollo, utilizan plantas medicinales de forma regular. Así, para este segmento de la población mundial, que generalmente son incapaces de pagar el coste de los fármacos sintéticos, existe la necesidad de estudiar estas plantas para regular el uso seguro y eficacia, con el fin de desarrollar productos farmacéuticos normalizados.^(39,46)

El Salvador es uno de los países que mantiene una biodiversidad vegetal significativa, razón por la que se llevan a cabo actividades de bioprospección que consiste en la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, organismos y sustancias con posibles beneficios para el ser humano, ya que los compuestos obtenidos de fuentes naturales o bien sus derivados, juegan un papel importante en la industria química en general y en la medicina moderna.⁽³¹⁾

Las plantas pertenecientes a la Familia Celastraceae fueron reconocidas por la FDA dentro de las plantas superiores como una de las más prometedoras para su estudio científico, dada su amplia distribución botánica, naturaleza química, complejidad de sus metabolitos y fundamentalmente por las actividades farmacológicas de sus especies.⁽⁴⁰⁾

En medicina tradicional las Celastráceas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, malestares estomacales, fiebres, artritis reumatoide y cáncer.⁽⁶⁴⁾ De especies de Celastraceae se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, entre ellos se destacan, los triterpenoides, sesquiterpenos, diterpenos y glicósidos cardiotónicos, metabolitos que presentan una amplia gama de actividades biológicas.^(9,35) Así mismo, algunas estructuras se consideran como privilegiadas, debido a las características estructurales y a las numerosas propiedades biológicas que

poseen. El grupo mayoritario de compuestos bioactivos son los terpenos, siendo los celastroides y los sesquiterpenos dihidro β -agarofuránicos los más característicos de las especies de esta Familia, considerándose como indicadores quimiotaxonómicos de la misma.⁽³⁵⁾

En la presente investigación se realizó el análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de tres especies de Celastráceas nativas de El Salvador: *Maytenus segoviarum* (hojas, ramas, raíces y frutos), *Quetzalia reynae* (hojas, ramas y raíces) y *Zinowiewia integerrima* (hojas, ramas y raíces). De la especie *Maytenus segoviarum* se encontró información fitoquímica de hojas y ramas, mientras que de las especies *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima* no se reporta información fitoquímica en la literatura científica.

Durante los meses de Enero a Mayo se inició la investigación bibliográfica y, además, se programaron visitas a los herbarios del Museo de Historia Natural de El Salvador y del Jardín Botánico La Laguna para determinar la ubicación geográfica de las especies. Posteriormente en el Parque Nacional Montecristo se llevó a cabo la identificación botánica y uso de técnicas recolección de los órganos de las especies antes mencionados. Las muestras recolectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, lugar en el que se llevó a cabo la preparación previa de cada órgano vegetal y seguidamente se prepararon los extractos orgánicos utilizando diferentes solventes de extracción. Los extractos obtenidos fueron sometidos al análisis fitoquímico preliminar, que consistió en realizar diversas pruebas cualitativas para determinar la presencia de componentes químicos correspondiente a cada órgano de las especies vegetales, posterior a la determinación fitoquímica se procedió con la tabulación y discusión de resultados. Todo este estudio se llevo a cabo en los meses de Enero a Noviembre del presente año.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Realizar el análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima* de la Familia Celastraceae pertenecientes a la flora Salvadoreña.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Diseñar un mapa de distribución geográfica de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador.

2.2.2 Recolectar las especies vegetales de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

2.2.3 Preparar los extractos orgánicos de frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

2.2.4 Efectuar el análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA CELASTRACEAE.

La Familia Celastraceae es comúnmente conocida como la Familia agridulce, debido al sabor de sus frutos y consta de 106 géneros y 1300 especies, distribuidas en regiones tropicales y sub tropicales de todo el mundo (Figura N° 1),⁽¹²⁸⁾ doce géneros de esta Familia han sido reportados en Centroamérica,⁽²⁾ encontrándose en la flora Salvadoreña diez géneros y dieciocho especies (Tabla N° 1).^(5,19,20)

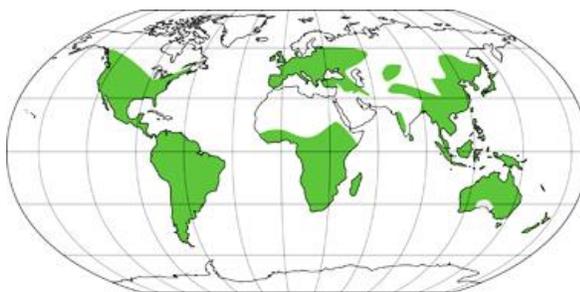


Figura N° 1. Distribución geográfica de la Familia Celastraceae (color verde).

La clasificación botánica de esta Familia ha experimentado cambios debido a hibridaciones,^(35,58) así, el género *Maytenus* incluye actualmente las especies antiguamente incluidas en *Gymnosporia* y algunas especies de *Rhacoma* hoy en día son incluidas en el género *Crossopetalum*, lo que ha dado lugar a que muchas especies tengan varios sinónimos. La Familia Celastraceae pertenece a:⁽³⁵⁾

División: Spermathophyta
 Subdivisión: Magnoliophyta (Angiospermas)
 Clase: Magnoliatae
 Subclase: Rosidae
 Orden: Celastrales
 Suborden: Celastranae
 Familia: Celastraceae

Tabla N° 1. Celastráceas pertenecientes a la Flora de El Salvador. (5,19,20,164)

Familia	Género	Especie	Nombres comunes en El Salvador
Celastraceae	<i>Cassine</i>	<i>xylocarpa</i>	"Calá", "Manzano silvestre"
	<i>Euonymus</i>	<i>enantiophyllus</i>	-
		<i>costaricensis</i>	-
	<i>Maytenus</i>	<i>chiapensis</i>	"Escobo blanco", "Arrayan rojo"
		<i>segoviarum</i>	"Cola de pavo"
	<i>Quetzalia</i>	<i>reynae</i>	"Palo de palomo", "Manzanito"
		<i>occidentalis</i>	-
	<i>Wimmeria</i>	<i>acuminata</i>	"Coralillo", "Ala de ángel"
		<i>bartlettii</i>	-
		<i>cyclocarpa</i>	"Camaroncillo", "Lupita", "Oponte"
	<i>Zinowiewia</i>	<i>integerrima</i>	"Culebro", "Barreto rojo", "Rosa blanca", "Siete pellejos"
		<i>rubra</i>	"Siete pellejos"
	<i>Celastrus</i>	<i>vulcanicola</i>	"Bejuco de sinaca", "Cafeto"
		<i>liebmannii</i>	-
	<i>Crossopetalum</i>	<i>uragoga</i>	"Manzanita"
		<i>parviflorum</i>	-
	<i>Hippocratea</i>	<i>volubilis</i>	"Bejuco camarón rojo", "Bejuco corral negro", "Bejuco de camarón"
<i>Semialarium</i>	<i>mexicanum</i>	"Cancerina", "Matapiojo cucaracho"	
(-) No se reporta el nombre común de la especie en El Salvador			

Elaborado por Karla Flores y Brenda Rodríguez con datos obtenidos de los herbarios del Jardín Botánico La Laguna (LAGU) y del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES). 2017

3.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA FAMILIA CELASTRACEAE.

En general se describen como árboles o arbustos, a veces escandentes, pubescentes, glabros o casi glabros; plantas hermafroditas, poligamodióicas o dioicas. Hojas alternas, opuestas y verticiladas, simples, enteras, crenadas y aserradas, con cristales de oxalato de calcio; estípulas persistentes, caducas o ausentes. Inflorescencias axilares o en nudos florales acompañados de hojas no desarrolladas, cimosas, tirsoideas, racemosas o fasciculadas, brácteas presentes, erosas.^(5,44)

Flores actinomorfas; cuatro o cinco sépalos libres o unidos en la base, imbricados, algunas veces persistentes; cuatro a cinco pétalos libres, imbricados; estambres en igual número que las partes del perianto, filamentos libres surgiendo por debajo o en el margen del disco, alternipétalos o alternisépalos, anteras tetrasporangiadas y ditecas o bisporangiadas, dehiscencia longitudinal, comúnmente introrsas o laterales; ovario súpero, semisúpero o raras veces semiínfero, con igual número de lóculos como carpelos, algunas veces abortando un lóculo, estilo terminal; fruto cápsula, sámara, baya o drupa; semillas a menudo ariladas. Raíces de color amarillo y naranja.^(5,44)

Durante los últimos 30 años, un gran número de metabolitos secundarios que presentan una gama de actividades biológicas se han extraído de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae, principalmente del género *Maytenus*, incluyendo actividad insecticida, antimicrobiana, citotóxica, hepatoprotectora, antipalúdicas, tratamiento en trastornos gástricos, enfermedades inflamatorias y dolor, entre otros trastornos.^(64,77,114)

3.2.1 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE CELASTRÁCEAS SALVADOREÑAS.

En el curso de las investigaciones fitoquímicas realizadas en especies de Celastráceas recolectadas en El Salvador, se han estudiado: *Crossopetalum uragoga*, *Celastrus vulcanicola*, *Cassine xylocarpa* y *Maytenus chiapensis*.

Los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos, alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, diterpenos de la serie del abietano, triterpenos pentacíclicos y triterpenos tetracíclicos, fueron los principales metabolitos secundarios aislados de los extractos orgánicos de las ramas, hojas, corteza del tallo y frutos de *Maytenus chiapensis*, hojas y ramas de *Crossopetalum uragoga* y corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* especies recolectadas en el Parque Nacional El Imposible, así mismo, de la corteza de raíz, tallos y hojas de *Celastrus vulcanicola* recolectada en el Parque Nacional Montecristo. Estos terpenoides presentaron actividades promisorias como revertidores de la multirresistencia a fármacos,⁽¹⁴⁵⁾ disuasorios de la alimentación en insectos,⁽¹²⁷⁾ citotóxicos,⁽¹³⁰⁾ inhibidores del virus de Epstein Barr,⁽¹²⁹⁾ actividad antituberculosa,⁽¹⁶²⁾ inhibidores fotosintéticos,⁽¹⁶³⁾ y antiinflamatorios.⁽¹⁴⁴⁾

-Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos.

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer, existe un incremento en el fallo de la quimioterapia, siendo la principal causa la multirresistencia a fármacos (MDR). La sobreexpresión de la P-glicoproteína, es responsable de una gran mayoría de los casos de MDR, ya que provoca una disminución de la concentración intracelular del fármaco.⁽²²⁾ De la fracción diclorometánica proveniente del extracto etanólico de las hojas de *Celastrus vulcanicola* se aislaron trece sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos (Figura N° 2), de ellos, nueve compuestos resultaron ser nuevos en la bibliografía química,

denominados como: (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-1,6,15-triacetoxi-2,9-dibenzoiloxi-4,8-dihidroxidihidro- β -agarofurano(1), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6,8,15-tetraacetoxi-2,9-dibenzoiloxi-4-hidroxidihidro- β -agarofurano(2), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2,8,15-tetraacetoxi-6,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi dihidro- β -agarofurano(3), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,2-diacetoxi-9-benzoiloxi-8-(*E*)-cinnamoiloxi-4,6-dihidroxidihidro- β -agarofurano(4), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-2,8-diacetoxi-6,9-dibenzoiloxi-1,4-dihidroxidihidro- β -agarofurano(5), (1*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-1,6-diacetoxi-9-benzoiloxi-8-(*Z*)-cinnamoiloxi-4-hidroxidihidro- β -agarofurano(6), (1*S*,2*S*,4*R*,5*R*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2,9-dibenzoiloxi-6-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano(7), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*)-1,8-diacetoxi-6,9-dibenzoiloxi-2,4-dihidroxidihidro- β -agarofurano(8), (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*)-2,8-diacetoxi-9-benzoiloxi-1,4-dihidroxidihidro- β -agarofurano(9).

Además de los sesquiterpenos dihidro β -agarofuránicos conocidos: 1 α ,2 α ,6 β ,8 β ,13-pentaacetoxi-9 β -benzoiloxi-4 β -hidroxi- β -dihidroagarofurano (10),⁽¹⁷⁵⁾ acetil pringleina(11),⁽¹⁵¹⁾ (1*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-9-benzoiloxi-1,6,15-triacetoxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano(12),⁽⁹²⁾ y (1 α ,2 α ,8 β ,9 β)-1,2, 8,14-tetraquis(acetiloxi)-9-(benzoiloxi) dihidro- β -agarofurano(13).⁽¹⁷²⁾

Todos los compuestos fueron ensayados como revertidores de la multirresistencia a fármacos, mediados por la expresión de la P-gp humana, es decir, la habilidad de revertir la resistencia del fenotipo y modular acumulación intracelular del fármaco, resultando cuatro compuestos (3, 4, 6 y 7) potentes quimiosensibilizantes para las células murinas MDR1-G185, mostrando alta eficacia comparada con los inhibidores clásicos de P-gp, como verapamilo, un quimiosensibilizador de primera generación, ya que revierten la resistencia a daunomicina y vinblastina a la más baja concentración probada 1 μ M.⁽⁶³⁾

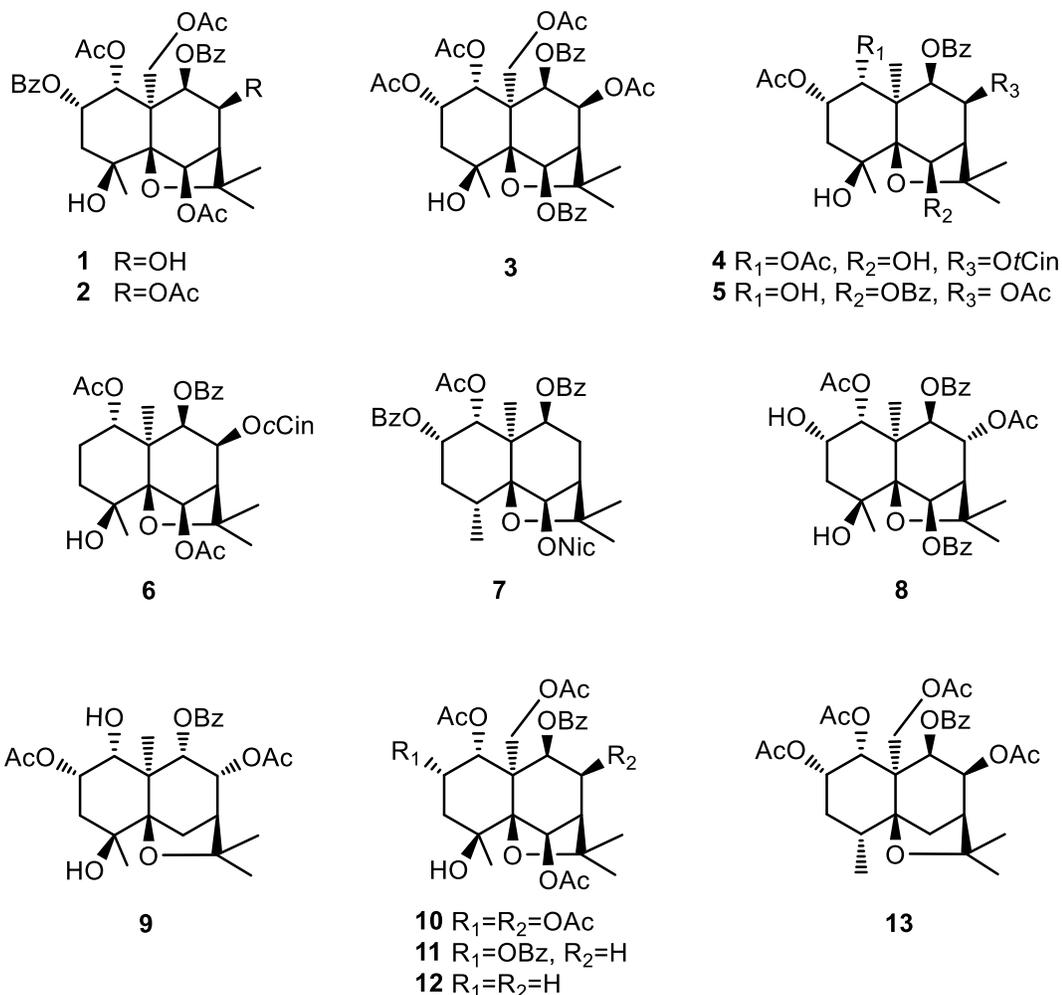


Figura N° 2. Estructuras sesquiterpénicas dihidro- β -agarofuránicos aislados de *Celastrus vulcanicola*.

En 2016, Núñez y colaboradores, aislaron veintidós sesquiterpenos dihidroagarofuránicos de los frutos de *Maytenus chiapensis*. Los compuestos nuevos fueron llamados, chiapen A(14), chiapen B(15), chiapen C(16), chiapen D(17) y chiapen E(18), mientras que los compuestos conocidos fueron identificados como, (1R,2S,4R,5S,6R,7R,8R,9S,10S)-6,15-diacetoxi-8,9-dibenzoiloxi-1,2-dihidroxi- β -dihidroagarofurano(19),⁽¹²²⁾ 6 β ,15-diacetoxi-1 α ,2 α ,8 α ,9 α -tetrabenzoiloxi-dihidro- β -agarofurano(20),⁽¹⁴⁵⁾ celaspeno-A (21),⁽¹⁷⁰⁾ 6 α ,13 β -diacetoxi-1 β ,8 β ,9 β -tribenzoiloxi- β -dihidroagarofurano(22),⁽⁹⁴⁾ 15-acetoxi

orbiculin A(23),⁽⁶⁹⁾ elat-1(24),⁽¹⁵⁰⁾ 1 α ,6 β ,8 α -13-tetraacetoxi-9 α -benzoiloxi-2 α -hidroxi- β -dihidroagarofurano(25),⁽⁹⁰⁾ ejap-4(26),⁽¹⁵⁰⁾ (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1,2,9,15-tetraacetoxi-4,6-dihidroxi-8-oxodihidro β agarofurano(27),⁽⁷⁹⁾ (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1,2,6,9,15-pentaacetoxi-4-hidroxi-8-oxodihidro- β -agarofurano(28),⁽¹²⁶⁾ (1*R*,2*S*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-1,6-diacetoxi-2,9-dibenzoiloxi- β -dihidroagarofurano(29),⁽¹²²⁾ orbiculin A(30),⁽¹⁰⁷⁾ ejap-2(31),⁽¹⁴⁹⁾ acetato de triptogelin A-3(32),⁽¹⁶¹⁾ diacetato de triptogelin A-3(33),⁽¹⁶¹⁾ 2 α -acetoxi-6 β ,9 β -difuroiloxi-1 α ,4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano (34),⁽¹⁴⁵⁾ y triptogelin G-2(35).⁽¹⁶⁰⁾

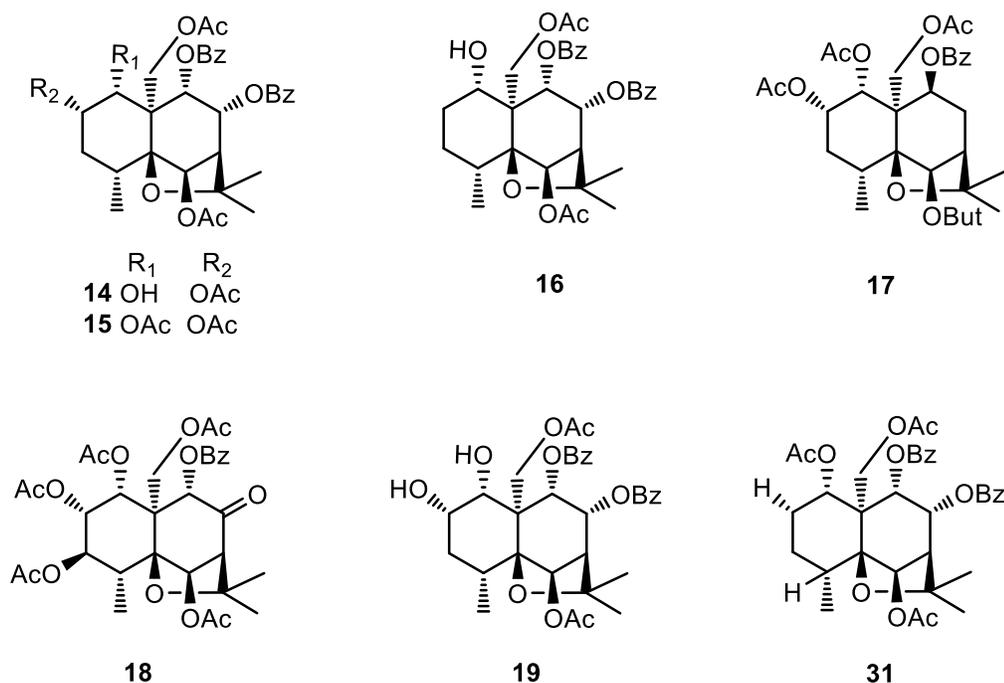


Figura N° 3. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos nuevos y conocidos activos frente al Virus del Epstein-Barr aislados de *Maytenus chiapensis*.

Así mismo, los compuestos químicos aislados se evaluaron como inhibidores de los antígenos tempranos del Virus Epstein-Barr (EBV-EA) inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Los sesquiterpenos demostraron una actividad inhibitoria más potente que el β -caroteno, conocido inhibidor del virus

Epstein-Barr, reportando que los compuestos 16, 19 y 31 (Figura N° 3), tienen significativos efectos anticancerígenos *in vivo* sobre dos etapas de un modelo químico DMBA/TPA de cáncer de piel en ratones.⁽¹²⁸⁾

-Alcaloides sesquiterpénicos.

De las hojas de *Maytenus chiapensis* se aislaron cuatro alcaloides sesquiterpénicos nuevos (Figura N° 4), denominados como chiapeninas ES-I(36), ES-II(37), ES-III(38) y ES-IV(39).

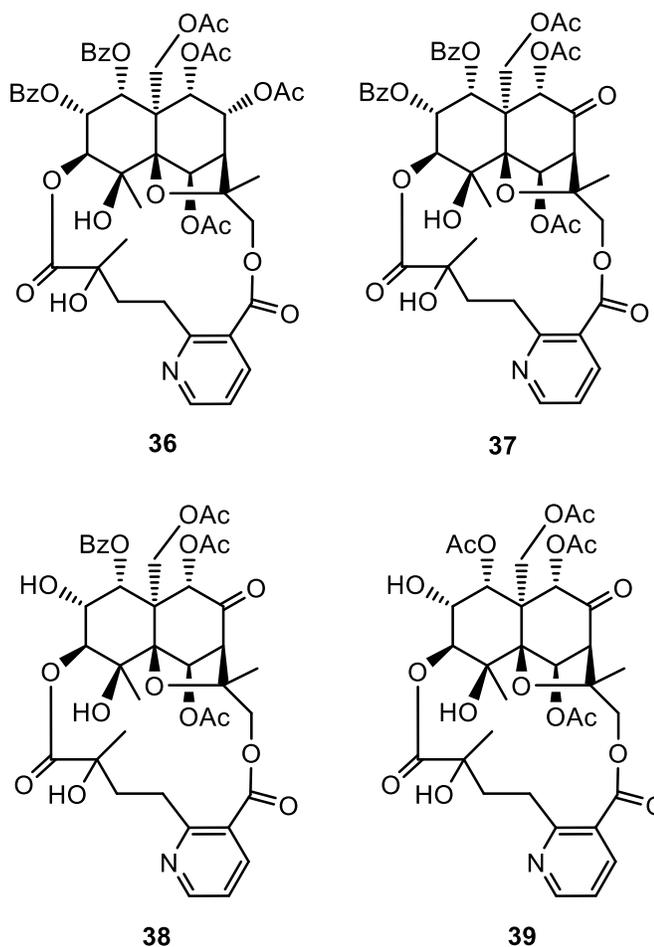


Figura N° 4. Estructuras estereoquímicas de nuevos alcaloides sesquiterpénicos aislados de *Maytenus chiapensis*.

Además de los alcaloides conocidos, wilfordina(40),(49) alatamina(41),(178) wilforidina(42),(180) alatusinina(43),(101) euonina(44),(159) euonymina(45),(169) ebenefolina E-I(46),(103) forrestina(47),(68) mayteina(48),(153) y 4-hidroxi-7-*epi*-chuchuhuanina E-V(49).(113) Sus estructuras fueron elucidadas por espectroscopia de RMN de 1D y 2D, incluyendo experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear (COSY, ROESY, HSQC y HMBC).

Los alcaloides sesquiterpénicos 40, 43 y 44 (Figura N° 5), exhibieron una fuerte actividad disuasoria de la alimentación (ADA) frente a *Spodoptera littoralis* "Rosquilla negra", larva extremadamente voraz en cultivos de tomate, chile verde, algodón, repollo, etc.(127)

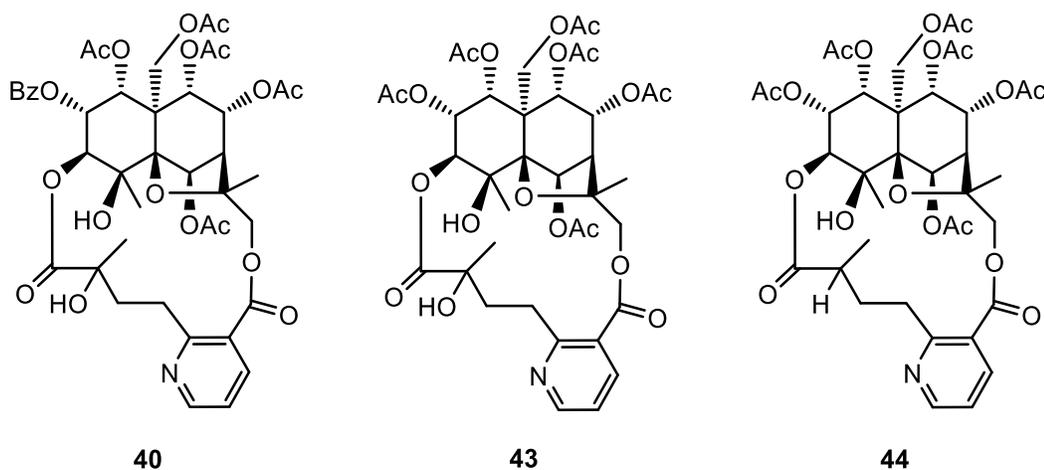


Figura N° 5. Alcaloides sesquiterpénicos activos frente a *Spodoptera littoralis* "Rosquilla negra", aislados de *Maytenus chiapensis*.

-Diterpenos.

La quimiopreención del cáncer es considerada como una de las estrategias para el control del cáncer. La inhibición de tumores en la etapa de promoción es una de las alternativas más prometedoras en la quimiopreención del cáncer y la inhibición de la producción de los antígenos tempranos del virus Epstein-Barr inducido por TPA es una de las estrategias empleadas para la búsqueda de

agentes quimiopreventivos. En esta vía se aislaron un diterpeno nuevo en la bibliografía química, con esqueleto abietatrieno de la fracción diclorometánica proveniente del extracto etanólico de las hojas de *Crossopetalum uragoga* al que se le llamó salvadoriol(50), además de cinco diterpenos conocidos en la bibliografía química e identificados como, ferruginol(51),⁽⁵⁶⁾ triptinina B(52),⁽¹⁷⁷⁾ hipolida(53),⁽¹⁷⁴⁾ carnosol(54),⁽⁵⁷⁾ y diacetato de carnosol(55).⁽⁵⁷⁾ Se analizó la actividad quimiopreventiva de los compuestos, resultando el salvadoriol y los compuestos 54 y 55 (Figura N° 6) prometedores por sus efectos antitumorales. Además, el compuesto 54 mostró los mejores resultados en la prueba de carcinogénesis en dos etapas *in vivo*, lo que sugiere una correlación con sus propiedades antioxidantes.⁽¹²⁹⁾

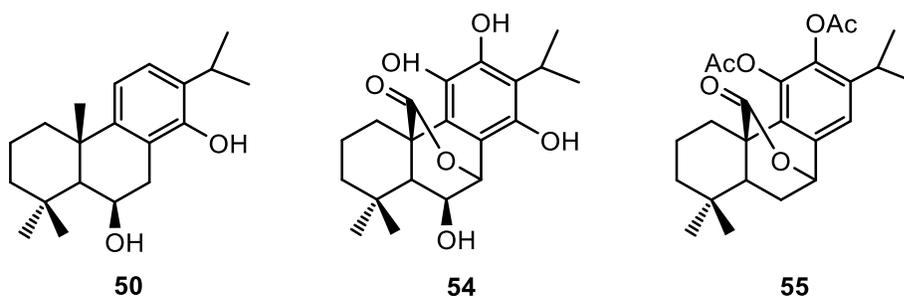


Figura N° 6. Estructuras diterpenicas aisladas de *Crossopetalum uragoga* con actividad quimiopreventiva.

-Triterpenos pentacíclicos y tetracíclicos.

De la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* y *Celastrus vulcanicola*, se aislaron tres nuevos triterpenos, dos de ellos presentan un esqueleto raro de naturaleza D:B-friedobacarano, denominados leonatriol(56) y leonatriolona(57) y el tercer compuesto representa el segundo ejemplo de triterpeno con esqueleto D:A-friedooleano, al que se le denominó cassinolida(58) (Figura N° 7); La configuración absoluta de los compuestos 56 y 57 fue determinada por aplicación de la preparación del éster de Riguera y consideraciones

biogénicas. También se propone una posible vía biogénica para la formación de cassinolda.⁽¹³²⁾

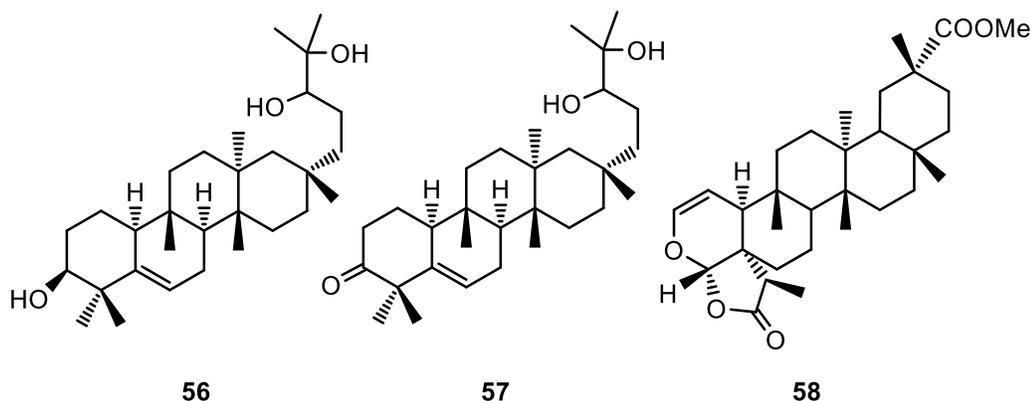


Figura N° 7. Estructuras de triterpenos tetracíclicos con esqueleto D:B-friedobacarano y D:A-friedooleano aislados de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* y *Celastrus vulcanicola*.

Doce triterpenoides (Figura N° 8) con un novedoso y raro esqueleto carbonado fusionado 6/6/6/6, se aislaron de la corteza de raíz de *Celastrus vulcanicola*, tres de estos compuestos fueron triterpenos tetracíclicos nuevos en la literatura química y se denominaron, montecrinano A(59), montecrinano B(60) y montecrinano C(61). Además se identificaron tres triterpenos tetracíclicos D:B-friedobacaranos conocidos, baruol(62),⁽¹²⁵⁾ leonatriol(63),⁽¹³²⁾ leonatriolona(64),⁽¹³²⁾ y seis triterpenos pentacíclicos de la serie del lupano, nepeticin(65),⁽⁵⁰⁾ 2 α ,3 β -dihidroxi-lup-20(29)-eno(66),⁽¹⁰⁹⁾ 3 β ,6 β -dihidroxi-lup-20(29)-eno(67),⁽⁷³⁾ betulina(68),⁽⁷⁰⁾ 6 β ,28-dihidroxi-3-oxolup-20(29)-eno(69),⁽⁷³⁾ y ácido 6 β -hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-28-oico(70).⁽¹¹¹⁾ Las estructuras de los nuevos metabolitos fueron elucidadas basados en espectroscopia (RMN 1D y 2D) y técnicas espectrométricas (espectrometría de masas de impacto electrónico de alta resolución y espectrometría de masas por electrospray). Sus configuraciones absolutas se determinaron mediante espectroscopia de RMN, con ácido (*R*)-(-)- α -metoxifenilacético como un agente derivatizador quiral y consideraciones

biogénicas. Vías biogénicas para el montecrinano y los D:B-friedobaccharanos fueron propuestas y estudiadas por métodos de funcionalidad de la densidad (DFT).⁽¹⁴¹⁾

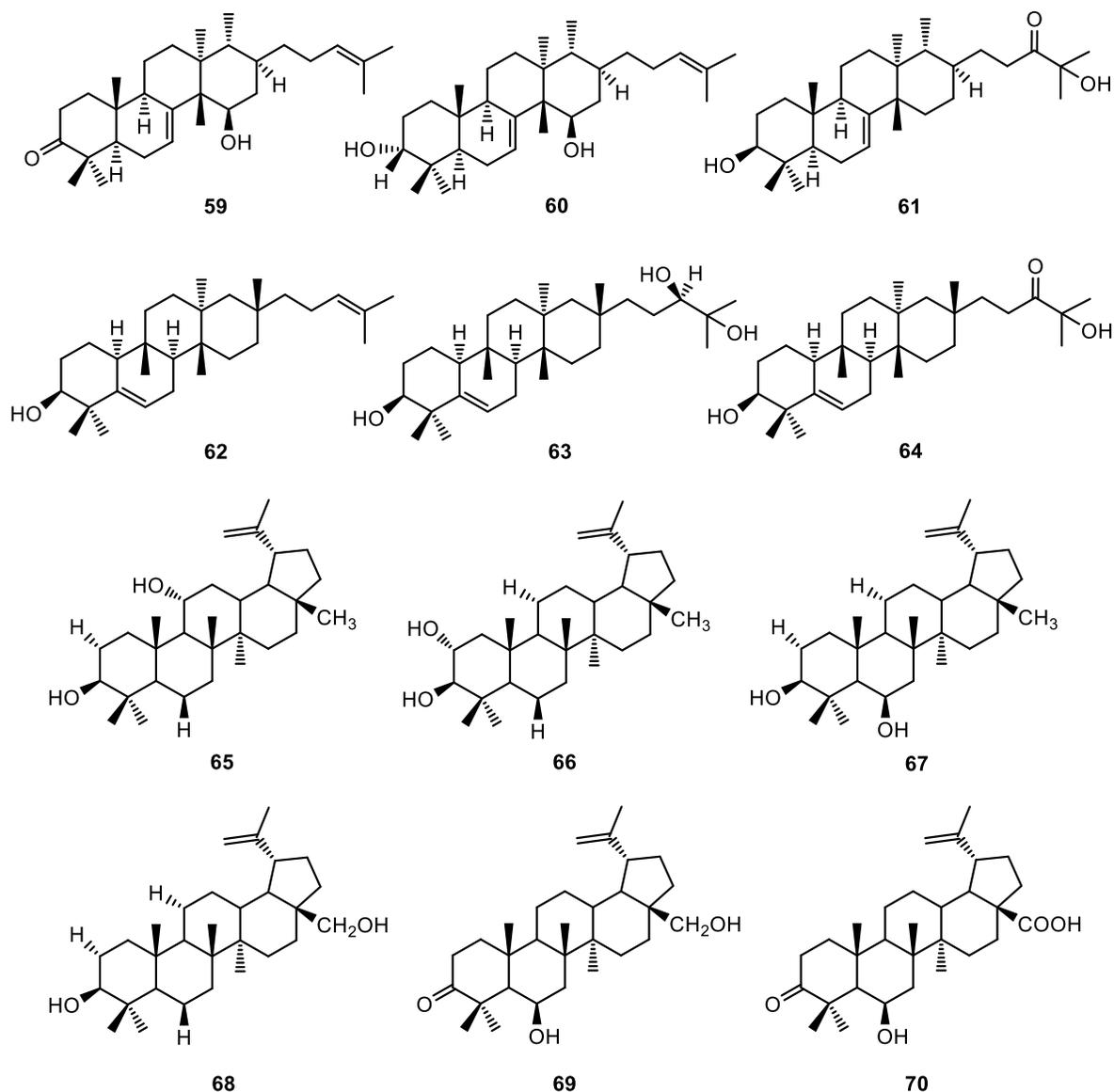


Figura N° 8. Triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de *Celastrus vulcanicola*.

En 2011, Núñez y colaboradores, publicaron el primer ejemplo de un aducto entre un triterpeno con un neolignano, al que denominaron uragogin(71) (Figura N° 9), el cual fue aislado de las ramas de *Crossopetalum uragoga*.⁽¹²⁴⁾

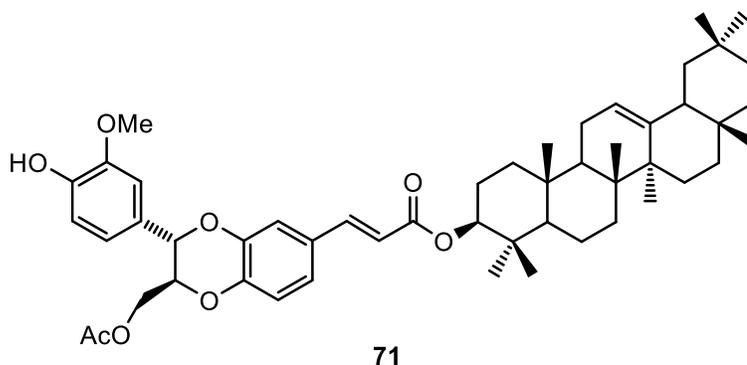


Figura N° 9. Uragogin, nuevo triterpeno pentacíclico aislado de las ramas de *Crossopetalum uragoga*.

De la corteza de raíz de *Celastrus vulcanicola*, se aislaron y elucidaron por espectroscopia de RMN de 1D y 2D, incluyendo experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear (COSY, ROESY, HSQC y HMBC), cinco triterpenos con esqueleto de friedelano nuevos (Figura N° 10) llamados, ácido 7β -hidroxi-3-oxo-D:A-friedooleanano-28-oico(72), ácido metiléster 7β -hidroxi-3-oxo-D:A-friedooleanano-28-oico(73), $7\beta,29$ -dihidroxi-3-oxo-D:A-friedooleanano (74), $1\beta,30$ -dihidroxi-3-oxo-D:A-friedooleanano(75), ácido 1β -hidroxi-3-oxo-D:A-friedooleanano-30-oico(76), y ocho conocidos en la literatura química. Se determinó la actividad de los compuestos frente a la diabetes mellitus tipo 2.

Resultando que los triterpenos 72 y 74 presentaron una mayor sensibilidad a la insulina, lo que sugiere que los triterpenos del friedelano tienen potencial terapéutico en estados de resistencia a la insulina.⁽⁵²⁾

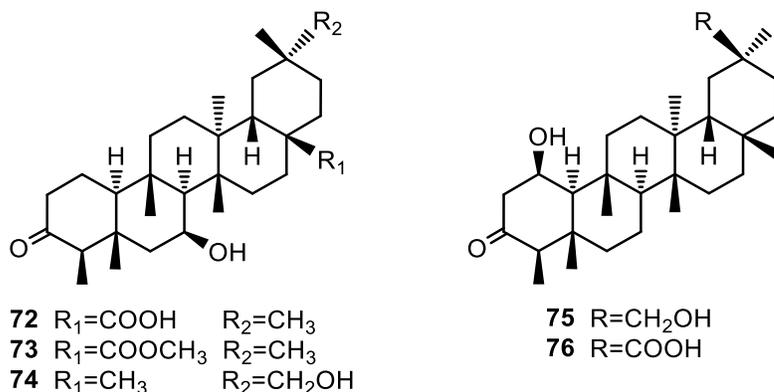


Figura N° 10. Nuevos triterpenos pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de *Celastrus vulcanicola*.

Osorio y colaboradores., reportan el aislamiento de ocho triterpenos nuevos en la literatura química con esqueleto olean-18-eno llamados, $3\beta,29$ -dihidroxi-olean-18-eno(77), 29-hidroxi-3-oxo-olean-18-eno(78), $6\beta,29$ -di hidroxi-3-oxo-olean-18-eno(79), 6β -hidroxi-3-oxo-olean-18-eno(80), $3\beta,21\alpha$ -dihidroxi-olean-18-eno(81), $3\beta,6\beta$ -dihidroxi-olean-18-eno(82), 21α -hidroxi-3-oxo-olean-18-eno(83), 3,21-dioxo-olean-18-eno(84), y dos triterpenos conocidos procedentes del extracto etanólico de los tallos de *Cassine xylocarpa*, identificados como, germanicol(85),⁽⁵⁴⁾ y germanicon(86).⁽⁹¹⁾

Se investigó la actividad antiviral de los compuestos y se encontró que cinco triterpenos (77, 79, 80, 83 y 84) poseen una potente actividad como inhibidores de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, siendo los compuestos 77 y 84 los más activos (Figura N° 11). Los compuestos en estudio presentan la ventaja sobre los fármacos antirretrovirales actualmente autorizados, ya que actúan como inhibidores de la transcripción dependiente del potenciador. Para determinar el mecanismo de acción se establecieron relaciones de estructura-actividad basadas en la regiosustitución y el grado de oxidación del triterpeno, revelando que los compuestos en estudio fueron capaces de modular la selectividad e intensidad de Inhibición del virus.⁽¹³⁵⁾

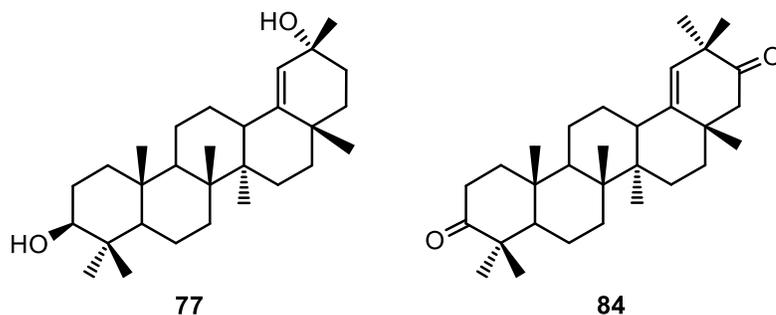


Figura N° 11. Triterpenos pentacíclicos procedentes de los tallos de *Cassine xylocarpa* con potente actividad inhibidora de la replicación del VIH tipo 1.

Del extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* y *Celastrus vulcanicola*, se aislaron dos nuevos triterpenos pentacíclicos (Figura N° 12), denominados: xylocetal(87) y 3b,21a-dihidroxi-5-eno(88), además de siete triterpenos conocidos en la bibliografía química.⁽¹³¹⁾

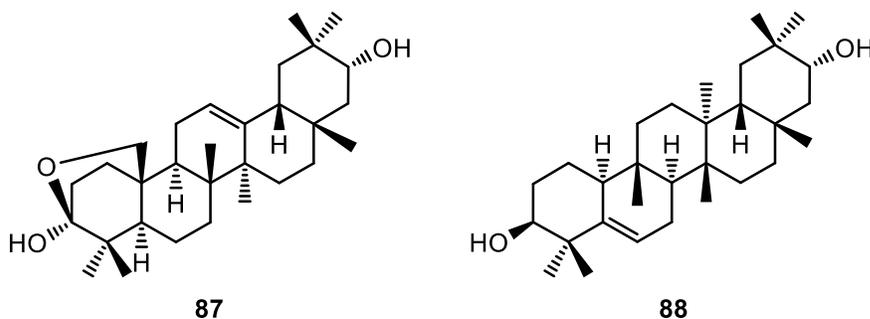


Figura N° 12. Nuevos triterpenos pentacíclicos aislados de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* y *Celastrus vulcanicola*.

En la búsqueda de nuevos agentes con actividad frente al virus del SIDA, se ha probado que los triterpenos de la serie del oleano presentan actividad prometedora al exhibir efectos inhibitorios sobre la replicación del virus de inmunodeficiencia humano tipo 1. Siguiendo las investigaciones en esta línea, Callies y colaboradores, aislaron de los tallos de *Cassine xylocarpa*, 4 triterpenos con esqueleto del oleano nuevos en la literatura química (Figura N°

13) a los que llamaron, $6\beta,30$ -dihidroxilup-20(29)-en-3-ona(89), 6β -hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-30-al(90), ácido 3-oxolup-20(29)-en-30-oico(91), $3\beta,6\beta,20$ -trihidroxilupano(92), y seis compuestos conocidos de naturaleza triterpénica identificados como, 3-oxolup-20(29)-en-30-al(93),⁽¹⁷³⁾ 3-oxo-30-hidroxilupano(94),⁽⁵⁵⁾ $6\beta,20$ -dihidroxilupano-3-ona(95),⁽⁷³⁾ $3\beta,30$ -dihidroxilupano(96),⁽¹⁶⁶⁾ 3-*epiglochidiol*(97),⁽⁸⁸⁾ y ochraceolida A(98).⁽¹²⁰⁾ De los compuestos ensayados, el compuesto 92 presenta potente actividad anti-VIH con una concentración inhibitoria media de 1.4 μM .⁽⁶¹⁾

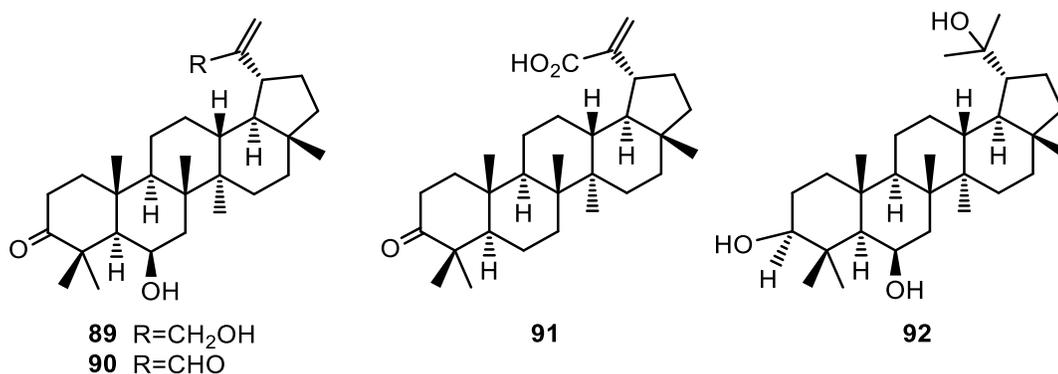


Figura N° 13. Nuevos triterpenos pentacíclicos con esqueleto del oleano aislados de los tallos de *Cassine xylocarpa*.

3.3 GENERALIDADES DE *Maytenus segoviarum*.

3.3.1 Historia.

El género *Maytenus*, uno de los géneros más representativos de la Familia Celastraceae, fue descrito en una obra prelinnea por Feuillée bajo el nombre de maitén, basándose en la especie *Maytenus boaria*. Posteriormente, fue Molina en 1972 quien describió esta especie, sin embargo, cometió algunos errores morfológicos, lo que generó confusión en su descripción ubicándola en otras Familias o creando otro género.⁽³⁵⁾

El género *Maytenus* se describe como arbustos o árboles pequeños, hojas alternas, el margen entero o parcial a completamente dentados; estípulas pequeñas, triangulares o lineares. Inflorescencia una cima solitaria o fasciculada, axilar, flores pequeñas, blancas o amarillentas; cinco pétalos, redondeados en el ápice; cinco estambres, insertados debajo del disco. Fruto capsular, coriáceo, dehiscencia por dos o tres valvas; con una a tres semillas y arilo vistoso blanco, rojo o amarillo.^(12,44)

Maytenus segoviarum es una especie perteneciente al género *Maytenus*, cuyo isotipo fue colectado por Paul C. Standley en 1947, en Jinotega Nicaragua, Dicho espécimen se encuentra bajo resguardo de Missouri Botanical Garden Herbarium.⁽¹⁶⁵⁾

Especies de este género se utilizan como antisépticos, antiasmáticos, antiinflamatorios, para tratar problemas estomacales y respiratorios, así mismo, les son atribuidas propiedades antitumorales, antimicrobianas, estimuladoras del sistema nervioso central (SNC), antioxidantes y antinociceptivos.^(51,121,157)

En países de Sudamérica algunas especies se han utilizado en infusión o masticadas para el tratamiento del dolor y en Paraguay como reguladores de la fertilidad y para inducir la menstruación en las mujeres.⁽⁵¹⁾

3.3.2 Descripción.

Nombre común: "Cola de pavo" (El Salvador).

Nombre Científico: *Maytenus segoviarum* Standl. & L.O. Williams.

Sinónimos de nombre científico: No se reportan sinónimos.

Familia: Celastraceae.

Referencia de herbarios: Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) y Jardín Botánico La Laguna (LAGU), año de consulta 2017.

Descripción botánica: Arbustos o árboles, de siete a ocho metros de alto, glabros excepto por el margen del cáliz. Hojas lanceoladas u ovadas de dos a nueve centímetros de largo y de uno a tres centímetros de ancho, redondeadas a agudas en el ápice, punta retusa, obtusas y cuneiformes en la base, margen ligeramente crenulado o entero, al secarse gris-verdes o pardas, de siete a nueve nervios laterales a cada lado; pecíolo de 2.5 milímetros de largo.^(12,146)

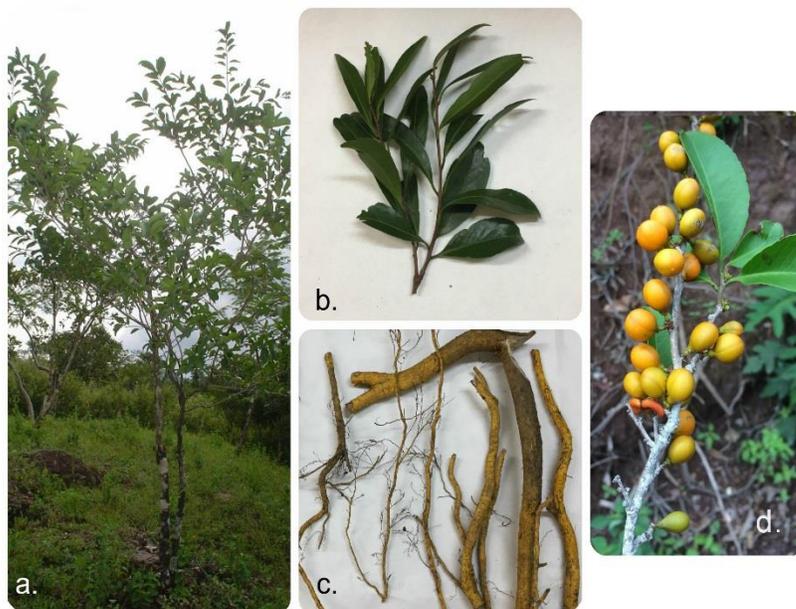


Figura N° 14. *Maytenus segoviarum* a. Árbol; b. Hojas; c. Raíces; d. Frutos.

La figura N° 14 es una fotografía de Martínez, M.L., del Parque Nacional Montecristo, El Salvador, 2017. De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Inflorescencias fasciculadas, axilares o solitarias, con flores, verde-amarillas; subsésiles o con pedicelos de tres a cinco milímetros; cáliz cortamente lobado semicirculares, ápice eroso; pétalos obtusos y erosos. Cápsula roja-naranja semiglobosa o globoso ovoide, bivalva; una semilla con arilo blanco, pero rojo cuando seco, raíces amarillas.^(12,44)

Hábitat: Bosques secos, laderas y suelos rocosas, selvas altas perennifolias.

Usos etnobotánicos: En El Salvador no se reportan usos etnobotánicos atribuidos a la especie *Maytenus segoviarum*.

Toxicidad: No se reportan estudios de toxicidad de la especie *Maytenus segoviarum*.

Origen y distribución: La especie se encuentra distribuida en Centroamérica (Ver anexo N° 1) y El Salvador, en los Departamentos de Morazán, Santa Ana y Cabañas.^(5,115)

Composición Química: Estudios fitoquímicos de las hojas de *Maytenus segoviarum* han demostrado la presencia de compuestos triterpénicos, entre ellos, *epifriedelanol*, *friedelina*, α -*amirina* y *lupeol*. También se reporta el aislamiento del β -*sitosterol*.⁽³⁰⁾

Así mismo, estudios fitoquímicos de las ramas de *Maytenus segoviarum* muestran el aislamiento de triterpenos de la serie del lupano (*lupeol* y *6 β -hidroxi-lupan-3-ona*) y alcaloides sesquiterpénicos (*euonymina*, *4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V*, *2-deacetilevonina* y *forrestina*).⁽³⁰⁾

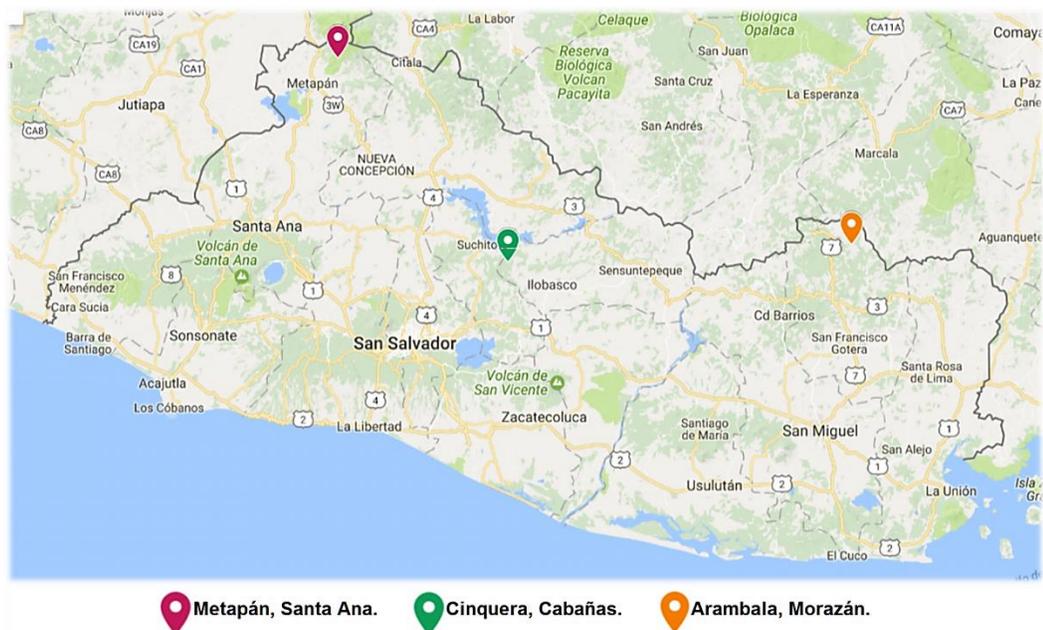


Figura N° 15. Distribución geográfica de la especie *Maytenus segoviarum* en El Salvador.

3.4 GENERALIDADES DE *Quetzalia reynae*.

3.4.1 Historia.

En 1897 Loesener describió a *Microtropis occidentalis* como la primera especie americana representante del género *Microtropis*. La segunda especie, *Microtropis schiedeana*, fue publicada tres años más tarde por el mismo autor.⁽¹¹⁸⁾

En 1909, durante la revisión de las especies americanas, Sprague identificó tres especies más, de las cuales sólo una, *Microtropis guatemalensis*, se puede referir al género *Microtropis*. Una cuarta especie, *Microtropis standleyi*, fue descrita en 1938 por Lundell.⁽²⁷⁾ En 1970 Lundell considero las especies americanas de *Microtropis* y las transfirió al género *Quetzalia*,⁽⁹⁶⁾ ambas están estrechamente relacionadas, la diferencia es su distribución geográfica, ya que *Microtropis* está en la actualidad restringido al continente Asiático.^(12,156)

En los países asiáticos las especies de *Microtropis* se utilizan como insecticidas, antiinflamatorios, contra el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y como antioxidantes e inmunosupresores, así mismo, les son atribuidas propiedades citotóxicas, antitumorales y antituberculosas.^(67,170)

Esto se debe a la variedad de metabolitos secundarios que poseen, entre ellos, sesquiterpenos β -agarofuranos, diterpenos, triterpenos y bencenoides.^(65,67,69)

Los triterpenoides pentacíclicos son los constituyentes dominantes y dentro de estos se encuentran oleano, ursano y lupano.⁽⁶⁵⁾

Quetzalia reynae es una especie cuyo holotipo fue colectado en El Salvador por María Luisa Reyna en 1977, dicho espécimen se encuentra bajo resguardo de Lundell Herbarium, University of Texas, en Austin.⁽¹⁰⁴⁾

3.4.2 Descripción.

Nombre común: “Palo de palomo”, “Manzanito”. (El Salvador).

Nombre Científico: *Quetzalia reynae* Lundell.

Sinónimos de nombre científico: *Microtropis ilicina* y *Quetzalia ilicina*. ⁽¹⁶⁴⁾

Estatus: Nativa, endémica

Familia: Celastraceae.

Referencia del herbario: Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) y Jardín Botánico La Laguna (LAGU), año de consulta 2017.

Descripción botánica: Arbustos o árboles hasta doce metros; ramitas comprimidas en las puntas, púrpura-rojizas. Hojas de 6 a 10 por 2.5 a 5 centímetros, elípticas u oblongo-elípticas, coriáceas, el haz verde, el envés blanco o gris, la vena media color verde, con 6 nervaduras laterales, la base

cuneada, los márgenes enteros o revolutos hacia la base, el ápice agudo; pecíolo color verde.⁽¹²⁾



Figura N° 16. *Quetzalia reynae* a. Árbol; b. Hojas; c. Raíces.

La figura N° 16 es una fotografía de Núñez, M.J., del Parque Nacional Montecristo, El Salvador, 2017. De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Inflorescencias de dos a cuatro centímetros, con tres a seis flores; pedúnculo con el margen eroso color blanco; estambres de un milímetro. Cápsulas dehiscentes a lo largo de un costado de dos a quince milímetros, angostamente elipsoidales u ovoides; semillas anaranjadas no ariladas.⁽¹²⁾

Hábitat: Selvas altas perennifolias, bosques tropicales montanos.

Usos etnobotánicos: En El Salvador no se reportan usos etnobotánicos atribuidos a la especie *Quetzalia reynae*.

Toxicidad: No se reportan estudios de toxicidad de la especie *Quetzalia reynae*.

Origen y distribución: Especie distribuida en El Salvador en el Departamento de Santa Ana, Municipio de Metapán.^(5,115)

Composición Química: No se reportan estudios fitoquímicos de la especie *Quetzalia reynae*.

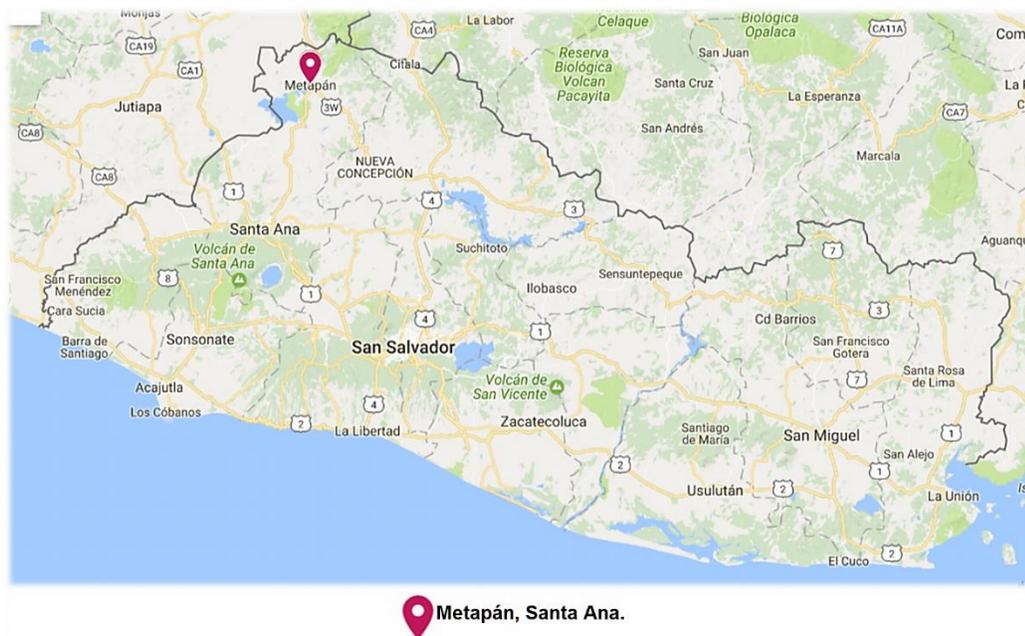


Figura N° 17. Distribución geográfica de la especie *Quetzalia reynae* en El Salvador.

3.5 GENERALIDADES DE *Zinowiewia integerrima*.

3.5.1 Historia.

En el año de 1858 Nicolai Stepanowitsch Turczaninow, describió *Wimmeria integerrima*, un año después, en 1859 describió el género *Zinowiewia* basado en *Wimmeria integerrima*.^(27,167)

El género permaneció monotípico hasta 1938 cuando Lundell describió 6 especies adicionales *Zinowiewia concinna* Lundell, *Zinowiewia rubra* Lundell, *Zinowiewia matudai* Lundell, *Zinowiewia australis* Lundell, *Zinowiewia costaricensis* Lundell y *Zinowiewia pallida* Lundell.⁽¹⁰⁾ Al año siguiente publicó una revisión del género describiendo siete especies, poco después añadió dos especies más. Entre 1964 y 1988 describieron cinco especies de México y Centroamérica y dos especies de Norte América y Sur América, siendo un total de 16 especies descritas como parte de este género en el continente americano.⁽¹⁶⁷⁾

3.5.2 Descripción.

Nombre común: "Culebro", "Barreto rojo", "Rosa Blanca", "Siete pellejos" (El Salvador).

Nombre Científico: *Zinowiewia integerrima* (Turcz.) Turcz.

Sinónimos de nombre científico: *Zinowiewia costaricensis*, *Zinowiewia cuneifolia*, *Zinowiewia inaequifolia*, *Zinowiewia micrantha*, *Zinowiewia ovata* y *Zinowiewia revoluta*.⁽¹⁶⁴⁾

Familia: Celastraceae.

Referencia del herbario: Museo de Historia Natural de El Salvador (MUHNES) y Jardín Botánico La Laguna (LAGU), año de consulta 2017.

Descripción botánica: Árboles de hasta 30 metros de alto; planta hermafrodita. Hojas opuestas variables en tamaño y forma, angostas a ampliamente ovadas o elípticas, en ocasiones asimétricas, el haz color verde, el envés verde más pálido, la vena media verde, blanca o roja, de cinco a siete nervaduras laterales, verdes o rojas en el envés, la base angosta a ampliamente cuneada o redondeada, los márgenes enteros, el ápice acuminado; pecíolo de cinco a quince mm, verde, blanco o rojo.^(12,44)

Inflorescencias solitarias, rara vez dos por axila, con treinta a ciento veinticinco flores; pedicelos de tres a cinco mm color rojos; flores verdes o verde-amarillas; cáliz triangular. Sámaras verdes amarillento con ala terminal, obovadas u oblanceoladas, ligeramente falcadas, el ápice redondeado o emarginado, sin arilo.^(12,44)



Figura N° 18. *Zinowiewia integerrima* a. Árbol; b. Hojas; c. Raíces.

La figura N° 18 es una fotografía de Núñez, M.J., del Parque Nacional Montecristo, El Salvador, 2017. De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Hábitat: Selvas altas perennifolias, las zonas templadas, en las cañadas o en laderas.

Usos etnobotánicos: En El Salvador no se reportan usos etnobotánicos atribuidos a la especie *Zinowiewia integerrima*.

Toxicidad: No se reportan estudios de toxicidad de la especie *Zinowiewia integerrima*.

Origen y distribución: Especie distribuida desde el sur de México, Centroamérica (Ver anexo N° 1), hasta Venezuela,⁽¹²⁾ y El Salvador en los Departamentos de Ahuachapán y Santa Ana.⁽¹¹⁵⁾

Composición Química: No se reportan estudios fitoquímicos de la especie *Zinowiewia integerrima*.

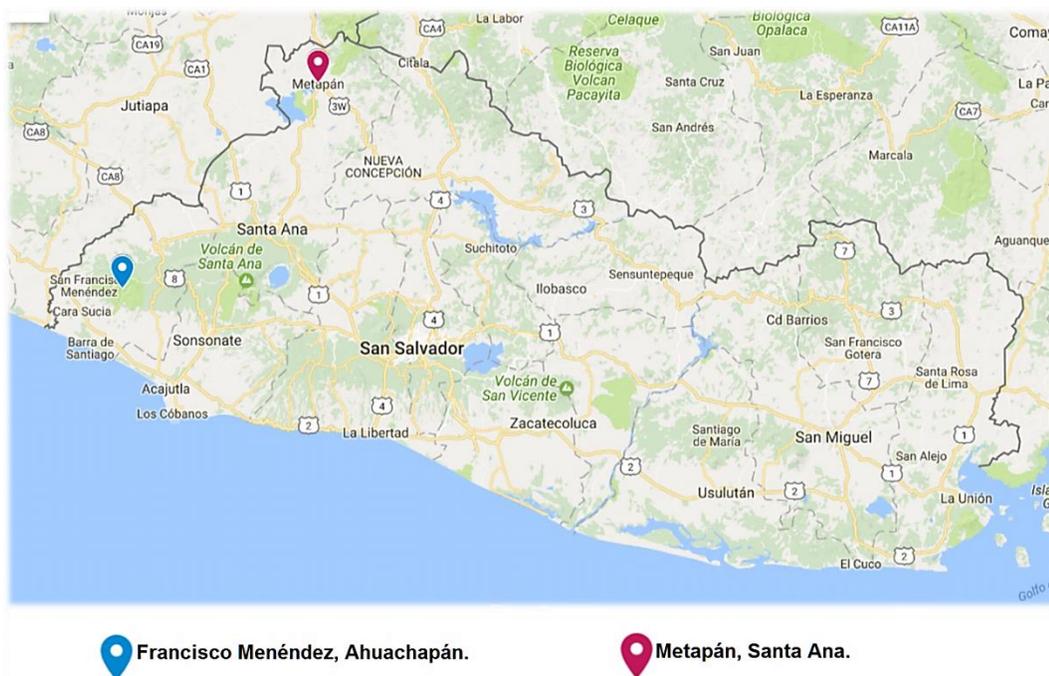


Figura N° 19. Distribución geográfica de la especie *Zinowiewia integerrima* en El Salvador.

3.6 GENERALIDADES DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO.

Se realiza un proceso de extracción de las plantas con el fin de obtener los principios activos, los cuales son extraídos por sus propiedades físicas y químicas.

Los métodos de extracción más importantes se dividen en:⁽²⁴⁾

- Métodos discontinuos.
- Métodos continuos.

3.6.1 Extracción discontinua.

La droga se pone en contacto con el disolvente por lo que la difusión de los principios activos se producirá en todas direcciones hasta alcanzar el equilibrio.

Entre los métodos de extracción discontinua destacan: ⁽²⁴⁾

- **Maceración:** se utiliza cuando los metabolitos a extraer son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable al disolvente, útil para la extracción de metabolitos termolábiles ya que se trabaja a temperatura ambiente dejando el material vegetal seco y triturado en contacto con el disolvente a temperatura ambiente. Una desventaja de este método es que el proceso es lento, no se consigue agotamiento total de la muestra y se emplean grandes volúmenes de disolvente (Figura N° 20).⁽²⁴⁾



Figura N° 20. Muestras de material vegetal en maceración.

La figura N° 20 es una fotografía de Castillo, U.O., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- **Maceración ultrasónica:** el material vegetal y el disolvente se trata con ondas ultrasónicas, es una maceración bajo ondas energéticas que mejoran la difusión y la interacción entre el solvente y material vegetal. Este es un método más rápido que la maceración (Figura N° 21).⁽²⁴⁾



Figura N° 21. Baño ultrasónico, aparato utilizado para realizar la maceración ultrasónica.

La figura N° 21 es una fotografía de Flores, K.C., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

3.6.2 Extracción continua.

En este tipo de extracción el disolvente utilizado se va renovando y actúa en una sola dirección. La droga se pone en contacto con el disolvente adecuado y en todo momento se mantiene el equilibrio entre la concentración de principio activo en la droga y en el disolvente, para que se produzca una difusión celular. Dentro de los métodos de extracción continua destacan:⁽²³⁾

- **Percolación:** es un proceso que se realiza a temperatura ambiente. El disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal, el cual es recogido por la parte inferior del percolador. Se puede llegar a la extracción

completa de los metabolitos con el inconveniente de un elevado consumo del disolvente (Figura N° 22).⁽²⁴⁾

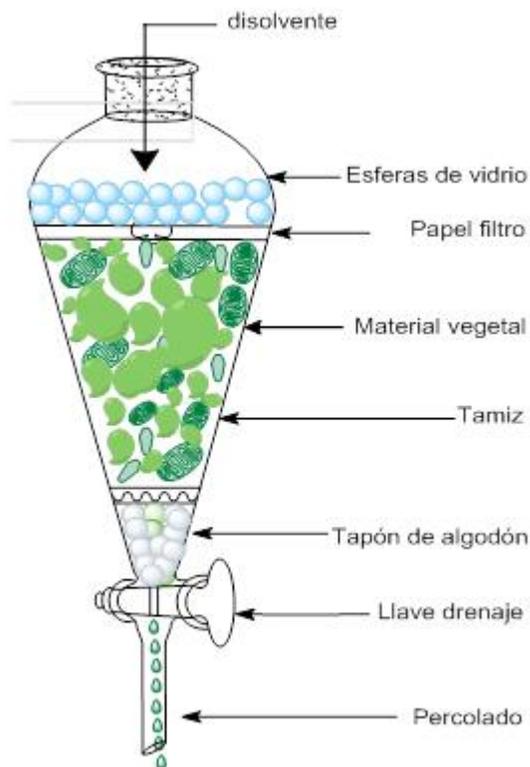


Figura N° 22. Aparato de percolación.

- **Soxhlet:** es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz o balón, cuerpo extractor y refrigerante. Algunas ventajas de este método se mencionan: utilización volúmenes de disolventes menores, extracciones exhaustivas y tiempos más cortos de extracción. Al utilizar este tipo de extracción se debe tomar en cuenta el uso de disolventes de bajo punto de ebullición (Figura N° 23).⁽²⁴⁾



Figura N° 23. Aparato Soxhlet.

La figura N° 23 es una fotografía de Martínez, M.L., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

3.6.3 Método cromatográfico de separación de metabolitos

secundarios.^(26,29)

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- a) Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase móvil recibe el nombre de elución.

3.6.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF).⁽²⁹⁾

La cromatografía en capa fina es una técnica cualitativa que se utiliza en la identificación de compuestos, en la determinación de componentes de una mezcla, ayuda a determinar el solvente adecuado para llevar a cabo una separación, así mismo, se utiliza en el análisis de las fracciones recogidas en una cromatografía en columna.

En la cromatografía en capa fina se emplea una fase estacionaria que se encuentra depositada sobre una placa de vidrio, plástico o lámina metálica, formando una capa fina de espesor uniforme entre 0.1 mm-0.2 mm. La placa cromatográfica se marca a una pequeña distancia del borde inferior y la mezcla a analizar se deposita sobre las marcas (Figura N° 24.A). Posteriormente, se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación (Figura N° 24.B). Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, ésta se saca de la cubeta y se deja secar para observar los compuestos separados de la mezcla (Figura N° 24.C). Si los compuestos son activos a luz ultravioleta, se visualizan en una lámpara UV. En caso contrario se utiliza un agente revelador, para ello, se rocía la placa y se deja secar para observar la

aparición de manchas coloreadas correspondientes a los compuestos revelados.

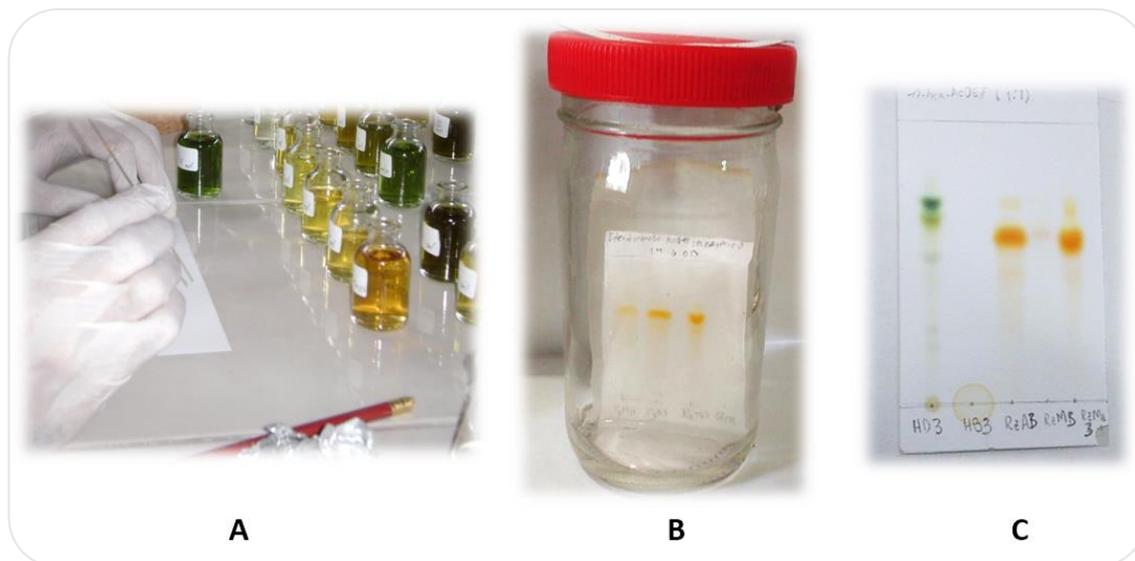


Figura N° 24. Cromatografía de capa fina; A: Aplicación de la muestra en la placa cromatográfica; B. Cubeta cromatográfica con la fase móvil; C. Compuestos separados en la placa cromatográfica.

La figura N° 25 es un conjunto de fotografías de Núñez, M.J., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

3.6.4 Análisis fitoquímico.

Se han desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos, basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración. El Análisis fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación de metabolitos secundarios, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o

fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Este consiste en la extracción de partes de la planta con solventes apropiados y de esa manera extraer los metabolitos secundarios para la realización de las pruebas fitoquímicas. Los constituyentes químicos se agrupan e identifican según su origen biosintético común (Ver tabla N° 2).

Tabla N° 2. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios.^(26,32,47)

Metabolitos	Prueba de identificación.
Alcaloides	Cromatografía en capa fina, reactivo revelador de Dragendorff.
Flavonoides	Prueba de Shinoda y cromatografía en capa fina con reactivo revelador vainillina 5% -HCl concentrado (4:1)
Taninos	Prueba de tricloruro de hierro, solución de gelatina y clorhidrato de quinina.
Antraquinonas	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador KOH 5% en metanol.
Saponinas	Método de la espuma, prueba de Liebermann-Burchard y Salkowski.
Esteroles	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Liebermann-Burchard.
Sesquiterpenlactonas	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Baljet.
Glicósidos Cardiotónicos	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Kedde, cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Liebermann-Burchard y prueba de Keller-Killiani.
Cumarinas	Cromatografía en capa fina, revelador luz UV ²⁵⁴ .
Terpenos	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Komarowsky.
Quininas	Cromatografía en capa fina con reactivo revelador de óleum.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.⁽⁸⁾

- **Retroprospectivo**, para llevar a cabo la investigación bibliográfica se indagaron estudios realizados en el pasado y los resultados obtenidos de este trabajo podrán ser utilizados en futuras investigaciones.

- **Experimental**, ya que se realizaron y analizaron los resultados obtenidos del estudio fitoquímico que se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

En la investigación bibliográfica se realizaron consultas en libros y publicaciones de revistas científicas en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- En internet.
- En la búsqueda de información botánica de las especies en estudio, se programaron visitas con cita previa a los herbarios del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES) y del Jardín Botánico La Laguna (LAGU) de El Salvador.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO.

- **Universo:** La Familia Celastraceae.

- **Población:** La Familia Celastraceae pertenecientes a la flora Salvadoreña.

- **Muestra:** De 20 a 25 gramos de cada órgano recolectado de *Maytenus segoviarum*, *Zinowiewia integerrima* y *Quetzalia reynae*, especies de la Familia Celastraceae pertenecientes a la flora Salvadoreña.

Para la recolección de frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas, raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se realizaron viajes de campo al Parque Nacional Montecristo, ubicado en el Departamento de Santa Ana, Municipio de Metapán, en los meses de Marzo a Mayo de 2017.

Para la recolecta fue necesario solicitar un permiso, el cual, fue otorgado por el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN), cuando se realizó la colecta la administración del parque asignó un guarda recursos, así mismo, nos acompañó un curador del Museo de Historia Natural de El Salvador, que fue el profesional que realizó la identificación de las especies vegetales y asignó el número de voucher correspondiente a cada una de ellas (Ver tabla N° 3). Posterior a la identificación de las especies, se llevó a cabo la recolección de órganos vegetales, sin deteriorar las especies vegetales.

Tabla N° 3. Identificación de las especies recolectadas en el Parque Nacional Montecristo de El Salvador.

Especie vegetal	Nombre común	Número de voucher
<i>Maytenus segoviarum</i>	"Cola de pavo".	J. Menjívar et al. 4001
<i>Quetzalia reynae</i>	"Palo de palomo", "Manzanito"	J. Menjívar et al. 3970
<i>Zinowiewia integerrima</i>	"Culebro", "Barreto rojo", "Rosa blanca", "Siete pellejos".	J. Menjívar et al. 3971
Identificación por: Jenny Menjívar (Curadora del Museo de Historia Natural de El Salvador).		

Dentro de las técnicas empleadas durante la recolección contemplamos:⁽⁷⁶⁾

- La edad de la planta: en la recolección se seleccionan los árboles que ya están desarrollados, de esta manera se conserva la especie vegetal.
- La hora del día: la recolección se llevó a cabo en horas de la mañana.
- Hojas: se recolectaron las que son verdes y que muestran un aspecto saludable.
- Ramas: se recolectaron las que muestran un aspecto saludable y así asegurar el contenido de metabolitos del órgano vegetal.
- Raíces: fueron retiradas cuidadosamente y cortadas en segmentos verticales, se cortaron las raíces laterales secundarias, evitando cortar las raíces primarias centrales para no dañar la especie.
- Frutos: se recolectaron en estado de maduración, es decir cuando están completamente desarrollados.
- Haciendo uso de “tijeras de podar”, “cuma” y “machete”, se emplean técnicas de corte para no herir o destruir la especie.
- Es importante mencionar que se recolectaron las cantidades necesarias, con la finalidad de proteger la especie y evitar su deterioro.

Los órganos recolectados fueron identificados con los siguientes datos: nombre común, nombre científico, órgano recolectado, fecha de recolecta, lugar de recolecta y botánico responsable de la identificación. Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, lugar en el que se extendieron en bandejas planas para conservar la planta en estado óptimo, evitando el crecimiento de hongos.

En la tabla N° 4 se resumen los órganos recolectados correspondientes a cada especie vegetal.

Tabla N° 4. Órganos recolectados correspondientes a cada especie vegetal.

Especie vegetal	Hojas	Ramas	Frutos	Raíces
<i>Maytenus segoviarum</i>	X	X	X	X
<i>Quetzalia reynae</i>	X	X	-	X
<i>Zinowiewia integerrima</i>	X	X	-	X
-: No se encontró el órgano vegetal en la época programada para la recolecta.				

4.4 PARTE EXPERIMENTAL.

4.4.1 Preparación previa de las especies vegetales.

Primero, se secaron por separado las hojas, ramas, raíces y frutos de cada una de las especies en una estufa de aire circulante a temperatura de 40°C durante 48 horas.

Luego se llevó a cabo el molido de las hojas, ramas, raíces y frutos secos de cada especie vegetal y por último se pesó el material vegetal molido (Figura N° 25).

La figura N° 25 es un conjunto de fotografías de Flores, K.C., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.



Figura N° 25. Preparación previa de las especies vegetales.

4.4.2 Fracciones y extractos orgánicos de las especies vegetales.

De cada muestra vegetal se prepararon las siguientes fracciones y extractos orgánicos y para facilitar su identificación a lo largo del proceso experimental fueron codificadas según órgano vegetal y tipo de extracto (Ver tabla N° 5).

Tabla N° 5. Codificación de las fracciones y extractos orgánicos correspondientes a cada especie vegetal.

Fracción/Extracto		Especie vegetal		
		<i>Maytenus segoviarum</i>	<i>Quetzalia reynae</i>	<i>Zinowiewia integerrima</i>
Hojas	Diclorometánico	MsHd	QrHd	ZiHd
	<i>n</i> -butanólico	MsHnb	QrHnb	ZiHnb
Ramas	Diclorometánico	MsRd	QrRd	ZiRd
	<i>n</i> -butanólico	MsRnb	QrRnb	ZiRnb
Raíces	Metanólico	MsRzm	QrRzm	ZiRzm
	Acetónico	MsRza	QrRza	ZiRza
	<i>n</i> -hexano-éter etílico (1:1)	MsRznh	QrRznh	ZiRznh

Tabla N° 5 (continuación)		
Frutos	Metanólico	MsFm
	Acetónico	MsFa
	<i>n</i> -hexano-éter etílico (1:1)	MsFnh
<p>Ms: <i>Maytenus segoviarum</i>; Qr: <i>Quetzalia reynae</i>; Zi: <i>Zinowiewia integerrima</i> H:hojas; R:ramas; Rz: raíces; F: frutos d: diclorometano; nb: <i>n</i>-butanol; m: metanol; a: acetona; nh: <i>n</i>-hexano-éter etílico (1:1)</p>		

4.4.3 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*.

4.4.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de *Maytenus segoviarum* (Figura N° 26).

1. Colocar 25.0 g de hojas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados.
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las hojas.
7. Redisolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.

13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.
17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

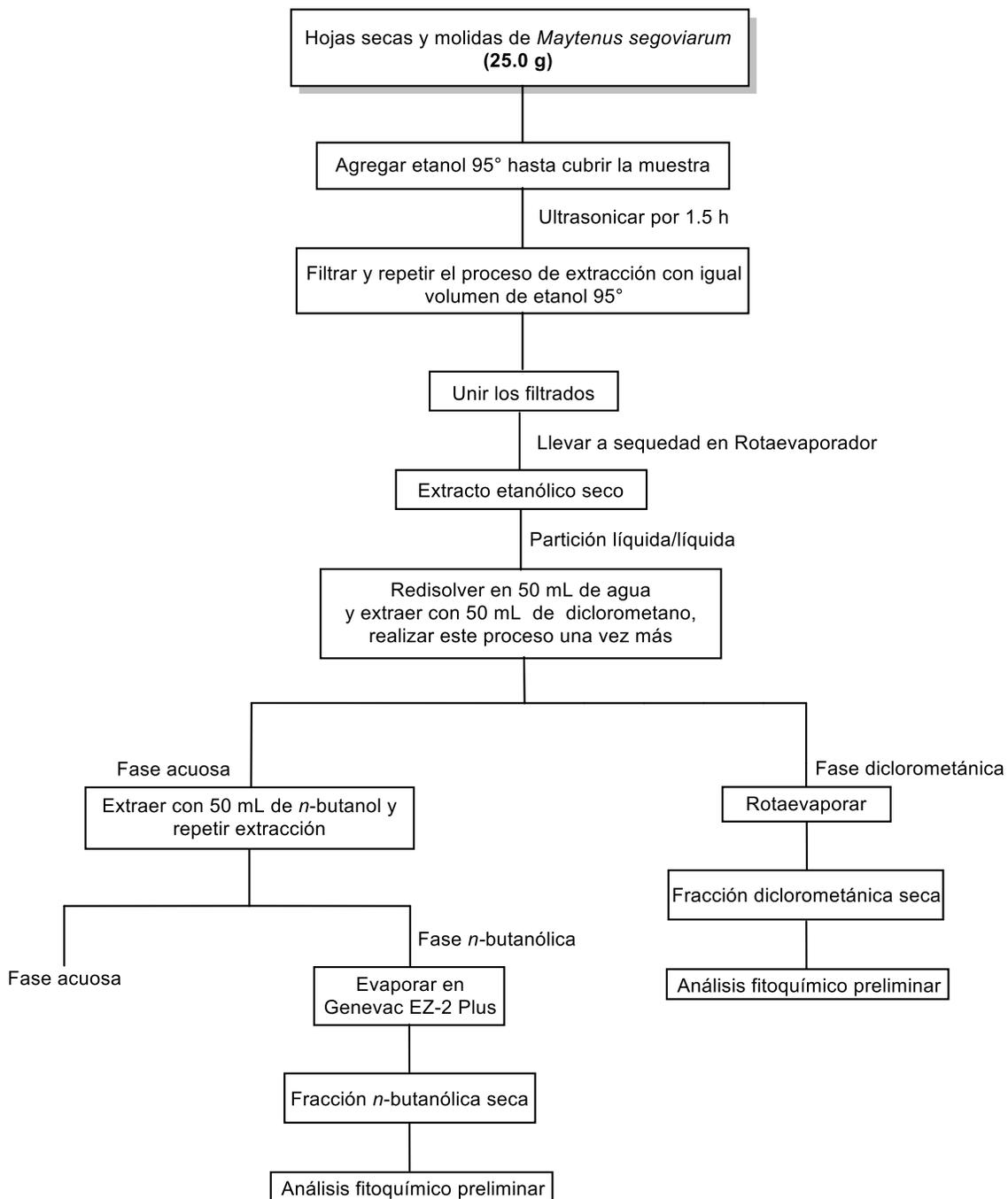


Figura N° 26. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las hojas de *Maytenus segoviarum*.

4.4.3.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de *Maytenus segoviarum* (Figura N° 27)

1. Colocar 20.0 g de ramas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las ramas.
7. Redisolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.
13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.
17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

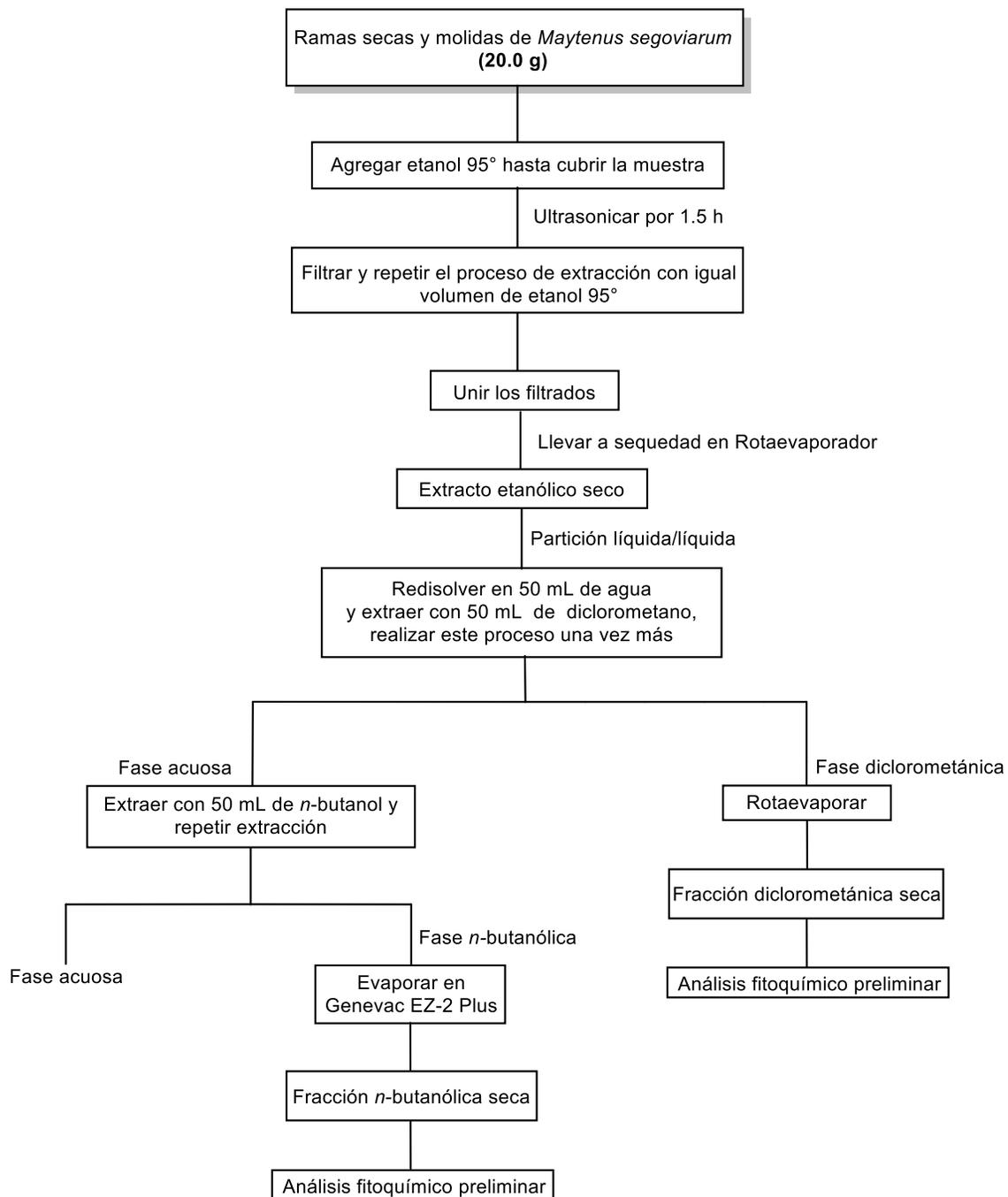


Figura N° 27. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas *Maytenus segoviarum*.

4.4.3.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de *Maytenus segoviarum* (Figura N° 28).

Se emplearán solventes de diferentes polaridades para obtener tres tipos de extractos de las raíces de *Maytenus segoviarum*.

a. Obtención del extracto metanólico de las raíces de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar metanol hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de metanol.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto metanólico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto metanólico.

b. Obtención del extracto acetónico de las raíces de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar acetona hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de acetona.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto acetónico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto acetónico.

c. Obtención del extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1) de las raíces de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar la cantidad de *n*-hexano-éter etílico (1:1) necesaria hasta cubrir el material vegetal.

3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de *n*-hexano-éter etílico (1:1).
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1).

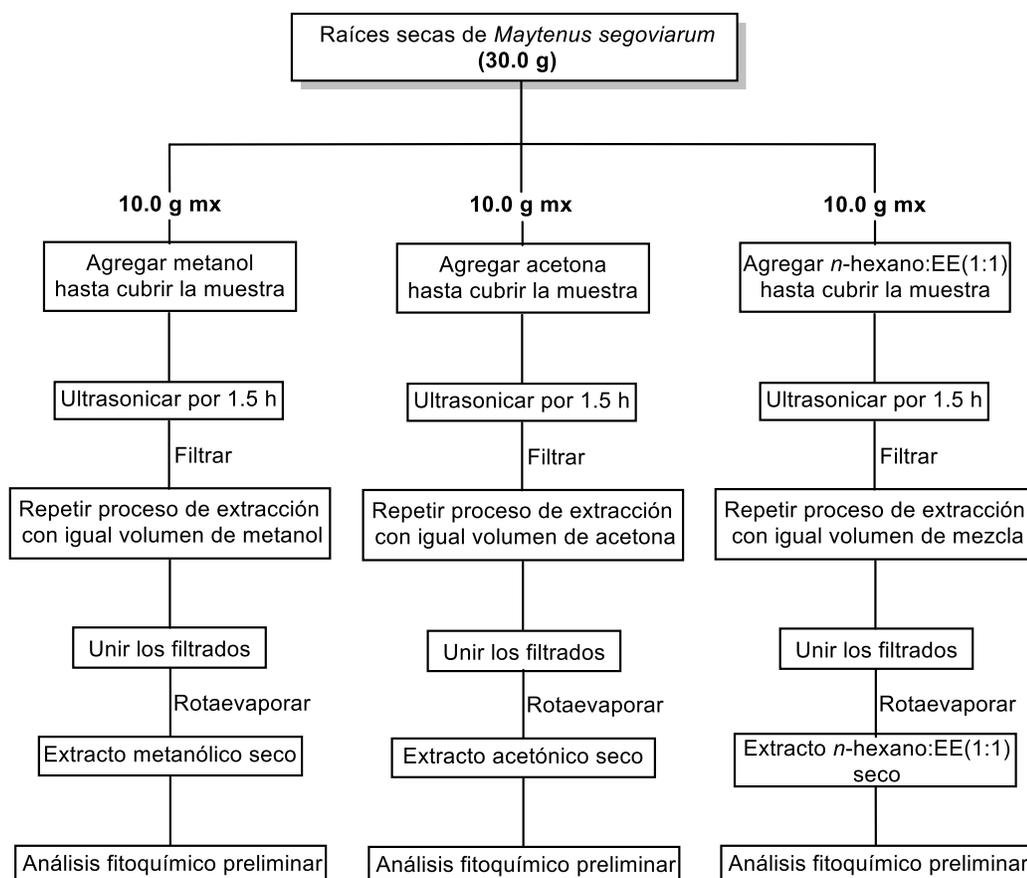


Figura N° 28. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de *Maytenus segoviarum*.

4.4.3.4 Obtención de los extractos orgánicos de los frutos de *Maytenus segoviarum* (Figura N° 29).

Se emplearán solventes de diferentes polaridades para obtener tres tipos de extractos de los frutos de *Maytenus segoviarum*.

a. Obtención del extracto metanólico de los frutos de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de frutos secos y molidos en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar metanol hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de metanol.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto metanólico seco de frutos.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto metanólico.

b. Obtención del extracto acetónico de los frutos de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de frutos secos y molidos en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar acetona hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de acetona.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto acetónico seco de frutos.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto acetónico.

c. Obtención del extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1) de los frutos de *Maytenus segoviarum*.

1. Colocar 10.0 g de frutos secos y molidos en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar la cantidad de *n*-hexano-éter etílico (1:1) necesaria hasta cubrir el material vegetal.

3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de *n*-hexano-éter etílico (1:1).
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto seco de frutos.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1).

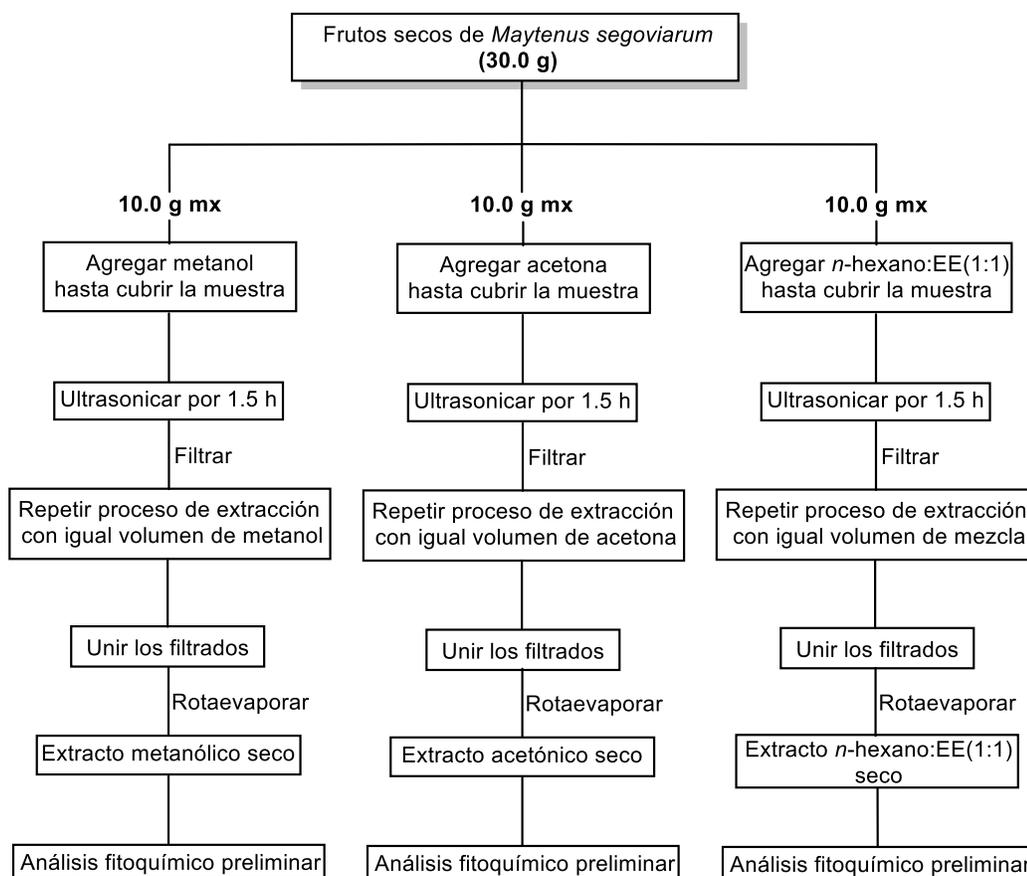


Figura N° 29. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de los frutos de *Maytenus segoviarum*.

4.4.4 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de *Quetzalia reynae*.

4.4.4.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de *Quetzalia reynae* (Figura N° 30)

1. Colocar 25.0 g de hojas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las hojas.
7. Redisolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.
13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.

17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

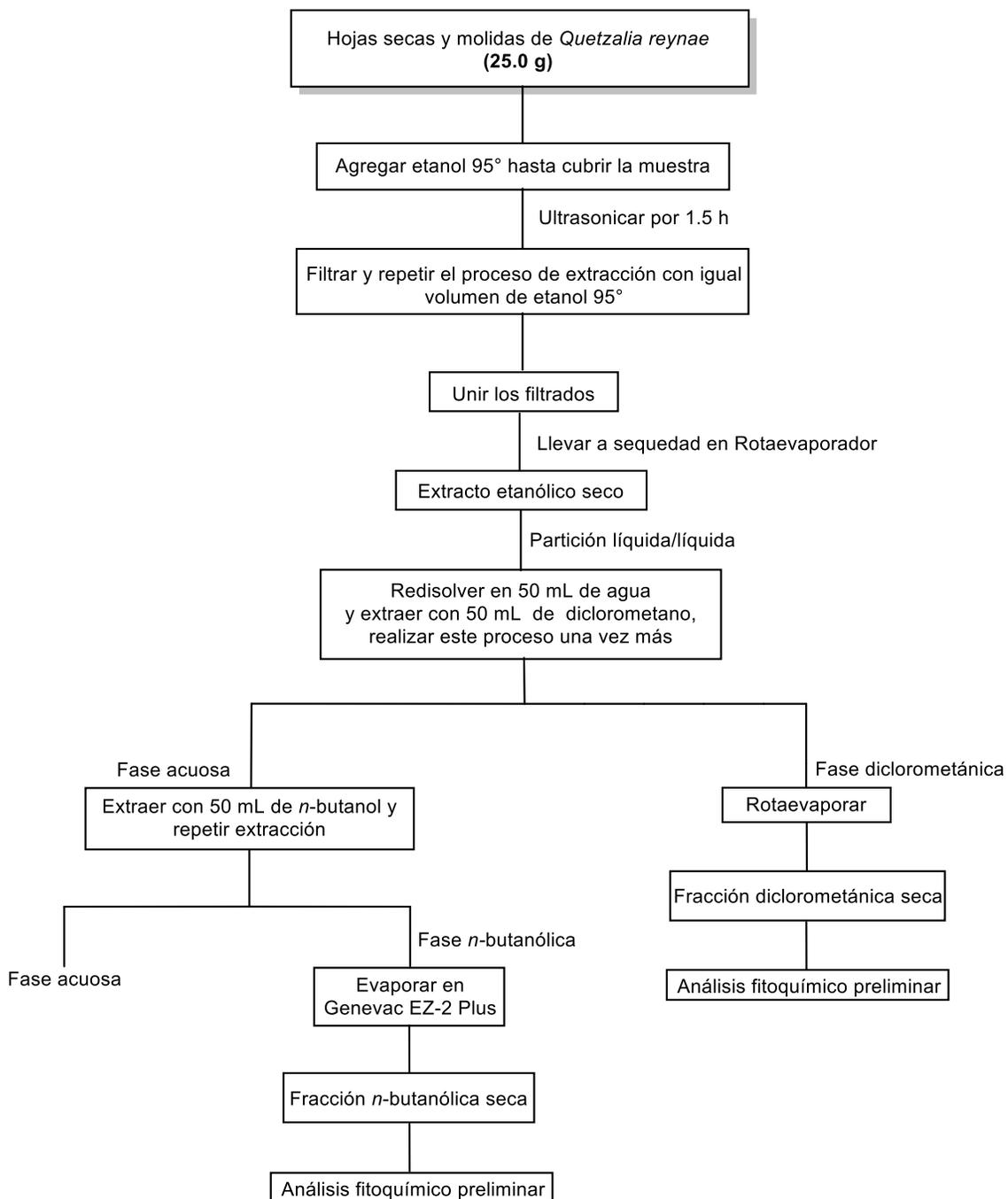


Figura N° 30. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las hojas de *Quetzalia reynae*.

4.4.4.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de *Quetzalia reynae* (Figura N° 31)

1. Colocar 20.0 g de ramas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las ramas.
7. Redissolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.
13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.
17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

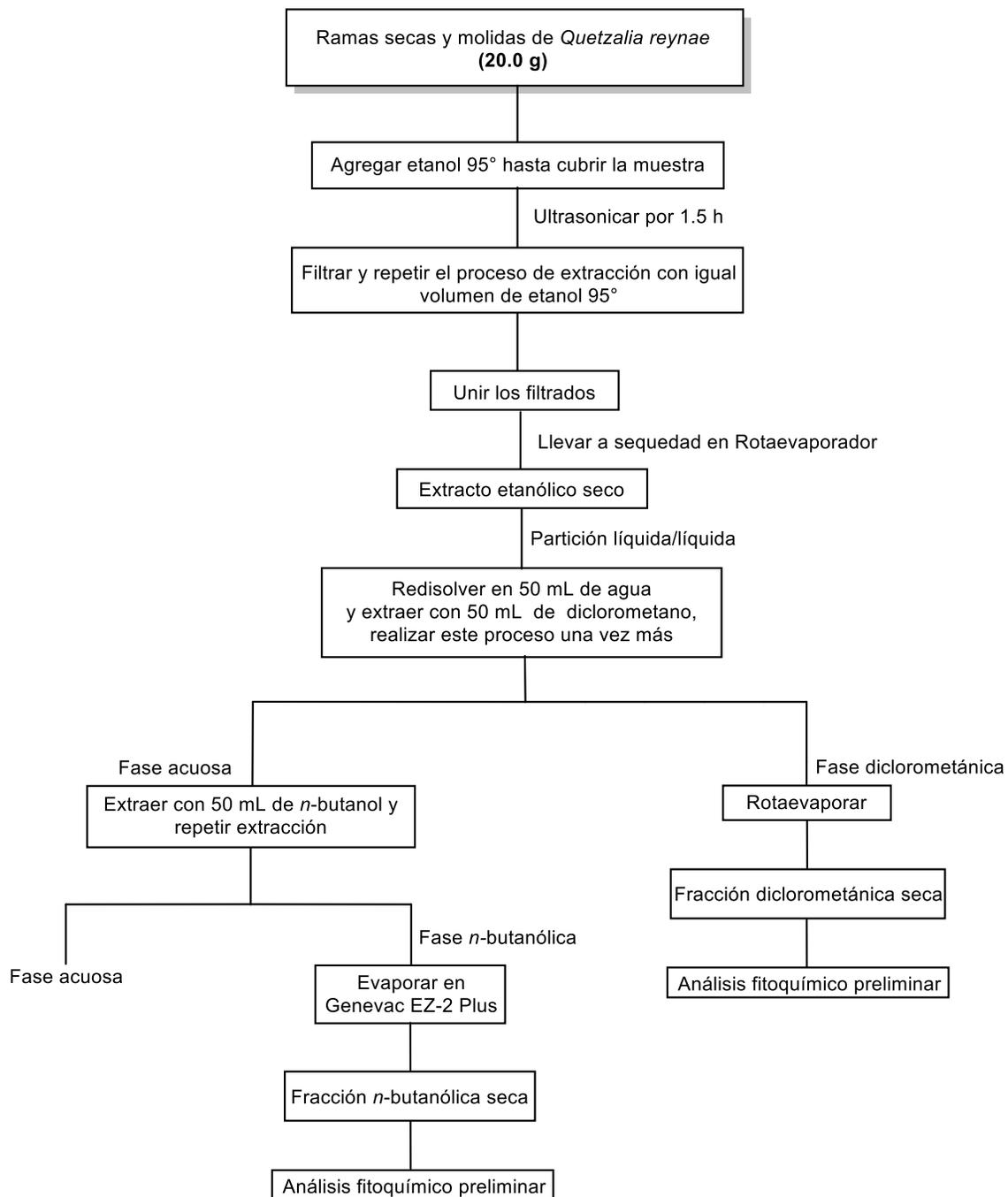


Figura N° 31. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas de *Quetzalia reynae*.

4.4.4.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de *Quetzalia reynae* (Figura N° 32).

Se emplearán solventes de diferentes polaridades para obtener tres tipos de extractos de las raíces de *Quetzalia reynae*.

a. Obtención del extracto metanólico de las raíces de *Quetzalia reynae*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar metanol hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de metanol.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto metanólico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto metanólico.

b. Obtención del extracto acetónico de las raíces de *Quetzalia reynae*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar acetona hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de acetona.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto acetónico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto acetónico.

c. Obtención del extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1) de las raíces de *Quetzalia reynae*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar la cantidad de *n*-hexano-éter etílico (1:1) necesaria hasta cubrir el material vegetal.

3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de *n*-hexano-éter etílico (1:1).
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1).

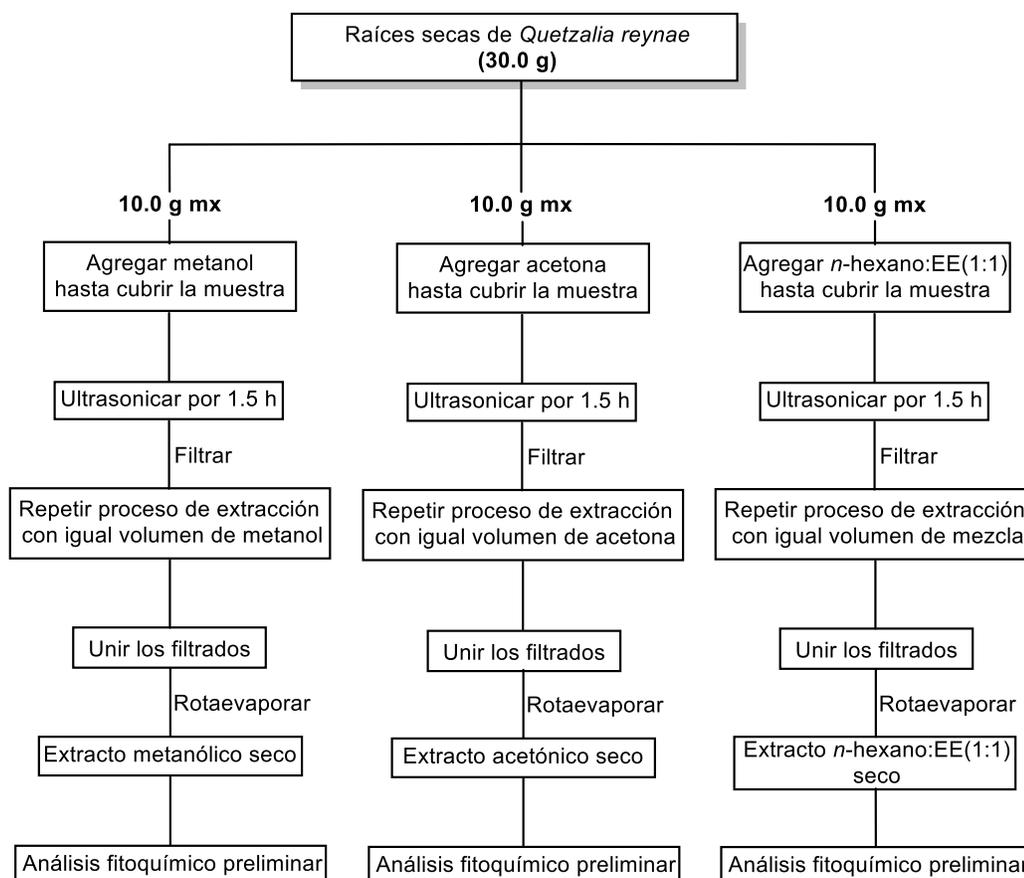


Figura N° 32. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de *Quetzalia reynae*.

4.4.5 Preparación de las fracciones y extractos orgánicos de *Zinowiewia integerrima*.

4.4.5.1 Obtención de las fracciones orgánicas de las hojas de *Zinowiewia integerrima* (Figura N° 33).

1. Colocar 25.0 g de hojas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las hojas.
7. Redisolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.
13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.

17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

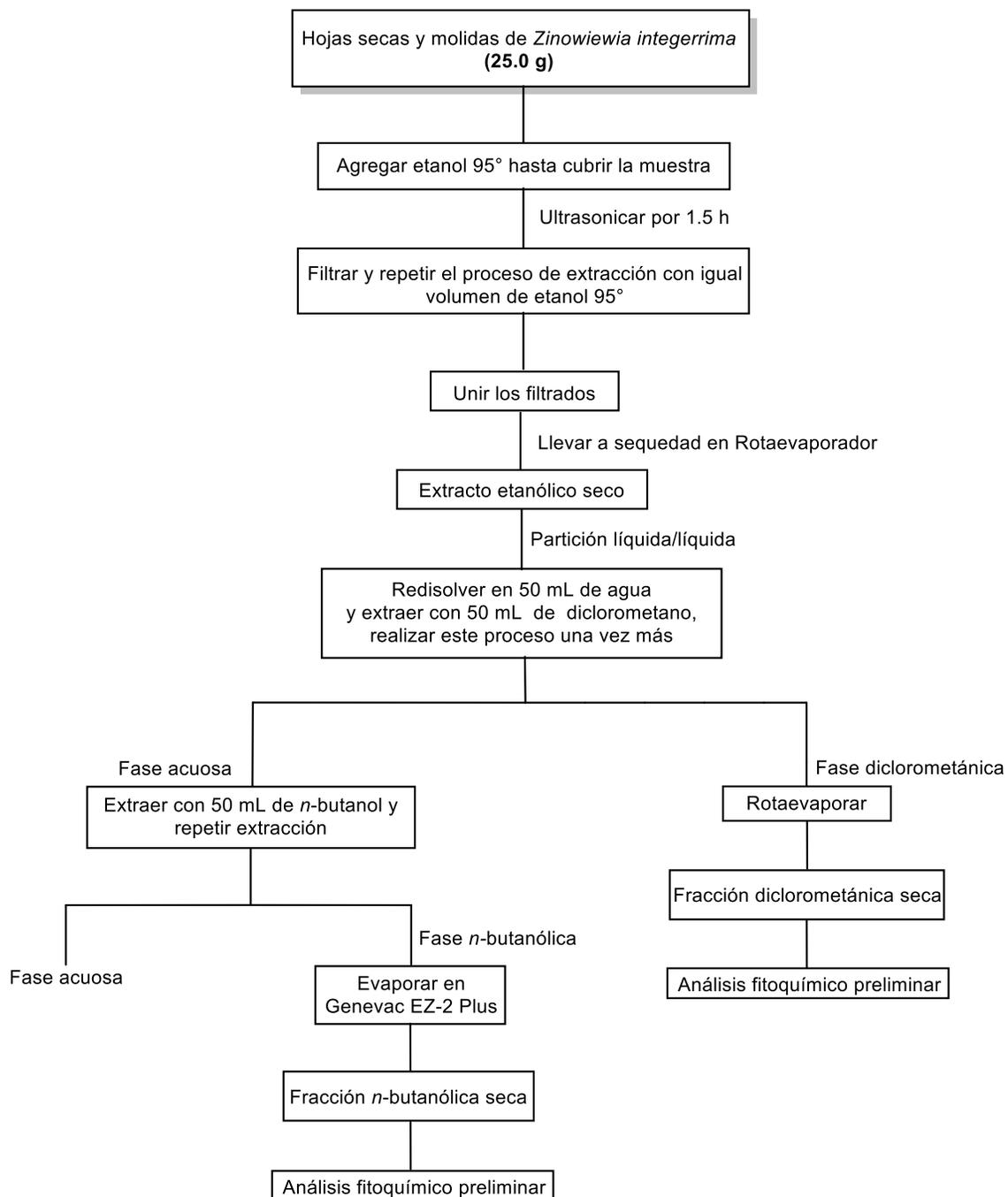


Figura N° 33. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las hojas de *Zinowiewia integerrima*.

4.4.5.2 Obtención de las fracciones orgánicas de las ramas de *Zinowiewia integerrima* (Figura N° 34).

1. Colocar 20.0 g de ramas secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar etanol 95° hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de etanol 95°.
5. Unir ambos filtrados
6. Llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto etanólico seco de las ramas.
7. Redissolver el extracto etanólico seco en 50 mL de agua.
8. Transferir la solución anterior a una ampolla de separación.
9. Extraer con 50 mL de diclorometano añadiéndolo por las paredes de la ampolla de separación.
10. Recolectar la fracción diclorometánica y conservar la fracción acuosa.
11. Repetir el paso N°9 y N°10 una vez más, reuniendo las fracciones diclorometánicas.
12. Llevar a sequedad las fracciones diclorometánicas utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C.
13. Colocar la fracción acuosa nuevamente en una ampolla de separación y extraer con 50 mL de *n*-butanol.
14. Recolectar la fracción *n*-butanólica.
15. Repetir el paso N°13 y N°14 una vez más, reuniendo las fracciones *n*-butanólicas.
16. Llevar a sequedad las fracciones *n*-butanólicas utilizando el Genevac EZ-2 Plus.
17. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de las fracciones diclorometánica y *n*-butanólica.

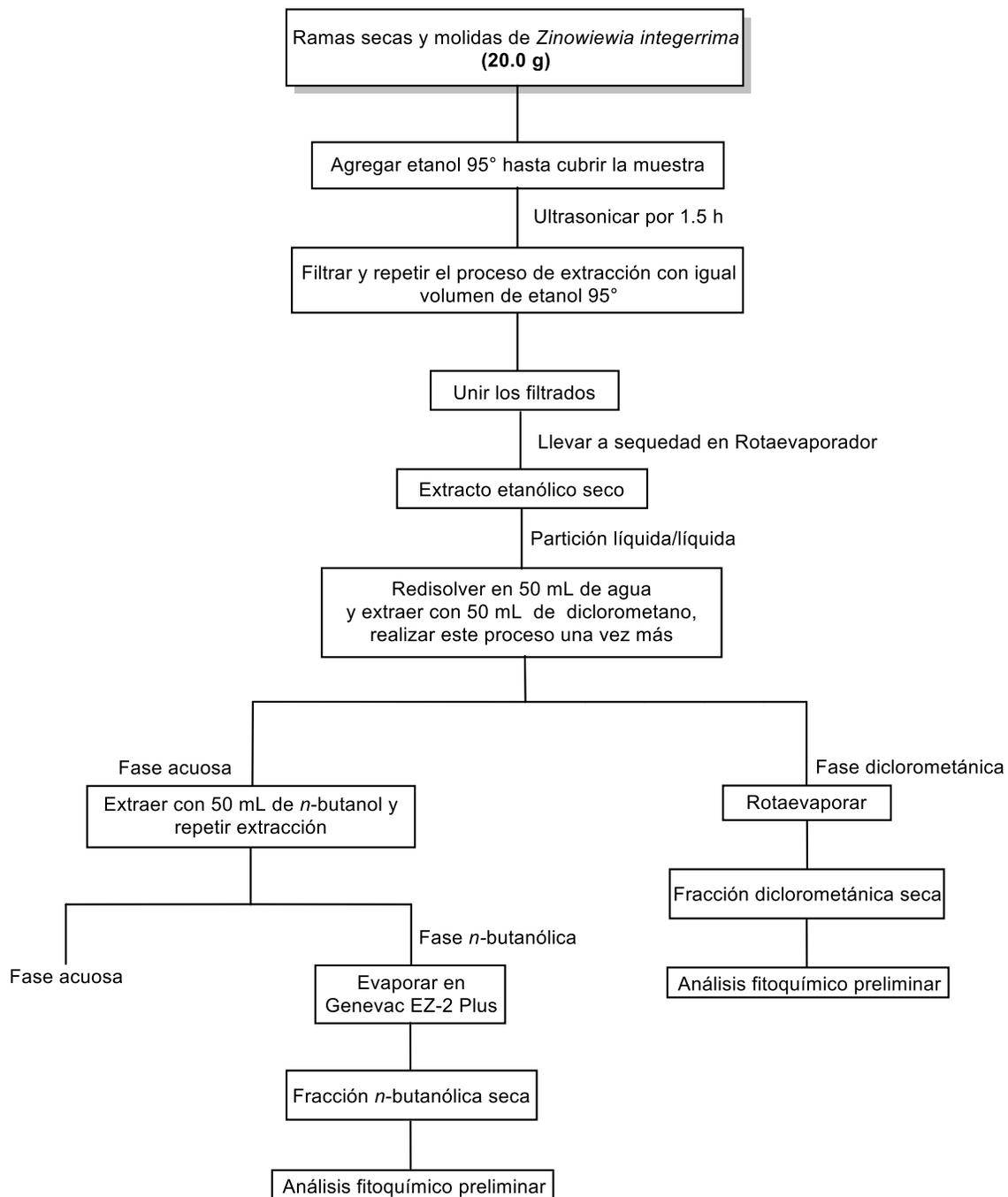


Figura N° 34. Esquema de trabajo para la obtención de fracciones orgánicas de las ramas de *Zinowiewia integerrima*.

4.4.5.3 Obtención de los extractos orgánicos de las raíces de *Zinowiewia integerrima* (Figura N° 35).

Se emplearán solventes de diferentes polaridades para obtener tres tipos de extractos de las raíces de *Zinowiewia integerrima*.

a. Obtención del extracto metanólico de las raíces de *Zinowiewia integerrima*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar metanol hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de metanol.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto metanólico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto metanólico.

b. Obtención del extracto acetónico de las raíces de *Zinowiewia integerrima*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.
2. Agregar acetona hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de acetona.
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto acetónico seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto acetónico.

c. Obtención del extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1) de las raíces de *Zinowiewia integerrima*.

1. Colocar 10.0 g de raíces secas y molidas en un erlenmeyer de 250 mL.

2. Agregar la cantidad de *n*-hexano-éter etílico (1:1) necesaria hasta cubrir el material vegetal.
3. Colocar el erlenmeyer en el sonicador durante una hora y treinta minutos.
4. Filtrar utilizando papel filtro Whatman N°40 y repetir el proceso de extracción con igual volumen de *n*-hexano-éter etílico (1:1).
5. Unir ambos filtrados y llevar a sequedad utilizando el rotaevaporador a una temperatura de 40°C para obtener el extracto seco de raíces.
6. Realizar el análisis fitoquímico preliminar al extracto *n*-hexano-éter etílico (1:1).

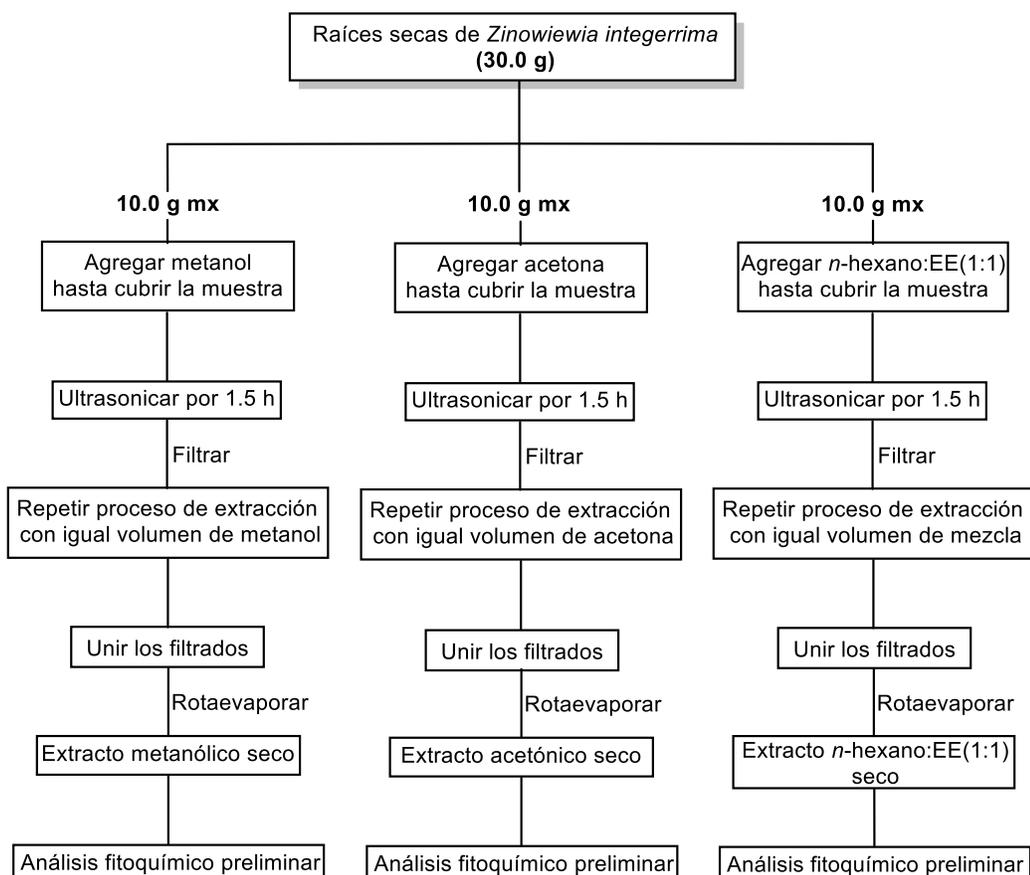


Figura N° 35. Esquema de trabajo para la obtención de extractos de las raíces de *Zinowiewia integerrima*.

4.4.6 Análisis fitoquímico preliminar de las especies en estudio.^(26,47)

Se realizaron las siguientes determinaciones fitoquímicas preliminares a las fracciones y extractos orgánicos obtenidos. En la tabla N° 6 se detalla cada uno de ellos, siendo del 1-12 fracciones orgánicas y del 13-24 extractos orgánicos.

Tabla N° 6. Fracciones y extractos orgánicos correspondientes a cada especie vegetal.

	N°	Especie vegetal	Órgano vegetal	Fracción/Extracto	Código
Fracciones orgánicas	1	<i>Maytenus segoviarum</i>	Hojas	Fracción diclorometánica	MsHd
	2	<i>Maytenus segoviarum</i>	Hojas	Fracción <i>n</i> -butanólica	MsHnb
	3	<i>Maytenus segoviarum</i>	Ramas	Fracción diclorometánica	MsRd
	4	<i>Maytenus segoviarum</i>	Ramas	Fracción <i>n</i> -butanólica	MsRnb
	5	<i>Quetzalia reynae</i>	Hojas	Fracción diclorometánica	QrHd
	6	<i>Quetzalia reynae</i>	Hojas	Fracción <i>n</i> -butanólica	QrHnb
	7	<i>Quetzalia reynae</i>	Ramas	Fracción diclorometánica	QrRd
	8	<i>Quetzalia reynae</i>	Ramas	Fracción <i>n</i> -butanólica	QrRnb
	9	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Hojas	Fracción diclorometánica	ZiHd
	10	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Hojas	Fracción <i>n</i> -butanólica	ZiHnb
	11	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Ramas	Fracción diclorometánica	ZiRd
	12	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Ramas	Fracción <i>n</i> -butanólica	ZiRnb
Extractos orgánicos	13	<i>Maytenus segoviarum</i>	Raíces	Extracto metanólico	MsRzm
	14	<i>Maytenus segoviarum</i>	Raíces	Extracto acetónico	MsRza
	15	<i>Maytenus segoviarum</i>	Raíces	Extracto de <i>n</i> -hexano-éter etílico	MsRznh
	16	<i>Maytenus segoviarum</i>	Frutos	Extracto metanólico	MsFm
	17	<i>Maytenus segoviarum</i>	Frutos	Extracto acetónico	MsFa
	18	<i>Maytenus segoviarum</i>	Frutos	Extracto de <i>n</i> -hexano-éter etílico	MsFnh
	19	<i>Quetzalia reynae</i>	Raíces	Extracto metanólico	QrRzm
	20	<i>Quetzalia reynae</i>	Raíces	Extracto acetónico	QrRza
	21	<i>Quetzalia reynae</i>	Raíces	Extracto de <i>n</i> -hexano-éter etílico	QrRznh
	22	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Raíces	Extracto metanólico	ZiRzm
	23	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Raíces	Extracto acetónico	ZiRza
	24	<i>Zinowiewia integerrima</i>	Raíces	Extracto de <i>n</i> -hexano-éter etílico	ZiRznh

4.4.6.1 Determinación de glicósidos saponínicos.

a. Método de la espuma.

1. Pesar 0.5 g de material vegetal seco y molido, colocarlo en un tubo de ensayo.
2. Añadir 4 mL de agua.
3. Agitar vigorosamente durante 30 segundos y dejar reposar.
4. Medir con una regla la altura formada por la espuma a los 1, 5, 10, 15 y 30 minutos.

Nota: Si el resultado es positivo, se procederá a realizar la prueba de Liebermann-Burchard y Salkowski.

b. Prueba de Liebermann-Burchard.

1. Tomar 5 mL de las fracciones y extractos orgánicos de las especies vegetales que resultaron positivas en la prueba de espuma.
2. Agregar 5 mL de ácido sulfúrico 10%.
3. Calentar cuidadosamente en baño maría por 20 minutos, enfriar y colocar en una ampolla de separación.
4. Extraer con 7.5 mL de diclorometano.
5. Recolectar la capa diclorometánica en un beaker de 100 mL.
6. Repetir el paso N°4 y N°5 una vez más y reunir las capas diclorometánicas.
7. Agregar sulfato de sodio anhidro a las capas diclorometánicas hasta que la solución no presente turbidez y luego filtrar en papel Whatman N°40.
8. Concentrar la fase diclorometánica hasta 3 mL en baño maría y agregarlos en un tubo de ensayo.
9. Colocar el tubo de ensayo en baño de hielo.
10. Agregar 1 mL de anhídrido acético sin agitar.
11. Agregar lentamente y por las paredes del tubo ácido sulfúrico concentrado gota a gota hasta formación de un anillo.

Evidencia positiva: formación de un anillo de color verde, que identifica como glicósidos saponínicos de carácter esteroidal o anillo de color rojizo que identifica glicósidos saponínicos de carácter triterpénico.

Nota: Este procedimiento debe realizarse en baño de hielo y en cámara de extracción de gases.

c. Prueba de Salkowski.

1. En un tubo de ensayo agregar 3 mL de extracto vegetal.
2. Agregar gota a gota 5 a 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado (por las paredes del tubo).
3. No agitar el tubo de ensayo.

Evidencia positiva: anillo de color verde, que identifica como glicósidos saponínicos de carácter esteroidal o anillo de color rojizo que identifica glicósidos saponínicos de carácter triterpénico.

Nota: Este procedimiento debe realizarse en baño de hielo y en cámara de extracción de gases.

4.4.6.2 Determinación de glicósidos cardiotónicos.

a. Detección de lactona insaturada.

Fase móvil: Acetato de etilo-metanol-agua (8:1:1).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Kedde A y Kedde B.

Testigos: Digoxina y *k*-estrofantina.

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.

5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador Kedde A y Kedde B.
7. Calcular los R_f .

Evidencia positiva: Manchas de color morado.

Cálculo del R_f .

En cromatografía, el cociente entre la distancia (medida hasta el punto de máxima intensidad de la mancha o zona) recorrida por un compuesto y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, desde el punto de aplicación de la sustancia de prueba, se denomina valor R_f .⁽¹⁴⁾

Para determinar el valor de R_f en las pruebas de cromatografía de capa fina del análisis fitoquímico preliminar de los extractos y fracciones orgánicas de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

b. Detección del núcleo esteroidal: Prueba de Liebermann-Burchard.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (1:1).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Liebermann-Burchard.

Testigos: Digoxina y *k*-estrofantidina

1. Aplicar 5-10 μ L de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.

5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador Liebermann-Burchard.
7. Calentar la placa a 110°C durante 2 minutos.
8. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color azul, verde, rosado, café, amarillo y morado.

c. Detección del azúcar. Prueba de Keller-Killiani.

1. Medir 1.0 mL de extracto vegetal y colocarlo en un tubo de ensayo.
2. Agregar 1.0 mL de sulfato férrico 5% en ácido acético glacial.
3. Agitar y añadir 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
4. Observar la coloración formada.

Evidencia positiva: Coloración azul.

4.4.6.3 Determinación de glicósidos flavonoides

a. Prueba de Shinoda o de la cianidina

1. Medir 1.5 mL de extracto vegetal.
2. Colocarlo en un vidrio reloj.
3. Añadir una lámina de magnesio metálico.
4. Agregar 5 gotas de HCl concentrado sobre la lámina de magnesio metálico.
5. Observar la coloración formada.

Evidencia positiva: Coloración rojiza.

b. Cromatografía de capa fina.^(17,98)

Fases móviles:

- Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético glacial:agua (6.7:0.7:0.7:1.8)
- n*-butanol:ácido acético:agua (4:1:5)

-Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético glacial:etilmetilcetona:agua
(5:0.7:0.3:3:1)

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Vainillina 5%-HCl concentrado.

Testigo: Quercetina.

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Observar las manchas eluidas en lámpara de luz UV a 254 nm y 365 nm.
7. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas color rojo, morado y amarillo.^(3,155)

4.4.6.4 Determinación de glicósidos antraquinónicos.

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (6:3.5:0.5)

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Hidróxido de potasio 5% en metanol.

Testigo: Extracto etanólico de *Alvaradoa amorphoides* "Cola de zorro".

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelar de hidróxido de potasio 5% en metanol.

7. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color rosado.

4.4.6.5 Determinación de taninos.

Medir 3 mL de la fracción o extracto orgánico y rotular 3 tubos de hemólisis con código desde la A hasta la C, agregando a cada tubo lo siguiente:

1. Tubo A: 1 mL de la fracción o extracto, agregar una gota y por las paredes solución de tricloruro de hierro 1%.
2. Tubo B: 1 mL de la fracción o extracto, luego incorporar 2 mL de solución de gelatina 5%.
3. Tubo C: 1 mL de la fracción o extracto, incorporar 2 mL de clorhidrato de quinina 5%.

Evidencia positiva: Se observará un precipitado luego de la adición de cada uno de los reactivos a excepción del tricloruro de hierro, en el cual se observará una coloración azul si es un tanino hidrolizable o una coloración verde si es un tanino condensado.

4.4.6.6 Determinación de alcaloides.

a. Cromatografía de capa fina.

Fase móvil: Acetona-acetato de etilo-metanol (9:0.6:0.4).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Dragendorff.

Testigo: Sulfato de hiosciamina.

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.

5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador Dragendorff.
7. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color naranja.

4.4.6.7 Determinación de sesquiterpenlactonas.

a. Detección de lactona insaturada.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (7:3).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Reactivo de Baljet.

Testigos: Juanislamina y caleina D.

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaca.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador de Baljet.
7. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color naranja.

4.4.6.8 Determinación de cumarinas.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (7:3).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Hidróxido de potasio 5% en metanol.

Testigo: 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina.

1. Aplicar 5-10µL de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaca.

2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con hidróxido de potasio 5% en metanol.
7. Observar las manchas eluidas en lámpara de luz UV a 365 nm.

Evidencia positiva: Manchas color azul fluorescente a luz UV a 365nm.

4.4.6.9 Determinación de esteroides.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (1:1).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Liebermann-Burchard.

Testigo: β -sitosterol.

1. Aplicar 5-10 μ L de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaca.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador Liebermann-Burchard.
7. Calentar la placa a 110°C durante 2 minutos.
8. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color azul, verde, rosado, café, amarillo y morado.

4.4.6.10 Determinación de triterpenos.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (1:1).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Komarowsky.

Testigos: Betulina y β -amirina.

1. Aplicar 5-10 μ L de cada extracto y fracción de las muestras identificadas en la cromatoplaça.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador Komarowsky.
7. Calentar la placa a 105°C durante 3-4 minutos.
8. Calcular los *R_f*.

Evidencia positiva: Manchas de color azul, amarillo, rojo y rosadas.

4.4.6.11 Determinación de quinonas en los extractos de raíces de Celastráceas.

a. Fraccionamiento de los extractos de raíces de Celastráceas en columna Sephadex LH20.

1. Suspender el gel Sephadex en metanol durante 24 horas.
2. Colocar el Sephadex dentro de una columna.
3. Estabilizar la columna, haciendo pasar a través de ella tres veces el volumen calculado de la fase móvil *n*-hexano-cloroformo-metanol en proporciones 2:1:1 (para realizar el cálculo del volumen a utilizar, ver sección 4.4.7).
4. Enrasar la columna con la fase móvil.
5. Pesar la cantidad de 60.0 mg del extracto seco de raíces de la especie en estudio.

6. Redissolver los 60.0 mg del extracto seco en la mínima cantidad de la fase móvil (aproximadamente al 5% del volumen de la columna).
7. Filtrar el extracto utilizando algodón.
8. Inyectar el extracto utilizando una pipeta y agregándolo por las paredes de la columna.
9. Abrir la llave de la columna y volver a enrasar con la fase móvil, para favorecer la penetración del extracto en el Sephadex.
10. Lavar las paredes de la columna con la fase móvil utilizando una pipeta y volver a envasar.
11. Agregar la mezcla de fase móvil a la columna y recolectar, por separado, las fracciones de un volumen aproximado de 2 mL, en tubos de ensayo previamente identificados.
12. Realizar la determinación de quinonas por cromatografía en capa fina.
Nota: El tamaño de la columna se elige de acuerdo a la cantidad de muestra a separar.

b. Determinación de quinonas por cromatografía en capa fina.

Fase móvil: *n*-hexano-acetato de etilo (7:3).

Fase estacionaria: POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.

Reactivo revelador: Óleum.

Testigos: Pristimerina y tingenona.

1. Aplicar 5-10µL de cada fracción obtenida de la columna de Sephadex en la cromatoplaca.
2. Introducir la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica saturada, con la fase móvil.
3. Dejar que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes de la placa y retirar de la cámara.
4. Marcar el frente del solvente.
5. Secar la placa a temperatura ambiente.
6. Rociar la placa con el revelador óleum.

7. Calentar la placa a 100°C durante 3-4 minutos.
8. Calcular los Rf.

Evidencia positiva: manchas de color amarillas a luz visible,⁽¹⁵⁾ y naranjas al ser reveladas con óleum y con el posterior calentamiento se observan manchas color café.

4.4.7 Cálculos para cromatografía en columna de Sephadex LH20.

Para calcular el volumen a utilizar de la fase móvil en la estabilización de la columna de Sephadex, se empleó la siguiente ecuación:⁽⁴³⁾

$$V = h \cdot \pi \cdot r^2$$

Donde:

V: volumen de la columna (cm³)

h: altura de la columna (cm)

π: 3.1416

r²: radio de la columna elevado al cuadrado (cm²)

Nota: Debido a que, la estabilización de la columna se realiza por triplicado, el valor obtenido de la ecuación se multiplica por tres.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la búsqueda de información botánica sobre las especies de la Familia Celastraceae se programaron visitas a los herbarios del Jardín Botánico La Laguna y del Museo de Historia Natural de El Salvador.

El Jardín Botánico La Laguna (Figura N° 36) y el Museo de Historia Natural de El Salvador MUHNES (Figura N° 37), son instituciones de carácter científico que administran y manejan colecciones nacionales, las cuales se resguardan en muestras, ejemplares y piezas que se convierten en registro del patrimonio natural salvadoreño.^(106,119)



Figura N° 36. Jardín Botánico La Laguna, El Salvador.⁽¹⁰⁵⁾



Figura N° 37. Museo de Historia Natural de El Salvador.

La figura N° 37 es una fotografía de Magarín, J.R. (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Se elaboraron solicitudes dirigidas a las dos instituciones, con la finalidad de consultar los ejemplares de las especies de Celastráceas y de esta manera conocer sobre descripciones botánicas de cada especie vegetal, nombres comunes y ubicación geográfica en El Salvador. Las fechas de las visitas realizadas a los herbarios se detallan a continuación (Ver tabla N° 7):

Tabla N° 7. Visitas realizadas a los herbarios de El Salvador.

Herbarios consultados	Fechas de visita
Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES)	25 de enero de 2017
Jardín Botánico La Laguna (LAGU)	19 de abril de 2017 04 de mayo de 2017

Con la información obtenida en los herbarios nacionales MHES, LAGU y en la base de datos de Trópicos® (Missouri Botanical Garden), se **diseñó un mapa de distribución geográfica de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador** (Figura N° 38), así mismo, se determinó que hasta la fecha hay un total de diez géneros y dieciocho especies de Celastráceas reportadas en El Salvador, distribuidas principalmente en los Departamentos de Santa Ana, Ahuachapán, Morazán, Cuscatlán, Cabañas y la Unión (Ver tabla N° 8). Estas especies se encuentran ubicadas entre 300 a 2100 metros sobre el nivel del mar,^(19,20) y en general se describen como árboles o arbustos, de hojas alternas, opuestas o verticiladas, con frutos en forma de cápsula, sámara o baya y las raíces son de color amarillo o naranja, siendo esta, una de las características principales en la identificación de Celastráceas.⁽⁴⁴⁾

Dentro de las Celastráceas Salvadoreñas, nos encontramos con una especie endémica y nativa del país: *Quetzalia reynae*, la cual, se encuentra únicamente en el Departamento de Santa Ana, Municipio de Metapán, en San José Ingenio, del Parque Nacional Montecristo (14°24'46"N 089°22'02"W).^(5,19,20,164)

Tabla N° 8. Distribución departamental de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador.^(5,19,20,164)

Especie vegetal	Departamento(s)
<i>Cassine xylocarpa</i> Vent.	Ahuachapán
<i>Euonymus enantiophyllus</i> (Donn. Sm.) Lundell.	Santa Ana
<i>Euonymus costaricensis</i> Standl.	Santa Ana
<i>Maytenus chiapensis</i> Lundell.	Santa Ana, Ahuachapán
<i>Maytenus segoviarum</i> Standl. & L.O. Williams.	Santa Ana, Cabañas, Morazán
<i>Quetzalia reynae</i> Lundell.	Santa Ana
<i>Quetzalia occidentalis</i> (Loes. ex Donn. Sm.) Lundell.	Ahuachapán
<i>Wimmeria acuminata</i> L.O. Williams.	Santa Ana
<i>Wimmeria bartlettii</i> Lundell.	Morazán
<i>Wimmeria cyclocarpa</i> Radlk.	Morazán, Cuscatlán
<i>Zinowiewia integerrima</i> (Turcz.) Turcz.	Santa Ana, Ahuachapán
<i>Zinowiewia rubra</i> Lundell.	Santa Ana
<i>Celastrus vulcanicola</i> Donn. Sm.	Santa Ana
<i>Celastrus liebmannii</i> Standl.	Santa Ana
<i>Crossopetalum uragoga</i> (Jacq.) Kuntze	Ahuachapán, Morazán, La Unión
<i>Crossopetalum parviflorum</i> (Hemsl.) Lundell	Santa Ana
<i>Hippocratea volubilis</i> L.	Ahuachapán, Morazán
<i>Semialarium mexicanum</i> N. Hallé.	Santa Ana, Ahuachapán, Morazán, Cabañas

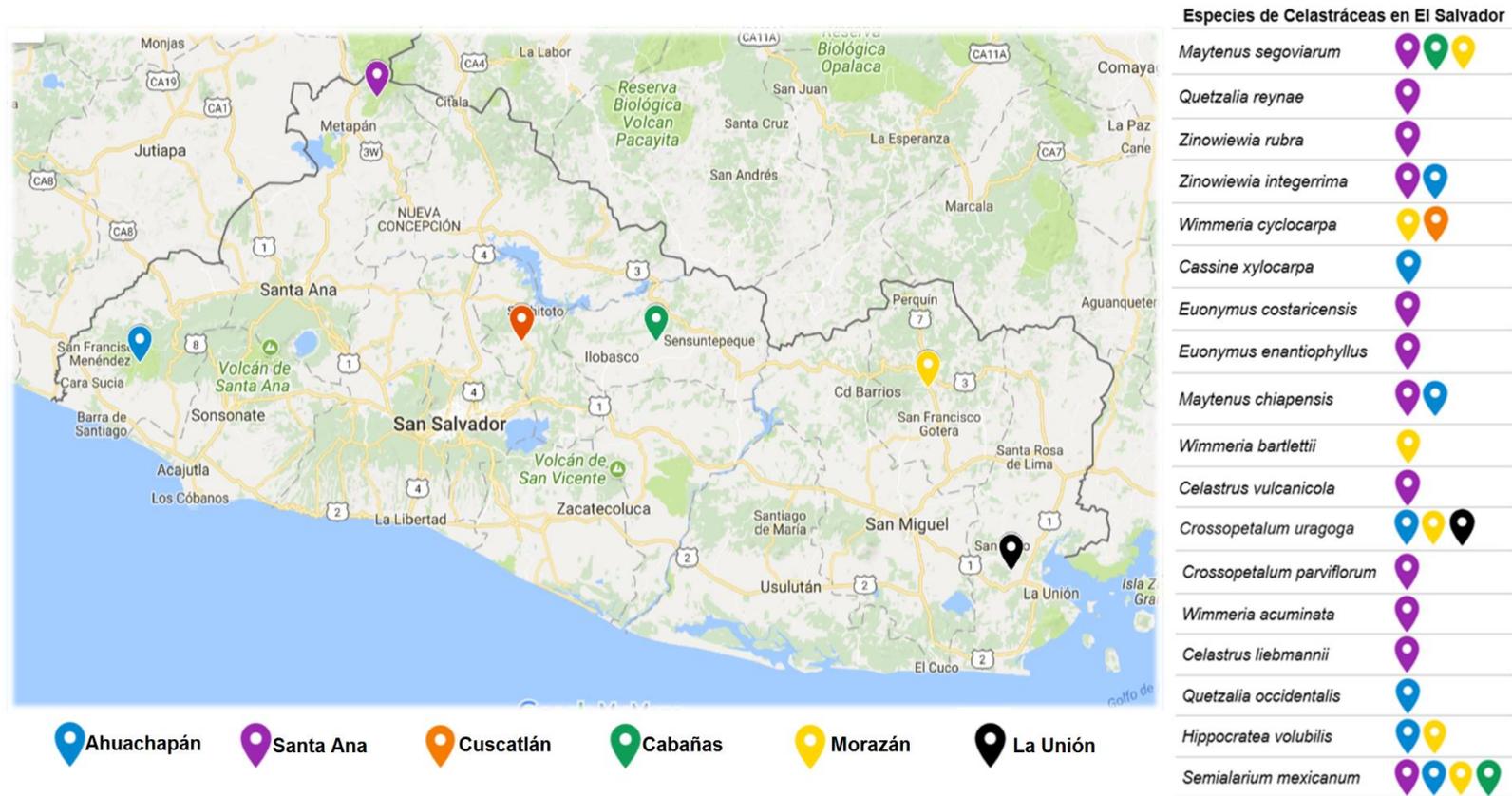


Figura N° 38. Distribución geográfica de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador. (5,19,20,164)

Se recolectaron las especies vegetales de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, en el Parque Nacional Montecristo, El Salvador (Figura N° 39).



Figura N° 39. Parque Nacional Montecristo, El Salvador.

La figura N° 39 es una fotografía de Núñez, M.J., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

El Parque Nacional Montecristo se ubica en la formación volcánica antigua sobre el macizo de Montecristo, cordillera Metapán Alotepeque, Municipio de Metapán, Departamento de Santa Ana, localizado en la región noroeste de El Salvador.⁽¹¹⁷⁾ Para la recolección de cada órgano vegetal de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se realizaron los siguientes viajes de campo (Ver tabla N° 9).

Tabla N° 9. Fechas de recolección en el Parque Nacional Montecristo de El Salvador.

Especie vegetal	Órganos vegetales recolectados	Fecha de recolecta
<i>Quetzalia reynae</i>	Hojas, ramas y raíces.	21 de marzo de 2017
<i>Zinowiewia integerrima</i>	Hojas, ramas y raíces.	21 de marzo de 2017
<i>Maytenus segoviarum</i>	Hojas, ramas, frutos y raíces.	19 de mayo de 2017

Como se mencionó anteriormente, para llevar a cabo la recolecta fue necesario solicitar un permiso, el cual fue otorgado por el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Anexo N° 2), cuando se realizó la recolecta la administración del parque asignó un guarda recursos, que conocía las áreas protegidas del parque y la ubicación de las especies vegetales. Así mismo, nos acompañó un curador del Museo de Historia Natural de El Salvador, que fue el profesional que realizó la identificación de las especies vegetales.

Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales y se prosiguió a **preparar los extractos orgánicos de hojas, ramas y raíces de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae*, *Zinowiewia integerrima* y frutos de *Maytenus segoviarum*.**

El material vegetal fue previamente secado en una estufa de aire circulante a temperatura de 40°C durante 48 horas y posterior al secado, se procedió al molido. Para preparar los extractos de cada órgano de las especies recolectadas se utilizó, empleando como método de extracción la maceración ultrasónica, este procedimiento de maceración discontinua mejora la difusión y la interacción entre el solvente y material vegetal a través de ondas ultrasónicas, ya que facilita el proceso de extracción de los metabolitos secundarios, además de ser un método que no utiliza calor y por lo tanto no daña los metabolitos termolábiles (Figura N° 40).⁽²⁴⁾



Figura N° 40. Baño ultrasónico, aparato utilizado para realizar la maceración ultrasónica.

La figura N° 40 es una fotografía de Flores, K.C., (2017). De los archivos fotográficos de Celastraceae. Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

En la maceración ultrasónica de hojas y ramas de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se utilizó como solvente de extracción etanol 95°. Posteriormente, se rotaevaporó para eliminar el solvente y obtener el extracto seco, luego se realizó la partición líquido/líquido utilizando agua y diclorometano y en la segunda partición líquido/líquido empleando agua/*n*-butanol, obteniéndose las fracciones diclorometánicas y *n*-butanólicas. Mientras que en la maceración ultrasónica de frutos de *Maytenus segoviarum*, raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se utilizaron diferentes solventes de extracción: metanol, acetona y mezcla de *n*-hexano-éter etílico (1:1). El proceso de fraccionamiento se realizó para lograr extraer el mayor número de metabolitos secundarios solubles en las diferentes fases de acuerdo a su polaridad, utilizando así, desde solventes no polares (diclorometano) hasta solventes polares (agua).

Seguidamente, se procedió a **efectuar el análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima***. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

5.1. Redisolución de las fracciones y extractos orgánicos secos.

Luego de realizar el procedimiento de extracción, las fracciones y extractos secos se redisolieron en un solvente y así, se llevó a cabo el análisis fitoquímico preliminar (Ver Tabla N° 10).

Tabla N° 10. Solventes utilizados en la redisolución de extractos secos.

Fracción/ Extracto	Solvente de redisolución	Fracción/ Extracto	Solvente de redisolución	Fracción/ Extracto	Solvente de redisolución
MsHd	Diclorometano	QrHd	Diclorometano	ZiHd	Diclorometano
MsHnb	Metanol	QrHnb	Metanol	ZiHnb	Metanol
MsRd	Diclorometano	QrRd	Diclorometano	ZiRd	Diclorometano
MsRnb	Metanol	QrRnb	Metanol	ZiRnb	***
MsRzm	Metanol	QrRzm	Metanol	ZiRzm	Metanol
MsRza	Acetona	QrRza	Acetona	ZiRza	Acetona
MsRznh	Diclorometano	QrRznh	Diclorometano	ZiRznh	Diclorometano
MsFm	Metanol				
MsFa	Acetona				
MsFnh	Diclorometano				
***: No se logró redisolver el extracto orgánico.					

Se emplearon diversos solventes para tratar de redisolver la fracción de *n*-butanol de ramas de *Zinowiewia integerrima* (ZiRnb), entre ellos: diclorometano,

acetona, metanol, isopropanol, *n*-butanol, etanol 95°, etanol 80°, etanol 50°, acetato de etilo, dioxano, *n*-hexano, *n*-heptano, benceno y éter de petróleo. Lastimosamente en ninguno de los solventes mencionados se logró redissolver dicha fracción. Razón por la cual, en los datos del análisis fitoquímico preliminar, se reporta como resultado negativo para ZiRnb.

5.2 Determinación de glicósidos saponínicos.

a. Método de la espuma.

Se ensaya este método en material vegetal seco y molido, la evidencia positiva de la prueba es una altura mínima de 1 cm, además debe persistir por 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 11.

Tabla N° 11. Resultados obtenidos de la medición de la espuma en el material vegetal seco de las especies de Celastráceas en estudio.

Especie vegetal	Órgano vegetal	Tiempo (min)/ Altura (cm)						R.
		0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min	
<i>Maytenus segoviarum</i>	Hojas	0.9	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	-
<i>Maytenus segoviarum</i>	Ramas	2.0	2.0	1.5	1.5	1.5	1.5	+
<i>Maytenus segoviarum</i>	Raíces	4.0	3.5	3.5	3.5	3.2	3.2	+
<i>Maytenus segoviarum</i>	Frutos	0.4	0.2	0.1	0.0	-	-	-
<i>Quetzalia reynae</i>	Hojas	0.9	0.7	0.7	0.6	0.5	0.0	-
<i>Quetzalia reynae</i>	Ramas	0.9	0.4	0.3	0.3	0.0	0.0	-
<i>Quetzalia reynae</i>	Raíces	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	-
<i>Zinowiewia integerrima</i>	Hojas	1.5	1.5	1.0	0.8	0.8	0.8	+
<i>Zinowiewia integerrima</i>	Ramas	1.5	1.2	1.2	1.2	0.5	0.5	+
<i>Zinowiewia integerrima</i>	Raíces	0.6	0.6	0.5	0.3	0.0	0.0	-

R: Resultado de la prueba.
(-) No formación de espuma.

Las saponinas son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos. Una de las pruebas más empleadas en la

detección de saponinas es la formación de espuma,⁽¹⁴⁸⁾ y esta debe persistir por más de un minuto.⁽⁹⁷⁾

En la prueba de espuma para el material vegetal seco y molido de *Maytenus segoviarum* hojas y frutos se observó una leve formación de espuma, pero esta no fue persistente. Mientras que en las ramas y raíces se observó la formación de espuma con altura y tiempo establecido (Figura N° 41).



Figura N° 41. Prueba de espuma de la especie *Maytenus segoviarum*.

Al realizar la prueba de espuma para el material vegetal seco y molido de *Quetzalia reynae* en hojas, ramas y raíces se observó la formación de espuma pero no alcanzó la altura mínima de 1 cm, que es la medida requerida de la prueba (Figura N° 42).

En la prueba de espuma para el material vegetal seco de *Zinowiewia integerrima* en hojas y ramas, se observó la formación de espuma con altura y

tiempo establecido, mientras que en raíces la espuma generada fue mayor a 1 cm y no perduro por más tiempo (Figura N° 43).



Figura N° 42. Prueba de espuma de la especie *Quetzalia reynae*.



Figura N° 43. Prueba de espuma de la especie *Zinowiewia integerrima*.

Así mismo, se realiza la prueba de espuma a las fracciones y extractos orgánicos preparados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 12.

Tabla N° 12. Resultados obtenidos de la medición de la espuma en las fracciones y extractos orgánicos de las especies de Celastráceas en estudio.

Fracción/ Extracto	Tiempo (min)/ Altura (cm)						Resultado
	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min	
MsHd	-	-	-	-	-	-	-
MsHnb	1.3	1.1	1.0	0.9	0.7	0.7	+
MsRd	-	-	-	-	-	-	-
MsRnb	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.0	+
MsRzm	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	+
MsRza	1.5	1.5	1.4	1.2	1.2	1.2	+
MsRznh	-	-	-	-	-	-	-
MsFm	-	-	-	-	-	-	-
MsFa	-	-	-	-	-	-	-
MsFnh	-	-	-	-	-	-	-
QrHd	-	-	-	-	-	-	-
QrHnb	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	-
QrRd	-	-	-	-	-	-	-
QrRnb	0.6	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	-
QrRzm	1.3	1.2	0.6	0.6	0.6	0.6	+
QrRza	-	-	-	-	-	-	-
QrRznh	-	-	-	-	-	-	-
ZiHd	-	-	-	-	-	-	-
ZiHnb	1.0	1.0	0.8	0.7	0.7	0.7	+
ZiRd	-	-	-	-	-	-	-
ZiRnb	-	-	-	-	-	-	-
ZiRzm	0.6	0.4	0.2	0.2	0.1	0.0	-
ZiRza	1.0	0.9	0.5	0.5	0.4	0.4	+
ZiRznh	-	-	-	-	-	-	-

(-) No formación de espuma.

Se ensayaron las fracciones y extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, resultando positivas las fracciones MsHnb y MsRnb, y los extractos MsRzm y MsRza. A pesar, que el resultado de la prueba de espuma en material vegetal seco de hojas fue negativo, el proceso de fraccionamiento permitió la purificación de los componentes en el órgano vegetal, debido a ello, la fracción *n*-butanólica de hojas resulto positiva al realizar el ensayo de espuma. Mientras que en los extractos orgánicos de los frutos no se observó la formación de espuma. Por lo tanto, se presume la presencia de glicósidos saponínicos en hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum* y la ausencia de estos metabolitos en los frutos.

Igualmente se ensayaron las fracciones y extractos orgánicos de *Quetzalia reynae*, resultando positivo el extracto QrRzm, a pesar, que el resultado de la prueba de espuma en material vegetal seco de raíces fue negativo, el proceso experimental permitió la extracción de los componentes del órgano vegetal, y debido a ello, el extracto metanólico de raíces resulto positivo al realizar el ensayo de espuma. Por consiguiente, se presume la presencia de glicósidos saponínicos en poca cantidad en las raíces de *Quetzalia reynae* y la ausencia de estos metabolitos en hojas y ramas.

Se ensayaron las fracciones y extractos orgánicos de *Zinowiewia integerrima*, resultando positiva la fracción ZiHnb y el extracto ZiRza. A pesar, que el resultado de la prueba de espuma en material vegetal seco de raíces fue negativo, el proceso experimental permitió la extracción de los componentes del órgano vegetal, y debido a ello, el extracto acetónico de raíces resulto positivo al realizar el ensayo de espuma. De manera que se presume la presencia de glicósidos saponínicos en hojas y raíces de *Zinowiewia integerrima*. Así mismo, al llevar a cabo la prueba en material vegetal seco se observó la formación de

espuma en ramas y, por lo tanto, también se presume la presencia de estos metabolitos en ramas de *Zinowiewia integerrima*.

b. Prueba de Liebermann-Burchard.

Se realizó la prueba de Liebermann-Burchard a los extractos que resultaron positivos en la prueba de la espuma. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 13.

Tabla N° 13. Resultados obtenidos en la prueba de Liebermann-Burchard.

Fracción/ Extracto	Resultado	Color del anillo
MsHnb	+	Rojo
MsRnb	+	Rojo
MsRzm	+	Rojo
MsRza	+	Rojo
QrRzm	+	Rojo
ZiHnb	+	Rojo
ZiRza	+	Rojo

c. Prueba de Salkowski.

Se realizó la prueba de Salkowski a los extractos que resultaron positivos en la prueba de la espuma. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 14.

Tabla N° 14. Resultados obtenidos en la prueba de Salkowski.

Fracción/ Extracto	Resultado	Color del anillo
MsHnb	+	Rojo
MsRnb	+	Rojo
MsRzm	+	Rojo
MsRza	+	Rojo
QrRzm	+	Rojo
ZiHnb	+	Rojo
ZiRza	+	Rojo

Como se mencionó anteriormente, las saponinas son glicósidos cuya aglicona pueden ser esterooidal o triterpénica, capaces de dar coloraciones con diversos reactivos de carácter ácido, siendo los más usuales, el reactivo de Liebermann-Burchard y de Salkowski, estas son pruebas cualitativas que contribuyen en la identificación del tipo de genina de la molécula de saponinas, la evidencia positiva de ambas pruebas para determinar la presencia de un núcleo triterpénico es la formación de un anillo de coloración rojo o púrpura, mientras que un anillo azul verdoso indica la presencia de un núcleo esterooidal.⁽²⁶⁾

Las fracciones MsHnb, MsRnb, ZiHnb y los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, QrRzm, y ZiRza (que resultaron positivos en la prueba de espuma) muestran el anillo color rojo en ambos ensayos (Figura N° 44) indicando prueba positiva para núcleo triterpénico y por lo tanto se reporta presencia de saponinas de tipo triterpénico en raíces de *Quetzalia reynae*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum* y *Zinowiewia integerrima*.

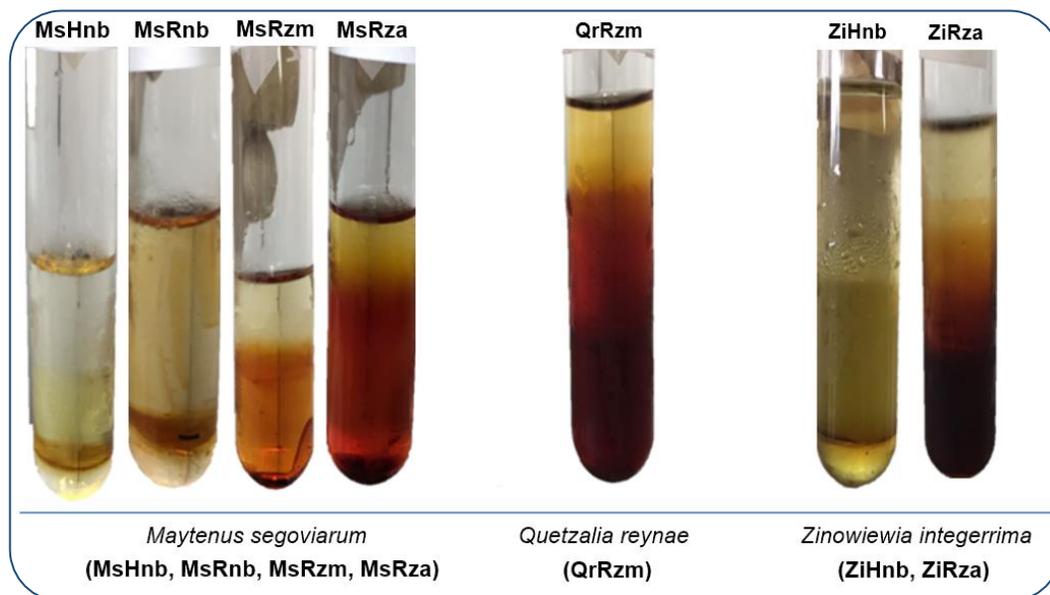


Figura N° 44. Resultados positivos de la prueba de Liebermann-Burchard y Salkowski para saponinas.

De los estudios más recientes, Estevam y *col.* (2009) realizaron un tamizaje fitoquímico al extracto de corteza de *Maytenus rigida* (Celastraceae), en el que los extractos etanólico, acuoso, clorofórmico y de acetato de etilo, mostraron contenido de saponinas, por lo que se puede justificar el resultado positivo al realizar la prueba a las fracciones MsHnb, MsRnb, ZiHnb y a los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, QrRzm, y ZiRza.⁽⁸⁰⁾

5.3 Determinación de glicósidos cardiotónicos.

Los glicósidos cardiotónicos son compuestos formados por una parte glicósidica constituida por una o varias unidades de azúcar y un núcleo esteroidal unido a un anillo lactónico insaturado. El sistema tetracíclico deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno, y son necesarias ciertas características estructurales para que los glicósidos cardiotónicos posean actividad sobre el músculo cardíaco:^(13,26)

- Un grupo OH en posición *beta* en C₁₄
- Unión *cis* entre los anillos A-B y entre los anillos C-D
- Unión *trans* entre los anillos B-C
- Anillo lactónico insaturado en posición *beta* en C₁₇ y puede ser de cinco o seis miembros.
- Un residuo azucarado sobre el grupo OH en posición *beta* en C₃

Para la caracterización de glicósidos cardiotónicos se realizan diversas pruebas que permiten identificar las partes que constituyen a estos compuestos. Los ensayos se basan en la identificación de la lactona insaturada, determinación del núcleo esteroidal y del residuo azucarado.

El agente revelador Kedde, reactivo para identificar la lactona insaturada de estos compuestos, está constituido por dos soluciones: ácido 3,5-dinitrobenzoico 2% en metanol (Kedde A) e hidróxido de potasio 5.7% en

metanol (Kedde B).⁽²⁶⁾ La evidencia positiva de esta prueba es la aparición de manchas de color morado o púrpura,⁽⁷⁾ y el mecanismo de reacción propuesto en la literatura química se basa en una desprotonación del C₂₁ de la lactona insaturada en medio alcalino (KOH) y el carbanión formado sufre una adición nucleofílica sobre el ácido 3,5-dinitrobenzoico y genera un complejo coloreado conocido como complejo de Meisenheimer (Figura N° 45).^(18,84,108)

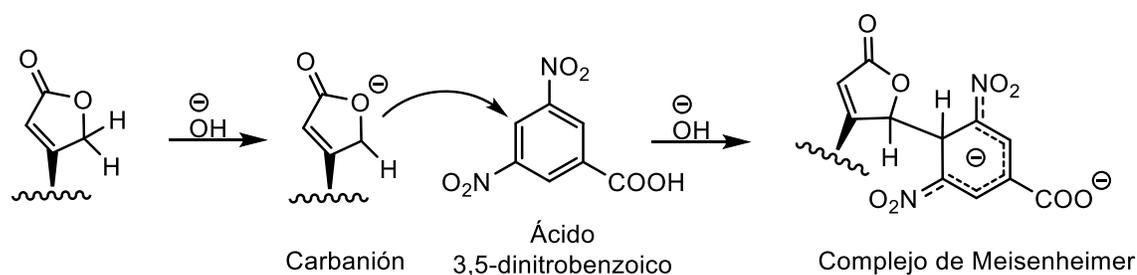


Figura N° 45. Mecanismo de reacción del reactivo de Kedde.⁽⁸⁴⁾

Utilizando la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1:1) y el revelador Kedde, no se observó el apareamiento de manchas color morado o púrpura y se demostró ausencia de lactonas insaturadas de glicósidos cardiotónicos en la cromatografía en capa fina, por tanto, no se prosiguió con la determinación del núcleo esteroidal y residuo azucarado.

En 1977, se reporta el primer aislamiento de un compuesto cardiotónico elucidado de una fracción del extracto etanólico de semillas de *Elaeodendron glaucum*, una especie perteneciente a la Familia Celastraceae,⁽¹¹⁰⁾ a partir de ese año se han aislado y caracterizado una amplia cantidad de cardenólidos, principalmente en los géneros *Elaeodendron* y *Euonymus*.^(136,154) Dentro de los estudios más actuales, Butler y col. (2014), aislaron compuestos cardenólidos de las hojas y tallos de *Elaeodendron australe* Var.⁽⁶⁰⁾ Meses después, Osorio y col. (2014), aislaron alrededor de diez glicósidos cardiotónicos de las hojas y frutos de *Elaeodendron orientale*.⁽¹³⁶⁾

Todas estas investigaciones respaldan la presencia de cardiotónicos en ciertas especies de la familia Celastraceae, sin embargo, hasta la fecha no se reporta el aislamiento de estos compuestos en los géneros *Maytenus*, *Quetzalia* y *Zinowiewia*, por lo tanto, se puede justificar el resultado negativo al realizar la prueba de glicósidos cardiotónicos a las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.4 Determinación de glicósidos flavonoides.

a. Prueba de Shinoda o de la antocianidina.

Se realiza la prueba a todas las fracciones y extractos orgánicos de las especies en estudio, la evidencia positiva para esta prueba es el apareamiento de una coloración rojiza luego de la adición de HCl concentrado sobre una lámina de magnesio metálico, los resultados se muestran en la tabla N° 15.

Tabla N° 15. Resultados obtenidos en la prueba de Shinoda.

Fracción/ Extracto	Resultado	Color
MsHd	-	-
MsHnb	+	Rojo
MsRd	-	-
MsRnb	+	Rojo
MsRzm	+	Rojo
MsRza	+	Rojo intenso
MsRznh	+	Rojo intenso
MsFm	-	-
MsFa	+	Rojo
MsFnh	-	-
QrHd	-	-
QrHnb	+	Rojo
QrRd	-	-
QrRnb	+	Rojo
QrRzm	+	Rojo
QrRza	+	rojo
QrRznh	+	Rojo intenso

ZiHd	-	-
ZiHnb	+	Rojo
ZiRd	-	-
ZiRnb	-	-
ZiRzm	+	Rojo
ZiRza	+	Rojo
ZiRzh	+	Rojo
(-) No se observó cambio de color.		

Los flavonoides son pigmentos constituidos por quince átomos de carbono bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos están unidos por una unidad de tres carbonos que puede formar o no un anillo.⁽²⁶⁾

La reacción más usual para la detección de los flavonoides es llamada prueba de Shinoda o de antocianidina, este ensayo consiste en colocar una lámina de magnesio y agregar gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl), se observa el apareamiento de un color naranja o rojizo,^(13,26) debido a que el magnesio metálico interacciona con el ácido clorhídrico, liberando hidrogeno en forma de gas, y por reducción se forma el ion flavilio o sal de flavilio, dando así la coloración característica (Figura N° 46).^(36,82)

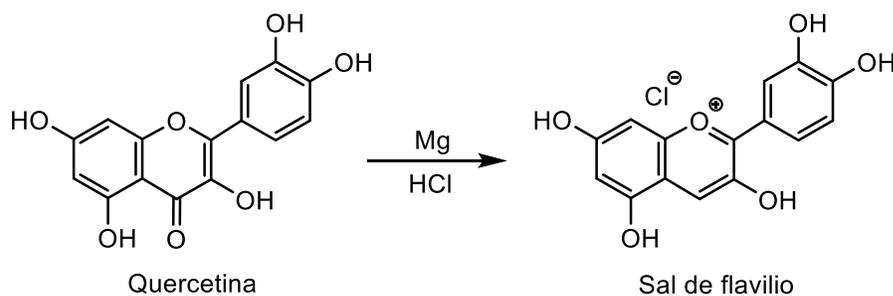


Figura N° 46. Reacción de Shinoda o de antocianidina.⁽³⁶⁾

En el ensayo fitoquímico preliminar, a través de la prueba de Shinoda se determina que las fracciones orgánicas MsHnb, MsRnb, QrHnb, QrRnb, ZiHnb y

extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFa, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh, resultaron positivos para flavonoides al mostrar la coloración roja durante el ensayo, siendo más evidente en los extractos orgánicos MsRza, MsRznh y QrRznh, ya que la coloración roja fue más intensa.

La Figura N° 47 muestra de forma representativa los resultados positivos de la prueba de Shinoda.

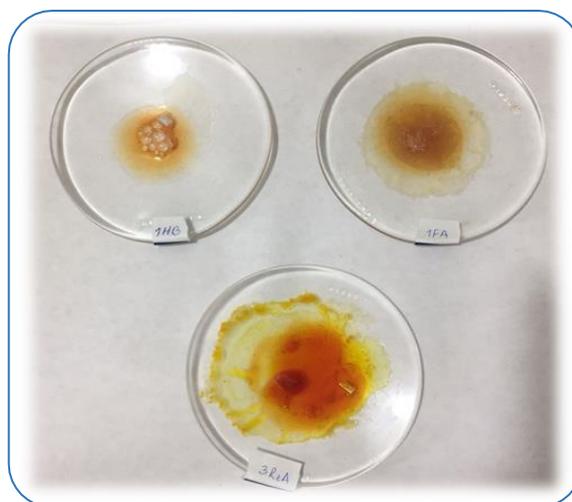


Figura N° 47. Resultados representativos de la prueba positiva de Shinoda.

b. Cromatografía de capa fina.

Para determinar la presencia de flavonoides utilizando cromatografía en capa fina se utilizaron las fases móviles acetato de etilo-metanol-agua en proporciones (8:1.5:0.5) y *n*-hexano-acetato de etilo (7:3). Fase estacionaria POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄, reactivo revelador vainillina 5%-HCl concentrado (4:1) y quercetina como testigo. La evidencia positiva para esta prueba son manchas de color rojo, morado,^(26,47) y amarillo,^(3,155) posteriores a calentamiento, los resultados y *R_f* de las fracciones y extractos orgánicos se muestran en las tablas N° 16 y N° 17. Las manchas en cada fracción y extracto orgánico se representan en orden alfabético, de menor a mayor polaridad.

Tabla N° 16. Resultados obtenidos de la prueba de flavonoides en cromatografía en capa fina utilizando la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5).

Fracción/ Extracto	Manchas	Rf	Color
MsHnb	a	0.64	Amarillo
	b, c, d	0.56, 0.25, 0.04	Rojo
MsRnb	a	0.64	Amarillo
MsRza	a	0.83	Morado
	b, c	0.66, 0.61	Rojo
MsFa	a, b	0.61, 0.18	Rojo
QrHnb	a	0.62	Amarillo
	b, c	0.50, 0.35	Morado
QrRnb	a	0.62	Amarillo
ZiHnb	a	0.60	Amarillo
ZiRnb	-	-	-
Quercetina (testigo)	b	0.65	Amarillo
(-) Resultado negativo.			

Tabla N° 17. Resultados obtenidos de la prueba de flavonoides en cromatografía en capa fina utilizando la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3).

Fracción/ Extracto	Manchas	Rf	Color
MsHd	-	-	-
MsRd	-	-	-
MsRzm	a, b	0.74, 0.41	Morado
MsRza	a, b, c	0.74, 0.63, 0.41	Morado
MsRznh	a, b, c	0.72, 0.61, 0.40	Morado
MsFm	-	-	-
MsFnh	-	-	-
QrHd	-	-	-
QrRd	-	-	-
QrRzm	a	0.41	Morado
	b, c	0.25, 0.12	Amarillo
QrRza	a, d	0.59, 0.13	Amarillo
	b, c	0.48, 0.41	Morado

QrRznh	a, d	0.59, 0.12	Amarillo
	b, c	0.48, 0.41	Morado
ZiHd	-	-	-
ZiRd	-	-	-
ZiRzm	a, b, c	0.62, 0.49, 0.15	Morado
ZiRza	a	0.41	Amarillo
ZiRznh	a, b	0.59, 0.55	Amarillo
	c	0.25	Rojo
Quercetina (testigo)	a	0.08	Amarillo
(-) Resultado negativo.			

Las técnicas cromatográficas, son muy empleadas en la identificación de flavonoides y es común el uso de agentes cromogénicos, como la vainillina en una mezcla de ácido clorhídrico concentrado, el mecanismo de reacción se basa en la condensación del reactivo de vainillina con proantocianinas en medio ácido. La vainillina protonada (un fragmento electrofílico débil) reacciona con el anillo flavonoide en la posición seis u ocho. El producto intermedio de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un producto color rosa claro a rojo intenso (Figura N° 48).⁽³⁴⁾

En el estudio fitoquímico preliminar, se ensayaron diversas fases móviles para determinar cuál de ellas era idónea en la prueba de cromatografía en capa fina para flavonoides y de acuerdo al comportamiento observado de las muestras, se determinaron dos fases móviles:

- La fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5), para las fracciones orgánicas MsHnb, MsRnb, QrHnb, QrRnb, ZiHnb y para los extractos orgánicos MsRza, MsFa.
- La fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3), para las fracciones orgánicas MsHd, MsRd, QrHd, QrRd, ZiHd, ZiRd y para los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFm, MsFnh, QrRzM, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh.

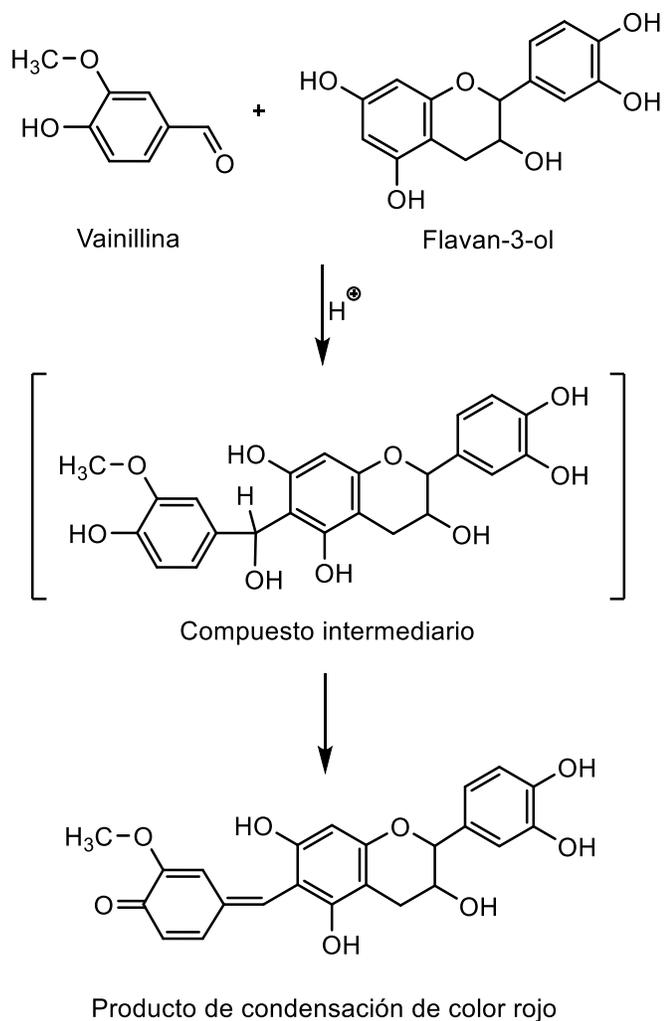


Figura N° 48. Reacción de vainillina con flavonoides en medio ácido.⁽³⁴⁾

La cromatografía en capa fina confirmó la presencia de flavonoides en las fracciones orgánicas MsHnb, MsRnb, QrHnb, QrRnb, ZiHnb y en los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFa, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh, ya que se observaron manchas de color rojo, morado y amarillo. La bibliografía química reporta que la quercetina con vainillina en ácido clorhídrico, revela de color amarillo y con un R_f de 0.69,^(3,155) y es por esa razón que se consideraron las manchas reveladas de dicho color (Figura N° 49),

siendo así una evidencia positiva de la presencia de flavonoides en las fracciones y extractos orgánicos antes mencionados. Los R_f calculados y las fases móviles utilizadas (acetato de etilo-metanol-agua 8:1.5:0.5 y *n*-hexano-acetato de etilo 7:3), nos dio una idea de la clase de flavonoides presentes en estas especies; los cuales podrían ser de alta y mediana polaridad.

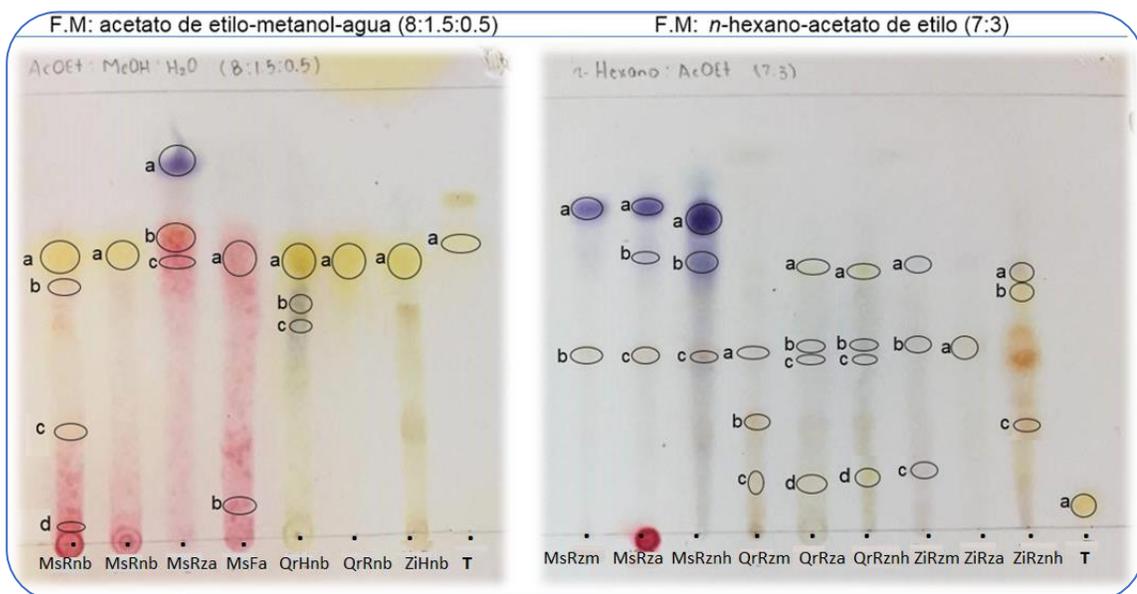


Figura N° 49. Resultados de la identificación de flavonoides en el cromatograma de capa fina utilizando vainillina 5%-HCl concentrado (4:1).

Desde hace algunos años, se han llevado a cabo investigaciones fitoquímicas de especies de la Familia Celastraceae en las que se reporta el aislamiento de flavonoides, a continuación, se mencionan algunos de los estudios en los que se aislaron este tipo de metabolitos secundarios: Sannomiya y col. (1998) en el extracto de *Maytenus aquifolium*,⁽¹⁵²⁾ Leite y col. (2001) en el extracto acuoso de hojas de las especies *Maytenus ilicifolia* y *Maytenus aquifolium*,⁽¹¹²⁾ Fonseca y col. (2007) en el extracto metanólico de hojas de *Maytenus truncata* Reissek,⁽⁸⁶⁾ Silva y col. (2008) en el extracto etanólico de raíces de *Maytenus obtusifolia*

Mart,⁽⁷²⁾ y recientemente Sousa y col. (2017) determinaron la presencia de flavonoles en el extracto metanólico de hojas de *Maytenus robusta*.⁽¹⁵⁷⁾

Todas estas investigaciones respaldan la presencia de flavonoides en especies de la Familia Celastraceae, por lo tanto, se puede justificar el resultado positivo de la prueba de shinoda y cromatografía en capa fina para flavonoides en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.5 Determinación de glicósidos antraquinónicos.

Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de quinonas, la mayoría están hidroxiladas en C₁ y C₂, con frecuencia están en forma de glicósidos.^(13,26)

Los reactivos alcalinos comúnmente utilizados para la identificación de antraquinonas incluyen: amoníaco, hidróxido de potasio en metanol, hidróxido de sodio, solución de carbonato de sodio, solución de piperidina en tolueno y solución de carbonato de litio saturada.⁽⁴⁸⁾

La literatura química describe la propiedad que poseen las antraquinonas hidroxiladas de formar sales con los álcalis, lo que permite su identificación a través de los cambios de coloración de las soluciones, de amarillo a rojo, violeta, verde o purpura, debido a la formación de sistemas conjugados de los grupos hidroxilos aromáticos y grupos carbonilos.^(16,26,48)

Utilizando la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (1:1) y como revelador el hidróxido de potasio 5% en metanol, no se observó el apareamiento de manchas color rojo, rosado o violeta en las fracciones y extractos orgánicos ensayados.

En la Familia Celastraceae, hasta el momento, no se ha reportado el aislamiento de compuestos con esqueleto antraquinónico, por lo que se justifica el resultado negativo al realizar la prueba de color en las fracciones y extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.6 Determinación de taninos.

Para la realización de esta prueba se utilizaron dos reactivos de precipitación (gelatina 5% y clorhidrato de quinina 5%) y un reactivo de coloración (tricloruro de hierro 1%). Los resultados se muestran en la tabla N° 18.

Tabla N° 18. Resultados obtenidos en la prueba de taninos.

Fracción/ Extracto	Gelatina	Quinina	FeCl ₃	Tipo de tanino
MsHd	+	+	Verde	Condensado
MsHnb	+	+	Verde	Condensado
MsRd	+	+	Verde	Condensado
MsRnb	+	+	Verde	Condensado
MsRzm	+	+	Verde	Condensado
MsRza	+	+	Verde	Condensado
MsRznh	-	-	-	-
MsFm	+	+	Verde	Condensado
MsFa	+	+	Verde	Condensado
MsFnh	-	-	-	-
QrHd	+	+	Verde	Condensado
QrHnb	+	+	Verde	Condensado
QrRd	+	+	Verde	Condensado
QrRnb	+	+	Verde	Condensado
QrRzm	+	+	Verde	Condensado
QrRza	+	+	Verde	Condensado
QrRznh	-	-	-	-
ZiHd	+	+	Verde	Condensado
ZiHnb	+	+	Verde	Condensado
ZiRd	+	+	Verde	Condensado
ZiRnb	-	-	-	-
ZiRzm	+	+	Verde	Condensado
ZiRza	+	+	Verde	Condensado

Tabla N° 18 (continuación)				
ZiRznh	-	-	-	-
(-) Prueba negativa.				

Los taninos son compuestos polifenólicos con ciertas propiedades y reacciones características, entre ellas, dan coloraciones azules o verdes con soluciones de sales férricas, precipitan en solución de gelatina, en solución por dicromato de potasio y en presencia de alcaloides.^(28,33,53,83) Es posible clasificar a los taninos en dos grupos principales:^(8,28,33)

1. Taninos hidrolizables: consistentes en un núcleo central de carbohidrato al que se unen ácidos carboxílicos fenólicos por enlace éster, estos dan un color azul oscuro con solución de cloruro férrico.
2. Taninos condensados: llamados también proantocianidinas, constituidos por oligómeros (moléculas agregadas para la formación de una estructura más compleja) de dos o más flavanoles y dan un color negro verdoso con sales de hierro.

En el análisis fitoquímico preliminar, los reactivos de precipitación (gelatina y clorhidrato de quinina) y el reactivo de coloración (tricloruro de hierro), confirmó la presencia de taninos en las fracciones orgánicas MsHd, MsHnb, MsRd, MsRnb, QrHd, QrHnb, QrRd, QrRnb, ZiHd, ZiHnb, ZiRd y en los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsFm, MsFa, QrRzm, QrRza, ZiRzm, ZiRza, siendo más evidente la precipitación en los extractos orgánicos MsRzm y QrRza. De forma representativa, la figura N° 50 muestra los resultados positivos de la prueba de taninos.

En estudios fitoquímicos se ha identificado la presencia de taninos en diversas especies de la Familia Celastraceae.⁽¹²¹⁾ Vonka y Chifa (2008), determinaron taninos en el extracto acuoso de hojas de *Maytenus vitisidaea* Griseb.⁽¹⁶⁸⁾ así mismo, Souza y col. (2008) aislaron taninos del extracto acuoso de hojas de

Maytenus ilicifolia,⁽¹⁵⁸⁾ poco después, se encontraron estos compuestos en el extracto etanólico de corteza de *Maytenus rigida*⁽⁸⁰⁾ y en el extracto de acetona-agua en las hojas de *Maytenus ilicifolia*.⁽¹³⁹⁾ Recientemente, Holnik y col. (2015), determinaron la cantidad de taninos totales en el extracto acuoso de hojas de *Maytenus aquifolium*.⁽⁹⁹⁾

El conjunto de estas investigaciones, justifican los resultados positivos de la de taninos en los extractos en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

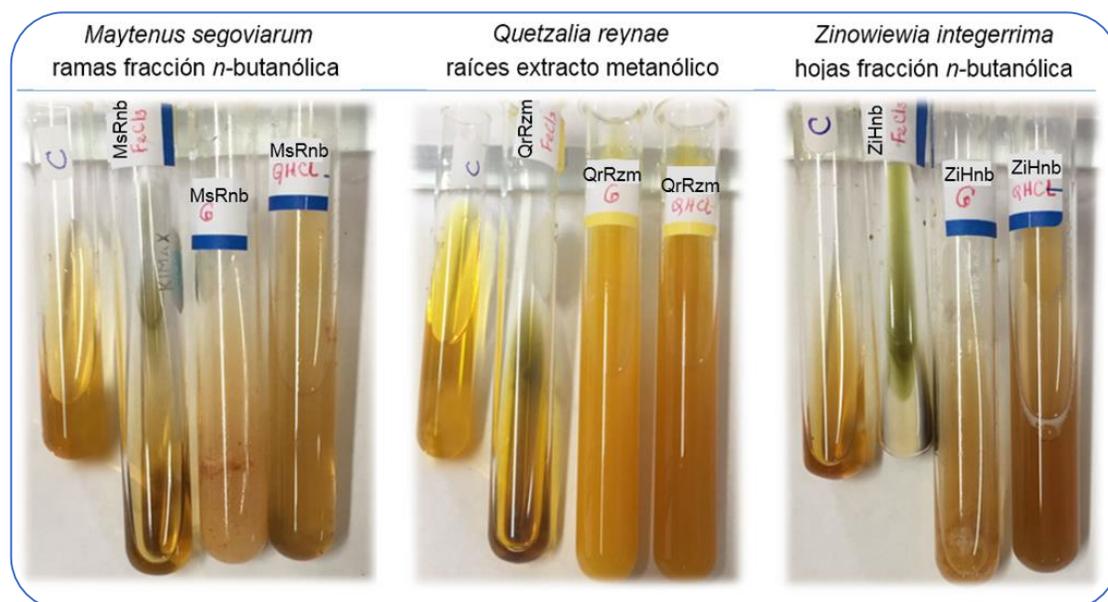


Figura N^o.50. Resultados representativos de la prueba positiva de taninos en extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*. (C: control; FeCl₃: tricloruro de hierro; G: gelatina; QHCl: clorhidrato de quinina).

5.7 Determinación de alcaloides.

Para determinar la presencia de alcaloides utilizando cromatografía en capa fina se utilizó la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua en proporciones (8:1.5:0.5). Fase estacionaria POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄, reactivo revelador

Dragendorff y sulfato de hiosciamina como testigo. La evidencia positiva para esta prueba son manchas de color naranja. Los resultados y *Rf* de las fracciones y extractos orgánicos se muestran en la tabla N° 19.

Tabla N° 19. Resultados obtenidos en la prueba de alcaloides.

Fracción/ Extracto	Resultado	Rf
MsHd	-	-
MsHnb	-	-
MsRd	-	-
MsRnb	-	-
MsRzm	+	0.82
MsRza	+	0.81
MsRznh	+	0.78
MsFm	-	-
MsFa	-	-
MsFnh	-	-
QrHd	-	-
QrHnb	+	0.65
QrRd	-	-
QrRnb	+	0.62
QrRzm	+	0.83
QrRza	+	0.80
QrRznh	+	0.78
ZiHd	-	-
ZiHnb	+	0.61
ZiRd	-	-
ZiRnb	-	-
ZiRzm	+	0.62
ZiRza	+	0.78
ZiRznh	+	0.78
Sulfato de hiosciamina (testigo)	+	0.11
(-) No se revelaron manchas naranjas.		

Los alcaloides son compuestos que constituyen uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios en las especies botánicas y están constituidos por uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico.⁽²⁶⁾

Para la comprobación de la presencia de alcaloides se han desarrollado un gran número de reactivos de coloración y de precipitación. Dentro de las técnicas cromatográficas en capa fina el agente revelador de uso general es el reactivo de Dragendorff,^(26,179) en el año de 1993 se llevó a cabo un estudio en el que se propuso un mecanismo de este reactivo Dragendorff reacciona con los alcaloides a través del átomo de nitrógeno para formar pares de iones insolubles en agua,⁽⁷⁹⁾ como resultado se observa la aparición del color naranja.⁽²⁶⁾ El mecanismo de reacción general propuesto es el siguiente (Figura N° 51):



Figura N° 51. Reacción general del reactivo de Dragendorff en presencia de alcaloides.⁽⁷⁹⁾

Se ensayaron diversas fases móviles para determinar cuál era idónea y de acuerdo al comportamiento observado de las muestras se determinó la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua en (8:1.5:0.5). La cromatografía en capa fina demostró la presencia de alcaloides en las fracciones orgánicas QrHnb, QrRnb, ZiHnb y en los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh, en los que se observaron manchas de color naranja (Figura N° 52), siendo esta una evidencia positiva de la presencia de éstos compuestos en los extractos antes mencionados. Los *Rf* calculados y la fase móvil utilizada (acetato de etilo-metanol-agua 8:1.5:0.5), nos dio una idea de la clase de alcaloides presentes en estas especies; los cuales podrían ser de alta y mediana polaridad.

En uno de los más recientes estudios realizado por Callies y *col.* (2017), se reporta el aislamiento de alcaloides sesquiterpénicos piridínicos en cuatro especies de Celastráceas. De la fracción diclorometánica del extracto etanólico

de hojas de *Celastrus vulcanicola* se aislaron trece alcaloides sesquiterpénicos, así mismo, se reporta la presencia de cinco alcaloides en la fracción diclorometánica del extracto etanólico de hojas de *Maytenus jeslkii*. También se estudió la fracción diclorometánica del extracto etanólico de tallos de *Maytenus segoviarum* en el que se demostró la existencia de cuatro alcaloides sesquiterpénicos, mientras que del extracto de *n*-hexano-éter dietílico de corteza de raíz de *Maytenus cuzcoina* se aislaron cinco alcaloides sesquiterpénicos.⁽⁶²⁾

Esta investigación,⁽⁶²⁾ y otros estudios,^(72,102,127) respaldan la presencia de alcaloides en la Familia Celastraceae, por lo tanto, se puede justificar el resultado positivo de la prueba alcaloides en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

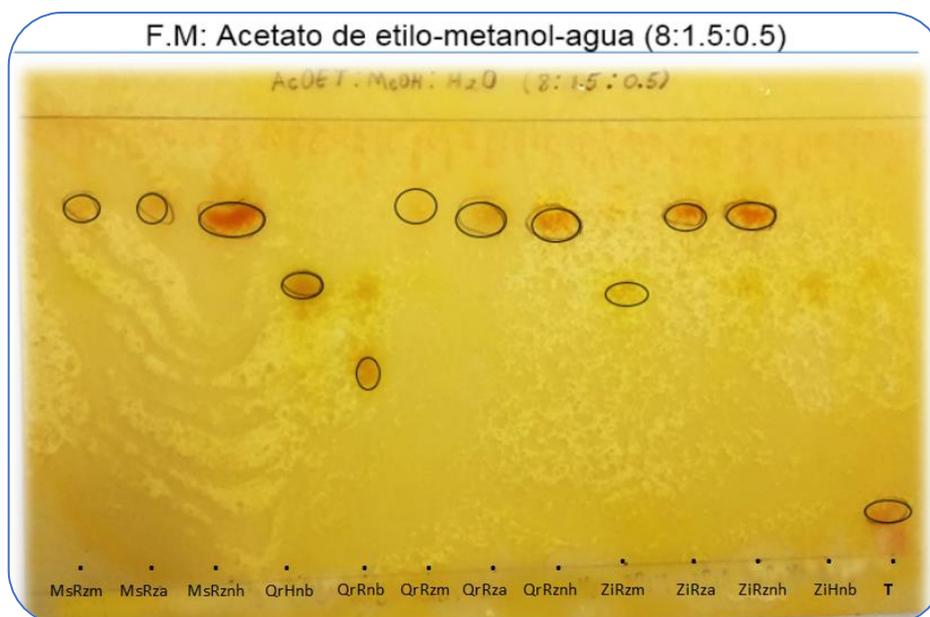


Figura N° 52. Resultados de la identificación de alcaloides en el cromatograma de capa fina utilizando Dragendorff.

5.8 Determinación de sesquiterpenlactonas.

Las sesquiterpenlactonas son compuestos de estructura muy diversa, resultantes de una variedad de ciclaciones, fusiones de anillo, oxidaciones, esterificaciones y otras reacciones, pero con un anillo característico de γ -lactona- α,β -insaturada, las reacciones químicas de color son usuales para detectar el anillo lactónico.⁽²⁶⁾ El revelador Baljet es un reactivo para identificar lactonas insaturadas y está constituido por una mezcla equivalente de dos soluciones: ácido pícrico 1% en etanol e hidróxido de sodio 10% en agua, la evidencia positiva de esta prueba es la aparición de manchas color naranja.⁽²⁶⁾ El mecanismo de reacción propuesto en la literatura química se basa en una desprotonación de la lactona insaturada en medio alcalino (NaOH) y el carbanión formado sufre una adición nucleofílica sobre el ácido pícrico y genera un complejo coloreado conocido como complejo de Meisenheimer (Figura N° 53).^(18,108)

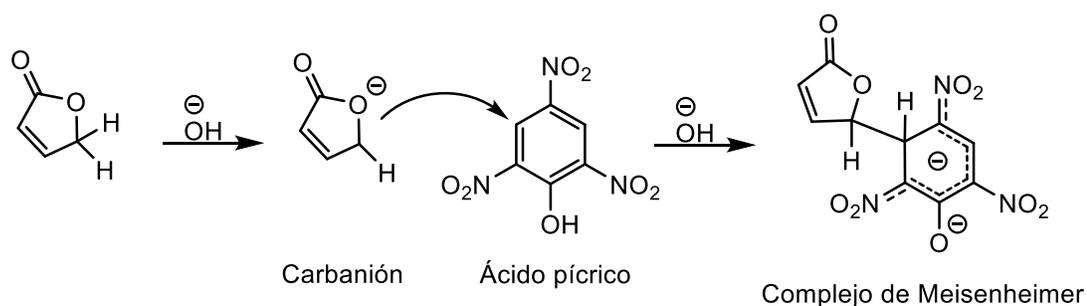


Figura N° 53. Mecanismo de reacción del reactivo de Baljet.^(18,108)

Utilizando la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3) y utilizando el revelador Baljet, no se observó el apareamiento de manchas color naranja. En las especies de la Familia Celastraceae, hasta el momento, no se ha reportado la presencia de sesquiterpenlactonas, por lo que se justifica el resultado negativo al realizar la prueba de color en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.9 Determinación de cumarinas.

Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las especies vegetales y se caracterizan por el sistema benzo- α -pirona y por su carácter lactónico.⁽²⁶⁾

Dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia de color púrpura, celeste, azul o amarilla opaca al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección en cromatografía de capa fina.^(26,148) Al revelar las placas cromatográficas con el reactivo revelador hidróxido de potasio 5% en metanol se logra intensificar la fluorescencia,⁽²⁶⁾ debido a la apertura de la lactona que constituye a las cumarinas (Figura N° 54).⁽⁴⁵⁾

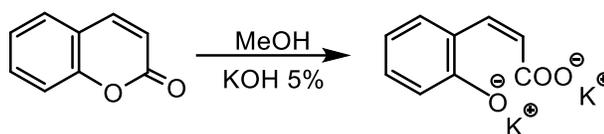


Figura N° 54. Mecanismo de reacción del reactivo de KOH en cumarinas.⁽⁴⁵⁾

Utilizando la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3) y utilizando el revelador hidróxido de potasio 5% en metanol, no se observó el aparecimiento de manchas fluorescentes al irradiar en ultravioleta a 365nm. En las especies de la Familia Celastraceae, no se ha reportado, hasta el momento, la presencia de cumarinas, por lo que se justifica el resultado negativo al realizar la prueba de fluorescencia en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.10 Determinación de esteroides.

Para determinar la presencia de esteroides en cromatografía en capa fina se utilizó la fase móvil acetato de *n*-hexano-acetato de etilo (1:1). Fase

estacionaria POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄, reactivo revelador Liebermann-Burchard y β -sitosterol como testigo. La evidencia positiva para esta prueba son manchas de color azul, verde, rosado, café, amarillo y morado.⁽⁹⁵⁾ Los resultados y *Rf* de las fracciones y extractos orgánicos se muestran en la tabla N° 20. Las manchas en cada fracción y extracto orgánico se representan en orden alfabético, de menor a mayor polaridad.

Tabla N° 20. Resultados obtenidos en la prueba de esteroides.

Fracción/ Extracto	Manchas	Rf	Color
MsHd	a, i, j	0.80, 0.20, 0.12	Morado
	b, c, d, e, f, g, h	0.68, 0.63, 0.58, 0.51, 0.44, 0.35, 0.27	Verde
MsHnb	-	-	-
MsRd	a, b, f, g, h	0.83, 0.73, 0.50, 0.28, 0.13	Morado
	c, d	0.68, 0.61	Verde
	e	0.56	Azul
MsRnb	-	-	-
MsRzm	a, b, c	0.75, 0.69, 0.57	Morado
MsRza	a, b, c	0.75, 0.69, 0.57	Morado
MsRznh	a, b, c, d, e, f	0.68, 0.53, 0.38, 0.28, 0.15, 0.10	Morado
MsFm	a, b	0.71, 0.66	Café
	c	0.53	Morado
	d, e	0.46, 0.37	Azul
MsFa	a, b	0.77, 0.69	Café
	c	0.43	Morado
	d	0.36	Azul
MsFnh	a	0.70	Café
	b, c	0.57, 0.51	Verde
	d, e, f	0.40, 0.20, 0.13	Morado
QrHd	a	0.80	Café
	b, e, f	0.71, 0.50, 0.41	Morado
	c, d	0.65, 0.58	Verde
QrHnb	-	-	-
QrRd	a, d	0.77, 0.57	Café
	b, e, f	0.70, 0.48, 0.39	Morado
	c	0.65	Verde

Tabla N° 20 (continuación).			
QrRnb	-	-	-
QrRzm	a, b, c	0.67, 0.55, 0.45	Café
QrRza	a, b, c, d	0.79, 0.67, 0.54, 0.43	Café
QrRznh	a, b, c	0.68, 0.55, 0.45	Café
ZiHd	a, f	0.80, 0.50	Morado
	b, e, g, h, i	0.72, 0.56, 0.26, 0.20, 0.12	Café
ZiHd	c, d	0.66, 0.61	Verde
ZiHnb	a	0.50	Morado
	b	0.25	Café
ZiRd	a, b, d, e	0.81, 0.73, 0.58, 0.48	Morado
	c	0.66	Verde
ZiRnb	-	-	-
ZiRzm	a, b	0.67, 0.57	Café
ZiRza	a	0.83	Morado
	b, c	0.67, 0.57	Café
ZiRznh	a, b	0.66, 0.56	Café
β -sitosterol (testigo)	a	0.54	Morado
(-) Resultado negativo.			

Los esteroides son compuestos de veintisiete a veintinueve átomos de carbono y cuyo esqueleto fundamental corresponde al ciclopentanoperhidrofenantreno. En los vegetales se puede encontrar libres como ésteres o como glicósidos.^(26,47)

Dentro de las técnicas cromatográficas en capa fina un agente revelador de uso común para la identificación de esteroides es el reactivo de Liebermann-Burchard,^(26,179) cuya evidencia positiva es la aparición de manchas de color azul, verde, rosado, café y amarillo.^(26,47) A lo largo de investigaciones científicas se han realizado propuestas de la reacción de Liebermann-Burchard sobre las moléculas esteroideas y entre las cuales se encuentran:

- a. Debido a la adición de ácido sulfúrico en la prueba de Liebermann-Burchard, se produce una deshidratación en el anillo A de la molécula y el color resulta de la conjugación de los dobles enlaces.⁽⁴⁾ La concentración de

esteroides también es importante, altas concentraciones pueden conducir a reacciones competitivas tales como la dimerización (Figura N° 55).^(4,59)

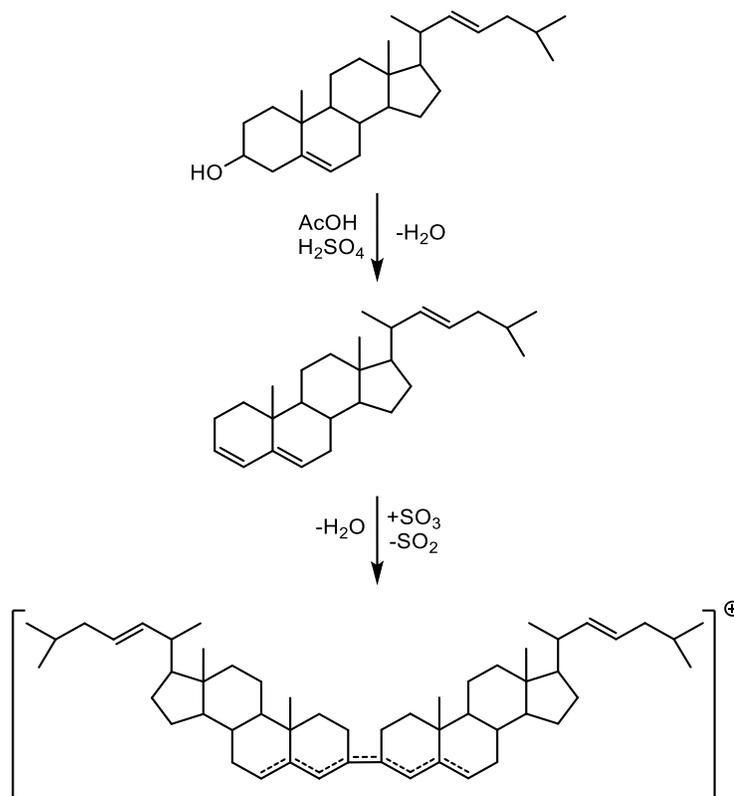


Figura N° 55. Mecanismo de reacción del Liebermann-Burchard para generar dímeros.^(4,59)

- b. La etapa inicial de la reacción de Liebermann-Burchard consiste en la protonación del grupo hidroxilo (-OH) del colesterol y la subsiguiente pérdida de agua (H₂O) para dar origen a la formación del ion carbonio 3,5-colestadieno que constituye el primer paso de la reacción de color en la prueba. Posteriormente ocurre una oxidación secuencial de este carbocatión por SO₃ produciendo un ácido colestahexano sulfónico, que es un compuesto cromóforo (Figura N° 56).⁽⁵⁹⁾

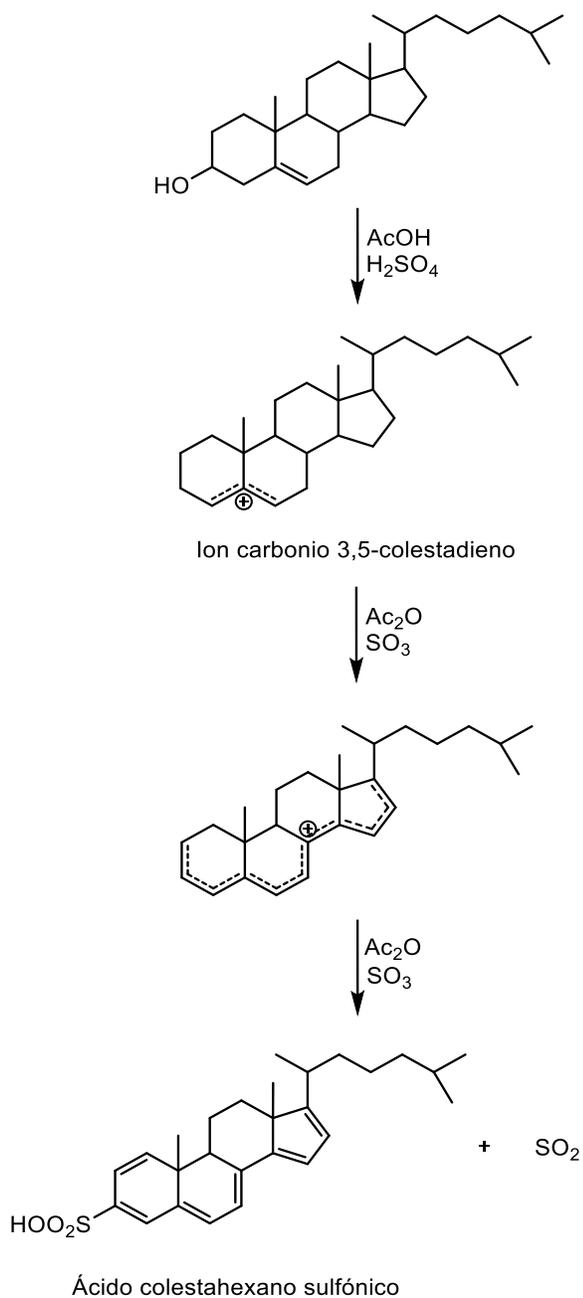


Figura N° 56. Mecanismo de reacción del Liebermann-Burchard para producir el ácido colestahexano sulfónico.⁽⁵⁹⁾

- c. En presencia de reactivos colorimétricos, el colesterol puede someterse acetilación, formación de esteroides, reordenamiento del esqueleto

esteroidal, dimerización, sulfonación, oxidación/desaturación (formación de dobles enlaces) y aromatización.⁽¹⁷⁶⁾

La cromatografía en capa fina demostró la ausencia de esteroides en las fracciones MsHnb, MsRnb, QrHnb y QrRnb. Mientras que, en las fracciones orgánicas MsHd, MsRd, QrHd, QrRd, ZiHd, ZiHnb, ZiRd y extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFm, MsFa, MsFnh, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh al ser tratadas con el reactivo Liebermann-Burchard se revelan manchas de color azul, verde y café. Así mismo, la bibliografía química reporta que el β -sitosterol con el reactivo revelador de Liebermann-Burchard, revela de morado,⁽⁹⁵⁾ y es por esa razón que se consideraron las manchas de dicho color (Figura N° 57).

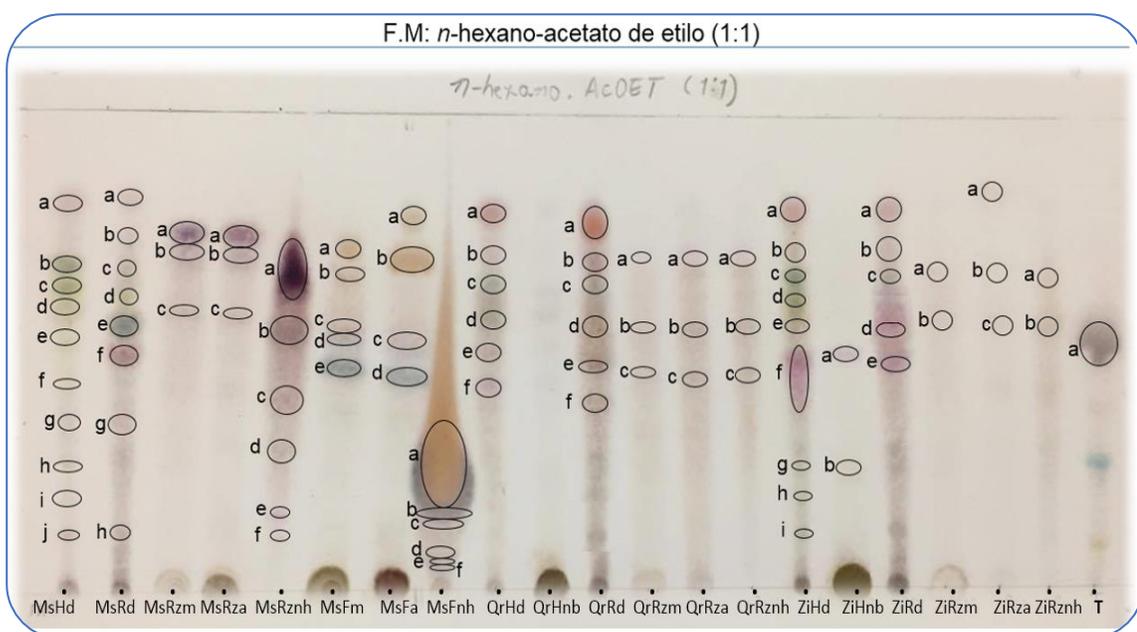


Figura N° 57. Resultados de la identificación de esteroides en el cromatograma de capa fina utilizando Liebermann-Burchard.

De la Familia Celastraceae se han aislado compuestos de tipo esteroidal, por ejemplo, se han identificado estos metabolitos en los extractos etanólico, acuoso, clorofórmico y de *n*-hexano de la corteza de *Maytenus rigida*.⁽⁸⁰⁾ Así mismo, en el extracto etanólico de las hojas de la especie *Maytenus guianensis*,⁽⁸¹⁾ y recientemente en los extractos clorofórmicos de las hojas de *Maytenus distichophylla* y de las hojas de *Salacia crassifolia*.⁽⁸⁵⁾ Por tanto, los estudios fitoquímicos mencionados respaldan los resultados positivos obtenidos en la prueba de esteroides en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.11 Determinación de triterpenos.

Para determinar la presencia de triterpenos en cromatografía en capa fina se utilizaron las fases móviles *n*-hexano-acetato de etilo (1:1) y acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5). Fase estacionaria POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄, reactivo revelador Komarowsky, como testigos se utilizó la betulina y β -amirina. La evidencia positiva para esta prueba son manchas de color azul, amarillo, rojo y rosadas. Los resultados y *R_f* de las fracciones y extractos orgánicos se muestran en las tablas N° 21 y N° 22. Las manchas en cada fracción y extracto orgánico se representan en orden alfabético, de menor a mayor polaridad.

Tabla N° 21. Resultados obtenidos en la prueba de triterpenos utilizando la fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5).

Fracción/ Extracto	Manchas	<i>R_f</i>	Color
MsHnb	a	0.35	Rojo
MsRnb	-	-	-
MsFm	a, b	0.93, 0.59	Azul
QrHnb	a, b	0.54, 0.22	Morado
QrRnb	-	-	-
ZiHnb	a, c, e, f	0.69, 0.56, 0.45, 0.17	Azul
	b, d	0.64, 0.50	Morado
ZiRnb	-	-	-

Tabla N° 21 (continuación).			
β -amirina (testigo)	a	0.89	Morado
Betulina (testigo)	a	0.77	Morado
(-) Resultado negativo.			

Tabla N° 22. Resultados obtenidos en la prueba de triterpenos utilizando la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (1:1).

Fracción/ Extracto	Manchas	Rf	Color
MsHd	a, e	0.90, 0.13	Morado
	b, c, d	0.77, 0.70, 0.41	Verde
MsRd	a, e, g, i, j	0.90, 0.55, 0.40, 0.27, 0.13	Morado
	b, c, d, f, h	0.78, 0.71, 0.63, 0.52, 0.32	Azul
MsRzm	a, b	0.82, 0.78	Azul
	c, d, e	0.67, 0.55, 0.45	Morado
MsRza	a, b, c, d, e	0.83, 0.79, 0.65, 0.45, 0.33	Gris
	f	0.05	Rojo
MsRznh	a, c, f	0.78, 0.54, 0.34	Azul
	b, d, e	0.63, 0.47, 0.43	Morado
MsFm	a, b	0.79, 0.55	Morado
MsFa	a, e, g	0.85, 0.54, 0.13	Morado
	b, c, d, f	0.79, 0.67, 0.62, 0.32	Azul
MsFnh	a, b, d	0.69, 0.59, 0.13	Azul
	c	0.47	Morado
QrHd	a, e	0.89, 0.63	Morado
	b, c, d	0.82, 0.77, 0.70	Azul
QrRd	a, c, d, e	0.88, 0.71, 0.61, 0.14	Morado
	b	0.82	Azul
QrRzm	a, b, c	0.66, 0.53, 0.40	Azul
QrRza	a, c	0.89, 0.66	Morado
	b, d, e, f, g	0.78, 0.62, 0.54, 0.39, 0.33	Azul
QrRznh	a, b, c, d, e	0.88, 0.76, 0.63, 0.53, 0.39	Morado
ZiHd	a, f, g	0.88, 0.47, 0.13	Morado
	b, c, d	0.82, 0.77, 0.69	Verde
	e	0.58	Azul
ZiRd	a, c, e	0.88, 0.63, 0.51	Morado
	b, d, f, g	0.66, 0.57, 0.36, 0.13	Azul
ZiRzm	a, b, c	0.66, 0.61, 0.53	Morado
ZiRza	a, b, c, d, e	0.88, 0.76, 0.65, 0.48, 0.33	Morado
ZiRznh	a, c, d, e	0.88, 0.61, 0.45, 0.38	Morado
	b, f, g	0.69, 0.34, 0.29	Gris

Tabla N° 22 (continuación).			
β -amirina (testigo)	a	0.714	Morado
Betulina (testigo)	a	0.595	Morado
(-) Resultado negativo.			

Los triterpenos son compuestos con un esqueleto carbonado y de estructura compleja ampliamente distribuidos en el reino vegetal, generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetonas o aldehídos y ácidos carboxílicos.^(13,26) Dentro de las técnicas cromatográficas en capa fina, un agente revelador de uso para la identificación de triterpenos es el reactivo de Komarowsky.⁽²⁶⁾ En diversas investigaciones, se ha estudiado sobre el mecanismo del reactivo Komarowsky (constituido por una mezcla de *p*-hidroxibenzaldehído 2% y ácido sulfúrico 50%) ya que, como evidencia positiva se observa la aparición de manchas de color azul, amarillo, rojo o rosadas,^(26,47) y a pesar que la reacción no es muy específica, se han postulado dos sugerencias del mecanismo de reacción:

1. Se presume que el ácido sulfúrico induce una deshidratación y da lugar a la formación de productos intermedios de tipo olefínico (productos con dobles enlaces), que posteriormente se condensan con el aldehído y generan las diversas coloraciones.^(93,123)
2. Así mismo, se sugiere un mecanismo de condensación que implica la formación de iones carbonio seguido de la condensación aldólica para formar productos coloreados.^(78,93)

En el estudio fitoquímico preliminar se ensayaron diversas fases móviles para determinar cuál de ellas era idónea en la prueba de cromatografía en capa fina para triterpenos y de acuerdo al comportamiento observado de las muestras se determinaron dos fases móviles:

- La fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1.5:0.5), para las fracciones orgánicas MsHnb, MsRnb, QrHnb, QrRnb, ZiHnb y para el extracto orgánico, MsFm.
- La fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (1:1), para las fracciones orgánicas MsHd, MsRd, QrHd, QrRd, ZiHd, ZiRd y para los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFm, MsFa, MsFnh, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh.

La cromatografía en capa fina demostró la ausencia de triterpenos en las fracciones orgánicas MsRnb y QrRnb. Mientras que en las fracciones orgánicas MsHd, MsHnb, MsRd, QrHd, QrHnb, QrRd, QrRnb, ZiHd, ZiHnb, ZiRd, y en los extractos orgánicos MsRzm, MsRza, MsRznh, MsFm, MsFa, MsFnh, QrRzm, QrRza, QrRznh, ZiRzm, ZiRza, ZiRznh, al ser reveladas se observaron manchas azules, rojas, moradas y verdes (Figura N° 58 y N° 59), se comprueba la presencia de triterpenos en los extractos mencionados últimamente.

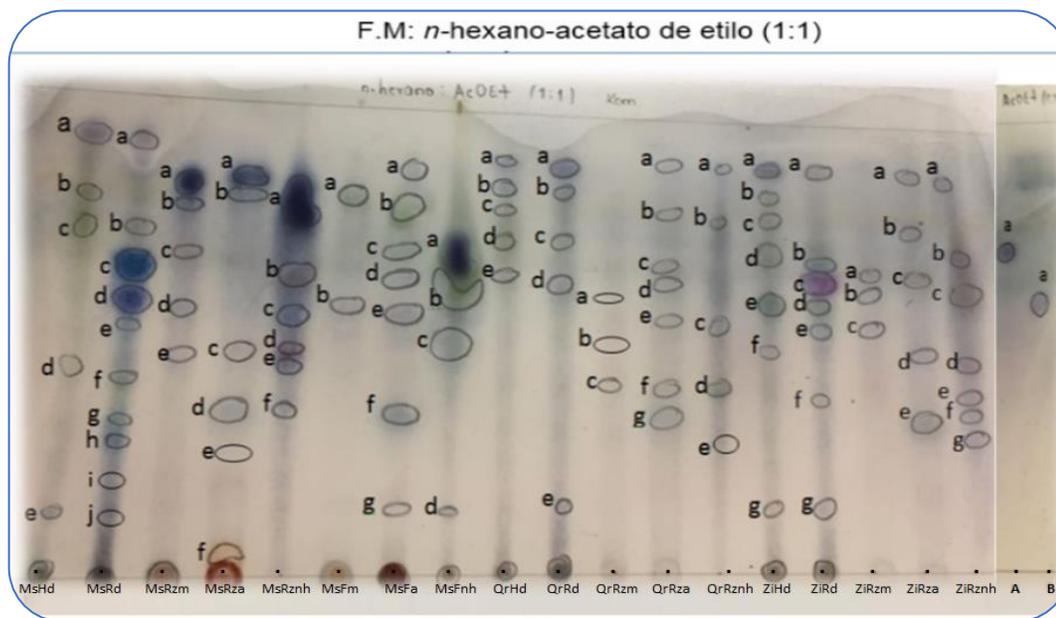


Figura N° 58. Resultados de la identificación de triterpenos en el cromatograma de capa fina utilizando Komarowsky.

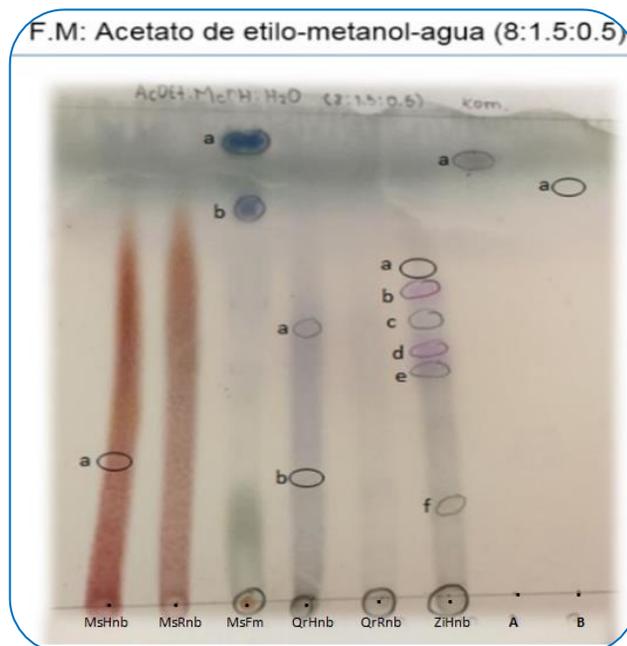


Figura N° 59. Resultados de la identificación de triterpenos en el cromatograma de capa fina utilizando Komarowsky.

Los triterpenos son metabolitos secundarios presentes en especies de Celastráceas; dentro de las investigaciones que comprueban su existencia en esta Familia botánica se encuentran los estudios realizados en el año 2012, uno de ellos por Osorio y *col.*⁽¹³⁵⁾ que permitió el aislamiento de diez compuestos triterpénicos pentacíclicos del extracto etanólico de tallos de *Cassine xylocarpa* y dos triterpenos pentacíclicos del extracto de hojas de *Maytenus jelskii*.

Así mismo, Ardiles y *col.*⁽⁵²⁾ estudian las raíces de *Celastrus vulcanicola* y aislaron trece triterpenos pentacíclicos del extracto *n*-hexano-éter dietílico, mientras que del extracto de *n*-hexano-éter dietílico de *Maytenus jelskii* identificaron veinticuatro triterpenos pentacíclicos. Un año después, Núñez y *col.* (2013), aislaron nueve triterpenos pentacíclicos del extracto *n*-hexano-éter dietílico de raíces de *Cassine xylocarpa* y *Celastrus vulcanicola*.⁽¹³¹⁾

Facundo y col. (2015), identifican nueve triterpenos en la especie *Maytenus guianensis*, siete de ellos en el extracto acetónico de tallos y dos del extracto etanólico de hojas.⁽⁸¹⁾ Poco tiempo después, Callies y col.⁽⁶¹⁾ determinan la presencia de un total de veintiséis triterpenos pentacíclicos, diez de ellos se aislaron del extracto etanólico de tallos de *Cassine xylocarpa*, mientras que dieciséis triterpenos del extracto de *n*-hexano-éter etílico de raíz de *Maytenus cuzcoina*. Uno de los más recientes estudios de elucidación reporta, seis triterpenos tetracíclicos y seis triterpenos pentacíclicos del extracto de *n*-hexano-éter etílico de raíces de *Celastrus vulcanicola*.⁽¹⁴¹⁾

Las investigaciones anteriormente citadas, respaldan la existencia de estos metabolitos en Celastráceas, razón por la cual, podemos justificar los resultados positivos presentados en las fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

5.12 Determinación de quinonas en los extractos de raíces.

Se menciona a continuación los resultados obtenidos en el fraccionamiento por columna Sephadex LH20, utilizando como ejemplo el extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima* (ZiRza), ya que al analizar los extractos orgánicos de raíces de *Maytenus segoviarum* y *Quetzalia reynae*, se obtuvieron los mismos resultados.

a. Fraccionamiento de extracto acetónico de raíz de *Zinowiewia integerrima* en columna Sephadex LH20.

La columna Sephadex se realizó con 60.0 mg del extracto acetónico seco de raíces de *Zinowiewia integerrima* (ZiRza), (Figura N° 60).

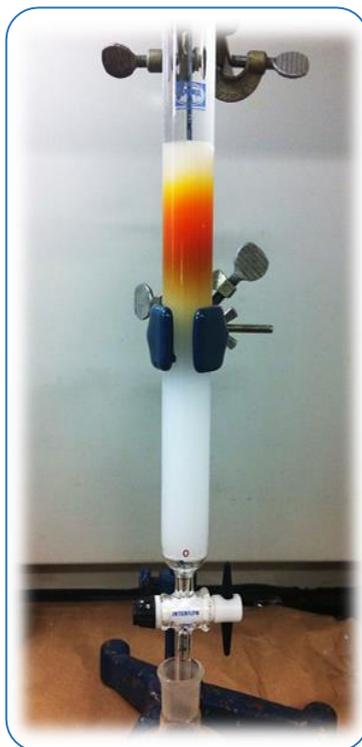


Figura N° 60. Fraccionamiento por columna Sephadex LH20 del extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima* (ZiRza).

En la estabilización de la columna, se utilizó un volumen de 94.74 mL de la fase móvil *n*-hexano-cloroformo-metanol en proporción 2:1:1, según el siguiente cálculo:

$$V = h \cdot \pi \cdot r^2$$

$$V = (19.3 \text{ cm}) (3.1416) (1.25 \text{ cm})^2$$

$$V = 94.74 \text{ cm}^3$$

La columna se eluyó con un volumen aproximado de 100 mL y se recolectaron un total de veintidós fracciones, cada una con un volumen aproximado de 2mL, el color observado en cada fracción orgánica se muestra en la tabla N° 23.

Tabla N° 23. Fracciones orgánicas obtenidas del extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima* (ZiRza), en la separación por columna Sephadex LH20.

Fracción	Color
1-5	Amarillo
6-15	Naranja
16-22	Naranja claro

Posterior a la obtención de fracciones orgánicas de cada extracto de raíces, se llevó a cabo la determinación de quinonas por cromatografía en capa fina.

b. Determinación de quinonas por cromatografía en capa fina.

Se utilizó la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3), como fase estacionaria POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄, reactivo revelador óleum y como testigos se utilizaron la pristimerina y la tingenona. La evidencia positiva para esta prueba son manchas de color amarillas,⁽¹⁵⁾ y naranjas al ser reveladas con óleum y posterior calentamiento se observan manchas moradas. Al realizar los primeros ensayos de cromatografía en capa fina, se reunieron las fracciones por la similitud que presentaban en la cromatoplaqa, para posteriormente ensayarlas en cromatografía de capa fina (Ver tabla N° 24). Los resultados de la cromatografía en capa fina y *R_f* obtenidos se muestran en la tabla N° 25.

Tabla N° 24. Fracciones orgánicas que se ensayaron en la determinación de quinonas del extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima*.

Fracciones orgánicas	Código
1-5	ZiRza1
6-9	ZiRza2
10-11	ZiRza3
12-15	ZiRza4
16-19	ZiRza5
20	ZiRza6
21	ZiRza7
22	ZiRza8

Tabla N° 25. Resultados obtenidos en la prueba de quinonas en las fracciones del extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima*.

Fracción	Resultado	Rf	Color		
			Luz visible	Reveladas	Calentamiento
ZiRza1	+	a. 0.64	Amarillo	Amarillo	Morado
		b. 0.53	Amarillo	Naranja	Morado
ZiRza2	+	0.58	Naranja	Naranja	Morado
ZiRza3	+	0.58	Naranja	Naranja	Morado
ZiRza4	+	0.59	Naranja	Naranja	Morado
ZiRza5	+	0.60	Amarillo	Naranja	Morado
ZiRza6	+	0.60	Amarillo	Naranja	Morado
ZiRza7	+	0.60	Amarillo	Naranja	Morado
ZiRza8	+	0.59	Amarillo	Naranja	Morado
Pristimerina (testigo)	+	0.59	Naranja	Naranja	Morado
Tingenona (testigo)	+	0.44	Naranja	Naranja	Morado

Las quinonas son compuestos fenólicos que se encuentran frecuentemente en la corteza y raíz de especies vegetales, son coloreados y pueden ser detectadas a luz visible, a luz ultravioleta o al utilizar reactivos cromogénicos,⁽²⁶⁾ un agente revelador de uso para la identificación de estos metabolitos es el reactivo óleum. En diversas investigaciones, se ha estudiado sobre el mecanismo del reactivo óleum, constituido por una mezcla de ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico concentrado,⁽¹¹⁶⁾ sin embargo, la reacción no es muy específica, pero se presume que con este revelador químico se hacen visibles aquellas manchas que no se detectan a la luz ultravioleta (UV), así mismo, las que no son coloreadas.^(38,114)

En el ensayo fitoquímico preliminar, la cromatografía en capa fina demostró la presencia de quinonas en las fracciones orgánicas ZiRza1, ZiRza2, ZiRza3, ZiRza4, ZiRza5, ZiRza6, ZiRza7 y ZiRza8 del extracto acetónico de raíces de *Zinowiewia integerrima*. Posterior a la elución de las placas con la fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (7:3), se observaron manchas de color amarillo a luz

visible (Figura N° 61), así mismo, la placa se reveló a luz ultravioleta en longitud de onda de 254 nm (Figura N° 62).

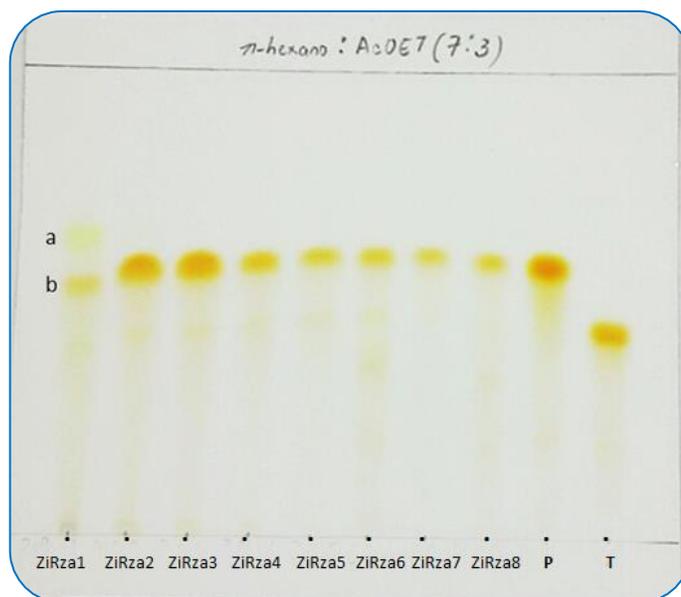


Figura N° 61. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina a luz visible.

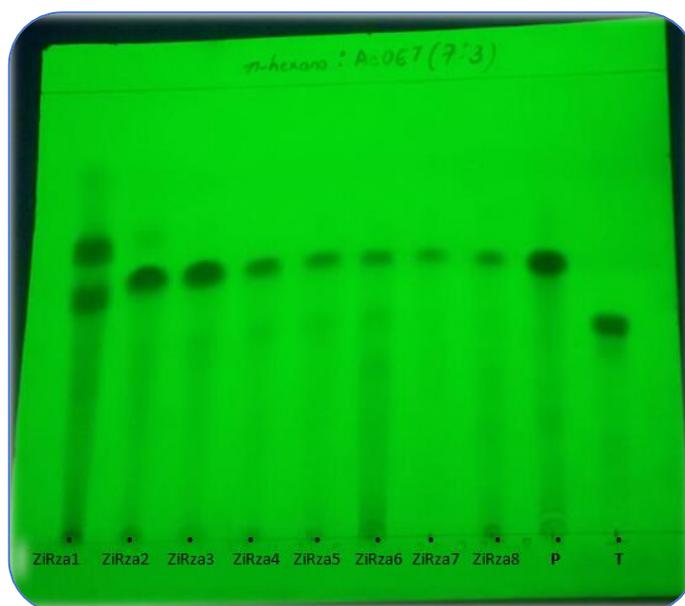


Figura N° 62. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina a luz ultravioleta en longitud de onda 254 nm.

La cromatoplaqa se roció con el reactivo óleum y las manchas se revelaron de color naranja (Figura N° 63) y posterior calentamiento, las manchas se tornaron a color morado.

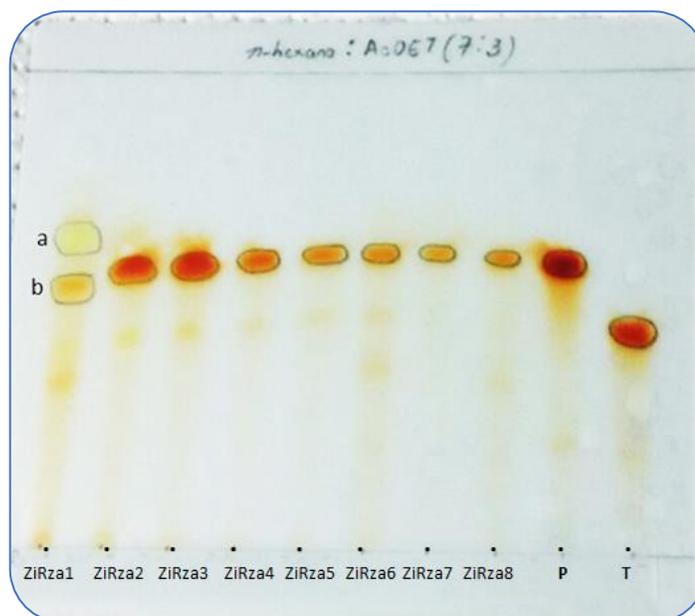


Figura N° 63. Resultados de la prueba de quinonas en el cromatograma de capa fina utilizando el reactivo revelador de óleum.

Las quinonas se encuentran fusionadas con triterpenos a través de un sistema metilenquinónico y que, en el caso particular de aislarse de Celastráceas, son llamados celastroloides y se encuentran en principalmente en las raíces.⁽¹⁴²⁾ Las investigaciones respaldan la presencia de quinonas en ciertas especies de la Familia Celastraceae y la abundancia de estos compuestos depende de cada especie, usualmente la tingenona y la pristimerina son los principales metabolitos secundarios quinónicos presentes en las raíces de esta Familia,^(116,142) por lo que se justifica el resultado positivo al realizar la prueba de quinonas en las fracciones orgánicas del extracto acetónico de las raíces de *Zinowiewia integerrima* y los resultados se confirman con los R_f calculados de cada una de las manchas reveladas, ya que presentan una cercanía al R_f de la

pristimerina y por lo tanto, se presume que este metabolito secundario se encuentra presente en las raíces de esta especie vegetal.

Así mismo, al analizar los resultados obtenidos en los cromatogramas de los extractos orgánicos de raíces de *Maytenus segoviarum* y *Quetzalia reynae*, se determinó la presencia de compuestos quinónicos como la pristimerina y tingenona.

5.13 Resumen de los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar.

Durante el desarrollo del tamizaje fitoquímico preliminar de fracciones y extractos orgánicos de las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, se evidenció la presencia de glicósidos saponínicos, flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, triterpenos y quinonas. Y ausencia de glicósidos cardiotónicos, glicósidos antraquinónicos, sesquiterpenlactonas y cumarinas. A continuación, se presenta el cuadro resumen de los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar (Ver tabla N° 26).

Tabla N° 26. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar.

Metabolitos secundarios	Especies vegetales									
	<i>Maytenus segoviarum</i>				<i>Quetzalia reynae</i>			<i>Zinowiewia integerrima</i>		
	Hojas	Ramas	Raíces	Frutos	Hojas	Ramas	Raíces	Hojas	Ramas	Raíces
Glicósidos saponínicos	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Glicósidos antraquinónicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroles	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quinonas	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La investigación bibliográfica indicó que hasta la fecha hay un total de diez géneros y dieciocho especies de Celastráceas en El Salvador, distribuidas principalmente en los Departamentos de Santa Ana, Ahuachapán, Morazán, Cuscatlán, Cabañas y La Unión.
2. Por medio de pruebas cualitativas se determinó la presencia de glicósidos saponínicos de tipo triterpénico en las raíces de *Quetzalia reynae*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum* y *Zinowiewia integerrima*.
3. La prueba de Shinoda y de cromatografía en capa fina con vainillina 5%-HCl con. (4:1), confirmó la existencia de flavonoides en hojas, ramas, raíces y frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Quetzalia reynae*, hojas y raíces de *Zinowiewia integerrima*.
4. En el análisis fitoquímico preliminar, los reactivos de precipitación (gelatina y clorhidrato de quinina) y el reactivo de coloración (triclورو de hierro), confirmó la presencia de taninos en frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.
5. La cromatografía en capa fina con reactivo revelador de Dragendorff, reveló la existencia de alcaloides de alta y mediana polaridad en raíces de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Quetzalia reynae*, hojas y raíces de *Zinowiewia integerrima*.
6. Empleando el reactivo revelador de Liebermann-Burchard, se confirmó la presencia de compuestos esteroidales en frutos de *Maytenus segoviarum*,

hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

7. Utilizando el reactivo revelador de Komarowsky, se determinó la existencia de compuestos triterpénicos en frutos de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.
8. Se demostró la presencia de quinonas en las fracciones de los extractos orgánicos de raíces de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, así mismo, según los R_f calculados se presume que la pristimerina y tingenona son metabolitos secundarios quinónicos que se encuentran presentes en estas especies vegetales.
9. El análisis fitoquímico preliminar indicó la presencia de glicósidos saponínicos, flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, triterpenos y quinonas en las fracciones y extractos orgánicos ensayados. Así mismo, se determinó la ausencia de glicósidos cardiotónicos, cumarinas, sesquiterpenlactonas y glicósidos antraquinónicos en las especies *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.
10. Se llevó a cabo el primer análisis fitoquímico preliminar de frutos y raíces de *Maytenus segoviarum*, hojas, ramas y raíces de *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Completar el estudio fitoquímico preliminar de los frutos de *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, ya que estos no se encuentran en estado de maduración en los meses de marzo a mayo.
2. Continuar con el estudio fitoquímico preliminar de otras especies de Celastráceas pertenecientes a la flora Salvadoreña, debido a su amplia distribución botánica, naturaleza química y fundamentalmente por las actividades farmacológicas que hasta la fecha se han reportado.
3. Realizar estudios de aislamiento y elucidación estructural de los diferentes metabolitos secundarios presentes *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, ya que son especies prometedoras como fuentes de moléculas bioactivas.
4. Realizar ensayos de actividades biológicas a las fracciones y extractos orgánicos obtenidos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*, tomando en consideración los antecedentes farmacológicos de la Familia Celastraceae.
5. Conservar y preservar las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae debido a su importancia y a su amplia distribución a nivel nacional, regional y mundial.
6. Verificar periódicamente las bases de datos oficiales de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador y mantener actualizada la información sobre nuevos géneros y nuevas especies de esta Familia botánica.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, J., Desmarchelier, C. (2007). *Maytenus ilicifolia* Martius (Congorosa). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6 (1),11-22.
2. Arce, L. A. (2011). Flora de Costa Rica I. Guía Práctica. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia EUNED.
3. Arias, E. (1994). Contribución al conocimiento de la composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
4. Bencsik, T., Ács, K., Farkas, A., Molnár, P., Papp, N., Horváth, G. (2015). Pharmacobotanical and phytochemical investigations of herbal drugs, teaching supplement. Project: Coordinated, practice-oriented, student friendly modernization of biomedical education in three Hungarian universities (Pécs, Debrecen, Szeged), with focus on the strengthening of international competitiveness, University of Pécs: Hungría.
5. Berendsohn, W., Gruber, A., Monterrosa, J. (2009). Nova Silva Cuscatlanica. Árboles Nativos e Introducidos de El Salvador. Berlín, Antigua Cuscatlán, El Salvador: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem.
6. Blanco, O., Lugones, Y., Gil, D., Faure, R., González, Y. (2009). Elastasa de neutrófilos humana y surfactante pulmonar en el síndrome de distrés respiratorio agudo. Biotecnología aplicada, 26, 281-286.

7. Bruneton, J. (1993). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. (2ª. Ed.) Zaragoza, España.
8. Canales, F., Alvarado, E., Pineda, Elia. (2012). Metodología de la investigación, manual para el desarrollo de personal de salud. México: Limusa.
9. Chávez, M.H. (2010). Estudio Fitoquímico de los Frutos de *Maytenus chiapensis* (Celastraceae). Tesis de Química. Universidad de El Salvador.
10. Cobar, O.M. (2009). Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la parte aérea de cuatro especies de plantas Guatemaltecas pertenecientes a la Familia Celastraceae y la evaluación de su actividad antifúngica, antimicrobiana y citotóxica. Informe del Proyecto FODECYT No. 110-2016.
11. Couttolenc, E., Cruz, J., Cedillo, E., Musálem, M. (2005). Uso local y potencial de las especies arbóreas en camarón de Tejeda, Veracruz. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 11(1), 45-50.
12. Davidse, G. (1995, última versión 2014). Flora Mesoamericana. México, DD.: Universidad Nacional Autónoma de México. 2(3), 1-71.
13. Domínguez, X.A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa.
14. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 32- NF 27. (2009). Twinbrook Parkway, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.

15. Galarraga, E. (2011). Estudio Fitoquímico de las Especies: *Phytolacca rugosa* (Phytolaccaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae), *Cestrum ruizteranianum* (Solanaceae) y *Ganophyllum giganteum* (Sapindaceae). Tesis doctoral: Universidad de los Andes
16. García, J. (1969). Estudio del *Rhamnus goudotiana*. Tesis de Química, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
17. Garnica, C.T. (2008). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y el tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica del extracto etanólico de las hojas de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) Familia Celastraceae. Guatemala: Tesis de licenciatura en Química, Universidad de San Carlos de Guatemala.
18. Greeff, K. (1981). Cardiac Glycosides: Part I: Experimental Pharmacology. New York: Springer.
19. Herbario del Jardín Botánico La Laguna (LAGU). (2017). Familia Celastraceae. San Salvador, El Salvador.
20. Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES). (2017). Familia Celastraceae. San Salvador, El Salvador.
21. Hinojosa J., Gutiérrez, M., Siller, F., Rodríguez, A., Morales, A., Guerrero, P., Del Toro, C. (2012). Phytochemical screening and antiinflammatory capacity of leaves from *Tithonia tubaeformis*. Ciencias Biológicas y de la Salud, 15(2), 53-60.

22. Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Memoria De Actividades. (2014). Universidad de La Laguna, España.
23. Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. (2013). Farmacología Básica y Clínica. (12ª. Ed.) México. D.F.
24. Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: Barcelona: Omega
25. Levy, S., Aguirre, J., Martínez, M., Durán, A. (2002). Caracterización del uso tradicional de la flora espontánea en la comunidad Lacandona de Lacanhá, Chiapas, México. *Interciencia*, 27, 512-520.
26. Lock, O. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. (2ª. Ed.) Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
27. Lundell, C. L. (1939). Revision of the American Celastraceae I. *Wimmeria*, *Microtropis* and *Zinowiewia*. The University Of Michigan Herbarium, No 3.
28. Makkar, H., Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). Plant Secondary Metabolites. Totowa, New Jersey: Humana Press.
29. Martínez, A., Csáky, A. (2001). Técnicas experimentales en síntesis de orgánica. España: Síntesis.
30. Martínez, M.L. (2007). Estudio de los metabolitos secundarios aislados de *Maytenus segoviarum* y *Cassine xylocarpa*. Tesis de Maestría, Universidad de El Salvador.

31. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) de El Salvador, P. d. (2010). IV Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica, El Salvador. El Salvador.
32. Núñez, M., Martínez, M.L., Toledo, R., Santamaría, A., Guardado, U. (2017). Manual de Farmacognosia, Ciclo I/2017. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. El Salvador.
33. Onslow, M.W. (1920). Practical Plant Biochemistry. London: Cambridge University Press.
34. Otles, S. (2005). Methods of Analysis of Food Components and Additives. New York: CRC PressTaylor & Francis Group.
35. Pérez, C.P. (2007). *Maytenus cuzcoina*, fuente de metabolitos secundarios bioactivos. Estudios de relación estructura-actividad. Tesis Doctoral, Universidad de la Laguna, España.
36. Pomilio, A.B. (1971). Estudio de antocianinas presentes en flores de especies Argentinas. Tesis de Doctorado en Química, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
37. Ramírez, S.M., Cardona, L.G. (2015). Evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de *Alvaradoa amorphoides* liebm. (Plumajillo). Tesis de licenciatura en Química, Universidad de El Salvador.
38. Rendón, S.I., Torres, L.N. (2012). Determinación de la actividad antimicótica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna

procedentes del extracto diclorometánico de la gomaresina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). Tesis de licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.

39. Rodríguez, F.M. (2000). Estudio fitoquímico de especies de la Familia Celastraceae (flora Panameña): *Maytenus blepharodes* y *Crossopetalum lobatum*. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, España.
40. Rodríguez, N. (2010). Metabolitos secundarios aislados de *Maytenus jelskii* (Celastraceae). Estudios de relación estructura-actividad. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, España.
41. Sánchez, J.P. (2014). Cuantificación de sesquiterpenlactonas totales procedentes del extracto clorofórmico de hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama) recolectadas en el periodo correspondiente de julio a diciembre de 2012. Tesis de licenciatura en Química, Universidad de El Salvador.
42. Sharapin Nicolai. (2000). Fundamento de tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia.
43. Spiegel, M.R., Liu, J., Abellanas, L. (2000). Fórmulas y tablas de matemática aplicada. (2ª. ed). Madrid, España: McGraw-Hill.
44. Stevens, W. (2001). Flora de Nicaragua, Introducción Gimnospermas y Angiospermas. Missouri Botanical Garden Press, 85.

45. Talapatra, S.K., Talapatra, B. (2015). Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine. New York: Springer.
46. Torres, D. (2008). Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Celastrus vulcanicola* y *Cassine xylocarpa* (Celastraceae). Tesis: Doctoral, Universidad de La Laguna, España.
47. Waksmundzka, M., Sherma, J., Kowalska, T. (2008). Thin layer chromatography in phytochemistry, chromatographic science series (Vol.99). Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group.
48. Willow, J.H. (2011). Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies. Hoboken: Wiley.
49. Acree, F.Jr., Haller, H.L. (1950). Wilfordine, an Insecticidal Alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook. Journal of The American Chemical Society, 72(4), 1608-1611. Doi: 10.1021/ja01160a050
50. Ahmad, V.U., Bano, S. (1981). Chemical examination of *Nepeta hindostana* (roth) haines the structure of nepeticin. Tetrahedron Letters, 22(8), 1714-1718. Doi: 10.1016/S0040-4039(01)90420-4
51. Alajmi, M., Alam, P. (2013). HPLC finger print and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of different *Maytenus* species grown in Kingdom of Saudi Arabia. Asian Pacific Journal Tropical Disease, 3(5), 341-347. Doi: 10.1016/S2222-1808(13)60082-1

52. Ardiles, A.E., González, Á., Núñez, M.J., Perestelo, N.R., Pardo, V., Jiménez, I.A.,...Bazzocchi, I.L. (2012). Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 diabetes mellitus. *Phytochemistry*, 84, 116-124. Doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.025
53. Atkinson, E., Hazleton, E.O. (1992). A Qualitative Tannin Test. *Biochemical Journal*, 16(4), 516-517. Doi: 10.1042/bj0160516
54. Beierbeck, H., Saunders, J.K. (1975). β -Carbon Shielding Effects in Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, 53(9), 1307-1313. Doi: 10.1139/v75-179
55. Bohlmann, F., Jakupovic, J. (1979). Neue sesquiterpene, triterpene, flavanone und andere aromatische verbindungen aus *Flourensia heterolepis*. *Phytochemistry*, 18(7), 1189-1194. Doi: 10.1016/0031-9422(79)80132-6
56. Brandt, C, W., Neubauer, L, G. Miro. (1939). 221 Resin. Part I. Feuruginol. *Journal of the Chemical Society*, 1031-1037. Doi: 10.1039/JR9390001031
57. Brieskon, C.H., Fuchs, A., Bredenberg, J.B., McChesney, J.D., Wenkert, E. (1964). The Structure of Carnosol. *The Journal of Organic Chemistry*, 29 (8), 2293–2298. Doi:10.1021/jo01031a044
58. Brüning, R., Wagner, H. (1978). Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: Chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. *Phytochemistry*, 17, 1821-1858. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)88719-1

59. Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A., Menis, O, (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(7), 794-801. Disponible en: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/20/7/794.full.pdf>
60. Butler, M.S., Towerzey, L., Pham, N.B., Hyde, E., a, Wadi, S.K., Guymer, G.P., Quinn, R.J. (2014). Cardenolide Glycosides from *Elaeodendron australe* var. *integrifolium*. *Phytochemistry*, 98, 106-1063. Doi: 10.1016/j.phytochem.2013.11.024
61. Callies, O., Bedoya, L., Beltrán, M., Muñoz, A., Obregón, P., Osorio, A.,...Bazzocchi, I.L. (2015). Isolation, Structural Modification, and HIV Inhibition of Pentacyclic Lupane-Type Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Maytenus cuzcoina*. *Journal of Natural Products*, 78, 1045-1055. Doi: 10.1021/np501025r
62. Callies, O., Núñez, M.J., Perestelo, N.R., Reyes, C.P., Torres, D., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L. (2017). Distinct sesquiterpene pyridine alkaloids from in Salvadoran and Peruvian Celastraceae species. *Phytochemistry*, 142, 21-29. Doi: 10.1016/j.phytochem.2017.06.013
63. Callies, O., Sánchez, M., Gamarro, F., Jiménez, I., Castanys, S., Bazzocchi, I.L. (2015). Restoration of Chemosensitivity in P-Glycoprotein-Dependent Multidrug-Resistant Cells by Dihydro- β -agarofuran Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola*. *Journal of Natural Products*, 78, 736-745. Doi: 10.1021/np500903a
64. Carvalho, C., Gregóri, V., Oliveira, A., Costa, C., Ferreira, L., Pains, L.,...Castro, A. (2014). Antinociceptive effects of *Maytenus imbricata* Mart.

ex. Reissek (Celastraceae) root extract and its tingenone constituent. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8 (1), 68-76. Doi: 10.5897/JMPR 2013.5085

65. Chen, I., Du, Y., Hwang, T., Chen, I., Lan, Y., Yen, H.,... Wu, Y. (2014). Anti-Inflammatory Triterpenoids from the Stems of *Microtropis fokienensis*. *Molecules*, 19 (4), 4608-4623. Doi: 10.3390/molecules19044608
66. Chen, I., Du, Y., Lu, M., Lin, A., Hsien, P., Wu, C.,...Wu, Y. (2008). Lupane-Type Triterpenoids from *Microtropis fokienensis* and *Perrottetia arisanensis* and the Apoptotic Effect of 28-Hydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al. *Journal of Natural Products*, 71, 1352–1357. Doi: 10.1021/np800093a
67. Chen, J., Kuo, W., Chen, I., Peng, C., Sung, P., Cheng, M., Lim, Y. (2014). Microjaponin, A New Dihydroagarofuranoid Sesquiterpene from the Stem of *Microtropis japonica* with Antituberculosis Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 11(8), 1241-1246. Doi: 10.1002/cbdv.201400066
68. Cheng, C., Liu, J., Wu, D. (1992). Forrestine, an alkaloid from *Tripterygium forrestii*. *Phytochemistry*, 31(12), 4391-4392. Doi: 10.1016/0031-9422(92)80491-V
69. Chou, T., Chen, I., Peng, C., Sung, P., Chen, J. (2008). A New Dihydroagarofuranoid Sesquiterpene and Antituberculosis Constituents from the Root of *Microtropis japonica*. *Chemistry & Biodiversity*, 5 (7),1412-1418. Doi: 10.1002/cbdv.200890129

70. Cole, B.J.W., Bentley, M.D., Hua, Y. (1991). Triterpenoid Extractives in the Outer Bark of *Betula lenta* (Black Birch). *Holzforschung*, 45(4), 265-268. Doi: 10.1515/hfsg.1991.45.4.265
71. Cortés, F., Jiménez, I., Martínez, F., Campillo, M., Bazzocchi, I., Pardo, L.,...Gamarro, F. (2005). Dihidro- β -Agarofuran Sesquiterpenes: A New Class of Reversal Agents of the Multidrug Resistance Phenotype Mediated by P-Glycoprotein in the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 1-15. Doi: 10.2174/1381612054864920
72. Da Silva, M., Sousa, D., Medeiros, V., Folly, M., Tavares J.F., Barbosa, J.M. (2008). Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(5-6), 500-503. Doi: 10.1016/j.bse.2008.01.006
73. Dantanarayana, A.P., Kumar, N.S., Sultanbawa, M.U., Balasubramaniam, S. (1981). Structures of four new oxygenated lupanes from *Pleurostyliia opposita* (Celastraceae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2717-2723. Doi: 10.1039/P19810002717
74. Diccionario médico. (11 de Abril de 2017). España. Barcelona. Disponible en: <http://www.diccionariomedico.net/>
75. Diccionario médico. Doctissimo. (11 de Abril de 2017). Disponible en: <http://www.doctissimo.com/es/salud/diccionario-medico/>
76. Directrices de la Organización mundial de la Salud (OMS) Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de Plantas Medicinales. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js55277s/5.4.html>.

77. Du, Y., Lin, A., Wu, C., Hsieh, P., Chen, Y., Chen, I.,...Wu, Y. (2009). New Cytotoxic Lupane Triterpenes from *Perrottetia arisanensis*. *Planta Medica*, 75, 848–855. Doi: 10.1055/s-0029-1185438
78. Duke, F.R. (1947). Komarowski Reaction. *Analytical Chemistry*, 19(9), 661-662. Doi: 10.1021/ac60009a015
79. Eisman, M., Gallego, M., Valcárcel, M. (1993). Indirect Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Papaverine, Strychnine and Cocaine by Continuous Precipitation With Dragendorff's Reagent. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8, 1117-1120. Doi: 10.1039/JA9930801117
80. Estevam, C.S., Cavalcanti, A.M., Cambui, E.V., Araújo, V., Leopoldo, P., Fernandes, R.P., Sant'Ana, A.E. (2009). Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B), 299-303. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n1b/a20v191b.pdf>
81. Facundo, V.A., De Oliveira, D.U., Linhares, J.S., Lima, R.A., Hurtado, F.B., Casseb, A.A.,...Lacerda, V.Jr. (2015). Chemical constituents from *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae) Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58, 270-273. Doi: 10.1016/j.bse. 2014.11.010
82. Fajardo, A., Arroyo, A., Ramírez, J. (2016). Extraction of total flavonoids of the outer peel of red onion (*Allium Cepa*). *UGCiencia*, 22, 119-126. Disponible en: <http://revistas.ugca.edu.co/files/journals/3/articles/599/submit/revision/review/599-2023-1-RV.docx>

83. Fear, C.M. (1929). The Alkaloid Test for Tannins. *Analyst*, 54,316-318. Doi: 10.1039/AN9295400316
84. Ferkaljuk, K. (17 de septiembre de 2017). Ludwig-Maximilians-Universität München Herzglykoside. Disponible en: <http://www.pharmbiol.cup.uni-muenchen.de/download/pbiii/herzglykoside.pdf>
85. Ferreira, F.L., Rodrigues, V.G., Silva, F.C., Matildes, B.L., Takahashi, J.A., Silva, G.D.,...Filho, S.A. (2017). *Maytenus distichophylla* and *Salacia crassifolia*: source of products with potential acetylcholinesterase inhibition. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 471-474. Doi: 10.1016/j.bjp.2016.12.006
86. Fonseca, A.P., Silva, G.D., Carvalho, J.J., Salazar, G.C., Duarte, L.P, Silva, R.P., Filho, S.A. (2007). Phytochemical study of the decoct from the leaves of *Maytenus truncata* Reissek and the evaluation of the antinociceptive, antiedematogenic and antiulcerogenic activities of the decoct extracts. *Química Nova*, 30(4),842-847. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf /qn/v30n4/a16v30n4.pdf>
87. Font. M. (11 de Abril de 2017). Espectrometría de masas MS. Universidad de Navarra. Disponible en: http://www.unav.es/ocw/farmaceutica1_f/Masas /Masas.pdf
88. Ganguly, A.K, Govindachari, T.R., Mohamed, P.A., Rahimtulla, A.D., Viswanathan, N. (1966). Chemical constituents of *Glochidion hohenackeri*. *Tetrahedron*, 22(4),1513-1519. Doi: 10.1016/S0040-4020(01)99451-7

89. Gómez, C. (2014). Diagnóstico de la infección por virus de Epstein Barr. AEPap. Disponible en: https://www.aepap.org/sites/default/files/diagnostico_de_mni_en_la_edad_pediitrica_final.pdf
90. González, A., Nufiez, M., Ravelo, A., Luis, G., Jiménez, I., Vázquez, J., Mufío, O. (1989). Sesquiterpene Esters from *Maytenus chubutensis*. Heterocycles, 29(12), 2287-2296. Doi: 10.3987/COM-89-5055
91. González, A.G., Fraga, B.M., González, P., Hernández, M.G., Ravelo, A.G. (1981). ¹³C NMR spectra of olean-18-ene derivatives. Phytochemistry 20(8), 1919-1921. Doi: 10.1016/0031-9422(81)84035-6
92. González, A.G., Jiménez, I.A., Ravelo, A.G., Bazzocchi, I.L. (1993). Minor sesquiterpenes from *Maytenus canariensis* with insecticidal and antifeedant activity. Tetrahedron, 49(30), 6637-6644. Doi: 10.1016/S0040-4020(01)81833-0
93. Graham, H.D. (1965). Quantitative Determination of Sugar Alcohols by the Komarowsky Reaction. Journal of Food Science, 30(5), 846-853. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1965.tb01852.x
94. Guo, Y., Li, X., Wang, J., Li, W., Sha, Y. (2003). A new sesquiterpene ester from the fruits of *Celastrus orbiculatus*. Journal of Asian Natural Products Research, 5(3), 205–208. Doi: 10.1080/1018602031000093401
95. Gutiérrez, J.E, Montaña, K., Bracho, J.C., Rodríguez, C., Chang, A. (2009). Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la maca (*Lepidium meyenii* walp.) Mediante técnicas cromatográficas. Revista de la

Sociedad Química del Perú, 75(2), 254-265. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n2/a13v75n2.pdf>

96. Hammel, B. (02 de Febrero de 2017). Draft Treatments for the Manual de Plantas de Costa Rica. Disponible en: http://www.inbio.ac.cr/papers/manual_plantas/1celastra.htm
97. Háuad, L.A., Pérez, A., Resendez, D., Moreno, C., Vásquez, S., López, D.L., Rodríguez, C.L. (2010). Determinación química y estudio terapéutico de *Agave tequilana* Weber. Revista Salud Pública y Nutrición, 5, 254-265. ISSN: 1870-0160
98. Hinojosa J., Gutiérrez, M., Siller, F., Rodríguez, A., Morales, A., Guerrero, P., Del Toro, C. (2012). Phytochemical screening and antiinflammatory capacity of leaves from *Tithonia tubaeformis*. Ciencias Biológicas y de la Salud, 15(2), 53-60. Disponible en: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/23Articulo%209%20Biotecnia%20XV%202.pdf>
99. Holnik, P.R., Hussein, A.A., Souza, B.M., Coldebella, P.F., Shimabuku, R.S., Leite, N.K. (2015). Comparison of the tannin doses between two species of thorn-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. and *Maytenus aquifolium* Mart. ex Reissek) grown in the medicinal garden of Bela Vista Biological Refuge - RBBV of Itaipu Binational - Foz do Iguacu, PR - Brazil. Revista Brasileira de Plantas Medicinaias 17(3), 385-391. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n3/1516-0572-rbpm-17-3-0385.pdf>
100. International Association for Plant Taxonomy IAPT. (26 de Abril de 2017). Chapter II. Status, typification, and priority of names. Section 2.

Typification. Article 9. Disponible en: <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art9>

101. Ishiwata, H., Shizuri, Y., Yamada, K. (1983). Three sesquiterpene alkaloids from *Euonymus alatus* forma *Striatus*. *Phytochemistry*, 22(12), 2839-2841. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)97709-4
102. Itokawa, H., Shirota, O., Morita, H., Takeya, K. (1992). Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia*. *Heterocycles*, 34(5), 885-889. Doi: 10.3987/COM-92-5988
103. Itokawa, H., Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Litakab, Y. (1993). Isolation, structural elucidation and conformational analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-Ray molecular structure of Ebenifoline W-I. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1247-1254. Doi: 10.1039/P19930001247
104. J. Stor Global Plants. Holotype of *Quetzalia reynae* Lundell (family Celastraceae). (04 de Febrero de 2017). Disponible en: <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.specimen.II00375644>
105. Jardín Botánico La Laguna, El Salvador. (27 de Agosto de 2017). Disponible en: <http://www.elsalvadormipais.com/jardin-botanico-la-laguna>
106. Jardín Botánico La Laguna, El Salvador. (27 de Agosto de 2017). Disponible en: <http://www.bgbm.org/lagu/Asociacion.htm>
107. Kim, S.E., Kim, Y.H., Lee, J.J., Kim, Y.C. (1998). A New Sesquiterpene Ester from *Celastrus orbiculatus* Reversing Multidrug Resistance in Cancer

Cells. Journal of Natural Products, 61(1), 108–111. Doi: 10.1021/np9702392

108. Kovar, K.A., Francas, G., Seidel, R. (1977). Zum Mechanismus der Reaktionen nach Raymond, Kedde und Baljet. Archiv der Pharmazie, 310(1), 40-47. Doi: 10.1002/ardp.19773100111
109. Kumar, N., Seshadri, T.R. (1975). Triterpenoids of *Pterocarpus santalinus*: Constitution of a new lupene diol. Phytochemistry, 14(2), 521-523. Doi: 10.1016/0031-9422(75)85121-1.
110. Kupchan, M., Uchida, I., Shimada, K., Fei, B.Y., Stevens, D.M., Sneden, A.T., Bryan, R.F. (1977). Elaeodendroside A: a Novel Cytotoxic Cardiac Glycoside from *Elaeodendron glaucum*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 0, 255-256. Doi: 10.1039/C39770000255
111. Kuroyanagi, M., Shiotsu, M., Ebihara, T., Kawai, H., Ueno, A., Fukushima, S. (1986). Chemical Studies on *Viburnum awabuki* K.KOCH. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 34(10), 4012-4017. Doi: 10.1248/cpb.34.4012
112. Leite, J.P., Rastrelli, L., Romussi, G., Oliveira, A.B., Vilegas, J.H., Vilegas, W., Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). Journal of agricultural and food chemistry, 49(8), 3796-3801. Doi: 10.1021/jf010294n
113. Liao, L. M., Vieira, P. C., Rodrigues, E.; Fernandes, J. B., Silva, M. F. (2001). Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Peritassa campestris*. Phytochemistry, 58(8), 1205-1207. Doi: 10.1016/S0031-9422(01)00315-

114. López, M., Trían, J., Pérez, F., Torres, M. (2005). Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. Universidad de Las Palmas de La Gran Canaria. Disponible en: <https://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/436/2/494.pdf.txt>
115. Martínez, M.L (2017, 31 de Marzo). Información sobre Celastráceas MUHNES. Correo electrónico enviado a: Flores, K.C.
116. Mena, G., Pérez, A.R., Moo, R.E., Cedillo, R., Bazzocchi, I.L., Jiménez, I.A., Quijano, L. (2007). Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, 70(5), 563-565. Doi: 10.1021/np060559y
117. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) de El Salvador. (27 de Agosto de 2017). Disponible en: <http://www.marn.gob.sv/parque-nacional-montecristo-2/>
118. Momtaz, S., Hussein, A., Ostad, S., Abdollahi, M., Lall N. (2013). Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 38-45.
119. Museo de Historia Natural de El Salvador, Secretaria de Cultura de la Presidencia de la Republica de El Salvador. (27 de Agosto de 2017). Disponible en: <http://www.cultura.gob.sv/museo-de-historia-natural-de-el-salvador/>
120. Ngassapa, O.D., Soejarto, D.D., Che, C.T., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.R., (1991). New Cytotoxic Lupane Lactones from *Kokoona ochracea*. *Journal of Natural Products*, 54(5), 1353-1359. Doi: 10.1021/np50077a019

121. Niero, R., Andrade, S., Cechinel, V. (2011). A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the *Maytenus* Genus. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 1-21. Doi: 10.2174/138161211796391029
122. Ning, R., Lei, Y., Liu, S., Wang, H., Zhang, R., Wang, W.,... Zhao, W. (2015). Natural β -dihydroagarofuran-type sesquiterpenoids as cognition-enhancing and neuroprotective agents from medicinal plants of the genus *Celastrus*. *Journal of Natural Products*, 78(9), 2175-2186. Doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00234
123. Nogare, S.D., Mitchell, J. (1953). Some Applications of Komarowsky Reaction. *Analytical Chemistry*, 25(9), 1376-1379. Doi: 10.1021/ac60081a021
124. Núñez, J.M., Kennedy, M., Jiménez, I., Bazzocchi, I.L. (2011). Uragogin and blepharodin, unprecedented hetero-Diels-Alder adducts from *Celastraceae* species. *Tetrahedron*, 67, 3030-3033. Doi: 10.1016/j.tet.2011.03.019
125. Núñez, M., López, M., Jiménez I., Moujir, L., Ravelo, A., Bazzocchi, I. (2004). First examples of tetracyclic triterpenoids with a D: B-friedobaccharane skeleton. A tentative biosynthetic route. *Tetrahedron Letters*, 45 (39), 7367–7370. Doi: 10.1016/j.tetlet.2004.07.133
126. Núñez, M.J., Cortés, F., Bazzocchi, I.L., Jiménez, I.A, González, A.G., Ravelo, A.G., Gavin, J.A. (2003). Absolute Configuration and Complete Assignment of ^{13}C NMR Data for New Sesquiterpenes from *Maytenus*

chiapensis. Journal of Natural Products, 66(4), 572-574. Doi: 10.1021/np0205248

127. Núñez, M.J., Guadaño, A., Jiménez, A., Ravelo, A., González, A., Bazzocchi, I.L. (2004). Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis*. Journal of Natural Products, 67,14-18. Doi: 10.1021/np030347q
128. Núñez, M.J., Jiménez, I., Mendoza, C, Chávez, M., Martínez, M.L., Ichiishi, E., Bazzocchi, I. (2016). Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae species as antitumour promoting agents: Structure activity relationship. European Journal of Medicinal Chemistry, 111, 95-102. Doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.049
129. Núñez, M.J., Reyes, C., Jiménez, A., Tokuda, H., Bazzocchi, I.L. (2011). *ent*-Rosane and abietane diterpenoids as cancer chemopreventive agents. Phytochemistry, 72 ,385–390. Doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.017
130. Núñez, M.J., Reyes, C., Jiménez, I.A., Mujir, L., Bazzocchi, I.L. (2005). Lupane Triterpenoids from Maytenus Species. Journal of Natural Products, 68, 1018-1021. Doi: 10.1021/np058016w
131. Núñez. M.J., Ardiles, A., Martínez, M., Torres, D., Jiménez, A., Bazzocchi, I.L. (2013). Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae). Phytochemistry Letters, 6, 148–151. Doi: 10.1016/j.phytol. 2012.12.003
132. Núñez. M.J., Ardiles, A., Martínez, M., Torres, D., Jiménez, A., Bazzocchi, I.L. (2012). Unusual D:B-friedobaccharane and oxygenated friedelane-type

triterpenoids from Salvadorean Celastraceae species. *Phytochemistry Letters*, 5, 244–248. Doi: 10.1016/j.phytol.2012.01.004

133. Organización Mundial de la Salud OMS. (11 de Abril 2017). El Cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
134. Ortega, F., Escaso, F. (11 de Abril de 2017). Diversidad Vegetal. UNED. Facultad de Ciencias. Disponible en: http://www.quned.es/mvg/archivos_publicos/qdocente_planes/281207/dveg1112t01introtxt.pdf
135. Osorio, A., Muñoz, A., Torres, D., Bedoya, L., Perestelo, N.,...Bazzocchi, I.L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF-kB and Sp1 dependent transcription. *European Journal of Medicinal Chemistry* 52, 295-303. Doi: 10.1016/j.ejmech. 2012.03.035
136. Osorio, A.A., López, M.R., Jiménez, I.A., Moujir, L.M., Rodríguez, M.L., Bazzocchi, I.L. (2014). *Elaeodendron orientale* as a source of cytotoxic cardenolides. *Phytochemistry*, 105, 60-67. Doi: 10.1016/j.phytochem. 2014.06.009
137. Pérez, J. (11 de Abril de 2017). Guías de Práctica Clínica sobre manejo de Dispepsia. Disponible en: http://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/documentogrupo/dispepsia_0.pdf
138. Plantas y Hongos. (26 de Abril de 2017). Glosario, Sámara. Disponible en: <http://www.plantasyhongos.es/glosario/samara.htm>

139. Pressuto, M.B., Costa, I.C., Souza, A.B., Nicoli, F.M., Mello, J.C., Petereit, F., Luftmann, H. (2009). Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Química Nova, 32(2), 412-416. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n2/v32n2a27.pdf>
140. Psychology Dictionary. (26 de Abril de 2017). Antinociceptive effect. Disponible en: <http://psychologydictionary.org/antinociceptive/>
141. Purino, A., Ardiles, A., Callies, O., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L. (2016). Montecrinanes A–C: Triterpenes with an Unprecedented Rearranged Tetracyclic Skeleton from *Celastrus vulcanicola*. Insights into Triterpenoid Biosynthesis Based on DFT Calculations. Chemistry A European Journal, 22, 7582-7591. Doi: 10.1002/chem.201600294
142. Ravelo, A.G., Estévez, A., Chávez, H., Pérez, E., Mesa, D. (2004). Recent Studies on Natural Products as Anticancer Agents. Current Topics in Medicinal Chemistry, 4(2), 241-265. Doi: 10.2174/1568026043451500
143. Repetto, M., Sanz, P. (10 de Abril de 2017). Glosario de términos Toxicológicos IUPAC. Asociación Española de Toxicología, España. Disponible en: <http://buscatox.com/05pub/Glosario%20terminos%20toxicologicos%20toxicologia%20Repetto.pdf>
144. Reyes, C.P, Núñez, M.J., Jiménez, I.A., Busserolles, J., Alcaraz, M.J., L., Bazzocchi, I.L. (2006). Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14, 1573–1579. Doi: 10.1016/j.bmc.2005.10.063

145. Reyes, C.P., Muñoz, F., Torrecillas, I.R., Mendoza, C.R., Gamarro, F., Bazzocchi, I.L.,...Jiménez, I.A. (2007). Biological evaluation, structure-activity relationships, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies of dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes as modulators of P-glycoprotein-dependent multidrug resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(20), 4808-4817. Doi: 10.1021/jm070290v
146. Robin, R. Z. (26 de Enero de 2017). Documentos de la FAO. Los árboles medicinales en los trópicos. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/q1460s/q1460s02.htm>
147. Rodríguez, B. (12 de Abril de 2017). Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear RMN. Universidad Autónoma de México. Disponible en: <http://www.iquimica.unam.mx/labserv/lab-cert?id=177>
148. Rojas, L.C., Uribe, Y.H., Martínez, N.S., Niño, D.R. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de "Cupatá" (*Strychnos schultesiana* krukof). *Revista Colombia Forestal*, 12, 161-170. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a11.pdf>
149. Rózsa, Z., Pelczer, I. (1989). New Sesquiterpene Esters from *Euonymus europaeus* and *E. latifolius*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 6, 1089-1095. Doi: 10.1039/P19890001089
150. Rózsa, Z., Perjési, A., Pelczer, I., Argay, G., Kálmán, A. (1989). New sesquiterpene esters and alkaloids from *Euonymus japonicus*: the 'Ejap' series. X-Ray molecular structures of Ejap-2, -3, -4, -5, -6, and -10. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 6, 1079-1087. Doi: 10.1039/P19890001079

151. Sánchez, A., Cárdenas, J., Rodríguez, L. (1987). Sesquiterpenes from *Celastrus pringlei*. *Phytochemistry*, 26(9), 2631-2632.
152. Sannomiya, M., Vilegas, W., Rastrelli, L., Pizza, C. (1998). A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry*, 49(1), 237-239. Doi: 10.1016/S0031-9422(97)00842-X
153. Sekar, K.V., Sneden, A.T., Flores, F.A. (1995). Mayteine and 6-benzoyl-6-deacetylmayteine from *Maytenus krukovii*. *Planta Medica*, 61(4), 390.
154. Shimada, K., Kyuno, T., Nambara, T., Uchida I. (1982). Isolation and characterization of cardiac steroids from seeds of *Elaeopendron glaucum* Pers. Structures of elaeodendrosides A, D, E, H, I, J and elaeodendrogenin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 30(11), 4075-4081. Doi: 10.1248/cpb.30.4075
155. Si, C.L., Lu, Y.Y., Qin, P.P., Ni, Y.H., Sun, R.C. (2011). Phenolic extractives with chemotaxonomic significance from the bark of *Paulownia tomentosa* var. *Tomentosa*. *Bioresources*, 6(4), 5086-5098. Disponible en: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/download/BioRes_06_4_5086_Si_LSN_Phenolic_Extractives_Paulownia/1262
156. Simmons, M., McKenna, M., Bacon, C., Yakobson, K., Cappa, J., Archer, R., Ford, A. (2012). Phylogeny of Celastraceae tribe *Euonymiae* inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 9–20.
157. Sousa, G., Aguilar, M., Takahashi, J., Alves, T., Kohlhoff, M., Vieira, S.,...Duarte, L., (2017). Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus*

robusta with acetylcholinesterase inhibition. *Phytochemistry Letters*, 19,34-38. Doi: 10.1016/j.phytol.2016.10.024

158. Souza, L.L., Cipriani, T.R., Iacomini, M., Gorin, P.A., Sasaki, G.L. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 59-67. Doi: 10.1016/j.jpba.2007.12.008
159. Sugiura, K., Yamada, K., Hirata, Y. (1973). The structures of evonimine and euonine, two minor alkaloids obtained from *Euonymus sieboldiana* blume. *Tetrahedron Letters*, 14(2), 113-116. Doi: 10.1016/S0040-4039(01)95591-1
160. Takaishi, Y., Aihara, F., Tamai, S., Nakano, K., Tomimatsu, T. (1992). Sesquiterpene esters from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, 31(11), 3943-3947. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)97559-9
161. Takaishi, Y., Noguchi, H., Murakami, K., Nakano, K., Tomimatsu, T. (1990). Sesquiterpene esters, triptogelin A-1-A-4, from *Tripterygium wilfordii* var. *Regelii*. *Phytochemistry*, 29(12), 3869-3873. Doi: 10.1016/0031-9422(90)85349-K
162. Torres, D., Jiménez, I.A., Rojas, R., Gilman, R., López, M., Bazzocchi, I.L. (2011). Dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes isolated from *Celastrus vulcanicola* as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* multidrug-resistant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 2182–2189. Doi: 10.1016/j.bmc.2011.02.034

163. Torres, D., King, B., Jiménez, I.A., Lotina, B., Bazzocchi, I.L. (2011). Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as Photosynthetic Inhibitors. *Journal of Natural Products*, 71, 1331-1335. Doi: 10.1021/np070647y
164. Tropicos® Celastraceae. (25 Octubre de 2017). Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/42000222?projectid=3>
165. Tropicos®. Standley, P.C. (29 de Enero de 2017). Disponible en: <http://www.tropicos.org/specimen/3330892>
166. Ullah, N., Ahmed, Z., Ahmed, S., Muhammad, P., Malik, A. (1999). A pentacyclic triterpene from *Daphne oleoides*. *Phytochemistry*, 50(5), 839-841. Doi: 10.1016/S0031-9422(98)00600-1
167. Ulloa, C., Jorgensen, P. (1994). A New Species of *Zinowiewia* (Celastraceae) and Notes on the Genus in Ecuador. *Missouri Botanical Garden*, 4 (2), 183-186. Doi: 10.2307/3391593
168. Vonka, C.A., Chifa, C. (2008). Taninos Condensados en *Maytenus vitis-idaea* Griseb. "tala salado" (Celastraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2), 240-243. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/27/2/LAJOP_27_2_2_2_EBXQ00F05M.pdf
169. Wada, H., Shizuri, Y., Sugiura, K., Yamada, K., Hirata, Y. (1971). Stereochemistry of evonine, neo-evonine, euonymine, and neo-euonymine, alkaloids obtained from *Euonymus sieboldiana* blume. *Tetrahedron Letters*, 12(33), 3131-3132. Doi: 10.1016/S0040-4039(01)97109-6

170. Wang, K., Ju, X., Zhang, C., Zhang, J. (2014). Phytochemical and chemotaxonomic study on *Microtropis triflora*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 52,1–3. Doi: 10.1016/j.bse.2013.09.002
171. Wang, M., Zhang, Q., Ren, Q., Kong, X., Wang, L., Wang, H.,... Guo, Y. (2014). Isolation and characterization of sesquiterpenes from *Celastrus orbiculatus* and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10945–10953. Doi: 10.1021/jf503735t
172. Weng, J., Yen, M., (2010). New dihydroagarofuranoid sesquiterpenes from *Celastrus paniculatus*. *Helvetica Chimica Acta*, 93(9), 1716-1724.
173. Wijeratne, D., Kumar, V., Sultanbawa, M. (1981). 3-Oxolup-20(29)-en-30-al, a new lupane from *Gymnosporia emarginata*(Celastraceae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2724-2726. Doi: 10.1039/P19810002724
174. Wu, D., Sun, X., Li, F. (1979). Two new diterpene lactones from tripterygium, hypolide and tripterolide. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. 1, 29–36. Disponible en: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-YOKE197902003.htm
175. Wu, W., Wang, M., Zhu, J., Zhou, W., Hu, Z., Ji, Z. (2001). Five New Insecticidal Sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus*. *Journal of Natural Products*, 64 (3), 364-367. Doi: 10.1021/np0004193

176. Xiong, Q., Wilson, W.K., Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard reaction: sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, 42(1), 87-96. Doi: 10.1007/s11745-006-3013-5
177. Xu, J., Ikekawa, T., Ohkawa, M., Yokota, I., Hara, N., Fujimoto, Y. (1997). Triptinins A and B, two Leukotriene D4 Antagonistic 19(4-3)-abeo-Abietanes from *Tripterogium wilfordii*. *Phytochemistry*, 44(8), 1511–1514. Doi: 10.1016/S0031-9422(96)00782-0
178. Yamada, K., Shizuri, Y., Hirata, Y. (1978). Isolation and structures of a new alkaloid alatamine and an insecticidal alkaloid wilfordine from *Euonymus alatus* forma *striatus* (thunb.) makino. *Tetrahedron*, 34(13), 1915-1920. Doi: 10.1016/0040-4020(78)80097-0
179. Yoder, L.R., Mahlberg, P.G. (1976). Reactions of Alkaloid and Histochemical Indicators in Laticifers and Specialized Parenchyma Cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63(9), 1167-1173. Disponible en: https://www.jstor.org/stable/2441734?seq=1#page_scan_tab_contents
180. Zhisheng, H., Shanhai, H., Ya, L., Huai, S., Xianguo, Y. (1985). Structure of new alkaloid wilfordine from *Tripterogium wilfordii*. *Acta Chimica Sinica*, 43(6), 593-596. Disponible en: http://siocjournal.cn/Jwk_hxxb/EN/abstract/abstract335360.shtml#

GLOSARIO

- **Antimalárico:** sustancia que previene o cura la malaria, también llamado antipalúdico.⁽²³⁾
- **Antinociceptivo:** Factor que aumenta la tolerancia o disminuye la sensibilidad a estímulos que generen dolor.⁽¹⁴⁰⁾
- **Biodiversidad Vegetal:** Riqueza de seres vivos que viven en el planeta, considerando tanto las especies, como los procesos que conforman los ecosistemas y el patrimonio genético que contienen los organismos vivos.⁽¹³⁴⁾
- **Bioensayo:** Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.⁽¹⁴³⁾
- **Cáncer:** El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo.⁽¹³³⁾
- **Cardiotónico:** Sustancias que estimulan la actividad del corazón.⁽⁷⁴⁾
- **Citotóxico:** Que produce daño a la función o a la estructura celular.⁽¹⁴³⁾
- **Daunomicina:** También llamado daunorrubicina. Antibiótico derivado de la antraciclina, aislado de *Streptomyces peucetius* utilizado en el tratamiento de leucemia mieloide aguda.⁽²³⁾

- **Dispepsia:** Molestias o dolores localizados en la parte alta del abdomen. Estas molestias pueden presentar mayor o menor frecuencia e intensidad de síntomas, y acompañarse de náuseas, hinchazón abdominal, acidez, digestión pesada, eructos, regurgitaciones (regreso de la comida desde el estómago a la boca) y vómitos.⁽¹³⁷⁾

- **Elastasa:** Proteasa liberada a partir de neutrófilos infiltrados en el espacio alveolar.⁽⁶⁾

- **Espectrometría de Masas:** Técnica analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares según su masa por medio de la ionización de la muestra y posterior separación de los fragmentos para su análisis.⁽⁸⁷⁾

- **Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear:** Es una técnica espectroscópica no destructiva, basada en las propiedades magnéticas de la materia y aplicada a cualquier sustancia química en estado líquido o sólido que contenga núcleos con espines nucleares. Comprende aplicaciones como son: elucidación estructural, determinación conformacional, establecimiento de equilibrios químicos, cinéticas químicas, cuantificación de mezclas, control de calidad, análisis conformacionales y estereoquímicos.⁽¹⁴⁷⁾

- **Etambutol:** Es un compuesto sintético hidrosoluble, termoestable, dextroisómero, activo *in vitro* a cepas susceptibles de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias. Fármaco de primera línea para el tratamiento de tuberculosis.⁽²³⁾

- **Holotipo:** Único elemento, ejemplar o ilustración designada por el autor como tipo nomenclatural.⁽¹⁰⁰⁾

- **In-Vitro:** Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos. Método para mantener en vida diversos organismos vivos en condiciones diferentes a las naturales, con técnicas de laboratorio.⁽⁷⁵⁾

- **Isotipo:** Cualquier duplicado del holotipo y se considera como material original.⁽¹⁰⁰⁾

- **Neutrófilo:** Tipo de leucocito más abundante de la sangre en el ser humano, miden de 8.5 a 10 μm . El periodo de vida media de los neutrófilos es corto y su función principal es la fagocitosis de bacterias y hongos.⁽⁷⁴⁾

- **Rifampicina:** Derivado semisintético de la rifamicina, producto antibiótico de *Streptomyces mediterranei*, activo *in vitro* contra cocos grampositivos y gramnegativos, algunas bacterias intestinales, micobacterias y clamidias. Es uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis.⁽²³⁾

- **Sámara:** Fruto seco, indehiscente con una proyección membranosa a modo de ala para la dispersión por el viento.⁽¹³⁸⁾

- **Virus de Epstein Barr:** Tipo de γ -herpes virus que se replica en las células linfoides y en epitelios o en fibroblastos. Inicialmente el virus infecta las células del compartimento oral, primero las células epiteliales y posteriormente los linfocitos B del tejido linfoide.⁽⁸⁹⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1

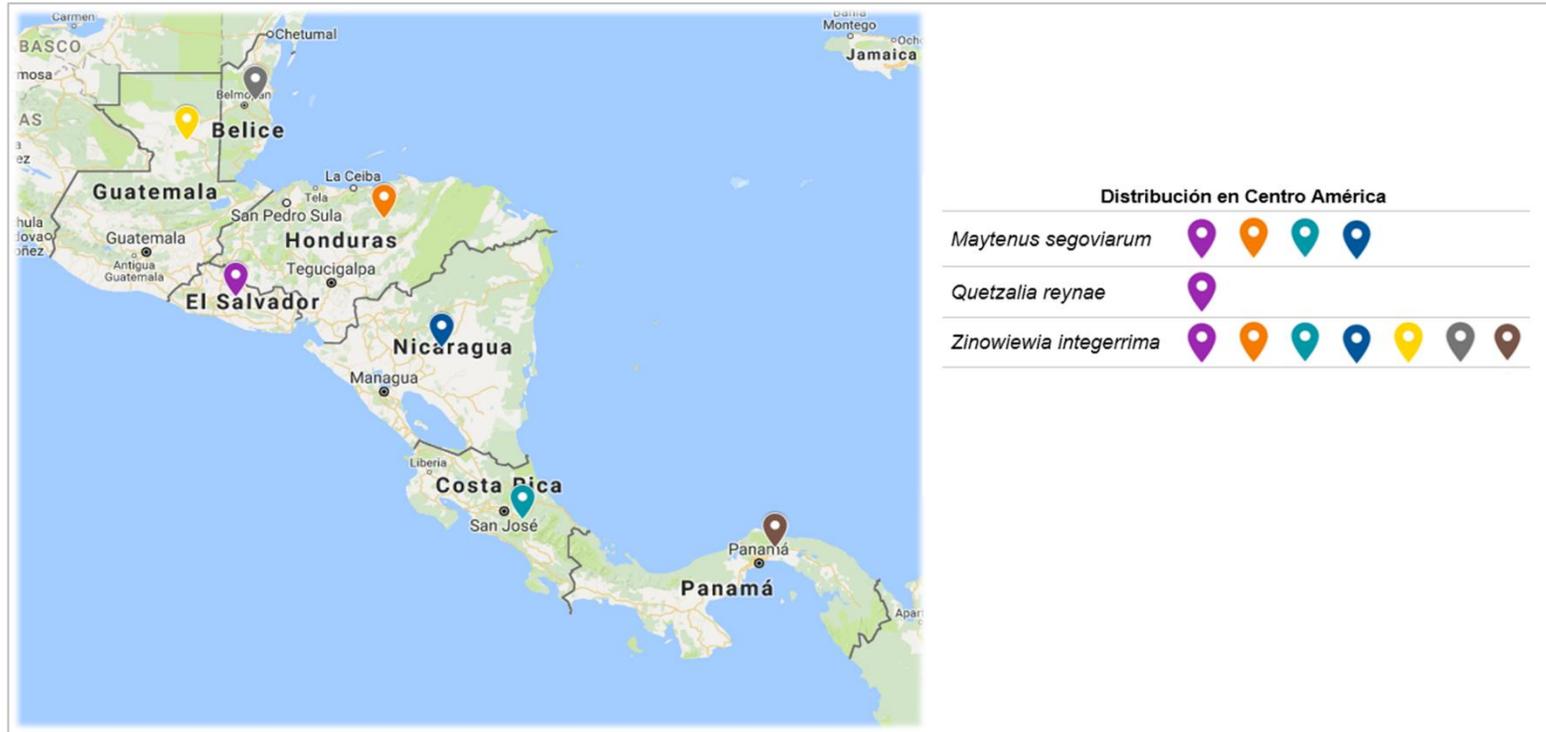


Figura N° 64. Distribución geográfica a nivel centroamericano de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima*.(5,19,20)

ANEXO Nº 2

PERMISO DE RECOLECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES.



MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y
RECURSOS NATURALES

RESOLUCIÓN MARN-DEV-GVS-AIMA-116-2016
AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y RECOLECTA CIENTÍFICA

San Salvador, a los veintidós días del mes de diciembre del año dos mil dieciséis. Vista la solicitud presentada por el Doctor **Marvín José Núñez Rivas**, profesor Universitario (farmacéutico) del Laboratorio de investigación en productos naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, con Documento Único de Identidad número Cero tres cinco tres tres dos seis dos guión ocho, en compañía de los investigadores: **Maestra Morena Lissette Martínez de Díaz**, con Documento Único de Identidad número Cero uno siete cuatro tres cuatro uno cinco guión cinco; licenciado **Ulises Oswaldo Guardado Castillo**, con Documento Único de Identidad número Cero cinco cero tres cuatro ocho seis tres guión seis; licenciado **Juan Pablo Sánchez Pérez**, con Documento Único de Identidad número Cero cuatro uno nueve siete seis nueve seis guión nueve; licenciado **José Gabriel Cerén López**, con Documento Único de Identidad número Cero cero cinco seis cero seis cuatro tres guión siete; y licenciada **Jenny Elizabeth Menjívar de Elías**, con Documento Único de Identidad número Cero cero tres nueve ocho tres ocho tres guión tres. Para que se les autorice la realización de la investigación científica denominada: **"Fitoquímica de especies de Celastráceas de la flora Salvadoreña: búsqueda de actividad antiparasitaria"**. Para desarrollarse a partir del mes de febrero a diciembre de dos mil diecisiete. El Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales,

CONSIDERANDO:

- I. Que de conformidad al Artículo 117 de la Constitución de la República, es deber del Estado, proteger los recursos naturales, así como la diversidad e integridad del medio ambiente, para garantizar el desarrollo sostenible; declara de interés social la protección, conservación, aprovechamiento racional, restauración o sustitución de los recursos naturales;
- II. Que mediante Decreto Legislativo No. 844, fecha catorce de abril de 1994, publicado en el Diario Oficial No. 96, Tomo No. 323, del veinticuatro de mayo del mismo año, se promulgó la Ley de Conservación de Vida Silvestre, la cual mediante Decreto Legislativo No. 441, publicado en el Diario Oficial No. 133, Tomo No. 352 de fecha 16 de julio de 2001, fue reformada, estableciendo que es responsabilidad del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, la aplicación de la citada ley en lo que respecta a la protección, restauración, conservación y uso sostenible de la vida silvestre;
- III. Que mediante Decreto Legislativo N° 579, de fecha 13 de enero de 2005, publicado en el Diario Oficial N° 32, Tomo N° 366, del 15 de febrero del mismo año, fue emitida la Ley de Áreas Naturales Protegidas, la cual establece en su Art. 5, que el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, es la autoridad competente para conocer y resolver sobre toda actividad relacionada con las Áreas Naturales Protegidas y los recursos que éstas



contienen, y en el Art. 6, literal h), que en su papel de rector del Sistema de Áreas Naturales Protegidas, le corresponde otorgar las autorizaciones previstas en dicha ley y su Reglamento, suspenderlas o cancelarlas, por causas justificadas;

- IV. Que el Art. 6 literal r) de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, dispone que en su papel de rector del Sistema de Áreas Naturales Protegidas, corresponde al Ministerio combatir la biopiratería en las áreas naturales protegidas a fin de proteger el patrimonio natural;
- V. Que el Art. 31 de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, dispone que la investigación técnica y científica es prioritaria en las Áreas Naturales Protegidas. Que dichas investigaciones no pueden ir en detrimento de las mismas y deberán contar con la correspondiente autorización;
- VI. Que según el Artículo 33 de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, el Ministerio podrá autorizar a personas naturales o jurídicas para realizar actividades, obras o proyectos, compatibles con los objetivos de las Áreas Naturales Protegidas, sin perjuicio de cumplir previamente con los requerimientos establecidos en la Ley de Medio Ambiente;
- VII. Que el Artículo 65 de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, dispone que mientras no se emita el Reglamento de dicha Ley, el Ministerio definirá por Acuerdo Ejecutivo o Resolución, las acciones necesarias para cumplir con el objetivo de la misma;
- VIII. Que el Artículo 66 de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, dispone que todas las resoluciones que emita el ministerio, serán autorizadas por su titular, por quien haga sus veces o por quien aquel designe;
- IX. Que según el Acuerdo No. 5, del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial No. 10, Tomo No. 406, del 15 de enero del dos mil quince, se delega en el Titular de la Dirección General de Ecosistemas y Vida Silvestre el cumplimiento de las atribuciones establecidas en la Ley de Conservación de Vida Silvestre;
- X. Que según el Acuerdo No 60 del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, del diez de marzo del dos mil quince, se delega en el Titular de la Dirección General de Ecosistemas y Vida Silvestre el cumplimiento de las atribuciones establecidas en la Ley de Áreas Naturales Protegidas;
- XI. Que con la mencionada investigación, el Ministerio podrá cumplir con lo establecido en el artículo 6, literal d) de la Ley de Conservación de Vida Silvestre que literalmente dice: Publicar los estudios y ponerlos al acceso del público y de la comunidad científica por igual, así como realizar otras actividades que promuevan los recursos de vida silvestre y su uso adecuado y del literal f) Realizar estudios y ensayos necesarios para la reproducción de la vida silvestre para uso humano, así como restaurar y conservar las poblaciones de aquellas especies en peligro o amenazadas de extinción, y velar por su protección y restauración



- XII. Que habiendo analizado la solicitud en mención, se considera que la ejecución de la investigación y recolección científica, no ocasionará impacto negativo significativo en los ecosistemas ni en las poblaciones de las especies que habitan en los sitios escogidos para muestrear;

POR TANTO:

De conformidad a los Artículos 6 literal r), 31, 33, 65 y 66 de la Ley de Áreas Naturales Protegidas, 6 literal d) y f) de la Ley de Conservación de Vida Silvestre;

RESUELVE:

1. **AUTORIZAR** al Doctor Marvin José Núñez Rivas, profesor Universitario (farmacéutico) del Laboratorio de investigación en productos naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, en compañía de los investigadores: Maestra Morena Lissette Martínez de Díaz, licenciado Ulises Oswaldo Guardado Castillo, licenciado Juan Pablo Sánchez Pérez, licenciado José Gabriel Cerén López, y licenciada Jenny Elizabeth Menjívar de Elías. Para que se les autorice la realización de la investigación científica denominada: "Fitoquímica de especies de Celastráceas de la flora Salvadoreña: búsqueda de actividad antiparasitaria", en el Parque Nacional Montecristo, departamento de Santa Ana y en el Parque Nacional El Imposible, departamento de Ahuachapán. Bajo las condiciones, prevenciones y disposiciones especiales siguientes:

De las condiciones:

- 1) Se autoriza la recolección de hojas, raíces y frutos de especies de plantas de la familia celastráceas, para preparar extractos orgánicos, posteriormente se realizará un tamizaje fitoquímica;
- 2) Se autoriza para el estudio, la recolección de especímenes y cantidades según se detalla a continuación: *Maytenus segoviarum* (PN Montecristo 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), *Celastrus vulcanicola* (PN Montecristo 300 g raíces), *Microtropis ilicina* (PN Montecristo 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), *Quetzalia reynae* (PN Montecristo 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), *Zinowewia integerrima* (PN Montecristo 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), *Perrottetia longistylis* (PN Montecristo 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), *Zinowewia cuneifolia* (PN El Imposible 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos), y *Zinowewia tacanensis* (PN El Imposible 600 gramos hojas, 300 g raíces, 300 g frutos);
- 3) La toma de fotografía está permitida, para documentar lo que el investigador considere pertinente relacionado al tema de investigación;



- 4) Depositar las muestras recolectadas deben ser procesadas en el laboratorio de investigación en productos naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, presentando constancia de depósito en el informe final correspondiente;
- 5) Apegarse a la Normativa de las leyes de Medio Ambiente, Conservación de Vida Silvestre y Áreas Naturales Protegidas, así como a los Convenios Internacionales;
- 6) En caso de necesitar prórroga para continuar la investigación y recolecta científica, deberá de tramitar la respectiva solicitud con quince días hábiles de anticipación al vencimiento del plazo otorgado en el presente permiso;
- 7) Entregar a esta Cartera de Estado a través de la Dirección General de Ecosistemas y Vida Silvestre, una copia impresa y una en formato digital del informe final e incluir documentación fotográfica en formato JPEG, para cumplir con la obligación legal establecida en el artículo 6 literal d) de la Ley de Conservación de Vida Silvestre que literalmente dice "publicar los estudios y ponerlos al acceso del público y de la comunidad científica por igual, así como realizar otras actividades que promuevan los recursos de vida silvestre y su uso adecuado";
- 8) No se autorizará ningún permiso tanto al investigador titular, así como a colaboradores asistentes de campo, hasta que se dé cumplimiento al literal anterior, y se haya recibido a entera satisfacción de este Ministerio.

De las prevenciones:

- 1) Las únicas personas autorizadas para realizar las recolectas son él: Doctor Marvin José Núñez Rivas, Maestra Morena Lisette Martínez de Díaz, licenciado Ulises Oswaldo Guardado Castillo, licenciado Juan Pablo Sánchez Pérez, licenciado José Gabriel Cerén López, y licenciada Jenny Elizabeth Menjívar de Elías;
- 2) No está permitida la recolecta de otros géneros o especies de plantas que no pertenezcan a las especies establecidas en la presente resolución;
- 3) En caso que la actividad requiera de otras autorizaciones o permisos, el investigador responsable del estudio deberá tramitar su obtención debido a que ésta autorización no exime de las demás que apliquen conforme a la legislación nacional o internacional;
- 4) El presente permiso no constituye autorización de ingreso a espacios de propiedad privada, por lo que este deberá de solicitarse, según sea el caso;
- 5) El investigador responsable del estudio deberá entregar una fotocopia de la presente resolución en el puesto de la Policía Nacional Civil y las Unidades Ambientales de las Municipalidades más cercanas a las áreas de la investigación, a efecto que tengan conocimiento de la actividad autorizada; además de coordinar el acompañamiento de la PNC y Fuerza Armada más cercana si lo considera necesario;



- 6) El investigador responsable del estudio, deberá presentar una fotocopia de la resolución a la oficina de guardarecursos de ambos Parques Nacionales y coordinar las visitas a través de la Gerencia de Áreas Naturales Protegidas y Corredor Biológico con el enlace designado por ésta, presentando un calendario, a efecto de desarrollar las actividades de la mejor manera posible;
- 7) Durante los viajes de campo los investigadores deberán ser acompañados del equipo de guardarecursos de cada Parque Nacional, siendo estos los responsables de verificar el cumplimiento de lo establecido en la presente resolución;
- 8) El investigador responsable del estudio, deberá notificar su ingreso y salida del Parque, en la oficina del personal de guardarecursos para cada visita. El MARN proporcionará guardarecursos para apoyar y acompañar la investigación, así como otras facilidades logísticas de acuerdo a la disponibilidad;
- 9) No ingerir bebidas alcohólicas o consumir drogas durante el desempeño de la fase de campo. En caso de encontrar a algún miembro del equipo de investigadores realizando estas prácticas, la autorización será cancelada inmediatamente y deberán abandonar el sitio;
- 10) Se deberá facilitar las visitas de inspección por parte de técnicos del Ministerio debidamente identificados, para la verificación del cumplimiento de lo establecido en la presente resolución;
- 11) La investigación se refiere de forma exclusiva al trabajo de graduación denominado **"Fitoquímica de especies de Celastráceas de la flora Salvadoreña: búsqueda de actividad antiparasitaria"**, por lo que cualquier otra actividad o estudio genético o químico con fines comerciales de los productos que deriven de la información obtenida y colectas antes referidas o uso relacionado con compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos con valor económico actual o potencial, deberá hacerse con el consentimiento previo del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador, el cual emitirá los preceptos y orientaciones a seguir para tal efecto bajo las Directrices de Bonn sobre Acceso a los Recursos Genéticos para preparar y redactar, en caso de ser necesario, las medidas legislativas, administrativas o de política sobre acceso y participación en los beneficios, con particular referencia a las disposiciones en virtud de los artículos 8 j), 10 c), 15, 16 y 19 del Convenio sobre la Diversidad Biológica, así como los contratos y otros arreglos en el marco de condiciones mutuamente convenidas para el acceso y la participación en los beneficios, en virtud del Protocolo de Nagoya sobre Acceso a Recursos Genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que deriven de su utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica y la Ley de Áreas Naturales Protegidas de El Salvador con énfasis en combate a la biopiratería (artículo 6 r) a fin de proteger el patrimonio natural;
- 12) En caso de incumplimiento a la presente Resolución, este Ministerio procederá a realizar las actuaciones administrativas correspondientes según el caso, suspender o



cancelar las autorizaciones o realizar el procedimiento administrativo sancionatorio por infracción a la Ley de Medio Ambiente, Ley de Conservación de Vida Silvestre y Ley de Áreas Naturales Protegidas, reservándose el derecho a denegar cualquier solicitud futura;

De las disposiciones especiales:

- 1) La autorización se refiere de forma exclusiva a la recolección de muestras de hojas, raíces y frutos) de las especies de plantas de la familia Celastraceae antes mencionadas, para la realización la investigación denominada: ***"Fitoquímica de especies de Celastráceas de la flora Salvadoreña: búsqueda de actividad antiparasitaria"***, en el Parque Nacional Montecristo, departamento de Santa Ana y en el Parque Nacional El Imposible, departamento de Ahuachapán. Cualquier actividad o estudio genético o químico con fines comerciales de los productos que deriven de la información obtenida de las especies colectadas, o cualquier uso relacionado con compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos con valor económico actual o potencial, deberá hacerse con el consentimiento previo del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, el cual emitirá las directrices a seguir para tal efecto; y con el compromiso escrito por parte del investigador principal, para que en caso de que se requiera exportar el material recolectado se circunscriba a que no se utilizará con fines comerciales en el marco de lo dispuesto en el artículo 15 del Convenio sobre la Diversidad Biológica, así como con toda la normativa respectiva y los estándares internacionales para su transporte;
2. **CONCEDER PERMISO** de ingreso al Doctor Marvin José Núñez Rivas, Maestra Morena Lissette Martínez de Díaz, licenciado Ulises Oswaldo Guardado Castillo, licenciado Juan Pablo Sánchez Pérez, licenciado José Gabriel Cerén López, y licenciada Jenny Elizabeth Menjivar de Elías, para que realicen la recolección de muestras de hojas, raíces y frutos) de las especies de plantas de la familia Celastraceae antes mencionadas al interior de los Parques Nacionales: Montecristo en el departamento de Santa Ana y El Imposible, departamento de Ahuachapán, para realizar la investigación denominada: ***"Fitoquímica de especies de Celastráceas de la flora Salvadoreña: búsqueda de actividad antiparasitaria"***.
3. **LA VIGENCIA** de la presente resolución es a partir del primero de enero al treinta y uno de diciembre de dos mil diecisiete.

COMUNÍQUESE.-A LA DIRECTORA GENERAL DE ECOSISTEMAS Y VIDA SILVESTRE, a.l (f) SILVIA MARGARITA HERNÁNDEZ DE LARIOS -----



ANEXO N° 3

EJEMPLARES DE LAS ESPECIES *Maytenus segoviarum*,
Quetzalia reynae Y *Zinowiewia integerrima*.⁽²⁰⁾



Herbarium MHES
M H E S I S - 0 0 0 4

Flora of El Salvador
Celastraceae
***Maytenus segoviarum* STANDL. & L. O. WILLIAMS**
Cantón El Limo, sobre calle que conduce a casa de Fredy Magaña. Metapán. Depto. Santa Ana
89°25'7"W, 14°24'6"N 1040 m
Zona rural con pastizales
Árbol de 5-7 m. Frutos anaranjados
Leg.: Menjivar, J. 4001 19. May 2017
Nuñez, M., de Díaz, M., & Magaña, F.
Det.: J. Menjivar, 22-05-2017
Herbaria: MHES, LAGU, MEXU

Figura N° 65. Ejemplar correspondiente a la especie *Maytenus segoviarum*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES). (20)

MEX 14-03-2017



Flora of El Salvador

Celastraceae

Quetzalia reynae LUNDELL

Estación Salvanatura, P.N. Montecristo, Metapán, Depto. Santa Ana

89°22'1"W, 14°24'36"N 2188 m

Bosque Nebuloso

Árbol de 5-10 m. Frutos verdes

Leg.: Menjivar, J., 3970 Nuñez, M., de Díaz, M., & Magaña, F. 21. Mar. 2017

Det.: J. Menjivar, 22-03-2017

Herbaria: MHES, LAGU, MEXU

Figura N° 66. Ejemplar correspondiente a la especie *Quetzalia reynae*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES). (20)



Figura N° 67. Ejemplar correspondiente a la especie *Zinowiewia integerrima*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES). (20)

ANEXO N° 4

NUMEROS DE VOUCHER DE LAS ESPECIES *Maytenus segoviarum*,
Quetzalia reynae Y *Zinowiewia integerrima*.⁽²⁰⁾



Herbarium MHES



Flora of El Salvador

Celastraceae

***Maytenus segoviarum* STANDL. & L. O. WILLIAMS**

Cantón El Limo, sobre calle que conduce a casa de Fredy Magaña. Metapán. Depto. Santa Ana

89°25'7"W, 14°24'6"N

1040 m

Zona rural con pastizales

Árbol de 5-7 m. Frutos anaranjados

Leg.: Menjívar, J. 4001

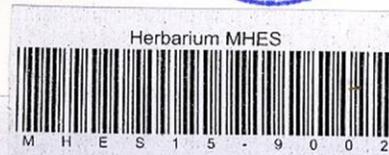
19. May 2017

Núñez, M., de Díaz, M., & Magaña, F.

Det.: J. Menjívar, 22-05-2017

Herbaria: MHES, LAGU, MEXU

Figura N° 68. Número de voucher correspondiente a la especie *Maytenus segoviarum*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES).⁽²⁰⁾



Flora of El Salvador

Celastraceae

Quetzalia reynae LUNDELL

Estación Salvanatura. P.N. Montecristo. Metapán. Depto.
Santa Ana

89°22'1"W, 14°24'36"N

2188 m

Bosque Nebuloso

Árbol de 5-10 m. Frutos verdes

Leg.: Menjívar, J. 3970

21.Mar.2017

Núñez, M., de Díaz, M., & Magaña, F.

Det.: J. Menjívar, 22-03-2017

Herbaria: MHES, LAGU, MEXU

Figura N° 69. Número de voucher correspondiente a la especie *Quetzalia reynae*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES).⁽²⁰⁾



Herbarium MHES



Flora of El Salvador

Celastraceae

***Zinowiewia integerrima* (TURCZ.) TURCZ.**

El canal de agua, sendero al Trifinio. P.N. Montecristo.
Metapán. Depto. Santa Ana

89°21'36"W, 14°24'8"N

1955 m

Bosque Nebuloso

Estéril

Leg.: Menjívar, J. 3971

21.Mar.2017

Núñez, M., de Díaz, M., & Magaña, F.

Det.: J.Menjivar, 22-03-2017

Herbaria: MHES

Figura N° 70. Número de voucher correspondiente a la especie *Zinowiewia integerrima*, del Museo de Historia Natural de El Salvador (MHES).⁽²⁰⁾

ANEXO Nº 5

DATOS CONSULTADOS EN LA BASE DE DATOS DE TROPICOS DE
LAS ESPECIES PERTENECIENTES A LA FAMILIA CELASTRACEAE
EN EI SALVADOR.⁽¹⁶⁴⁾

Tabla N° 27. Datos consultados en la base de datos de tropicos de las especies pertenecientes a la Familia Celastraceae en El Salvador.⁽¹⁶⁴⁾

Espece vegetal	Departamento	Localización	Coordenadas
<i>Cassine xylocarpa</i>	Ahuachapán	San Benito, al pie de agua prieta.	13°49'N 089°56'W
<i>Euonymus enantiophyllus</i>	Santa Ana	PNM. Sendero al Trifinio.	14°24'N 089°22'W
<i>Euonymus costaricensis</i>	Santa Ana	San José Ingenio. Metapán.	14°25'N 089°21'W
<i>Maytenus chiapensis</i>	Ahuachapán	Concepción de Ataco, Ctón. El Arco, finca La Esperanza, sector El Mirador.	13°49'42"N 089°51'22"W
<i>Maytenus segoviarum</i>	Cabañas	A.N.P. Cinquera, Cerro San Benito, verada al mirador. Bosque de galería.	13°55'N 088°58'W
<i>Quetzalia reynae</i>	Santa Ana	San José Ingenio, P.N. Montecristo, faldas del Cerro Miramundo.	14°24'46"N 089°22'02"W
<i>Quetzalia occidentalis</i>	Ahuachapán	Cerro Campana coffee farm.	13°51'19"N 089°54'49"W
<i>Wimmeria acuminata</i>	Santa Ana	Calle polvosa. Valle nuevo. Metapán. Santa Ana.	14°16'N 089°27'W
<i>Wimmeria bartlettii</i>	Morazán	Chilanga. Ctón. Joya del Matazano, ANP. Cerro Cacahuatique.	13°45'57"N 088°11'36"W
<i>Wimmeria cyclocarpa</i>	Morazán	Chilanga, Joya del Matazano, A.N.P. Cerro Cacahuatique, zona intermedia del Sendero Carbón.	13°45'45"N 088°11'58"W
<i>Zinowiewia integerrima</i>	Santa Ana	Bosque Nebuloso. PNM. Metapán.	13°51'N 089°38'W
<i>Zinowiewia rubra</i>	Santa Ana	Los Volcanes, sector El Paraíso. PNM. Metapán.	13°52'N 089°38'W
<i>Celastrus vulcanicola</i>	Santa Ana	San José Ingenio. Metapán.	14°24'53"N 089°21'41"W
<i>Celastrus liebmannii</i>	Santa Ana	Moramundito, P.N. Montecristo. Creciendo dentro del bosque nebuloso.	14°26'N 089°21'W
<i>Crossopetalum uragoga</i>	Ahuachapán	El Corozo, Mariposario. San Francisco Menéndez.	13°49'24"N 090°00'11"W
<i>Crossopetalum parviflorum</i>	Ahuachapán	Cerro Campana. Coffe Farm.	13°51'1989°54'49
<i>Hippocratea volubilis</i>	Morazán	Arambala, río Sapo.	13°54'N 088°06'W
<i>Semialarium mexicanum</i>	Morazán	Arambala, A.P. Río Sapo, sendero secreto de la naturaleza.	13°55'N 088°06'W

ANEXO Nº 6

**ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS
COMO TESTIGOS EN LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.**

Tabla N° 28. Estructuras químicas de los compuestos utilizados como testigos en la cromatografía de capa fina.

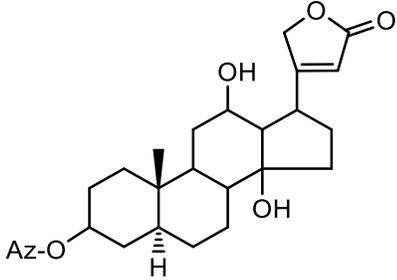
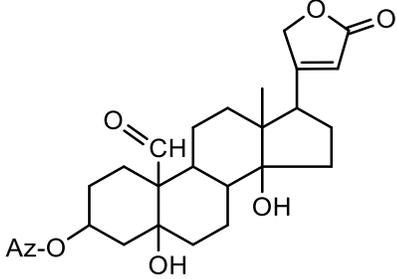
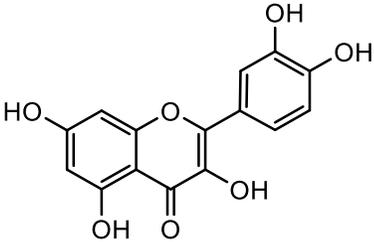
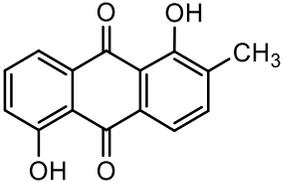
Determinación	Testigos	Estructura química
Glicósidos cardiotónicos	Digoxina.(26)	
Glicósidos cardiotónicos	<i>k</i> -estrofantina.(26)	
Flavonoides	Quercetina.(26)	
Glicósidos antraquinónicos	Extracto etanólico de <i>Alvaradoa amorphoides</i> .(37)	

Tabla Nº 28 (continuación)

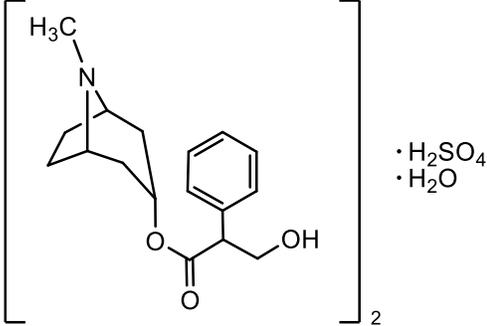
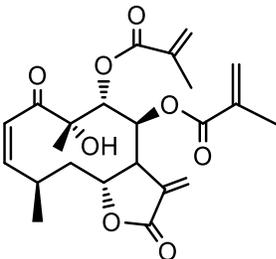
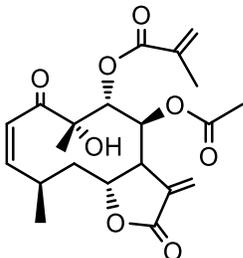
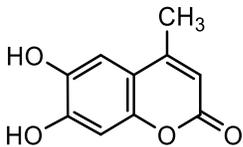
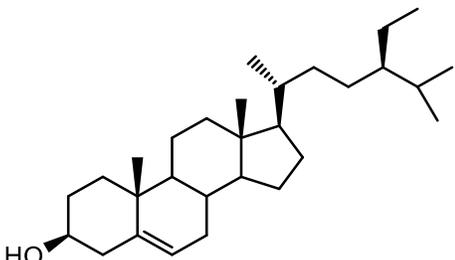
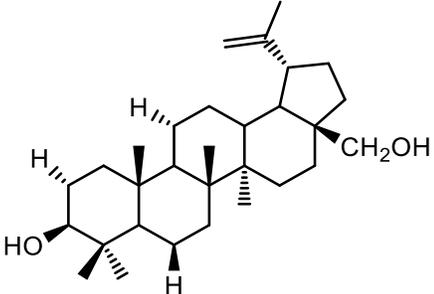
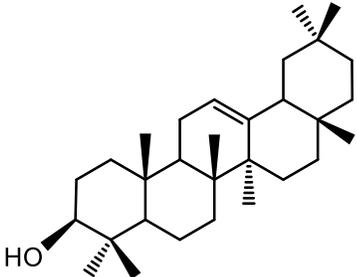
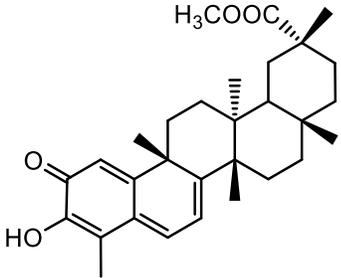
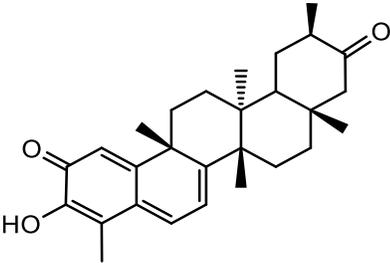
<p>Alcaloides</p>	<p>Sulfato de hiosciamina.(47)</p>	
<p>Sesquiterpenlactonas</p>	<p>Juanislamina.(41)</p>	
<p>Sesquiterpenlactonas</p>	<p>Caleina D.(41)</p>	
<p>Cumarinas</p>	<p>6,7-dihidroxi-4-metilcumarina.(26)</p>	
<p>Esteroles</p>	<p>β-sitosterol.(26)</p>	

Tabla N° 28 (continuación)

<p>Triterpenos</p>	<p>Betulina.(141)</p>	
<p>Triterpenos</p>	<p>β-amirina.(26)</p>	
<p>Quinonas</p>	<p>Pristimerina.(142)</p>	
<p>Quinonas</p>	<p>Tingenona.(142)</p>	

ANEXO N° 7

MATERIAL, CRISTALERÍA, REACTIVOS Y PREPARACION DE
REACTIVOS.⁽²⁶⁾

MATERIALES Y CRISTALERIA

- Agitadores de vidrio.
- Ampolla de separación 125 mL.
- Aro metálico.
- Balones volumétricos 50 mL, 100 mL y 200 mL.
- Baño maría.
- Bolsas plásticas de 1,2 y 5 lb.
- Embudo de vidrio.
- Espátula de plástico.
- Etiquetas de papel.
- Guantes.
- Papel filtro Whatman N° 40.
- Papel glassine.
- Papel kraft.
- Papel toalla.
- Pinzas de sostén y de extensión.
- Pipetas pasteur.
- Placas POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄.
- Probetas 25 mL, 50 mL y 100 mL.
- Soporte metálico.
- Tubos de ensayo.
- Vaso de precipitado 25, 50, 100, 250 mL.
- Vidrio reloj.

EQUIPO

- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Cámara de extracción de gases Fisher Hamilton.
- Digital ultrasonic bath Symphony.
- Estufa Thermo scientific Heratherm OMH400.

- Genevac EZ-2 Plus Evaporator.
- Hot plate.
- Lámpara UV (254nm-365 nm).
- Ultrasonic bath BRANSON M2800H.

REACTIVOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

- Acetato de etilo.
- Ácido acético glacial.
- Ácido clorhídrico concentrado.
- Ácido fórmico.
- Ácido sulfúrico 5% (v/v) en etanol.
- Ácido sulfúrico 50% (v/v).
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Ácido tartárico.
- Anhídrido acético.
- Clorhidrato de quinina 5% (m/v).
- Diclorometano.
- Hidróxido de potasio al 5% (m/v) en metanol.
- Láminas de magnesio.
- Metanol.
- *n*-butanol.
- *n*-hexano.
- Reactivo de Baljet.
- Reactivo revelador de Dragendorff.
- Reactivo revelador de Kedde.
- Reactivo revelador de Komarowsky.
- Reactivo revelador de Liebermann-Burchard.
- Solución de gelatina al 5% (m/v).
- Solución de vainillina 1%.

- Sulfato de sodio anhidro.
- Tricloruro de hierro 1% (v/v) en metanol.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de: Ácido sulfúrico 5% v/v (100 mL).

1. Medir 5.2 mL de ácido sulfúrico concentrado (96 %) en una probeta de 10.0 mL.
2. Transferir el volumen anterior a un beaker de 100.0 mL (Beaker "B").
3. Agregar 50.0 mL de agua al beaker "B".
4. Realizar dos lavados a la probeta con 10.0 mL de agua y recibirlos en el beaker "B".
5. Dejar enfriar y una vez frío transferir la solución a un balón volumétrico de 100.0 mL.
6. Realizar dos lavados al beaker "B" con 10.0 mL de agua y recibirlos en el balón.
7. Aforar con agua y agitar para homogenizar.
8. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Clorhidrato de quinina 5% m/v (100 mL).

1. Pesar 5 g de clorhidrato de quinina en un beaker de 100.0 mL (Beaker "C").
2. Agregar 70.0 mL de agua al beaker "C" y calentar suavemente hasta disolver.
3. Dejar enfriar la solución.
4. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 100.0 mL.
5. Realizar dos lavados al beaker "C" con 10.0 mL de agua y recibirlos en el balón volumétrico.
6. Aforar con agua y agitar para homogenizar.

Preparación de: Hidróxido de potasio al 5% en metanol (100 mL).

1. Pesar 5 g de hidróxido de potasio en un beaker de 100.0 mL (Beaker "E").
2. Agregar 70.0 mL de metanol al beaker "E" y agitar.
3. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 100.0 mL.
4. Realizar dos lavados al beaker "E" con 10.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.
5. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.
6. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Reactivo Baljet.

Solución "A" (50 mL):

1. Pesar 1.0 g de ácido pícrico en un beaker de 50 mL (Beaker "A").
2. Agregar 30.0 mL de etanol 90° al beaker "A" y agitar.
3. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 50.0 mL.
4. Realizar dos lavados al beaker "A" con 5.0 mL de etanol 90° y recibirlos en el balón volumétrico.
5. Aforar con etanol 90° y agitar para homogenizar.
6. Envasar y rotular.

Solución "B" (50 mL):

7. Pesar 5 g de hidróxido de sodio en un beaker de 50 mL (Beaker "B").
8. Agregar 30.0 mL de agua al beaker "B" y agitar.
9. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 50.0 mL.
10. Realizar dos lavados al beaker "B" con 5.0 mL de agua y recibirlos en el balón volumétrico.
11. Aforar con agua y agitar para homogenizar.
12. Envasar y rotular.

Reactivo "Baljet": Mezclar volúmenes iguales de la solución "A" y "B".

Preparación de: Reactivo revelador de Dragendorff.

Solución "A" (50 mL):

1. Pesar 12.5 g de ácido tartárico en un beaker de 100.0 mL (Beaker "A").
2. Pesar 1.0625 g de nitrato de bismuto en un beaker de 10.0 mL.
3. Adicionar 50.0 mL de agua al beaker "A" y agitar.
4. Incorporar los 1.0625 g de nitrato de bismuto y agitar hasta disolver.
5. Envasar y rotular.

Solución "B" (50 mL):

6. Pesar 20.0 g de ioduro de potasio (KI) en un beaker de 100.0 mL (Beaker "B").
7. Agregar 50.0 mL de agua al beaker "B" y agitar hasta disolver.
8. Envasar y rotular.

Solución de reserva AB

9. Mezclar volúmenes iguales de la solución "A" y "B". Almacenar en refrigeración.

Revelador de Dragendorff (Preparar al momento de utilizar):

1. Pesar 10.0 g de ácido tartárico en un beaker de 100.0 mL (Beaker "C").
2. Agregar 50.0 mL de agua al beaker "C", agitar y adicionar 5.00 mL de solución de reserva (AB).
3. Envasar y rotular.

Preparación de: Reactivo revelador Kedde.

Kedde "A" (50 mL):

1. Pesar 1.0 g de ácido 3,5 dinitrobenzónico en un beaker de 50.0 mL (Beaker "A").
2. Agregar 30.0 mL de metanol al beaker "A" y agitar.
3. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 50.0 mL.
4. Realizar dos lavados al beaker "A" con 5.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.

5. Agitar el balón para homogenizar.
6. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.
7. Envasar y rotular.

Kedde "B" (50 mL):

8. Pesar 2.85 g de hidróxido de potasio en un beaker de 50.0 mL (Beaker "B").
9. Agregar 30.0 mL de metanol al beaker "B" y agitar.
10. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 50.0 mL.
11. Realizar dos lavados al beaker "B" con 5.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.
12. Agitar el balón para homogenizar.
13. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.
14. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Reactivo revelador de Komarowsky.

Solución "A" Ácido sulfúrico 50% (50 mL):

1. Medir 26.0 mL de ácido sulfúrico concentrado (96 %) en una probeta de 50.0 mL.
2. Transferir el volumen anterior a un beaker de 100.0 mL (Beaker "A").
3. Agregar 5.0 mL de agua al beaker "A".
4. Realizar un lavado a la probeta con 5.0 mL de agua y recibirlo en el beaker "A".
5. Dejar enfriar y una vez frío transferir la solución a un balón volumétrico de 50.0 mL.
6. Realizar dos lavados al beaker "B" con 5.0 mL de agua y recibirlos en el balón.
7. Aforar con agua y agitar para homogenizar.

Solución "B" (100 mL):

8. Pesar 2.0 g de 4-hidroxibenzaldehído en un beaker de 100.0 mL (Beaker "B").
9. Agregar 70.0 mL de metanol y agitar hasta disolver.
10. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 100.0 mL.
11. Realizar dos lavados beaker "B" con 10.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.
12. Agitar el balón para homogenizar.
13. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.

Revelador de Komarowsky (Preparar al momento de utilizar):

1. Medir 2.5 mL de la solución "A" y mezclarlos con 25 mL de la solución "B".

Preparación de: Reactivo revelador de Liebermann-Burchard (50mL).

Preparar al momento de utilizar

1. Medir 5.0 mL de anhídrido acético en una probeta de 10.0 mL.
2. Transferir el volumen anterior a un beaker de 50.0 mL (Beaker "A").
3. Agregar 5.0 mL de ácido sulfúrico concentrado al beaker "A" y colocar la mezcla en baño de hielo.
4. Una vez fría la mezcla, transferirla a un balón volumétrico de 50.0 mL. (mantener siempre el balón en baño de hielo).
5. Realizar dos lavados beaker "A" con 10.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.
6. Agitar el balón para homogenizar.
7. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.
8. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Solución de ácido sulfúrico 5% en etanol (50mL).

1. Medir 2.6 mL de ácido sulfúrico concentrado (96 %) en una probeta de 10.0 mL.

2. Transferir el volumen anterior a un beaker de 50.0 mL (Beaker "A").
3. Agregar 10.0 mL de etanol al beaker "A".
4. Realizar dos lavados a la probeta con 5.0 mL de etanol y recibirlo en el beaker "A".
5. Dejar enfriar y una vez frío transferir la solución a un balón volumétrico de 50.0 mL.
6. Realizar dos lavados al beaker "B" con 10.0 mL de etanol y recibirlos en el balón.
7. Aforar con etanol y agitar para homogenizar.
8. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Solución de gelatina al 5% m/v (100 mL).

1. Pesar 5.0 g de gelatina en un beaker de 100.0 mL (Beaker "K").
2. Pesar 10.0 g de cloruro de sodio en un vidrio reloj.
3. Agregar 70.0 mL de agua al beaker "K", calentar suavemente y agitar hasta disolver.
4. Una vez disuelta la gelatina, incorporar los 10.0 g de cloruro de sodio y agitar hasta disolver.
5. Dejar enfriar la solución transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
6. Realizar dos lavados al beaker "K" con 10.0 mL de agua y recibirlos en el balón volumétrico.
7. Aforar con agua y agitar para homogenizar.
8. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Solución de vainillina 1% en etanol (100 mL).

1. Pesar 1.0 g de vainillina en un beaker de 100.0 mL (Beaker "V").
2. Agregar 70.0 mL de etanol y agitar hasta disolver.
3. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 100.0 mL.

4. Realizar dos lavados beaker "V" con 10.0 mL de etanol y recibirlos en el balón volumétrico.
5. Agitar el balón para homogenizar.
6. Aforar con etanol y agitar para homogenizar.
7. Envasar, rotular y almacenar.

Preparación de: Tricloruro de hierro 1% en metanol (100 mL).

1. Pesar 1.0 g de tricloruro de hierro en un beaker de 100.0 mL (Beaker "M").
2. Agregar 70.0 mL de metanol y agitar hasta disolver.
3. Transferir el contenido a un balón volumétrico de 100.0 mL.
4. Realizar dos lavados beaker "M" con 10.0 mL de metanol y recibirlos en el balón volumétrico.
5. Agitar el balón para homogenizar.
6. Aforar con metanol y agitar para homogenizar.
7. Envasar, rotular y almacenar.