ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Zanthoxylum caribaeum.*

JOSÉ PATRICIO REYES GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

MONTERÍA

2022 – I

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Zanthoxylum caribaeum.*

JOSÉ PATRICIO REYES GONZÁLEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS QUÍMICA.

DIRECTOR:

MSc. ALBERTO ANTONIO ANGULO ORTIZ

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

MONTERÍA

2022 – I

NOTA DE ACEPTACIÓN

El informe final parcial de trabajo de grado titulado “ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE *Zanthoxylum caribaeum*“: realizado por el químico José Patricio Reyes González, para cumplir con los requisitos exigidos por la facultad de postgrados y ciencias básicas para optar el título de MAGISTER EN CIENCIAS QUÍMICAS.

_____

ALBERTO ANGULO ORTÍZ, M.Sc. Director

_____

GILMAR SANTAFÉ PATIÑO, Ph.D. Jurado,

_____

FERNIS JOSÉ MARÍN SEVERICHE, M.Sc. Jurado

AGRADECIMIENTOS

- *A Dios omnipotente que siempre ha estado presente en mi vida colmándome de mil bendiciones.*
- *Al alma mater Universidad de Córdoba.*
- *A mi padre José Patricio Reyes Arrieta quien le debo toda mi educación y financio mis estudios de postgrado con amor y trabajo duro.*
- *A mi madre querida Carmen Emilia González Durango que nunca faltaste con tus consejos en mis situaciones problemas y me ayudaste a darles solución.*
- *Al Magister Alberto Angulo Ortiz agradecido por su valioso aporte en mi formación académica.*
- *Al grupo PRONAT y a su director Gilmar Santa Fe Patiño por su colaboración incondicional y formación académica.*
- *A la profesora Orfa Inés Contreras Martínez por su tiempo y aporte biológico a mi trabajo a quien le agradezco por su tiempo y aportes biológicos a mi trabajo.*
- *Finalmente a Luis Guillermo Cuadrado Durango por los aportes en la toma de los espectros de masa y realización de los cromatogramas.*

Dedicatoria

A mi Dios

A mi hija Sara Victoria Reyes Rodríguez.

A mis padres Carmen Emilia González Durango y José Patricio Reyes Arrieta.

A mi compañera Heydy Rodríguez Castro.

A mis Hermanos Antonio, Luis y David.

TABLA DE CONTENIDO

Pag

1. INTRODUCCIÓN 18

2. OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVO GENERAL 20

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS 20

3. MARCO TEÓRICO 21

3.1 Generalidades de la familia de las Rutáceas 21

3.2 Características morfológicas del género *Zanthoxylum* 21

3.3 Distribución mundial del género Zanthoxylum. 22

4 SECCIÓN EXPERIMENTAL. 38

4.1 MATERIAL VEGETAL: 38

4.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS: 39

4.2.1. Materiales y reactivos: 39

4.2.2 Equipos: 39

4.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA 40

4.3.1 Tratamiento del material vegetal. 40

4.4 Aislamiento y purificación de componentes químicos de *Zanthoxylum caribaeum* 40

4.4.1 Preparación de la muestra para análisis cromatográficos. 41

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 41

4.5.2Protocolo del ensayo DPPH●. 43

5. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANO. 44

6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS. 45

6.1 Condiciones cromatográficas. 45

6.1.2 Espectrometría de masas 45

6.1.3 Software 46

6.1.4 Extracción de características moleculares 46

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS 48

7.1 Marcha fitoquímica 48

7.1.1 Imágenes del resultado 48

7.1.2 CCD del extracto etanólico de las hojas de *Z. caribaeum.* 49

7.1.3 Extracto etanólico de *hojas de Z. caribaeum.* 50

7.2 Análisis de los metabolitos del extracto de corteza *Zanthoxylum caribaeum* utilizando la base de datos METLIN. 59

7.3 Evidencia espectros energía Media MS-FINDER 71

7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. 91

7.4.1 Evaluación de actividad antioxidante por el Método DPPH•. 91

7.4.2 Evaluación de actividad antioxidante por el método ABTS+•. 101

7.4.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP. 110

8 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 112

9 CONCLUSIÓN 116

10 BIBLIOGRAFÍA. 116

Lista de Figuras

Figura 1. Taxonomía *Zantoxylum Caribaeum* ……18

Figura 2. Distribución geográfica de las especies pertenecientes al género z*anthoxylum*…….19

Figura 3. Mapa de Colombia, en color amarillo distribución de género *zanthoxylum.*.,…….21

Figura 4: Principales representantes de los alcaloides benzofenantridínicos. Fagaronina **(1)**; nitidina **(2)**; queleritrina **(3)**; sanguinarina **(4)** ……26

Figura 5: Alcaloides tipo benzofenantridínicos aislados de la especie Zanthoxylum quinduense. 8-hidroxi-2,3- metilendioxi-9-metoxibenzofenantridina **(5)**; nornitidina **(6)**, norqueleritrina **(7)**, arnotianamida **(8)**; acetonildihidroqueleritrina **(9)** …….27

Figura 6: Alcaloides berberínicos encontrados en Zanthoxylum. Berberina **(1)**; jarratrozina **(2)**; columbamina **(3)**; palmatina **(4)**……27

Figura 7: Alcaloides aporfirínicos encontrados en Zanthoxylum. Liriodenina **(1)**; N - acetildehidroanonaina **(2)**; N - anonaina **(3)**; Magnoflorina **(4)**……28

Figura 8: Alcaloides bencilisoquinolínicos de Zanthoxylum. (-) isotembetarina

(1); (-)- xylopinidina **(2)**……..……28

Figura 9: Alcaloides isoquinolínicos *Zanthoxylum*: γ-Fagarina **(1)**; Kokusaginina **(2)**; Maculina **(3)**; Teclaerverdoornina **(4)**; Acromicina **(5)**; Skimianina **(6)**……29

Figura 10: Monoterpenos representativos del género *Zanthoxylum*: α-Pineno **(1)**; Linalool **(2)**; E β- Ocimeno **(3)**; Mirceno **(4)**; p-cimeno **(5)**; Limoneno **(6)**……30

Figura 11: Sesquiterpenos representativos de *Zanthoxylum*: β-Elemeno **(1)**; Germacreno D **(2)**; Biciclogermacreno **(3)**; δ-Cadieno **(4)**; 10α-metoxicadinan-4-en-3-ona **(5)**; 10β-metoximuurolan-4en-3-ona **(6);** α-Humuleno **(7)**; Germacrona **(8)**..30

Figura 12: Triterpenos representativos del género *Zanthoxylum*: β-Amirina **1**; Lupeol **2**; Lupenona **3**; Betulina **4**……...31

Figura 13: Lignanos diarilbutirolactónicos encontrados en *Zanthoxylum*: Hinokinina**1**;Cubebina**2**; Metil arctigenina **3** ;Gadaina**4**; Meridinol **5**……31

Figura 14: Lignanos furofuránicos encontrados en *Zanthoxylum*: Asarinina **1**; Sesamina **2**; Eudesmina **3**; (+)-Siringaresinol **4**; Planispina A **5**; Kobusina **6**…….32

Figura 15: Principales cumarinas simples obtenidas del género *Zanthoxylum*. Cumarina **1**; Isoscopoletina **2**; Daftenina-7-metiléter **3**; Umbeliferona **4**; Escopoletina **5**; 6,7-dimetilesculetina **6**; Herniarina **7**; 4-metoxicumarina **8**; Metilcumatina **9**; 6-metilcumarina **10**; Lacirnatina **11**……..……32

Figura 16: furocumarinas representativas del género *Zanthoxylum*. Psoraleno **1**; Xantotoxina **2**; Bergapteno **3**; isopimpinelina **4**; Isobergapteno **5**; Imperatonina **6**; Xantotoxol **7**……33

Figura 17: Piranocumarinas representativas de *Zanthoxylum*. Dipetalina **1**; Alloxanthoxyletina **2**; Xanthoxlyyletina **3**; Xnatyletina **4**; Tetrahidroxantyletina **5**; Braylina **6**…….....……33

Figura 18: Flavonas representativas de *Zanthoxylum*: Vitexina **1**; sovitexina **2**; Apigenina **3**; Diosmina **4**……34

Figura 19: Flavonoles encontrados en *Zanthoxylum*: Kaempferol **1**; Hiperina **2**; Quercetina **3**; Afzelina **4**; Quercitrina **5**; Triofolina **6**; Quercetina 3-O-β-glucósido **7**; Isorhamnetina 3-O-α-L-ramnósido **8**; Rutina **9**……34

Figura 20: Flavanonas representativas de *Zanthoxylum*: Catequina **1**; 5-metoxy-7-hidroxi flavanona **2**; Hesperidina **3**; Neohesperidina **4** ……35

Figura 21. Cromatogramas para Cantin-6-ona (A01), Dihidrosanguinarina(A03), Dihidrogliciteina (A04) ……51

Figura 23. Cromatogramas para los compuestos Cantin-6-ona (A01), Dihidrosanguinarina(A03), Dihidrogliciteina (A04)……54

Figura 24. Espectros de MS de las fracciones A01, A03 y A04……55

Figura 25. Cromatograma del extracto etanólico de corteza de *Zantoxylum caribaeum*……*55*

Figura 26. Cromatograma del extracto acuoso de las hojas de *Zantoxylum caribaeum*……64

Figura 27. Patrón de fragmentación de cantina-6-ona aislado……70

Figura 28. Cromatograma RMN para la cantin-6-no……..70

Figura 29. Espectro de A09 ID40 (-)-Loliolida;Loliolida……71

Figura 30. Espectro de A09 ID49 C00050650……71

Figura 31. Espectro de A08 ID76 6-(2-hidroxi-ciclopentil)-7-oxo-heptanamida)…72

Figura 32. Espectro de A08 y A09 ID88 (Ácido 7-hidroxieucommico)……72

Figura 33. Espectro de A08 y A09 ID89 (ácido beta-carbolina-1-propiónico)…….73

Figura 34. Espectro de A09 ID137 (N-Oxido-Tramadol)……73

Figura 35. Espectro de A08 ID180 ácido todo-trans-5,6-epoxiretinoico……..74

Figura 36. Espectro de A08 ID183 (ent -7 alfa-ácido hidroxikaur-16-en-19-oico;ent-7beta- ácido hidroxikaurenoico) ……74

Figura 37. Espectro de A08 ID189 (UNPD191078)……75

Figura 38. Espectro de A08 ID195 (UNPD160901)……75

Figura 39. Espectro de A08 ID201……76

Figura 40. Espectro de A08 ID202 2- [[2-furanil(oxo)metil]amino]-5,6,7,8-tetra hidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carboxílico éster etílico del ácido……...76

Figura 41. Espectro de A08 ID205 (prostaglandina B2) ……... …….77

Figura 42. Espectro de A08 ID210 (afidicolina) …….....77

Figura 43. Espectro de A08 ID218 (Gibberellin A14;GA14)……....78

Figura 44. Espectro de A08 ID219 (3a,21-dihidroxi-5b-pregnano-11,20-diona)…78

Figura 45. Espectro de A08 ID220 (fenotrina)……..……..79

Figura 46. Espectro de A08 ID222……79

Figura 47. Espectro de A08 ID224……80

Figura 48. Espectro de A08 ID229……80

Figura 49. Espectro de A08 ID235 (3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano [2,3: 7,8] flavona) ……81

Figura 50. Espectro de A08 ID236 (Xanthoangelol C) ……81

Figura 51. Espectro de A08 ID237 (6'',6''- Dimetilpirano [2'',3'':6',5']- 2'-hidroxi-4,4'-dimetoxicalcona) ……..82

Figura 52. Espectro de A08 ID289 4-{5-[(etilperoxi)metil]-4-metiltiofen-2-il}-6-[(oxan-2-iloxi) metil]piridin-2-carboxilato de etilo) ……...82

Figura 53. Espectro de A08 ID296 (27-nor-5b-colestano-3a,7a,12a,24,25-pentol)……..……83

Figura 54. Espectro de A08 ID319 ((2R,3S,5S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-17-[(1S,2R,3R,4S)- 4-etil-2,3-dihidroxi-1,5-dimetil-hexil]-2,3-dihidroxi-10,13-dimetil-1,2,3,4,5,7,8,9,11,12 ,14,15,16,17-tetradecahidrociclopenta[a]fenantreno-6-ona**)**……..…**….83**

Figura 55. Espectro de A08 ID321 (UNPD18173). ……..…84

Figura 56. Espectro de A08 ID325 ……..84

Figura 57. Espectro de A08 ID326 (15-[(E)-2, 3-dihidroxi-4-isopropil-1-metil-hex-4-enil]-4,5-dihidroxi-2,16-dimetil-9-oxatetraciclo[9.7.0.02,7.012,16]octadecan-8-ona) …….85

Figura 58. Espectro de A08 ID334 (Teasapogenol A) ……85

Figura 59. Espectro de A08 ID341 (ácido gentirigénico) ……86

Figura 60. Espectro de A08 ID348 (Acinospesigenina A.) ……86

Figura 61. Espectro de AO8 349 (Alisol E 23-acetato) ……..87

Figura 62. Espectro de A08 ID355 (UNPD129863) ……87

Figura 63. Espectro de A08 ID370 (UNPD215179) ……..…88

Figura 64. Espectro de A08 ID376 (CNP0432080) ……..…88

Figura 65. Espectro de A09 ID377 (linarina; 7-O-rutinósido de acacetina; 7-rutinósido de acacetina; Budleoflavonolosida) ……89

Figura 66. Espectro de A08 ID382 (UNPD2351)……...89

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Marcha fitoquímica del subextracto crudo de corteza de Z.caribaeum……50

Imagen 2. Estudio cromatográfico mediante CCD de las hojas de *Z. caribaeum* con compuestos con distinto Rf……..51

Lista de graficas.

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato Hojas…….87
Gráfica 2. Actividad antioxidante DPPH• para el subextracto bencénico de hojas…….……...89
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de Diclorometano hoja…….……91
Gráfica 4. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato de corteza.,…….……92
Gráfica 5. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de bencina corteza…….…..……94
Gráfica 6. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de diclorometano corteza…….96
Gráfica 7. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato corteza……..……98
Gráfica 8. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato hoja……..……..99
Gráfica 9. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto bencénico de hojas……..……101
Gráfica 10. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto diclorometano de hojas…….....103
Gráfica 11. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto bencina de corteza…….....104
Gráfica 12. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto diclorometano de corteza…….……..……106
Grafica 13. Absorbancia vs concentración de los subextractos y referencia (Ac ascórbico) por el método de FRAP…….……108
Grafica 14. Porcentaje de reducción del crecimiento de las cepas biológicas C. Auris, C. Albicans, C. Glabrata, C. Trpicalis de Vs Extracto de corteza……..110

Grafica 15. Porcentaje de reducción del crecimiento de las cepas biológicas C. Auris, C. Albicans, C. Glabrata, C. Tropicalis de Vs Extracto de acuoso de hojas ……111

Lista de tablas

Tabla 1. Especie, lugar, parte de la planta y tratamiento referencia bibliografía...21

Tabla 2 . Número y nombre de genotipo, especie, variedad y procedencia, de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. (Rutaceae)…….……36

Tabla 3. Marcha fitoquímica del extracto crudo……46

Tabla 4. Identificación mediante pico ion molecular Cantin-6-ona Dihidrosanguinarina y Dihidrogliciteina……..……49

Tabla 5. Lista de metabolitos detectados en modo de ionización positiva por UHPLC-QTOF-MS/MS del extracto etanólico de corteza de *Z. caribaeum* en la base de datos de METLIN……..…….…….……..53

Tabla 6. Lista de metabolitos secundarios detectados en modo de ionización positiva por UHPLC-QTOF-MS/MS de las hojas de *Z. caribaeum* subextracto acuoso en la base de datos METLIN…….……61

Tabla 7. Compuestos similares entre la fracción etanólica de la corteza y el subextractoacuoso de hojas de Zantoxylum Caribaeum……..……..…..84

Tabla 8. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de hojas por el método de DPPH•……86

Tabla 9. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto bencénico de hojas por el método de DPPH•…….88

Tabla 10. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de hojas por el método de DPPH•……90

Tabla 11. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato de corteza por el método de DPPH•…….91

Tabla 12. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto bencénico de corteza por el método de DPPH•……..93

Tabla 13. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de corteza por el método de DPPH•……..95

Tabla 14. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de corteza por el método de ABTS+•……..97

Tabla 15. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de hojas por el método de ABTS+•……..98

Tabla 16. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de bencénico de hojas por el método de ABTS+•……100

Tabla 17. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de hojas por el método de ABTS+•……102

Tabla 18. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de bencina de corteza por el método de ABTS+•……103

Tabla 19. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de corteza por el método de ABTS+•……105

Tabla 20. Absorbancias obtenidas de los subextractos a diferentes concentraciones por el método de FRAP…….……...107

Tabla 21. Absorbancias a las diferentes concentraciones de ácido ascórbico por el método de FRAP…… 107

Tabla 22. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto crudo de corteza……..109

Tabla 23. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto acuoso de hoja……..110

Tabla 24. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto crudo de corteza…….…112

Tabla 25. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto acuoso de hoja……..112

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron tres compuestos puros, Cantin-6-ona (A01), dihidrosanguinarina (A03) y dihidrogliciteína (A04), dos alcaloides con m/z=221.0729, m/z=341.1091, y el isoflavonoide con masa m/z=287.0939 respectivamente, se identificaron mediante técnicas de UHPLC acoplado a espectrometría de masas y para cantin-6-ona se corroboro la estructura mediante RMN protónica. Además se identificaron 40 compuestos del extracto etanólico de corteza entre los que se destacan: 3,4-dimetilcatinona, (R, Z)-alfa-bisaboleno, 2-feniletil beta-D-glucopiranosido, 6-piperazin-1-il-Isoquinolina y 29 compuestos de extracto acuoso de hoja, estos son algunos 1-(2,3-dihidro-6-metil-1H-pirrolizin-5-il)-1,4-pentanediona, N-(3-oxododecanoil)homoserina lactona, Ciclopirox, 9-Nitroantraceno, Isofenoxazina, Dietiltoluamida, Granisetron, Sesquicineol, Oleoil sarcosina, Tridodecilamina.

Los subextractos de hojas en bencina de petróleo y diclorometano, presentaron la mejor actividad antioxidante por el método ABTS+•, con valores de IC_{50} 136,2 ppm y 41,15 ppm respectivamente, este último también mostró actividad antioxidante frente al radical DPPH• con IC_{50} 72,5 ppm, así como también el subextracto en acetato de etilo de corteza que presentó un valor IC_{50} de 70,45 ppm, mientras que por el método de Potencial Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP) a todas las concentraciones evaluadas los extractos que presentaron poder de reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} fueron los subextractos en diclorometano hojas y bencénico de la corteza.

El extracto acuoso de hojas presento mayor actividad inhibitoria de crecimiento expresada en porcentaje de reducción de crecimiento fúngico, con IC_{50} entre 900 y 1200 mg/mL, C_{90} y IC_{99} con valores entre 1000 y 2100 mg/mL.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia después de Brasil, es el país con mayor biodiversidad en vegetación, debido a que cuenta con aproximadamente 26.500 especies de plantas con flores por lo que se considera el segundo país con mayor riqueza (Rangel, 2015). A partir de estos recursos se extraen productos naturales en forma de extractos, los cuales son usados para el tratamiento de múltiples enfermedades, en forma de cataplasmas o infusiones, en la mayoría de las veces desconociendo la composición química que les atribuye dicha propiedad curativa o preventiva.

Dentro de esta gran variedad de plantas pertenecientes a diferentes familias, se destaca la familia Rutácea, con 160 géneros y aproximadamente 2000 especies en que se encuentran distribuidas principalmente en Asia, América y África (Okagu et al., 2021). En el cual encontramos *Zanthoxylum caribaeum* el cual es conocido popularmente como espino negro y ha sido muy utilizado por sus propiedades antiinflamatorias, aun así existen pocos estudios de esta especie que relaciona su acción biológica (Souza et al., 2017).

Por todo lo anterior se justifica la realización de este trabajo el cual se centró en él estudió fitoquímico de las hojas y corteza de la especie *Zanthoxylum caribaeum* para la extracción, purificación y elucidación de nuevos compuestos mediante el uso de técnicas como cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-QTOF-MS/MS) (Purves et al., 2016), y resonancia magnética nuclear protónica (RMN-1H), puesto que es una especie poco estudiada químicamente, existen limitados reportes investigativos y su relación con su acción biológica (Souza et al., 2017).

Algunos estudios reportan, el aislamiento de los alcaloides 5-metoxicantin-6-ona y N-metilisocordina e isocoridina metiodida en la corteza (Della & Sojo, 1967). Y actividad del aceite esencial de Z. *caribaeum,* el cual causó una alta mortalidad en los grupos de insectos *Rhodnius prolixus* (Nogueira *et al.*, 2014). Sin embargo, el género *Zanthoxylum* en general, ha sido ampliamente utilizado en la medicina

popular con el uso de la raíz, corteza, hojas y madera para promover circulación sanguínea, disipar la estasis sanguínea y controlar dolores de muela, de garganta, tos, fiebre y mordedura de serpiente. Tuyen *et al.,* (2021) mediante sus investigaciones logró confirmar la presencia de alcaloides de tipo fenantridinaquinolinas, fenilpropanoides, lignanos y cumarinas, compuestos que mostraron actividad como antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena. Es por ello que se realizó el estudio fitoquímico de la especie *Zantoxylum caribaeum* el cual tuvo como finalidad: aislar, purificar, elucidar y evaluar la actividad biológica de los componentes mayoritarios de dicha especie los cuales puedan ser promisorios para el desarrollo de nuevos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.2 Realizar el estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante, antimicrobiana de hojas y corteza de la especie *Zanthoxylum caribaeum* (RUTACEAE).

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.3.1 Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos etanólico de hojas y corteza de la especie *Zantoxylum caribaeum*, mediante las técnicas cromatográficas; cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa delgada (CCD).

2.3.2 Elucidar las estructuras de los compuestos aislados, mediante el uso de técnicas como cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-QTOF-MS/MS) y resonancia magnética nuclear (RMN-^{1}H).

2.3.3 Evaluar la actividad antioxidante de los subextractos benzina de petróleo, diclorometano y acetato de etilo de las hojas y corteza, de la especie *Zantoxylum caribaeum* frente a los radicales DPPH●, ABTS+• y reducción férrica FRAP.

2.3.4 Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de las hojas y corteza de la especie *Zantoxylum caribaeum* por el método de microdilución en caldo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de la familia Rutáceas

La familia de las rutáceas comprende cerca de 150 géneros y más de 1600 especies, las cuales se han caracterizado por presentar propiedades curativas, para tratar múltiples enfermedades. (Nguyen, et al., 2016).

Destacándose el género Zantoxylum, el cual se ha convertido en pilar de muchos estudios por sus usos etnobotánicos reportados como febrífugos, analgésicos, usado para tratar infecciones, inflamaciones, resfriados, ulceraciones, entre otros (Puga *et al*.,2013).

3.2 Características morfológicas del género *Zanthoxylum*

El género *Zantoxylum* se encuentra como árbol, arbustos o arbolillo caducifolio de 4-6 m de altura como máximo, de tallos espinosos y ramillas de color marrón, hojas opuestas paripinnadas con 3-11 folíolos ovados, opuestos de 3.7 a 6.5 cm de longitud (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007), con el ápice agudo de color verde fuerte en el haz y más claro en el envés (Figura 1).

Figura 1. Taxonomía *Zantoxylum caribaeum*

Pecíolo diminuto casi sésiles, flores verdosas dispuestas en cimas axilares sésiles que nacen después que las hojas, carecen de cáliz y tienen de 4 a 5 pétalos. Fruto en folículo rojizo, margen diminutamente dentado o entero, que se torna negruzco, fragante, elipsoide, de unos 5 mm de diámetro. Semillas negras, brillantes (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007).

3.3 Distribución mundial del género Zanthoxylum.

El género *Zanthoxylum L*. es uno de los más numerosos de la familia Rutaceae, se estima que hay alrededor de 200 especies en el mundo, aunque no existe una monografía del género. Kallunki (2004), se estima que la mayoría de las especies se distribuyen en Centroamérica y que son, principalmente, de distribución tropical. En la actualidad, la información sobre estudios de distribución geográfica realizados con este género es escasa, se conoce que en las Antillas existen hasta 45 especies y que más del 50% son endémicas (Puga *et al*.,2013)..

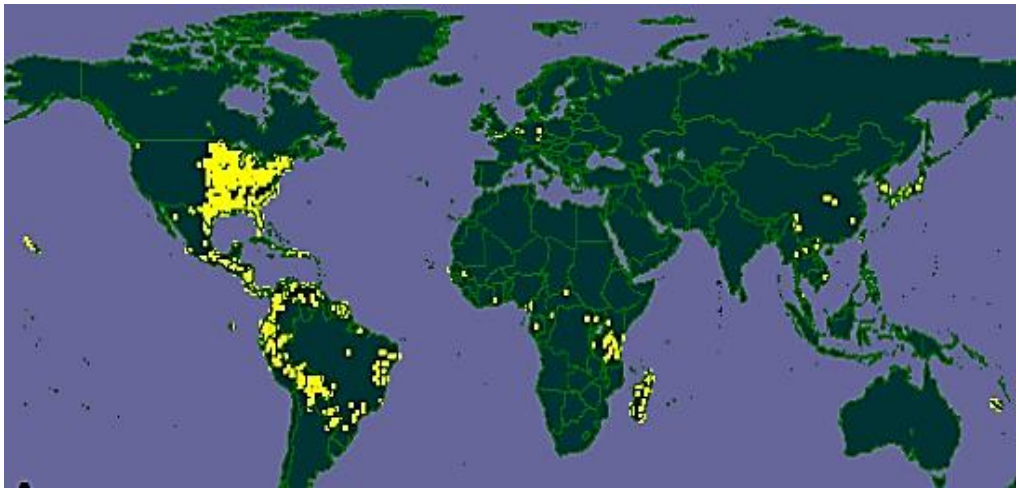


Figura 2. Distribución geográfica de las especies pertenecientes al género *Zantoxylum.*

A nivel mundial el género *Zanthoxylum* se encuentra distribuido en el continente americano: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Islas del Caribe, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, Honduras, México, Panamá, Perú, Puerto Rico, y Venezuela. En

Asia: China, India, Indonesia, Japón, Malasia y Vietnam. En África: Camerún, Kenya y Nigeria. de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander, San Andrés y Providencia, Tolima,Valle y Vaupés (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007) (**Figura 3**).

Figura 3. Mapa de Colombia, en color amarillo distribución de género *Zanthoxylum.*

El género *Zanthoxylum* se emplea especialmente en Asia, África y América en medicina tradicional, es utilizada por algunas tribus como la Ya-Mei (radicada en la Isla de Lanyu, Taiwán) como remedió contra la mordedura de serpiente, en la Tabla 1 se mencionan algunos usos etnobotánicos, de especies del género *Zanthoxylum* la amplia gama de usos etnobotánicos del género, que van desde usos medicinales, control de algunos parásitos, analgésicos, bactericidas, fungicidas, entre otros. Por lo tanto, las especies de este género pueden ser promisorias para el desarrollo de medicamentos no sólo por su distribución geográfica (casi en todo el país y a nivel mundial) sino además por su amplio uso en medicina tradicional (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007).

Cabe notar que las partes que más se utilizan en la medicina tradicional son las hojas, tallo y raíces, por lo que supone que estas se encuentran concentradas el mayor número de metabolitos; es por ello que se observa la realización de ensayos biológicos de especies del género *Zanthoxylum*, encontrándose una diversidad de metabolitos secundarios, los más representativos del género son: alcaloides, lignanos, amidas, cumarinas, terpenos, flavonoides, y algunos esteroles, cromonas, entre otros. En la tabla 1, se ilustran los múltiples usos en la medicina tradicional de las diferentes especies del género, provenientes de diversos lugares del mundo (Zanthoxylum Macías, Cuca, & Jiménez, 2007).

Tabla 1. Características de algunas especies del género *Zanthoxylum* en el mundo

ESPECIE	**LUGAR**	**PARTE DE LA PLANTA**	**USOS**	**BIBLIOGRAFÍA**
Zanthoxylum xanthoxyloide	África y Camerún	Corteza y hojas	Contra la tos, fiebre, dolor de muela, mordedura de serpiente, enteritis, disentería, diarrea, uretritis y contra la estomatitis	(Ngane,et al., 2000;Tatsadjieu, et al 2003, García 1992. NgonoNgane et al., 2008.)
Zanthoxylum chalybeum	Kenya	Corteza, raíces y hojas	Contra la malaria, resfriados, tos, dolor de muela, heridas, resfriados y neumonía	Micheni et al, 2016. Matu, E. Staden, J, (2003).
Zanthoxylum usambarense	Kenya	Corteza	Tratamiento del reumatismo	Matu, E. Staden, J, (2003).
Zanthoxylum leprieurii	Camerún	Raíces	Usado como tratamiento de la blenorragia, esterilidad,	Mouafo et al 2012, Tatsadjieu, et al 2003, Ngane et al 2000.

			ulceraciones, antibacterial	
Zanthoxylum tetraspermun	Sri Lanka		Contra la diarrea, reumatismo y dispepsia	Ross et al, 2004, Nissanka et al, 2001
Zanthoxylum integrifoliolum	Taiwán	Corteza	Remedió en la mordedura de serpiente, dispepsia y tónico contra la fiebre	Sian-Ling L. (2000)
Zanthoxylum hyemale	Brasil		Antiespasmódico, astringente y agente tónico	De Moura et al, 2002
Zanthoxylum liebmannianum	México		parásitos de tipo intestinal	Nissanka et al, 2001
Zanthoxylum budrunga	India	Fruto, hojas y corteza	Contra el asma, bronquitis, hemorroides, diarrea, dolor de cabeza, tos y dispepsia.	Islam. Et al.,(2001); Ahmadan et al (2003).
Zanthoxylum fagara, Zanthoxylum elephantiasis y Zanthoxylm martinicense	Cuba		Analgésico, antidiarreico, fiebre, enfermedades orales, enfermedades del pecho	
Zanthoxylum avicennae	China y Japón	Tallo	Tónico estomacal y contra la picadura de serpientes	Thi-Thuy,et al.,. (1999).
Zanthoxylum armantum	Himalayas		Pesticida contra el *Aphis cracccivora* Koch	Tewary, Bhardwaj, Shanker, (2005).
Zanthoxylum culantrillo	China	Hojas y corteza	Anestésico	Swinehart, Stermitz.,(1980).
Zanthoxylum dipetalum, Zanthoxylum	Hawai	Hojas y pericarpio	Ovicida e insecticida	Marr, Tang., (1992).

kavase, Zanthoxylum hawaiiense				
Zanthoxylum coriaceum	Hawai	Raíces y hojas	Diarrea, antihemorrágico, dolor de oído y tratamiento contra la mordedura de serpiente	Marr, Tang., (1992).
Zanthoxylum Davyi		Extracto metanólico de la corteza	Actividad antibacteriana sobre Staphylococcus aureus y S. epidermidis.	Steenkamp et al., 2007
Zanthoxylum Rhoifolium		Extracto etanolico y alcaloides aislados de corteza.	Actividad antibacteriana contra algunas bacterias Gram (+/-).	Gonzaga et al., 2003
Zanthoxylum syncarpum		Amida (sincarpamida) aislada de los tallos	Actividad antimalarica.	Kaur *et al*., 2009
Zanthoxylum americanum		Extractos etanólicos de las hojas, corteza, frutos y raíces.	Actividad antifúngica.	Bafi-Yeboa 2005 *et al*.
Zanthoxylum Armatum		Extracto metanólico y aceite esencial de las Hojas	Actividad pesticida contra importantes plagas agrícolas	Tewary et al., 2005

3.4 FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Zanthoxylum*

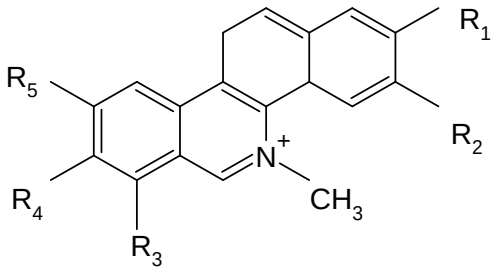
En el género *Zanthoxylum,* se han reportado una variedad de metanolitos secundarios alcaloides, terpenos, lignanos, esteroides, cumarinas, flavonoides; siendo los alcaloides los más evidenciados en este género (Diéguez, Rivas, Prieto-González, Garrido, & Torres, 2004).

La presencia de los alcaloides en gran proporción dentro de este género de plantas puede deberse a que sirven como un medio de transporte y almacenamiento de nitrógeno, además, son usados como protectores contra ataques de microorganismos patógenos y herbívoros. Los lignanos tienen función defensiva dentro de la planta, son también responsables de las propiedades de durabilidad de la planta, su color, calidad y textura de la madera (Diéguez, Rivas, Prieto- González, Garrido, & Torres, 2004).

Los terpenos tienen la función de atraer los insectos para que polinicen las flores de las plantas también sirven como repelentes de los insectos depredadores, protegiendo a la planta; se localizan en mayor proporción en las hojas, las flores y los frutos. Las cumarinas actúan como agentes microbianos e inhibidores de germinación. Se encuentran también los esteroides o esteroles, que forman parte de la membrana dando viscosidad y estabilidad a la misma, algunos también poseen funciones defensivas. Se encuentran también los flavonoides dentro del género *Zanthoxylum*, este tipo de metabolitos cumple con funciones de defensa y pigmentación, en la planta cumple un papel importante puesto que ayuda contra los fenómenos de daño oxidativo.

Según reportes se ha evidenciado la presencia de alcaloides en la mayoría de las especies de género *Zanthoxylum*, aislados de todos los órganos vegetales siendo las cortezas de tronco y raíz en donde son más abundantes, los alcaloides generalmente aislados en especies del género son de dos tipos: isoquinolinícos (benzofenantridínicos, bencilisoquinolínicos, aporfínicos, protoberberínicos y berberínicos) y quinolínicos dentro de los cuales se pueden resaltar alcaloides

benzofenantridínicos (**Figura 4**) como Fagaronina **(1)**; nitidina **(2)**; queleritrina **(3)**; sanguinarina **(4)**.



1: R_1=OH; R_2=OMe; R_3=H; R_4=R_5=OMe

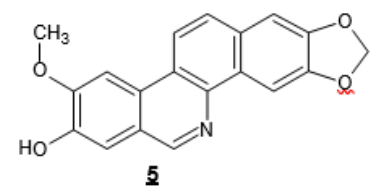
2: R_1+R_2= OCH_2O; R_3=H; R_4=R_5=OMe

3: R_1+R_2= OCH_2O; R_3=R_4= OMe; R_5=H

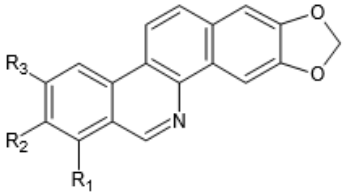
4: R_1+R_2= R_3+ R_4= OCH_2O; R_5=H

Figura 4: Principales representantes de los alcaloides benzofenantridínicos.

Patiño en 2011, reporto un estudio en el cual aisló 5 alcaloides, un nuevo alcaloide benzofenantridínico (**Figura 5)** denominado (8-hidroxi-2,3-metilenodioxi-9-metoxi benzofenantridina (**5**), y 4 ya reportados los cuales son nornitidina (**6**), norqueleri trina (**7**), arnotianamida (**8**) y acetonil dihidroqueleritrina (**9**) aislados de la especie *Zanthoxylum quinduense*.

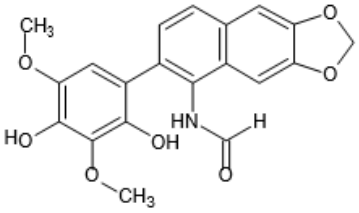


5

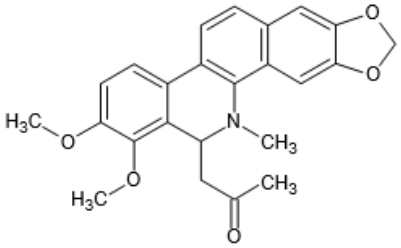


6: R_1 = H; R_2 = R_3 = OMe

7: R_1 = R_2 = OMe; R_3 = H



8



9

Figura 5: Alcaloides tipo benzofenantridínicos aislados de la especie Zanthoxylum quinduense.

Por otro lado, en el género *Zanthoxylum* se han aislado varios alcaloides del tipo berberínicos (**Figura 6**) como: Berberina **(1)**; jarratrozina **(2)**; columbamina **(3)**; palmatina **(4)** (Fish & Waterman, 2014) y algunos alcaloides aporfínicos (**Figura 7**). como Liriodenina **(5)**; N - acetildehidroanonaina **(6)**; N - anonaina **(7)**; Magnoflorina **(8)**.

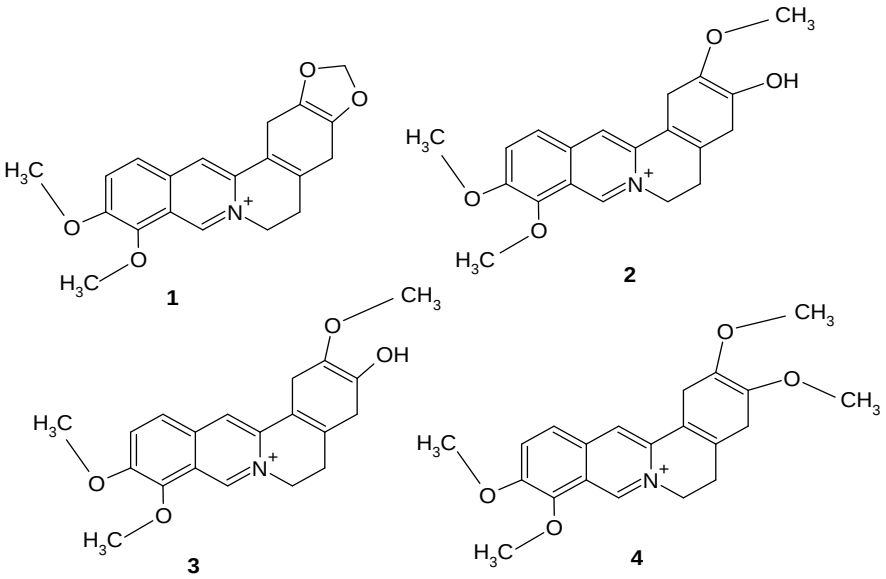


Figura 6: Alcaloides berberínicos encontrados en Zanthoxylum

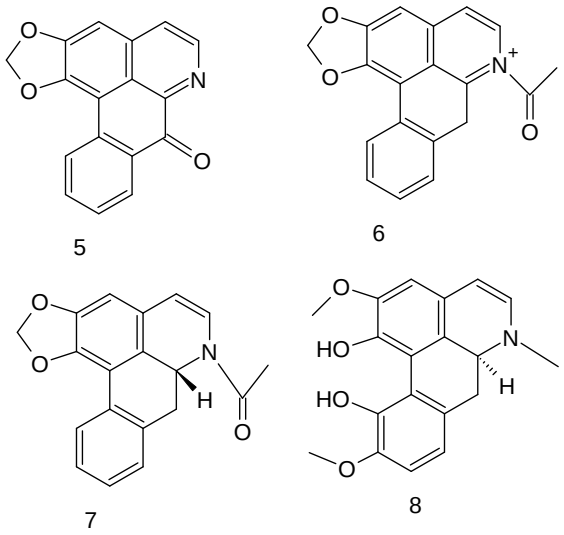


Figura 7: Alcaloides aporfínicos encontrados en *Zanthoxylum*.

Los alcaloides del tipo bencilisoquinolínicos presentan restricciones en algunas plantas del género, pero se han encontrado alcaloides de tipo cuaternario como es el caso de la (*R*)-(-)-isotembetarina (**1**) y (*S*)-(-)-xylopinidina (**2**) (Figura 8), aislados de la corteza de of *Z. quinduense* (Prieto, 2012).

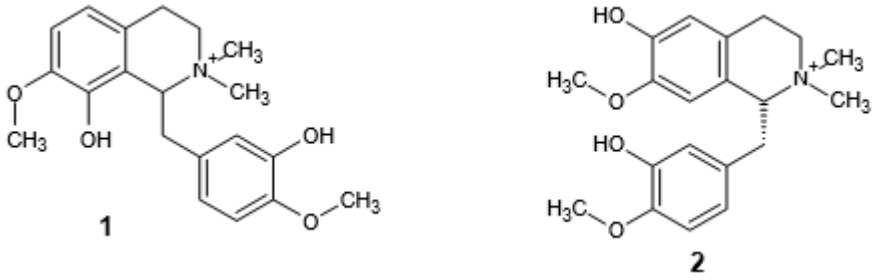


Figura 8: Alcaloides bencilisoquinolínicos de *Zanthoxylum quinduense*.

Los alcaloides isoquínolínicos presentan una marcada actividad antiespasmolítica sobre los músculos lisos (Prieto, 2012), metabolitos como: γ-Fagarina **(1)**; Kokusaginina **(2)**; Maculina **(3)**; Teclaerverdoornina **(4)**; Acromicina **(5)**; Skimianina **(6)** se han identificado como constituyentes de la corteza y la madera de las plantas pertenecientes al género (**Figura 9**).

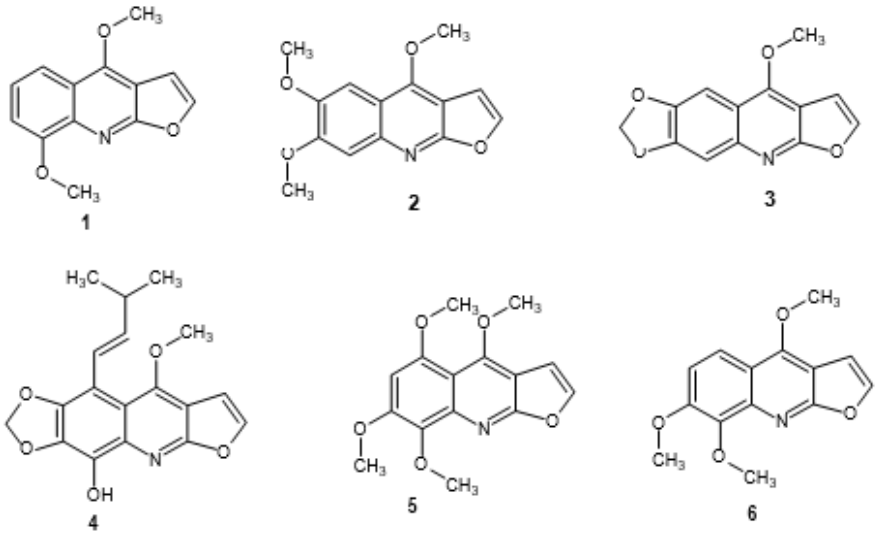


Figura 9: Alcaloides isoquinolínicos *Zanthoxylum*:

De diversas especies de este género se ha reportado el aislamiento e identificación de compuestos terpénicos, dentro de estos se pueden nombrar monoterpenos como: α-Pineno **(1)**; Linalool **(2)**; E β- Ocimeno **(3)**; Mirceno **(4)**; p-cimeno **(5)**; Limoneno **(6)** (**Figura 10**).

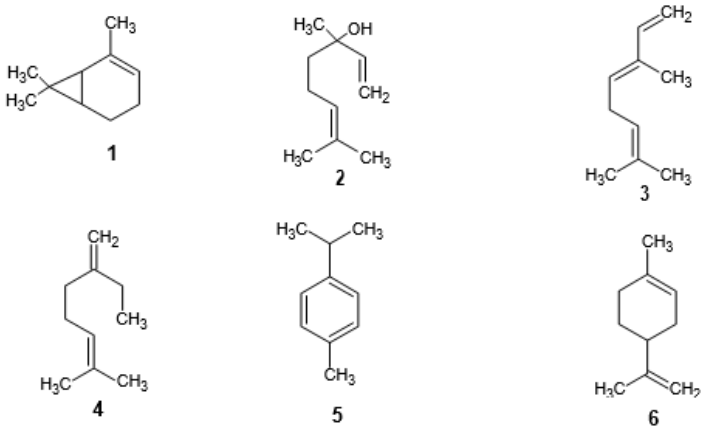


Figura 10: Monoterpenos representativos del género *Zanthoxylum*.

Sesquiterpenos reportados β-Elemeno **(1)**, Germacreno D **(2)**, Biciclogerma creno **(3)**, δ-Cadieno **(4)**, 10α-metoxicadinan-4-en-3-ona **(5)**, 10β-metoximuurolan-4en-3-ona **(6),** α-Humuleno **(7)** y Germacrona **(8),** como se muestra en la (**Figura 11**) .

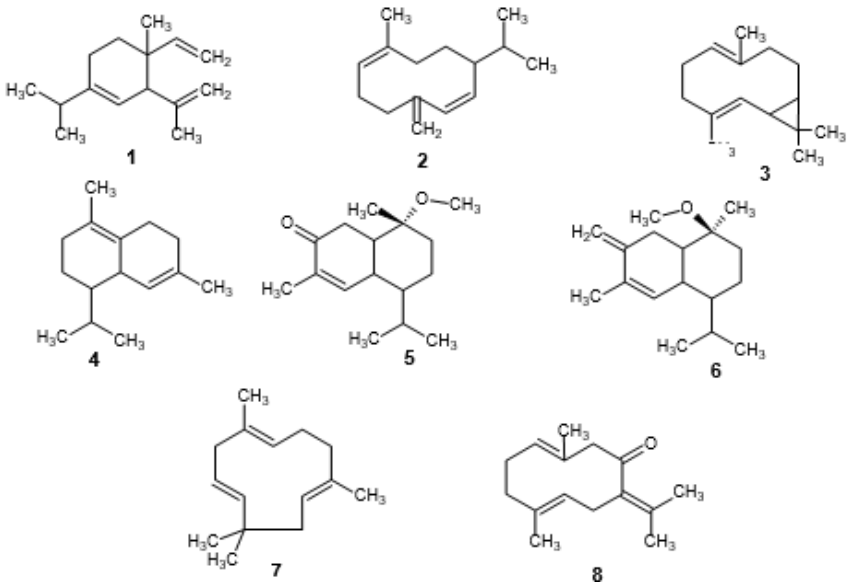


Figura 11: Sesquiterpenos representativos de *Zanthoxylum*.

Okagu et al., (2021), en su investigación sobre especies del género *Zanthoxylum* reportan la identificación de algunos triterpenos entre ellos β-Amirina **1**; Lupeol **2**; Lupenona **3**; Betulina **4** (**Figura 12**).

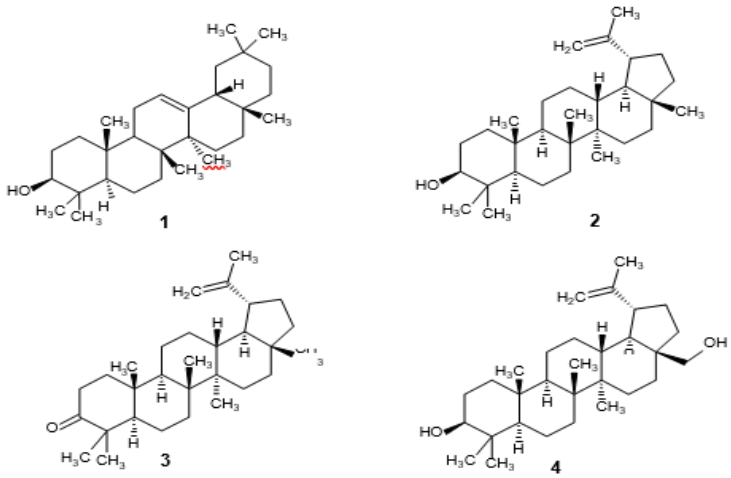


Figura 12: Triterpenos representativos del género *Zanthoxylum*:

En el género *Zanthoxylum* se han encontrado además algunos lignanos del tipo diarilbutirolactónicos y furofuránicos, dentro de los cuales están Hinokinina **1**, Cubebina **2**, Metil arctigenina **3**, Gadaina **4** y Meridinol **5** (Figura 13), estos compuestos tienen característica ser buenos agentes antioxidantes. (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007).

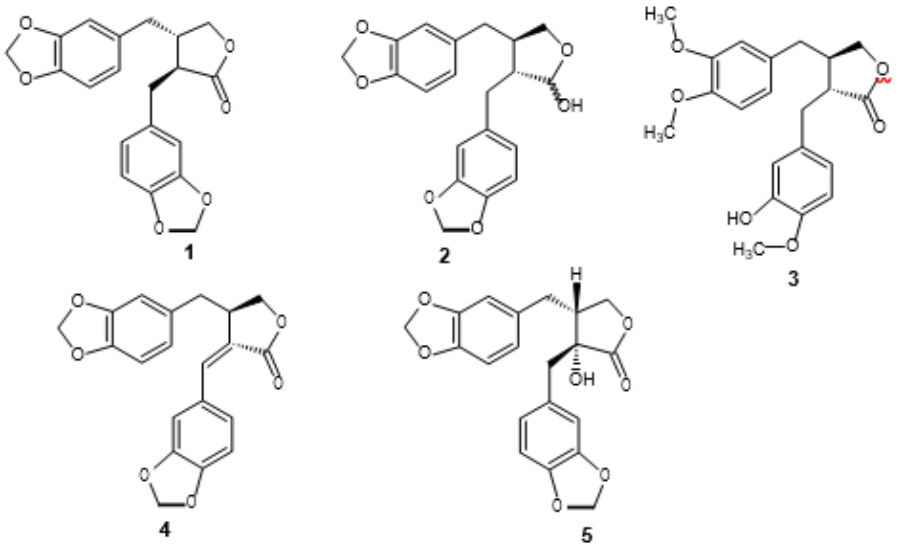


Figura 13: Lignanos diarilbutirolactónicos encontrados en *Zanthoxylum*.

Algunos Lignanos furofuránicos como Asarinina **1**; Sesamina **2**; Eudesmina **3**; (+)-Siringaresinol **4**; Planispina A **5** y Kobusina **6** (**Figura 14**) (Okagu et al., 2021).

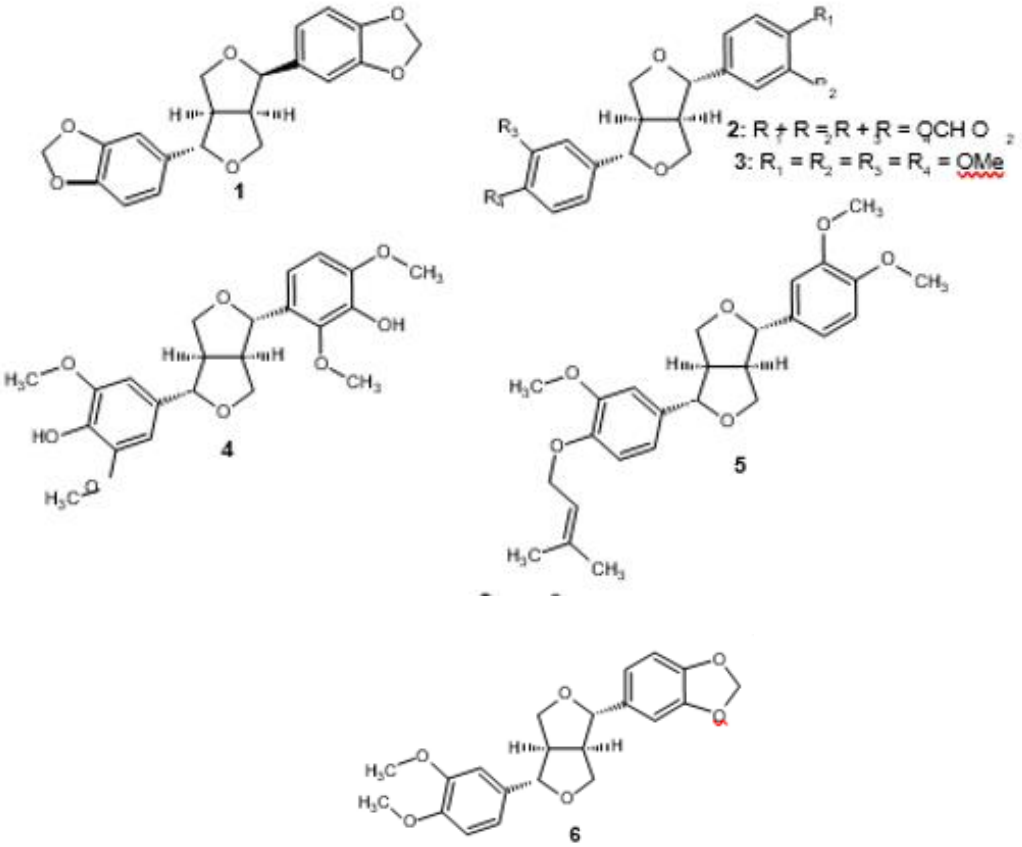


Figura 14: Lignanos furofuránicos encontrados en *Zanthoxylum*.

En este género también se han encontrado diferentes tipos de cumarinas, como son las cumarinas simples, lineales, dihidrofurocumarinas, furocumarinas y piranocumarinas. Dentro de este grupo se resaltan Cumarina **1**; Isoscopoletina **2**; Daftenina-7-metiléter **3**; Umbeliferona **4**; Escopoletina (Okagu et al., 2021) **5**; 6,7-dimetilesculetina **6**; Herniarina **7**; 4-metoxicumarina **8**; Metilcumatina **9**; 6-metilcumarina **10**; Lacirnatina **11,** como se muestra en la figura 15.

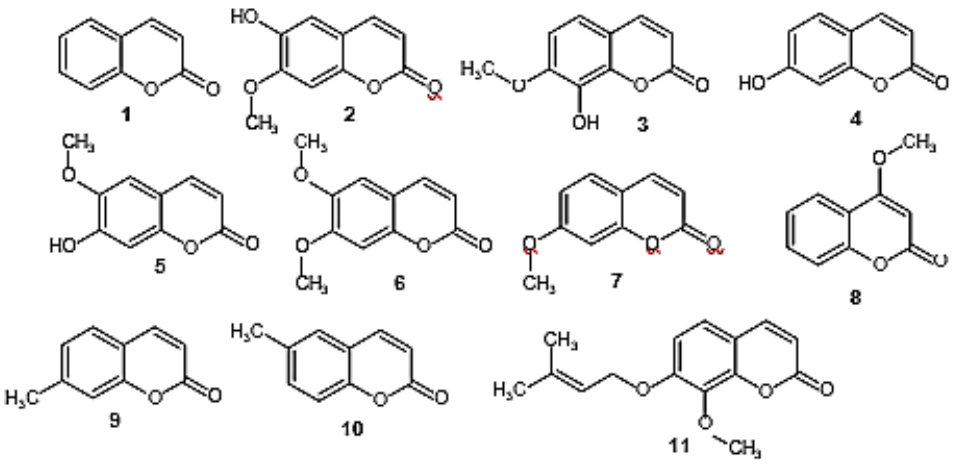


Figura 15: Principales cumarinas simples obtenidas del género *Zanthoxylum*.

Las furocumarinas poseen actividad citotóxica frente a distintas líneas tumorales, se marcadores quimiotaxonómicos de gran valor para el género Zanthoxylum, debido a que en unas especies las hay de tipo linear y en otros de tipo angular, es por estas restricciones que ha sido considera así, algunas furocumarinas (**Figura 16**) como Psoraleno **1**; Xantotoxina **2**; Bergapteno **3**; isopimpinelina **4**; Isobergapteno **5**; Imperatonina **6**; Xantotoxol **7** (Patiño et al., 2011).

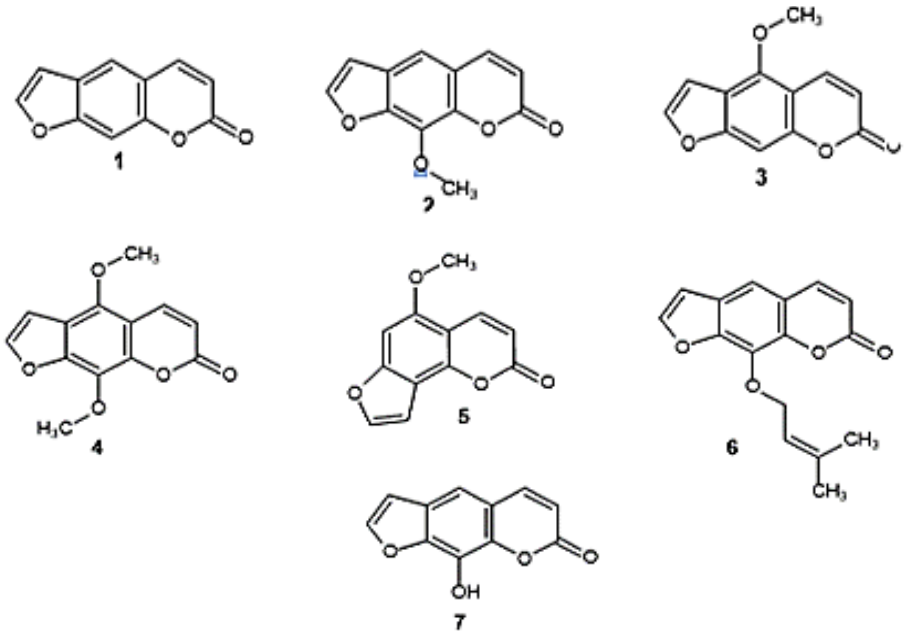


Figura 16: Furocumarinas representativas del género *Zanthoxylum*.

Las piranoquinolinas parecen estar ausentes de las especies de Zanthoxylum, se han encontrado las piranocumarinas análogas, las más representativas de Zanthoxylum como Dipetalina **1**; Alloxanthoxyletina **2**; Xanthoxlyyletina **3**; Xnatyletina **4**; Tetrahidroxantyletina **5**; Braylina **6** (**Figura 17**) (Fish & Waterman, 2014).

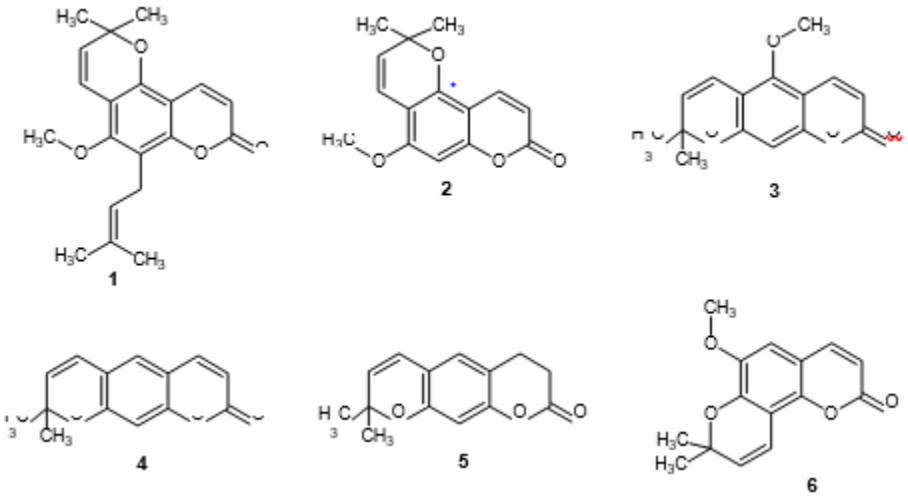


Figura 18: Piranocumarinas representativas de *Zanthoxylum*.

Dentro de este género es posible encontrar los flavonoides como glicósidos de flavonas, flavonoles y flavanonas (Figura 19), como son Vitexina **1**; Isovitexina **2**; Apigenina **3**; Diosmina **4**, éstos se caracterizan por ser compuestos polimetoxilados (Espino, 2019).

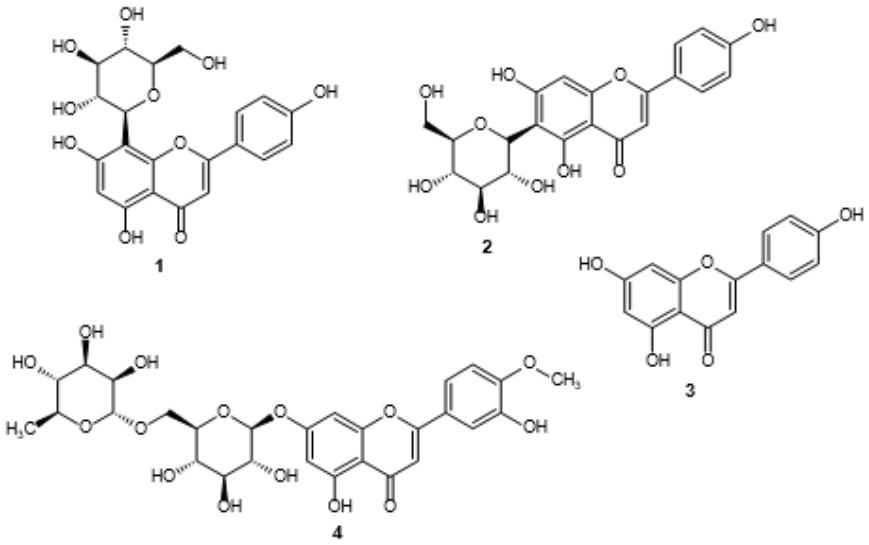


Figura 19: Flavonas representativas de *Zanthoxylum*.

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica, dentro de este grupo se destacan flavonoles como Kaempferol **1**; Hiperina **2**; Quercetina **3**;Afzelina **4**; Quercitrina **5**; Triofolina **6**; Quercetina 3-O-β-glucósido **7**; Isorhamnetina 3-O-α-L-ramnósido **8**; Rutina **9** (**Figura 18**) (Espino, 2019).

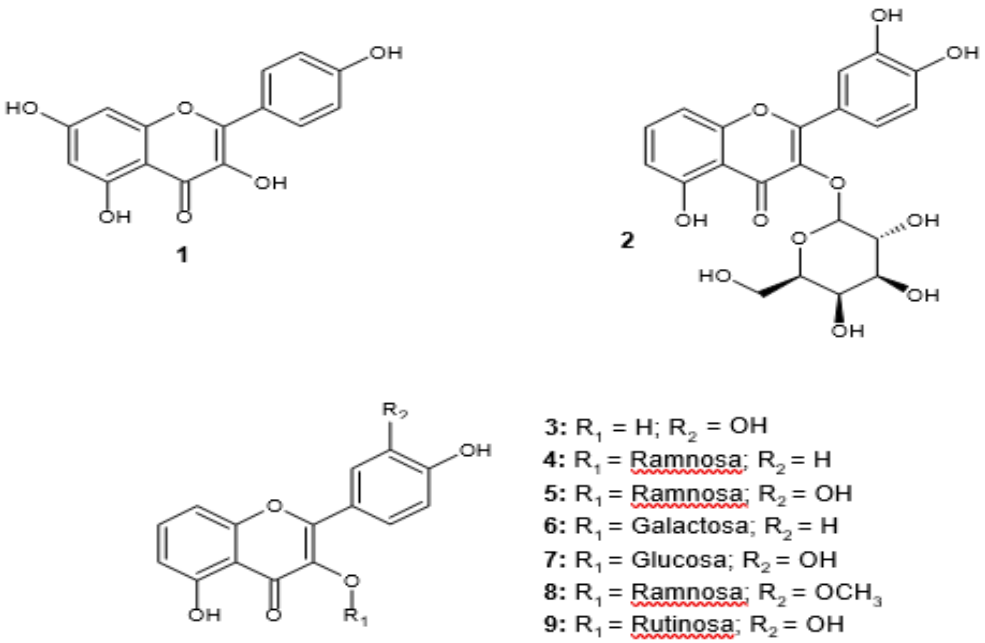


Figura 20: Flavonoles encontrados en *Zanthoxylum*.

Así mismo, tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas (Luengo M. T., 2002) dentro de los cuales están las flavonas como Catequina **1**; 5-metoxy-7-hidroxi flavanona **2**; Hesperidina **3**; Neohesperidina **4** (**Figura 21**).

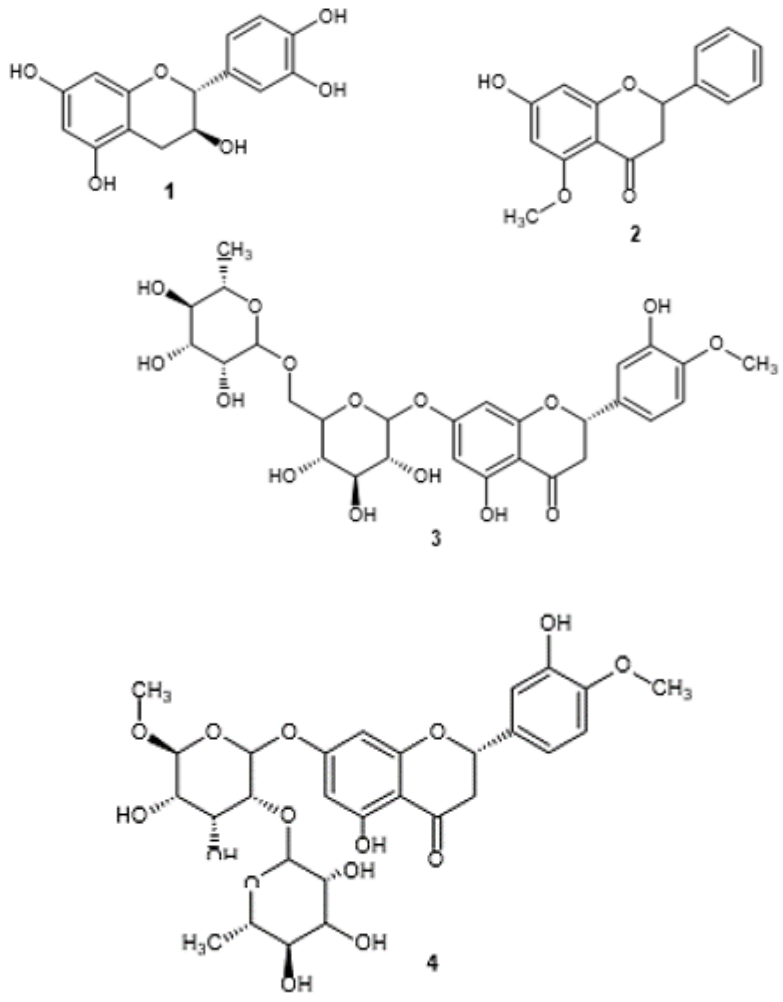


Figura 21: Flavanonas representativas de *Zanthoxylum* (Luengo M. T., 2002).

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL.

4.1 MATERIAL VEGETAL:

El material vegetal estudiado fue recolectado en el corregimiento Pantano tierra bonita del municipio de Puerto Escondido en el departamento de Córdoba (Colombia), ubicado en las siguientes coordenadas: 8°57'47.5" N y 76°05'32.8" W.

Para este estudio se tomaron las hojas, y corteza del árbol *Zantoxylum Caribaeum* con sinónimos *Fagara caribaea (Lam.) Krug & Urb.; Fagara chiloperone (Mart. ex Engl.) Engl. ex Chodat & Hassl.; Fagara occidentalis (Rose) Engl.; Zanthoxylum chiloperone Mart. ex Engl.; Zanthoxylum gentlei Lundell; Zanthoxylum nelsonii Rose; Zanthoxylum occidentale Rose; Zanthoxylum rugosum A. St.-Hil. & Tul,* la caracterización taxonómica **(Tabla 2)** fue realizada por el Herbario de la Universidad de Córdoba, mientras que el estudio químico fue desarrollado en el laboratorio Química de los Productos Naturales (PRONAT) de la facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Córdoba.

Tabla 2. Número y nombre de genotipo, especie, variedad y procedencia, de *Zanthoxylum caribaeum* Lam. (Rutaceae).

Nombre común del genotipo	Familia	Procedencia	Variedad
Tachuelo	Rutáceae	Corregimiento pantano tierra bonita en (Puerto Escondido-Córdoba) 8°57'47.5"N 76°05'32.8"W	*Zanthoxylum caribaeum.*

4.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

4.2.1. Materiales y reactivos:

En cuanto a la extracción y purificación de los compuestos, se utilizaron solventes tipo comercial: etanol, hexano y Acetato de etilo, cromatoplacas de sílica-gel 60 F_{254} soportadas sobre placas de aluminio marca Merck, para el monitoreo de las fracciones por cromatografía en capa delgada (CCD), columnas cromatográficas para la separación y purificación de los compuestos, material de vidrio (volumétrico y gravimétrico), para la evaluación de las actividades biológicas se usó: agar Sabouraud, agar Tripticasa de soja, caldo Sabouraud, caldo Mueller Hinton, fluconazol, ciprofloxacina, metanol, filtros de membrana de teflón de 0.20 µm, 2,2-azino-Bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio ($ABTS^{+\bullet}$), radical 2,2-difenil 1 picril-hidrazilo ($DPPH^{\bullet}$), persulfato de potasio ($S_2O_8K_2$) , agua estéril, buffer fosfato de pH 7.4, fosfato de dihidrógeno de sodio($NaH_2PO_4*H_2O$), fosfato disódico (Na_2HPO_4), dimetilsulfóxido (DMSO), ACN, ácido fórmico.

4.2.2 Equipos:

- ✓ Molino.
- ✓ Espectrofotómetro Spectroquant® Prove
- ✓ Soxleth
- ✓ Rota evaporador Heidolp.
- ✓ Bomba de vacío Buchí B-728.
- ✓ Balanza Analítica.
- ✓ Plancha de calentamiento.
- ✓ UV/VIS
- ✓ Lector de Elisa
- ✓ Autoclave
- ✓ Espectrofotómetro de masas
- ✓ Horno de columna

4.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

4.3.1 Tratamiento del material vegetal.

1. Las hojas y corteza se sometieron a secado con exposición al sol para la deshidratación, posteriormente fueron sometidas a un proceso de molienda para disminuir el tamaño de la muestra y aumentar la superficie de contacto con los solventes extractores.
2. Extracción lipídica de las hojas mediante el desengrase exhaustivo con Soxhlet utilizando n-hexano, para finalmente, obtener el extracto crudo hexanico y el marco.
3. Al marco se realiza extracción con etanol0 durante 24 días y con filtraciones sucesivas cada 8 días.
4. Finalmente, se rotaevaporó a presión reducida obteniendo de esta manera el extracto crudo etanólico hojas y corteza de *Zanthoxylum caribaeum*.

4.4 Aislamiento y purificación de componentes químicos de *Zanthoxylum caribaeum*

Una vez obtenido el extracto etanólico, se sometió a un proceso de separación por cromatografía en columna, con una mezcla de solventes Bencina - acetato con una relación de 95:5 para el extracto etanólico de las hojas y de 9:1 para el extracto de corteza.

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada, y posteriormente reunidas teniendo en cuenta Rf similares, nuevamente se monitorearon y se reunieron fracciones hasta obtener mayor cantidad de los compuestos similares evidenciados en la lampara UV. Posteriormente estas fracciones fueron sometidas cromatografía ultra liquida de alta resolución acoplado a masas “UHPLC-QTof-MS/MS, extracción de características moleculares (MFE), Metlín, Buscador de MS, Red Social Global de Productos Naturales (GNPS) y análisis de resonancia magnética nuclear (RMN)”.

4.4.1 Preparación de la muestra para análisis cromatográficos.

Para realizar el análisis de los extractos, se prepararon soluciones madre, disolviendo con precisión 5.0 ± 0.01 mg de cada extracto en 5.0 mL de Metanol (MeOH) (JT Baker, grado LC-MS) en un matraz aforado (Pyrex ®) de 5,0 mL y se almacenaron a - 5°C. A partir de la solución estándar se prepararon soluciones de x10 $\mu g.mL^{-1}$ y se filtraron a través de filtros de membrana de teflón de 0.20 µm (Millipore ®) para inyección en el UHPLC-QTOF-MS/MS.

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizaron ensayos dirigidos de actividad antioxidante a los subextractos de bencina, diclorometano y acetato. Para llevarlo a cabo se emplearon los métodos de radical catiónico 2,2-azino-Bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio ($ABTS^{+\bullet}$), el método de radical 2,2-difenil 1 picril-hidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) y método de potencial de reducción férrica (FRAP) (Pastrana, 2013).

Todas las pruebas y análisis se realizaron por triplicado y se calculó la media.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación:

$$\%\ Inhibición = \left[1 - \left(\frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{referencia}}\right)\right] * 100$$

Donde:

A. muestra: Absorbancia de muestra

A. blanco: Absorbancia de blanco

A. referencia: Absorbancia de referencia

4.5.1 Método catión radical ABTS+• [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]

4.5.1.1 Preparación solución madre ABTS+•.

Este método consiste en formar un radical catiónico ABTS+•, mediante una reacción de oxidación con persulfato de potasio. Para preparar la solución madre de radical ABTS+•, se tomaron 17.5 mg de ABTS+• y se disolvieron en 9.9 ml de H_2O estéril. Luego 34 mg de persulfato de potasio ($S_2O_8K_2$) se diluyeron en 1ml de H_2O. De estas soluciones preparadas se tomaron 9.9 ml de solución de ABTS+• (3.5mM) y se mezcla con 0.1 ml de solución de persulfato de potasio (1.25 mM), esta nueva solución se guarda en la oscuridad por 12 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas y se diluyeron con un buffer fosfato de pH 7.4 hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.700±0.05 a una λ=734 nm en el espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, El blanco del equipo para hacer las lecturas de absorbancia se ajustó con buffer fosfato pH 7.4 (Pastrana, 2013).

4.5.1.2 Preparación del buffer fosfato pH 7.4.

Se tomaron 0.270 g $NaH_2PO_4*H_2O$ y 0.426g de Na_2HPO_4 y se aforo hasta 500 ml con H_2O estéril (Gallego et al., 2014).

4.5.1.3 Preparación de la solución madre de los extractos.

Se preparó una solución madre de 10000 ppm de los extractos y se diluyeron en 2 mL DMSO, de la cual se tomaron alícuotas, las cuales fueron diluidas en DMSO hasta obtener concentraciones de: 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL.

4.5.1.4 Evaluación de la muestras de ABTS+•.

- Blanco de Equipo: Consiste en un buffer fosfato con un pH de 7.4 con el que se ajustó el equipo a absorbancia cero.

- Referencia: se preparó utilizando 40 µL de DMSO y 1960 µL de solución de ABTS+•.
- Muestra: Se tomaron 40 µL de las diferentes concentraciones y se diluyeron en 1960 µL del radical ABTS+• previamente preparado. Esto con la finalidad de calcular el IC_{50}.
- Blanco de Muestra: Se preparó con 40 µL de muestra y 1960 µL del buffer fosfato con pH 7.4.

Luego de que las soluciones se prepararon, se incubaron por 30 min en la oscuridad y se realizó lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a 734 nm. Todas las lecturas se realizaron por triplicado y se calculó la media (Gallego et al., 2014).

4.5.2Protocolo del ensayo DPPH●.

4.5.2.1 Preparación solución madre de DPPH●.

Para preparar la solución madre de DPPH●, se tomaron 150 mg DPPH● y se disolvieron en 7ml MeOH, la cual se guardó en la oscuridad por 24 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas de 1 mL que se diluyeron con MeOH hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.300±0.05 a una λ=517 nm en el espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20. El blanco del equipo para hacer las lecturas de absorbancia se ajustó con metanol (García, 2014).

4.5.2.2 Preparación de la solución madre de los extractos.

Se prepararon soluciones madres de 25000 ppm y 10000 ppm de los extractos los cuales se diluyeron en 3 mL DMSO. A partir de estas se prepararon soluciones para algunos extractos de 500 µg/m, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, y 100 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL para cálculos de IC_{50}.

4.5.2.3 Evaluación de la Muestras de DPPH●.

- Blanco de Equipo: se ajustó el equipo con metanol analítico hasta absorbancia cero.
- Referencia: se preparó utilizando 40 µL de metanol y 1960 µL de solución de DPPH●.
- Muestra: se tomaron 40 µL de las diferentes concentraciones y se diluyeron en 1960 µL del radical DPPH● previamente preparado. Esto con la finalidad de calcular el IC_{50}.
- Blanco de Muestra: se preparó utilizando 40 µL de la solución del extracto y 1960 µL de metanol.
- Luego de que las soluciones se prepararon, se incubaron por 30 min en la oscuridad y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm (García, 2014)**.**

5. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos, crudo de corteza (A) y acuoso de hojas (B) se realizaron a través del método de microdilución en caldo, empleando cajas de microtitulación de 96 pozos, siguiendo los protocolos descritos por el Instituto de Standares de Laboratorio Clínico (CLSI) y European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), con algunas modificaciones. Para los ensayos se emplearon ocho aislamientos clínicos, 4 fúngicos pertenecientes a Candida spp., (C. albicans, C. glabrata C. tropicalis, C. auris) y 4 bacterianos, que incluyen bacterias Gram positivas (Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium) y bacterias Gram negativas (Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli); Todos los microorganismos fueron identificados por métodos estándar: Vitek 2 Compact. Biomerieux SA., YST vitek 2 Card y AST-YS08 Vitek 2 Card (Ref 420739).

Para los ensayos, a partir de cultivos puros en agar sabouraud (para los hongos) y agar Tripticasa de soja (para bacterias) se estandarizó el inóculo fúngico (1-5 x 105

UFC/mL) y bacteriano (1-5 x 108 UFC/mL) empleando un espectrofotómetro Spectroquant® Prove 300 a 530nm. Se realizaron diluciones seriadas en caldo sabouraud y caldo Mueller Hinton para hongos y bacterias respectivamente hasta obtener concentraciones finales de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 µg/mL de los extractos a evaluar, en cada pozo de reacción. Los ensayos se desarrollaron con un volumen final de 200 µL por pozo (100 µL del inoculo microbiano y 100 µL de los extractos). Microorganismos sin tratamiento fueron empleados como control de crecimiento y los antimicrobianos fluconazol y ciprofloxacina (para hongos y bacterias respectivamente), fueron empleados como controles positivos. Las cajas fueron incubadas a 37oC por 24 horas. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción del crecimiento microbiano.

6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.

6.1 Condiciones cromatográficas.

Los extractos fueron analizados mediante u cromatógrafo de líquidos de ultra alto rendimiento (UHPLC) Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) usando un detector de matriz de diodos (DAD), en cuanto a la separación cromatográfica se realizó en una columna C18 (50 mm x 2.1 mm de d.i., 1.8 µm, Zorbax Eclipse Plus, Agilent, EE. UU.), con una fase móvil que consistió en H_2O (disolvente A) y ACN (disolvente B) con ácido fórmico al 0.1 %, respectivamente, el gradiente del cromatógrafo fue de 0-10 min, 5% B; 10-16 min, 5 a 40% B; 16-20 min, 50-100% B, la temperatura del horno de columna y del muestreador automático fue de 35°C, l flujo fue de 0.25 $mL.min^{-1}$ y el volumen de inyección fue de 2.0 µL.

6.1.2 Espectrometría de masas.

Para el análisis espectrométrico se utilizó un sistema Q-TOF-MS Agilent 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), equipado con una interfaz ESI

Jet en modo de iones positivos y negativos con variación de voltaje capilar de 2.5, 3.0 y 3.5 kV con baja, media y alta energía respectivamente, además de un flujo de gas de 10-12 $L.min^{-1}$, con una temperatura de gas de 300-350°C, nebulizador de 35 psi, Voltaje de boquilla 0.5, 1.0 y 1.5 kV, fragmentador de 85, 150 y 320 V, Skimmer de 55, 65 y 80 V, OctopoleRFPeak de 450 y 750 V, y un rango de energía de colisión de 20 ~ 50 V.

Los iones moleculares y los iones de producto se obtuvieron simultáneamente mediante exploración completa y la adquisición de MSE, los datos recolectados estuvieron en un rango de 100 a 1700 Da, con una tasa de barrido de espectro de 3.0 s^{-1} y procesados por el software MassHunter Workstation Versión B.08.00.

6.1.3 Software

Los compuestos se extrajeron de los datos sin procesar utilizando el algoritmo Molecular Feature Extraction (MFE) en el software de análisis cualitativo Mass Hunter. Las muestras se procesaron con el software MassProfiler (Agilent Technologies) y la identificación de los compuestos se realizó con el software METLIN Personal Metabolite Database and Molecular Formula Generation (Agilent Technologies).

6.1.4 Extracción de características moleculares

El algoritmo MFE es una técnica de búsqueda de compuestos que están presentes en una muestra, incluso cuando los cromatogramas son complejos y los compuestos no están bien resueltos, aunque MFE localiza iones que son covariantes (suben y bajan juntos en abundancia), el análisis no solo se basa exclusivamente en información de picos cromatográficos. El algoritmo utiliza la precisión de las mediciones de masa para agrupar iones relacionados por la envolvente del estado de carga, la distribución isotópica y/o la presencia de aductos y dímeros. Asigna múltiples especies (iones) que están relacionadas con la misma molécula neutra (por ejemplo, iones que representan múltiples estados de carga o

aductos de la misma molécula neutra) a un solo compuesto que se denomina característica. Usando este enfoque, el algoritmo MFE puede ubicar múltiples compuestos dentro de un solo pico cromatográfico.

Cuando se usa la espectrometría de masas para analizar muestras que contienen incógnitas, a menudo es necesario derivar composiciones elementales (fórmulas moleculares) para las incógnitas en función de los datos del espectro de masas. El software MassHunter MFG utiliza una amplia gama de información de MS, no solo mediciones de masa precisas, para producir una lista de fórmulas moleculares candidatas que se clasifican según sus probabilidades relativas. El software MFG ahorra a los analistas un tiempo considerable porque elimina candidatos poco probables y ofrece una clasificación relativa para los candidatos restantes, lo que facilita encontrar las fórmulas correctas.

El software MFG usa un sistema de puntuación ligeramente diferente cuando se usa junto con el algoritmo MFE que cuando se usa con datos espectrales sin procesar. MFE puede ubicar múltiples especies covariantes de la misma característica, lo que crea información adicional para usar en la determinación de la fórmula molecular. Esta información está contenida en aductos y en dímeros (especies) que a menudo son producidos por fuentes de iones a presión atmosférica. Cuando los espectros reconstruidos por MFE están disponibles, el software MFG calcula una puntuación de especies cruzadas combinada ponderada por abundancia para cada fórmula molecular.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Marcha fitoquímica

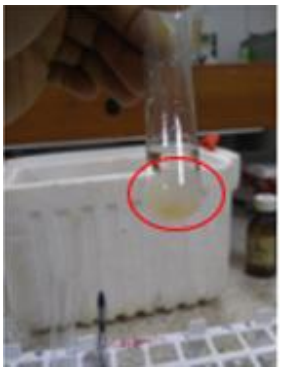
Se realizó marcha fitoquímica al subextracto crudo de la corteza y encontrándose, positivo para alcaloides, esteroides, flavonoides, antraquinonas como se ilustra en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la Marcha fitoquímica del subextracto crudo de corteza de *Z. caribaeum*.

ANÁLISIS PRELIMINAR		RESULTADOS
Alcaloides	R. Dragendorff	++
	R. Mayer	++
	R. Valser	++
Esteroides y/o Triterpenoides		+++
Flavonoides*		++
Reacción con ácido clorhídrico		---
Naftoquinonas y/o Antraquinonas**		+
Taninos y de Saponinas		---

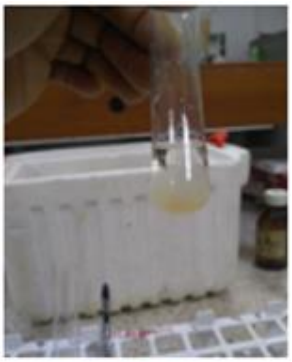
***** - Reacción de la Cianhídrica (ɣ-benzopirona); **Reacción de Bornträger-Krauss.

7.1.1 Imágenes del resultado



R. Dragendorff

R. Mayer



Bortranger- Krauss

Cianhidrina

R. Valser

R. Mayer

Imagen 1. Marcha fitoquímica del subextracto crudo de corteza de caribaeum.

7.1.2 CCD del extracto etanólico de las hojas de *Z. caribaeum.*

El estudio cromatográfico mediante CCD de las hojas de *Z. caribaeum* usando como sistema de elución Bencina: Acetato de Etilo – 95:5, permitió evidenciar la presencia de múltiples compuestos con distinto Rf, algunos con mayor afinidad al sistema de elución, por lo que se realizaron extracciones con diferentes solventes de polaridad diferente.

Imagen 2. Estudio cromatográfico mediante CCD de las hojas de *Z. caribaeum* con compuestos con distinto Rf.

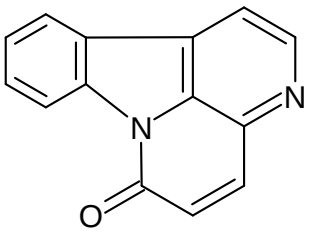
7.1.3 Extracto etanólico de *hojas de Z. caribaeum.*

El extracto etanólico de hojas fue sometido a una separación liquido-liquido obteniendo una fase polar y otra apolar (Agua- hexano). Tomando la fase polar para realizar los respectivos análisis debido a que presentaba diversos compuestos coloreados evidenciados en la lampara UV, mientras que la fase apolar era muy parecida al perfil cromatográfico en capa delgada y su índice de retención al extracto hexánico obtenido en el desengrase exhaustivo de las hojas inicialmente por soxhlet, posteriormente se realizó cromatografía en columna con distintos sistemas de elución de (95:5, 90:10, 80:20, 70:30 hasta 50:50) Bencina: Acetato. se obtuvieron 153 fracciones del extracto crudo de corteza, estas fracciones se reunieron en 9 grupos por comparación del índice de retención observados y medidos en las placas de capa delgada (CD), reveladas mediante el uso de la lámpara UV y cámara de yodo, logrando extraer y purificar tres sustancias (**Figura22**): Cantin-6-ona (A01), Dihidrosanguinarina (A02) y Dihidrogliciteina (A04), **Tabla 4** que mediante el uso obteniendo los siguientes compuestos:

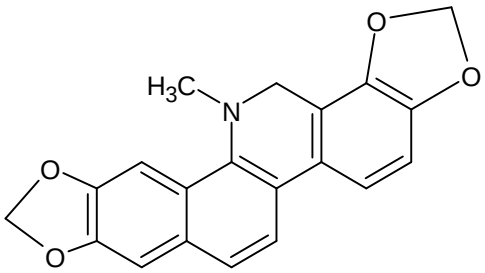
Tabla 4. Identificación mediante pico ion molecular Cantin-6-ona Dihidrosanguinarina y Dihidrogliciteina.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Compuestos	Fórmula	m/z (ESI+)	Diff (ppm)
A01	2.074	Cantin-6-ona	$C_{14}H_8N_2O$	221.0728	1.6
				193. 0768	
				167. 0628	
				140.0549	
A02	3.489	Dihidrosanguinarina	$C_{20}H_{15}NO_4$	334.1090	1.5
				318.0778	
				304.0617	
				290.0827	
A04	4.104	Dihidrogliciteina	$C_{16}H_{14}O_5$	287.0928	1.7
				272.0691	
				254.0580	
				244.0742	

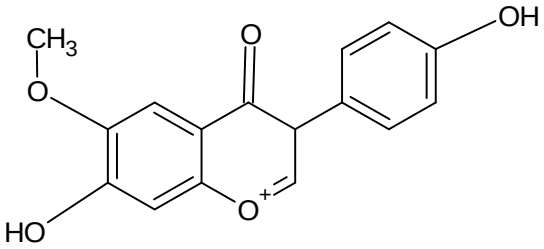
El análisis de la mayor concentración de iones en la fracción A01 permitió establecer la presencia de un alcaloide de m/z 221.0728, con un patrón de fragmentación característico de un alcaloide de indol conocido como Canthin-6-one y un error de masa de 4.7 ppm. En la **figura 23** se evidencia los cromatogramas de los compuestos con sus picos de absorción, los cuales fueron corroborados con los espectros de masas **figura 24.**



Cantin-6-ona ($C_{14}H_8N_2O$)

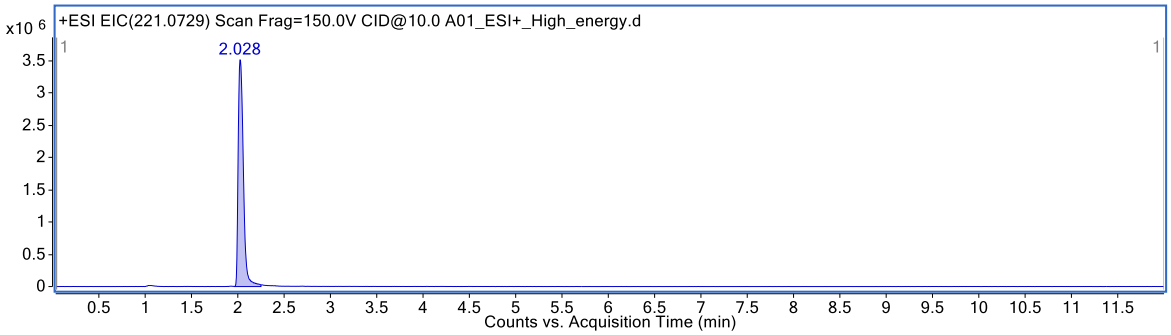


Dihidrosanguinarina. ($C_{20}H_{15}NO_4$)



Dihidrogliciteina ($C_{16}H_{14}O_5$)

Figura 22. Compuestos purificados del extracto de la corteza de *Z. caribaeum.*



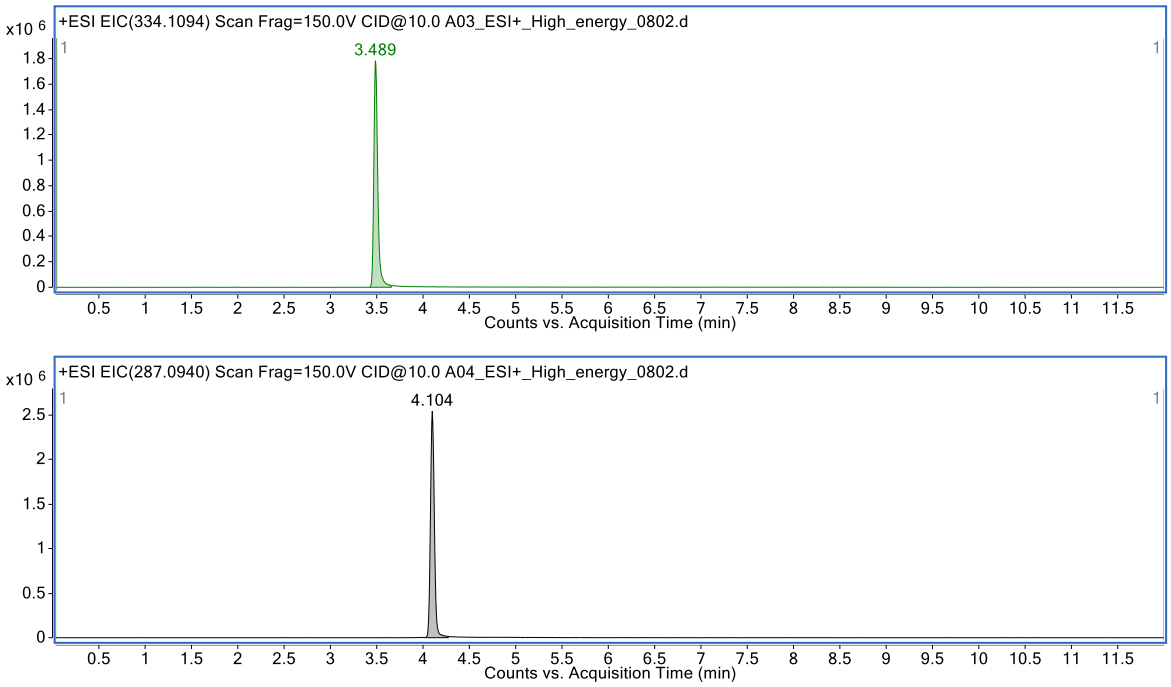
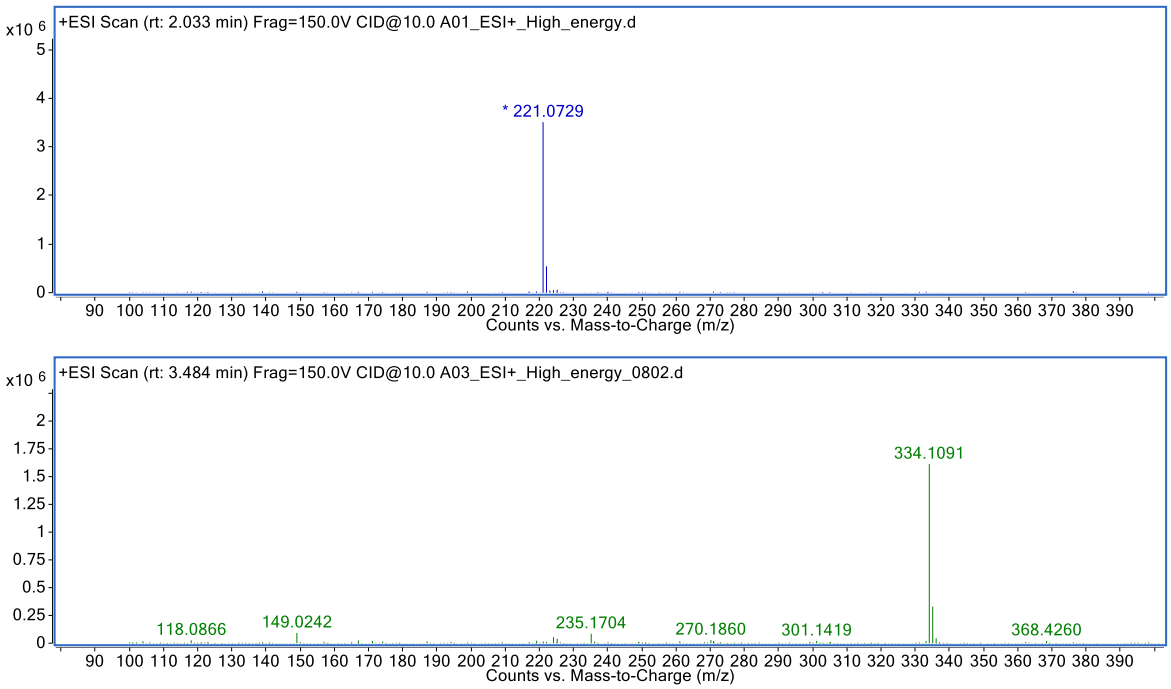


Figura 23. Cromatogramas para los compuestos Cantin-6-ona (A01), Dihidrosanguinarina(A03), Dihidrogliciteina (A04).



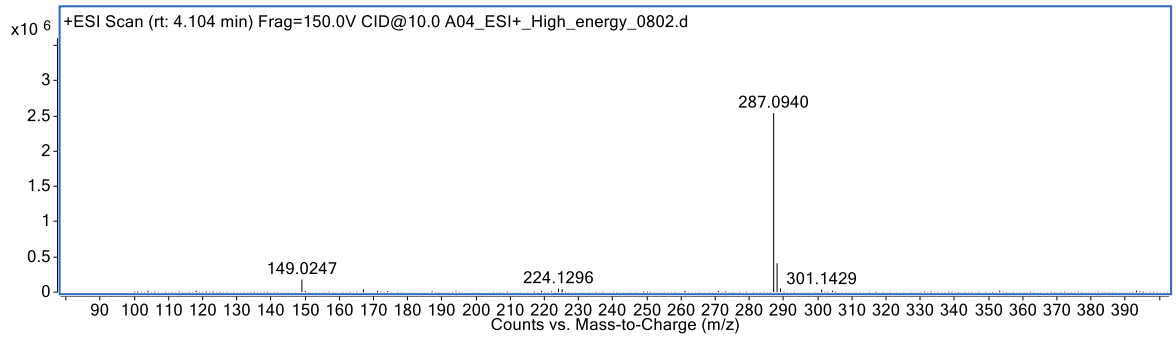


Figura 24. Espectros de MS de las fracciones A01, A03 y A04

Al extracto de corteza se le realizó un análisis de ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada espectrometría de masas (UHPLC-QTof-MS/MS) **figura 24**, identificando los principales compuestos (**Tabla 5)**, a través de bases de datos como Matlin , MS-Finder y Global Natural Products Social (GNPS).

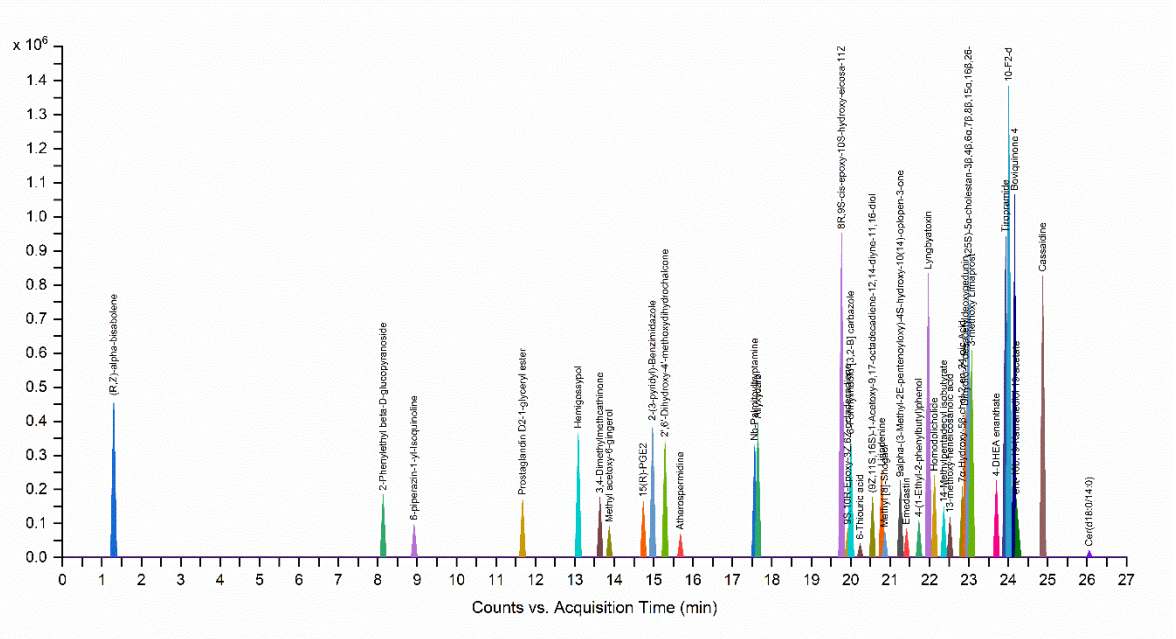


Figura 25. Cromatograma del extracto etanólico de corteza de *Zantoxylum caribaeum.*

Tabla 5. Lista de metabolitos detectados en modo de ionización positiva por UHPLC-QTOF-MS/MS del extracto etanólico de corteza de *Z. caribaeum* en la base de datos de METLIN.

Nombre	R*t* (min)	Fórmula	Masa	*m/z*	Atribución	Fórmula Generación (MFG)		Extracción de características moleculares (MFE)		Energía
						Score	Diff (ppm)	Score	Diff (ppm)	
(R,Z)-alfa-bisaboleno	1.303	$C_{15}H_{24}$	204.1876	227.1767	$[M+Na]^+$	62.71	1.12	100	1.12	Baja
2-Fenil beta-D-glucopiranosido	8.14	$C_{14}H_{20}O_6$	284.1254	285.1325	$[M+H]^+$	66.43	2.16	100	2.16	Media
6-piperazina-1-il-Isoquinolina	8.939	$C_{13}H_{15}N_3$	213.126	236.1153	$[M+Na]^+$	66.5	3.00	98.6	3.00	Baja
Prostaglandina D2-1-gliceril-ester	11.622	$C_{23}H_{38}O_7$	426.2618	427.2689	$[M+H]^+$	65.05	-0.14	97.7	-0.14	Baja
Hemigosipol	13.03	$C_{15}H_{16}O_4$	260.1048	261.1122	$[M+H]^+$	78.44	0.08	100	0.08	Baja
3,4-Dimetilmetilcatinona	13.67	$C_{12}H_{17}NO$	191.1319	192.1392	$[M+H]^+$	85.59	-4.41	100	-4.41	Media
Metil acetoxi-6-gingerol	14.477	$C_{20}H_{30}O_5$	350.2096	351.2168	$[M+H]^+$	65.6	-0.76	72.9	-0.76	Baja
15(R)-Prostaglandina E2	14.71	$C_{20}H_{32}O_5$	352.2253	353.2325	$[M+H]^+$	77.52	-1.02	89.8	-1.02	Baja

2-(3-piridil)-Benzimidazol	14.991	$C_{12}H_9N_3$	195.0796	217.1953	$[M+Na]^+$	65.01	3.67	90.5	3.67	Baja
2',6'-Dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	15.145	$C_{16}H_{16}O_4$	272.1049	272.252	$[M+H]^+$	69.21	0.33	98.3	0.33	Baja
Curcumina II	15.523	$C_{22}H_{22}O_5$	366.1467	366.3822	$[M+H]^+$	97.2	-1.31	79.2	-1.31	Baja
Aterospermidina	16.617	$C_{18}H_{11}NO_4$	305.0698	306.0773	$[M+H]^+$	72.69	-3.39	100	-3.39	Alta
Nb-Palmitoiltriptamina	17.593	$C_{26}H_{42}N2O$	398.3302	421.3197	$[M+Na]^+$	97.96	-1.15	100	-1.15	Media
Allixicarbon	17.599	$C_{16}H_{22}N_2O_2$	274.1692	292.2033	$[M+H]^+$	82.35	-3.85	100	-3.85	Alta
8R,9S-cis-epoxi-10S-hidroxi-eicosa-11Z,14Z-ácido dienoico.	19.752	$C_{20}H_{34}O_4$	338.246	339.2531	$[M+H]^+$	79.35	-0.78	92.6	-0.78	Baja
9S,10R-Epoxi-3Z,6Z-octadecadieno	19.904	$C_{17}H_{30}O$	250.2306	268.2644	$[M+NH_4]^+$	74.86	-3.66	100	-3.66	Alta
6-Formilindol[3,2-B] carbazol	19.915	$C_{19}H_{12}N_2O$	284.0962	285.1035	$[M+H]^+$	84.36	-4.46	90.6	-4.46	Alta
6- ácido tioúrico	20.184	$C_5H_4N_4O_2S$	184.0058	185.013	$[M+H]^+$	61.16	-1.74	100	-1.74	Media

(9Z,11S,16S)-1-Acetoxi-9,17-octadecadieno-12,14-dieno-11,16-diol	20.595	$C_{20}H_{28}O_4$	332.1987	333.206	$[M+H]^+$	68.36	0.15	100	0.15	Baja
Liriodenina	20.716	$C_{17}H_9NO_3$	275.0595	276.0666	$[M+H]^+$	81.01	-4.74	100	-4.74	Alta
Metil-[8]--shogaol	20.77	$C_{20}H_30O_3$	318.2194	319.2263	$[M+H]^+$	73.58	0.32	100	0.32	Media
1-naftilacetilespermina	21.048	$C_{22}H_{34}N_4O$	370.2723	393.2612	$[M+Na]^+$	79.4	2.71	100	2.71	Media
9alfa-(3-metil-2E-pentenoiloxi)-4S-hidroxi-10(14)-oppen-3-ona	21.32	$C_{21}H_{32}O_4$	348.2296	349.2369	$[M+H]^+$	71.47	1.25	85.1	1.25	Media
Emedastina	21.399	$C_{17}H_{26}N_4O$	302.2105	303.2179	$[M+H]^+$	57.59	0.43	100	0.43	Alta
4-(1-etil-2-fenilbutil)fenol	21.703	$C_{18}H_{22}O$	254.1679	255.1751	$[M+H]^+$	69.79	-3.31	100	-3.31	Alta
Lingbiatoxina	21.968	$C_{27}H_{39}N_3O_2$	437.3039	455.3377	$[M+NH_4]^+$	95.8	0.86	99.7	0.86	Alta
Homodolicolido	22.158	$C_{29}H_{48}O_6$	492.346	493.3532	$[M+H]^+$	68.11	-1.91	100	-1.91	Baja

14-Metilpentadecil isobutirata	22.32	$C_{20}H_{40}O_2$	312.3043	330.3382	$[M+NH_4]^+$	76.11	-4.62	100	-4.62	Alta
13-metoxi- ácido heneicosanoico	22.464	$C_{22}H_{44}O_3$	356.3302	374.3641	$[M+NH_4]^+$	80.87	-3.11	100	-3.11	Alta
7α-Hidroxi-5β-chol-2-en-24- Acid oico	22.857	$C_{24}H_{38}O_3$	374.2821	392.3165	$[M+NH_4]^+$	86.65	0.05	100	0.05	Baja
Dihydro-7-desacetyldeoxygedunin	22.9	$C_{26}H_{34}O_5$	426.2412	427.2484	$[M+H]^+$	81.96	-1.37	100	-1.37	Baja
(25S)-5alfa-colestan-3beta,4beta,6alfa,8beta,15alfa,16beta,26-heptol	22.933	$C_{27}H_{48}O_8$	500.3355	501.3427	$[M+H]^+$	98.16	-1.12	100	-1.12	Media
3-metoxi Limaprost	23.061	$C_{23}H_{40}O_6$	412.283	413.2905	$[M+H]^+$	97.57	-1.3	82.1	-1.3	Media
enantato de dehidroepiandrosterona	23.675	$C_{26}H_{40}O_3$	400.299	401.3051	$[M+H]^+$	71.24	-3.09	80.5	-3.09	Media
Tiropramida	23.925	$C_{28}H_{41}N_3O_3$	467.3146	485.3484	$[M+NH_4]^+$	98.52	0.5	78	0.5	Baja
(8Z,12E)-13-(3,5-dihidroxi-2-pentilciclopentil)-11-	24.005	$C_{23}H_{40}O_5$	396.2882	397.2955	[M+H]+	97.98	-1.5	85.3	-1.5	Baja

hidroxitrideca-8,12-ácido dienoico										
Boviquinona 4	24.11	$C_{26}H_{36}O_4$	412.2615	413.2677	$[M+H]^+$	59.68	-0.22	100	-0.22	Baja
ent-16b,19-kauranediol 19-acetato	24.181	$C_{22}H_{36}O_3$	348.2661	349.2735	$[M+H]^+$	86.43	0.99	100	0.99	Media
Casaidina	24.87	$C_{24}H_{41}NO_4$	407.3035	408.3109	$[M+H]^+$	98.55	0.04	85.5	0.04	Media
N-(miristoil)-dihidroceramida	26.976	$C_{32}H_{65}NO_3$	511.4979	512.5053	$[M+H]^+$	77.54	-2.88	100	-2.88	Alta

7.2 Análisis de los metabolitos del extracto de corteza *Zanthoxylum caribaeum* utilizando la base de datos METLIN.

Una herramienta en productos naturales que ha sido muy útil e importante en los últimos años para la identificación y cuantificación de metabolitos en la investigación vegetal es la espectrometría de masas. Sin embargo, la complejidad de los datos generados y su tamaño imponen grandes desafíos computacionales para el procesamiento de datos. Actualmente, existen numerosas herramientas destinadas a respaldar el perfilado de metabolitos basado en espectrometría de masas y el intercambio de datos entre laboratorios analíticos. Este trabajo aplicó bases de datos disponibles como METLIN, MS-FINDER y GNPS para explorar la composición química de extractos de la planta tropical *Z. caribaeum* . Después de enviar las muestras de análisis al espectrómetro UHPLC-QT of-MS/MS, los datos se cargaron en las bases de datos para la identificación de estructuras potenciales. Se utilizaron diferentes evidencias y filtros para proponer estructuras probables en este documento. Inicialmente, el sistema Q-Tof-MS/MS en modo Auto MS/MS con variaciones en los parámetros de energía de la fuente de ionización permitía obtener información de las masas monoisotópicas de pequeñas, medianas y grandes masas moleculares, así como correlacionar la presencia de posibles metabolitos en los extractos a través de patrones de fragmentación. Utilizando la herramienta algorítmica MFE se procesaron los datos extraídos obtenidos de los análisis. La técnica permitió el descubrimiento de compuestos mediante la localización de componentes moleculares individuales en los extractos, incluso cuando los cromatogramas son complejos (Sana *et al.*, 2008) . En consecuencia, las fracciones A08 y A09 se analizaron mediante UHPLC-QTof-MS/MS y los datos generados se procesaron para comparar los valores de MFE y MFG. Los datos resultantes se importaron y combinaron en dos proyectos en el software de adquisición de datos MassHunter Workstation, que representan las fracciones A08 y A09. Se encontró un total de 63 características, cada una con un mínimo de al menos dos picos base,

presentes en las réplicas en al menos uno de los dos proyectos. La lista de compuestos se buscó en la base de datos METLIN B.08.00 utilizando coincidencias de fragmentación de masa estándar, diferencia (ppm), puntuación (MFE/MFG) y tiempo de retención (R*t)*. Los resultados de la búsqueda de A08 en la base de datos se resumen en la **Tabla 6.** Un total de masas coincidieron con la base de datos dentro de las ventanas de tolerancia especificadas anteriormente.

Al menos 38 de estos compuestos se detectaron en la fracción A08 que coincidía tanto con la masa monoisotópica como con al menos un pico del patrón de fragmentación de los estándares de la base de datos, y tenían una puntuación MFG de 60 y MFE de 72 (la puntuación máxima es 100) que coincidía con la fórmula y los compuestos en la base de datos. De los 47 compuestos que coincidieron con la base de datos y se calculó una puntuación de MFG y MFE entre 50 y 100; 14 de estos tenían una puntuación de MFG y MFE superior a 80, lo que indica una coincidencia más alta de las masas de la base de datos que se correlaciona bien con los patrones de isótopos para esas masas y, por lo tanto, una mayor confianza en la fórmula molecular y el compuesto estándar. Sin embargo, los 24 compuestos restantes presentaron puntuaciones bajas de MFG con valores altos de MFE, generando una incertidumbre en la identidad química. Posteriormente, los valores de error de masa (Diff) no fueron superiores a 5,0 ppm. Los cromatogramas de iones extraídos individuales de los compuestos identificados por la base de datos se ensamblaron en un solo cromatograma para evaluar la superposición de iones extraídos y los tiempos de retención.

Para la fracción A09, se detectaron un total de 110 compuestos para los que no hubo coincidencia masiva con la base de datos, MFG pudo calcular una puntuación para 29 de ellos, Fig. 7. En general, MFG calculó una puntuación para el 26 % de los 110 detectados iones Esto es significativo porque implica que a medida que la base de datos se llena con un número creciente de iones, habrá un parámetro adicional, como MFG y MFE, para indicar qué tan confiable puede ser una coincidencia de base de datos. Para evaluar si más de los compuestos en la fracción

A09 podían coincidir con la base de datos, se relajaron los parámetros de filtro en la adquisición de datos de la estación de trabajo MassHunter. Para lo anterior, se requería en primer lugar que las masas aparecieran con alta intensidad luego de suprimir los constituyentes del blanco (disolvente de dilución), y en segundo lugar, el patrón de fragmentación de cada pico de ion molecular a través del ion producto. En general, el número de compuestos que coinciden con la base de datos disminuye drásticamente con estos requisitos de especificidad. La **Tabla 5** enumera todos los compuestos de la fracción A09 con información de fórmula, masa, R*t* y puntaje que coinciden con la base de datos METLIN en términos de masas y puntajes MFG/MFE. Se ha encontrado que ácido beta-carbolina-1-propiónico esta presente en el extracto de corteza y hojas En 2021 Diaz de la UDCA descubren el compuesto

.

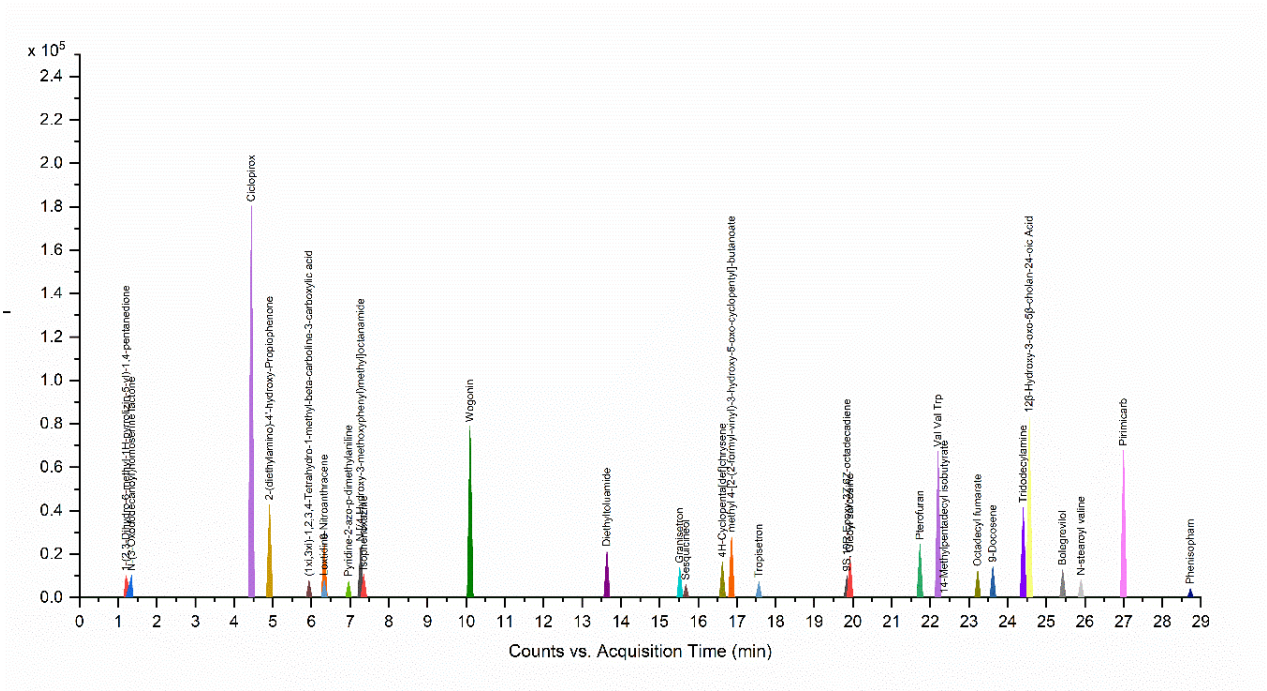


Figura 26. Cromatograma del extracto acuoso de las hojas de *Zantoxylum caribaeum*.

Tabla 6. Lista de metabolitos secundarios detectados en modo de ionización positiva por UHPLC-QTOF-MS/MS del subextracto acuoso de las hojas de *Z. caribaeum* en la base de datos METLIN

Nombre	Rt (min)	Fórmula	Masa	*m/z*	Atribución	Fórmula Generación		Extracción de características moleculares		Energía
						Puntaje (MFG)	Diff (MFG, ppm)	Score (MFE)	Diff (MFE, ppm)	
1-(2,3-Dihidro-6-metil-1H-pirrolizin-5-il)-1,4-pentanediona	1.215	$C_{13}H_{17}NO_2$	219.1254	220.1332	$[M+H]^+$	71.69	2.19	81.3	2.19	Medium
N-(3-oxo-dodecanoil) homoserina lactona	1.312	$C_{16}H_{27}NO_4$	297.1939	298.2011	$[M+H]^+$	85.33	0.51	100	0.51	Medium
Ciclopiroxolamina	4.488	$C_{12}H_{17}NO_2$	207.1266	208.1339	$[M+H]^+$	97.75	-3.45	100	-3.45	Low
2-(dietilamino)-4'-hidroxi-Propiofenona	4.893	$C_{13}H_{19}NO_2$	221.142	222.1492	$[M+H]^+$	87.53	-1.71	89.6	-1.71	Low
Ácido (1xi,3xi)-1,2,3,4-tetrahidro-1-	5.943	$C_{13}H_{14}N_2O_2$	230.1055	231.1128	$[M+H]^+$	70.46	0.09	72.7	0.09	Low

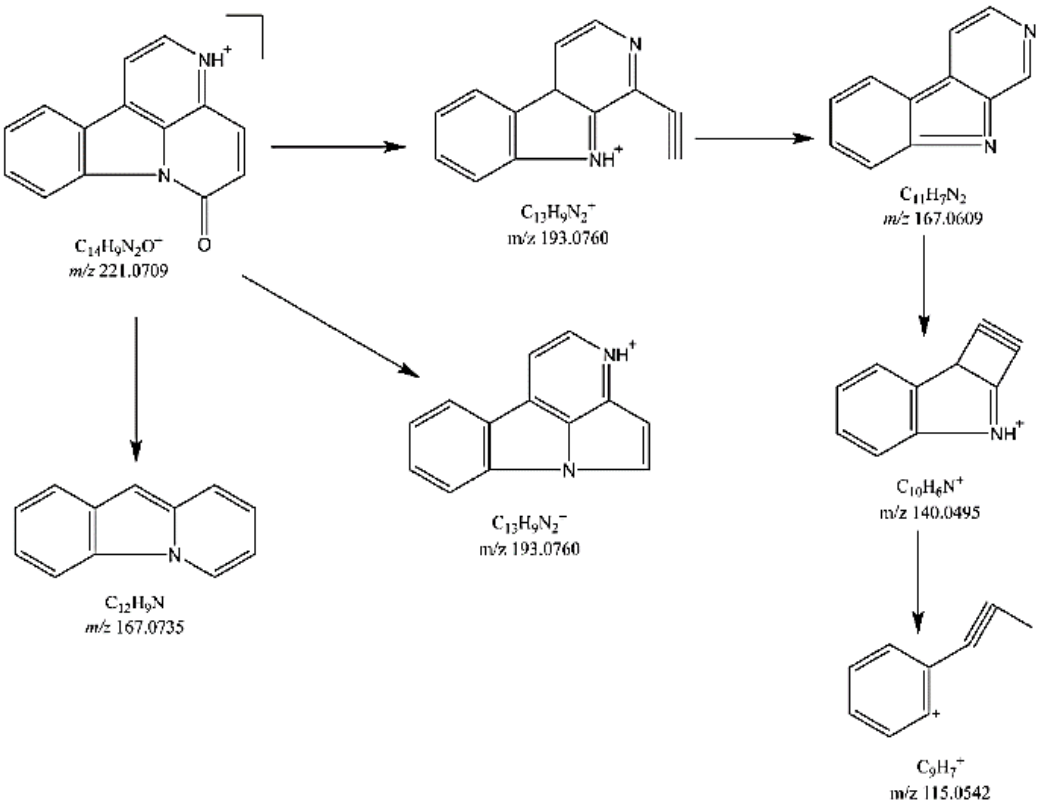
metil-beta-carbolina-3-carboxílico										
9-nitroantraceno	6.371	$C_{14}H_9NO_2$	223.0637	241.0974	$[M+NH_4]^+$	88.19	-1.45	100	-1.45	Medium
Loxtidina	6.384	$C_{19}H_{29}N_5O_2$	359.2321	360.2393	$[M+H]^+$	84.99	-0.03	100	-0.03	Low
Piridina-2-azo-p-dimetilanilina	6.924	$C_{13}H_{14}N_4$	226.1211	249.1106	$[M+H]^+$	60.33	3.5	91.5	3.5	Low
N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]octanamida	7.266	$C_{16}H_{25}NO_3$	279.184	280.1912	$[M+H]^+$	85.65	-1.88	80	-1.88	Medium
Isofenoxazina	7.369	$C_{12}H_8N_2O_2$	212.0591	213.0663	$[M+H]^+$	84.12	-2.65	100	-2.65	Low
Dietiltoluamida	13.657	$C_{12}H_{17}NO$	191.1313	192.1386	$[M+H]^+$	85.59	-1.69	100	-1.69	Medium
Granisetrón	15.525	$C_{18}H_{24}N_4O$	312.1951	335.1838	$[M+Na]^+$	63.69	-0.31	72.5	-0.31	Low
Sesquicineol	15.646	$C_{15}H_{26}O$	222.1984	240.2322	$[M+NH_4]^+$	75.93	0	100	0	High

4H-ciclopenta[def]criseno	16.67	$C_{19}H_{12}$	240.0931	263.0822	$[M+Na]^+$	67.08	3.44	77.9	3.44	Low
metil 4-[2-(2-formil-vinil)-3-hidroxi-5-oxo-ciclopentil]-butanoato	16.861	$C_{13}H_{18}O_5$	254.1158	255.1231	$[M+H]^+$	83.22	-1.33	100	-1.33	Medium
Tropisetron	17.594	$C_{17}H_{20}N_2O_2$	284.1526	302.1864	$[M+NH_4]^+$	78.05	-0.55	100	-0.55	High
9S,10R-Epoxi-3Z,6Z-octadecadieno	19.895	$C_{17}H_{30}O$	250.2298	268.2635	$[M+NH_4]^+$	75.86	-0.51	96.9	-0.51	High
Oleoil sarcosina	19.895	$C_{21}H_{39}NO_3$	353.2937	371.3274	$[M+NH_4]^+$	86.16	-1.9	91.6	-1.9	Medium
Pterofurano	21.749	$C_{16}H_{14}O_5$	286.0847	287.0921	$[M+H]^+$	84.91	-2.16	93.9	-2.16	Medium
Val-trp 24587-37-9 L-Valil-L-triptófano L-triptófano, L-valil-N-valiltriptófano	22.183	$C_{21}H_{30}N_4O_4$	402.2266	425.216	$[M+Na]^+$	97.37	0.19	87.3	0.19	Low
Fumarato de octadecil	23.248	$C_{22}H_{40}O_4$	368.2937	386.3276	$[M+NH_4]^+$	88.34	-2.84	100	-2.84	Low

9-Docoseno	23.598	$C_{22}H_{44}$	308.3441	326.378	$[M+NH_4]^+$	80.74	0.57	90.5	0.57	High
Tridodecilamina	24.388	$C_{36}H_{75}N$	521.5907	522.5981	$[M+H]^+$	0		71.4		Low
12β-Hidroxi-3-oxo-5β-cholan-24-Acido Oico.	24.501	$C_{24}H_{38}O_4$	390.2777	413.2669	$[M+NH_4]^+$	94.68	-1.74	89.1	-1.74	High
Bolegrevilol	25.391	$C_{28}H_{40}O_4$	440.2929	441.3003	$[M+H]^+$	69.79	-0.53	96	-0.53	High
N-estearol valina	25.854	$C_{23}H_{45}NO_3$	383.3398	406.3292	$[M+Na]^+$	84.66	0.28	100	0.28	High
Pirimicarboato	26.977	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	238.1424	261.1316	$[M+Na]^+$	87.22	2.35	92.4	2.35	Medium
Fenisofan	28.737	$C_{19}H_{22}N_2O_4$	342.1567	365.1458	$[M+Na]^+$	72.14	3.78	100	3.78	High
Wogonina	10.106	$C_{16}H_{12}O_5$	284.0685	285.0759	$[M+H]^+$		-0.2			High

Debido a la restricción analítica, sustentada en que la masa por sí sola no puede asignar sin ambigüedad la composición elemental, existe la necesidad de complementar el mapeo de bases de datos de alta precisión de datos de masa con otras técnicas, como proporciones isotópicas y Rt. Aquí, hemos demostrado la utilidad del software METLIN Personal Metabolite Database para asignar las composiciones elementales correctas para un conjunto de metabolitos en las fracciones A08 y A09 de la planta *Z. caribaeum.* Al combinar la capacidad de MFG y MFE con la comparación masiva de bases de datos, el beneficio anticipado aumenta la confianza con la que se asigna una composición elemental correcta a compuestos conocidos y desconocidos.

- Identificación de metabolitos de las fracciones A01-A05 mediante espectrometría de masas de alta resolución y resonancia magnética nuclear.
- Perfil metabolómico de las fracciones A08 y A09 (extracto de AcOEt/MeOH) por MS-FINDER y correlación de grupos de metabolitos con GNPS para verificación de las familias de compuestos fitoquímicos más grandes.



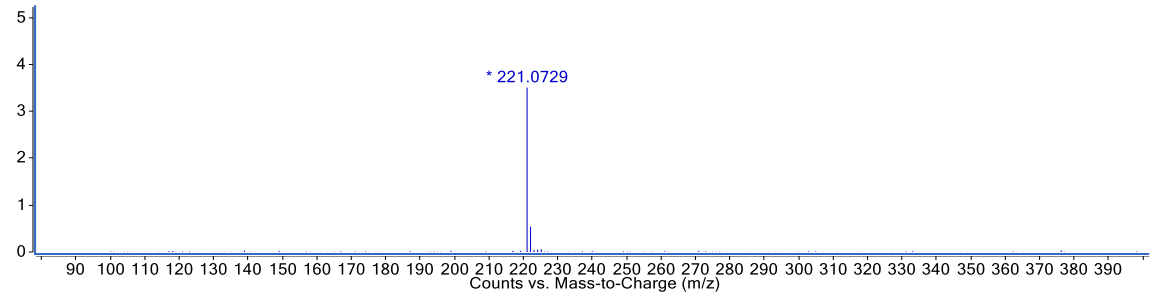


Figura 27. Patrón de fragmentación de cantina-6-ona aislado.

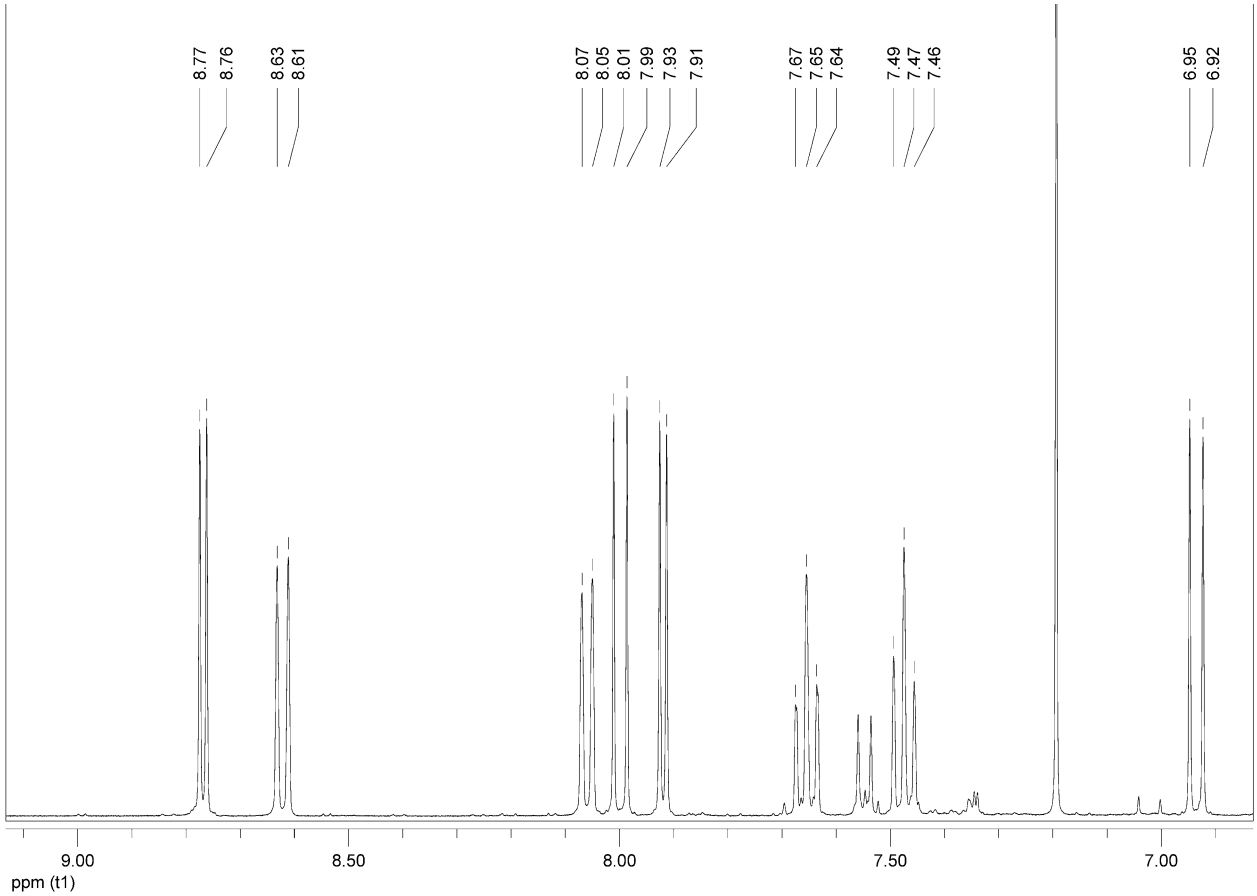
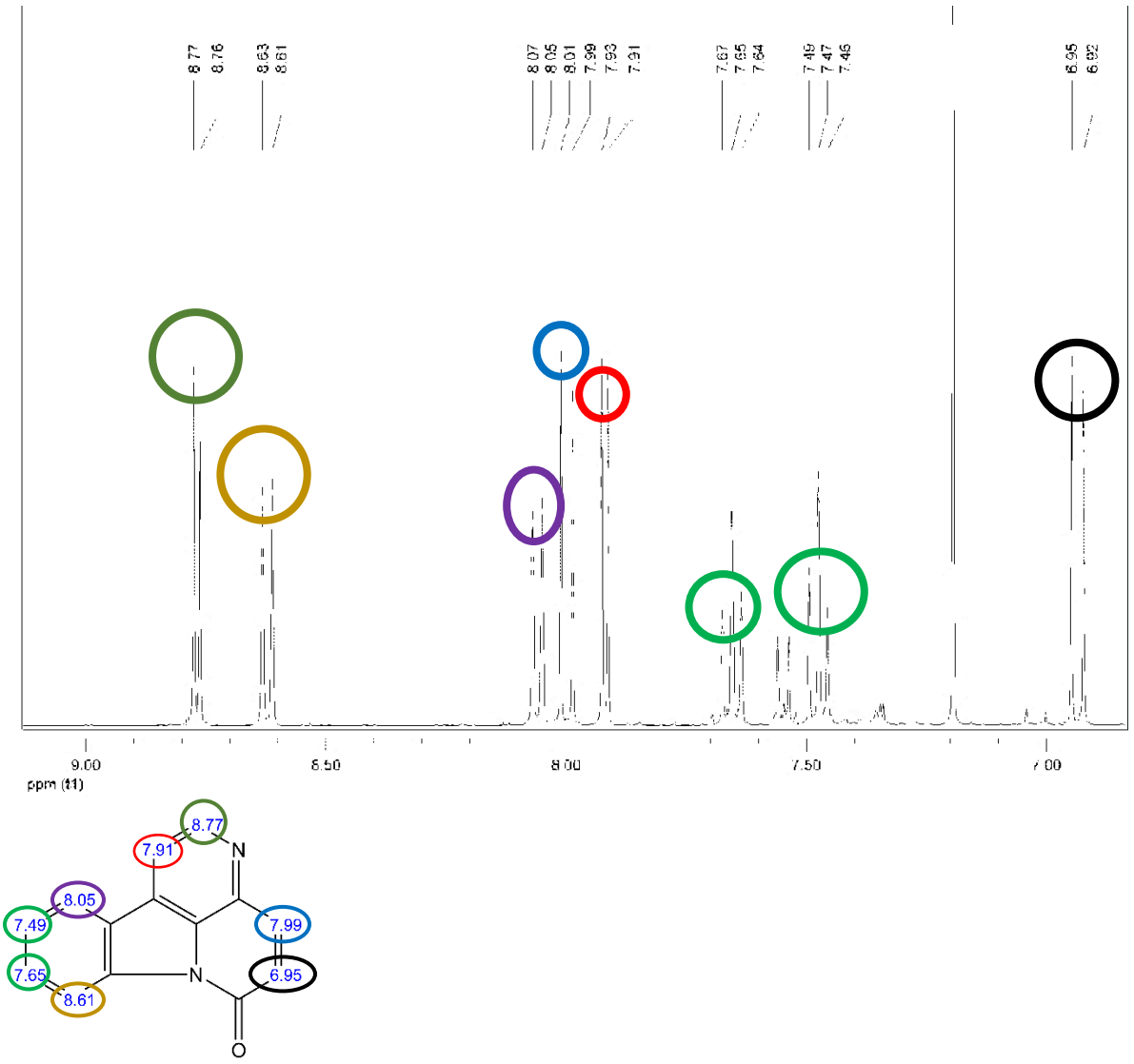


Figura 28. Cromatograma y estructura RMN^{1} H para la cantin-6-ona.

Elucidación estructural de la cantin-6-ona para RMN ^{1}H.

Para el cromatograma **Figura 28**, mostro los siguientes desplazamientos correspondientes para campos bajos.



Para la señal que tiene un desplazamiento alrededor de **J=6,95** el cual acopla para un doblete a campos más altos se evidencia que es un carbono influenciado por un grupo carbonilo el cual acopla para la señal en la posición **δH 5**.

La señal más prolongada alrededor de **J=7,2** corresponde a el disolvente tetracloruro de carbono deuterado.

Las siguientes señales son características para grupos metinos (-CH) en cadenas aromáticas. Los cuales corresponden a tripletes observados en las posiciones **10δH= 7,49 y 9δH = 7,65**

Para la señal que tiene un desplazamiento alrededor de **7,91** el cual acopla para un doblete para la señal en la posición **1δH**.

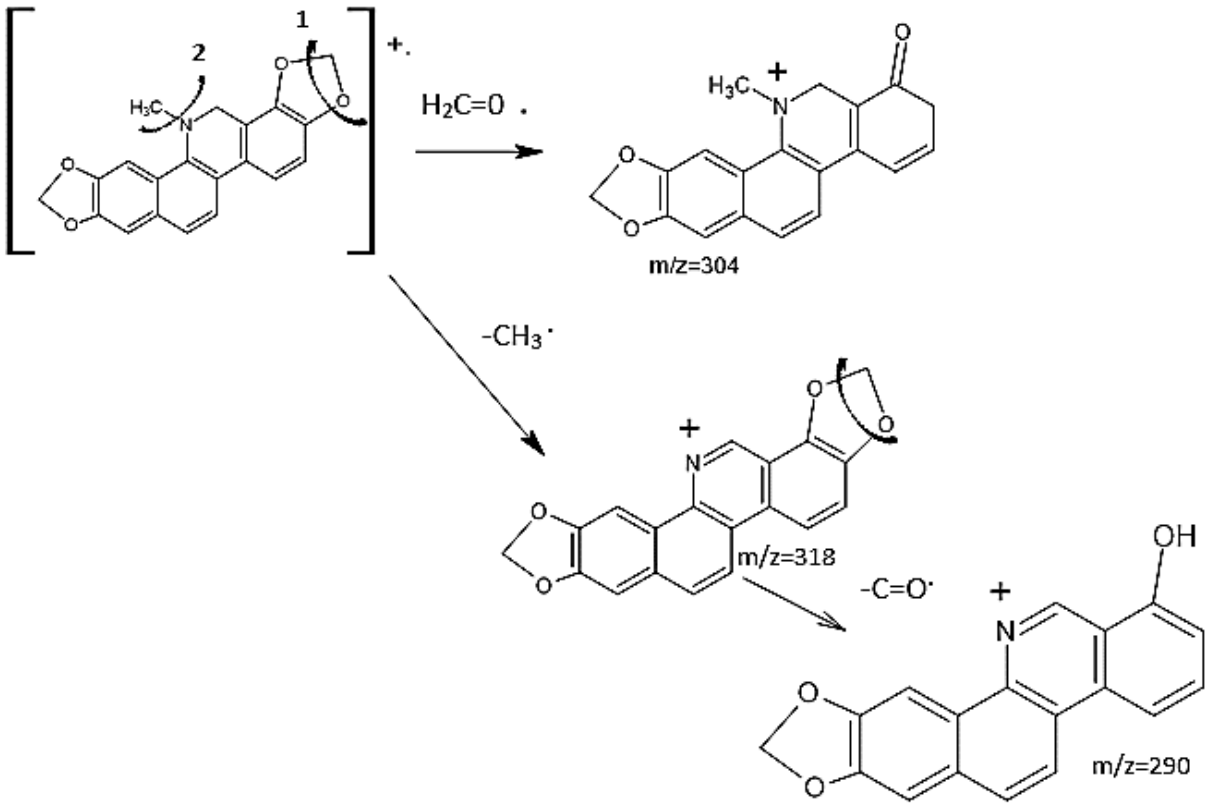
Para la señal que tiene un desplazamiento alrededor de **7,99** el cual acopla para un doblete para la señal en la posición **4δH.**

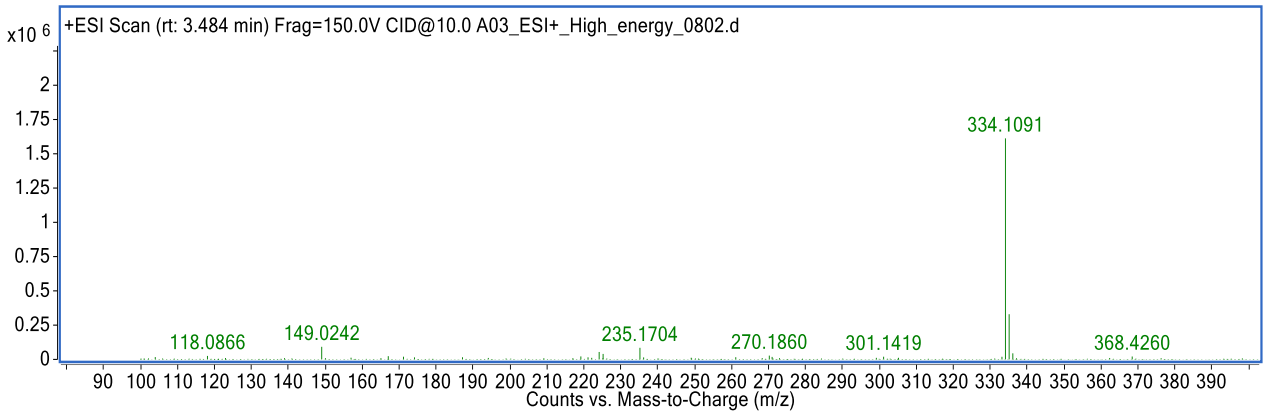
Para la señal que tiene un desplazamiento alrededor de **8,77** el cual acopla para un doblete para la señal en la posición **2δH.**

Las siguientes señales son características para grupos metinos (-CH) en cadenas aromáticas. Los cuales corresponden a tripletes observados en las posiciones **8δH= 8,61 - 11δH= 8,05** siendo los hidrógenos desplazados hacia los campos más bajos del cromatograma.

Elucidación de dihidrosanguinarina

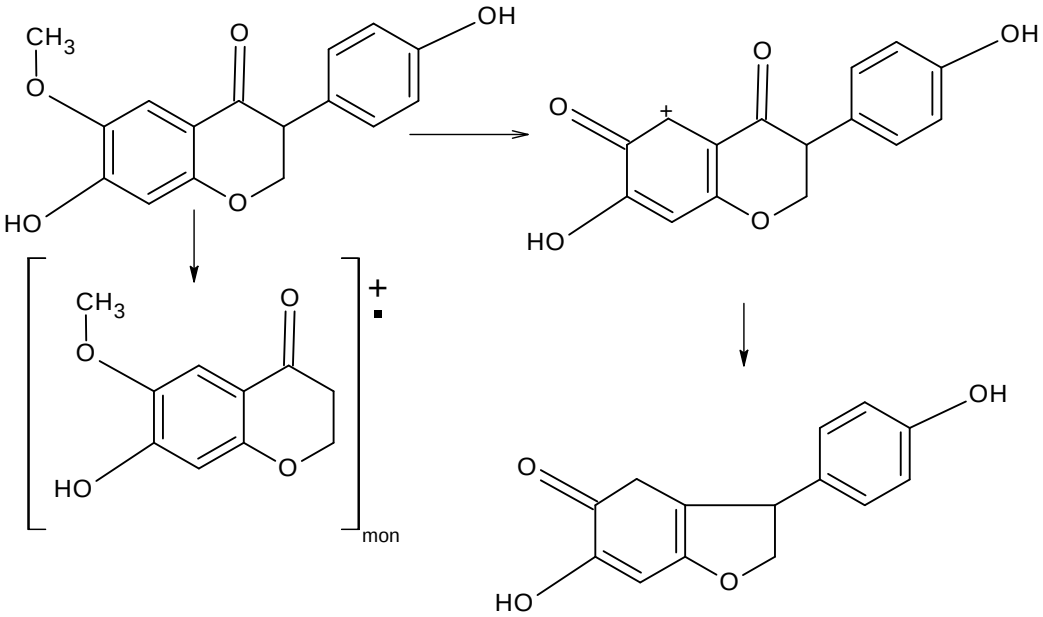
Fragmentación característica de los picos mas abundantes en el espectro de masas.

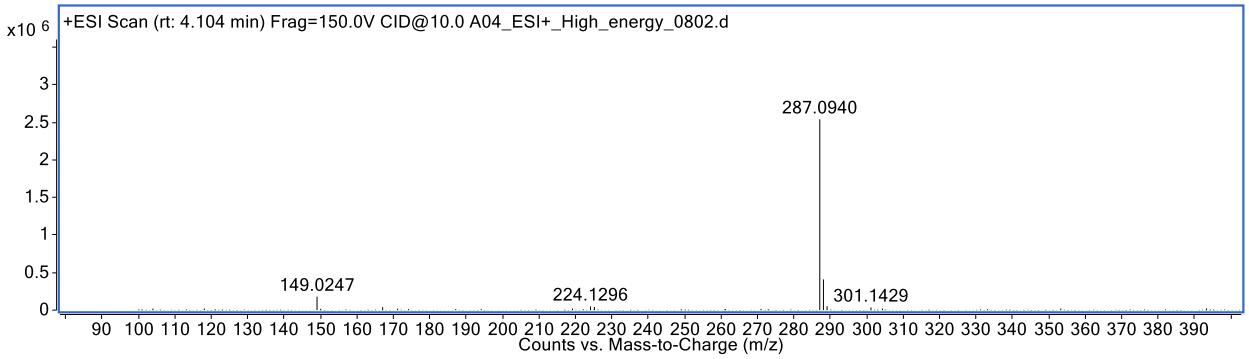




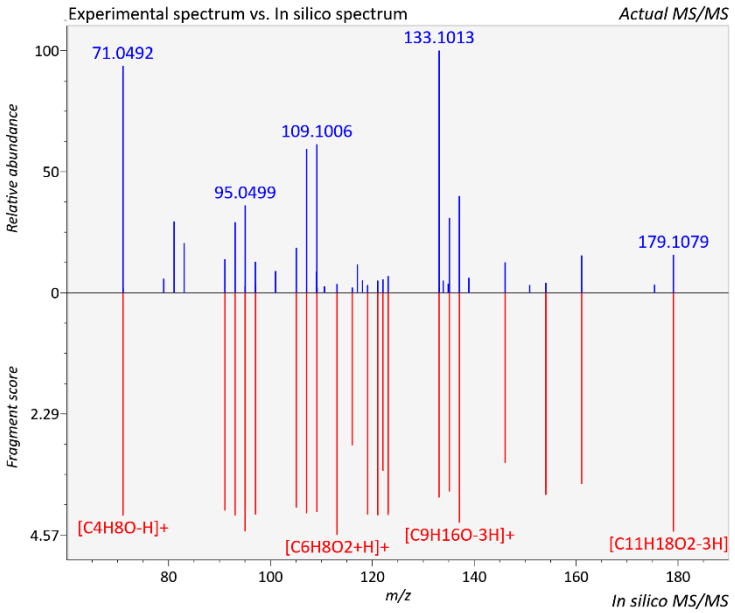
Elucidación de dihidrogliciteina

Fragmentación característica de los picos más abundantes en el espectro de masas.





7.3 Evidencia espectros energía Media MS-FINDER



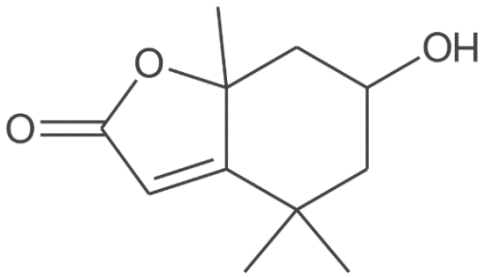
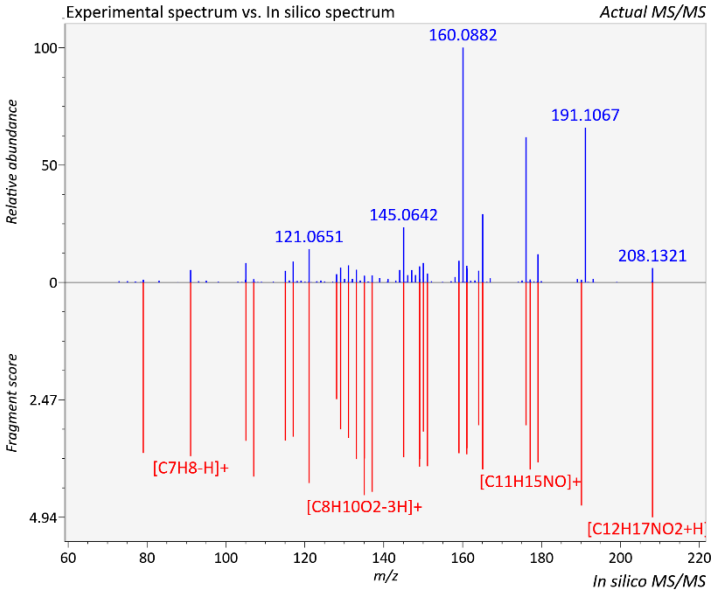


Figura 29. Espectro de A09 ID40 (-)-Loliolida;Loliolida



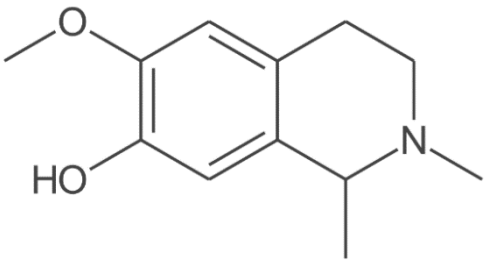
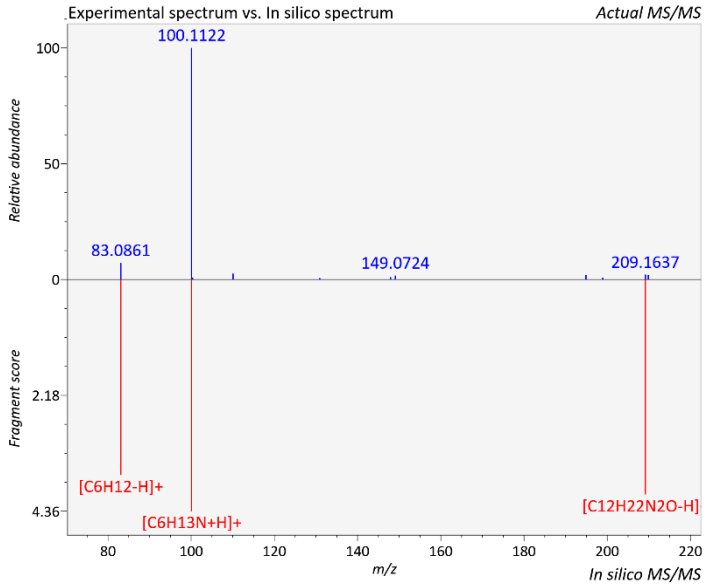


Figura 30. Espectro de A09 ID49 C00050650



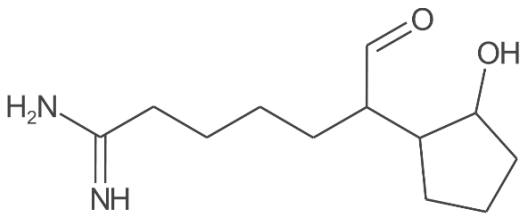
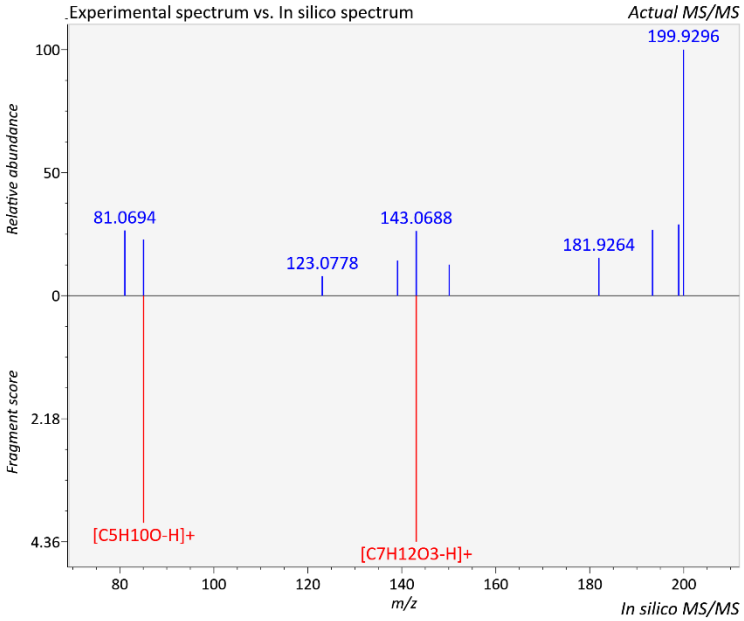


Figura 31. Espectro de A08 ID76 6-(2-hidroxi-ciclopentil)-7-oxo-heptanamida)



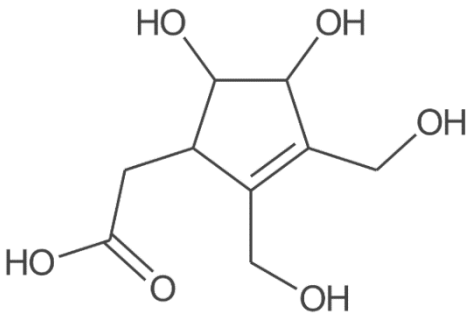
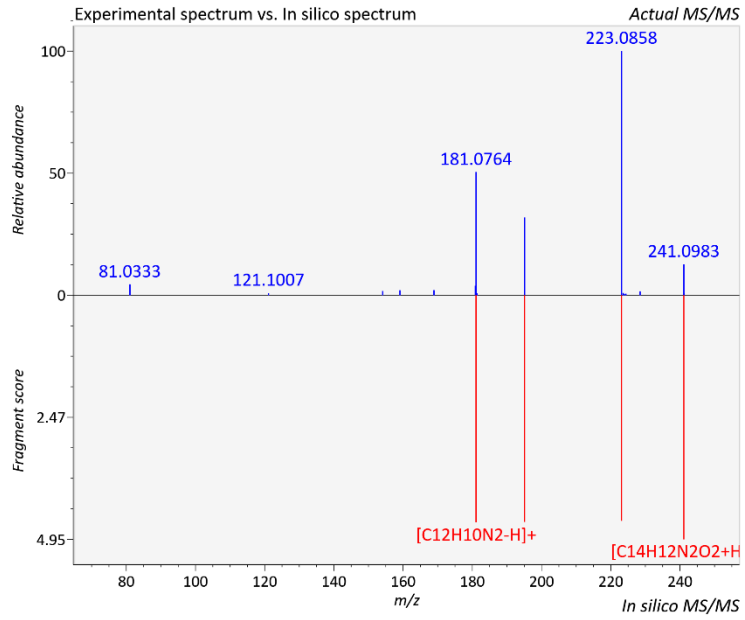


Figura 32. Espectro de A08 y A09 ID88 (Ácido 7-hidroxieucommico)



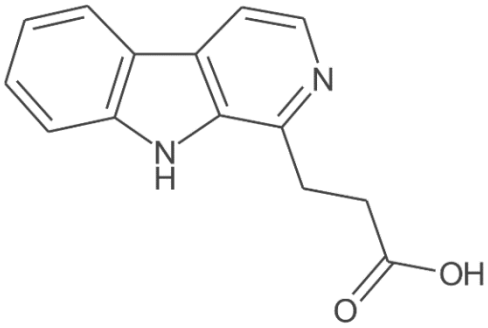
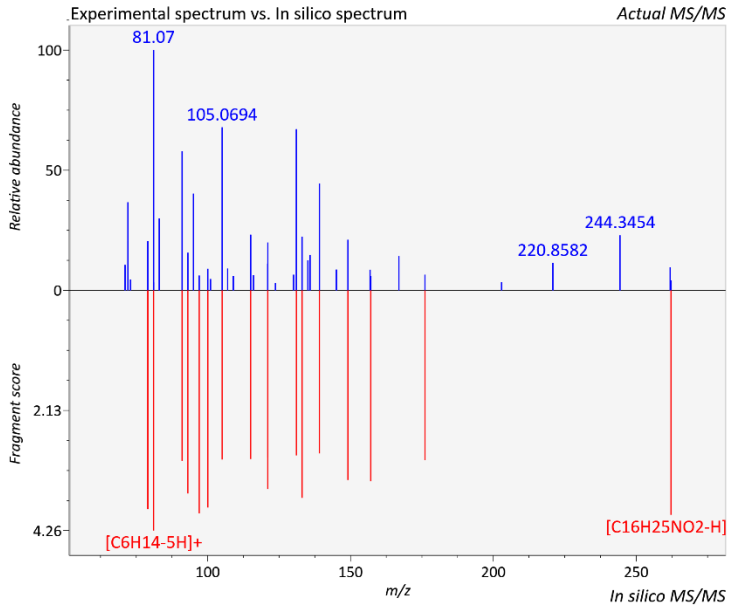


Figura 33. Espectro de A08 y A09 ID89 (ácido beta-carbolina-1-propiónico)



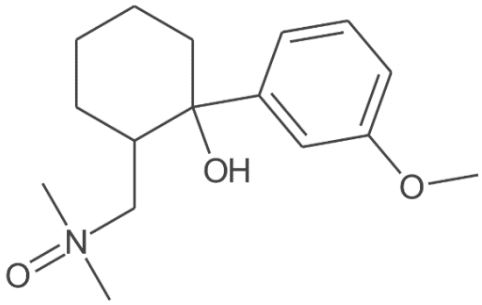


Figura 34. Espectro de A09 ID137 (N-Oxido-Tramadol).

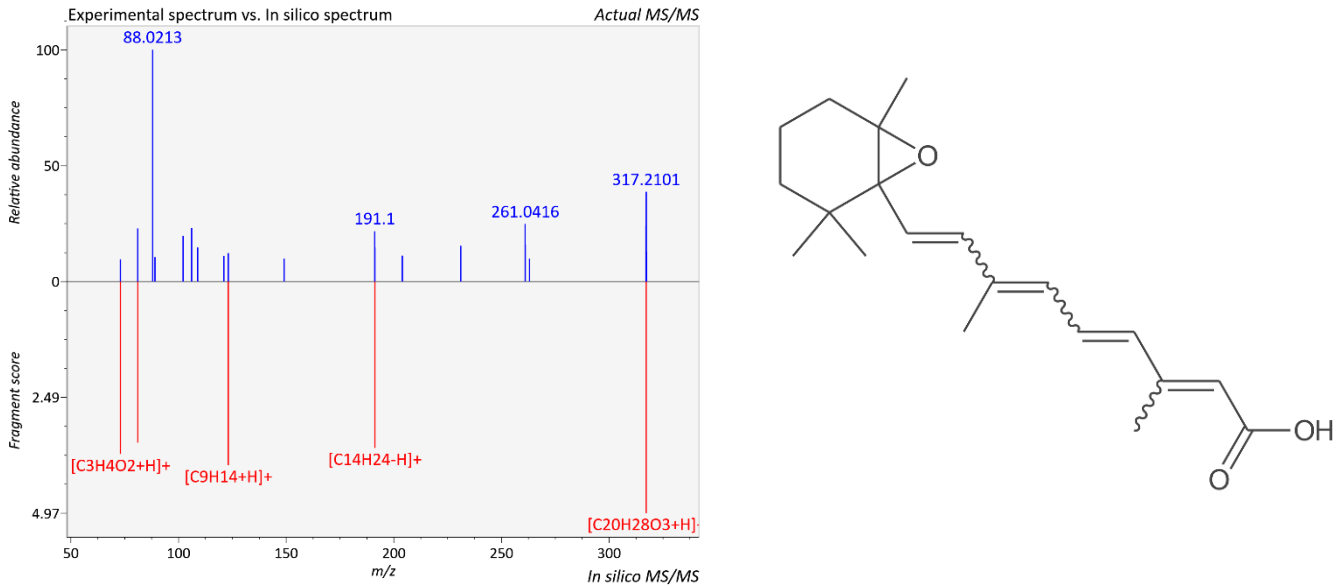


Figura 35. Espectro de A08 ID180 ácido todo-trans-5,6-epoxiretinoico

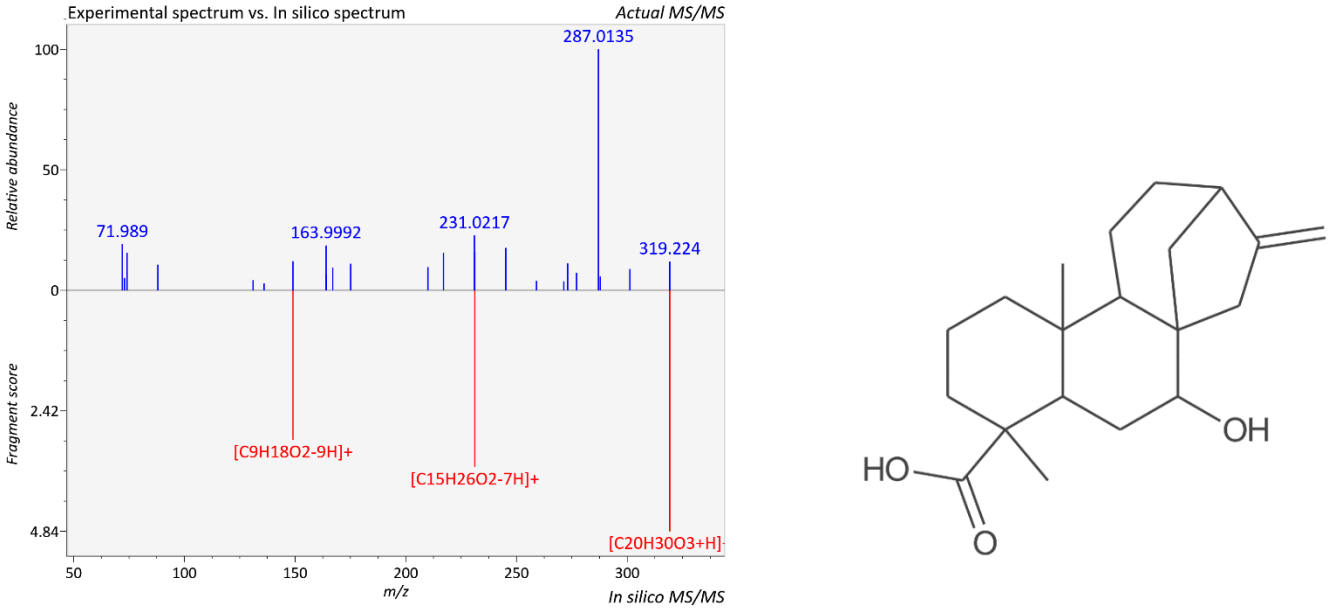
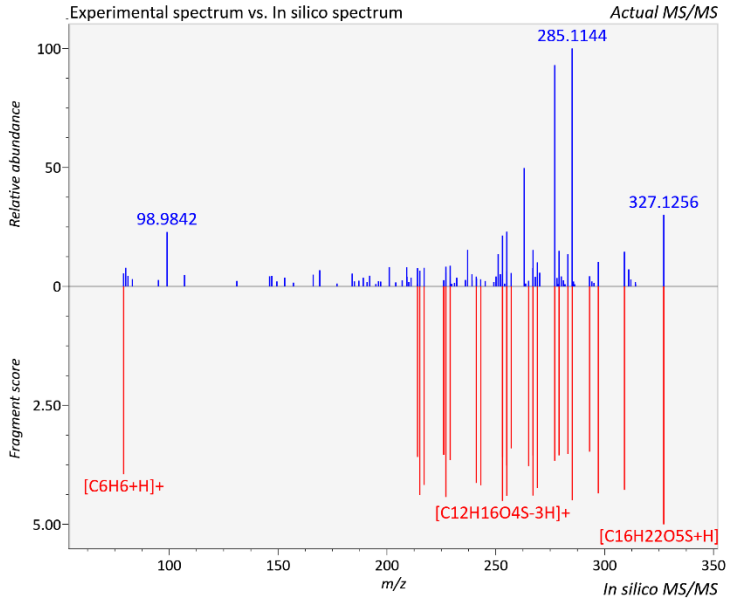


Figura 36. Espectro de A08 ID183 (ent -7 alfa-ácido hidroxikaur-16-en-19-oico;ent-7beta- ácido hidroxikaurenoico)



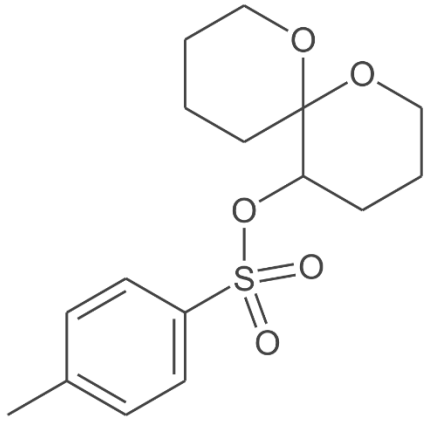
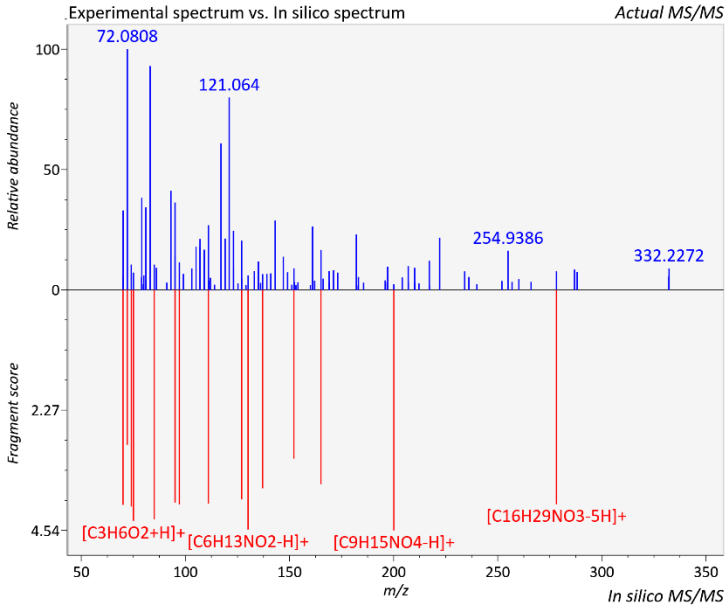


Figura 37. Espectro de A08 ID189 (UNPD191078)



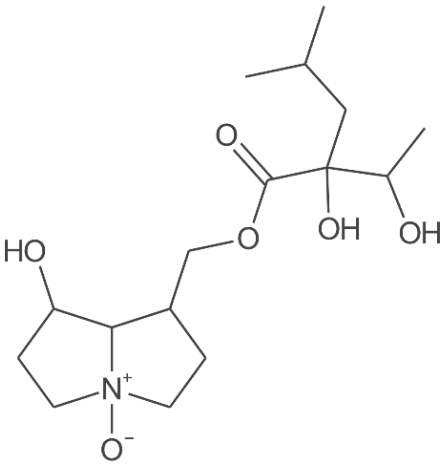


Figura 38. Espectro de A08 ID195 (UNPD160901)

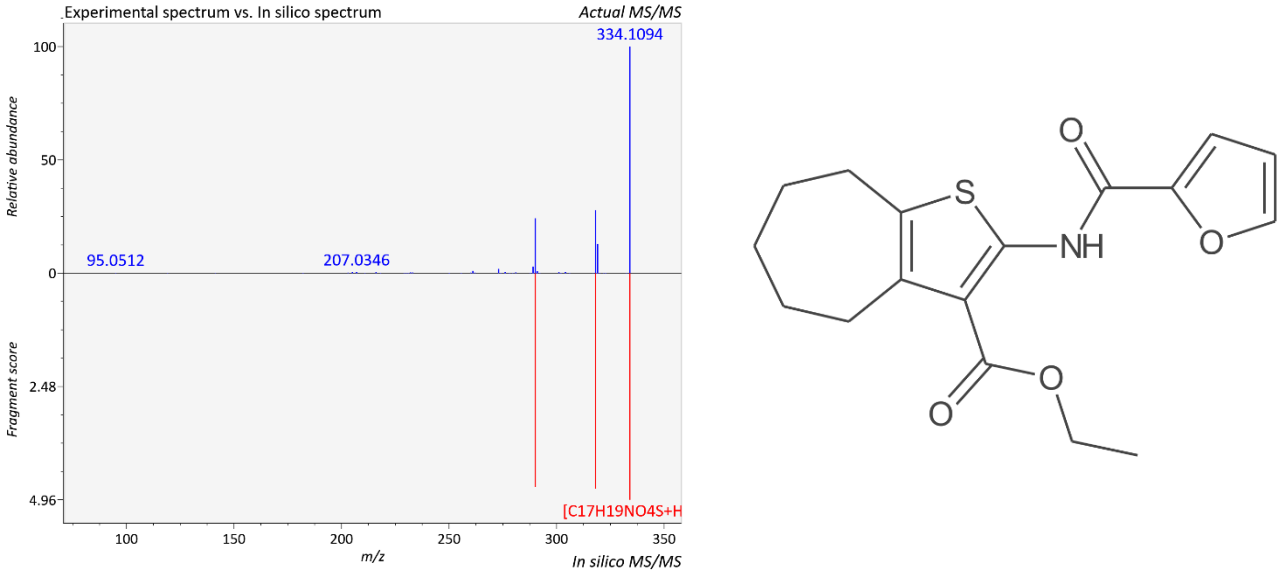


Figura 39. Espectro de A08 ID201

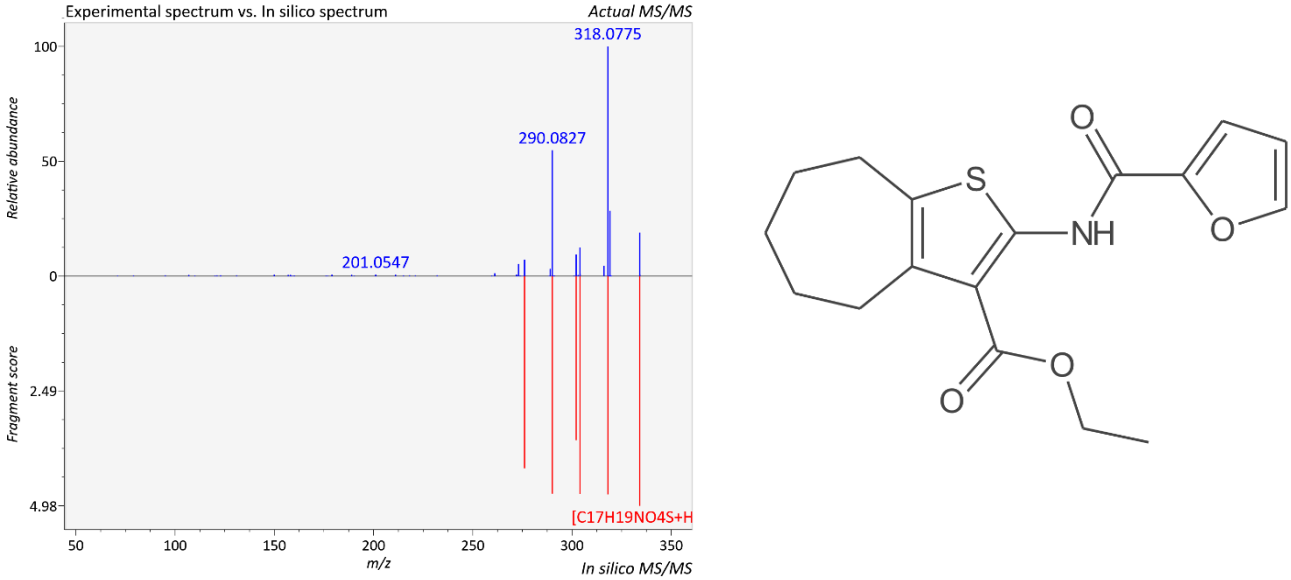
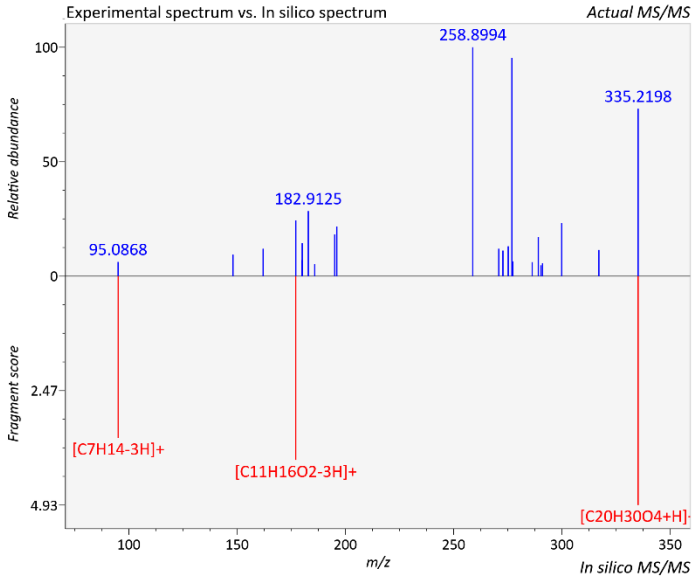


Figura 40. Espectro de A08 ID202 2- [[2-furanil(oxo)metil]amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carboxílico éster etílico del ácido



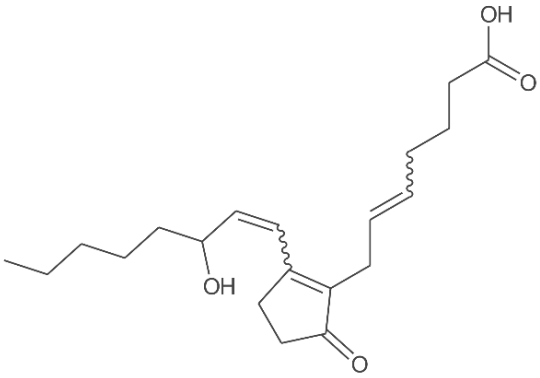
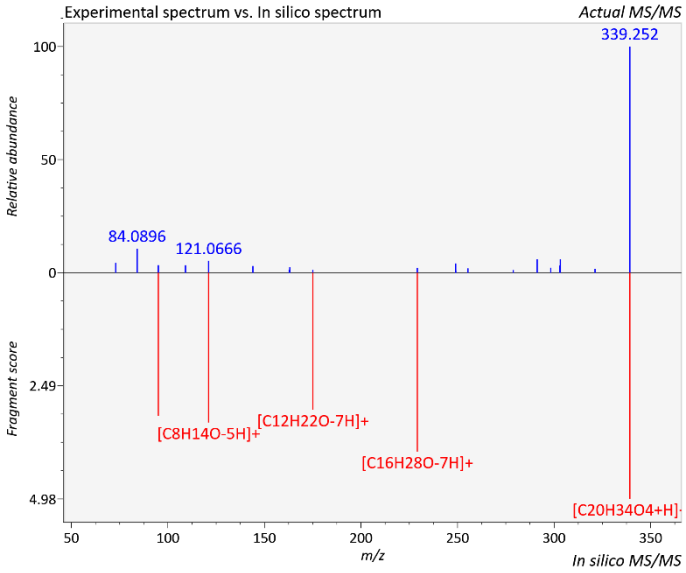


Figura 41. Espectro de A08 ID205 (prostaglandina B2)



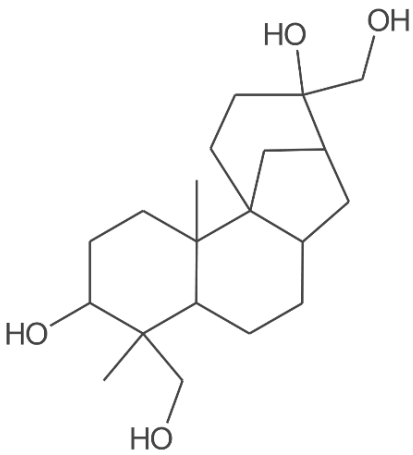
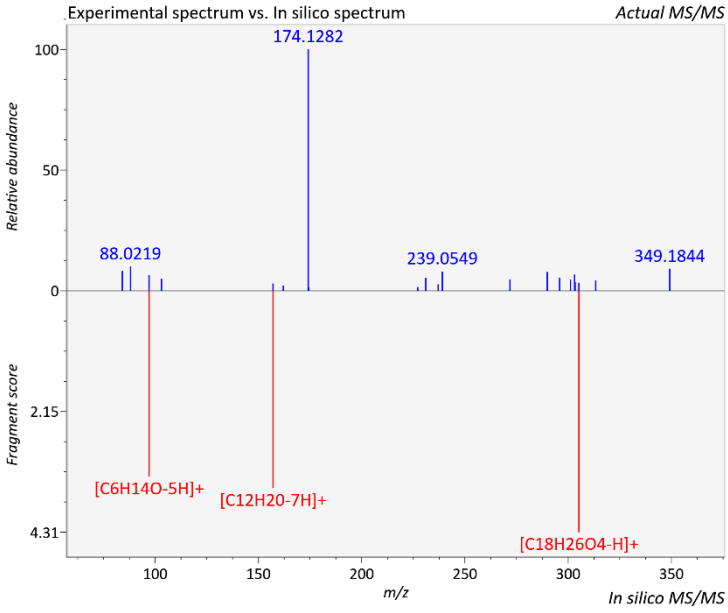


Figura 42. Espectro de A08 ID210 (afidicolina)



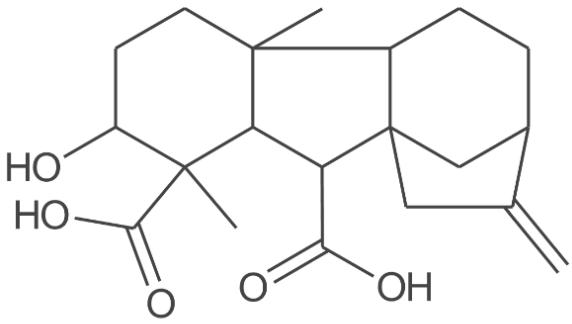


Figura 43. Espectro de A08 ID218 (Gibberellin A14;GA14)

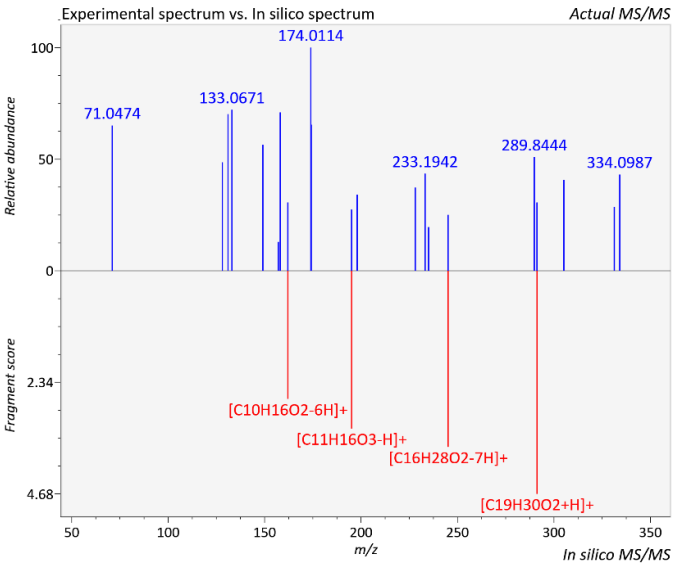
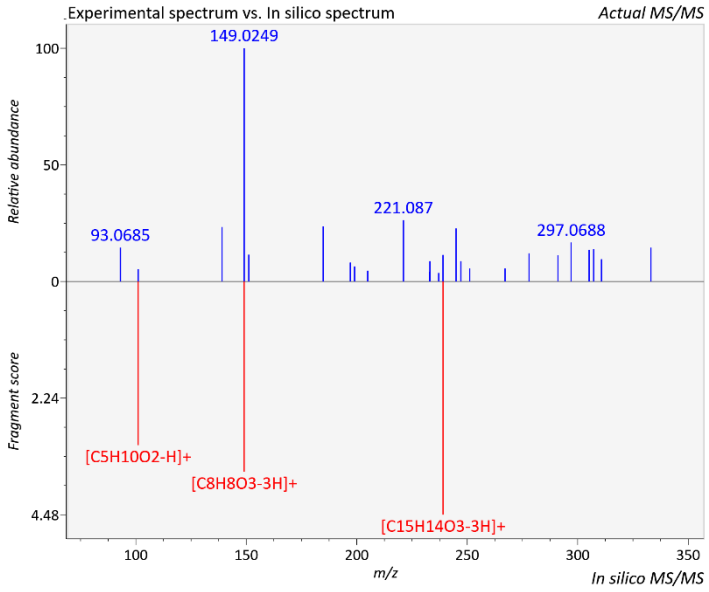


Figura 44. Espectro de A08 ID219 (3a,21-dihidroxi-5b-pregnano-11,20-diona)



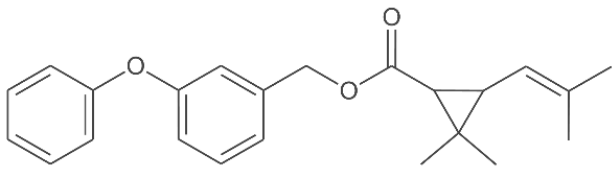
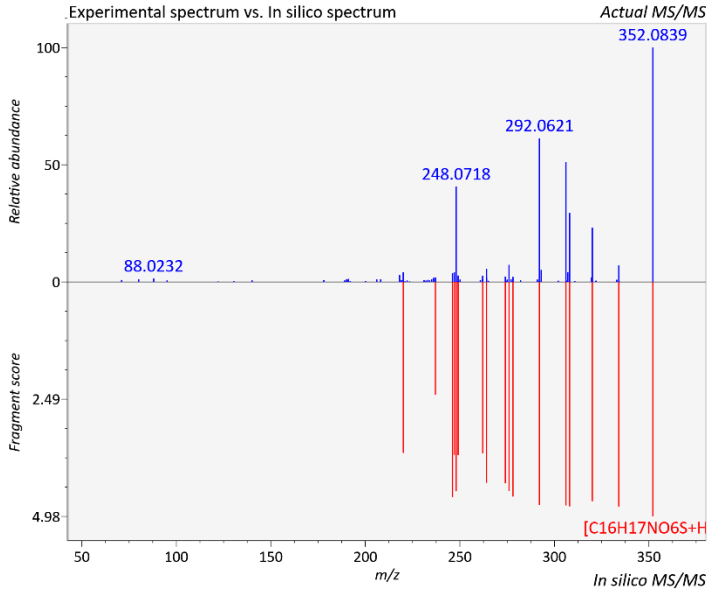


Figura 45. Espectro de A08 ID220 (fenotrina)



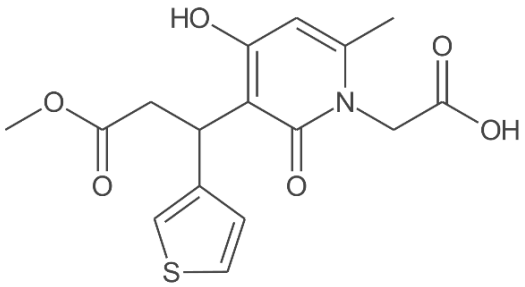
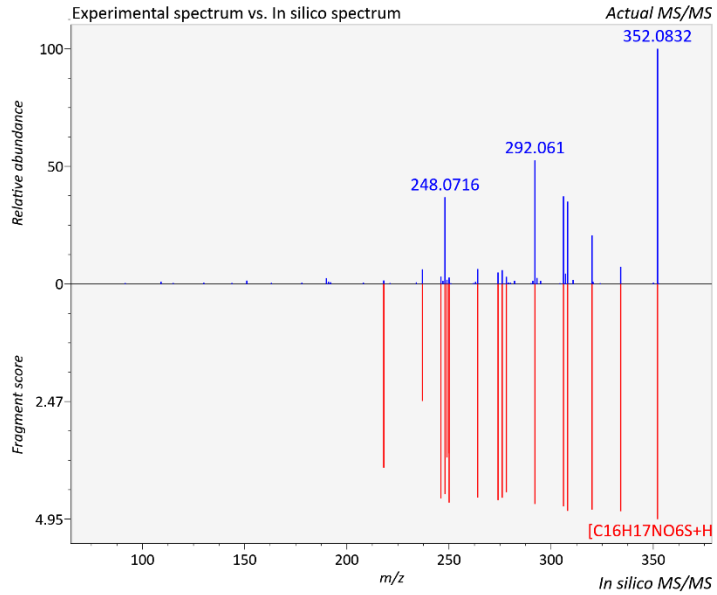


Figura 46. Espectro de A08 ID222



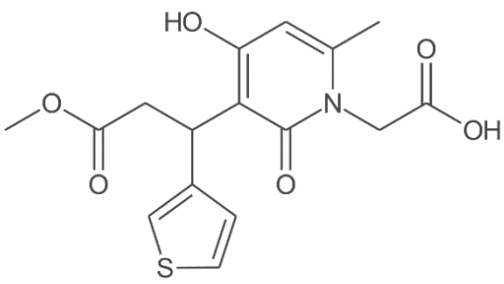
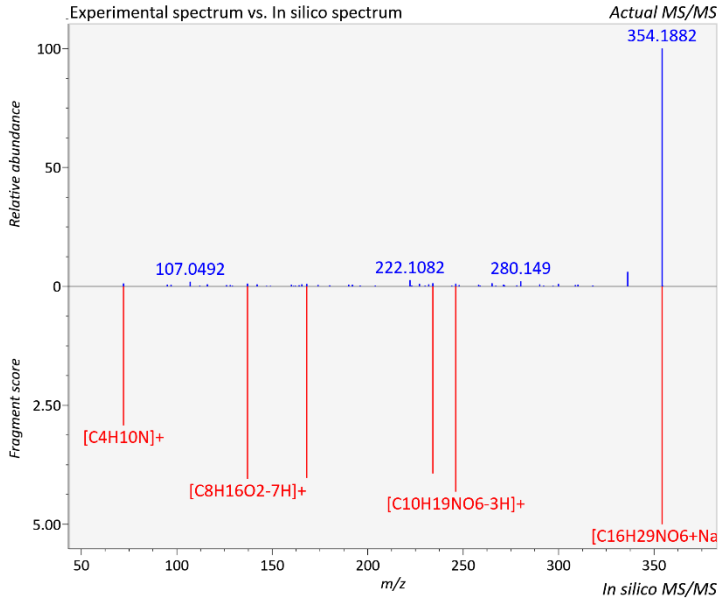


Figura 47. Espectro de A08 ID224



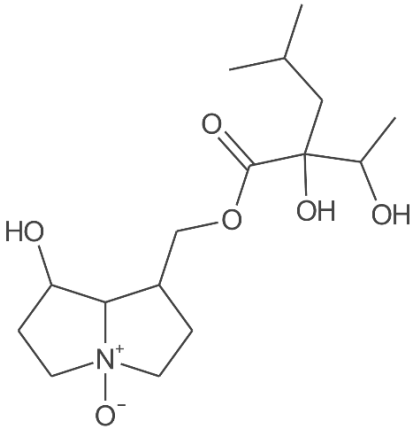


Figura 48. Espectro de A08 ID229

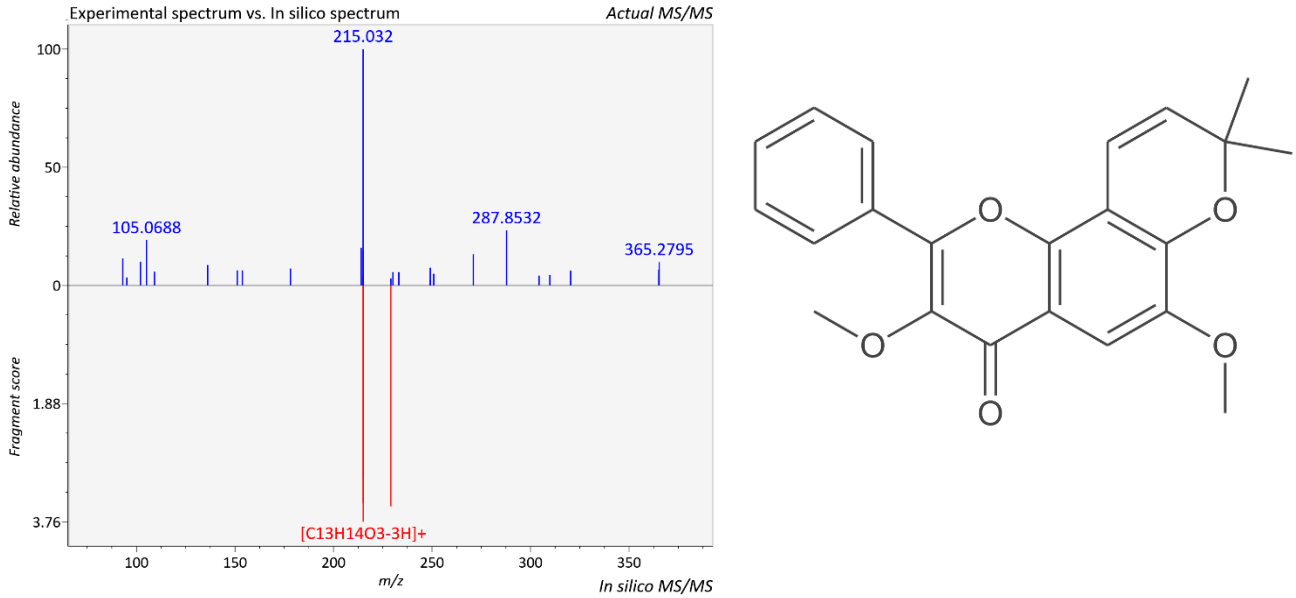


Figura 49. Espectro de A08 ID235 (3,6-dimetoxi-6",6"-dimetilpirano [2,3: 7,8] flavona)

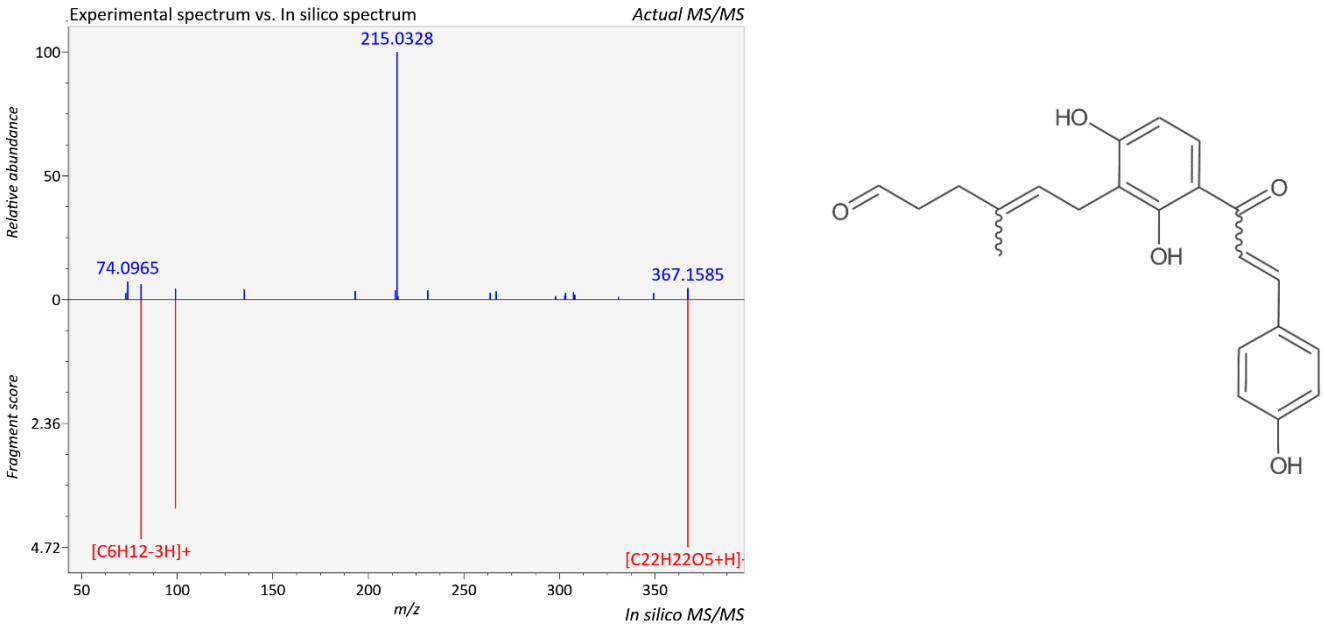
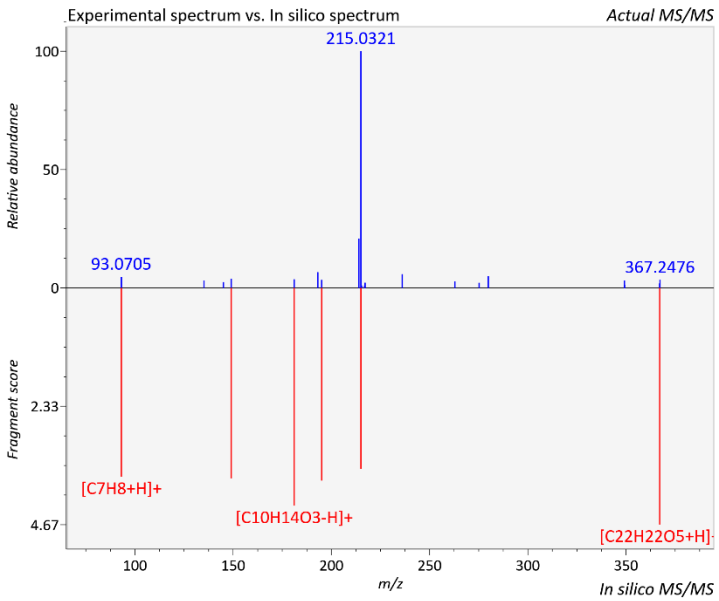


Figura 50. Espectro de A08 ID236 (Xanthoangelol C)



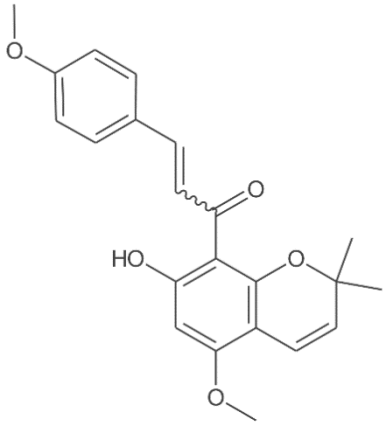
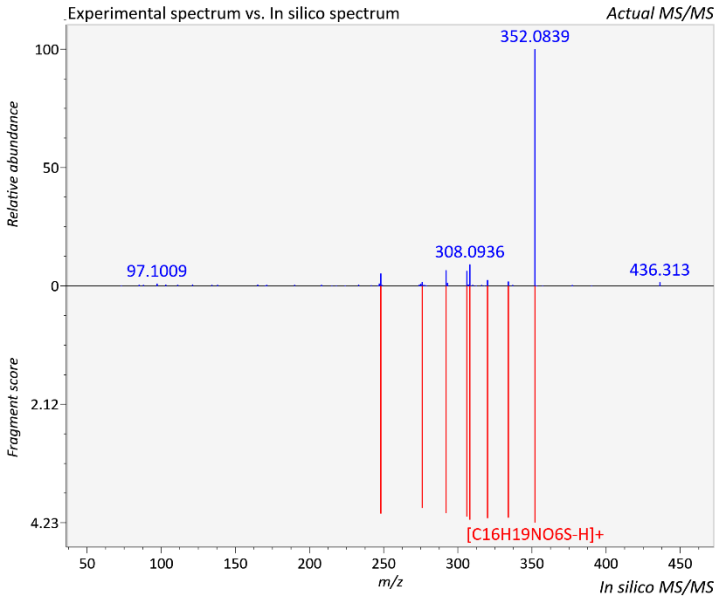


Figura 51. Espectro de A08 ID237 (6",6"- Dimetilpirano [2",3":6',5']- 2'-hidroxi-4,4'-dimetoxicalcona)



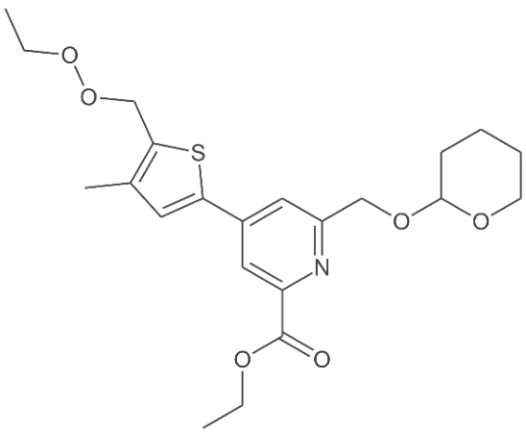
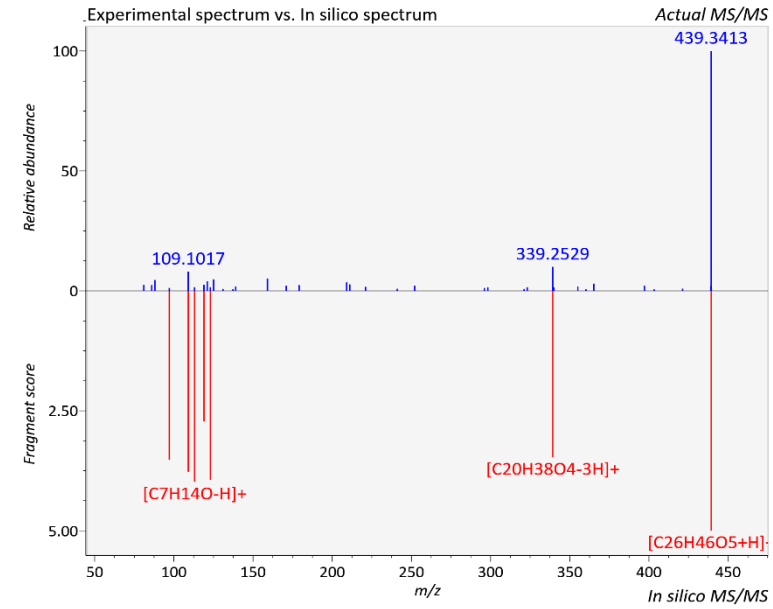


Figura 52. Espectro de A08 ID289 4-{5-[(etilperoxi)metil]-4-metiltiofen-2-il}-6-[(oxan-2-iloxi) metil]piridin-2-carboxilato de etilo)



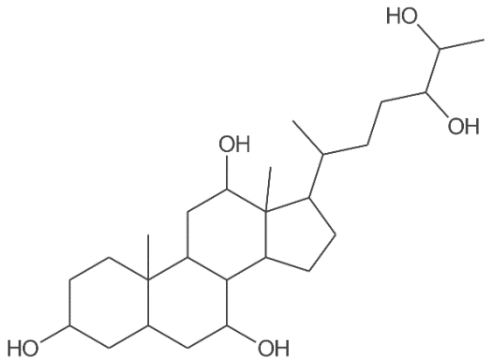
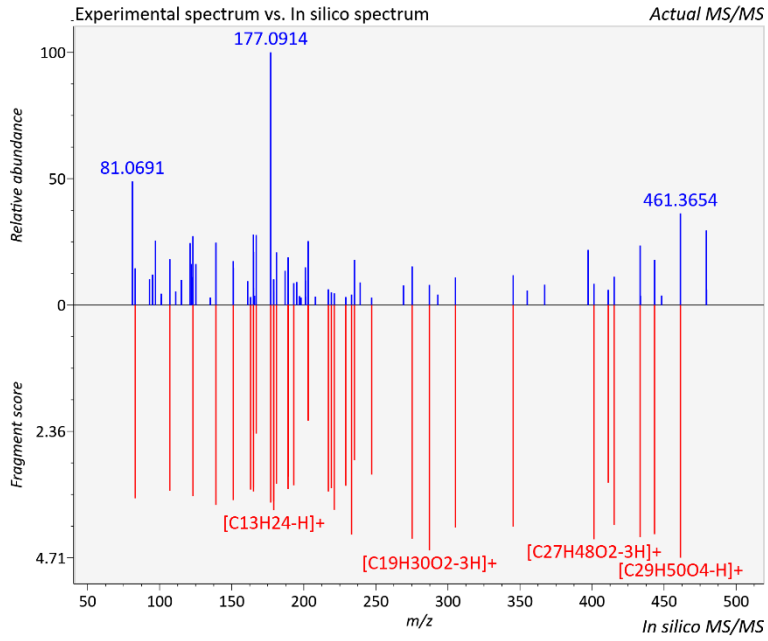


Figura 53. Espectro de A08 ID296 (27-nor-5b-colestano-3a,7a,12a,24,25-pentol)



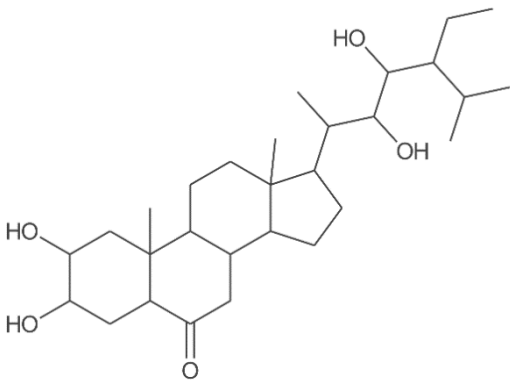
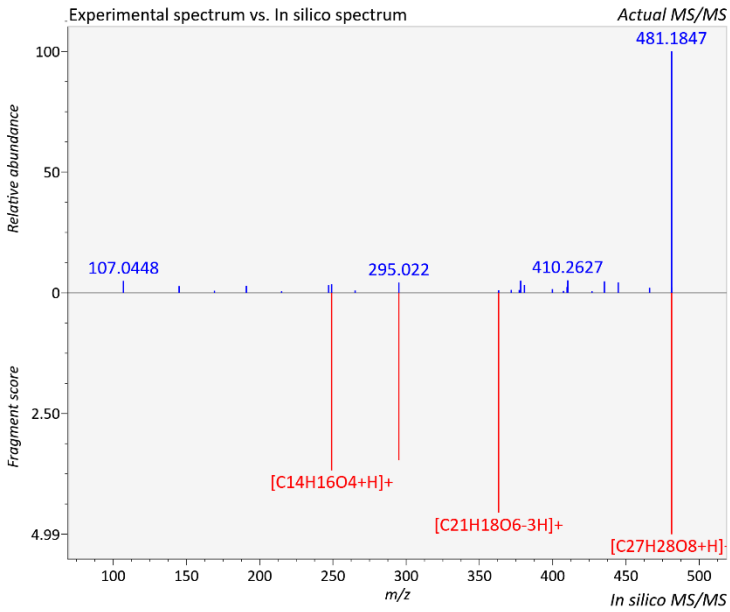


Figura 54. Espectro de A08 ID319 ((2R,3S,5S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-17-[(1S,2R,3R,4S)- 4-etil-2,3-dihidroxi-1,5-dimetil-hexil]-2,3-dihidroxi-10,13-dimetil-1,2,3,4,5,7,8,9,11,12 ,14,15,16,17-tetradecahidrociclopenta[a]fenantreno-6-ona**)**



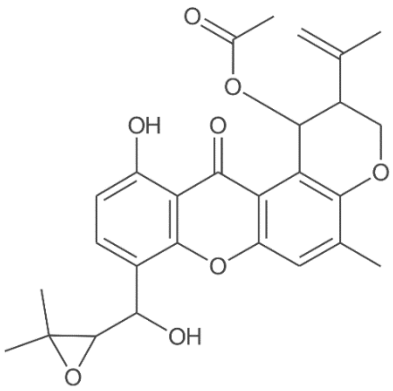
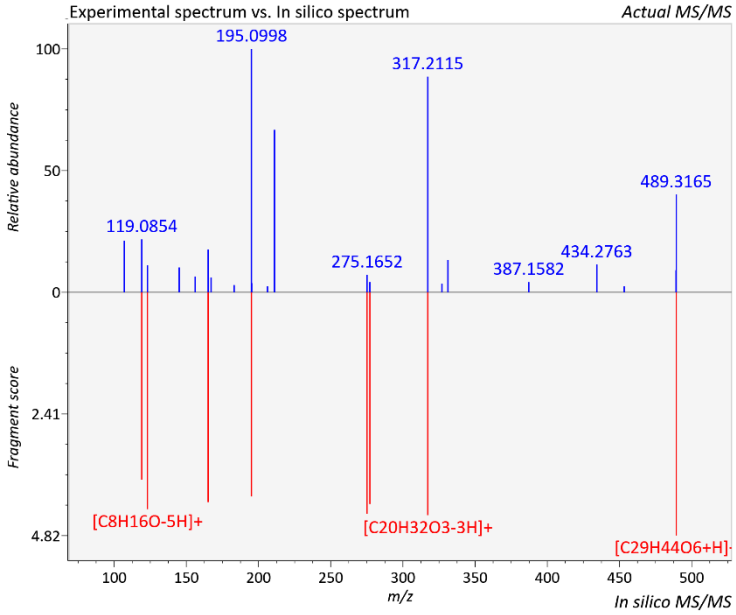


Figura 55. Espectro de A08 ID321 (UNPD18173)



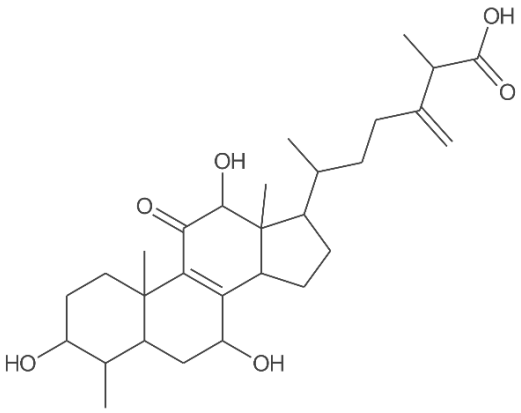


Figura 56. Espectro de A08 ID325

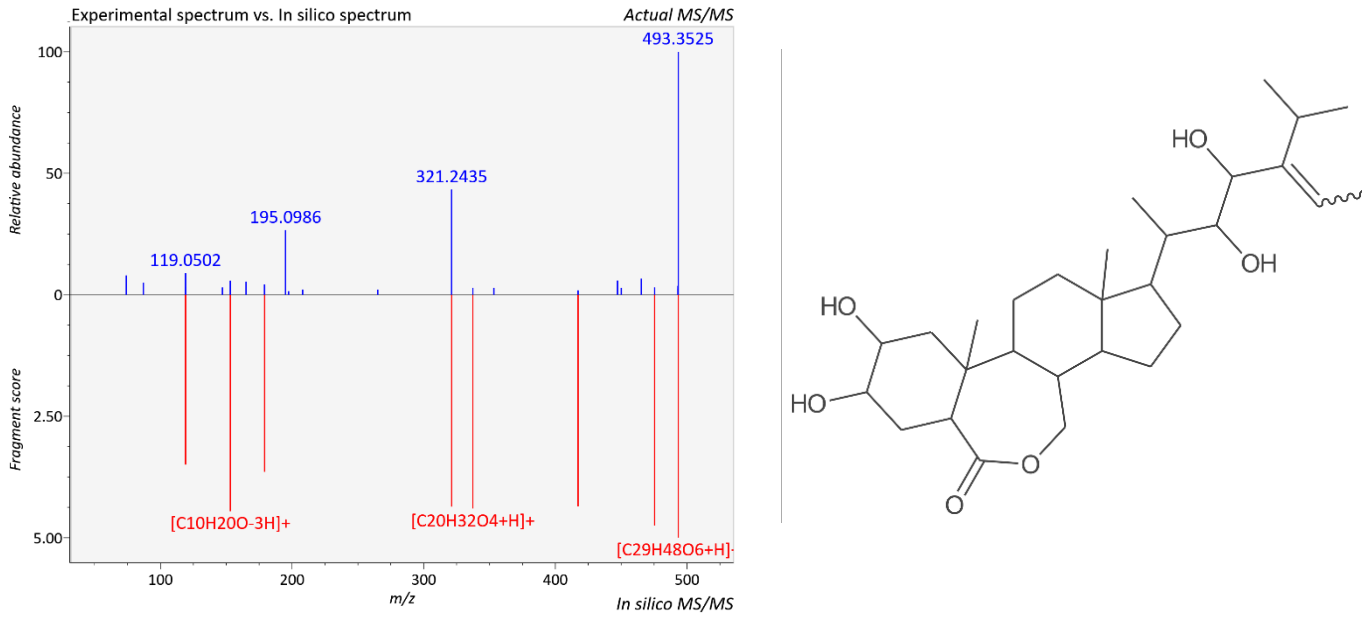


Figura 57. Espectro de A08 ID326 (15-[(E)-2, 3-dihidroxi-4-isopropil-1-metil-hex-4-enil]-4,5-dihidroxi-2,16-dimetil-9-oxatetraciclo[9.7.0.02,7.012,16]octadecan-8-ona)

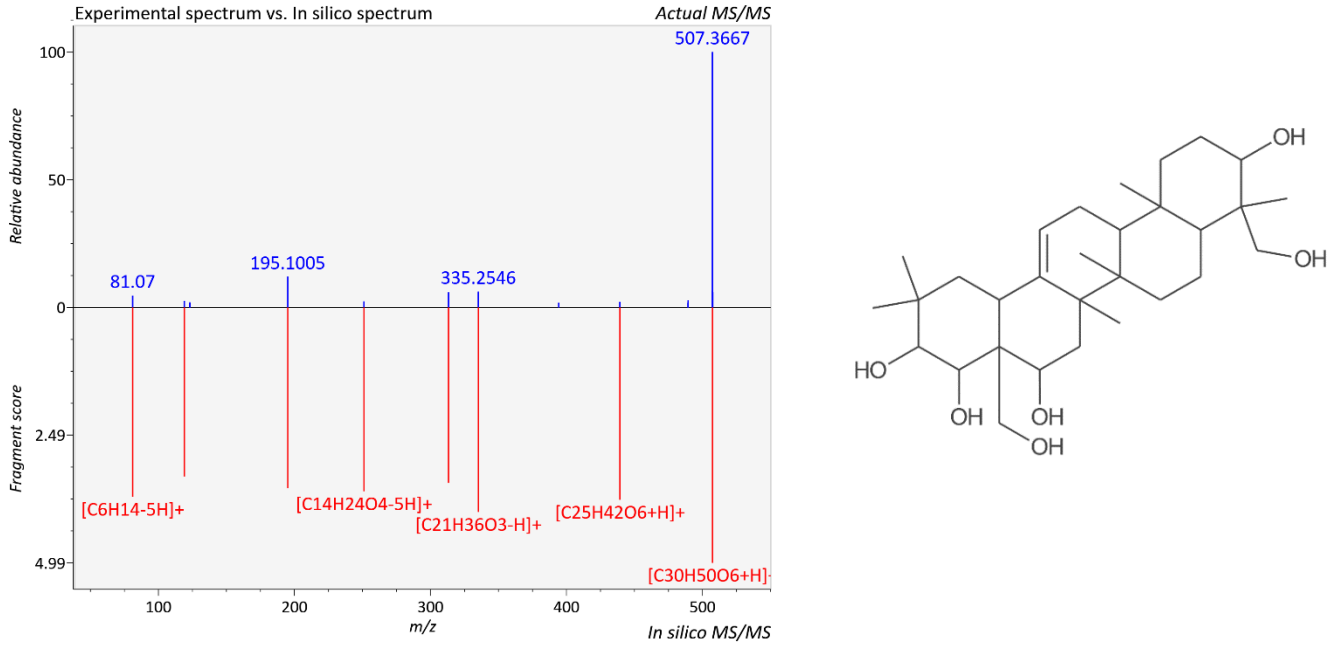
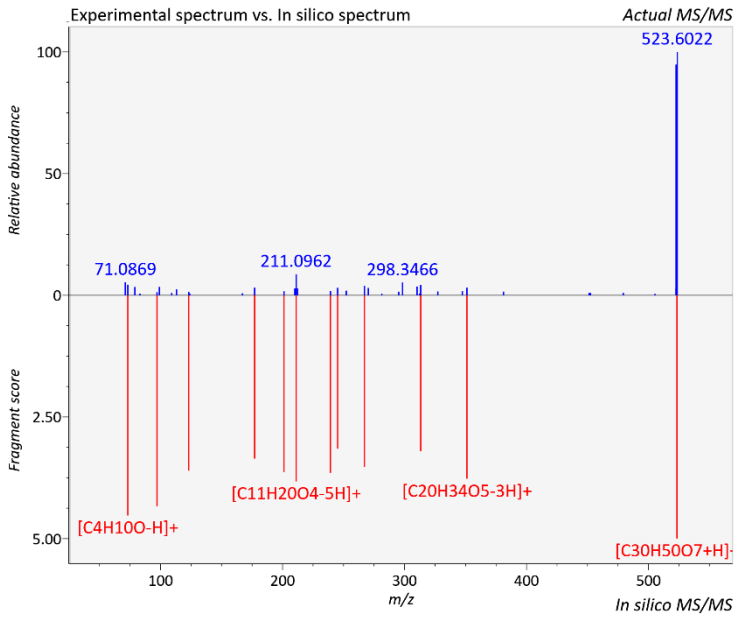


Figura 58. Espectro de A08 ID334 (Teasapogenol A)



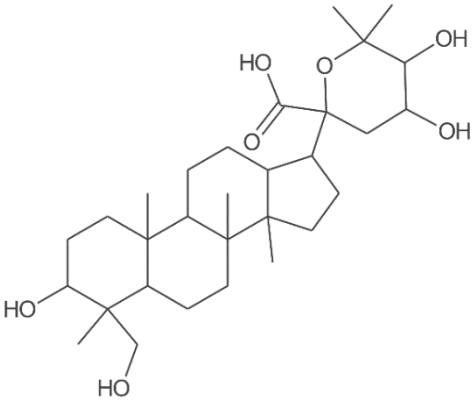
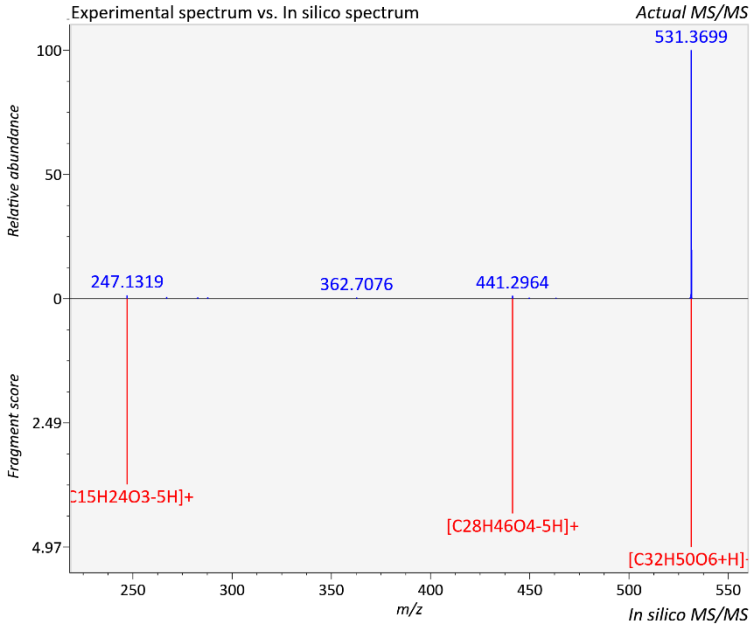


Figura 59. Espectro de A08 ID341 (ácido gentirigénico)



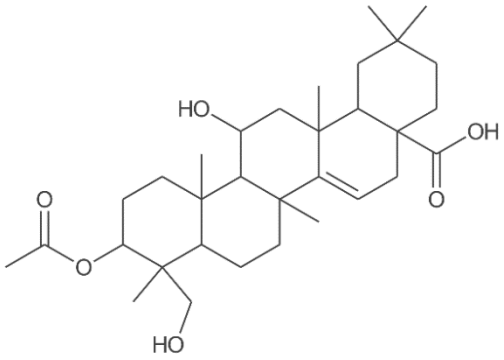


Figura 60. Espectro de A08 ID348 (Acinospesigenina A.)

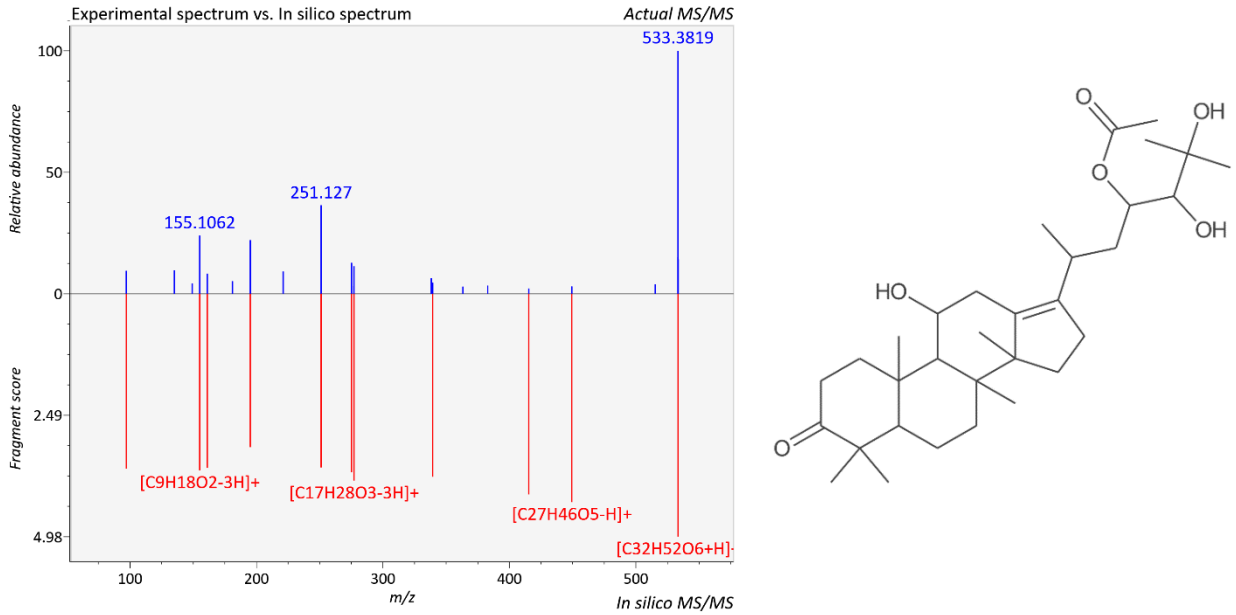


Figura 61. Espectro de AO8 349 (Alisol E 23-acetato)

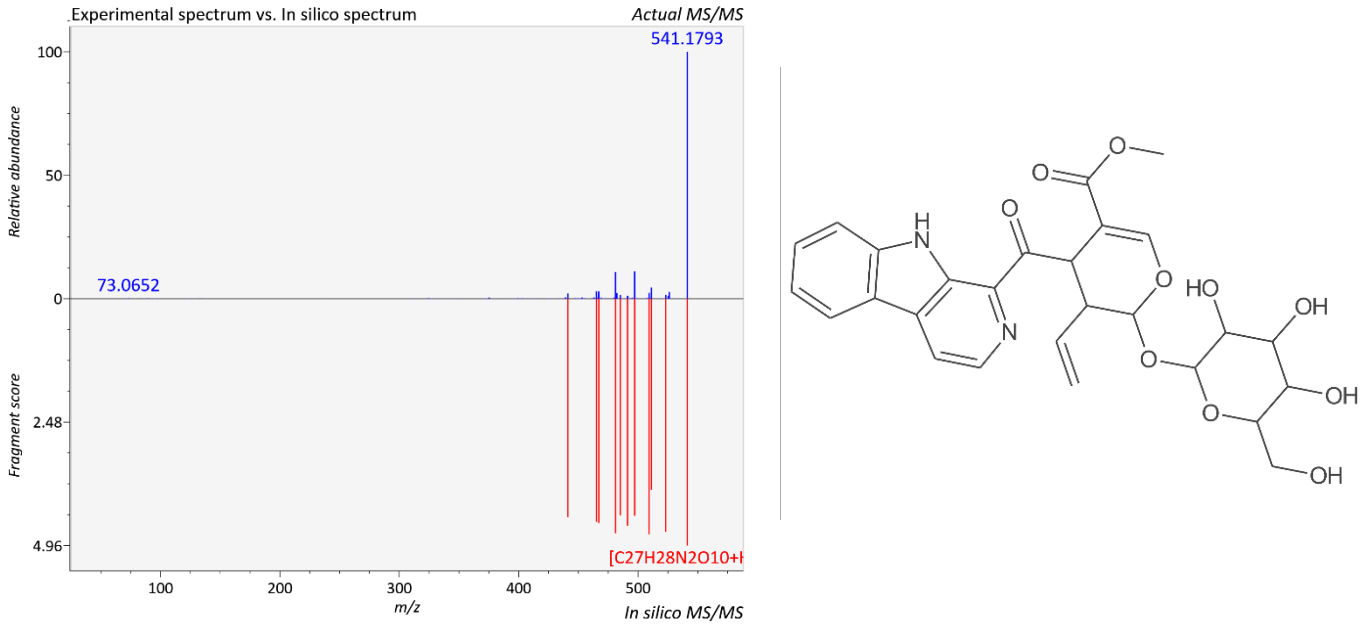


Figura 62. Espectro de A08 ID355 (UNPD129863)

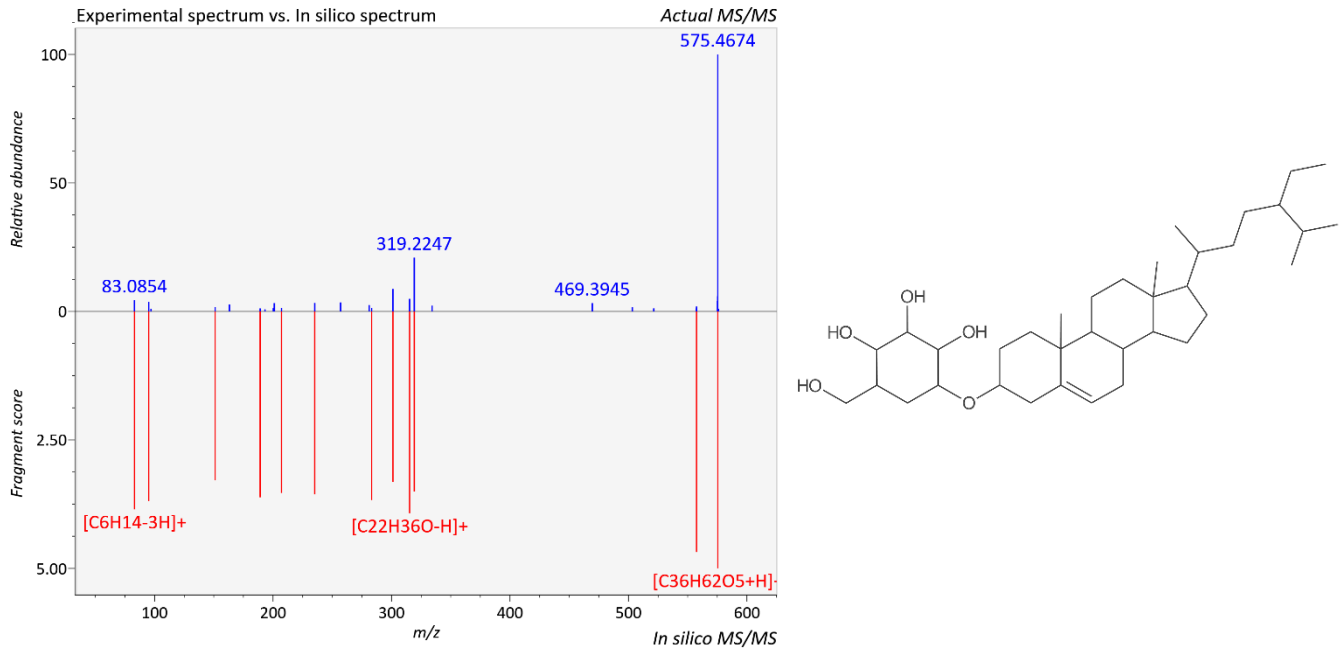


Figura 63. Espectro de A08 ID370 (UNPD215179)

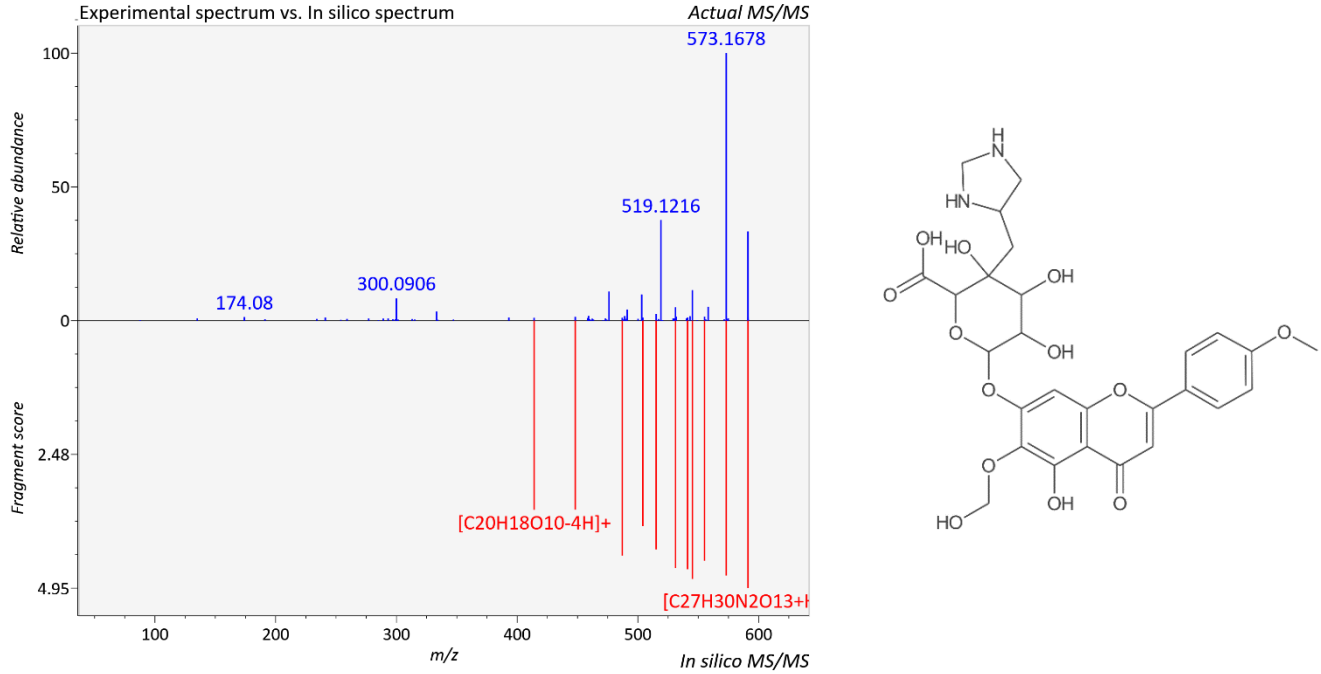
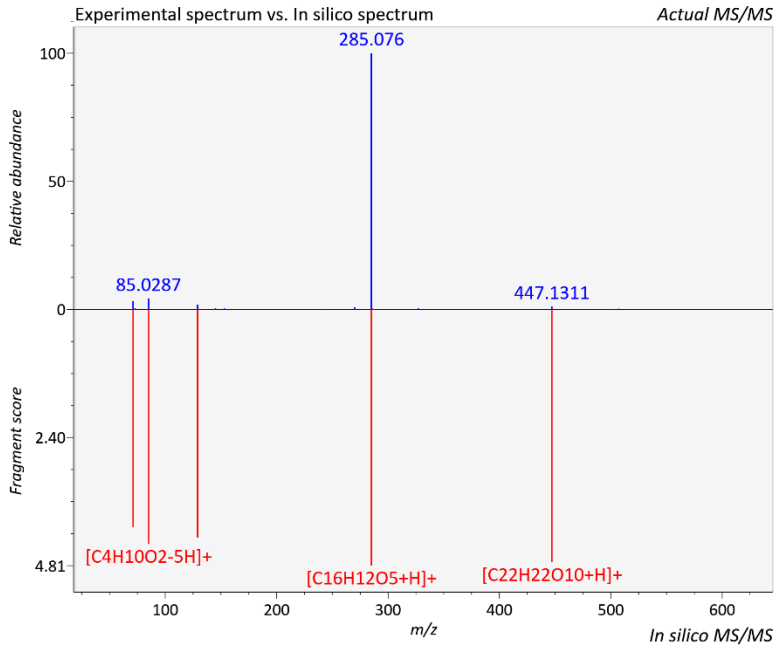


Figura 64. Espectro de A08 ID376 (CNP0432080)



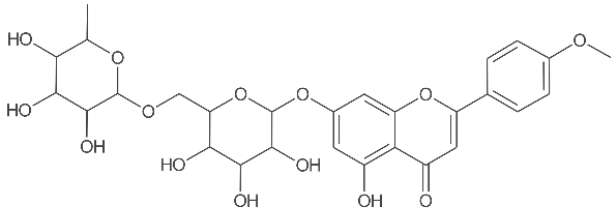
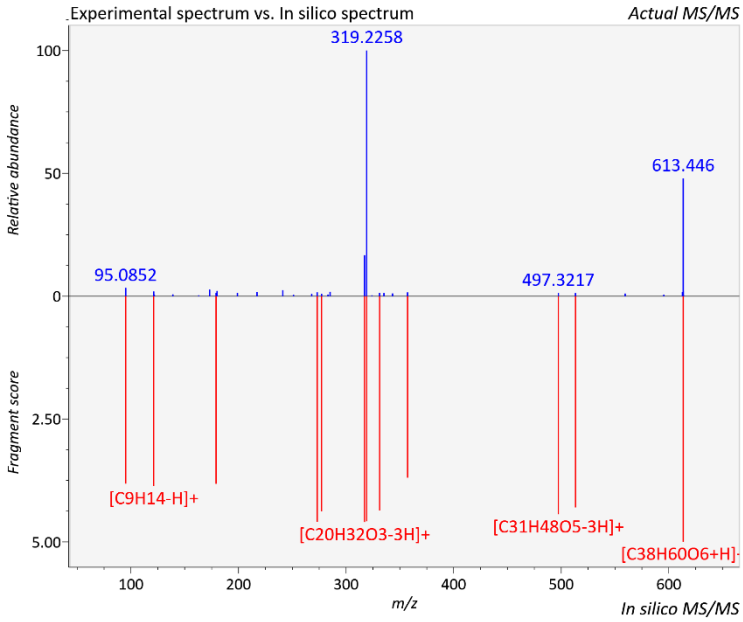


Figura 65. Espectro de A09 ID377 (linarina; 7-O-rutinósido de acacetina; 7-rutinósido de acacetina; Budleoflavonolosida)



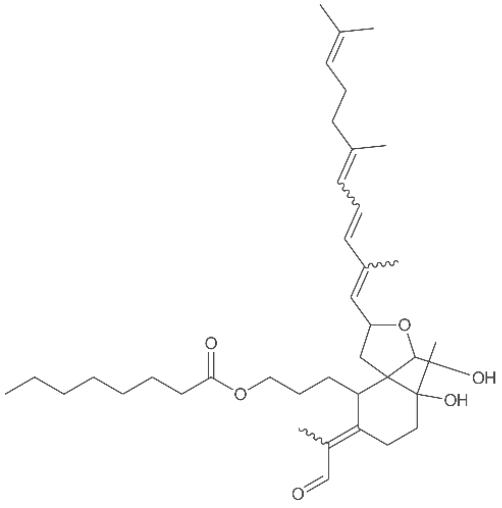


Figura 66. Espectro de A08 ID382 (UNPD2351)

Tabla 7. Compuestos similares entre la fracción etanólica de la corteza y el subextracto acuoso de hojas de Zantoxylum caribaeum.

ID	Extracto	RT (minuto	m/z	Tipo	Fórmula	metabolito nombre	Puntuación (máximo 10)	Ontología	error (ppm)
40	MeOH	8,218317	197,1175	[M+H]+	C11H16O3	(-)-Loliolide;Loliolide	6,71	Benzofuranos	-1,4237
49	MeOH	1,14565	208,1335	[M+H]+	C12H17NO2	C00050650	6,65	tetrahidroisoquinolinas	-1,4233
64	MeOH	1,224233	222,1491	[M+H]+	C13H19NO2	(1S)-6,7-dimethoxy-1,2-dimethyl-3,4-dihydro-1H-isoquinoline	6,00	tetrahidroisoquinolinas	-1,1065
76	AcOEt	1,30075	227,1763	[M+H]+	C12H22N2O2	6-(2-Hydroxy-cyclopentyl)-7-oxo-heptanamidine	5,28	ciclopentanoles	-3,9599
88	AcOEt+MeOH	8,53265	241,0687	[M+Na]+	C9H14O6	7-Hydroxy eucommic acid	5,76	Iridoides y derivados	-2,0227
89	AcOEt+MeOH	6,410833	241,0978	[M+H]+	C14H12N2O2	beta-Carboline-1-propionic acid	5,89	Harmala alcaloides	-2,6902
137	MeOH	7,196667	280,1912	[M+H]+	C16H25NO3	N-Oxide-Tramadol	5,85	anisoles	-1,7189
180	AcOEt	21,26152	317,2104	[M+H]+	C20H28O3	all-trans-5,6-Epoxyretinoic acid	6,17	retinoides	2,2808
183	AcOEt	20,79	319,2263	[M+H]+	C20H30O3	ent-7alpha-Hydroxykaur-16-en-19-oic acid;ent-7beta-Hydroxykaurenoic acid	5,62	Kaurane diterpenoides	1,4811
189	AcOEt	19,61123	327,1251	[M+H]+	C16H22O5S	UNPD191078	5,21	bencenosulfonato ésteres	2,9784
195	MeOH	1,06705	332,2074	[M+H]+	C16H29NO6	UNPD160901	5,36	pirrolizidinas	-1,92
202	AcOEt	20,71142	334,1097	[M+H]+	C17H19NO4S	2-[[2-furanyl(oxo)methyl]amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carboxylic	6,06	cicloheptatiofenos	3,1687
205	AcOEt	18,98255	335,2218	[M+H]+	C20H30O4	Prostaglandin B2	5,88	Prostaglandinas y afines compuestos	-0,3414
210	AcOEt	20,00417	339,2531	[M+H]+	C20H34O4	Aphidicolin	5,69	Afidicolano y estemodano diterpenoides	-0,337
218	AcOEt	15,9962	349,2009	[M+H]+	C20H28O5	Gibberellin A14;GA14	5,53	C20-giberelinas 6- ácidos carboxílicos	0,1447
219	AcOEt	21,3401	349,2369	[M+H]+	C21H32O4	3a,21-Dihydroxy-5b-pregnane-11,20-dione	5,55	21-hidroxiesteroides	1,252
220	AcOEt	18,98255	351,1956	[M+H]+	C23H26O3	phenothrin	5,28	piretroides	-0,3681
223	AcOEt	15,4461	352,0841	[M+H]+	C16H17NO6S	2-{4-hydroxy-3-[3-methoxy-3-oxo-1-(thiophen-3-yl)propyl]-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridi	6,02	Alfa aminoácidos y derivados	2,3775
229	MeOH	1,06705	354,1894	[M+Na]+	C16H29NO6	UNPD160901	5,50	pirrolizidinas	-2,0885
235	AcOEt	18,51105	365,1384	[M+H]+	C22H20O5	3,6-Dimethoxy-6",6"-dimethylpyrano[2,3:7,8]flavone	5,47	piranoflavonoides	-0,1368
236	AcOEt	16,07478	367,1538	[M+H]+	C22H22O5	Xanthoangelol C	5,30	chalconas 3-preniladas	0,547
237	AcOEt	15,52468	367,1541	[M+H]+	C22H22O5	6",6"-Dimethylpyrano[2",3":6',5']-2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone	5,80	2'-hidroxicalconas	-0,2723
289	AcOEt	22,04735	436,1779	[M+H]+	C22H29NO6S	ethyl 4-{5-[(ethylperoxy)methyl]-4-methylthiophen-2-yl}-6-[(oxan-2-yloxy)methyl]pyridine-2-c	6,78	piridincarboxílico ácidos	2,1488
296	AcOEt	21,96877	439,3426	[M+H]+	C26H46O5	27-Nor-5b-cholestane-3a,7a,12a,24,25-pentol	5,38	pentahidroxi bilis ácidos , alcoholes y deri	-1,8228
319	AcOEt	23,61907	479,3754	[M+H]+	C29H50O5	(2R,3S,5S,8S,9S,10R,13S,14S,17R)-17-[(1S,2R,3R,4S)-4-ethyl-2,3-dihydroxy-1,5-dimethy	5,85	Estigmastanos y derivados	-4,8055
321	AcOEt	13,79582	481,1856	[M+H]+	C27H28O8	UNPD18173	5,03	piranoxantonas	0,1964
325	AcOEt	22,20452	489,3207	[M+H]+	C29H44O6	Camphoratin A, (rel)-	6,13	trihidroxi bilis ácidos , alcoholes y derivad	0,7487
326	AcOEt	22,12595	493,3522	[M+H]+	C29H48O6	15-[(E)-2,3-dihydroxy-4-isopropyl-1-methyl-hex-4-enyl]-4,5-dihydroxy-2,16-dimethyl-9-oxat	5,64	Brassinólidos y derivados	0,3366
334	AcOEt	24,48352	507,3691	[M+H]+	C30H50O6	Theasapogenol A	6,42	triterpenoides	-2,1412
341	AcOEt	23,69765	523,3641	[M+H]+	C30H50O7	Gentirigenic acid	5,66	triterpeno saponinas	-2,2391
348	AcOEt	23,77623	531,3692	[M+H]+	C32H50O6	Acinospesigenin A	6,48	escalarano sesterterpenoides	-2,2328
349	AcOEt	24,5621	533,3843	[M+H]+	C32H52O6	Alisol E 23-acetate	6,05	triterpenoides	-1,1913
355	AcOEt	22,75462	541,1794	[M+H]+	C27H28N2O10	UNPD129863	6,41	Terpeno glucósidos	4,2051
370	AcOEt	23,30473	575,4678	[M+H]+	C36H62O5	UNPD215179	5,64	Estigmastanos y derivados	-1,39
376	AcOEt	20,23992	591,1796	[M+H]+	C27H30N2O13	CNP0432080	5,35	Flavonoides-7-O-glucurónidos	4,1776
377	MeOH	10,10437	593,1872	[M+H]+	C28H32O14	Linarin;Acacetin 7-O-rutinoside;Acacetin 7-rutinoside;Buddleoflavonoloside	7,97	Flavonoides-7-O-glucósidos	-1,2121
382	AcOEt	24,87643	613,4471	[M+H]+	C38H60O6	UNPD2351	5,96	Sesterterpenoides	-1,3616
387	AcOEt	25,26933	623,3946	[M+H]+	C38H54O7	UNPD124237	5,90	triterpenoides	-0,5937

7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los subextractos etanólico de hoja y de corteza, se les realizó una partición con solventes de polaridad creciente, baja polaridad (Bencina), polaridad media (Diclorometano) y polaridad alta (Acetato de etilo), mediante los métodos ABTS+•, DPPH• y FRAP.

Se obtuvieron subextracto de: acetato etilo de hojas (SAH), bencénico de hojas (SBH), diclorometano de hojas (SDH), acetato de etilo corteza (SAC), bencénico de corteza (SBC) y diclorometano de corteza (SDC).

Para la evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH• se emplearon concentraciones de 500, 400, 300, 200 y 100 ppm, y concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20 ppm. Para el método de ABTS+• se emplearon las mismas concentraciones para realizar el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC_{50}). Se empleó el modelo de regresión lineal (mínimos cuadrados), para la determinación de la concentración inhibitoria media (IC_{50}).

7.4.1 Evaluación de actividad antioxidante por el Método DPPH•.

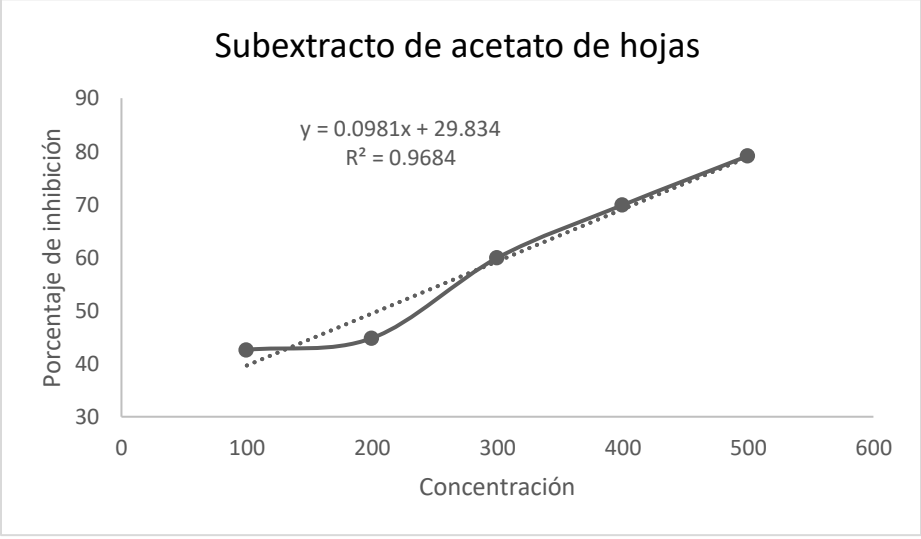
7.4.1.1 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto de acetato etilo de hojas.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de DPPH•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de hojas por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	42.604
200 ppm	44.812
300 ppm	59.933
400 ppm	69.867
500 ppm	79.139

Los resultados mostrados en la **tabla 8** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 79.139 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 205.56 ppm (**gráfica 1**).



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato de etilo Hojas.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9684, se puede explicar un 96.84 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.0981 unidades por cada unidad de concentración.

7.4.1.2 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto bencénico de hojas

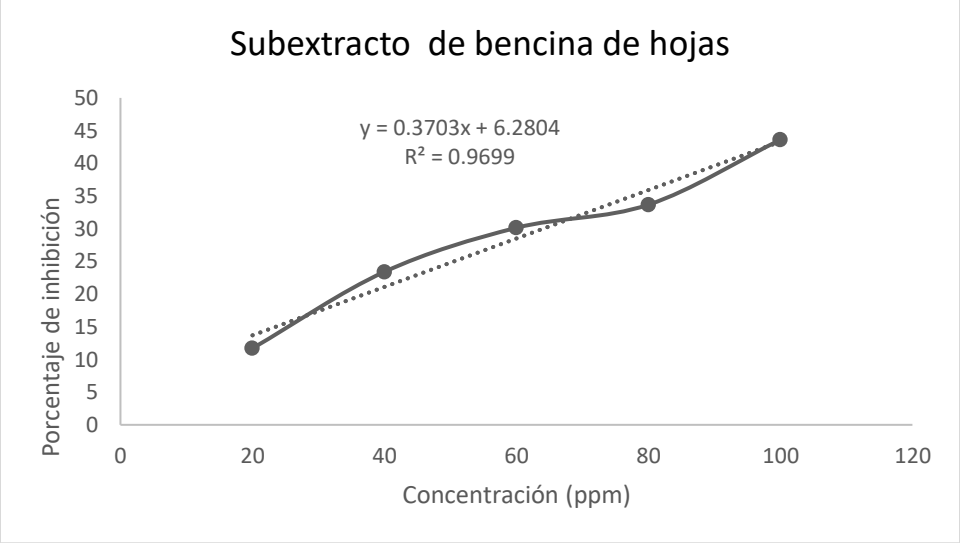
A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de DPPH•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto bencénico de hojas por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
20 ppm	11.700
40 ppm	23.400
60 ppm	30.132
80 ppm	33.650
100 ppm	43.600

Los resultados de la **tabla 9,** muestran porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 100 ppm, con porcentaje de inhibición de 43.6 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de

confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 118 ppm (**gráfica 2**).



Gráfica 2. Actividad antioxidante DPPH• para el subextracto bencénico de hojas.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9699, se puede explicar un 96.99 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.3703 unidades por cada unidad de concentración.

Vemos que el valor de IC_{50} está por fuera de la curva, por lo que a esas concentraciones no presentó IC_{50} apreciable, por lo que se puede concluir que, en este extracto, no se encuentran presentes compuestos que puedan estabilizar al radical DPPH•, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada frente a este radical.

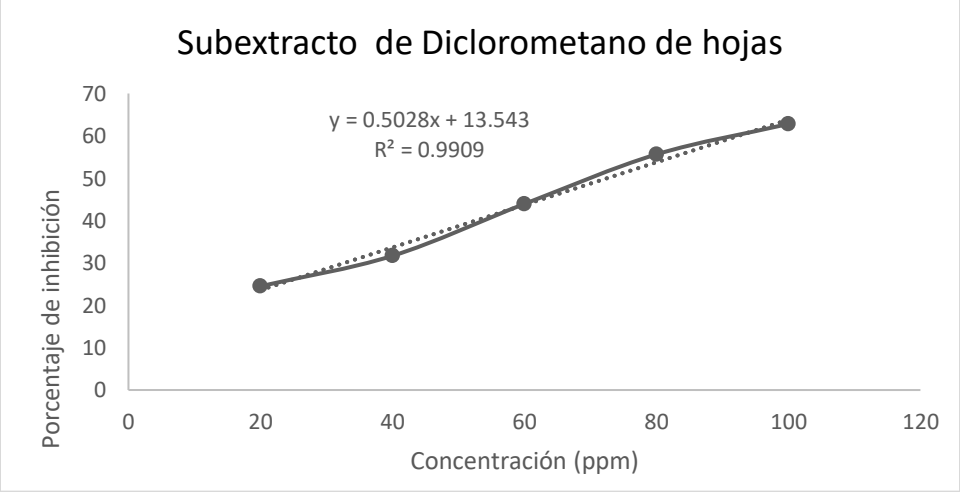
7.4.1.3 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto diclorometano de hojas.

Se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 10.

Tabla 10. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de hojas por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
20 ppm	24.500
40 ppm	31.670
60 ppm	43.920
80 ppm	55.629
100 ppm	62.803

Los resultados mostrados en la **tabla 10** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 100 ppm con porcentaje de inhibición de 62.803 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 72.5 ppm (**gráfica 3**).



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de Diclorometano de hoja.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9909, se puede explicar un 99.09 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.5028 unidades por cada unidad de concentración.

7.4.1.4 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto de acetato de corteza.

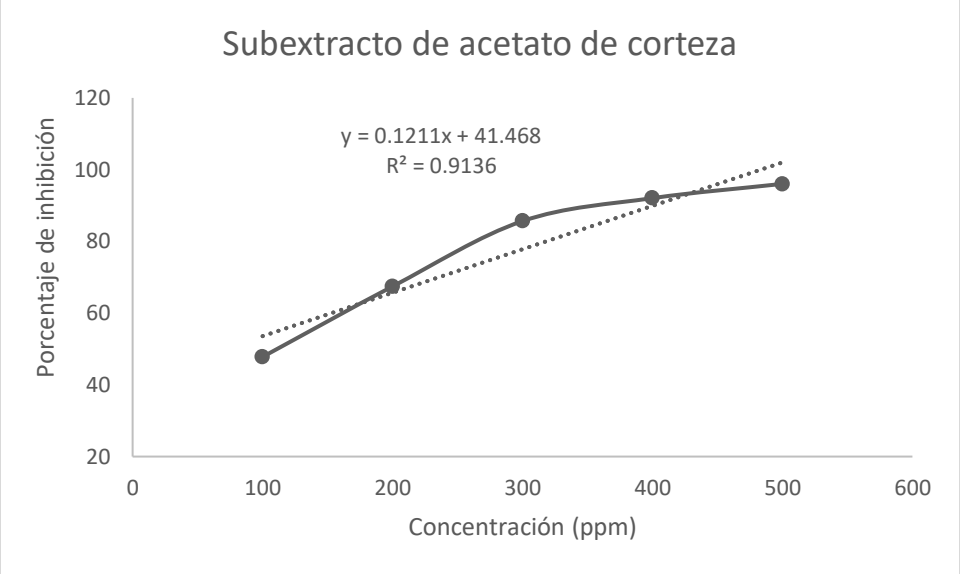
A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de DPPH•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato de corteza por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	47.790
200 ppm	67.430
300 ppm	85.650
400 ppm	92.052
500 ppm	96.026

Los resultados mostrados en la **tabla 11** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 96.026 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo

lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 70.45 ppm (**Gráfica 4**).



Gráfica 4. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato de corteza.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9136, se puede explicar un 91.36 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.1211 unidades por cada unidad de concentración.

Vemos que el valor de IC_{50} está por fuera de la curva, por lo que a esas concentraciones no presentó IC_{50} apreciable, por lo que se puede concluir que, en este extracto, no se encuentran presentes compuestos que puedan estabilizar al radical DPPH•, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada frente a este radical.

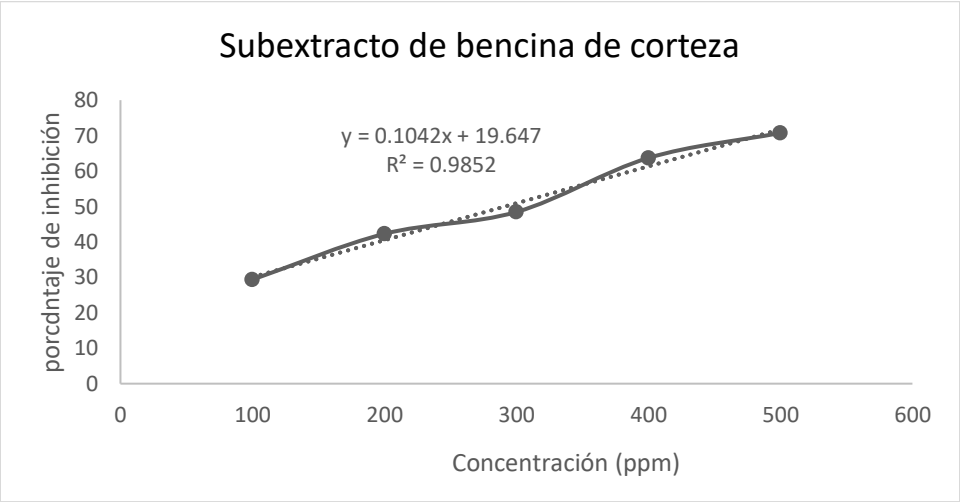
7.4.1.5 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto bencénico de corteza.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de DPPH•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto bencénico de corteza por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	29.350
200 ppm	42.270
300 ppm	48.450
400 ppm	63.680
500 ppm	70.750

Los resultados mostrados en la **tabla 12** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 70.75 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 291 ppm (**Gráfica 5**).



Gráfica 5. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de bencina de corteza.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9852 se puede explicar un 98.52 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.1042 unidades por cada unidad de concentración.

7.4.1.6 Ensayos de actividad antioxidante DPPH• para el subextracto de Diclorometano de corteza.

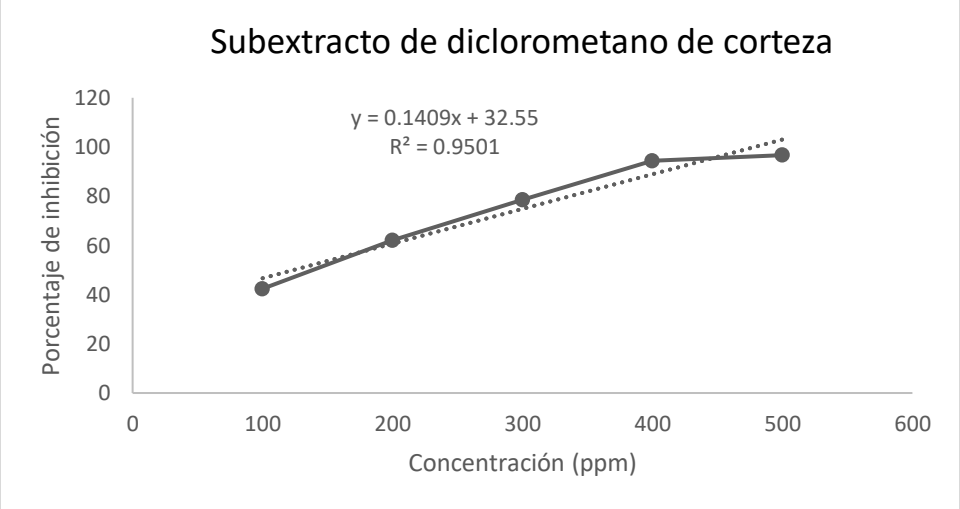
A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de DPPH•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de corteza por el método de DPPH•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	42.380
200 ppm	62.140
300 ppm	78.470

400 ppm	94.400
500 ppm	96.600

Los resultados mostrados en la **tabla 13** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 96.6 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 123.84 ppm (**Gráfica 6**).



Gráfica 6. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de diclorometano de corteza.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9501, se puede explicar un 95.01 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.1409 unidades por cada unidad de concentración.

Los extractos que mostraron mejor actividad antioxidante por el método de DPPH• fueron: subextracto diclorometano de hojas y el subextracto en acetato de etilo de corteza con IC_{50} 72.5 ppm y 70.45 ppm respectivamente.

7.4.2 Evaluación de actividad antioxidante por el método ABTS+•.

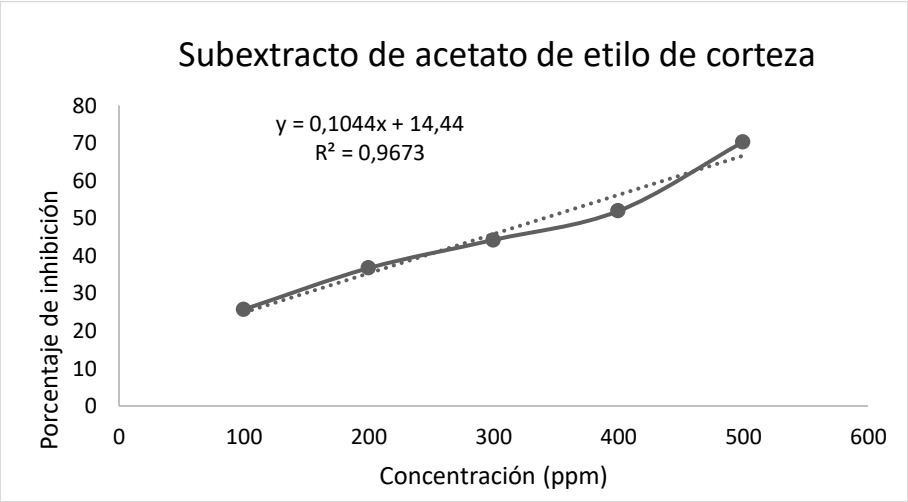
7.4.2.1 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de acetato etilo de corteza.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 14.

Tabla 14. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de corteza por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	25.700
200 ppm	36.700
300 ppm	44.200
400 ppm	51.900
500 ppm	70.300

Los resultados mostrados en la **tabla 14** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 70.3 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 340 ppm (**gráfica 7**).



Gráfica 7. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto de acetato de etilo de corteza.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9673, se puede explicar un 96.73 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.1044 unidades por cada unidad de concentración.

7.4.2.2 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de acetato etilo de hojas.

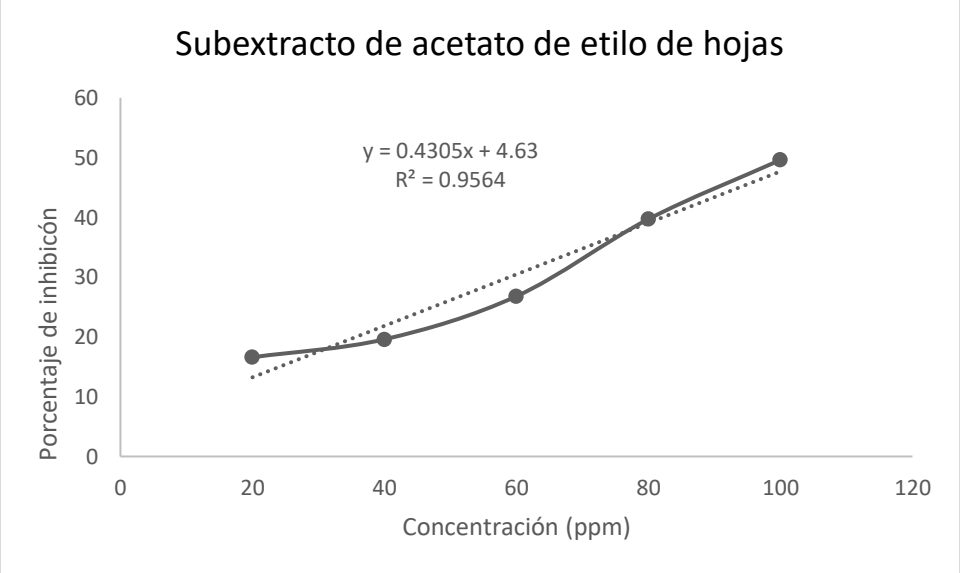
A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 15.

Tabla 15. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de acetato etilo de hojas por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
20 ppm	16.6
40 ppm	19.6
60 ppm	26.8

80 ppm	39.7
100 ppm	49.6

Los resultados mostrados en la **tabla 15** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 100 ppm con porcentaje de inhibición de 49.6 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 105 ppm (**Gráfica 8**).



Gráfica 8. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del subextracto de acetato hojas**.**

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9564, se puede explicar un 95.64 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el

porcentaje de inhibición se afecta 0.4305 unidades por cada unidad de concentración.

Vemos que el valor de IC_{50} está por fuera de la curva, por lo que a esas concentraciones no presentó IC_{50} apreciable, por lo que se puede concluir que, en este extracto, no se encuentran presentes compuestos que puedan estabilizar al radical ABTS+•, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada frente a este radical.

7.4.2.3 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de bencénico de hojas.

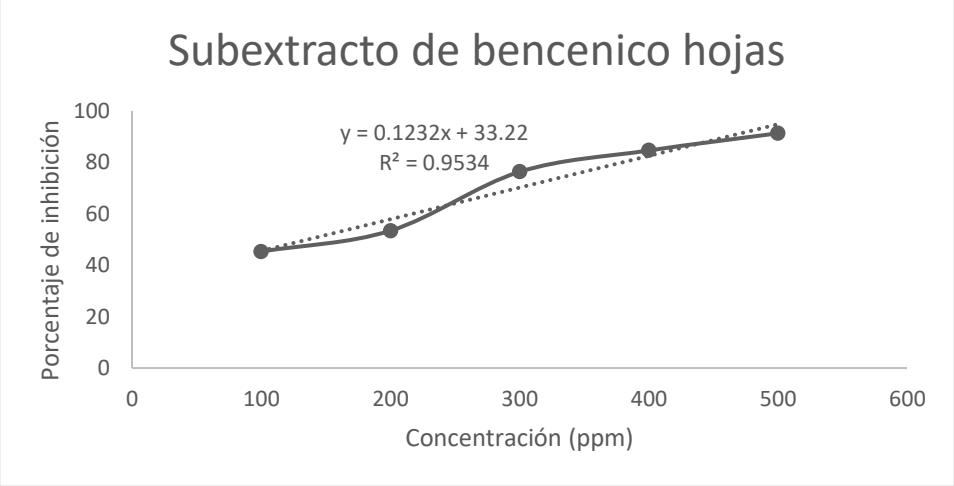
A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 16.

Tabla 16. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de bencénico de hojas por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	45.3
200 ppm	53.4
300 ppm	76.3
400 ppm	84.6
500 ppm	91.3

Los resultados mostrados en la **tabla 16** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 91.3 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo

lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 136.2 ppm (**Gráfica 9**).



Gráfica 9. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto bencénico de hojas.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9534, se puede explicar un 95.34 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.1232 unidades por cada unidad de concentración.

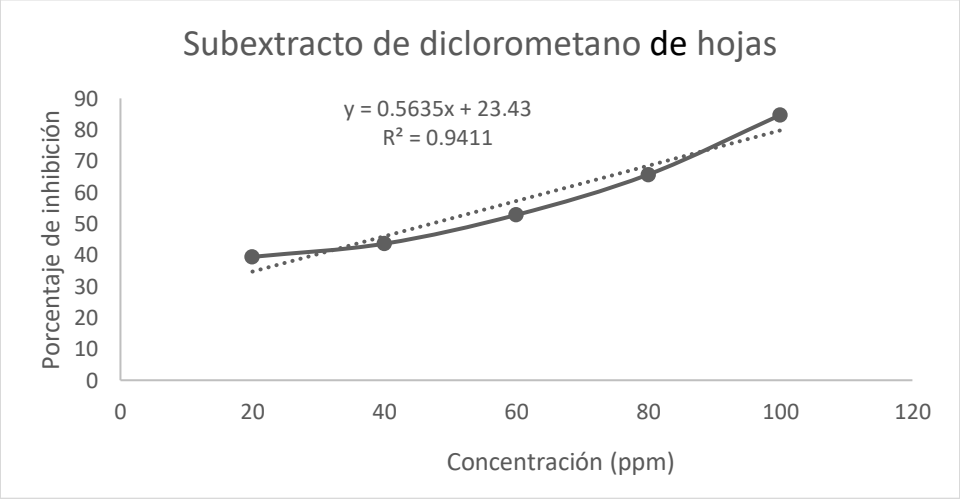
7.4.2.4 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de diclorometano de hojas.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 17.

Tabla 17. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de hojas por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
20 ppm	39.4
40 ppm	43.6
60 ppm	52.8
80 ppm	65.7
100 ppm	84.7

Los resultados mostrados en la **tabla 17** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 100 ppm con porcentaje de inhibición de 84.7 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Minh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 41.15 ppm (**gráfica 10**).



Gráfica 10. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del subextracto diclorometano de hojas.

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva con un valor de R^2= 0.9411, se puede explicar un 94.11 % de la variabilidad de la absorbancia respecto a las

concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.5635 unidades por cada unidad de concentración.

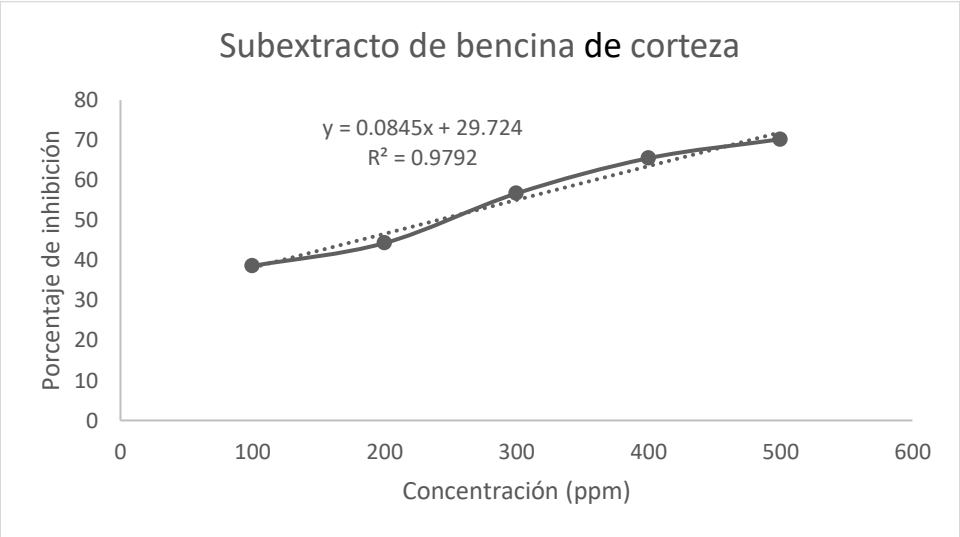
7.4.2.5 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de bencina de corteza.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de bencina de corteza por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	38.60
200 ppm	44.30
300 ppm	56.70
400 ppm	65.50
500 ppm	70.24

Los resultados mostrados en la **tabla 18** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 70.24 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 239.95 ppm (**Gráfica 11**).



Gráfica 11. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del subextracto bencina de corteza**.**

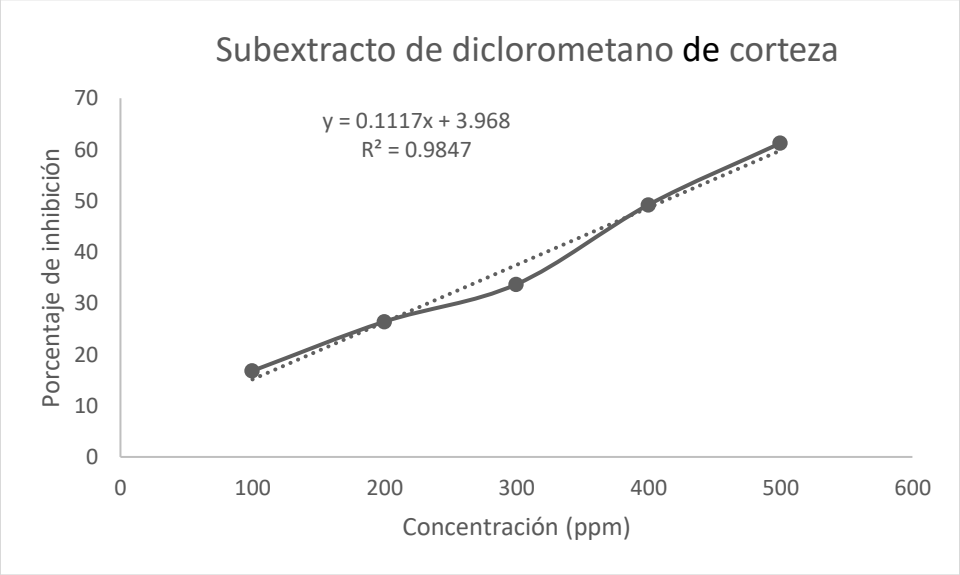
7.4.2.6 Ensayos de actividad antioxidante ABTS+• para el subextracto de diclorometano de corteza.

A partir de los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de ABTS+•, se calcularon los porcentajes de inhibición del extracto a diferentes concentraciones los cuales se reportaron en la tabla 19.

Tabla 19. Porcentajes de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones para el subextracto de diclorometano de corteza por el método de ABTS+•.

Concentración	% inhibición
100 ppm	16.80
200 ppm	26.40
300 ppm	33.70
400 ppm	49.20
500 ppm	61.23

Los resultados mostrados en la **tabla 19** se observaron porcentajes de inhibición altos para este extracto a una concentración de 500 ppm con porcentaje de inhibición de 61.23 %. Al graficar los datos obtenidos del porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración, los resultados se ajustaron a varios modelos curvilíneos. Puesto que el valor-P (0,00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC_{50} respectivo con un valor de 412.1 ppm (**Gráfica 12**).



Gráfica 12. Porcentaje de inhibición (% Inh) frente a la concentración del Subextracto diclorometano de corteza.

Los extractos que mejor actividad antioxidante por el método de ABTS+•, mostraron fueron subextracto bencénico hojas y subextracto de diclorometano hojas con IC_{50} 136.2 ppm y 41.15 ppm respectivamente.

Los extractos que mejor actividad antioxidante por el método de DPPH• mostraron fueron subextracto diclorometano hojas y subextracto acetato corteza con IC_{50} 72.5 ppm y 70.45 ppm respectivamente.

7.4.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP.

Para la determinación del potencial de reducción férrica por el método FRAP, se determinaron las absorbancias de los subextractos estudiados, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Absorbancias obtenidas de los subextractos a diferentes concentraciones por el método de FRAP.

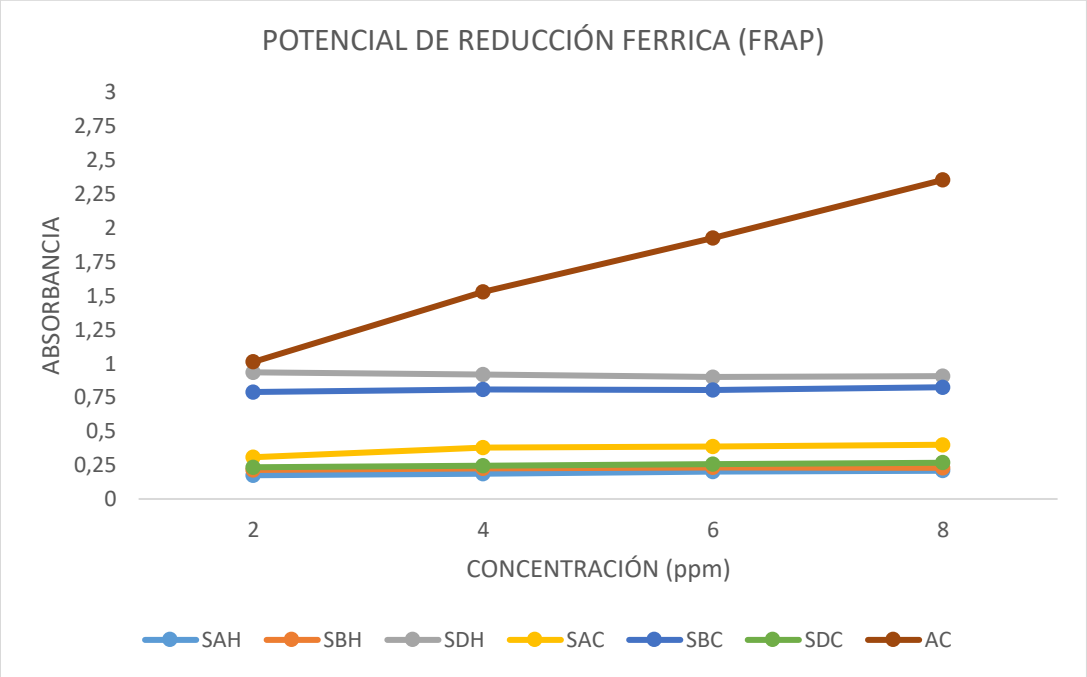
Subextractos	Concentraciones			
	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm
SAH	0.175	0.187	0.200	0.208
SBH	0.214	0.225	0.232	0.230
SDH	0.934	0.916	0.900	0.908
SAC	0.308	0.378	0.386	0.400
SBC	0.789	0.809	0.805	0.824
SDC	0.234	0.245	0.256	0.267

El potencial de reducción férrica fue medido mediante una curva de calibrado de ácido ascórbico, a concentraciones de 2, 4, 6 y 8 ppm, como se ilustra en la tabla 20.

Tabla 21. Absorbancias a las diferentes concentraciones de ácido ascórbico por el método de FRAP.

Concentración (ppm)	Absorbancia del ácido ascórbico
2	1.011
4	1.529
6	1.924
8	2.353

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el análisis, se realizó la gráfica de Absorbancia frente a la concentración de cada subextracto y el patrón de ácido ascórbico. (Gráfica 13).



Grafica 13. Absorbancia Vs Concentración de los subextractos y referencia (Ac ascórbico) por el método de FRAP.

Al evaluar el potencial de reducción férrica de cada uno de los subextractos estudiados y compararlos con los obtenidos para el ácido ascórbico, se puede concluir que los subextractos que presenta potencial de reducción a todas las concentraciones evaluadas fueron SDH y SBC. Por su parte las absorbancias obtenidas estuvieron en un intervalo de 0.8 a 1.0 aunque estos resultados son mucho menores que los obtenidos para el ácido ascórbico.

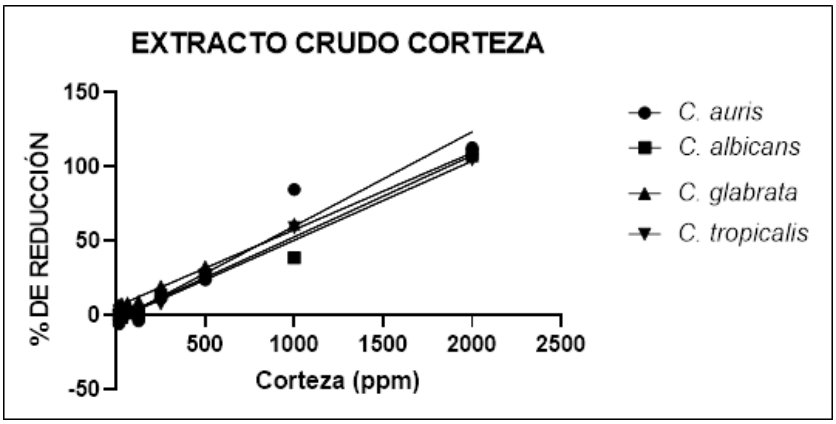
8 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados obtenidos de la actividad antifungica del extracto de hojas y corteza de ***Zantoxylum Caribaeum*** frente a los hongos ***Candida albicans (Tejido subcutáneo), Candida tropicalis (Sangre), Candida auris y Candida glabrata*** por el método de microdilución en caldo, con concentraciones evaluadas de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 ppm.

Tabla 22. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto crudo de corteza

% REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO EXTRACTO CRUDO DE CORTEZA								
Aislamiento	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.50**	**31.25**	**15.62**
C. auris	112.84	84.76	23.92	11.24	-3.73	3.04	-1.31	-5.82
C. albicans	108.64	38.79	27.46	13.87	0.99	1.60	-1.20	0.31
C. glabrata	107.39	61.48	32.73	19.35	9.44	8.22	7.67	7.00
C. tropicalis	104.71	59.05	27.24	7.79	0.27	0.16	-0.26	2.99

Extracto crudo de corteza	***C. auris***	***C. albicans***	***C. glabrata***	***C. tropicalis***
IC_{50}	842.5	989.2	852.3	949.7
IC_{90}	1472	1739	1625	1680
IC_{99}	1614	1908	1799	1844



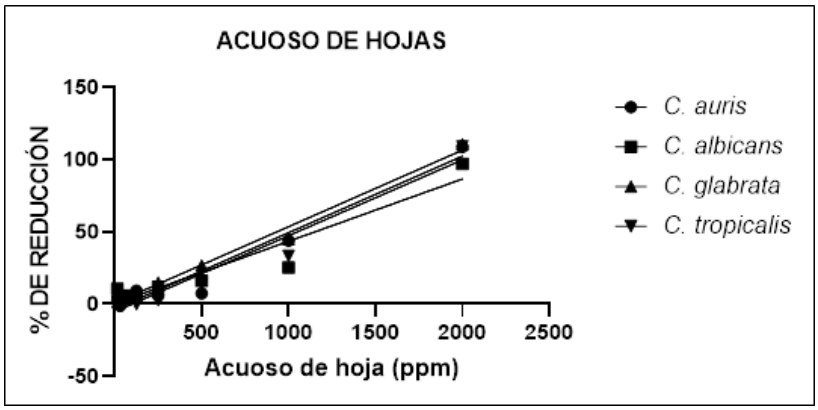
Grafica 14. Porcentaje de reducción del crecimiento de las cepas biológicas *C. Auris, C. Albicans, C. Glabrata, C. Trpicalis* de Vs Extracto de corteza.

Tabla 23. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto acuoso de hoja

Extracto acuoso de hoja	***C. auris***	***C. albicans***	***C. glabrata***	***C. tropicalis***
IC_{50}	1011	1152	932.5	1051
IC_{90}	1766	2079	1688	1813
IC_{99}	1936	2287	1858	1984

% REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO ACUOSO DE HOJA								
Aislamientos	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.5**	**31.25**	**15.62**
C. auris	108.88	43.91	7.48	5.80	9.25	5.62	-1.24	2.92
C. albicans	97.00	25.24	16.04	11.68	4.88	3.63	5.37	10.53
C. glabrata	110.60	45.16	26.71	14.85	7.98	5.62	3.40	1.55
C. tropicalis	109.00	33.32	13.79	2.76	-0.15	5.72	1.17	1.81

El extracto que presento mayor actividad inhibitoria de crecimiento expresada en porcentaje de reducción de crecimiento fúngico (Tabla 22 y 23), fue el extracto acuoso de hojas con IC_{50} entre 900 y 1200 C_{90} y IC_{99} con valores entre 1000 y 2100. Además de evidenciarse que el extracto presento mayor efecto inhibitorio frente ***C. albicans*** con IC_{50} = 1152, IC_{90}= 2079 y IC_{99}= 2287.



Grafica 15. Porcentaje de reducción del crecimiento de las cepas biológicas *C. auris, C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis* de Vs Extracto de acuoso de hojas.

La especie *Zanthoxylum monophyllum* también contiene metabolitos con actividad biológica contra hongos que afectan a los humanos como *Aspergillus terreus, Aspergillus flavus, Penicillium digitatum, Penicillium funiculosum, Penicillium citinum*, Paecilomyces y Colombia cuenta con una diversidad de climas y condiciones ambientales, que favorecen el crecimiento y dispersión de diferentes variedades y especies de plantas. En el departamento de Norte de Santander, caracterizado por tener un bosque seco tropical, se han realizado algunos estudios de clasificación botánica. (Chaves G. et al.,2021). lo cual sugiere la presencia de un posible efecto sinérgico. Es probable, que la acción conjunta de diferentes sustancias presentes en el extracto crudo, pueda potenciar el efecto antifúngico, en contraste al menor efecto observado cuando estas sustancias actúan separadamente. (Gómez Y, *et al*., 2007).

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del extracto de hojas y corteza de ***Zantoxylum Caribaeum*** frente a las cepas bacterianas ***P. aeruginosa, E. coli, S. aureus*** y ***E. faecium*** por el método de microdilución en caldo, con concentraciones evaluadas de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 ppm. (Tabla 24 y 25).

Tabla 24. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto crudo de corteza.

% REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO EXTRACTO CRUDO DE CORTEZA								
Aislamientos	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.50**	**31.25**	**15.62**
P. aeruginosa	15.86	13.53	17.49	14.33	9.30	9.69	8.62	7.80
E. coli	18.18	25.45	7.17	6.35	13.30	9.59	9.99	10.15
S. aureus	-62.45	-54.15	-70.38	-36.26	-26.77	-22.79	-5.12	9.82
E. faecium	-4.43	-4.68	35.48	-6.81	6.22	29.99	-29.21	28.47

Tabla 25. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto acuoso de hoja

% REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO EXTRACTO B								
Aislamientos	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62.5**	**31.25**	**15.62**
P. aeruginosa	68.21	-109502.43	-176924.33	-55323.53	-54.67	-52.18	-36.62	-23.07
E. coli	54.87	-0.53	-56.81	-16.56	-56.41	-11.13	-9.66	-12.83
S. aureus	-5.86	-22.44	-32.45	-31.31	-27.44	-18.00	-11.04	-10.39
E. faecium	68.25	47.33	4.82	-8.34	-1.28	-0.82	**-1.78**	-5.86

Como se puede observar ninguno de los dos extractos presento actividad antibacteriana considerable, debido a que los porcentajes de reducción de crecimiento bacteriano fueron muy bajos 2000 ppm, hubo una absorbancia de *P. aeruginosa* 68,21 y de *E. coli* 54,87 y par a *E. faecium* 68,25. Los demás valores no son reproducibles debido a la baja absorbancia presentada.

8. CONCLUSIÓN.

Se aislaron tres compuestos puros en el desarrollo de este, Cantin-6-ona (A01), dihidrosanguinina (A03) y dihidrogliciteína (A04), tres alcaloides con m/z 221.0729, m/z 341.1091, m/z 287.0939, respectivamente, se identificaron mediante técnicas de ultra HPLC acoplado a espectrometria de masas y para cantin-6-ona se confirm la estructura mediante RMN protonica. Y se identificaron 40 compuestos del extracto etanólico de corteza entre los que se destacan 3,4-dimetilcatinona, (R,Z)-alfa-bisaboleno, 2-feniletil beta-D-glucopiranosido, 6-piperazin-1-il-Isoquinolina y 29 compuestos de extracto acuoso de hojas se encuentran 1-(2,3-Dihidro-6-metil-1H-pirrolizin-5-il)-1,4-pentanediona, N-(3-Oxododecanoil)homoserina lactona, Ciclopirox, 9-Nitroantraceno, Isofenoxazina, Dietiltoluamida, Granisetron, Sesquicineol, Oleoil sarcosine, Tridodecilamina.

Los extractos que mejor actividad antioxidante por el método de ABTS+•, mostraron fueron subextracto bencénico hojas y subextracto de diclorometano hojas con IC_{50} 136,2 ppm y 41,15 ppm respectivamente, este último tambien evidencio actividad antioxidante por el método de DPPH•, con IC_{50} 72,5 ppm y subextracto acetato corteza con IC_{50} 70,45 ppm respectivamente y por el método de potencial de reducción férrica a todas las concentraciones evaluadas fueron subextracto de diclorometano hojas y subextracto bencénico corteza.

El extracto acuoso de hojas presento mayor actividad inhibitoria de crecimiento expresada en porcentaje de reducción de crecimiento fúngico, con IC_{50} entre 900 y 1200 C_{90} y IC_{99} con valores entre 1000 y 2100.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmad, M., Rahman, M., Huq, E., Chowdhury, R. (2003). Alcaloides de Zanthoxylum budrunga. Fitterapia, 74, 191-193. doi: 10.1016/s0367-326x(02)00286-1. PMID: 12628423.
- Cragg, G.,Kingston, D., Newman, D.(2005).Anticancer Agents from Natural Products. Taylor & Francis Group, New York, 1-3.

- Cynthia, O., Rocío, C., López, V., De la Garza, M., Arriaga, M. (2014). Estudio de mutagenicidad y actividad antibacteriana de *Erythrina herbacea, Zanthoxylum caribaeum* y *Dendropanax arboreus*, Rev. mex. cienc. farm , 45 (1), 78-85.
- Della, D; Sojo, M. (1967). Alkaloids of Zanthoxylum caribaeum Lam. J Chem Soc Perkin 1;(21), 2155-6. doi: 10.1039/j39670002155. PMID: 6069795.
- Díaz Soto L. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar, 1561-3046.
- Diéguez, R., Rivas, Y., Prieto-González, S., Garrido, G., & Torres, J. M. (2004). Potencialidad del Género Zanthoxylum como fuente de actividades Biológicas. Acta farmacológica Bonaerense, 243 - 251.
- Espino, E. M. (2019). Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la Shapilloja (Zanthoxylum fagara). [Trabajo de grado] Tarapoto, Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
- Fish, F., & Waterman, P. G. (2014). Chemosystematics in the Rutaceae II. The Chemosystematics of the Zanthoxylum/Fagara. Taxon, 177 - 203.
- Gallego, V; Arango, S; Ospina, L; Arango, V; Cardona, W. Actividad espermicida de saponinas esteroidales y triterpénicas extraídas de diferen tes plantas. Plantas Medicinales. 2014; 19(1): 76-84.
- García, J. Estudio químico, actividad antioxidante y bactericida de los extractos y subextractos de las hojas y corteza Qxandra xylopioides (annonaceae). [Tesis maestría]. Montería: Universidad de Córdoba; 2014.
- Gómez Y, Gil K, González E, Farías L. (2007). Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol Fagara monophylla (Rutaceae) en Venezuela, Revista de Biología Tropical. 55(3-4), 767-775.
- Gómez Y, Gil K, González E, Farías L. 2007. Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela Rev. biol. trop vol.55 n.3-4
- Hoang Quoc Viet, Caugiay, Hanoi, Viet Nam Deanna Della Casa and Maria Sojo C, Escuela de Quimica, Facultad de Ciencias, Universidad Centralde Venezuela, Caracas, Venezuela 1967

- Houghton, P., Woldemariam, T., Watanabe, Y., Yates, M. (1999). Activity Against Mycobacterium Tuberculosis of Alkaloids Constituents of Angostura Bark, *Galipea officinalis*. Planta Medica, 65, 250-254.
- Instituto de Ciencias Naturales: Colecciones en línea. Información obtenida el 20 de Marzo de 2010, a través del portal http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/
- Islam, A. Sayeed, A., Bhuiyan, A., Mosaddik, M., Islam, M., Khan, G. (2001). Actividad antimicrobiana y citotoxicidad de Zanthoxylum budrunga. Fitoterapia, 72, 428-430.
- Jacquemond, I., Benoit, F., Mustofa, A., Stanislas, E., Mallie, M., Fouraste, I. (2002). Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Galipinine thers Tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. Planta Medica, 68 (1), 68-69.
- J. A., Stermit, F. (1980). "Terpeno de Bishordeninil, Alcaloides y otros
- Kallunki, J. (2004). Rutaceae. In: Flowering plants of the Neotropics (Nathan, S., S. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson & S. Heald, eds.) . 333-335. The New York Botanical Garden, Princeton University Press, New Jersey
- Macias, V., Cuca L., & Jiménez, K. (2007). Usos en medicina folclórica, actividad biológica y fitoquímica de metabolitos secundarios de algunas especies del género Zanthoxylum. Duazary, 4(2), 140–159. https://doi.org/10.21676/2389783X.655
- Marr, K., Tang, C. (1992). "Volatille Insecticidal Compounds and Chemical Variability of Hawaiian Zanthoxylum Rutaceaes Species". Sistemática Bioquímica y Ecología. 20, 209-217.
- Melo, M., Zickel, C. (2004). Géneros Zanthoxylum L. y Esenbeckia Kunth (Rutaceae) en el Estado de Pernambuco, Brasil. Acta Bot. Sujetadores, 18, 73-90.
- Mriithi, M., Abraham, W., Addae-Kyereme, J., Scowen, I., Croff, S., Gitu, P., Kendrick, H., Njagi, E., Wrigh, C. (2002). Isolation and in Vitro Antiplasmodial Activities of Alkaloids from *Teclea trithocarpa*: In Antimalarial Activity and X-

Ray Cristal Structure of Normelicopicine *Journal of Natural Products*, 65, 956-959.

- Nogueira, J., Mourão, S., Dolabela, I., Santos, M., Mello, C., Kelecom, A., Mexas, R., Feder, D., Fernandes, C., Gonzalez, M., & Rocha, L. (2014). Zanthoxylum caribaeum (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on Rhodnius prolixus nymph. Parasitology Research, 113(11), 4271-4279.
- Nothias, LF, Petras, D, Schmid, R, Dührkop, K *, et al.* (2020). Redes moleculares basadas en características en el entorno de análisis GNPS. *Métodos de la naturaleza, 17* (9), 905-908.
- Nguyen, H., Tran, T., Pham, M., Pham, Q., Nguyen, X., Bui, H., Cam, I., Vu, D., Phan, V., Chau, V., SeonJu, P., Seung, H. (2019). Alkaloid glycosides and their cytotoxic constituents from Zanthoxylum nitidum. Phytochemistry Letters, 32(1), 47-51.
- Nguyen, P. H., Zhao, B. T., Kim, O., Lee, J. H., Choi, J. S., Min, B. S., & Woo, M. H. (2016). Anti-inflammatory terpenylated coumarins from the leaves of Zanthoxylum schinifolium with α-glucosidase inhibitory activity. *Journal of Natural Medicines*, *70*(2), 276-81.
- Okagu, I; Ndefo, J; Aham, E; Udenigwe, C. (2021). Especies de Zanthoxylum: una revisión exhaustiva de los usos tradicionales, la fitoquímica, las aplicaciones farmacológicas y nutracéuticas. Moléculas, 26(13):4023. https://doi.org/10.3390/molecules26134023
- Ordaz, P., Garcés, R., López, E., de la Garza, M., Arriaga, M. (2014). Estudio de mutagenicidad y actividad antibacteriana de Erythrina herbacea, Zanthoxylum caribaeum y Dendropanax arboreus. Rev Mex Cienc Farm, 45 (1), 81.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Un reporte sobre la salud. https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed*

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). *Un reporte sobre la salud.* https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance.
- Pastrana, O., Análisis químico y de bioprospección de organismos marinos del phylum echinodermata (*Mellita quinquiesperforata, Isostichopus badionotus, Holothuria mexicana, Diadema antillarum y Oreaster reticulatus*) del caribe Cordobés. [Tesis maestría]. Montería: Universidad de Córdoba; 2013.
- Patiño, O. J., Moreno, J. M., Sarmiento, L. L., & Cuca, L. E. (2011). Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género Zanthoxylum (Rutaceae). Revista Cubana de Farmacia, 431 - 438.
- Puga, Ana., Hernández, A., Carrillo, H., Espinosa, D., Rivas, Patricia.(2013) Patrones de distribución del género Zanthoxylum L. (Rutaceae) Revista Mexicana de Biodiversidad 84; 1180: 1179-1188.
- Purves, K, Macintyre, L, Brennan, D, Hreggviðsson, GÓ *, et al.* (2016). Uso de redes moleculares para la bioprospección de metabolitos secundarios microbianos. *Metabolitos, 6* (1), 2.
- Prieto, J. A. (2012). Tesis de grado. Estudio fitoquímico de Compsoneura capitellata (Myristicaceae), Zanthoxylum rigidum (Rutaceae) y Ocotea longifolia (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de Sitophilus sp. Bogotá, Cundinamarca, Colombia: Universidad nacional de Colombia.
- Raheem, DJ, Tawfike, AF, Abdelmohsen, UR, Edrada-Ebel, R *, et al.* (2019). Aplicación de metabolómica y redes moleculares en la investigación del perfil químico y la actividad antitripanosómica de *campanillas británicas* (Hyacinthoides non-scripta). *Informes científicos, 9* (1), 1-13.
- Rangel, J. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat., 39(151), 176–200. https://doi.org/10.18257/raccefyn.136

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med, 26 (9-10), 1231-7.
- Rodrigues, L., Carine, Andrade.,Estudio químico de extractos de las hojas de zanthoxylum caribaeum lam De Costa, M., Neve, H., s Brandão Bolsista PROBIC, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana. Pag, 7-9
- Rojano, B. A., Gaviria, C. A., Gil, M. A., Saez, J. A., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Antioxidant activity of the isoespintanol in different media. Vitae, 15(1), 173-181.
- Sana, T., Roark, J., Li, X., Waddell, K *, et al.* (2008). Coincidencia de fórmulas moleculares y METLIN Personal Metabolite Database aplicado a la identificación de compuestos generados por LC/TOF-MS. *Revista de técnicas biomoleculares: JBT, 19* (4), 258.
- Saquib, H., Anderson, J., Mclaughlin, J. (1999). Bioactive Furanocumarinas from the Berries of Zanthoxylum americanum. Phytotherapy Research, 4, 216-219
- Silva, L., Paoli, A. (2000). Caracterización de la semilla de Zanthoxylum Rhoifolium Lam.-Rutaceae. Reverendo Bras. Semilla, 22, 250-256.
- Souza, J; Toledo, A; Santana, C; Santos, C; Mallmann, A; Silva, J; Pinto, F. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil and leaf extracts of Zanthoxylum caribaeum Lam. against serotypes of Salmonella. Rev. sujetadores producto de salud animado 18 (3). https://doi.org/10.1590/S1519-99402017000300005
- Tuyen, T., Quan, P., Thu L., V, Toan, T., Nghi, D., Bach, P., Inh, C., Hanh, N., Vien, T., Hong Minh, P., Long, P., Khoi Nguyen, N., Thuy Dung, P., Hong Van, N. (2021). Composición química, actividades antimicrobianas y citotóxicas de los aceites esenciales de hojas, frutos y ramas obtenidos de

Zanthoxylum nitidum cultivado en Vietnam. Comunicaciones de productos naturales. https://doi.org/10.1177/1934578X20985649

- Tewary, D., Bhardwaj, A., Shanker, A. (2005). Actividades plaguicidas en cinco plantas medicinales recolectadas en las colinas medias del Himalaya occidental. Cultivos y Productos Industriales, artículo en prensa.
- Thi-Thuy, T., Porzel, A., Ripperger, H., Van-Sung, T., Adán, G. (1999). Los alcaloides terpénicos de bishordeninil forman Zanthoxylum avicennae. Fitoquímica, 50, 903-907
- Vu Dinh Hoangd, Phan Van Kiemc,e, Chau Van Minhc, SeonJu Parkb, Seung Hyun Kimb,∗ a Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST),constituyentes de Zanthoxylum culantrillo y Zanthoxylum coriaceum". Fitoquímica. 19, 1219-1223.
- Wenwen Pang, Shan Liu, Fangting He, Xinyang Li,Baloch Saira, Tianli Zheng, Jiayi Chen, Ke Dong,Xiao-fang Pei .(2018) Mutagenicity _study and antibacterial activity of *Erythrina herbacea, Zanthoxylum caribaeum* and *Dendropanax arboreus.*