



Universidad de Oriente

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

en opción al título de Licenciado

en Ciencias Farmacéuticas

Título: Actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

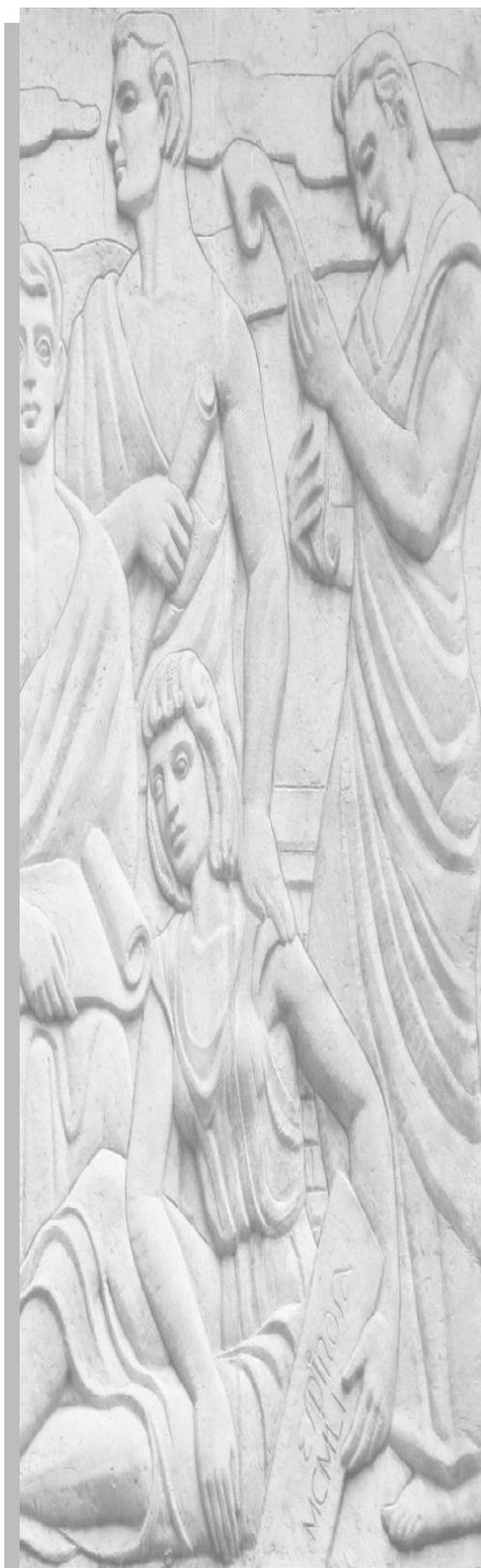
Autora: Yuselis Ramos Domínguez

Tutores: MSc. Yamilé Heredia Díaz

Asesora: MSc. Rosalia González Fernández

Santiago de Cuba

Curso: 2018-2019



A decorative rectangular frame made of gold-colored filigree. The frame is adorned with white lilies and green leaves at the top-right and bottom-right corners. The word "Pensamiento" is written in a green, cursive font across the center of the frame. A faint, larger version of the word "Pensamiento" is visible in the background behind the main text.

Pensamiento
Pensamiento



“Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida”.

Marco Aurelio

A decorative rectangular frame made of gold-colored filigree. The frame is adorned with white lilies and green leaves at the top-right and bottom-right corners. The word "Dedicataria" is written in a green, cursive font across the center of the frame. A faint, larger version of the word "Dedicataria" is visible in the background behind the main text.

Dedicataria

Dedico todo este esfuerzo a las personas que hicieron realidad mis sueños, especialmente a mis padres quienes han luchado hasta el final para verme triunfar, a mi hermano querido, a mi amado esposo quien no me ha dejado sola ni un momento en toda esta batalla y a quien le debo mucho por su gran amor y apoyo. A mis abuelos, que aunque ya no estén a mi lado sé que hoy estarán felices de mis resultados. A mi tía Edita, la más especial, por comportarse como una madre para mí en todo momento. En fin a todos los que hicieron este sueño realidad.





Agradecimientos

Sí hoy he llegado hasta aquí, es gracias a todas aquellas personas quienes me apoyaron y me hicieron comprender que todo en la vida se logra, con esfuerzo, pero se logra.

- ♥ *Primeramente le quiero agradecer a Dios por escucharme siempre y llenarme de valor y fuerza para salir adelante en los momentos más difíciles por los que he pasado y sobre todo por dejar que llegue hasta aquí.*
- ♥ *Le agradezco incondicionalmente a mis padres quienes han luchado sin cesar para que este sueño se me hiciera realidad, por estar siempre cuando los necesité, por su amor y gran apoyo, por sus buenos consejos. Gracias por la preocupación, el interés y responsabilidad que han tenido por mí, por ser mis padres, los amo.*
- ♥ *A mi único y maravilloso hermano, por su apoyo y sus consejos cuando lo he necesitado y por su gran deseo de que este día llegara a mi vida.*
- ♥ *Le doy las gracias a mi brillante esposo Enoeldis Martínez, quien ha compartido conmigo buenos y malos momentos en esta etapa de mi vida y nunca me ha dejado sola, por darme todo su amor y ayudarme a lograr esta meta de forma tan victoriosa, por guiarme y demostrarme ser más que un esposo: ser como un padre y una madre. Por aconsejarme y quererme como si fuera su hija o su hermana. Por dar todo por mí sin importarle precio. Gracias mi amor por estar a mi lado cuando mas necesité de una persona tan comprensiva como tú.*
- ♥ *A mi tía Edita por ser como una madre y estar conmigo en momentos difíciles, brindándome todo su amor y apoyo y*

por ayudarme a que este sueño se me cumpliera. Le agradezco además a mi tío Alexander y a mi prima Vida por su apoyo.

- ♥ *A toda mi familia en general por formar parte de ella.*
- ♥ *Gracias a mi compañera Bárbara, por extenderme su mano desde la primera vez que me conoció, por guiarme y apoyarme, por ser como una hermana, por estar en los buenos y malos momentos que pasé cuando ella estuvo presente. Gracias amiga.*
- ♥ *Le agradezco mucho a mis compañeras de aula, Marilín, Elinay, Isitania y a Karina por dedicarme de su tiempo cuando más las necesité, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, por sus consejos, por estar siempre ahí para mí. Por ser mis maravillosas compañeras de estudio.*
- ♥ *A Iliana, le doy gracias por ayudarme tanto, por estar presente en esta etapa de mi vida donde ha dado todo de ella para que yo salga adelante, por sus buenos consejos y quererme como una hija más.*
- ♥ *A Leo que es más que un amigo, es un hermano. Gracias por estar siempre para ayudarme en los momentos que más te necesité, por tus consejos, por cuidarme y quererme como tu hermanita, por hacer siempre lo que te pido sin mirar atrás y sin interés ninguno. Gracias por abrirme tu corazón.*
- ♥ *A mis compañeras Yadiana, Marlen y Marley quienes compartieron 3 maravillosos años a mi lado, mis queridas e incomparables compañeras de cuarto. Por querernos tanto como una familia y ser una para todas y todas para una, por ayudarme en mis estudios, y a pesar de que hoy estamos*

todas separadas seguimos queriéndonos de la misma forma, porque supimos ser buenas amigas.

- ♥ *Gracias a mis tutoras Rosalía y Yamilé por dedicarme su tiempo, paciencia y dedicación incondicional en la realización de este trabajo a pesar de las dificultades.*
- ♥ *Al profe Jesús quien estuvo siempre atento y preocupado por mi investigación.*
- ♥ *A Yarísbey, nuestra querida Chicha, gracias por comportante como una madre en los meses que trabajamos juntas. Por no dejarme sola y brindarme todo tu apoyo en la realización de este trabajo.*
- ♥ *Gracias a mi compañera Soilén y a mi hermanita Yení que aunque estén lejos siempre me apoyaron y no dejaron de darme fuerza para llegar hasta aquí.*
- ♥ *A todos mis compañeros de aula y carrera que formaron parte de mi vida estos 5 años, por los lindos momentos que pasamos unidos, por las risas y por las malas noches estudiando para un examen el siguiente día, gracias por formar parte de mi vida.*
- ♥ *A Margarita, Alexis, Alain y Eduardo por quererme como una más de la familia y por apoyarme siempre con mis estudios.*
- ♥ *A mis vecinos que siempre se preocupan por mí y me apoyaron de una forma u otra desde el principio para que lograra mi objetivo.*
- ♥ *A mi amigo Pablito por estar siempre atento de mis problemas y darme la mano, por aconsejarme y guiarme.*

- ♥ *Al profe Adián de química por ser como un padre y apoyarme desde el primer día que conocí la Universidad.*
- ♥ *A los profe de química que me ayudaron mucho en el desarrollo de esta investigación, quienes me dieron el frente cuando los necesité.*
- ♥ *A todos los profesores del departamento en general por contribuir a formarme una profesional ejemplar, por su profesionalismo y educación.*
- ♥ *A los amigos lejanos que siempre quisieron que este día llegara.*

En fin, a todas aquellas personas que contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad les doy de todo corazón:



A decorative frame made of gold filigree surrounds the text. The frame is adorned with clusters of white lilies with dark spots on their petals and green leaves. The lilies are positioned at the top right and bottom right corners of the frame. The word "Resumen" is written in a dark green, bold, cursive font, centered within the frame. A lighter, semi-transparent version of the same word is visible behind it.

Resumen
Resumen

RESUMEN

El *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., cuenta con escasos estudios científicos de actividad antimicrobiana, por lo que se pretende evaluar dicha actividad. Primeramente, al material vegetal recolectado (hojas), se le determinaron los parámetros farmacognósticos según la Norma Ramal de Salud Pública 309/91. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se obtuvo un extracto, al cual se le determinaron los parámetros físico-químicos según la Norma Ramal de Salud Pública 312/91, así como su contenido de fenoles y flavonoides totales a través del método de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. El extracto fue evaluado en su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y parásitos mediante métodos colorimétricos y de conteo directo. Se establecieron como parámetros farmacognósticos para la droga: humedad residual (11,5 %), cenizas totales (7,91 %), cenizas solubles en agua (2,64 %). Se seleccionó como mejor menstruo el etanol al 70% atendiendo a los resultados de sustancias solubles y su estabilidad microbiológica. Se identificaron los metabolitos siguientes: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos. El extracto total tuvo un olor característico, un color amarillo verdoso, densidad relativa de $0,9244 \pm 0,0651$; pH de 5,97, índice de refracción de 1,3605 y sólidos totales de 21,4 mg/100 mL. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 14,73 μg de ácido gálico/mg y 3,11 μg de quercetina/mg respectivamente. El extracto total no fue activo frente a bacterias y hongos evaluados, sin embargo exhibió una potente actividad frente a los parásitos, siendo *Trypanosoma brucei* ($\text{CI}_{50} = 2,48$) el más sensible.

A decorative frame made of gold filigree, featuring intricate scrollwork and floral motifs. The frame is adorned with several white lilies with dark spots on their petals and green leaves. The word "Abstract" is written in a green, cursive font across the center of the frame.

Abstract

ABSTRACT

Zanthoxylum fagara (L.) Sarg. is a shrub, which has scarce reports of antimicrobial activity. The aim of this study to evaluate the antimicrobial activity of its leaves. First, plant material (leaves) was collected, determining its pharmacognostic parameters according to the Public Health Standard 309/91. For the evaluation of the antimicrobial activity an extract was obtained, which was determined the physical-chemical parameters according to the Public Health Standard 312/91, as well as, its content of phenols and total flavonoids through the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods respectively. The *in vitro* antimicrobial activity of extract was evaluated against bacteria, fungi and parasites by colorimetric methods and direct counting. Pharmacognostic parameters for the plant material were established: residual moisture (11.5 %), total ashes (7.91 %), water soluble ashes (2.64 %). The solvent ethanol (70%) was selected as the best, based on the results of soluble substances and its microbiological stability. The following metabolites were identified: alkaloids, triterpenes and steroids, essential oils, flavonoids, carbohydrates, phenols and tannins. The total extract had a characteristic odor, a greenish-yellow color, relative density of 0.9244 ± 0.0651 ; pH of 5.97, refractive index of 1.3605 and total solids of 21.4 mg/100 mL. The content of phenols and total flavonoids was 14.73 μg de ácido gálico/mg and 3.11 μg de quercetina/mg respectively. The total extract was not active against bacteria and fungi tested, however it exhibited a potent activity against the parasites, being *Trypanosoma brucei* (IC₅₀ = 2.48) the most sensitive.

A decorative frame made of gold filigree surrounds the text. The frame is adorned with white lilies and green leaves, particularly concentrated in the top right and bottom right corners. The word "Índice" is written in a dark green, cursive font, with a lighter, semi-transparent version of the same word behind it.

Índice

CONTENIDO	PÁGINAS
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1. Generalidades del género <i>Zanthoxylum</i> .	4
I. 1.1. Estudios fitoquímicos.	4
1.1.2. Usos etnobotánicos del género <i>Zanthoxylum</i> .	9
I.1.3. Estudios farmacognósticos.	10
I.1.4. Antecedentes de estudios de actividades farmacológicas del género <i>Zanthoxylum</i> .	10
I.2. Generalidades de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) Sarg.	13
I.2.1. Taxonomía.	13
I.2.2. Hábitat y distribución.	13
I.2.3. Descripción botánica.	14
I.2.4. Estudios fitoquímicos.	14
I.2.5. Usos etnobotánicos.	15
I.2.6. Estudios de actividades farmacológicas.	15
I.3. Parámetros farmacognósticos de las drogas vegetales.	16
I.4. Parámetros físico-químicos de los extractos a partir de plantas medicinales.	17
I.5. Métodos para determinar la actividad antifúngica y antibacteriana <i>in vitro</i> .	18
I.6. Métodos para determinar la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> .	19
I.6.1. Modelos <i>in vitro</i> para <i>Leishmania</i> .	19
I.6.2. Modelos <i>in vitro</i> para <i>Trypanosoma</i> .	20
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	21
II.1. Características generales de la investigación.	21
II.2. Metodología de la investigación.	21
II.2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal.	21
II.2.1.1. Recolección.	21
II.2.1.2. Secado.	21
II.2.2. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	22
II.2.2.1. Determinación de la humedad residual.	22
II.2.2.2. Determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua.	22
II.2.2.3. Determinación de sustancias solubles en las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	23
II.3. Determinación de la composición química de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	24
II.4. Obtención y evaluación de la calidad del extracto total de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	25
II.4.1. Obtención del extracto total por percolación.	25
II.4.2. Determinación de los parámetros físico-químicos del extracto total.	26
II.4.2.1. Determinación de las características organolépticas.	26
II.4.2.2. Determinación de pH.	26

II.4.2.3. Determinación del índice de refracción.	26
II.4.2.4. Determinación de la densidad relativa.	27
II.4.2.5. Determinación de sólidos totales.	28
II.4.2.6. Determinación de la composición química cualitativa del extracto total.	28
II.4.2.7. Determinación de la composición química cuantitativa del extracto total.	28
II.4.2.7.1 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	28
II.4.2.7.2. Determinación del contenido de flavonoides totales por el método colorimétrico con cloruro de aluminio.	29
II.4.2.7.3. Determinación de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales en el extracto total de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	30
II.5. Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto total de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	30
II.5.1. Microorganismos.	31
II.5.2. Diluciones de la muestra de ensayo.	31
II.5.3. Actividad antibacteriana y antifúngica.	32
II.5.4. Actividad antiparasitaria.	33
II.6. Procesamiento y análisis estadístico de los resultados.	34
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
III.1. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	35
III. 1.1. Determinación de la humedad residual, cenizas totales y cenizas solubles en agua.	35
III.1.2. Determinación de sustancias solubles en las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	36
III.1.3. Determinación de la composición química cualitativa de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	38
III.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto total de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	40
III.2.1. Determinación los parámetros físico-químicos del extracto total.	40
III.2.2. Determinación de la composición química cualitativa del extracto total de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	42
III.2.3. Determinación de la composición química cuantitativa del extracto total de las hojas de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .	42
III.2.3.1. Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	42
III.3. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto total en etanol al 70% de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .	45
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXO	

A decorative frame made of gold filigree surrounds the text. The frame is adorned with several white lilies with dark spots on their petals and green leaves. The lilies are positioned at the top right and bottom right corners of the frame. The background is white.

Introducción

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se han utilizado por miles de años para el beneficio de la humanidad; ya sea como alimentos, ropa, cosméticos, construcciones, herramientas, medicamentos y agentes de protección de cultivos. Una de sus grandes contribuciones ha sido en la salud humana, lográndose aislar de ellas diferentes compuestos con actividad farmacológica demostrada, dentro de los que se pueden mencionar la quinina, la morfina, la aspirina (un análogo de un producto natural), digitoxina y muchos otros.

Las investigaciones en este campo son cada vez más numerosas, a tal punto que en los últimos años más de la mitad de los productos farmacéuticos usados son derivados de fuentes naturales, pues de ellos se pueden obtener nuevos compuestos (metabolitos secundarios bioactivos).¹ Van encaminadas al descubrimiento de alternativas terapéuticas más económicas, que permitan ahorrar en la obtención de medicamentos, una de estas es en el tratamiento de las infecciones producidas por los microorganismos.

Las necesidades terapéuticas insatisfechas en el tratamiento de infecciones bacterianas, parasitarias, virales y fúngicas, entre otras, han llevado a que la búsqueda de nuevas sustancias con aplicaciones terapéuticas sea indispensable. Actualmente los tratamientos convencionales con medicamentos sintéticos, son o han empezado a ser insuficientes debido al desarrollo de la resistencia antimicrobiana y a la baja seguridad que presentan los mismos para los pacientes.²

Las infecciones causadas por microorganismos se han convertido en una de las afecciones más difíciles y costosas de tratar, debido a la aparición de nuevas afecciones, al resurgimiento de estas que parecían haber sido controladas y al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.³

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural que está en continua evolución y constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, pues las bacterias se han adaptado rápidamente a diferentes agentes antimicrobianos debido a su inadecuado uso en medicina, en la alimentación de animales, en producción de cultivos y en productos de aseo. La rápida propagación de la multiresistencia ha generado

investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, a partir de las plantas medicinales.⁴

A nivel mundial el género *Zanthoxylum* perteneciente a la familia Rutaceae, tiene gran importancia desde el punto de vista económico por sus aplicaciones médicas, en la industria y la alimentación.⁵ Las especies de este género poseen un gran valor a nivel etnobotánico, de actividad biológica y fitoquímico. A nivel etnobotánico, se reporta que diversas especies han sido utilizadas en distintas partes del mundo para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos.⁶ Como por ejemplo en la tos, enteritis, diarrea, resfriados, reumatismo y úlceras.⁷ En el caso de la actividad biológica, se ha comprobado que algunos extractos y metabolitos secundarios aislados han mostrado interesante actividad insecticida, antitumoral, antioxidante, antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria.⁶ Por último, se ha logrado la identificación de los metabolitos secundarios más representativos tales como: alcaloides, lignanos, amidas, cumarinas, carbohidratos, flavonoides, terpenos y esteroides.⁵

En Cuba, este género se encuentra representado por 25 especies dentro de las que se encuentra la especie *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.⁸ El cual se conoce popularmente como: amoroso, aruña gato, limoncillo, tomeguín, zarza de tomeguín y tarro de chivo. Es un arbusto muy común en todas las costas secas y pedregosas de la Isla. Popularmente tanto las hojas como la corteza se utilizan por sus propiedades antipiréticas y sedantes.⁹

Se han reportado algunos estudios fitoquímicos de esta planta medicinal, en los cuales se ha demostrado la presencia de alcaloides¹⁰, lignanos, cumarinas⁹, saponinas, aceites esenciales¹¹, lactonas, azúcares reductores, fenoles y taninos.⁶ Estos compuestos pudieran estar relacionados con las propiedades farmacológicas que han mostrado diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas y la corteza del tallo, como son: antifúngica^{6,12}, antibacteriana¹¹, antiinflamatoria, y citotóxico.¹³

Teniendo en cuenta las diversas propiedades farmacológicas demostradas, la gran variedad en la composición química de esta y otras especies del género; además de los escasos estudios científicos de la actividad antimicrobiana en esta especie medicinal, se propone como problema científico:

Problema científico:

Insuficientes evidencias científicas sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. no posibilitan avalar su uso etnofarmacológico.

Hipótesis:

La evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. contribuirá a fundamentar científicamente su uso etnofarmacológico.

Objetivos**General:**

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

Específicos:

1. Determinar los parámetros farmacognósticos y la composición química cualitativa de las hojas de la especie.
2. Determinar la actividad antifúngica, antibacteriana y antiparasitaria de la especie.



Capítulo I
Capítulo I

Revisión bibliográfica
Revisión bibliográfica

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. Generalidades del género *Zanthoxylum*.

El género *Zanthoxylum* comprende arbustos y árboles de la familia Rutaceae que incluyen 250 especies nativas a las regiones templadas y subtropicales del mundo. El mismo tiene relevancia desde el punto de vista etnobotánico y se utiliza como fuente de materias primas farmacéuticas y de cosméticos.¹⁴ Entre los metabolitos secundarios más representativos del género *Zanthoxylum* podemos encontrar: alcaloides, lignanos, amidas, cumarinas, terpenos y flavonoides, pero también pueden hallarse esteroides y cromonas.¹⁵ La literatura reporta numerosos estudios fitoquímicos que han permitido el aislamiento y caracterización de estos metabolitos a partir de varias especies del género.

I. 1.1. Estudios fitoquímicos.

Los estudios fitoquímicos del género *Zanthoxylum* han demostrado la presencia de varios tipos de alcaloides, lignanos, cumarinas y amidas, los cuales tienen gran importancia quimiotaxonómica para el género. También se han identificado otros metabolitos como flavonoides, esteroides y terpenos.¹⁶

Alcaloides:

Los principales alcaloides aislados del género son de dos tipos: isoquinolínicos (bencilisoquinolina, aporfina, protoberberina, berberina¹⁷ y benzofenantridina) y quinolínicos^{18,19}, los cuales se encuentran distribuidos en todas las partes útiles de las plantas que conforman este género, prevaleciendo más en el tronco y en la raíz.²⁰ Dentro de los alcaloides isoquinolínicos, que se reportan con mayor frecuencia, se encuentran las benzofenantridinas, las cuales tienen una distribución muy limitada²¹ y solo se han aislado a partir de algunos géneros pertenecientes a las familias Papaveraceae, Fumiraceae y Rutaceae, donde son considerados marcadores quimiotaxonómicos. En la familia Rutaceae están presentes en especies de los géneros *Phellodendron*, *Fagaropsis*, *Tetradium*, *Toddalia* y *Zanthoxylum* (incluyendo *fagara*), prevaleciendo más en este último. Los principales representantes (Figura 1) son: fagaronina (compuesto 1), nitidina (compuesto 2), queleritrina (compuesto 3) y sanguinarina (compuesto 4).²²

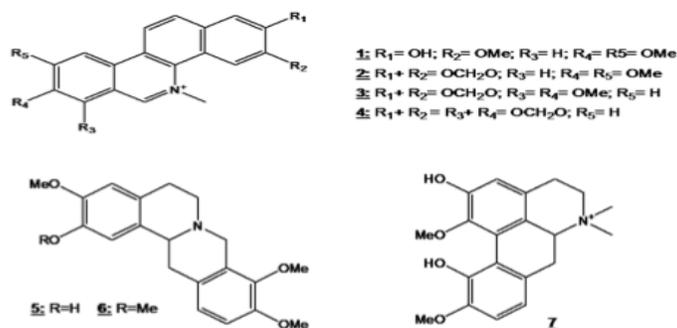


Figura 1. Estructura química de alcaloides isoquinolínicos aislados a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

La berberina y protoberberina han sido reportados en varias especies del género *Zanthoxylum*, por ejemplo tetrahydroberberinas (Figura 1), tales como N-metiltetrahydrocolumbamina (compuesto 5) y N-metiltetrahidropalmatina (compuesto 6), han sido aislados de la corteza de *Z. quinduense*.¹⁹ También se encuentran alcaloides de la aporfina (Figura 1), como por ejemplo: N, Ndimetilindarpina (compuesto 7), obtenido a partir de la corteza de la raíz de *Z. zanthoxyloides*.²³ Existen dos tipos de alcaloides quinolínicos que han sido reportado para las especies del género: las furoquinolinas y piranoquinolinas (Figura 2). De la corteza de la especie *Z. budrungase* han aislado las piranoquinolinas N-metilflindersina (compuesto 8) y la zantobungeanina (compuesto 9), mientras que la dictamina (compuesto 10) y eskimianina (compuesto 11) pertenecen al grupo de las furoquinolinas.²⁴ Por su parte, del *Z. simulans* se han aislado las piranoquinolinas zantosimulina (compuesto 12) y huajiaosimulima (compuesto 13).²⁵

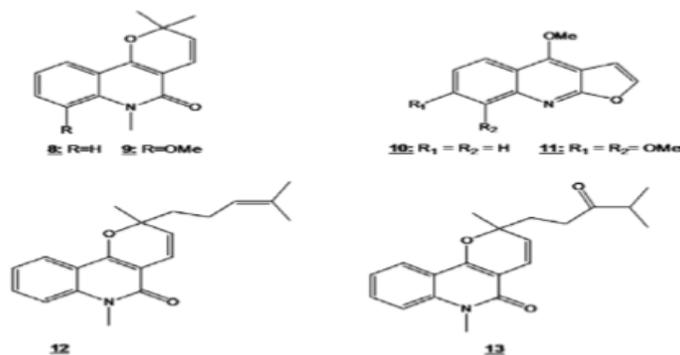


Figura 2. Estructura química de alcaloides quinolínicos aislados a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

Del extracto isopropanólico de la corteza de *Z. quinduensis* fueron aislados e identificados cinco compuestos, cuatro alcaloides benzofenantridínicos y un triterpeno. De los cuatro alcaloides, tres de ellos han sido aislados en otras especies del género *Zanthoxylum*, los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos como Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) incluyendo técnicas bidimensionales; así fueron identificados la norqueleritrina, nornitidina y arnotianamida.²⁶ Un estudio fitoquímico de la especie *Z. setulosum* permitió el aislamiento del alcaloide eskimmianina, lo cual confirma que los alcaloides quinolínicos pueden ser marcadores quimiotaxonómicos para el género *Zanthoxylum*.²⁷

Flavonoides:

Los flavonoides son un grupo aromático que están compuestos de dos anillos fenilos, ligados mediante un anillo pirano.²⁸ Los mismos representan para el género *Zanthoxylum* un marcador quimiotaxonómico. Nueve flavonoides de las hojas de *Z. bungeanum* fueron aislados y caracterizados por primera vez para esta especie. Sus estructuras fueron elucidadas por técnicas espectroscópicas como quercetina, afzelina, quercitrina, trifolina, quercetina-3-O β -D-glucósido, isorhamnetina 3-O- L-rhamnosida, hiperósido, vitexina y rutina.²⁹

Lignanos:

Los lignanos se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas superiores, específicamente en muchas de la familia Rutaceae, prevalecen generalmente en la corteza, raíz y en las hojas. En el género *Zanthoxylum* los lignanos más reportadas han sido de dos tipos, diarilbutirolactonas y 2,6-diaril-3,7- dioxabicyclo [3.3.0] octano.¹⁹ De las partes aéreas de *Zanthoxylum acuminatum* (Rutaceae) en Upala, Alajuela, Costa Rica se aislaron los lignanos: el dibencilbutirolactónico conocido como hinokinina (compuesto 14) y los cuatro lignanosbifuranos, la (+)-asarinina (compuesto 15), (+)-piperitol (compuesto 16), (+)kobusina (compuesto 17) y epi-kobusina (compuesto 18) (Figura 3). Las separaciones fueron realizadas con técnicas cromatográficas y las estructuras fueron elucidadas mediante técnicas de RMN 1D (Unidimensional) y 2D (Bidimensional).³⁰ Los

conocidos lignanos eudesmina, epieudesmina, sesamina y siringaresinol se han aislado de *Z. setulosum*.²⁶



Figura 3. Estructura química de lignanos aislados de especies del género *Zanthoxylum*.

Amidas:

Las amidas son compuestos que tienen importancia taxonómica para el género *Zanthoxylum* y se han encontrado principalmente en el pericarpio del fruto, hojas, tallos y raíces. Este género se caracteriza químicamente por la acumulación frecuente de alcanamidas olefínicas (amidas de ácidos alifáticos insaturados) y capacidad biogénica derivada de la condensación de ácidos grasos tales como linolenico y linoleico con aminas del tipo isobutilo. Un ejemplo lo constituye el compuesto denominado α -sanshool (compuesto 28), aislado de *Z. liebmannianum*.³¹

Otros tipos de amidas que se encuentran en este género son las amidas aromáticas, descritas ocasionalmente como alcaloides o transcinnamoilamidas. Un ejemplo típico es la syncarpamida (compuesto 29), la cual ha sido aislada del *Z. syncarpum*.³² (Figura 4).

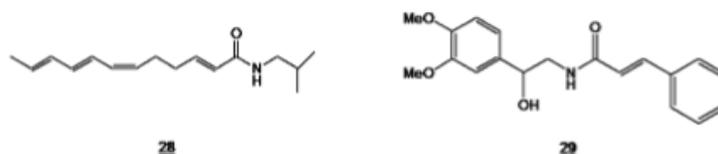


Figura 4. Estructura química de amidas aisladas a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

Cumarinas:

Las cumarinas se localizan en la madera y en los frutos de las plantas¹⁷ generalmente se encuentran en las familias Apiaceae y Rutaceae. También están presentes en las familias Asteraceae, Poaceae y Rubiaceae.³³ Estos metabolitos, se limitan a cuatro subfamilias

(Aurantioideae, Flindersioideae, Toddalioideae y Rutoideae). En la subfamilia Rutoideae está presente en el género *Zanthoxylum*, que se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de cumarinas (dihidrofurocumarinas, furocumarinas y piranocumarinas).³⁴ De la especie *Z. shinifolium* se aislaron varias terpenilcumarinas (Figura 5). Del tallo se aisló la larcinatina (compuesto 19), y de la corteza, se aislaron la auraptena (compuesto 20), la colinina (compuesto 21), y el psoraleno (compuesto 22).³⁵

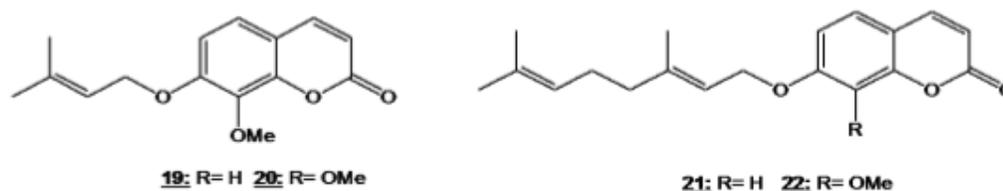


Figura 5. Estructura química de cumarinas aisladas a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

Esteroles:

Los esteroides son componentes comunes de muchas plantas, encontrándose distribuidos prácticamente en todos los órganos. Dentro de los esteroides reportados para el género (Figura 6), se encuentran: el β -sitosterol (compuesto 23) y el lupeol (compuesto 24), sustancia esta última que dentro de la familia Rutaceae aparece prácticamente restringida al género *Zanthoxylum*. El estigmasterol (compuesto 25), el campesterol (compuesto 26) y la β -amyrina (compuesto 27) han sido aislados de diversas partes de las especies de *Zanthoxylum* estudiadas.¹⁹

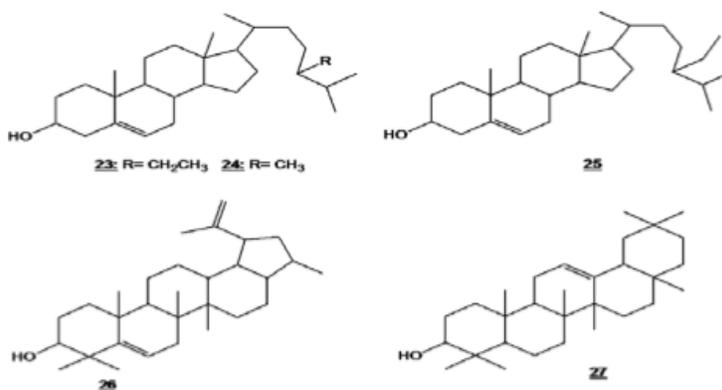


Figura 6. Estructura química de esteroides aislados a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

Compuestos volátiles:

En el género *Zanthoxylum*, se acumulan aceites volátiles principalmente en las hojas, flores y frutos. En este último órgano, se han realizado estudios con especies de este género (*Z. monophyllum*, *Z. rhoifolium* y *Z. fagara*), para determinar la composición química de aceites esenciales aislados por destilación a vapor. A través de la Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG/MS) se pudieron identificar los componentes principales del aceite de *Z. rhoifolium* (β -Mirceno compuesto 31, β -felandreno compuesto 32, y D-germacreno compuesto 33), el de *Z. monophyllum* (sabineno compuesto 34; 1,8-cineol compuesto 35, y cis-4-thujanol compuesto 36) y de el *Z. fagara* (D-germacreno-4-ol compuesto 37, elemol compuesto 38 y α -cadinol compuesto 39) (Figura 7).¹² Estudios de la composición de aceites esenciales, en especies costarricenses del género *Zanthoxylum* (*Z. fagara*, *Z. acuminatum*, *Z. melanostictum*, *Z. monophyllum*) revelaron la presencia de un gran número de terpenos principalmente monoterpénoides tales como linalol, 4-terpineol, α -terpineol, y trans-2-hexenol.³⁶

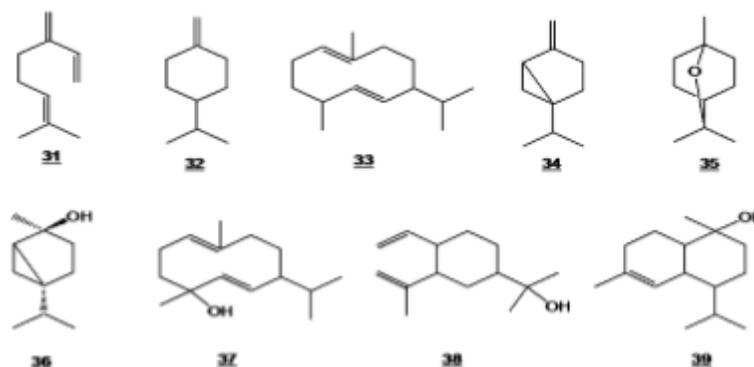


Figura 7. Estructura química de terpenos aislados a partir de especies del género *Zanthoxylum*.

1.1.2. Usos etnobotánicos del género *Zanthoxylum*.

Los conocimientos etnomédicos constituyen un potente instrumento de información que ha permitido y permite guiar, con cierta discriminación, las investigaciones científicas actuales en la búsqueda de nuevas terapias, ante una elevada diversidad de plantas

superiores por explorar. Diversas especies de este género han sido utilizadas en distintas partes del mundo para el tratamiento de disímiles afecciones en humanos y animales.²⁰

Los principales órganos vegetales de las especies de *Zanthoxylum* empleados en la etnomedicina son: la corteza (de diferentes partes de la planta), la raíz, las hojas y los frutos. Otras partes empleadas son las semillas, la madera, el tallo, las yemas, los rizomas, o bien la planta entera. Los métodos populares de extracción más utilizados son la infusión y la decocción, aunque también se emplean otras formas de preparación como: la extracción con aceite, el empleo de las cenizas de las plantas o reducción a polvo, la mezcla con grasa animal, la preparación de jugos, etc. Todos estos métodos de extracción utilizan el agua como principal o único disolvente.

Este género es muy conocido dentro de la medicina popular por sus propiedades curativas; algunas de sus especies son usadas, mayormente por los nativos, para calmar el dolor de muelas, la tos, la diarrea, el dolor de oídos, el vómito y el dolor de estómago producidos por parásitos intestinales, entre otras.⁷

I.1.3. Estudios farmacognósticos.

En un estudio realizado por Torres Y en el año 2018 a la especie *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb, se identificaron en un extracto etanólico a través de la técnica de tamizaje fitoquímico alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, saponinas, aceites esenciales y sustancias grasas, azúcares reductores, flavonoides, fenoles y taninos en todos los lotes evaluados. Además se pudieron establecer como especificaciones de calidad para la droga vegetal: Hojas ennegrecidas (no mayor que 2 %), materia orgánica (no mayor que 0,01 %) e inorgánica extraña (no mayor que 0,01 %.), humedad residual método azeotrópico (no mayor que 14 %), cenizas totales (no mayor que 10 %), cenizas solubles en agua (no mayor que 6 %), cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 % (no mayor que 3 %); sustancias solubles: en agua (mayor que 6 %), etanol al 50 (mayor que 16 %) y 95 % (máximo 85 %).³⁷

I.1.4. Antecedentes de estudios de actividades farmacológicas del género *Zanthoxylum*.

Se ha comprobado que este especies de este género poseen actividades farmacológicas tales como: antitumorales, antileucémicas, antimicrobianas, anti-VIH, antimaláricas,

antifúngica, amebicidas, giardicidas, tripanocidas, antileishmánicas y como repelente contra mosquitos.³⁸

Se utiliza además como antihelmíntico de uso en humanos y animales; como analgésico; tiene efecto afrodisíaco, es promotor de la concepción y contra la infertilidad; tiene acción contra diversas enfermedades de la piel, sarna y urticaria; febrífugo; antihemorrágico y para el tratamiento de afecciones respiratorias.⁶ Además son efectivas, contra el reumatismo, la amenorrea, dismenorrea, hipermenorrea, en el tratamiento de infecciones genitourinarias, sífilis y gonorrea. Otras propiedades etnomédicas que resultan interesantes, aunque no sean reportadas con tanta frecuencia como las anteriores, son: acción contra edemas, resolución de tumores, acción diurética, anticonvulsiva, tónica y estimulante.²⁰

El género *Zanthoxylum* es utilizado por la población como analgésico. Un ejemplo, es el estudio de alcaloides aislados y purificados a partir de un extracto acuoso de la raíz de *Z. xanthoxyloides*, el cual produjo una inhibición en la producción de prostaglandinas, ejerciendo una acción analgésica.³⁹

El fraccionamiento de un extracto de acetato de etilo a partir de las frutas de la especie *Z. limonella*, condujo al aislamiento del xantocilina, una sustancia con efectos alelopáticos sobre *Amaranthus tricolor* L y *Echinochloacrus galli* Beauv.⁴⁰ Extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de las hojas de la especie solventes, en la especie *Z. xanthoxyloide* mostraron actividad contra *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, especialmente los extractos con acetona y agua (70:30) y etanol de las hojas de esta especie.⁴¹

Otros estudios de actividad biológica demostraron la fuerte actividad de metabolitos aislados a partir de extractos alcohólicos. En el extracto metanólico de *Z. nitidumse*, *Z. integrifoliolum* y *Z. avicennae*, se identificaron alcaloides del tipo quinolínicos, lignanos y cumarinas, todos estos metabolitos exhibieron una fuerte actividad antiinflamatoria.⁴² El lupeol es otro de los metabolitos con efectos anti-inflamatorios, que se encuentra en la mayoría de las especies del género *Zanyhoxylum*.³⁶

Se demostró actividad antifúngica y antibacteriana de metabolitos aislados del *Z. tessmannii*, como por ejemplo: la 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona¹³ frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Por otra parte, el ácido 3 β , 16 β -hidroxibetulínico presentó una actividad débil sobre *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, mientras que el derivado acetilado 3 β -acetoxi mostró buena actividad sobre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.²⁷ Los extractos etanólicos y de diclorometano obtenidos a partir de la corteza del tallo de *Z. chalybeum* presentaron una fuerte actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.⁴³

El extracto metanólico de la corteza del tallo de *Z. nitidum* mostró marcada actividad de captación frente al radical DPPH, con una Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 77,8 $\mu\text{g/mL}$.⁴⁴ Los extractos obtenidos a partir de la corteza de tallo de *Z. alatum* en éter petróleo y acetato de etilo mostraron los resultados más relevantes frente al ensayo de captación del radical DPPH con valores de CI₅₀ de 85,16 y 72,39 $\mu\text{g/ML}$.⁴⁵ Más tarde Kamarkar I y colaboradores en 2016 evaluaron la actividad antioxidante del zanthonitrilo, líquido de color amarillo, aislado de las hojas de *Z. alatum* obteniendo una CI₅₀ de 7,86 $\mu\text{g/mL}$.⁴⁶ El extracto etanólico de la corteza del tallo de *Z. armatum* mostró una efectiva captación del radical DPPH, exhibiendo un marcado efecto antioxidante a bajas concentraciones.⁴⁷

El aceite esencial obtenido a partir de semillas del *Z. bungeanum*, el extracto etanólico de frutas del *Z. alatum* y los extractos hexánico, etéreo, metanólico y de acetato de etilo obtenidos a partir de frutos del *Z. piperitum*, demostraron tener propiedades antioxidantes.⁴⁸ Otra de las propiedades farmacológicas reportadas para especies del género es la antimalárica, demostrada en alcaloides, sesquiterpenos, lactonas, cumarinas, triterpenoides y limonoides, sustancias estas extraídas de *Z. chalybeum*, *Z. syncarpum*, *Z. zanthoxyloides*, *Z. gillettii*, *Z. limonella*, *Z. rhoifolium* y *Z. usambarense*. También se han obtenido resultados positivos de actividad antimalárica para el extracto etanólico de *Z. guilletti* y para el extracto de cloroformo a partir de las frutas de *Z. limonella*.⁴⁹ Se reportó además que el extracto etéreo de *Z. armatum*, mostró actividad insecticida significativa contra el mosquito *Culex* spp.⁵⁰ Los extractos del *Z. coreanum*, *Z. planispinum*

y *Z. schinifolium* exhibieron actividad antiviral con IC₅₀ de 1.0; 6.4; 7.5 y 3.7 µg/mL contra el virus de diarrea epidémica porcina. Tres especies del género *Zanthoxylum* (*Z. ailanthoides*, *Z. integrifolium* y el *Z. scandens*) mostraron actividad anti-VIH.⁵¹

En un estudio de actividad antitumoral, utilizando pericarpios secos de *Z. armatum*, se pudieron aislar varios compuestos que mostraron actividad inhibitoria del crecimiento celular frente a la línea celular neurofibromatosis tipo 153. Las propiedades anti-tumorales del aceite volátil y de los terpenos (α -humuleno, β -cariofileno, α -pineno y β -pineno) de las hojas de *Z. rhoifolium*, se estudiaron comprobándose su actividad citotóxica selectiva contra líneas de células tumorales.⁵² La investigación química llevada a cabo con raíces y frutas del *Z. leprieurii* logró el aislamiento de cuatro alcaloides derivados de la acridona, activos contra las células de carcinoma de pulmón (A549) y las células de adenocarcinoma de colo-rectal. En la especie *Z. simulans* se aislaron dos alcaloides: la zantosimulina (activa frente a las 13 líneas celulares de cáncer humano evaluadas) y la huajiaosimulina (activa frente a 6 de las 13 líneas evaluadas).⁵³

I.2. Generalidades de la especie *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

I.2.1. Taxonomía.

Reino: Plantae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Zanthoxylum*

Especie: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.⁵⁴



I.2.2. Hábitat y distribución.

Esta especie se encuentra distribuida en los Estados Unidos de América (Texas y Florida), México, América Central y del Sur, Bahamas y Antillas Mayores. En la parte occidental de Cuba, se puede encontrar en: Pinar del Rio, Habana, Matanzas, Isla de la Juventud. En el centro: Villa Clara (Manaca), Cienfuegos, Santi Espiritu, Ciego de Ávila (Cayo Coco), Camagüey, Las Tunas (Playa Herradura) y en el oriente: Granma entre Yara y Manzanillo, Holguín, Santiago de Cuba, Guantánamo. Esta planta crece en matorral xeromorfo costero

y subcostero, bosque semidecíduo microfilo, con frecuencia en vegetación secundaria, ocasionalmente en matorral xeroformo espinoso sobre serpina.⁸

I.2.3. Descripción botánica.

Es un arbusto o arbolito de 2-6 (-10) m de tallo tronco aculeado; ramas jóvenes zigzagueantes o geniculadas, pubéculas, usualmente con acúleos de 3-6 mm de largo, ligeramente recurvados, aislados. Hojas imparipinnadas, de 2,5-8 (-11) cm de largo; pecíolo de ≤ 2 cm de largo y raquis alados; folíolos 5 -13, subsésiles, obovados, ovales o suborbiculares, de 0,5 – 3 x 0,5 - 2 cm, cartáceos a coriáceos, pelúcido – glandulosos, redondeados a emarginados, de base cuneiforme o redondeada y margen acrenado distalmente, usualmente con domacios. Inflorescencias auxiliares en espiga, racimo espiciforme o fascículo de espigas o racimos, de 1- 2 cm de largo. Pedicelos de 0,3- 1 mm de largo. Flores 4- meras. Sépalos libres, romboidal – triangulares, de 1,2 – 1,5 mm de largo y ancho, glandulosos, de margen croso. Pétalos ovales u obovados, de 2 – 3 mm de largo, amarillo verdoso, de margen ciliado. Ovario 2 – mero; carpelos libres, con estípite delgado de (1-) 2 – 4, 5mm de largo; estilo terminal. Folículos (1-) 2, bivalvados, estipitados, de 2,5 – 3,5 (-4) mm de diámetro. Semillas globosas, de 2 – 2, 9 mm de diámetro, adheridas al pericarpo; hilo triangular o circular, de 0,8 – 1,2 mm de largo, a veces hundido.⁸

I.2.4. Estudios fitoquímicos.

En la especie *Z. fagara* mediante el tamizaje fitoquímico, se ha identificado la presencia de alcaloides en hojas, tallos y saponinas en este último órgano. El aceite esencial que contienen las hojas contiene alfa-bisabolol.⁸

En un estudio desarrollado por Macías V y colaboradores en el año 2011, se determinó en el análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de la corteza de *Z. fagara* la presencia de alcaloides, lo que es muy común en especies del género *Zanthoxylum*. También se encontraron resultados positivos para flavonoides, entre otros como: hiperina, quercetrina, 3,5-diacetiltambulina, (2S)-naringenina, quercetina, foeniculina, isorhamnetinao rutina; taninos y terpenos (lactonas terpénicas).¹⁵

En las hojas de *Z. fagara* se demostró que presentaba diferentes tipos de alcaloides terpénicos de bishordeninilo como la sinefrina, magnoflorina, laurifolina, skimmianina y escopoletina.¹⁰

Se realizó un estudio por Amaro y colaboradores donde se reportó la estructura del primer lignano de dibencilbutirolactona, el meridinol, mediante una separación cromatográfica del extracto etanólico de las hojas y tallos del *Z. fagara*. Esto fue determinado por la evidencia de sus datos espectroscópicos y una estructura de monocristal de rayos X.⁹

Se desarrolló un estudio en Costa Rica por Setzer y colaboradores donde se determinaron los componentes del aceite en las hojas de esta especie. El cual se obtuvo por hidrodestilación y posteriormente con análisis por cromatografía gaseosa y espectrofotometría de masas, obteniéndose los siguientes componentes: citronelol (26.1%), geraniol (15.3%), citronelal (11.3%), geranial (11.6%) y neral (9.6%).¹¹

Estudios realizados a las hojas han demostrado que estas presentan en su composición química: alcaloides^{6,55}, lignanos y aceites esenciales.⁹

I.2.5. Usos etnobotánicos.

Las hojas y la corteza de *Z. fagara* son utilizadas por sus propiedades antipiréticas y sedantes.⁹ Además la corteza es usada por ser estimulante arterial y nervioso ⁵⁶ y para el tratamiento de la sífilis.⁵⁵

I.2.6. Estudios de actividades farmacológicas.

Macías V y colaboradores en el año 2014 determinaron la actividad antiinflamatoria, antiproliferativa y antioxidante a la corteza de la especie *Z. fagara*. El extracto etanólico mostró una acción moderadamente efectiva contra la inflamación con un valor promedio de 45,3 % de inhibición.

Estos investigadores demostraron además la actividad antioxidante, con valores comprendidos entre 15 y 93 % (indicando que la actividad es dependiente de la dosis utilizada) para el ensayo DPPH; 93 % y 4-94 % para el ensayo de peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS) y para la peroxidación inducida con FeSO₄ respectivamente; se

logró una buena correlación entre los 3 ensayos con diferencias absolutas menores del 2 %.

En la actividad biológica antiproliferativa evaluada en el mismo estudio, el extracto resultó razonablemente eficiente a la concentración utilizada (20 µg/mL) en la inhibición del crecimiento de células de leucemia K562 con porcentaje de inhibición de 55,5 %, que mostró una selectividad marcada, puesto que para otras líneas celulares se obtuvo un porcentaje de inhibición inferior a 50 %, en un intervalo de 15 a 36 %.¹⁵

En estudio desarrollado por Setzer y colaboradores se demostró que el aceite de las hojas de *Z. fagara* y los componentes principales presentaron una actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus* (ATCCNo. 14579), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 27853), y *Aspergillus niger* (ATCC No. 16401). Estos mismos compuestos han sido evaluados para la actividad citotóxica contra MDAMB-231 (adecarcinoma de mama humano), Hs578T (humanocarcinoma ductal mamario) y 5637 (vejiga primaria humanacarcinoma).¹¹

I.3. Parámetros farmacognósticos de las drogas vegetales.

Es importante determinar y definir si el material vegetal contiene o no determinados componentes que puedan producir algún efecto en la actividad fisiológica del organismo y que por tanto ejerce la acción terapéutica deseada. Por lo que es necesario realizar un estudio farmacognóstico profundo que posteriormente contribuya a arribar a conclusiones respecto a la factibilidad biológica y económica de la especie. Dentro de estos parámetros se encuentran:

- Cenizas: estos son criterios para juzgar la identidad y la pureza de la droga vegetal: cenizas totales, cenizas sulfatadas, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido, etc.
- Contenido de humedad: Verificar el contenido de humedad ayuda a reducir los errores en la estimación del peso real del material de la droga. La baja humedad sugiere una mejor estabilidad contra la degradación del material vegetal. Existen diferentes métodos para determinar la humedad dentro de los que se encuentran: el método gravimétrico (pérdida por desecación: dentro del que se encuentra el de la estufa y el infrarrojo) y el azeotrópico (destilación con tolueno).

- Sustancias solubles: son compuestos que se extraen de la droga mediante la utilización de solventes como el agua, alcohol, o una mezcla hidroalcohólica, por maceración y evaporación hasta sequedad de una alícuota del extracto.
- Evaluación química cualitativa: abarca la identificación y caracterización de la droga vegetal con respecto a la composición fitoquímica. Emplea diferentes técnicas analíticas para detectar y aislar los componentes activos. Las técnicas de tamizaje fitoquímico implican la identificación botánica, la extracción con disolventes adecuados, la purificación y la caracterización de los constituyentes activos de importancia farmacéutica. Dentro de los componentes químicos que se determinan encontramos flavonoides, fenoles y taninos, alcaloides, lignanos, glicósidos, quinonas, cumarinas, etc.
- Existen otros como por ejemplo la comprobación de los requisitos macro morfológicos, determinación de los requisitos micro morfológico, hojas ennegrecidas, flores oscurecidas, otras partes de la propia planta, materia orgánica e inorgánica extraña y de aceites esenciales.^{57, 58}

I.4. Parámetros físico-químicos de los extractos a partir de plantas medicinales.

Con el objetivo de determinar si los extractos y/o tinturas poseen los requerimientos necesarios para tomarlas como base de un estudio farmacognóstico, se le determinan algunos parámetros de calidad, tales como: requisitos organolépticos, pH, índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales. Además se realizan otras determinaciones como el contenido promedio y el análisis capilar.

Finalidad de algunas de estas determinaciones:

- *Requisitos organolépticos*: Permite determinar color, olor y sabor de un determinado extracto y analizar si son característico de ellos, en caso de conocerse.
- *pH*: Permite conocer la concentración de iones hidronio o hidroxilos cuyo control es necesario para garantizar la estabilidad del extracto y su compatibilidad con otras sustancias, en caso de formar parte de una forma farmacéutica o con el sitio de aplicación o con las vías de absorción, si constituye un medicamento herbario).

- *Índice de refracción*: Mediante esta determinación se conoce el número de impurezas presentes y la transparencia de la solución alcohólica o hidroalcohólica. Permite identificar en ocasiones sustancias y comprobar su pureza.
- *Densidad relativa*: Mediante esta determinación se conoce la masa de sustancia por unidad de volumen con respecto a la masa de un volumen igual de agua a 4 °C.
- *Sólidos totales*: Permite determinar la cantidad de sólidos (cantidad total) disueltos en el extracto.⁵⁹

I.5. Métodos para determinar la actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro*.

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos.

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, dilución y bioautográficos, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo.⁶⁰

Métodos de difusión

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo.⁶¹ Presenta la ventaja de que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y colaboradores, (método de Kirby-Bauer).⁶²

Métodos de dilución

En los métodos de dilución, las muestras a evaluar pueden ser extractos, sustancias puras y muestras polares y no polares, permitiendo determinar los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).⁶³ Además, los valores de CMI a diferentes niveles se pueden calcular a partir de una curva dosis-respuesta. Presentan una mayor sensibilidad, permiten

diferenciar entre un efecto bactericida y bacteriostático, son económicos permitiendo evaluar un gran número de muestras y sus resultados son reproducibles y considerados como los métodos *in vitro* de referencia.⁶⁴

En los métodos de dilución el crecimiento del microorganismo puede medirse a través de la turbidez o empleando indicadores redox. La turbidez puede ser medida visualmente u obtenida por la medición de la densidad óptica a 450 nm. Por su parte, las técnicas redox emplean sustancias que pueden ser medidas por su cambio de coloración una vez que reaccionan con el sustrato bacteriano empleando lectores de placas y espectrofotómetro. Hoy en día los indicadores redox que más se utilizan son el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimeltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y la resazurina.⁶⁴

Métodos bioautográficos

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bioguiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de Cromatografía en Capa Delgada (CCD).⁶⁵ Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de CCD, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano.⁶⁶

I.6. Métodos para determinar la actividad antiparasitaria *in vitro*.

I.6.1. Modelos *in vitro* para *Leishmania*

Se han establecido pruebas empleando modelos animales, pero no resultan adecuados para ensayos primarios de gran escala en la búsqueda de nuevos productos. Por ello, varios ensayos *in vitro* contra *Leishmania* han sido desarrollados tanto para las formas extracelular (promastigotes) e intracelular (amastigotes).⁶⁷ El método por conteo directo es empleado para ambas formas del parásito, mientras que los ensayos colorimétricos empleando indicadores redox (azul de Alamar y el MTT) resultan útiles solo para las formas extracelulares. La especies viscerales *L. donovani* y *L. infantum* son unas de las

mejores para los ensayo anti-leishmanial, aunque el uso de la formas promastigotes no gozan de tanta aceptación por sus bajos niveles de validación.⁶⁴

I.6.2. Modelos *in vitro* para *Trypanosoma*

La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) y americana (enfermedad de Chagas) son causadas por las especies de *T. brucei* y *T. cruzi* respectivamente. Ambas enfermedades son clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades tropicales negligenciadas. Debido a la no patogenicidad para humanos que presenta la cepa *T. brucei* sensible a fármacos, la misma clasifica como la de primera elección en un ensayo primario. No obstante y si el laboratorio cuenta con la garantías de bioseguridad, las cepas *T. gambiense* o *T. rhodesiense* pueden ser empleadas en los ensayos. Para la evaluación de la actividad se han desarrollados métodos colorimétricos usando azul de alamar o resazurina como indicadores redox. A diferencia, la cepa *T. cruzi* clasifica como un patógeno altamente infeccioso, de ahí que las condiciones de bioseguridad en los laboratorios sean más estrictas siendo la cepa Tulahuen la más utilizada.⁶⁴ Recientemente una cepa modificada con el gen de β -galactosidasa, puede ser utilizada en un ensayo colorímetro mediante la adición de sustrato de clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG, acrónimo del inglés).⁶⁸

A decorative gold frame with intricate scrollwork and floral motifs. The frame is adorned with several white lilies and green leaves, particularly concentrated in the top right and bottom right corners. The text is centered within the frame.

Capítulo II
Capítulo II

Materiales y Métodos

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Características generales de la investigación.

Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de la especie *Z. fagara*. El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios: Tecnología Farmacéutica y MEDICUBA-SUIZA, del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente, Cuba; Toxicología y Biomedicina, Universidad de Ciencias Médicas, Cuba y por último en el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Amberes, Bélgica, en el período comprendido de octubre del 2018 a junio del 2019.

II.2. Metodología de la investigación.

II.2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal.

II.2.1.1. Recolección.

Las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., fueron recolectadas en horas de la mañana, en el Palenque (poblado de Siboney) del municipio Santiago de Cuba. Una muestra de la planta herborizada fue sometida a identificación taxonómica (Anexo I) por el Ing. Félix Acosta Cantillo del Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO), en el museo Tomás Romay, del mismo municipio mencionado anteriormente, para corroborar que se trataba de la especie en estudio con un número de herbario asignado.

II.2.1.2. Secado.

La droga vegetal colectada se pesó en una balanza técnica marca Nagema (alemana), posteriormente se secó a la sombra ya que esta especie presenta aceites esenciales⁶, hasta llegar a peso constante, fue molinada en un molino de cuchilla marca MRC Modelo KM700 (Suiza).

II.2.2. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

II.2.2.1. Determinación de la humedad residual.^{58, 69}

La humedad residual se le determinó a las hojas de *Z. fagara* a través del método azeotrópico. Utilizando un balón de 500 mL, se transfirió 200 mL de tolueno, se añadieron 2 mL de agua, luego se puso la manta de calentamiento, se destiló en el equipo de determinación de agua por el método de tolueno hasta que el volumen de agua en el tubo colector permaneció constante y se midió el volumen inicial de agua (V_1). Se dejó enfriar el tolueno (tolueno saturado). De la muestra de ensayo pulverizada y tamizada, se pesaron 10 g, con un error máximo de 0,5 mg y se transfirieron al balón que contenía el tolueno saturado; se puso en la manta de calentamiento nuevamente y se destiló hasta que el volumen del agua en el tubo colector permaneció constante y se midió el volumen final de agua (V_2).

Expresión de los resultados: El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresado en % se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$H = ((V_2 - V_1) / M) \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

V_1 : volumen de agua inicial

V_2 : volumen final de agua (mL)

M: masa de la muestra

100: factor matemático para los cálculos.

Aproximación de los resultados e informe: Los resultados se aproximaron hasta la décima. El ensayo se realizó por duplicado. Se informó el promedio de las dos determinaciones del % de humedad.

II.2.2.2. Determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua.^{58, 69}

Para la determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua, se empleó una mufla marca YUDIAN de procedencia china y las pesadas fueron realizadas en una balanza analítica de marca SARTORIUS. Cada determinación se realizó a partir de 2 g de la muestra.

Cenizas totales (C_t): Los cálculos se efectuaron por las siguientes ecuaciones matemáticas:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$C_t = \frac{C_1 \times 100}{100 - H} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

C_1 : Cenizas totales en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M_1 : Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

H: % humedad.

Cenizas solubles en agua (CSA):

Las *cenizas solubles en agua* se determinaron a partir de las cenizas totales, luego de disolver las mismas en agua destilada. Los cálculos se desarrollaron utilizando las siguientes ecuaciones matemáticas:

$$C_1 = \frac{M_2 - M_4}{M_1 - M} \times 100 \quad \text{Ecuación 4} \quad CSA = \frac{C_1 \times 100}{100 - H} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

C_1 : % cenizas solubles en agua en base hidratada

M: masa del crisol vacío (g).

M_1 : masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M_2 : masa del crisol con las cenizas totales (g).

M_4 : masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

H: % de humedad.

II.2.2.3. Determinación de sustancias solubles en las hojas de *Zanthoxylum fagara*.^{58,69}

El ensayo de sustancias solubles se llevó a cabo a partir de 5 g de la droga vegetal seca pulverizada. Los menstruos utilizados fueron agua, etanol al 30%, 70% y 95%. Los cuales se seleccionaron para lograr extraer la mayor variabilidad de sustancias solubles en disolventes con diferentes polaridades. Los cálculos fueron realizados empleando la siguiente ecuación matemática:

$$S_s = \frac{(R \times 500 \times 100)}{(M \times (100 - H))} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

H: humedad de la muestra en %.

500 y 100: factores matemáticos para los cálculos.

R: residuo de la muestra (g).

M: masa de la muestra (g).

Los menstros se escogieron teniendo en cuenta la diversidad de metabolitos que posee esta especie medicinal. Se consideraron índices de polaridad (IP) cercanos a los empleados en la elaboración de preparaciones farmacéuticas vegetales y la relativa inocuidad de los mismos. El etanol es un solvente de mediana polaridad de amplio uso que permite extraer sustancias polares, apolares, y es utilizado en diferentes proporciones, como vehículo en las preparaciones farmacéuticas. Mientras que el agua permite la extracción de sustancias con características polares. Los menstros seleccionados permitieron estudiar un rango de polaridad desde mediana (IP=5) hasta alta polaridad (IP=8).

II.3. Determinación de la composición química de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

Para la detección de los metabolitos secundarios se obtuvieron extractos a partir de las hojas secas de la especie *Z. fagara*, utilizando solventes en orden creciente de polaridad acorde a la técnica tradicional conocida como tamizaje fitoquímico. Se partió de 10 g de droga seca pulverizada en 100 mL de solvente. La extracción fue realizada por maceración durante 48 h y agitación dos veces al día. Se realizaron extracciones sucesivas, con n-hexano, etanol al 95% y agua.⁶⁹ Se tuvieron en cuenta en cuenta los ensayos de los metabolitos secundarios que se han identificado en estudios anteriores realizados por diferentes autores a esta planta medicinal.¹⁵

Se aplicaron ensayos cualitativos a los diferentes extractos obtenidos, a través de reacciones químicas en dependencia de la polaridad de los mismos, para la identificación de: **alcaloides** (Dragendorff, Mayer, Wagner), **triterpenos y esteroides** (Solkowski, Liebermann-Burchard, Rosemheim), **quinonas** (Borntrager, variante con benceno), **cumarinas** (Baljet, Legal, hidroxamato férrico), **saponinas** (espuma), **resinas** (resinas), **mucílagos** (mucílagos), **aceites esenciales** (Sudan III, papel blanco sin reactivo), **azúcares reductores** (Fehling, Benedict), **fenoles y taninos** (cloruro férrico, gelatina, cafeína),

aminoácidos y aminos libres (ninhidrina), **carbohidratos** (Molisch), **flavonoides** (ácido sulfúrico concentrado, Shinoda, álcalis, Rosemheim), **principios amargos y/o astringentes** (sabor).⁶⁹

II.4. Obtención y evaluación de la calidad del extracto total de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

Una vez seleccionado el mejor menstuo en el ensayo de sustancias solubles, se procedió a la obtención del extracto total a partir de las hojas de *Z. fagara*, a través del método de percolación hasta agotamiento total de la droga a temperatura ambiente.

II.4.1. Obtención del extracto total por percolación.

El extracto total se obtuvo mediante el proceso de percolación el cual se realizó acorde al procedimiento descrito en la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP 311)⁷⁰. Para ello se pesaron 200 g de droga seca, se humectaron con 200 mL por 1 h y luego se cargó el percolador en el cual se añadieron 8 L de etanol. El percolador, cuyo orificio de salida se cubrió con papel de filtro, se dejó abierto para lograr la salida de la primera alícuota del solvente y luego se cerró. Se recirculó la tercera parte del volumen del líquido contenido en el percolador y luego se dejó macerar durante 24 h. Se realizaron cinco extracciones sucesivas hasta lograr el agotamiento total de la droga. El volumen final de extracto obtenido fue de 8 L, el cual se dejó reposar por 24 horas y se filtró a vacío. Después se tomó una parte del mismo y se le determinaron algunos parámetros fisicoquímicos y el resto se concentró en un rotoevaporador (KIRKA–WERKE/Alemania) a 40 °C hasta sequedad y se liofilizó en un liofilizador marca alpha 1-2 LD plus/Alemania, para realizar la determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales, además de la actividad antimicrobiana.

El método de extracción empleado (percolación), es uno de los más utilizados en la preparación de diferentes fitofármacos.^{75, 77} Además, posee como ventajas que requiere de poco tiempo de operación, permite el agotamiento casi completo del material extraído, garantizando un buen proceso extractivo de principios activos, no necesita de

aplicación de calor y es aplicable en preparaciones a pequeña y a gran escala.⁶⁹ Este método también se ha utilizado en otras investigaciones para la elaboración de extractos etanólicos a partir de las hojas de la especie en estudio.¹⁵

II.4.2. Determinación de los parámetros físico-químicos del extracto total. ^{59, 69}

Al extracto total obtenido se le determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: características organolépticas, pH, índice de refracción, densidad relativa, contenido de sólidos totales, composición química cualitativa y cuantitativa (fenoles y flavonoides totales).

II.4.2.1. Determinación de las características organolépticas:

- *Determinación del olor:* Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si corresponde con la característica del producto.
- *Determinación del color.* Se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

II.4.2.2. Determinación de pH:

Se determinó según se establece en NC 90-13 Aseguramiento metrológico. Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH, empleando un pH-metro digital (Everich) con un electrodo combinado de vidrio y calomel con control de temperatura (25 °C).

II.4.2.3. Determinación del índice de refracción:

Sobre el prisma de medición de un refractómetro ABB Alemán de la Carlseiss Jena, se colocó una gota de agua, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos. Luego se esperó unos minutos y se ajustó el instrumento al índice de refracción correspondiente al agua a una temperatura de 25 °C, con una tolerancia de +/- 0,2 °C. Se limpiaron los

prismas cuidadosamente empleando un algodón húmedo con solución de alcohol y éter etílico 50 % v/v. Con la varilla de vidrio se colocó en el prisma fijo, sin tocarlo, una o dos gotas de la muestra de ensayo. Se cerró el doble prisma y se esperó unos minutos antes de efectuar la lectura, hasta que la temperatura fue estable.

Como la muestra era de color transparente, se utilizó luz transmitida, o sea, se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termoprisma y se enfocó la luz a través del prisma de iluminación.

II.4.2.4. Determinación de la densidad relativa:

De la muestra de ensayo se tomó la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfrió a 25°C. Se pesó el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de +/- 0,5 mg y se llenó con la muestra de ensayo de modo que no quedaran burbujas de aire, y se empleó una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra. Se sumergió en un baño de agua a (25 +/- 1 °C) durante 30 min, al cabo de las cuales se tapó, se secó exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesó.

Se vació el picnómetro, se lavó con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25 °C.

La densidad relativa (D) se calculó mediante la ecuación matemática siguiente:

$$D = (m_1 - m) / (m_2 - m) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

m: masa del picnómetro vacío (g).

m₁: masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g).

m₂: masa del picnómetro con agua (g).

Si la determinación se ha hecho a la temperatura t se emplea la ecuación matemática siguiente:

$$d_{25}^{25} = d_{25}^t + 0,00080 (t - 25) \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

d₂₅^t: densidad relativa a la temperatura de medición.

t: temperatura de la medición(°C).

0,00080: factor de corrección.

II.4.2.5. Determinación de sólidos totales:

De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfirió 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en un baño de agua y se evaporó hasta que el residuo quedó aparentemente seco, posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105 +/- 2 °C durante 3 horas.

Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta que se obtuvo una constante.

Los sólidos totales S_t se calcularon mediante la ecuación matemática siguiente:

$$S_t = (Pr - P) / V \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

P_r : masa de la cápsula más el residuo (g)

P: masa de la cápsula vacía (g)

V: volumen de la porción de ensayo (mL)

100: factor matemático

II.4.2.6. Determinación de la composición química cualitativa del extracto total:

Se aplicaron ensayos cualitativos descritos en el tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos secundarios, excepto para carbohidratos; siguiendo la misma metodología ya descrita en el **acápito II.3.**⁶⁹

II.4.2.7. Determinación de la composición química cuantitativa del extracto total:

II.4.2.7.1 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico) descrito en la Farmacopea Británica 2010.⁷¹ El mismo oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno - tungsteno de color azul.

Determinación cuantitativa por espectrofotometría visible. Procedimiento: Se mezcló 2 mL del extracto de 1mg/mL con 1mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 10 mL de agua

destilada y se diluyó hasta 25 mL de una solución de carbonato de sodio. Luego se dejó reposar 30 minutos y se midió la absorbancia a 760 nm, usando agua destilada como blanco. La medición de la absorbancia se realizó en un Espectrofotómetro UV/VIS de la firma PG Instruments modelo T60. Se cuantificó la cantidad de compuestos fenólicos solubles totales presentes en el extracto, mediante la construcción de una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Los resultados se expresaron como μg equivalente de ácido gálico/mg del extracto. La muestra ensayada se preparó por triplicado.

Preparación de la curva de calibración con patrón de referencia de ácido gálico.

Se preparó una curva de calibración en un rango de concentraciones de 6,4 a 19,2 $\mu\text{g/mL}$ empleando como sustancia patrón de referencia el ácido gálico. Cada nivel de concentración se realizó por triplicado. Se evaluó el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer a través de los parámetros estadísticos siguientes: coeficiente de correlación y determinación, significación estadística del intercepto y coeficiente de variación de la pendiente.⁷²

II.4.2.7.2. Determinación del contenido de flavonoides totales por el método colorimétrico con cloruro de aluminio

La presencia de flavonoides totales en el extracto total se determinó por el método colorimétrico con cloruro de aluminio en etanol absoluto a 415 nm. Este método se basa en el salto batocrómico que produce la adición del cloruro de aluminio al 2% en etanol absoluto, por formación de un complejo estable con la función 4 ceto-5 hidroxil presente en un gran número de flavonoides. En este caso el catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides de color amarillo, lo que producen un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores e intensifica la absorción, siendo posible cuantificar la cantidad de flavonoides y evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas que acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales.

Determinación cuantitativa por espectrofotometría visible. Procedimiento: Se mezcló 2 mL del extracto a una concentración de 1mg/mL con 2 mL de una solución de cloruro de aluminio al 2 %, se esperó 1 h y luego se midió la absorbancia a 420 nm, usando todos los

reactivos utilizados sin la muestra de ensayo como blanco. La medición de la absorbancia se realizó en un Espectrofotómetro UV/VIS de la firma PG Instruments modelo T60, mediante la construcción de una curva patrón usando como estándar quercetina. Los resultados se expresaron como μg en equivalente de quercetina/mg de extracto.⁷³

Preparación de la curva de calibración con patrón de referencia de quercetina.

Se preparó una curva de calibración en un rango de concentraciones de 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ empleando como sustancia patrón de referencia la quercetina. Cada nivel de concentración se realizó por triplicado. Se evaluó el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer a través de los parámetros estadísticos siguientes: coeficiente de correlación y determinación, significación estadística del intercepto y coeficiente de variación de la pendiente.⁷³

II.4.2.7.3. Determinación de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales en el extracto total de *Zanthoxylum fagara*.⁷³

La concentración equivalente, tanto de ácido gálico como de quercetina ($\mu\text{g}/\text{mg}$), se obtuvo por interpolación en la curva de calibración de la absorbancia medida al extracto total. La ecuación matemática empleada para el cálculo de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales, expresadas como ácido gálico y quercetina, respectivamente, fue:

$$\text{Conc. del Extracto} = \text{Conc. Equivalente} \times \text{Factor mat. de dilución} \quad \text{Ecuación 10}$$

II.5. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto total de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

Al extracto total a partir de las hojas de *Z. fagara*, se le determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y a *Trypanosoma brucei* (parásito) a través de métodos colorimétricos con resazurina y para el ensayo con *Trypanosoma cruzi* (parásito) se utilizó el sustrato clorofenol rojo-B-D-galactopiranosido. Mientras que para las formas amastigotes de *Leishmania infantum* (parásito) se utilizó el método de conteo directo de tinción con solución de Giemsa al 10 %.

Teniendo en cuenta que dentro del género *Zanthoxylum* existen plantas medicinales a las cuales se les ha probado la actividad antimicrobiana, además de que la especie *Z. fagara*,

también ha presentado esta actividad pero en extractos preparados de la corteza del tallo y que la población la utiliza para bajar la fiebre,⁵⁶ lo cual pudiera estar relacionado con procesos infecciosos, se determinó la actividad antimicrobiana de un extracto total, mediante un ensayo *in vitro* integral contra un panel de microorganismos integrado por bacterias, hongos y parásitos.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron en el laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene del Departamento de Ciencias Farmacéuticas; de la Universidad de Amberes, Bélgica, a través del Proyecto VLIR IUC-Uso.

II.5.1. Microorganismos.

Para el desarrollo del ensayo se utilizaron las siguientes cepas de microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Candida albicans* ATCC B59630 (*azol resistente*). Las bacterias fueron cultivadas en medio MHB (acrónimo del inglés Mueller Hinton Broth) y mantenidas en medio Triptona-Soya-Agar. Los hongos se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI acrónimo en inglés)-1640 (Gibco-BRL, EE.UU). Todos los cultivos y ensayos se realizaron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Las cepas fueron proporcionadas por la colección de cultivo del Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de referencia europea perteneciente a la Universidad de Amberes, Bélgica.

Para la actividad antiparasitaria se utilizaron las cepas de *Leishmania infantum* MHOM/MA (BE)/67, *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen CL2, β galactosidasa (*sensible a nifurtimox*), *Trypanosoma brucei var brucei* Squib 427 (*sensible a suramina*, las cuales fueron proporcionadas por el propio Laboratorio de la Universidad de Amberes. *Leishmania infantum* fue mantenida en Golden Hámster (*Mesocricetus auratus*) y las cepas de *T. cruzi* sobre células MRC-5_{SV2} en medio MEN, suplementado con 200 mM de L-glutamina, 16,5 mM de NaHCO₃ y 5% de suero fetal bovino. El medio Hirumi (HMI-9) fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino se utilizará para mantener la cepa de *T. brucei var brucei*.

II.5.2. Diluciones de la muestra de ensayo.

El extracto total se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO, BDH, Poole, Inglaterra) 100% a una concentración madre de 20 mg/mL. A partir de esta disolución las muestras fueron diluidas sucesivamente 1:2 en agua desmineralizada hasta obtener 6 niveles de concentración: 128-4 µg/mL para realizar una curva de calibración y con esta determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Se emplearon como fármacos de referencia: doxiciclina (*S. aureus* y *E. coli*), flucitosina (*C. albicans*), miltefosina (*L. infantum*), benznidazol (*T. cruzi*) y suramina (*T. brucei*); todos se compraron a Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos.

II.5.3. Actividad antibacteriana y antifúngica.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias y hongos se utilizaron la prueba fluorométrica con resazurina ⁷⁴. Los ensayos fueron realizados en microplacas estériles de 96 pocillos. Diez microlitros de cada una de las muestras diluidas en agua se adicionaron a cada pocillo junto con 190 µL del inóculo de la bacteria (5×10^5 UFC/mL) y hongo (5×10^3 UFC/mL). El crecimiento microbiano se comparó con los pozos controles no tratados, (100% crecimiento celular) y con los pozos controles que contienen sólo el medio de cultivo (0% de crecimiento celular). Las placas se incubaron bajo condiciones según el microorganismo: bacterias (17 h a 37 °C), levadura (24 h a 37 °C), micobacteria (7 días a 37 °C), hongo (7 días a 27 °C). Luego se adicionaron 20 µL de resazurina ($c(x)=50$ µg/mL) por pozo y las placas se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones y por el tiempo requerido según el tipo de microorganismo: (*S. aureus*: 15 min, *E. coli*: 45 min y *C. albicans*: 24 h. Posteriormente se determinó el porcentaje de crecimiento microbiano por fluorimetría a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de 590 nm de emisión en un fluorímetro para microplacas (TECAN GENios, Alemania). Los resultados se expresaron como concentración media inhibitoria CI_{50} determinada por regresión lineal a partir de las concentraciones evaluadas, expresados como la media de dos experimentos realizados.

II.5.4. Actividad antiparasitaria.

Ensayo frente a *Leishmania infantum*

Las formas amastigotes de *L. infantum* se colectaron del bazo de un hámster infectado mediante tres pasos de purificación por centrifugación. Macrófagos peritoneales primarios de ratón se colectaron después de la estimulación peritoneal con una suspensión de fécula de papa al 2% y se utilizaron como células hospederas. El ensayo se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos, las que contenían 10 μ L de cada una de las muestras a las concentraciones preparadas por pocillo junto con 190 μ L del inóculo macrófago/parásito ($3 \times 10^5/3 \times 10^6$). Después de 5 días de incubación a 37 °C en 5% de CO₂, se realizaron la tinción con solución de Giemsa al 10 % y se determinó el grado de infectación por conteo directo mediante un microscopio, así como la citotoxicidad sobre las células hospederas. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de la infectación comparada con los pocillos controles no tratados. La CI₅₀ se calculó mediante regresión lineal, expresados como la media de dos experimentos realizados.

Ensayo frente a *Trypanosoma brucei*

El ensayo se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos, las que contenían por cada pocillo 10 μ L de cada una de las muestras a las concentraciones preparadas junto con 190 μ L de la suspensión de trypomastigotes de parásitos ($1,5 \times 10^4$ para *T. b. brucei*)⁷⁵. Después de tres días de incubación, a cada pocillo se adicionaron 50 μ l de resazurina. Posteriormente las placas se incubaron por 24 horas para *T. b. brucei*, luego se realizó la lectura de las mismas en un fluorímetro en microplacas (TECAN GENios, Alemania) a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de 590 nm de emisión. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del crecimiento del parásito en comparación con los controles y la CI₅₀ se calculó mediante regresión lineal expresada como la media de dos experimentos realizados. El crecimiento del parásito se comparó con los pocillos controles infectados no tratados, (100% crecimiento celular) y con los pocillos controles no infectados (0% de crecimiento celular).

Ensayo frente a *Trypanosoma cruzi*

En este ensayo 190 μL del inóculo de células MRC-5_{SV2} (4×10^3 /pocillo) infectadas con las formas trypomastigotes del parásito (4×10^4 parásitos/pocillo) se sembraron, junto con 10 μL de las muestras a cada una de las concentraciones en microplacas estériles de 96 pocillos. El crecimiento del parásito se comparó con los pocillos controles infectados no tratados, (100% de crecimiento celular) y con los pocillos controles no infectados (0% de crecimiento celular) después de 7 días de incubación (37 °C). Posteriormente a cada pocillo se le adicionaron el sustrato clorofenol rojo-B-D-galactopiranosido (CPRG, acrónimo en inglés) y las microplacas se incubaron durante otras 4 horas a 37 °C. El grado de infestación del parásito se midió espectrofotométricamente a 540 nm.⁶⁸ Los resultados se expresaron como reducción de la infestación en comparación con los controles y la CI_{50} se calculó mediante regresión lineal expresada como la media de dos experimentos realizados. Se consideró activo el extracto cuando presentara una CI_{50} por debajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁶⁴

II.6. Procesamiento y análisis estadístico de los resultados.

Para el procesamiento matemático y análisis estadístico de los resultados se utilizó el software Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2007 y el software STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.14. En el ensayo de sustancias solubles se realizó un análisis de comparación de varias muestras y se compararon las medias de los diferentes disolventes empleando el test de Mínimas y Máximas Diferencias Significativas de Tukey-HSD. Los datos experimentales obtenidos para la curva patrón de ácido gálico y quercetina, se analizaron por regresión lineal utilizando del programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.II. Los criterios de aceptación para evaluar la linealidad fueron:

- ✓ Ecuación de la recta.
- ✓ Coeficiente de correlación superior a 0,99.
- ✓ Coeficiente de determinación superior a 99.
- ✓ Coeficiente de determinación ajustado superior a 99.
- ✓ Prueba de falta de ajuste, el valor de probabilidad debe ser mayor que 0,05.



Capítulo III
Capítulo III

Resultados y Discusión

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

El secado total de las hojas empleando el método al aire (sombra) duró 10 días. Este proceso modificó la coloración verde de las hojas a un color carmelita y con esto la friabilidad de las mismas, lo que facilitó la disminución del tamaño de partículas.

III. 1.1. Determinación de la humedad residual, cenizas totales y cenizas solubles en agua.

El exceso de agua en las drogas vegetales puede promover el crecimiento de hongos, la presencia de insectos o provocar la hidrólisis de compuestos activos que se encuentran en el material vegetal y por consiguiente su posterior deterioro. Es por ello que los límites en el contenido de agua en las plantas deben ser determinados para cada una, estableciéndose en las Normas^{58,76} y Farmacopeas⁷¹, un rango de un 8 a 14 % de humedad residual para drogas no oficiales.

La humedad residual determinada por el método azeotrópico a las hojas de la especie *Z. fagara* estuvo dentro de los límites establecidos por la bibliografía de referencia, la cual fue de $11,5 \pm 0,70$ % (Tabla 1). Lo que indica que el secado a la sombra permite que se conserve y se mantenga la calidad de las mismas, para ser usadas como posible materia prima, lográndose una mayor conservación por un tiempo prolongado. También se evita la proliferación de microorganismos y degradación de metabolitos que sean volátiles con una posible actividad farmacológica.

Tabla 1. Comportamiento de la humedad residual, cenizas totales y solubles en agua para la droga seca.

Droga seca	H (%) \pm S	C _T (%) \pm S	C _{SA} (%) \pm S
	11,5 \pm 0,70	7,91 \pm 0,04	2,64 \pm 0,48

Leyenda: H, Humedad residual; C_T, Cenizas totales; C_{SA}, Cenizas solubles en agua

El contenido de cenizas totales fue otro de los parámetros determinados, indicativo de la calidad del material con que se trabaja y constituyen una base para juzgar su pureza e

identidad. También brinda información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas, cuerpos extraños o la cantidad de estos elementos en su contenido.⁷⁷ Este parámetro está asociado a la presencia de material inorgánico en las hojas, o sea, microelementos inorgánicos que almacena la planta para su desarrollo metabólico.⁷⁸

El contenido de cenizas totales fue de $7,91 \pm 0,04$ % (Tabla 1), el cual excedió del límite permisible reportado en las Farmacopeas que es hasta el 5 %.^{71, 79} Este comportamiento pudiera estar relacionado a la presencia de cenizas fisiológicas de esta droga vegetal, que es la cantidad remanente después de la ignición del material, derivadas de los tejidos celulares.⁵⁷ Además de la posible presencia de metales alcalinos, alcalino-térreos o metales pesados en las hojas.⁸⁰ Por lo que se recomienda realizar la determinación del contenido de metales en la droga seca.

En el Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos de nuestro país se reportan en varias especies valores elevados en este parámetro como es el caso de la *Foniculum vulgare* Mill.= *Anethum foeniculum* L. (hinojo) CT no mayor que 10,0 %, *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga, confitillo) CT no mayor que 18,0 %, *Mentha spicata* L. (toronjil, toronjil de menta, yerba buena) CT no mayor que 18, 0 % y *Plantago major* L. (llantén mayor) CT no mayor que 18, 0 %.⁸¹ La diversidad en las diferentes especies vegetales, está asociada a las características del suelo donde se recolectan las mismas y al poder acumulativo de elementos de naturaleza inorgánica, fundamentalmente, del órgano que se estudie.⁷⁷ Un estudio realizado por Torres Y en el 2018 a la especie *Zanthoxylum pistaciifolium* (Griseb) obtiene para cada lote estudiado valores cercanos a los de esta investigación.³⁷

La cantidad de cenizas solubles en agua también ayudan a evaluar la pureza de la droga. Al analizar los resultados obtenidos en las hojas de *Z. fagara*, se pudo evidenciar que se haya entre $2,64 \pm 0,48$ % (Tabla 1), obteniéndose pequeños valores, lo que demuestra que una pequeña parte de las cenizas totales de esta droga presenta características polares.

III.1.2. Determinación de sustancias solubles en las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

La determinación de sustancias extraíbles o solubles, se realiza cuando no existen métodos adecuados para determinar los constituyentes activos de las drogas vegetales por procesos físicos o físico-químicos o cuando lo exige la monografía de la Farmacopea. Generalmente se determinan con agua, etanol y raramente, con éter. Este método se basa en la solubilidad de estas en un solvente dado y cuando no son conocidas, en la actividad farmacológica del extracto obtenido con el solvente.⁸² Este ensayo es uno de los índices numéricos más importantes para seleccionar los mejores disolventes en el proceso de extracción.

En la figura 8 se muestra el comportamiento del parámetro sustancias solubles para la droga seca de la especie *Z. fagara*. Como se puede observar, de manera general se obtuvieron mayores rendimientos en los extractos preparados con los disolventes de mayor polaridad (agua y etanol al 30 %, pues estos dos tienen índices de polaridad muy cercanos 9 y 8 respectivamente). No siendo así para el caso del resto de los menstros empleados. Esto indica que las sustancias extraídas tienen un alto índice de polaridad. Según el análisis de varianza multifactorial realizado, existen diferencias estadísticas y numéricas en todos los menstros utilizados, obteniéndose un p-valor menor que 0,05 (0,0000), con un nivel del 95,0 % de confianza.

Teniendo en cuenta que los disolventes que resultaron ser mejores en la extracción de sustancias solubles no fueron estables microbiológicamente durante la preparación del extracto, se seleccionó el etanol al 70 % como el mejor menstro, donde se garantiza la extracción de sustancias y la estabilidad del extracto, pues se evita la proliferación de microorganismos.

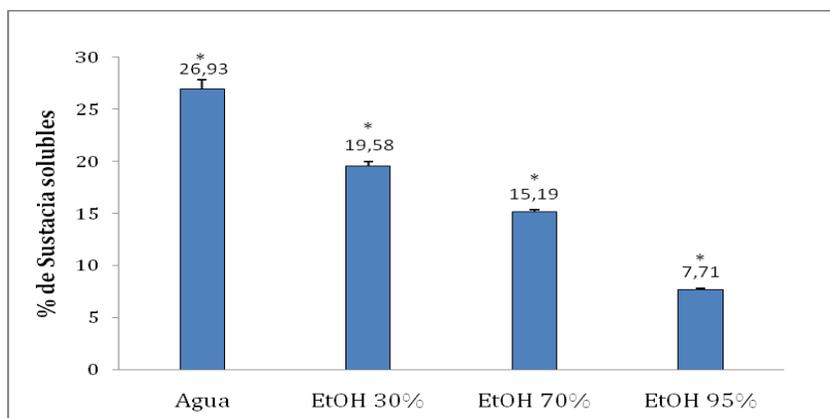


Figura 8. Resultado del ensayo de sustancias solubles

Leyenda: El * encima de los números significa que existen diferencias estadísticas en las medias obtenidas para cada disolvente.

Atendiendo a los resultados obtenidos, en la humedad residual, cenizas totales, cenizas solubles en agua y sustancias solubles, se propone como patrón preliminar de calidad para las hojas de *Z. fagara* los valores de: H ($11,5 \pm 0,70$ %); CT ($7,91 \pm 0,04$ %); CSA ($2,64 \pm 0,48$ %) y el mejor menstruo para la extracción de sustancias en esta especie resultó ser el etanol al 70%.

III.1.3. Determinación de la composición química cualitativa de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

La determinación cualitativa de metabolitos secundarios es de gran valor, debido a que estos, son los responsables de las actividades farmacológicas atribuidas por la población a las diferentes plantas medicinales. Estos juegan un papel principal en la adaptación de las especies al medio ambiente y en la superación de las condiciones de estrés.⁸³ Es por ello que en esta investigación se realizó el tamizaje fitoquímico a las hojas de la especie *Z. fagara* con tres solventes diferentes (n-hexano, etanol al 95% y agua).

Los extractos de las hojas obtenidos a partir de extracciones sucesivas con los tres solventes, fueron sometidos a ensayos químicos de caracterización cualitativa (Tabla 2). En el extracto de n-hexano se obtuvo como evidencia positiva la presencia de aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos. Considerando la pobre diversidad de

metabolitos extraídos, se infiere que este solvente resulta poco útil en la extracción de metabolitos secundarios de las hojas de la especie. En el caso del extracto con etanol al 95%, se detectaron un mayor número de familias químicas, resaltando positivas las pruebas de alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos. En el extracto preparado con agua solamente se obtuvieron resultados positivos en los ensayos para carbohidratos y flavonoides. Al igual que en el solvente n-hexano, el agua resultó ser menos efectivo en la extracción de metabolitos secundarios en la planta en estudio.

La mayor variabilidad de metabolitos se obtuvo en etanol al 95%. Teniendo en cuenta que este solvente es universal, de mediana polaridad, extrae tanto compuestos polares como no polares, es el más usado en las preparaciones de fitofármacos y permite extraer y preservar los compuestos presentes en las plantas, se puede justificar el comportamiento obtenido para esta las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

Tabla 2. Resultados de la determinación de la composición química cualitativa de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*

Metabolitos	Extractos		
	n-hexano	etanol al 95%	Agua
Alcaloides	–	+++	±
Triterpenos y esteroides	–	+	n/r
Quinonas	n/r	–	n/r
Cumarinas	–	±	n/r
Saponinas	n/r	–	–
Resinas	n/r	–	–
Mucílagos	n/r	–	–
Aceites esenciales	+	+	n/r
Azúcares reductores	n/r	±	–
Fenoles y taninos	+	+	–
Aminoácidos libres y aminas en general	n/r	–	n/r
Carbohidratos	n/r	n/r	+
Flavonoides	++	++	++
Principios amargos y/o astringentes	n/r	–	–

Leyenda: +++ (abundante), ++ (moderado), + (escaso), ± (dudoso), – (negativo) y n/r (no se realiza)

Existen varios antecedentes de estudios fitoquímicos realizados a las hojas de *Z. fagara*, en los que coinciden algunos de los resultados obtenidos en este estudio, pues se han detectado la presencia de alcaloides^{10, 55} y aceites esenciales.¹¹ Los cuales son marcadores quimiotaxonómicos de esta especie.

Para otras especies del género *Zanthoxylum*, resultan comunes los informes sobre la presencia de los mismos tipos de metabolitos determinados en este tamizaje fitoquímico. Dentro de los que podemos citar a los alcaloides, los cuales son los compuestos más relevantes, ya que se han aislado en la mayoría de las especies de este género y en todos los órganos de las plantas. La literatura científica consultada, reporta estudios en los frutos de *Z. coriaceum* y en la corteza del tallo de *Z. elephantiasis* y *Z. martinicense* a partir de los cuales se han aislado alcaloides del tipo quinolona, quinolina y benzofenantridina.¹³ Los triterpenos son otros de los metabolitos que resultan comunes en la mayoría de las especies del género, especialmente el compuesto conocido como lupeol.⁵ Los flavonoides son sustancias de muy amplia distribución entre las plantas. En el género *Zanthoxylum* se han aislado flavonoides glicosilados derivados de flavonol, flavonoles, flavonas y flavanonas.⁸⁴

En sentido general, las pruebas químicas cualitativas realizadas, sugieren que las familias químicas que componen las hojas de la especie estudiada son: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos, muchas de las cuales coinciden con estudios anteriores realizados en otras especies del género.⁵

III.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto total de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

III.2.1. Determinación los parámetros físico-químicos del extracto total.

Después de seleccionar el mejor menstuo para la extracción de sustancias solubles (etanol al 70%), se procedió a preparar un extracto total a partir de las hojas de *Z. fagara*, al cual se le determinaron los parámetros físico-químicos y la actividad antimicrobiana, a

través del método de percolación hasta agotamiento total de la droga a temperatura ambiente.

La determinación de los parámetros físico-químicos resulta de gran importancia en el establecimiento de estándares que garanticen la calidad de la droga vegetal para ser usada como materia prima y por consiguiente lograr una mayor eficacia y seguridad del producto terminado de interés farmacéutico.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos del extracto total.

ET	Olor	Color	DR (%) ± S	pH (%) ± S (T 25 °C)	IR (%) ± S (T 25 °C)	ST (%) ± S (mg/100ml)
	Característico	Amarillo verdoso	0,9244 ± 0,0651	5,97 ± 0,061	1,3605 ± 0,0004	21,4 ± 0,0424

Legenda: ET (Extracto total), DR (Densidad relativa), IR (Índice de refracción), ST (Sólidos totales).

Dentro de los parámetros físico-químicos determinados al extracto total de las hojas de *Z. fagara* (Tabla 3), se encuentran las características organolépticas, las cuales varían en los diferentes preparados farmacéuticos en dependencia del modo de preparación. En este caso al tratarse de un extracto total los parámetros evaluados fueron el color y el olor. Este presentó un olor característico propio de la especie y un color amarillo verdoso, que va en correspondencia con el que adquieren las hojas una vez que se secan.

Otro de los parámetros determinados fue la densidad relativa, la cual fue de $0,9244 \pm 0,0651$ relacionando este resultado obtenido con la densidad del agua, ambas se determinaron a la misma temperatura. También se determinó el valor del pH el cual fue de $5,97 \pm 0,061$ siendo ligeramente ácido. Este comportamiento pudiera estar relacionado con la presencia de algunos metabolitos que le aportan acidez al preparado farmacéutico, los cuales se identificaron en el tamizaje fitoquímico realizado tanto a la droga como al extracto total. Dentro de los que se destacan compuestos fenólicos como: fenoles, taninos y flavonoides, los cuales presentan en su estructura un grupo hidroxilo, que es el responsable de aportar la ligera acidez. Otros metabolitos que pudieran estar relacionados con este resultado son: los triterpenos y esteroides.⁸⁵

El índice de refracción (n) de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es valioso en la identificación de sustancias y en la detección de impurezas.⁸⁶ Se determinó el índice de refracción dando un valor de $1,36 \pm 0,0004$ a una temperatura de 25°C conociendo de esta manera el número de impurezas presentes y la transparencia del extracto. Los sólidos totales fueron de $21,4 \pm 0,042$ mg/100 mL; el cual puede ser utilizado como criterio de concentración en ensayos biológicos.

Todas estas determinaciones constituyen los primeros parámetros físico-químicos de calidad a monitorear durante el proceso extractivo de las hojas de *Z. fagara*. Estableciendo que el extracto debe tener un olor característico al de la especie, un color amarillo verdoso, una densidad relativa ($0,9244 \pm 0,0651$), un pH ($5,97 \pm 0,061$), un índice de refracción ($1,3605 \pm 0,0004$) y los sólidos totales ($21,4 \pm 0,0424$ mg/100 mL), en las mismas condiciones experimentales que se preparó este extracto, aunque en este último parámetro pueden influir las condiciones ambientales del lugar de recolecta.

III.2.2. Determinación de la composición química cualitativa del extracto total de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

En el tamizaje fitoquímico realizado al extracto total de la especie *Z. fagara*, se obtuvieron resultados similares a los de la droga seca. En el mismo se evidenció la presencia de alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos. Pues en el caso de los triterpenos y esteroides fue dudoso y carbohidratos no se realiza por ser un extracto en etanol. En otros estudios realizados a extractos de las hojas se ha evidenciado la presencia de alcaloides y aceites esenciales.^{10, 55}

Existen coincidencia de estos resultados con los descritos en otras investigaciones de *Z. fagara* pero en otros órganos. Como por ejemplo en el extracto etanólico de la corteza seca se obtenido por el método de percolación con etanol al 96 %, se detectó la presencia de alcaloides ^{6, 13,15}, flavonoides ¹⁵, fenoles y taninos ^{6, 13,15}, principalmente. También se han aislado del extracto etanólico obtenido de la corteza (estado fresco) estos mismos metabolitos excepto flavonoides.⁶ Y por último en los frutos de *Z. fagara* se han

identificado como compuestos mayoritarios del aceite esencial el D - germacreno -4-ol, elemol y α -cadinol.⁵

III.2.3. Determinación de la composición química cuantitativa del extracto total de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

III.2.3.1. Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto de *Zanthoxylum fagara*.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles son grupos químicos presentes en múltiples especies de plantas. Aquellos más representativos son los taninos, aun cuando otros grupos químicos también lo presentan en su estructura como son: algunos aminoácidos y proteínas, los flavonoides, lignanos, cumarinas, entre otras estructuras.⁸⁷

Cuando se aplican técnicas de análisis colorimétricas, la selección del modelo de calibración apropiado es importante para la determinación cuantitativa de los fenoles totales. Por tanto, es necesario investigar la relación entre la concentración del patrón de ácido gálico y la absorbancia de las muestras ensayadas. Para ello se preparó una curva patrón de ácido gálico en el rango de concentraciones de 6,4 a 19,2 $\mu\text{g/mL}$ y para quercetina el rango de concentraciones fue de 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$ y se evaluó, en ambos casos se evaluó el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

La interpretación estadística de la regresión lineal de la curva de ácido gálico, permitió comprobar que todos los parámetros estudiados cumplen los criterios de aceptación (Figura 9).⁷² El coeficiente de correlación es mayor que 0,99 y el de determinación superior a 99; además este último es cercano al coeficiente de determinación ajustado. La prueba de falta de ajuste fue no significativa ya que el p valor es mayor que 0,05; lo que

permite afirmar la significativa correlación lineal entre los valores de concentración estudiados y las respuestas obtenidas. Por los resultados antes expuestos se afirma que la curva sigue un modelo lineal con un 95,0 % de confianza. Se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0,055x - 0,092$.

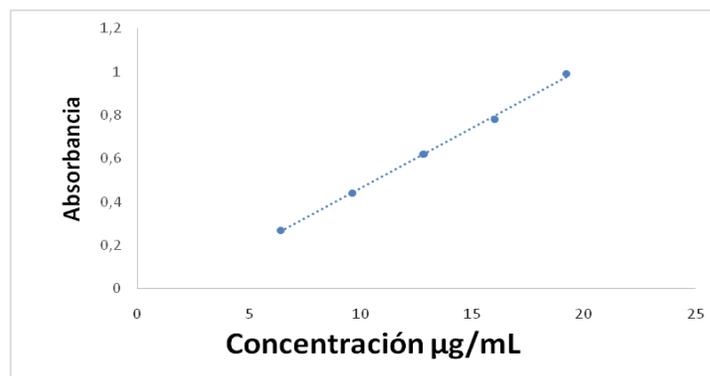


Figura 9. Curva de calibración de ácido gálico

En el caso de la curva de calibración con quercetina como patrón, a diferentes concentraciones la recta y los parámetros estadísticos que la describen (Figura 10) son los siguientes: $y = 0,0726x + 0,0203$; $R^2 = 0,9931$; $F=434,03$; $p=0,0002$; p -intercepto= $0,1768$. Bajo estas condiciones se puede afirmar que la ecuación obtenida puede ser empleada para la determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados como quercetina.

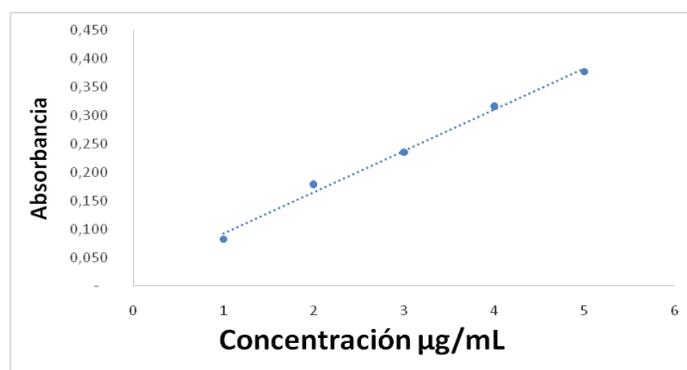


Figura 10. Curva de calibración de quercetina

Con estos resultados se verificó el cumplimiento de la Ley de Lambert Beer, confirmando que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. Por lo que las rectas

de regresión lineal obtenidas se pueden utilizar como modelo de calibración para determinar el contenido de fenoles totales en el extracto total.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos tanto en el contenido tanto de fenoles como de flavonoides totales en el extracto de *Z. fagara*, obteniéndose que para el primero fue de $14,73 \pm 0,26$ μg de ácido gálico/mg y en el caso del segundo fue de $3,11 \pm 0,16$ μg de quercetina/mg. De esta planta no existen reportes del contenido de fenoles ni de flavonoides totales.

Aunque existen reportes en otros órganos de especies del género *Zanthoxylum*, donde se han podido cuantificar ambos metabolitos. Tal es el caso de los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo a partir de la corteza del tallo de *Zanthoxylum alatum*, obteniéndose valores máximos del contenido de fenoles totales de 5,12 y 4,36 mg/g de ácido gálico respectivamente.^{88,89} Para esta misma especie se realizó otro estudio en el 2016, donde el contenido de fenoles y flavonoides totales en un extracto metanólico fue de $89,2 \pm 0,59$ mg / g y $63,8 \pm 0,34$ mg / g respectivamente.⁴⁶ También extractos en metanol ($59,34 \pm 0,13$ mg/g de ácido gálico) y acetona ($34,24 \pm 0,25$ mg/g de ácido gálico) de las frutas del *Zanthoxylum armatum* han presentado un alto contenido de fenoles totales. Mientras que el contenido de flavonoides fue de $0,82 \pm 0,03$ mg/g de quercetina).⁹⁰

En los tres estudios los valores reportados tanto de fenoles como de flavonoides totales resultaron ser superiores a los obtenidos en esta investigación, aunque hay que tener en cuenta que se utilizaron otros órganos de la planta diferentes al que se utilizó en *Z. fagara*. Y en dependencia del órgano que se utilice el contenido de los metabolitos secundarios puede variar, ya que ellos se acumulan en dependencia de las necesidades fisiológicas de las plantas. Además en la producción de estos pueden influir tanto factores extrínsecos como intrínsecos.⁵⁷

Tabla 4. Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto.

Extracto total	Contenido de fenoles totales (μg de ácido gálico/mg \pm S)	Contenido de flavonoides totales (μg de quercetina/mg \pm S)
----------------	---	---

	14,73 ± 0,26	3,11 ± 0,16
--	--------------	-------------

III.3. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto total en etanol al 70% de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

Las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias, hongos, virus y parásitos todavía son una amenaza mayor en la salud pública, a pesar del gran progreso en la medicina humana. Su impacto es mayor en los países en vías de desarrollo debido a la indisponibilidad relativa de medicinas. Además de la resistencia antimicrobiana, ya que los microorganismos la han creado a través de mutaciones genéticas y otros mecanismos de resistencia. Siendo de gran importancia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas como es el caso de extractos o sustancias puras aisladas de plantas medicinales.

Uno de los géneros que está constituido por especies con diversas propiedades farmacológicas es el *Zanthoxylum*. En el cual se han demostrado propiedades antimicrobianas del *Z. americanum*⁹¹, *Z. leprieurii*, *Z. xanthoxyloides*⁹², *Z. martinicense*, *Z. elephantiasis*⁹³, *Z. acanthopodium*, *Z. articulatum*⁹⁴, *Z. monophyllum*, *Z. usambarensense*⁹⁵, *Z. guilletii*⁹⁶, *Z. armatum*.^{97,98}

La actividad antimicrobiana del extracto total del *Z. fagara* fue evaluada en la presente investigación aplicando métodos colorimétricos (bacterias y hongos). Además de estos métodos en el ensayo contra parásitos se utilizó el de conteo directo.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana del extracto total.

Muestras	Bacterias y hongos Cl ₅₀ µg/mL			Parásitos Cl ₅₀ µg/mL ± S		
	Ec	Sa	Ca	Tbr	Tc	Lin
ET	>128	>128	>128	2,48 ± 1,38	13,19 ± 13,17	13,19 ± 4,29

Leyenda: ET (Extracto Total), Ec (*Escherichia coli*), Sa (*Staphylococcus aureus*), Ca (*Candida albicans*), Tbr (*Trypanosoma brucei*), Tc (*Trypanosoma cruzi*), Lin (*Leishmania infantum*), Cl₅₀ (Concentración Inhibitoria media), S (Desviación Estándar).

Como se puede observar en la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana del extracto total a partir de las hojas de la especie *Z. fagara*. Se consideró activo el extracto cuando presentara una Cl₅₀ por debajo de 100 µg/mL.⁶⁴

El extracto total evaluado no resultó activo frente a las cepas de las bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) y del hongo ensayado (*Candida albicans*). Estos resultados no coinciden con reportes realizados por varios autores donde un extracto etanólico obtenido de la corteza de esta especie se evaluó frente a *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Microsporium canis* y *Trichophyton mentagrophytes* y exhibió más significativa actividad antifúngica, en comparación con los otros extractos evaluados de otras especies de *Zanthoxylum*.⁶

En otro estudio se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de esta misma especie frente a diferentes cepas gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio cholerae* caso clínico) y gram-positivas (*Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus epidermidis*), utilizando el método de difusión en agar. El mismo presentó inhibición para las cepas de *B. subtilis* (17 mm), *V. cholerae* El Tor (11 mm), *V. cholerae* caso clínico (10 mm) y *S. epidermidis* (9 mm).⁷ El extracto de la raíz de *Z. zanthoxyloides* mostró ser una fuente probable de compuestos con un amplio espectro antimicrobiano frente a *E.coli* y *S.aureus*.⁹⁹

En una investigación realizada a extractos preparados a partir de las hojas de las especies *Zanthoxylum holtizianum* y *Zanthoxylum líndense*, se evidenció que ambos extractos presentaron menor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos que los obtenidos a partir de la corteza y la raíz. Lo cual coincide con lo obtenido en este estudio. Además ser el *Staphylococcus aureus*, la bacteria más susceptible con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 2,5-0,625 mg/mL. No siendo así en esta investigación.¹⁰⁰

En contraste a lo observado en la actividad antibacteriana y antifúngica, el extracto total de *Z. fagara* mostró una potente actividad antiprotozoaria frente a todas las cepas de parásitos evaluadas (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei*), pues se obtuvieron IC₅₀ menores que 100 µg/mL.⁶⁴ En las dos primeras, se obtuvieron las mismas IC₅₀= 13,19; lo que demuestra que ambas tuvieron la misma sensibilidad al reaccionar el extracto con estas. La cepa *Trypanosoma brucei*, de las tres fue la que mayor

sensibilidad presentó. Estos resultados evidencian la presencia en las hojas de *Z. fagara* de posibles compuestos que pudieran afectar directamente a los parásitos o estimular mecanismos en las células hospederas para su eliminación. Dentro de estos compuestos se pueden mencionar: a los alcaloides y aceites esenciales, los cuales se identificaron en el tamizaje fitoquímico realizado tanto a la droga como al extracto total.

En la literatura consultada, la actividad antiparasitaria de especies de *Zanthoxylum* ha sido poco explorada; sin embargo, muchas especies del género han presentado actividad contra parásitos (*Z. tingoassuiba*, *Z. chalybeum*, *Z. syncarpum*, *Z. zanthoxyloides*, *Zanthoxylum chiloperone*, *Z. rhoifolium*, etc).⁵ Una de las cepas más estudiada contra especies de este género es la *T. cruzi*, mientras que de *T. brucei* y *L. infantum* no se han obtenido hasta el momento reportes.

La especie *Zanthoxylum chiloperone* extracto de hojas fue sensible a la cepa *Trypanosoma cruzi*, pues ocurrió la lisis total de esta a una IC₅₀ de 900 µg/mL, la cual fue superior a la que se obtuvo en este estudio contra este mismo parásito.¹⁰¹ De esta misma especie, se aisló de extractos etanólicos obtenidos de las hojas, los frutos, la corteza y la raíz, el alcaloide 6-cantirona y algunos de sus análogos, los cuales también presentaron efecto contra *Trypanozoma*.¹⁰² Calderón y colaboradores reportaron que *Zanthoxylum acuminatum* posee actividad contra *T. cruzi* con valores de CI₅₀ de 17 µg / ml.¹⁰³

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto total de las hojas de *Z. fagara*, revelaron un pobre espectro de acción frente a bacterias y hongos, resultando evidencias insuficientes para justificar su empleo como antimicrobiano. En cambio, se observó una potente actividad frente a parásitos, lo que pudiera contribuir al estudio y desarrollo de algún producto natural a partir de las hojas de esta especie para el tratamiento de alguna de las enfermedades causadas por estos parásitos.

A decorative frame made of gold filigree surrounds the text. The frame is adorned with several white lilies with dark spots on their petals and green leaves. The lilies are positioned at the top right and bottom right corners of the frame. The word "Conclusiones" is written in a dark green, cursive font, centered within the frame. A faint, light green version of the same word is visible in the background behind the main text.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se determinaron los parámetros farmacognósticos a las hojas secas de la especie *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.: humedad residual de $11,5 \pm 0,70$ %, cenizas totales de $7,91 \pm 0,04$ %), cenizas solubles en agua de $2,64 \pm 0,48$ %. Como mejor menstruo se seleccionó el etanol al 70% atendiendo a los resultados de sustancias solubles y estabilidad microbiológica. Se identificaron los metabolitos siguientes: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos.
2. El extracto total presentó un olor característico al de la especie, color amarillo verdoso, densidad relativa de $0,9244 \pm 0,0651$; pH de $5,97 \pm 0,061$, índice de refracción de $1,3605 \pm 0,0004$ y sólidos totales de $21,4 \pm 0,0424$ mg/100 mL. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de $14,73 \pm 0,26$ µg de ácido gálico/mg y $3,11 \pm 0,16$ µg de quercetina/mg respectivamente. En el tamizaje fitoquímico se obtuvieron las mismas evidencias positivas que los de droga seca, excepto triterpenos, esteroides y carbohidratos.
3. El extracto total de las hojas de *Z. fagara* no mostró actividad frente a las bacterias y hongos evaluadas, sin embargo exhibió una potente actividad frente a las diferentes cepas de parásitos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*), siendo la más sensible *Trypanosoma brucei* con una CI_{50} igual a $2,48 \pm 1,38$ µg/mL.

A decorative rectangular frame made of gold-colored filigree. The frame is adorned with several white lilies with dark spots on their petals and green leaves. The lilies are positioned at the top right and bottom right corners of the frame. The word "Recomendaciones" is written across the center of the frame in a green, cursive font. There is also a faint, light green version of the word "Recomendaciones" in the background.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto total y las fracciones que se puedan derivar de este a un nivel mayor de concentración en las bacterias y hongos evaluados.
2. Aislar y caracterizar a través de técnicas espectroscópicas los compuestos químicos de las fracciones que resulten ser más activas.
3. Determinar los metales alcalinos-terreos y pesados en las hojas de la especie estudiada.

A decorative border made of gold filigree and white lilies with green leaves, framing the central text.

Referencias
Referencias
Bibliográficas
Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Kaufman PB, Kirakosyan A, McKenzie M, Dayanandan P, Hoyt JE, Li C. The uses of plant natural products by humans and risks associated with their use. *Natural products from plants* 2006. 442-68.
- ² Pan L, Chay H, Kinghorn AD. The Continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett.* 2010; 3:1-8.
- ³ Valgas C, Machado de Souza S, Smania E, Smania A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol.* 2007; 38:369-80.
- ⁴ Benin AL, Dowell SF. Antibiotic resistance and implications for the appropriate use of antimicrobial agents. En: Mainous A, Pomeroy C, editors. *Management of antimicrobials in infectious diseases: impact of antibiotic resistance.* New York: Humana Press; 2001. p. 13-8.
- ⁵ Patiño LOJ, Prieto RJA, Cuca SLE. *Zanthoxylum* Genus as Potential Source of Bioactive Compounds. En: Prof. Iraj Rasooli, editors. *Bioactive Compounds in Phytomedicine.* 2012. p.185-218. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-inphytomedicine>
- ⁶ Diéguez HR, Garrido GG, Prieto GS, Iznaga Y, González L, Molina TJ, Curini M, et al. Antifungal activity of some cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia.* 2003; 74:384-86.
- ⁷ Macías VE., Ericsson D. Coy B., Luis E. Cuca. Novel furocarbazole alkaloids and antibacterial activity of ethanol extract from *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. *Revista Colombiana de Química.* 2010; 39 (3): 333-341.
- ⁸ Hno León y Hno Alain "*Flora de Cuba*", Vol. 2. La Habana 1951; p.381- 387.
- ⁹ Amaro JM et al. Meridinol, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. *Phytochemisrry* 1988; 27(12): 3933-3935.
- ¹⁰ Stermitz F, Caolo M, Swinehart J. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phym & mirtry* 1980; 19: 1469-1472.
- ¹¹ Setzer WN, Schmidt JM, Eiter LC, Haber WA. The leaf oil composition of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg from Monteverde, Costa Rica, and its biological activities. *Journal of Essential Oil Research* 2014; 17(3):333-335.

- ¹² Prieto JA, Patiño OJ, Delgado WA, Moreno JP, Cuca LE. Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three colombian *Zanthoxylum* species. Chilean Journal of Agricultural Research 2011; 71(1):73-82.
- ¹³ Márquez L, Agüero J, Hernández I, Garrido G., Martínez I., Diéguez R., Prieto S. et al. Anti-inflammatory evaluation and phytochemical characterization of some plants of the *Zanthoxylum* genus. Acta Farmacéutica Bonaerense 2005; 24 (3): 325-30.
- ¹⁴ Negi J.S, Bisht V.K, Bhandari V. K, Singh P., Sundriyal R. C. Chemical constituents and biological activities of The Genus *Zanthoxylum*: African Journal of Pure and Applied Chemistry 2011; 5(12), 412-416.
- ¹⁵ Macías VEV., Coy EDB., Cuca SLE. Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. (Rutaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2011; 16 (1):43-53.
- ¹⁶ González GK, González JA, Agüero AJ, Rivas VY, Urquiola CA, Prieto-GS, Molina TJ. Evaluación fitoquímica preliminar de cuatro especies endémicas cubanas de *Zanthoxylum* (Rutaceae). Acta Farmacéutica Bonaerense 2004; 23 (1): 71-4.
- ¹⁷ Samita FN, SandjoLP, Ndiege IO, Hassanali. A y Lwande W. *Zanthoxylum aporphines* : Three new larvicidal dibenzoquinolin-7-one alkaloids from *Zanthoxylum paracanthum* (Rutaceae).Beilstein J. Organisation the Chemistry 2013; 9:447–452.
- ¹⁸ Cordell AG. Introduction to Alkaloids a biogenetic approach. John Wiley & Sons 1981; pp. 509-517.
- ¹⁹ Krane BD, Fagbule, MO, Shamma M.The Benzophenanthridine Alkaloids. Journal of Natural Products 1984; 47:1-43.
- ²⁰ Diéguez R, Rivas Y, Prieto S, Garrido G y Molina J. Potencialidad del Género *Zanthoxylum* como Fuente de Agentes con Actividad Biológica. Acta Farmacéutica Bonaerense 2004; 23.(2): 243-51.
- ²¹ Maiti M, Kumar GS.Biophysical Aspects and Biological Implications of the Interaction of Benzophenanthridine Alkaloids with DNA. Biophysical Reviews and Letters 2009; 1: 119-129.
- ²² Patiño OJ, Cuca LE. Isoquinoline Alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). Biochemical Systematic and Ecology 2010; 38 (4): 853-856.

-
- ²³ Queiroz EF, Hay AE, Chaaib F, Diemen D, Diallo D, Hostettmann K. New and Bioactive Aromatic Compounds from *Zanthoxylum xanthoxyloides*. *Planta Medica* 2006; 72: 746-750.
- ²⁴ Rahman MM, Islam MA, Khondkar P, Gray AI. Alkaloids and lignans from *Zanthoxylum budrunga* (Rutaceae). *Biochemical Systematic and Ecology* 2005; 33: 91-96.
- ²⁵ Chen IS, Tsai IW, Teng CM, Chen JJ, Chang YL, Ko F N et al. Piranoquinolines Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry* 1997; 46: 525-529.
- ²⁶ Patiño LO, Cuca SLE. Alcaloides benzofenantridínicos de *Zanthoxylum quinduensis*. *Actualidades Biológicas* 2005; 27(1):53-58.
- ²⁷ Mora S, Castro V, Pobeda L, Chavarría M, Murillo R. Chemical constituents from *Z. setulosum* (Rutaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas* 2011; 10 (2): 155 – 158.
- ²⁸ Escamilla CI, Cuevas EY, Fonseca JG. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 2009; 52 (2): 73-75.
- ²⁹ Zhang Y, Wang D, Yang L, Zhou D, Zhang J. Purificación y caracterización de flavonoides de las hojas de *Z. bungeanum* y la relación entre su estructura y la Actividad antioxidante. 2014; 9(8).
- ³⁰ Murillo R, Castro V, Chavarría M, Pobeda L. Lignanos de *Zanthoxylum acuminatum*. *Ciencia y Tecnología* 2006; 24(2): 227-232.
- ³¹ Navarrete A., Hong E., Anthelmintic Properties of Sanshool from *Zanthoxylum liebmannianum*. *Planta Médica*. 1996; 62:250-251.
- ³² Ross SA, Sultana GNN, Burandt CL, ElSohly MA, Marais JPJ, Ferreira D. Syncarpamide a New Antiplasmodial (+)-Norepinephrine Derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. *Journal of Natural Products* 2004. 67, 88-90
- ³³ Ribeiro CVC, Kaplan MAC. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. *Quimica Nova* 2002. 25, 533-538.
- ³⁴ Murray RDH, Méndez J, Brown SA. The Natural Coumarins. Occurrence, Chemistry and Biochemistry. John Wiley & Sons LTD. *Planta Medica* 1982; 343-345.
- ³⁵ Jo, Y. S, Huong, D. T. L., Bae, K., Lee, M. K., Kim, Y. H. "Monoamine Oxidase Inhibitory Coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 2002; 68: 84-85.
-

- ³⁶ Adesina, SK. The Nigerian *Zanthoxylum*: Chemical and Biological Values. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines 2005; 2: 282-301.
- ³⁷ Torres NY. Estandarización de los parámetros farmacognósticos de las hojas de *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb [Tesis de Grado]. Santiago de Cuba. 2018.
- ³⁸ Santiago BLV, Chen IS, Chen TL, Chang YL, Teng CM, Lin WY. Etude Phytochimique de Plantes Medicinales des Andes Vénézuéliennes: *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae) et *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae). [Tesis de Doctorado]. Merida-Venezuela: Universidad de los Andes. 2011.
- ³⁹ Prempeh A B A, Mensah J. Analgesic Activity of Crude Aqueous Extract of the Root Bark of *Zanthoxylum xanthoxyloides*. General Medical Journal 2008; 42 (2): 79-84.
- ⁴⁰ Charoenying P, Teerarak M, Laosinwattana C. An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. Scientia Horticulturae 2010. p. 411-416.
- ⁴¹ Azando E, Hounzangbé M, Oloundadé P, Brunet S, Fabre N, Valentin et al. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldialaavis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. Veterinary Parasitology 2011; 180: 292-297.
- ⁴² Chen JJ, Chen PH, Liao CH, Huang SY, Chen IS. New Phenylpropanoids, Bis (1-phenylethyl) phenols, Bisquinolinone Alkaloid, and Anti-inflammatory Constituents from *Zanthoxylum integrifolium*. Journal of Natural Products 2007; 70:1444-1448.
- ⁴³ Pierre MJ, Munyabuhoro S, Bajyana SE. *In vitro* antimicrobial investigation of *Zanthoxylum chalybeum* stems bark. Journal of Medicinal Plants Research 2013; 7 (21):1577-1579.
- ⁴⁴ Bhattacharya S, Kamaruz MZ. *In vitro* antioxidative effects of stem bark from *Zanthoxylum nitidum* (ROXB.) DC (RUTACEAE). Pharmacology online 2011: 1216-1223
- ⁴⁵ Mukija M, Nath KA. Antioxidant potential and total phenolic content of *Zanthoxylum alatum* stem bark. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2014; 4(6): 388-397.
- ⁴⁶ Karmakar I, Haldar S, Chakraborty M, Dewanje S, Haldar PK. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of Zanthonitrile isolated from *Zanthoxylum alatum*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2016; 6 (6): 119-122.

-
- ⁴⁷ Saití SC, Raturi R, Badoni P, Singh H. Antiinflammatory and antioxidant activities of *Zanthoxylum armatum* stem bark. Global Journal of researches in engineering: J general engineering 2011.
- ⁴⁸ Lee SJ, Lim KT. Glycoprotein of *Zanthoxylum piperitum* DC has a hepatoprotective effect via antioxidative character in vivo and *in vitro*. Toxicology *in vitro* 2008; 22: 376-385.
- ⁴⁹ Nguta JM, Mbairi JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kiama SG. Antimalarial herbal remedies of Msambweni, Kenya. Journal of Ethnopharmacology 2010; 128: 424-432.
- ⁵⁰ Kokate SD, Venkatachalam SR, Hassarajani SA. *Zanthoxylum armatum* extract as mosquito larvicide. Proceedings of the National Academy of Sciences. Biological Sciences 2001; 71 (3-4): 229-32.
- ⁵¹ Chou ZT, Chan HH, Peng H, Liou MJ, Wu TS. Isolation of substances with antiproliferative and apoptosis-inducing activities against leukemia cells from the leaves of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. Phytomedicine 2011; 18: 344-348.
- ⁵² Silva L, Paoli A. Caracterizacão Morfo-Anatômica da Semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Rutaceae. Revista Brasileira de Sementes 2000; 22: 250-256.
- ⁵³ Kuetea V, Krusche B, Youns M, Voukeng I, Fankama AG, Tankeo S, et al. Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology 2011; 134: 803-812.
- ⁵⁴ Zuloaga FO., Morrone O, Belgrano MJ., Marticorena C., E. Marchesi. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 2008; 107(1): 1-983, 985-2286, 2287-3348.
- ⁵⁵ Dreyer DL, Brenner RC. Alkaloids of some mexican *Zanthoxylum* species. Phytochemistry 1980; 19: 935-939.
- ⁵⁶ Roig y Mesa JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Segunda edición. Tomo II. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2012, 736-737.
- ⁵⁷ Cuéllar AC. MM. Farmacognosia y Química de los productos naturales. Primera edición. La Habana: Editorial Félix Varela 2001; 135-147, 161-166, 186, 207, 251, 259, 276, 291- 295, 292, 306, 316, 357, 664.
-

-
- ⁵⁸ Ministerio de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal. Droga Cruda. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 309/91 (NRSP 309/91). La Habana, 1991.
- ⁵⁹ Ministerio de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 312/91 (NRSP 312/91). La Habana, 1991.
- ⁶⁰ Escobar M L.; Rivera A; Aristizábal G. A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Revista Scielo 2010; 17(1): 67-74.
- ⁶¹ Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC, "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*". *Ethnopharmacol* 2004; 94(2-3):279.
- ⁶² "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar". National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997; 17(1).
- ⁶³ Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal Medicinal Plants Research*. 2010; 4(2): 104-111.
- ⁶⁴ Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 106: 290–302.
- ⁶⁵ Silva MTG, Simas SM, Batista TGFM, Cardarelli P, T. TCB, "Studies on antimicrobial activity *in vitro* of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100 (7): 779.
- ⁶⁶ Ramirez LS, Castaño DM. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 2009; (42): 263-268.
- ⁶⁷ Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research Microbiol*. 2004; 155: 224-230.
- ⁶⁸ Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, *et al*. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010; 105(2): 233-8.
-

-
- ⁶⁹ Ochoa AP, López TG, Colombat MR. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Monografía. Editado en CD-ROM ISBN 959-207-012- 1; 2002: 15-30.
- ⁷⁰ Ministerio de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Proceso tecnológico. Norma Ramal de Salud Pública 311/91. (NRSP 311/91). La Habana, 1991.
- ⁷¹ British Pharmacopoeia. Versión 14.0, 2010.
- ⁷² Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (Ministerio de Salud Pública). Regulación N°41. Validación de métodos analíticos; 2007: 15-16
- ⁷³ Arias RD. Estabilidad física, química y microbiológica de una jalea de *Calendula officinalis* L. al 1%. [Tesis de Maestría]. Santiago de Cuba. 2018.
- ⁷⁴ Gabrielson J, Hart M, Jarelov A, Kuhn I, McKenzie D, Mollby R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*. 2002; 50: 63-73.
- ⁷⁵ Raz B, Iten M, Grether-Buhler Y, Kaminsky R, Brun R. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodensiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica*. 1997; 68: 139-147.
- ⁷⁶ World Health Organization (WHO). Quality control methods for medicinal plant materials. Ed ilustrada. Ginebra: World Health Organization; 1998.
- ⁷⁷ Márquez IH, Guerrero TB, Valarezo GF, Campo M. Preliminary pharmacognostic study of the stem and root of the species *Moringa oleifera* Lam grown in Machala. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2017;22 (1):1-8.
- ⁷⁸ Peña E, Saralegui H. Técnicas de Anatomía vegetal. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1982. p.100.
- ⁷⁹ Lou Z. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their international unification. 1980. WHO/PHARM/80.502. 8-39.
- ⁸⁰ Viamontes LM. Caracterización farmacognóstica de las hojas de *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb. [Tesis de Diploma]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2017.

-
- ⁸¹ Gonzáles OJ. Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. MINSAP Dirección Nacional de Farmacias. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2010. p. 24, 55, 71, 84, 87, 111.
- ⁸² Temas de Farmacognosia. Plantas medicinales y Productos naturales. Determinación de sustancias extraíbles. [citado abril 2019]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com>.
- ⁸³ Ramakrishna A, Gokare A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 2011; 6:11, 1720-1731.
- ⁸⁴ Omoto O, Matasyoh C y Vulule M. Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum gillettii* essential oils against *Anopheles gambiae*. *African Journal of Biotechnology* 2014; 13 (21):2175-2180.
- ⁸⁵ García AA, Pérez-Urria CE. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca(Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2 (3): 119-145.
- ⁸⁶ Farmacopea de los Estados Unidos. Formulario Nacional. Fármacos para Tomografía de Emisión de Positrones. Pruebas Físicas. 2012; 1: 440.
- ⁸⁷ Paladino SC. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en la vid (*Vitis vinífera* L). [Tesis de maestría]. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo; 2008.
- ⁸⁸ Adolfo RM. Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de las hojas de *Tamarindus indica* L. en dos estados fisiológicos de la especie. [Tesis de Diploma]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2009.
- ⁸⁹ Mukhija M, Nath Ka. Antioxidant potential and total phenolic content of *Zanthoxylum alatum* stem bark. *Journal App Pharmacognosy* 2014; 6:388-397.
- ⁹⁰ Mukhija M, Pal SM, Lal DK, Nath K A. Cytotoxic and antioxidant activity of *Zanthoxylum alatum* stem bark and its flavonoid constituents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015; 4(4): 86-92.
- ⁹¹ Seal T, Chaudhuri K, Pillai B. Antioxidant activity of some selected wild edible fruits of North-Eastern Region in India and effect of solvent extraction system. *Global Journal of Environmental Research* 2012; 6 (3): 84-90.

-
- ⁹² Bafi YN, Arnason JT, Baker J, Smith ML. Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine* 2005; 12:370-377.
- ⁹³ Nganea AN, Biyiti L, Amvam Zollo PH, Bouchet P. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum leprieurii* Guill. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 70: 335-342.
- ⁹⁴ Ishwori L, Anupam DT, Singh PK, Dutta CM, Deepa N. Antibacterial activity of some selected plants traditionally used as medicine in Manipur. *African Journal of Biotechnology* 2014; 13 (13): 1491-1495.
- ⁹⁵ Rodrigues FFG, Costa JGM, Coutinho HDM. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. *The Indian Journal of Medical Research* 2010; 131:833-835.
- ⁹⁶ Matu EN, Staden JV. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 87: 35-41.
- ⁹⁷ Agyare C, Mensah AY, Osei-Asante S. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some medicinal plants from Ghana. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales* 2006; 5(6): 113 -17.
- ⁹⁸ Negi JS, Bisht VK, Bhandari AK, Bisht R, Kandari NS. Major Constituents, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Zanthoxylum armatum* DC. Essential Oil. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutic IJPT* 2012; 11 (2): 68-72.
- ⁹⁹ Kumar SS, Vishnoi R, Kumar GD, Kishor K. Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India. *Journal of Applied and Natural Science* 2012; 4 (1): 47-50 ,
- ¹⁰⁰ Ynalvez RA, Cardenas C, Addo JK, Adukpo GE, Dadson BA, Mensah AA. Evaluation of the antimicrobial activity of *Zanthoxylum zanthoxyloides* root bark extracts. *Research Journal of Medicinal Plants* 2012; 6 (2): 149-159.
- ¹⁰¹ Runyoro DKB, Ngassapa OD, Masimba P, Peter B. Antimicrobial activity of *Zanthoxylum holtzianum* (Engl.) Waterm and *Zanthoxylum lindense* (Engl.) Kokwaro Growing in Bagamoyo District, Coast Region, Tanzania. *Journal Pharmaceutical Sciences and Research* 2017; 9(1): 49-54.

¹⁰² Hamuy R, Acosta N, López E, Ferreira ME, Vera de Bilbao N. Determination of the *in vitro* sensitivity of different *Trypanosoma cruzi* strains to benznidazole and the leaf extract of the plant *Zanthoxylum chiloperone*. *Memories Instituto Investigación Ciencias Salud* 2013; 11(2): 16-25.

¹⁰³ Ferreira ME, Cebrián TG, Corrales AS, Vera N, Rolón M, Vega C et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: First sustainable Chagas disease treatment. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 133:986-993.

¹⁰⁴ Calderón AI, Romero LI, Barría EO, Brun R, Correa MDA, Gupta MP. Evaluation of larvicidal and *in vitro* antiparasitic activities of plants in a biodiversity plot in the Altos de Campana National Park, Panama. *Journal Pharmaceutical Biology* 2006; 44:487-498.

A decorative rectangular frame made of gold-colored filigree. The frame is adorned with white lilies and green leaves at the top right and bottom right corners. The word "Anexos" is written in a green, cursive font across the center of the frame. A faint, light green version of the word "Anexos" is visible in the background behind the main text.

Anexos

ANEXO I. Identificación Taxonómica de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

 BIOECO CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD		HERBARIO BSC CENTRO ORIENTAL DE ECOSISTEMAS Y BIODIVERSIDAD	
		No <u>19270</u>	
Nombre Científico <u><i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) Sarg.</u>		Familia <u>Rutaceae</u>	
Nombre Común <u>"Tarro de Chiro"</u>			
Localidad <u>Siboney</u>			
Provincia <u>Stgo de Cuba</u>		Fecha <u>30-9-2018</u>	
Colector <u>Yuselis Ramos Domínguez</u>			
Formación vegetal _____			
Hábito _____	Coordenadas _____		
Sustrato _____	Altitud _____		
Fenología _____	Determinador <u>Prof. Félix Acosta Castillo</u>		
Observaciones _____			

Fichas de datos de seguridad de los reactivos más tóxicos utilizados

Fichas de datos de seguridad. Ácido sulfúrico.

- 1. Identificación de la sustancia y firma comercial:** Ácido sulfúrico.
- 2. Identificación de peligros:** provoca graves quemaduras en la piel (hasta destrucción del tejido corporal) y lesiones oculares. Puede descomponerse a altas temperaturas formando gases tóxicos como el dióxido de azufre. No es inflamable, pero reacciona violentamente con el agua generando calor y serias salpicaduras.
- 3. Composición, Información sobre ingredientes:** Identidad química de la sustancia: Ácido sulfúrico. Nombres comunes: ácido de batería, ácido fertilizante. Número CAS: 7664-93-9. Otros componentes: no contiene.
- 4. Medidas de primeros auxilios:** Contacto con la piel: Retirar las ropas contaminadas inmediatamente. Lavar las partes afectadas del cuerpo con abundante agua. Contacto con los ojos: Lavar con agua, levantando ocasionalmente los párpados. Ingestión: Si la víctima está consciente, administrar grandes cantidades de agua inmediatamente. No intentar hacer vomitar a la víctima. Inhalación: Llevar al accidentado al aire fresco, mantener abrigado y aplicar respiración artificial si fuera necesario. La administración boca a boca puede exponer al administrador. Transportar a la víctima al hospital inmediatamente.
- 5. Medidas contra incendios:** Medios de extinción apropiados: Para fuegos pequeños: usar extintores de polvo. Tener en cuenta que el ácido reacciona con el agua produciendo desprendimiento de calor. En caso de fuegos mayores: usar agua para refrigerar los recipientes, asegurándose que no entre en contacto con el producto.
- 6. Medidas en caso de vertido accidental:** ponerse el equipo de protección antes de entrar en el área de peligro. Ventilar la zona de derrame o fuga. Use equipo antiácido, máscara completa o pantalla facial, guantes antiácidos, botas de policloruro de vinilo (PVC), por dentro del equipo. Restringir el acceso al área. Mantener el personal sin protección en posición contraria a la dirección del viento en el área de derrame.
- 7. Almacenamiento y manipulación:** proporcionar una ventilación adecuada. Utilizar protección de ojos y manos cuando se manejen pequeñas cantidades. Usar equipo de protección total cuando exista riesgo de salpicaduras o derrames. Cuando se diluye, adicionar siempre el ácido sobre el agua y nunca el agua sobre el ácido.

8. Controles de exposición/protección personal: ventilación local asistida. Protección para ojos y cara: usar pantalla de protección facial. Protección de la piel: usar equipo antiácido o delantal de PVC, guantes antiácidos, botas de PVC, pantalón por fuera de las botas. Protección respiratoria: en caso de presencia de niebla ácida se debe usar máscara con cartuchos para gases ácidos.

9. Propiedades físicas y químicas: Aspecto: líquido incoloro a amarillo, viscoso. Olor: sin olor cuando está frío, si se calienta se desprenden vapores de SO₃ PH (sin diluir): < 0.1 Punto de ebullición: entre 310 y 335 °C Densidad relativa: 1,84 g/mL Solubilidad: completamente soluble.

10. Estabilidad y reactividad: es extremadamente reactivo con metales, álcalis y muchos productos químicos orgánicos e inorgánicos. La dilución con agua genera calor excesivo y pueden ocurrir salpicaduras o ebullición. Este producto es muy estable bajo condiciones normales de almacenamiento, manipulación y uso. El contacto con materia orgánica combustible puede causar fuego o explosión. Deben evitarse las altas temperaturas.

11. Información toxicológica: Contacto con la piel: Provoca quemaduras graves profundas y dolorosas. Las quemaduras extensas pueden tener como resultado el shock y muerte. Contacto con los ojos: Provoca quemaduras graves profundas y dolorosas. Ingestión: Puede tener como resultado quemaduras graves en boca, garganta, perforación del esófago, estómago, manchas y erosión de dientes, náuseas y vómitos de sangre y tejidos erosionados, y hasta la muerte. No inducir el vómito. Inhalación: La niebla ácida puede causar irritación de vías respiratorias.

12. Información ecológica: efecto perjudicial en organismos acuáticos. Corrosivo incluso en forma diluida. No produce consumo biológico de oxígeno. Existe peligro para el agua potable en caso de penetración en suelos y/o acuíferos.

13. Consideraciones de Disposición Final: No lavar hacia drenajes ni permitir que se alcance cursos naturales de agua. Si se neutraliza con piedra caliza, dolomita o ceniza de soda (carbonato de sodio) se requerirá de buena ventilación debido a que se libera dióxido de carbono.

14. Transporte: Nombre según ONU: Ácido Sulfúrico. Clasificación de riesgo para el transporte: 8. Grupo de embalaje: II

Ficha de datos de seguridad. Ácido clorhídrico.

1. Identificación de la sustancia y firma comercial: Ácido clorhídrico.

2. Identificación de peligros: Inhalación: Corrosivo. Exposición prolongada: quemaduras, úlceras en la nariz y la garganta. Si la concentración es elevada causa ulceración de la nariz y la garganta, edema pulmonar, espasmos, shock, falla circulatoria, incluso la muerte. Ingestión: Corrosivo. Puede generar quemaduras en la boca, garganta, esófago y estómago; náuseas, dificultad al comer, vómitos, diarreas; en casos graves colapso y muerte. Piel: puede causar inflamación, enrojecimiento, dolor y quemaduras, dependiendo de la concentración. Ojos: Corrosivo. Produce irritación, enrojecimiento, dolor, lagrimeo excesivo y puede ocasionar pérdida total de la visión. Efectos crónicos: asma ocupacional, las exposiciones repetidas pueden generar coloración café y daños en el esmalte de los dientes, dermatitis y sangrado de la nariz.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Componente: ácido clorhídrico. Número CAS:7647-01-0.

4. Medidas de primeros auxilios: Inhalación: trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial (evitar respiración boca a boca). Si respira con dificultad suministrar oxígeno. Mantener la víctima abrigada y en reposo. Buscar atención médica inmediata. Ingestión: lavar la boca con agua. Si está consciente, suministrar abundante agua. No inducir el vómito; si este se produce de forma natural, inclinar la persona hacia el frente para evitar la broncoaspiración. Piel: Retirar la ropa y calzado contaminado. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón. Si la irritación persiste repetir el lavado. Ojos: lavar con abundante agua. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico.

5. Medidas contra incendios: usar el agente de extinción adecuado según el tipo de fuego alrededor. En caso de grandes incendios use agua en forma de rocío, espuma resistente al alcohol. Evacuar o aislar el área de peligro. Restringir el acceso a personas innecesarias y sin la debida protección. Ubicarse a favor del viento.

6. Medidas en caso de vertido accidental: evacuar o aislar el área de peligro. Restringir el acceso a personas innecesarias y sin la debida protección. Ubicarse a favor del viento. Ventilar el área. No tocar el líquido ni permitir el contacto directo con el vapor.

Eliminar toda fuente de calor. Evitar que la sustancia caiga en alcantarillas, en zonas bajas o confinadas. Lavar la zona con abundante agua.

7. Almacenamiento y Manipulación: usar protección personal siempre, aunque la exposición sea corta. Mantener estrictas normas de higiene, no fumar, ni comer en el sitio de trabajo. Rotular los recipientes adecuadamente. Para preparar soluciones adicionar lentamente el ácido al agua, para evitar salpicaduras. Almacenar en lugares ventilados, secos y frescos; lejos de fuentes de calor y de la acción directa de los rayos solares.

8. Controles de exposición/protección personal: ventilación local y general resistente a la corrosión, para asegurar que la concentración no exceda los límites de exposición ocupacional. Suministrar aire de reemplazo continuamente para suplir el aire removido. Utilizar gafas de protección resistente a químicos con protección lateral, guantes, overol y botas. Respirador con filtro para vapores ácidos.

9. Propiedades físicas y químicas: Apariencia, olor y estado físico: es un líquido humeante incoloro o amarillo claro con olor penetrante e irritante. Punto de ebullición (°C): 50 a 70 mm Hg Punto de fusión (°C): -66 pH: 0.1 Solubilidad: soluble en agua, alcoholes, éter y benceno.

10. Estabilidad y reactividad: estable bajo condiciones normales de manipulación y almacenamiento. Es sensible a la luz solar directa. Evitar la exposición al calor y a materiales incompatibles.

11. Información toxicológica: los valores de toxicidad se han reportado para el producto concentrado: DL50 (Intraperitoneal, ratón) =40.142mg/Kg. DL50 (oral, conejo) =900mg/Kg. No es carcinogénico para humanos.

12. Información ecológica: alteración del pH en medio acuático. Este ácido se disocia totalmente; por lo que puede afectar significativamente el medio. Es mortal a concentraciones mayores de 25 mg/L.

13. Consideraciones de Disposición Final: adicionar cuidadosamente ceniza de soda o cal, los productos de la reacción se pueden conducir a un lugar seguro, donde no tenga contacto con el ser humano.

14. Transporte: etiqueta negra y blanca de sustancia corrosiva. No transporte con sustancias explosivas, gases venenosos, sustancias que puedan presentar combustión

espontánea, comburentes, peróxidos, radiactivos, ni sustancias con riesgo de incendios.

Ficha de datos de seguridad. Benceno.

1. Identificación de la sustancia y firma comercial: Benceno.

2. Identificación de peligros: puede provocar cáncer, defectos genéticos. Líquidos y vapores muy inflamables. Provoca irritación ocular grave, irritación cutánea, daños en los órganos y puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Componente: benceno. M.=78.11. Fórmula: C₆H₆. Número CAS: 71-43-2.

4. Medidas de primeros auxilios: en caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito. Inhalación: Trasladar a la persona al aire libre. En caso de asfixia proceder a la respiración artificial. Contacto con la piel: Lavar con abundante agua. Quitarse las ropas contaminadas. Ojos: Lavar con agua abundante (mínimo durante 15 minutos), manteniendo los párpados abiertos. Pedir atención médica. Ingestión: Evitar el vómito. Riesgo de aspiración. Pedir atención médica. Laxantes: sulfato sódico (1 cucharada sopera en 250 mL de agua). Administrar aceite de vaselina como laxante (3 mL/kg). Lavado de estómago. (Únicamente si es inevitable, y con sumo cuidado).

5. Medidas contra incendios: utilizar como medio de extinción espuma y polvo seco.

6. Medidas en caso de vertido accidental: no inhalar los vapores. Prevenir la contaminación de suelos y aguas. Recoger con materiales absorbentes; en su defecto arena o tierras secas y depositar en contenedores para residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.

7. Almacenamiento y Manipulación: evitar la formación de cargas electrostáticas. Almacenar en recipientes bien cerrados, locales bien ventilados, protegido de la luz, alejado de fuentes de ignición y calor. Temperatura ambiente. No almacenar en recipientes de plástico.

8. Controles de exposición/protección personal: asegurar una buena ventilación y renovación de aire del local. En caso de formarse vapores/aerosoles, usar equipo respiratorio adecuado. Usar guantes apropiados de nitrilo y gafas apropiadas.

9. Propiedades físicas y químicas: Aspecto: Líquido Color: incoloro. Olor: Característico. Punto de fusión/punto de congelación: 5,5 °C. Punto inicial de ebullición

e intervalo de ebullición: 80,1 °C. Punto de inflamación: - 11 °C. Presión de vapor: 101 hPa (20 °C) Solubilidad: 0,7 g/l agua 20 °C.

10. Estabilidad y reactividad: deben evitarse temperaturas elevadas. Los gases/vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire.

11. Información toxicológica: Inhalación: Irritaciones en vías respiratorias. Absorción: efectos en el sistema nervioso central, dolores de cabeza, vértigo, arritmias, espasmos, hipotensión, dificultades respiratorias, ansiedad, narcosis, parálisis respiratoria y muerte. Ingestión: náuseas y vómitos. Riesgo de aspiración al vomitar. En contacto con la piel: irritaciones. Riesgo de absorción cutánea. Puede tener un efecto desengrasante sobre la piel, con riesgo de infección secundaria. Por contacto ocular: Irritaciones en mucosas.

12. Información ecológica: clasificado como alto riesgo para el medio acuático y terrestre.

13. Consideraciones de Disposición Final: los residuos no deben desecharse con la basura doméstica, no debe llegar al alcantarillado. Los embalajes se deben eliminar de acuerdo a las disposiciones oficiales.

14. Transporte: terrestre, marítimo y aéreo: Clase 3. Grupo de embalaje: II.

Ficha de datos de seguridad. Cloroformo.

1. Identificación de la sustancia y firma comercial: Cloroformo.

2. Identificación de peligros: puede ser fatal si es tragado, inhalado o absorbido a través de la piel. Causa irritación a la piel, ojos y aparato respiratorio. Puede afectar el sistema nervioso central, sistema cardiovascular, hígado y riñones. Se sospecha de riesgo de cáncer. Puede causar cáncer. El riesgo de cáncer depende del nivel y duración de la exposición.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Ingredientes: Cloroformo. Número CAS: 67-66-3.

4. Medidas de primeros auxilios: Inhalación: retirarse al aire fresco. Si la persona no respira, dar respiración artificial. Si la respiración fuera difícil, dar oxígeno. Ingestión: no inducir el vómito. Dar cantidades grandes de agua. Nunca dar nada por la boca a una persona inconsciente. Contacto con la piel: Lave la piel inmediatamente con agua abundante por lo menos durante 15 minutos, mientras se quita la ropa y zapatos contaminados. Lave la ropa antes de usarla nuevamente. Contacto con los ojos: Lave los ojos inmediatamente con abundante agua, por lo menos durante 15 minutos, elevando los párpados superior e inferior ocasionalmente para asegurar la remoción del químico. Busque atención médica inmediatamente.

5. Medidas contra incendios: leve peligro de incendio cuando se expone a calor fuerte; de otro modo, prácticamente no es inflamable. Utilice cualquier medio apropiado para extinguir fuego alrededor. En el evento de un fuego, usar vestidos protectores completos y aparato respiratorio autónomo con mascarilla completa operando en la demanda de presión u otro modo de presión positiva.

6. Medidas en caso de vertido accidental: eliminar los posibles puntos de ignición y ventilar la zona. No fumar. Evitar respirar los vapores. Recoger el vertido con materiales absorbentes no combustibles (tierra, arena, vermiculita, tierra de diatomeas...). Verter el producto y el absorbente en un contenedor adecuado. La zona contaminada debe limpiarse inmediatamente con un descontaminante adecuado.

7. Almacenamiento y Manipulación: guarde en un envase resistente a la luz, cerrado herméticamente y almacene en un área fresca, seca y bien ventilada. Aísle de las sustancias incompatibles. Lávese las manos antes de comer y no coma, ni beba, ni

fume en el trabajo. Los envases de este material pueden ser peligrosos cuando están vacíos ya que retienen residuos del producto (vapores, líquido).

8. Controles de exposición/protección personal: proveer una ventilación adecuada. Si esto no fuese suficiente para mantener las concentraciones de partículas y vapores del disolvente por debajo del límite de exposición durante el trabajo, debe llevarse un equipo de respiración adecuado. Usar equipo respiratorio con suministro de aire. Para los contactos prolongados o repetidos utilizar guantes del tipo alcohol polivinílico o goma de nitrilo. Utilizar gafas protectoras, especialmente diseñadas para proteger contra las salpicaduras de líquidos.

9. Propiedades físicas y químicas: Aspecto: Líquido incoloro con olor dulce. Punto de fusión: -63 °C. Punto de ebullición: 61°C (760 mm de Hg). Presión de vapor: 159 mm Hg a 20 °C. Solubilidad en agua: 8 g/l a 20 °C. Índice de refracción: 1.4459 a 20 °C, 589 nm. Densidad: 1,498 g/mL (a 15 °C); 1.484 (a 20 °C). Temperatura de autoignición: mayor de 1000 °C.

10. Estabilidad y reactividad: estable en condiciones ordinarias de uso y almacenamiento. El pH disminuye con la exposición prolongada a la luz y aire debido a la formación de HCl. Puede producir monóxido de carbono, dióxido de carbono, cloruro de hidrógeno y fosgeno cuando se calienta hasta la descomposición.

11. Información toxicológica: este material produce cáncer en animales de laboratorio, y en la IARC se enumera como un probable carcinógeno humano. La inhalación y la ingestión son dañinos y pueden ser mortales. Puede causar daño a la reproducción. Irritante. El consumo de alcohol puede aumentar los efectos tóxicos. El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis.

12. Información ecológica: no existen datos disponibles ensayados sobre el preparado. No se debe permitir que el producto pase a las alcantarillas o a cursos de agua. Evitar la emisión de disolventes a la atmósfera y al suelo.

13. Consideraciones de Disposición Final: Tratar los residuos, lavar y descartar los envases según la legislación vigente.

14. Transporte: terrestre y marítimo. Grupo de empaque: III

Ficha de datos de seguridad. Tolueno.

1. Identificación de la sustancia y firma comercial: Tolueno.

2. Identificación de peligros: líquido inflamable, puede causar corrosión o irritación cutáneas, toxicidad para la reproducción, toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (efectos narcóticos, somnolencia), toxicidad específica en determinados órganos (exposiciones repetidas), peligro por aspiración.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Nombre de la sustancia Tolueno, No de índice 601-021-00-3, Número CE 203-625-9, Número CAS 108-88-3, Fórmula molecular C₇H₈, Masa molar 92,14 g/mol.

4. Medidas de primeros auxilios: Inhalación: Proporcionar aire fresco. Contacto con la piel: Lavar la piel con agua/ ducharse. Contacto con los ojos: Lavar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Si aparece malestar o en caso de duda en cualquiera de los casos anteriores consultar a un médico.

5. Medidas contra incendios: Coordinar las medidas de extinción con los alrededores utilizando agua pulverizada, espuma, polvo extinguidor seco, dióxido de carbono (CO₂). Luchar contra el incendio desde una distancia razonable, tomando las precauciones habituales. Llevar un aparato de respiración autónomo.

6. Medidas en caso de vertido accidental: Utilización de equipos de protección adecuados con el fin de evitar toda posible contaminación de la piel, los ojos y la ropa. Evitar el contacto con la piel, los ojos y la ropa. Prevención de las fuentes de ignición.

7. Almacenamiento y Manipulación: Prever una ventilación suficiente. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. Debido al peligro de explosión, evitar pérdidas de vapores. Mantener el recipiente herméticamente cerrado. Temperatura de almacenaje recomendada: 15 - 25 °C.

8. Controles de exposición/protección personal: Utilizar gafas de protección con protección a los costados. Usar guantes de protección adecuados.

9. Propiedades físicas y químicas: Estado físico: líquido (fluído) Color: incolor Olor: característico Punto de fusión/punto de congelación: -95 °C a 1,013 hPa. Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición: 110,6 °C a 1,013 hPa. Punto de inflamación: 4,4 °C a 1,013 hPa. Densidad: 0,87 g/cm³ a 20 °C. Densidad relativa: 3,18 aire = 1 Índice de refracción: 1,496.

10. Estabilidad y reactividad: riesgo de ignición, los vapores pueden formar con aire una mezcla explosiva. El material es estable bajo condiciones ambientales normales y en condiciones previsibles de temperatura y presión durante su almacenamiento y manipulación.

11. Información toxicológica: Toxicidad para la reproducción: Se sospecha que daña al feto. Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única: Puede provocar somnolencia o vértigo. Toxicidad específica en determinados órganos - exposición repetida: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas (en caso de inhalación). Peligro por aspiración: Puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias.

12. Información ecológica: Peligroso para el agua.

13. Consideraciones de Disposición Final: Debe eliminarse el producto y su recipiente como residuos peligrosos. Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional. No tirar los residuos por el desagüe.

14. Transporte: Clase(s) de peligro para el transporte: Clase 3 (líquidos inflamables). El transporte a granel de la mercancía no está previsto. Grupo de embalaje II (materia medianamente peligrosa).

Ficha de datos de seguridad. Metanol.

1. Identificación de la sustancia y firma comercial: Metanol.

2. Identificación de peligros: Inhalación: Disturbios visuales, dolor abdominal, diarrea, vómito, inconciencia. En casos graves: coma, paro respiratorio, ceguera, convulsiones, acidosis metabólica severa y muerte Ingestión/ Piel: Se absorbe por la piel presentando efectos iguales a la inhalación. Produce resequedad, enrojecimiento y dolor. Ojos: Irritación, dolor, lagrimeo, sensación de quemadura y visión borrosa. Su eliminación del cuerpo es lenta. Produce ceguera, acidosis metabólica, afecta el corazón y el sistema nervioso central, en especial el nervio óptico, conduce a dolores de cabeza persistentes y visión borrosa. Los efectos crónicos de sobreexposición pueden incluir daños a los riñones y el hígado. La exposición repetida o prolongada en contacto con la piel conduce a dermatitis.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Componente: Alcohol metílico. Número CAS: 67-56-1.

4. Medidas de primeros auxilios: Inhalación: Trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial (evitar el método boca a boca). Si respira con dificultad suministrar oxígeno. Mantener la víctima abrigada y en reposo. Buscar atención médica inmediatamente. Ingestión: Lavar la boca con agua. Si está consciente, suministrar abundante agua o de a beber una copa de whisky. No inducir el vómito. Buscar atención médica inmediatamente. Piel: Retirar la ropa y calzado contaminados. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón, mínimo durante 15 minutos. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica. Ojos: Lavar con abundante agua, mínimo durante 15 minutos. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.

5. Medidas contra incendios: Altamente inflamable. Los vapores son más pesados que el aire, pueden viajar hasta la fuente de ignición y regresar en llamas. Los contenedores pueden explotar cuando están expuestos a las llamas. Puede formar mezclas explosivas. Evacuar o aislar el área de peligro. Restringir el acceso a personas innecesarias y sin la debida protección. Ubicarse a favor del viento. Usar equipo de protección personal. El agua puede ser inefectiva. Use polvo (BC y ABC), espuma para alcohol, dióxido de carbono con el aire.

6. Medidas en caso de vertido accidental: No inhalar los vapores. Procurar una ventilación apropiada. Evitar fuentes de ignición. No fumar. No permitir el paso al sistema de desagües.

7. Almacenamiento y Manipulación: De almacenarse en lugares ventilados, frescos y secos, a temperaturas inferiores a 30°C. Lejos de fuentes de calor e ignición. Separado de materiales incompatibles. Rotular los recipientes adecuadamente. No fumar, ni exponer a los rayos solares. Los equipos eléctricos, de iluminación y ventilación deben ser a prueba de explosión. Para su manipulación usar siempre protección personal total así sea corta la exposición o la actividad que realice con el producto.

8. Controles de exposición/protección personal: Respirador con filtro para vapores orgánicos, monogafas, guantes de caucho o neopreno, delantal de caucho.

9. Propiedades físicas y químicas: Apariencia: Líquido claro, incoloro de olor picante característico. Punto de Ebullición (°C): 64.5 Densidad Relativa del Vapor (Aire=1): 1.10 Punto de Fusión (°C): -97.8 pH: Neutro. Presión de Vapor (mm Hg): 92.0 / 20 °C.

10. Estabilidad y reactividad: Estable bajo condiciones normales. Reacciona vigorosamente con agentes oxidantes (nitratos, percloratos, peróxido de hidrógeno, ácido nítrico, ácido perclórico, trióxido de cromo), ácido sulfúrico. Reacción violenta con anhídrido crómico, perclorito de plomo, cloroformo e hidróxidos.

11. Información toxicológica: Antídoto: Etanol.

12. Información ecológica: La sustancia es de baja toxicidad para organismos acuáticos y terrestres.

13. Consideraciones de Disposición Final: Desecho Tóxico, se puede filtrar y destilar. Incinerar en forma controlada, el incinerador debe poseer un sistema para la absorción de los humos o vapores producidos. Evitar inhalar los vapores.

14. Transporte: Etiqueta roja de líquido inflamable. No transportar con sustancias clase explosivas, gases venenosos, sólidos de combustión espontánea, sustancias comburentes, peróxidos orgánicos, materiales radiactivos, sustancias con riesgo de incendio, ni alimentos.

Ficha de datos de seguridad. Alcohol amílico.

- 1. Identificación de la sustancia y firma comercial:** Alcohol amílico.
- 2. Identificación de peligros:** Riesgo para la salud: 2: Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio. Nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritación de la piel. Provoca irritación de ojos. Nocivo por ingestión: Riesgo de inflamabilidad: 4: En caso de calentamiento pueden producirse mezclas explosivas con el aire. El fuego puede provocar emanaciones de amoníaco y óxidos de nitrógeno. Riesgo de reactividad: Disolución exotérmica con agua.
- 3. Composición, Información sobre ingredientes:** Ingredientes: Alcohol isoamílico. Número CAS: 75-85-4.
- 4. Medidas de primeros auxilios:** Ingestión: beber agua inmediatamente. Inhalación: Tomar aire fresco, si ha parado de respirar dar respiración artificial. Contacto con la piel: lavar con abundante agua y eliminar la ropa contaminada. Contacto con los ojos: lavar con abundante agua.
- 5. Medidas contra incendios:** permanecer en el área de riesgo solo con sistemas de respiración independientes al ambiente. Utilizar polvo seco, dióxido de carbono y espuma para apagar el incendio.
- 6. Medidas en caso de vertido accidental:** evitar el contacto con la sustancia, asegurarse de que exista una ventilación adecuada, evacuar el área de peligro y respetar los procedimientos de emergencia.
- 7. Almacenamiento y Manipulación:** trabajar bajo campana extractora, almacenar en un lugar fresco, conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y ventilado, evitar el contacto con los ojos y la piel, conservar alejado de toda llama o fuente de chispas.
- 8. Controles de exposición/protección personal:** utilizar gafas de seguridad, guantes de caucho y mascarilla con filtro.
- 9. Propiedades físicas y químicas:** Peso molecular: 88.15 g/mol Temperatura de ebullición: 130 °C. Temperatura de fusión: -117 °C. Temperatura de inflamación: 62,2 °C. Temperatura de ignición: No reportado. Densidad: 0,8 g/cm³ (25 °C). pH: 6. Estado físico: líquido. Color: Incoloro. Olor: alcohol. Solubilidad en agua: 400g/l (20 °C).
- 10. Estabilidad y reactividad:** el producto es químicamente estable y las mezclas vapor/agua pueden ser explosivas con un calentamiento intenso.

11. Información toxicológica: Toxicidad oral aguda: vómitos, edema pulmonar y neumonía. Toxicidad aguda por inhalación: irritación de las mucosas, tos, insuficiencia respiratoria. Toxicidad cutánea aguda: Irritación en la piel; la exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas y dermatitis.

12. Información ecológica: su presencia en el ambiente debe ser evitada.

13. Consideraciones de Disposición Final: los residuos deben eliminarse de acuerdo con las normativas vigentes (locales y nacionales), manejar los recipientes sucios como el propio producto.

14. Transporte: terrestre, aéreo y marítimo. Grupo de embalaje: III.

Ficha de datos de seguridad. Ninhidrina.

1. Identificación de la sustancia y firma: Ninhidrina. 2. Identificación de peligros: toxicidad oral aguda, irritación cutánea y ocular.

3. Composición, Información sobre ingredientes: Ingrediente: Ninhidrina. Fórmula: C₉H₆O₄. Número CAS: 485-47-2.

4. Medidas de primeros auxilios: Tras inhalación: aire fresco. Contacto con la piel: lavar con abundante agua y eliminar la ropa contaminada. Contacto con los ojos: lavar con abundante agua. Ingestión: beber abundante agua.

5. Medidas contra incendios: los medios de extinción adecuados son agua, dióxido de carbono, espuma y polvo seco; permanecer en el área solo con sistemas de respiraciones artificiales e independientes del ambiente.

6. Medidas en caso de vertido accidental: evitar el contacto con la sustancia, asegurar una ventilación adecuada, no tirar los residuos al desagüe, recoger en seco y proceder a la eliminación de residuos. Evitar la formación de polvos.

7. Almacenamiento y Manipulación: para una correcta manipulación se deben seguir claramente las instrucciones de la etiqueta del recipiente. Almacenar en un frasco bien cerrado, en un lugar seco y protegido de la luz.

8. Controles de exposición/protección personal: no contiene sustancias con valores límites de exposición profesional. Utilizar protección respiratoria, guantes de caucho, gafas protectoras y traje protector.

9. Propiedades físicas y químicas: pH: 4,6 - 5 (10 g / l, 20 °C) Punto de fusión/punto de congelación: 250 °C Inflamabilidad (sólido, gas): No inflamable Densidad aparente: 680 kg / m³.

10. Estabilidad y reactividad: el material es estable bajo condiciones ambientales normales y en condiciones previsibles de temperatura y presión durante su almacenamiento y manipulación. Es reactivo frente a un ácido fuerte.

11. Información toxicológica: toxicidad aguda oral. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias.

12. Información ecológica: no se clasifica como peligroso para el medio ambiente acuático.

13. Consideraciones de Disposición Final: eliminar el producto y su recipiente como residuos peligrosos. Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional. No tirar los residuos por el desagüe.

14. Transporte: no relevante.

Ficha de datos de seguridad. Hidróxido de sodio.

- 1. Identificación de la sustancia y firma comercial:** Hidróxido de sodio.
- 2. Identificación de peligros:** es corrosivo, higroscópico. Reacciona con agua, ácidos y otros materiales. Causa quemaduras en piel y ojos. Puede ocasionar irritación severa del tracto respiratorio y digestivo con posibles quemaduras. En casos crónicos puede producir cáncer en el esófago y dermatitis por contacto prolongado con la piel.
- 3. Composición, Información sobre ingredientes:** Ingrediente: Hidróxido de sodio. Número CAS: 1310-73-2.
- 4. Medidas de primeros auxilios:** **Inhalación:** trasladar al aire fresco. Si no respira administrar respiración artificial. Si respira con dificultad administrar oxígeno. Mantener a la víctima abrigada y en reposo. **Ingestión:** lavar la boca con agua. Si está consciente administrar abundante agua. No inducir el vómito. **Piel:** retirar la ropa y calzado contaminado. Lavar la zona afectada con abundante agua y jabón, mínimo durante 15 minutos. **Ojos:** lavar con abundante agua. Colocar una venda esterilizada.
- 5. Medidas contra incendios:** no es combustible, pero en contacto con agua puede generar calor para encender combustibles. El material caliente o fundido puede reaccionar violentamente con agua. No usar medios de extinción halogenados ni chorro de agua a presión. Evacuar o aislar el área de peligro. Colocarse a favor del viento. Usar equipos de protección personal.
- 6. Medidas en caso de vertido accidental:** evacuar o aislar el área de peligro. Restringir el acceso de personas innecesarias y sin la debida protección. Utilizar equipo de protección personal. Ventilar el área. No permitir que caiga en fuentes de agua o alcantarillas.
- 7. Almacenamiento y Manipulación:** utilizar los elementos de protección personal así sea muy corta la exposición o la actividad a realizar con la sustancia. No fumar ni beber en el sitio de trabajo. Almacenar en lugares frescos, ventilados y secos, lejos de fuentes de calor e ignición, en recipientes no metálicos, preferentemente a nivel del piso.
- 8. Controles de exposición/protección personal:** ventilación local para mantener la concentración por debajo de los límites de salud ocupacional. Debe disponerse de duchas y estaciones lava-ojos.
- 9. Propiedades físicas y químicas:** Apariencia, olor y estado físico: sólido blanco inodoro en forma de escamas. Gravedad específica (Agua=1): 2.13/25°C Punto de

ebullición (°C): 1390 Punto de fusión (°C): 318 Presión de vapor (mm Hg): 42.0/999°C
Viscosidad (cp): 4 a 350°C pH: 14 (solución al 5%) Solubilidad: soluble en agua, alcohol y glicerol.

10. Estabilidad y reactividad: estable bajo condiciones normales de manipulación y almacenamiento. No se polimeriza. Es sensible a la humedad o exposición excesiva al aire. Reacciona rápidamente con varios azúcares y materiales inflamables.

11. Información toxicológica: provoca quemaduras severas por ingestión y contacto. Puede provocar irritación en los ojos, la piel y el tracto respiratorio.

12. Información ecológica: peligroso para la vida acuática incluso en bajas concentraciones.

13. Consideraciones de Disposición Final: debe tenerse presente la legislación ambiental local y los residuos pueden ser llevados a un relleno sanitario legalmente autorizado para residuos químicos, previa neutralización.

14. Transporte: se debe colocar la etiqueta blanca-negra de sustancia corrosiva. No transportar con sustancias explosivas, sustancias que en contacto con agua puedan desprender gases inflamables, sustancias comburentes, peróxidos orgánicos, materiales radiactivos, sustancias incompatibles ni alimentos.

Ficha de datos de seguridad. Cloruro férrico.

- 1. Identificación de la sustancia y firma comercial:** Cloruro férrico.
- 2. Identificación de peligros:** toxicidad aguda por ingestión, lesiones oculares graves, corrosivo para los metales e irritación cutánea.
- 3. Composición, Información sobre ingredientes:** Ingrediente: Cloruro férrico. Número CAS: 7705-08-0.
- 4. Medidas de primeros auxilios:** Inhalación: Se trata de un producto no clasificado como peligroso por inhalación, sin embargo, se recomienda en caso de síntomas de intoxicación sacar al afectado del lugar de exposición, suministrarle aire limpio y mantenerlo en reposo. Solicitar atención médica en el caso de que los síntomas persistan. Contacto con la piel: Quitar la ropa y los zapatos contaminados, aclarar la piel o duchar al afectado si procede con abundante agua fría y jabón neutro. Si el producto produce quemaduras o congelación, no se debe quitar la ropa debido a que podría empeorar la lesión producida si esta se encuentra pegada a la piel. Contacto con los ojos: Enjuagar los ojos con abundante agua a temperatura ambiente al menos durante 15 minutos. Ingestión/aspiración: No inducir al vómito, en el caso de que se produzca mantener inclinada la cabeza hacia delante para evitar la aspiración. En el caso de pérdida de consciencia no administrar nada por vía oral hasta la supervisión del médico. Enjuagar la boca y la garganta, ya que existe la posibilidad de que hayan sido afectadas.
- 5. Medidas contra incendios:** en caso de inflamación como consecuencia de manipulación, almacenamiento o uso indebido emplear preferentemente extintores de polvo polivalente, puede hacerse necesario el uso de ropa protectora completa y equipo de respiración autónomo. Disponer de un mínimo de instalaciones de emergencia o elementos de actuación (mantas ignífugas, botiquín portátil, etc).
- 6. Medidas en caso de vertido accidental:** ante la exposición potencial con el producto derramado se hace obligatorio el uso de elementos de protección personal. Evacuar la zona y mantener a las personas sin protección alejadas. Se recomienda absorber el vertido mediante arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro.
- 7. Almacenamiento y Manipulación:** evitar fuentes de calor, radiación, electricidad estática y el contacto con alimentos.

8. Controles de exposición/protección personal: se recomienda la utilización de equipos de protección individual básicos, utilizar guantes de protección química, gafas panorámicas contra salpicaduras y proyecciones.

9. Propiedades físicas y químicas: Estado físico a 20°C: líquido Color: marrón pH: 1 Punto de inflamación: No inflamable (>60°C) Punto de ebullición: 106 – 120°C Densidad relativa: 1,40 Kg. /l (20°C) Solubilidad en agua: Muy soluble

10. Estabilidad y reactividad: no se esperan reacciones peligrosas si se cumplen las instrucciones de almacenamiento de productos químicos. Es estable bajo condiciones indicadas de almacenamiento, manipulación y uso.

11. Información toxicológica: Toxicidad aguda oral: puede provocar irritación de garganta, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Contacto con la piel: Produce inflamación cutánea. Contacto con los ojos: Produce lesiones oculares importantes tras contacto.

12. Información ecológica: esta sustancia no está clasificada como peligrosa para el medio ambiente.

13. Consideraciones de Disposición Final: los residuos se deben diluir con agua y neutralizar con una solución de hidróxido cálcico diluido. Verter la solución resultante en condiciones controladas y respetando la legislación vigente.

14. Transporte: terrestre y marítimo. Grupo de embalaje: III