



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la  
Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)**

**Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial**

**AUTOR:**

**Edith Milagros Espino Arévalo**

**ASESOR:**

**Ing. M. Sc. Epifanio Efraín Martínez Mena**

**Tarapoto – Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la  
Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)**

**AUTOR:**

**Edith Milagros Espino Arévalo**

**Sustentada y aprobada el 08 de noviembre del 2019, por los siguientes jurados:**

.....  
**Ing. Mg. Juan José Salazar Díaz**

**Presidente**

.....  
**Ing. Dr. Jaime Guillermo Guerrero Marina**

**Secretario**

.....  
**Ing. Dra. Anita Ruth Mendiola Céspedes**

**Miembro**

.....  
**Ing. M. Sc. Alejandro Alberto Cruz Rengifo**

**Asesor**

## Declaratoria de autenticidad

**Edith Milagros Espino Arévalo**, con DNI N° 77462860, bachiller de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, autor de la tesis titulada: **Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)**.

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencia de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene la tesis no ha sido auto plagiada.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 08 de noviembre del 2019



**Bach. Edith Milagros Espino Arévalo**

DNI N° 77462860

**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres:	Espino Arevalo Edith Milagros		
Código de alumno :	77462866	Teléfono:	942709510
Correo electrónico :	milagros18espino@gmail.com	DNI:	77462866

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de:	Ingeniería Agroindustrial
Escuela Profesional de:	Ingeniería Agroindustrial.

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	( )
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

**4. Datos del Trabajo de investigación**

Título:	Evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la Shapilloja ( <i>Zanthoxylum fagara</i> )
Año de publicación:	2019

**5. Tipo de Acceso al documento**

Acceso público *	(X)	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital.**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

## 7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”**.



Firma del Autor

## 8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

23 / 12 / 2019



Firma del Responsable de Repositorio  
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso  
Abierto de la UNSM – T.

\***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

\*\* **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

## Dedicatoria

A Dios por su apoyo, fuerza y amor para lograr este objetivo tan importante en mi vida.

A mi madre Olga, por su incondicional cariño y empuje, por brindarme apoyo en este arduo proyecto. Por su ayuda, a mi hermana Lucia Edith, por sus consejos y ánimos.

Edith Milagros Espino Arévalo

## **Agradecimiento**

A mi madre y a mi hermana por estar siempre impulsándome a cumplir con esta meta, por su ayuda tanto económica como emocional. Al Ing. M. Sc. Alejandro Alberto Cruz Rengifo y al Ing. Richer Garay Montes, por sus colaboraciones con conocimientos científicos y guía en la realización del proyecto y en la presentación de este informe.

A la prestigiosa Universidad de Salamanca en España, en especial a la Dr. María Ángeles Castro Gonzáles por su deseo de colaboración.

Edith Milagros Espino Arévalo

## Índice

Dedicatoria .....	vi
Agradecimiento .....	vii
Indice .....	viii
Resumen .....	xiii
Abstract .....	xiv
Introducción .....	1
CAPÍTULO I.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	8
1.1. Antecedentes del estudio del problema.....	8
1.2. Bases teóricas.....	16
1.3. Definición de términos básicos .....	27
CAPÍTULO II .....	31
MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
2.1. Tipo y Nivel de investigación .....	31
2.2. Diseño de investigación .....	31
2.3. Población y Muestra .....	32
2.4. Métodos de investigación .....	32
2.5. Técnicas y procedimientos experimentales .....	32
2.6. Técnicas de procesamientos y análisis de datos .....	45
CAPÍTULO III.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.1. Resultados de la investigación .....	46
3.1.1. Rendimiento en la obtención del extracto etanólico. ....	46
3.1.2. Determinación de la humedad de las hojas. ....	48
3.1.3. Evaluación fitoquímica – marcha fitoquímica preliminar. ....	49
3.1.4. Cromatografía en capa fina con placa de aluminio.....	53
3.1.5. Cromatografía en capa fina con placa de vidrio. ....	55

3.1.6. <i>Cromatografía en columna.</i> .....	56
3.1.7. <i>Verificación de metabolitos secundarios por UHPLC.</i> .....	57
3.1.8. <i>Ensayo de purificación del metabolito predominante.</i> .....	67
3.2. <i>Discusión de Resultados</i> .....	72
CONCLUSIONES .....	76
RECOMENDACIONES .....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
ANEXOS.....	91

## Lista de tablas

Tabla 1: Metabolitos secundarios en CCD según la fluorescencia en luz UV sin uso de revelador.....	38
Tabla 2: Rendimiento del extracto etanólico de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	46
Tabla 3: Porcentaje de humedad de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	48
Tabla 4: Evaluación fitoquímica del extracto etanólico .....	49
Tabla 5: Determinación de solventes apropiados para la separación de metabolitos.....	53
Tabla 6: Posibles metabolitos secundarios en CCD según la fluorescencia en luz UV .....	55
Tabla 7: Resultados del ensayo de purificación del metabolito predominante .....	71

## Lista de figuras

Figura 1: <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	8
Figura 2: Hojas y frutos de la especie <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	9
Figura 3: Espectro UV del Ácido gálico .....	13
Figura 4: Espectro UV del Ácido clorogénico, ácido rosmarinico y ácido cafeico .....	14
Figura 5: Espectro UV del Dyoxamycina.....	14
Figura 6: Espectro UV de la Raponcítina y Berberina .....	15
Figura 7: Espectro UV de la Palmatina .....	15
Figura 8: Espectro UV de Harmane .....	15
Figura 9: Cromatografía en capa delgada.....	19
Figura 10: Ejemplo de cromatografía en capa delgada .....	20
Figura 11: Relación entre distancia recorrida de soluto y eluyente o relación de frente (Rf) .....	20
Figura 12: Cromatografía en columna.....	21
Figura 13: Proceso de cromatografía en columna .....	22
Figura 14: Cromatografía Líquida de Alta Resolución .....	24
Figura 15: Detector de absorbancia de un equipo HPLC .....	26
Figura 16: Cromatograma resultante del HPLC .....	26
Figura 17: Fraccionamiento del extracto etanólico para la marcha fitoquímica preliminar .....	35
Figura 18: Ejemplo de colocación de la muestra en cromatografía de capa fina con soporte de vidrio .....	39
Figura 19: Extracto etanólico de la especie vegetal <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	47
Figura 20: Placas cromatográficas del extracto etanólico de <i>Zanthoxylum fagara</i> en luz visible y en luz UV con solventes Cloroformo:EtOAc .....	54
Figura 21: Placa cromatográfica del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum</i> <i>fagara</i> en luz visible con Cloroformo:EtOAc .....	56

Figura 22: Cromatografía en columna del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum fagara</i> en luz visible con Cloroformo:EtOAc.....	57
Figura 23: Dionex UltiMate 3000. Thermo Fisher Scientific .....	58
Figura 24: Cromatograma de Ácidos fenólicos y Flavonoides de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	59
Figura 25: Espectro UV del pico #2 del Cromatograma de Ácidos fenólicos y Flavonoides de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	60
Figura 26: Cromatograma de Antraquinonas de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	62
Figura 27: Espectro UV de los picos #2 y #3 del Cromatograma de Antraquinonas de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	63
Figura 28: Cromatograma de Alcaloides de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	65
Figura 29: Espectro UV de los picos #1 y #3 del Cromatograma de Alcaloides de las hojas de <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	66
Figura 30: Purificación por CC del metabolito predominante del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	68
Figura 31: Cromatograma del Anillo 1 con su espectro UV a una longitud de onda de 270 nm del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	69
Figura 32: Cromatograma del Anillo 2 con su espectro UV a una longitud de onda de 320 nm del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	70
Figura 33: Ensayo de purificación por CCD de los anillos 1 y 2 respectivamente separados en CC del extracto etanólico de las hojas <i>Zanthoxylum fagara</i> .....	71

## Resumen

El presente estudio tiene como objetivo “Realizar la evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)” para descubrir las fuentes de sus propiedades farmacológicas. Lo que conlleva a estudiar el problema principal analizando a las hojas de la Shapilloja por diversas técnicas de análisis fitoquímico y cromatográficas para lo cual en una primera instancia se formuló la siguiente hipótesis: “El extracto etanólico de las hojas de *Zanthoxylum fagara* recolectado en el distrito de Lamas, contienen metabolitos secundarios de interés para su uso farmacológico”. En la investigación se utilizaron diversas metodologías para en estudiar el extracto etanólico de las hojas de *Zanthoxylum fagara* por medio de los ensayos de marcha fitoquímica preliminar, detección de compuestos por UHPLC y ensayos de separación, purificación del metabolito predominante por CCD y CC. De acuerdo a la naturaleza del trabajo de tesis, este es un estudio de investigación básica, de nivel descriptivo, con un diseño Cuasiexperimental y método Inductivo – Deductivo; utilizando los resultados obtenidos del desarrollo de la técnicas y procedimientos experimentales como los datos para ser analizados por las fuentes bibliográficas. Los resultados del presente trabajo evidencian la presencia de tres compuestos de ácidos fenólicos y/o flavonoides, cinco antraquinonas, cuatro alcaloides, glicósidos, leucoantocianidinas y triperpenos; por ensayo de separación y purificación se logró aislar un metabolito predominante el cual se postula ser un ácido fenólico; por las pruebas realizadas las hojas presentan un rendimiento en extracto etanólico de 7,11% sobre base seca y un porcentaje de humedad de 74,36%.

**Palabras clave:** Evaluación fitoquímica, UHPLC, *Zanthoxylum fagara*, Extracto etnólico, Metabolitos secundarios.

## Abstract

The following study aims to "Carry out the assessment phytochemistry and chromatographic profile of the Shapilloja leaves (*Zanthoxylum fagara*)" to discover the sources of their pharmacological properties. The objective leads us to study the main problem analyzing the Shapilloja leaves by various techniques of phytochemical analysis and chromatographic for which in the first instance is made the following hypothesis: "The ethanolic extract of the *Zanthoxylum fagara* leaves collected in the Lamas district, contain secondary metabolites of interest to its pharmacological use." For research it was used diverse methodologies that are based on the study of the ethanolic extract of the *Zanthoxylum fagara* leaves through rehearsals preliminary phytochemical screening, detection of compounds by UHPLC, testing of separation, purification of the predominant metabolite by the Thin-layer chromatography (TLC) and Column chromatography (CC); according to the nature of the thesis work, this is a study of basic research, of descriptive level, with a quasi-experimental design and Inductive - Deductive method; using the results obtained in the development of the experimental techniques and procedures as the data to be analyzed by the bibliographic sources. The results of this study demonstrate the presence of three compounds of phenolic acids and/or flavonoids, five anthraquinones, four alkaloids, glycosides, leucoanthocyanidins, and triperpenes; and by trial of purification 75.2 mg/g of the predominant metabolite that may be a phenolic acid; also the leaves present a performance in ethanolic extract of 7.11% and a moisture percentage of 74.36%

**Keywords:** Assessment phytochemistry, UHPLC, *Zanthoxylum fagara*, Ethanolic extract, Secondary metabolites.



## Introducción

El uso de las plantas medicinales se desarrolla casi al mismo tiempo con la aparición e historia del hombre, según Benítez (2016), se remonta a hace aproximadamente 60000 a. c. y los primeros cultivos de estas como la valeriana y la manzanilla hace unos 35000 a. c. aproximadamente, destacando miles de años después en el libro atribuido a Hipócrates del siglo VI a. c. titulado “Corpus Hippocraticum”, donde habla de los agentes medicinales como *pharmakon* según Salaverry (2012), que añade también otro alcance histórico, como el libro de farmacología de Dioscórides del año 65 d. c., llamado “De Materia Médica” que es una recopilación de alrededor de 600 plantas medicinales que fueron conocidos por los médicos de la cultura griega y cuenta con la descripción de sus propiedades.

En 1803 el farmacéutico alemán Friedrich Sertürner logró aislar por primera vez un metabolito secundario en el opio, al que llamó Morfina por sus efectos analgésicos, según lo que explica Benítez (2016), donde agrega otros grandes descubrimientos de la época en el aislamiento de principios activos como la etenina, quinina y cinchonina, estricnina y brucina, descubiertos por los químicos Pelletier & Caventou, pioneros en el estudio de alcaloides; también el aislamiento de la cafeína por Friedrich Runge, la digitalina por Nativelle y la salicina por Leroux.

El estudio de las plantas medicinales nace como disciplina científica en el tiempo en que ocurrían los descubrimientos antes mencionados, ya que en el año 1815, el alemán Aenotheus Seydler, en su tesis doctoral titulada “Analecta Pharmacognostica” nombrado por Cortez-Gallardo *et al.* (2004), menciona por primera vez a la Farmacognosia y la describe como una ciencia que se enfoca en el estudio del conocimiento completo de las drogas naturales, desde los estudios etnobotánicos, de sus principios activos y hasta las pruebas farmacológicas; Morales (1996) la define asimismo como el estudio de sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal, que pueden ser estudiadas y sustentadas con pruebas científicas, de acuerdo a ello es que esta disciplina se ve estrechamente relacionada y es considerada como la ciencia origen de la Fitoquímica, siendo esta última la que se encarga de analizar los extractos obtenidos de las plantas terapéuticas y desvelar la composición químicas de los metabolitos secundarios en dichas plantas.

En el siguiente siglo cuando se crea la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1978 en la conferencia de Alma-Ata según Albornoz (1993) y Akerele (1993) citados por Bermúdez, Oliveira-Miranda y Velásquez (2005, p. 453) se acordó por impulsar la documentación y evaluación científica de plantas que puedan ser consideradas como medicinales, logrando que algunos países de la región desarrollen programas de investigación fitoquímica. Consecuentemente a esto, los científicos e investigadores latinoamericanos crearon en 1983 la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica (SLF) preocupados por el avance de los estudios fitoquímicos (Moyna, 2002).

En nuestro país los estudios en plantas medicinales y una política por parte del estado que los promueva han sido ausentes, algunos primeros pasos que se han dado con respecto a este tema fue en el 2004 cuando se promulgó la Ley 28216, “Ley de protección al acceso a la diversidad biológica peruana y de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas; y la Ley 27811, que establece el régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas; sin embargo, no se rescata la importancia que tiene el hacer estudios fitoquímicos en las especies vegetales argumentándose que el principal problema es que no existe un inventario nacional de plantas medicinales (Salaverry, 2012).

Por otro lado, habiéndose recalado que son las universidades e investigadores que con impulso propio vienen haciendo estudios en este campo en nuestro país, se reconoce principalmente al libro de autoría peruana “Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales” de Lock (2016) como un gran aporte de guía y conocimientos en este campo, el cual trata como su mismo nombre lo dice, de explicar y describir los métodos de análisis en las plantas medicinales, procesos como la marcha fitoquímica preliminar que es explicada detalladamente, también los distintos métodos cromatográficos y espectrométricos, además de separar por capítulos las familias de metabolitos secundarios para definirlos y asignar a cada uno de ellos los métodos de identificación y separación más viables que puedan dar mejores resultados; asimismo en el libro se expone ejemplos de aplicación realizadas en distintas especies vegetales, como el de la cuantificación de alcaloides por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en la uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Wild.) DC.) en donde muestra también los resultados obtenidos, se esta forma estos métodos pueden ser reproducidos para investigar nuevas especies.

Otro aporte que resaltar de investigaciones en el Perú es el libro de Puelles *et al.* (2010), titulado “Plantas medicinales en el Perú: Etnobotánica y Viabilidad Comercial” donde en el capítulo cuatro, “Los análisis fitoquímicos en estudios etnobotánicos. Experiencias en Perú” incluye pautas o técnicas de los análisis con sus etapas fundamentales: recolección y preparación del material vegetal, marcha fitoquímica y la caracterización de los constituyentes. Además muestra los resultados de los screening fitoquímicos realizados en cinco especies de los Andes peruanos (Ortiga colorada, Llancahuasi, Ortiga blanca, Lengua de perro y la Escorzonera) contribuyendo al avance de las investigaciones en estas especies.

En el caso de los estudios fitoquímicos en nuestra Región San Martín existen algunos como el de Llontop y Rojas (2018), en el que se elaboraron extractos de las hojas de *Phthirusa robusta* Rusby conocida como “suelda con suelda”. También se puede señalar el estudio fitoquímico de las hojas de Sacha Inchi elaborado por Castillo S., Castillo V. y Reyes (2010).

Al respecto la Universidad Nacional de San Martín – T (UNSM) también ha colaborado con investigaciones como el estudio de la composición fitoquímica del extracto de cormos de la especie *Dracotum lorentense* Krowse llamado comúnmente en la zona “Jergón Sacha” desarrollado por Bocanegra (2007). Y por último en una investigación sobre la torta el Piñón Blanco (*Jatropha curcas* L.) presentado por Ruíz (2014).

Dada la importancia histórica del estudio de los principios activos en plantas medicinales para encontrar nuevas fuentes de fármacos que nos permitan luchar contra las distintas enfermedades, y que nuestra Región y País aún son carentes de los mismos, se convierte en una prioridad promover y apoyar futuras investigaciones. Con el afán de contribuir con esta necesidad el presente trabajo trata sobre el análisis fitoquímico y cromatográfico de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* llamada tradicionalmente Shapilloja.

### **Formulación del problema**

El uso de las plantas con agentes farmacológicos se está convirtiendo en una necesidad en la medicina moderna para combatir los efectos secundarios de algunas medicinas sintéticas, por lo que la investigación en este campo también está avanzando a la manera de encontrar nuevas curas para enfermedades, y mejorando la extracción y purificación de estos metabolitos para su uso. Según Bernal (2013) que cita a Camacho y Soncco (2005) las

plantas de uso medicinal son fuentes de nuevas drogas y en estos tiempos es que más se espera que muchas de ellas sean desarrolladas e investigadas a cabalidad, proyectando que quedaría hasta dos décadas en adelante para seguir haciéndolo con toda la diversidad con la que cuenta nuestro país, dependiendo también de la estrecha colaboración entre científicos. Lo que se busca es aumentar el porcentaje de su empleo ya que desde 1981 al 2000 el 61% de nuevas moléculas y medicamentos a nivel mundial son de plantas medicinales y el 60% de los medicamentos anticancerígenos tienen un origen natural (Organización Panamericana de la Salud, 2019)

Sin embargo, como lo indican Bussmann y Sharon (2015) en sus libro “Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonía”; donde hacen una recopilación de interés botánico de las plantas medicinales del Perú, en nuestro país se han estudiado el 60% de las especies vegetales dentro de las cuales existen 1400 especies descritas con valor medicinal, que no han siendo investigadas fitoquímicamente en su mayoría, es decir siendo reconocidas por sus uso común en las comunidades para tratar sus enfermedades pero no valiéndose de investigaciones científicas para conocer los metabolitos que dan origen a sus propiedades; algo que también menciona la OPS (2019) en su informe “Situación de las Plantas Medicinales en el Perú” de su reunión dada en Lima en 2018 llamada “Plantas Medicinales y Salud Pública: Pasado, Presente y Futuro” en cual se expresa que muy a pesar del amplio uso que puedan tener dentro de la población, aún se desconoce y no se aprovechan a muchas especies nativas del Perú. La poca información que se tiene de nuestras plantas medicinales hace que su identificación con certeza se haya visto imposibilitada ya que no se cuenta con un herbario Nacional que brinde esta información quitando los fallos de antiguas investigaciones como afirma la OPS (2019), a esto añadiéndole que la modernización de muchos pueblos plantea que sea urgente que se registren sus conocimientos antes de que se pierdan y el exterminio que sufren muchas especies usadas hacen que sea una prioridad su estudio químico, según Baca y Ramírez (2008) citados por Bernal (2013).

Es necesario que se preste atención a desarrollar una cadena de valor de las plantas con uso medicinal, desde un adecuado registro y protección, hasta una progreso en sus investigaciones conllevando una seguridad tanto en calidad como en su uso (OPS, 2019). El Perú tiene muchos aspectos que mejorar en la investigación de las plantas con principios activos buenos para la salud, con leyes que respalden el estudio, con financiamiento y equipos a las universidades estatales, ya que la gran mayoría de estas indagaciones son de

origen independiente y de organizaciones extranjeras; de tal manera que debemos de proteger nuestros recursos botánicos y por último incentivar e invertir en estos análisis que respondan a la necesidad de hallar fármacos de origen natural.

Luego de presentar la realidad problemática, la formulación del problema se traduce en las siguientes interrogantes:

### **Problema Principal**

¿Las hojas de la planta Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*) usada tradicionalmente por la población para combatir diversos malestares, contienen metabolitos secundarios de interés farmacológico?

### **Problemas Secundarios**

1. ¿Qué grupos químicos de metabolitos secundarios contiene el extracto etanólico de las hojas de la planta Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)?
2. ¿Cuántos metabolitos secundarios será posible identificar en el extracto etanólico de las hojas de la planta Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*)?

### **Hipótesis principal**

Las hojas de *Zanthoxylum fagara* recolectadas en el distrito de Lamas, contienen metabolitos secundarios de interés para su uso farmacológico.

### **Variables:**

- *Variable Independiente:* Extracto etanólico de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.
- *Variable Dependiente:* Metabolitos secundarios de las hojas de la *Zanthoxylum fagara*.

### **Importancia del estudio**

El estudio fitoquímico de las hojas de la planta *Zanthoxylum fagara* favorece a conocer la causa de sus propiedades medicinales y de su uso tradicional en la selva peruana como un

agente analgésico y antibacteriano, en las diferentes modalidades en las que son aprovechadas por la población. Se realizó la identificación de los subgrupos de metabolitos secundarios presentes, que se hizo utilizando el tamizaje fitoquímico y diferentes pruebas cromatográficas, dentro de estas últimas el uso del equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) que permitió la obtención de sus espectros UV por los que se pudo detectar cuántos metabolitos podrían existir dentro de los subgrupos más destacados, además se realizó un ensayo de separación y purificación del metabolito que más predominancia presenta.

Este trabajo representa un avance en el estudio de la plantas medicinales usadas en la selva peruana, y contribuye con conocimiento científico a la investigación de los principios activos que tienen efectos biológicos, brindando respuestas en la planta *Zanthoxylum fagara*, como también metodologías para este tipo de estudios y de esta forma colaborar con el avance de los estudios fitoquímicos en el Perú y la difusión de estos nuevos conocimientos.

### **Limitaciones de la Investigación**

- En la detección de metabolitos secundarios por UHPLC no se pudo identificar con exactitud la estructura química de éstos debido a la falta de un equipo de Espectrofotometría de masas.
- En el ensayo de purificación del metabolito predominante, trabajando como un aporte adicional de separación y purificación se necesitan estudios más profundos para su identificación.

### **Objetivo general**

Realizar la evaluación fitoquímica y perfil cromatográfico de las hojas de la especie vegetal Shapilloja (*Zanthoxylum fagara*).

### **Objetivos específicos**

- Evaluar fitoquímicamente al extracto etanólico de las hojas de la *Zanthoxylum fagara* para identificar los metabolitos secundarios por medio de reacciones de coloración, cromatografía de capa delgada y cromatografía en columna.

- Detectar los metabolitos secundarios de la *Zanthoxylum fagara* presentes en las hojas por medio de UHPLC.
- Determinar el rendimiento del extracto, el porcentaje de humedad de las hojas y un ensayo de separación y purificación del metabolito predominante.

La muestra utilizada son las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*; recolectadas en el Distrito de Lamas, sometidas a secado, molienda y análisis fitoquímico preliminar y de UHPLC. El diseño de investigación es Cuasiexperimental y el método de investigación es el Inductivo-Deductivo.

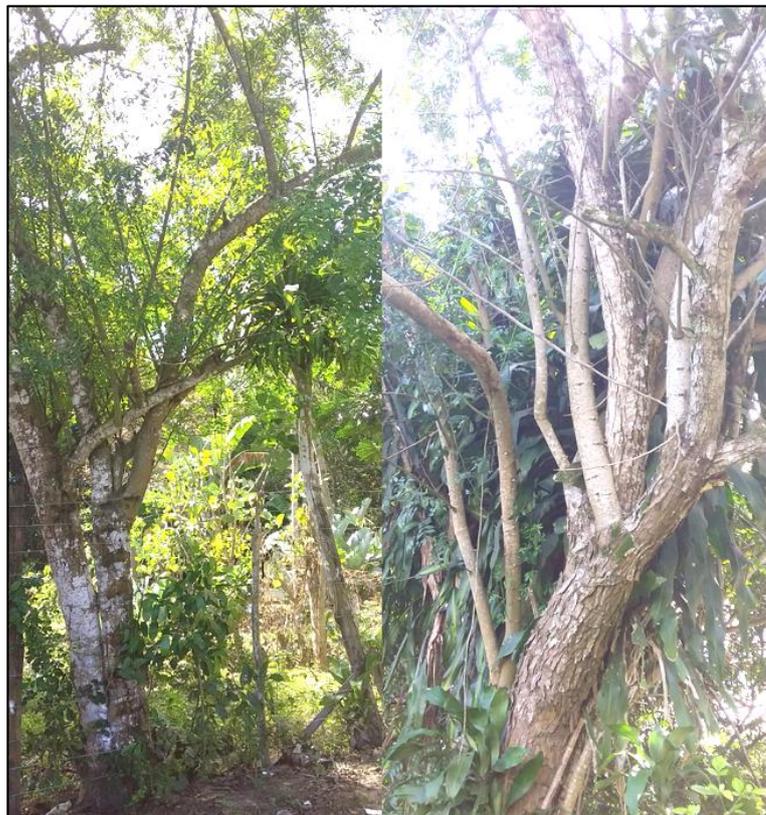
# CAPÍTULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Antecedentes del estudio del problema

*Esta sección presenta los estudios más importantes que hay sobre la planta que engloba la investigación, la *Zanthoxylum fagara*.*

Gilman (1999) describe a la planta *Zanthoxylum fagara* (Shapilloja) como un árbol con las hojas compuestas paripinadas con alas distintas a lo largo del raquis de estas; en el caso de la Shapilloja oriunda de nuestro país las hojas son color verde oscuro y cuando son aplastadas generan un olor a chinche, los tallos crecen cerca de la base del suelo y tiene espinas puntiagudas en casi toda la planta.



**Figura 1.** *Zanthoxylum fagara*. (Elaboración propia - 2019).

La taxonomía aceptada del árbol según el Jardín Botánico de Missouri, en inglés Missouri Botanical Garden (2019):

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae
- Superorden: Rosanae
- Orden: Sapindales
- Familia: Rutaceae
- Género: *Zanthoxylum*
- Nombre científico: *Zanthoxylum fagara*.



**Figura 2.** Hojas y frutos de la especie *Zanthoxylum fagara*. (Elaboración propia - 2019).

Algunos nombres comunes que se le da en nuestra Región son: limoncillo, shapilloja y shapilleja. La altura de la planta varía entre los 4 a 7 metros, su tasa de crecimiento es moderada y su contextura fina; en el caso de la *Zanthoxylum fagara* que crece en nuestra región sus hojas son lanceoladas, no mayores de 5 centímetros de longitud, perennes durante todo el año al igual que las flores que son de color amarillo, sus frutos son diminutos menores de un centímetro de diámetro, y varían de rojo a negro en el tiempo de maduración, la planta puede ser tolerante a varios tipos de suelos y resistente a temporadas de sequía además que hay plagas que limitan sus crecimiento (Gilman, 1999).

La *Zanthoxylum fagara*, comúnmente llamada Shapilloja en nuestra región, es una planta conocida por sus efectos curativos, en la “Base de datos de plantas medicinales” del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP (2010) (aunque presente un error de imprenta al citar el nombre científico de la planta objeto de estudio en este informe), menciona los usos medicinales que se le da a la Shapilloja en nuestra Amazonía, entre estos están los de digestivo; los pobladores hacen infusiones de las

hojas de la planta para combatir y aliviar sus problemas estomacales, también suelen usarlo para disminuir los efectos de la fiebre y de la gripe preparando con las hojas baños relajantes que ayudan a luchar contra estos males; otro uso común que se le dan es contra el dolor de cabeza y los mareos para ello hacen que las hojas pasen por un proceso de maceración en alcohol para así luego colocárselo en las zonas afectadas de la cabeza consiguiendo que los dolores desaparezcan; una planta milenaria que no ha sido investigada a profundidad y que significa una fuente nueva de conocimientos para la ciencia en general dándole un buen uso y aprovechamiento como recurso natural.

Como es mencionado en el párrafo anterior hay pocos estudios elaborados sobre la *Zanthoxylum fagara* que estén estrechamente relacionados a la rama de la fitoquímica, como por ejemplo Diéguez-Hurtado *et al.* (2003) con su artículo científico titulado “Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species”, con traducción “Actividad Antifúngica de algunas especies Cubanas de *Zanthoxylum*” que tuvo como objeto de estudio el extracto etanólico de la corteza de la especie y que sus resultados fueron que la Shapilloja tiene un poder antifúngico de un rango de 500 a 1000 en inhibición de hongos comunes en animales domésticos con un uso de 11 a 18 µg/disco.

Uno de ellos también es la tesis doctoral de Santiago (2011) titulada “Etude Phytochimique de Plantes Médicinales des Andes Vénézuéliennes: *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) et *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae)”, (Estudio fitoquímico de plantas medicinales de los Andes venezolanos: *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) y *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae) ), que aunque su investigación no se centre netamente en la planta en estudio cita como fuente de información algunos autores que han realizado pruebas químicas en esta, como a Dominguez, Benavides y Butruille (1974) quiénes definen a la Shapilloja como un arbusto que está ampliamente distribuido en América del Sur y en regiones tropicales del Continente pero al ser resistente a suelos áridos puede encontrarse también en regiones semidesérticas, siendo los nativos de todas estas zonas lo que usan los extractos de forma particular por sus propiedades sudoríficas, que alivian el dolor y relajantes; estudiaron fitoquímicamente a la especie, específicamente a la resina de la planta que fue colectada de dos lugares, el primero siendo Valle Alto y luego Monterrey, en dicha resina estudiada encontró la presencia de un alcaloide llamado magnoflorina muy común para el género *Zanthoxylum* según se reporta. Otros autores que cita es Kuck, Albonico, Deulofevu y Escalante (1967), quienes en su investigación

aún denominaban a la *Zanthoxylum fagara* como *Fagara pterota* (nombre que se usaba para el árbol en 1896 para luego ser modificado por el que actualmente se utiliza) y en donde encontraron, también en su resina, varios alcaloides como la candicina, la tembetarina, la magnoflorina (que ayuda a reducir la presión arterial), la *N*-metilisocoridina, la laurifolina, la chelereritrina y algunas trazas de nitidina. Años después Dreyer y Brenner (1980) que de igual forma son citados por Santiago (2011) también hallaron estos mismos alcaloides para tiempo en el cual ya se denominaba a la planta con el nombre actual *de Zanthoxylum fagara*.

Por último Santiago (2011) cita a Stermitz, Caolo y Swinehart (1980), que además encontraron skimmianina y laurifolina cuando realizaron su investigación en los extractos de baja polaridad de las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

Un estudio relacionado con los aceites esenciales que contienen las hojas de la Shapilloja fue hecho por Pino, Agüero, Marbot y Fernandes (2005) con el título de “Composition of the Essential Oil of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. from Cuba”, traducido al español “Composición del Aceite Esencial de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. de Cuba”; esta investigación es la más reciente sobre las hojas de la planta y aunque no se centre en el estudio fitoquímico de ésta la información es importante para mencionar ya que los aceites esenciales pueden jugar un rol significativo en las reacciones que producen ciertos metabolitos al ser terpenoides en su mayoría, se encontraron 37 componentes en el aceite esencial que se analizó que eran equivalentes al 90% del total de y dentro de los cuales los componentes más predominantes fueron el  $\alpha$ -bisabolol con un 11,3% terpeno que tiene efectos regenerantes, anti-inflamatorios y calmantes, y el bulnesol con un 8,7% otro terpeno conocido por ser calmante y relajante.

Por su parte Macías, Coy y Cuca (2011) realizaron un análisis a la especie *Zanthoxylum fagara* que se tituló “Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza *de Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. (Rutaceae)” donde cita algunas referencias de metabolitos secundarios hallados en la especie como por ejemplo: la sinefrina, un alcaloide conocido por ser un estimulante del sistema nervioso, descrito en la investigación sobre alcaloides y otros componentes de la planta hecho por Stermitz *et al.* (1980),

también el meridinol un lignano encontrado en la especie por Amaro-Luis *et al.* (1988) y otros dos alcaloides, la escopoletina y skimmianina descritas por Dreyer y Brenner (1980) en su estudio de algunas especies del género *Zanthoxylum* que se desarrollan en México.

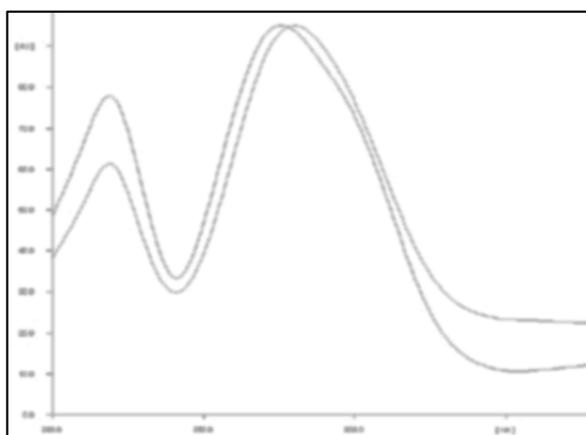
Dentro de sus pruebas realizadas, a la especie en estudio, Macías *et al.* (2011) obtuvieron un extracto alcohólico de la corteza de la *Zanthoxylum* el cual fue sometido a análisis preliminares fitoquímicos y que dio como resultado el hallazgo de varias familias de metabolitos secundarios presentes como los alcaloides, los flavonoides, taninos y terpenos. Otro resultado a rescatar es en las pruebas de actividad antioxidante que se obtuvo entre un 15 y 93% haciendo visible que la potencia de esta actividad depende de la concentración en la dosis utilizada en los ensayos con DPPH, en los ensayos con TBARS se dio resultados de un 93% y en el caso de la peroxidación inducida entre un 4 a 94%, encontrándose muy buena correlación entre los tres ensayos y lo que según la investigación se puede deber a la presencia de flavonoides en la corteza de la especie, algunos lignanos o hasta algún tipo de alcaloides. Para culminar, con el estudio de la actividad biológica antiinflamatoria se dio resultados positivos con un 45,3% y en el caso de los análisis de actividad antiproliferativa dio un porcentaje de 55,5% en inhibición contra células con Leucemia en una concentración de 20  $\mu\text{m}/\text{mL}$  con lo que se puede afirmar que el extracto de la corteza de *Zanthoxylum fagara* es un recurso valioso para la lucha contra esta enfermedad.

En el estudio titulado “Anti-inflammatory Evaluation and Phytochemical Characterization of some Plants of the *Zanthoxylum* genus” realizado por Márquez *et al.* (2005) traducido como “Evaluación Anti-inflimatoria y Caracterización Fitoquímica de algunas plantas del género *Zanthoxylum*”, se hizo estudio a varias especies de este género dentro de las cuáles una de ellas era la *Zanthoxylum fagara* de la que fue examinada el extracto alcohólico de la corteza del tallo, en lo que respecta a la caracterización fitoquímica se usó la CCD para depositar el extracto de la planta y separar por medio de los solventes de Hexano y Acetato de Etilo en una relación 2:1, se logró observar coloraciones de rojo a verde y de azul a amarillo, probablemente por constituir alcaloides, cumarinas y lignanos; y en lo que se refiere a la evaluación anti-inflamatoria indica que el extracto de la corteza de *Zanthoxylum fagara* tiene un importante poder anti-inflamatorio que puede ser útil para tratar irritaciones e inflamaciones producidas por infecciones.

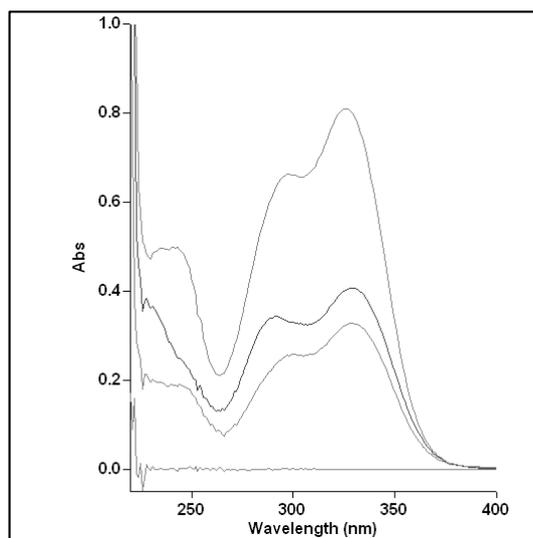
Para complementar la información en un estudio hecho por Ordaz *et al.* (2014) para recalcar el potencial de la *Zanthoxylum fagara* por ser parte del género *Zanthoxylum*, concluyó que los extractos acuosos, acetónicos y hexánicos obtenidos de las cortezas de *E. herbacea*, *Z. caribaeum* y *D. arboreus* son antibacterianos y no mutagénicos. Estas propiedades exhortan a que debe ampliarse la investigación sobre sus propiedades anti-mutagénicas. Por lo cual se observa que la puede tener la actividad antimutagénica que es común en su género.

Luego de descritas las investigaciones que se le han hecho a la *Zanthoxylum fagara* se confirma que la mayoría de éstas son en base al extracto etanólico de la corteza del tronco, no a las hojas como es en el presente estudio, se reportan también en su mayoría pruebas biológicas y análisis preliminares; además no hay anteriores tesis de la planta en nuestro país, de tal manera que este estudio busca hacer visible el potencial de esta y detectar metabolitos secundarios en las hojas por UHPLC.

A forma de complementar la información referida a anteriores investigaciones fitoquímicas se presentan los espectros UV de algunos de los metabolitos; en el caso de los Compuestos Fenólicos que correspondan a los **Ácidos Fenólicos** tenemos al Ácido gálico que se muestra en la Figura 3 que se encuentra entre los 200 a 300 nm como resultado de la investigación de Verma, Nigam, Jain, Pant y Padhi (2011) titulada “Microwave-assisted extraction of gallic acid in leaves of *Eucalyptus x hybrida* Maiden and its quantitative determination by HPTLC”, también los espectros UV del Ácido clorogénico, ácido rosmarinico y ácido cafeíco respectivamente del estudio de Vronska y Demyd (2016) sobre la hierba Melissa que se muestra en la Figura 4.

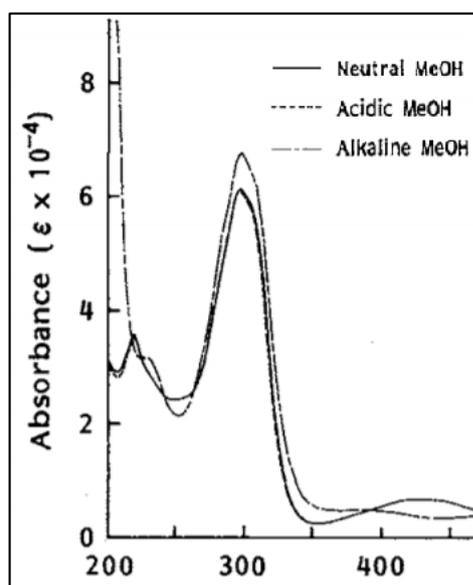


**Figura 3.** Espectro UV del Ácido gálico. Verma, Nigam, Jain, Pant y Padhi (2011).



**Figura 4.** Espectro UV del Ácido clorogénico, ácido rosmarinico y ácido cafeico respectivamente. Vronska y Demyd (2016).

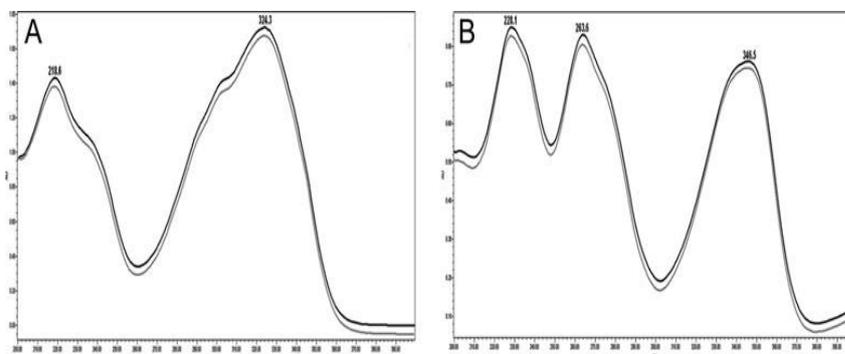
Con respecto a los compuestos o metabolitos pertenecientes a las **Antraquinonas** tenemos el espectro UV de la Dyoxamycina del estudio de Ryuichi *et al.* (1991) que es descrita como una benzo(a) antraquinona antibiotica que se puede observar en la Figura 5, con longitudes de onda entre 220-300 nm.



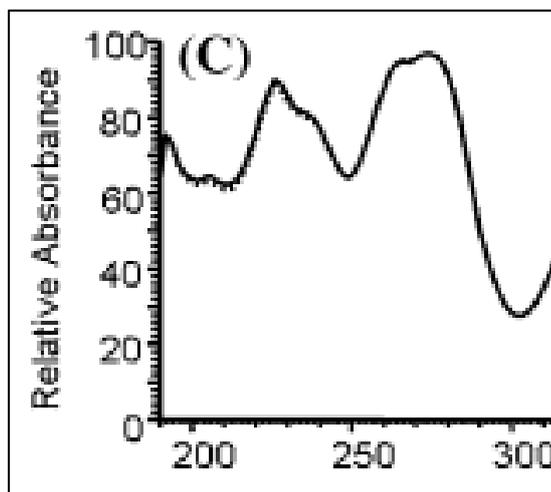
**Figura 5.** Espectro UV del Dyoxamycina. Ryuichi *et al.* (1991).

Por último, algunos espectros UV de metabolitos pertenecientes a los **Alcaloides** se pueden visualizar en la Figura 6 que pertenecen a la Raponcinitina y a la Berberina extraídas de la investigación de Poudel *et al.* (2013); también Peiying, Yufeng, Qirong, Weidong y Yiyu (2006) obtuvieron el espectro UV de la palmatina que se muestra en

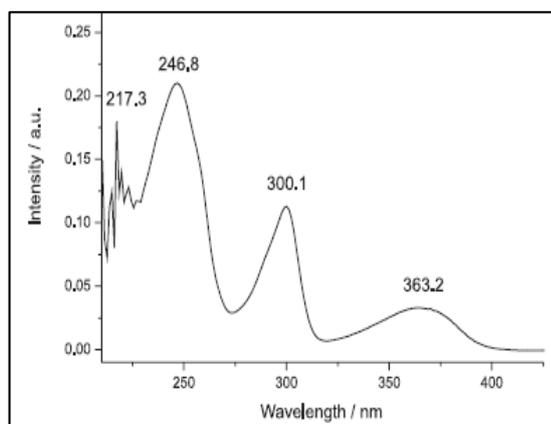
la Figura 7 y, Pereira, Rodrigues y Yariwake (2014) obtuvieron el del alcaloide Harmane que se encuentra en la Figura 8.



**Figura 6.** Espectro UV de la Raponcitina y Berberina. Poudel *et al.* (2013).



**Figura 7.** Espectro UV de la Palmatina. Peiying, Yufeng, Qirong, Weidong y Yiyu (2006).



**Figura 8.** Espectro UV de Harmane. Pereira, Rodrigues y Yariwake (2014).

## 1.2. Bases teóricas

### Evaluación Fitoquímica

El estudio o evaluación fitoquímica empieza del estudio de los principios activos de las plantas medicinales, estos principios activos son los responsables de los beneficios terapéuticos que tienen estas, el primer paso para determinar qué tipos de metabolitos secundarios son es por medio de un tamizaje fitoquímico; Pérez, Tamayo, Rojas y Jiménez (2015) afirman que la medicina moderna a través de los análisis clínicos, ha conseguido precisar la validez de aquellas plantas necesitando de profundos estudios que no solo deben estar centrados en el campo de la experimentación, sino mejorar aún más la extracción de los componentes activos purificados.

En una planta los metabolitos secundarios están distribuidos por toda la estructura o partes de esta como las flores, las hojas, el tallo (mayormente utilizando su corteza para propósitos medicinales), las raíces y los frutos; cada parte puede poseer distintos metabolitos y también muchos en común, por eso los estudios fitoquímicos se realizan de forma separada para cada parte. Esto puede deberse a distintos factores como las características del suelo, también puede depender de la época del año y de la altura sobre el nivel de mar junto con la ubicación geográfica, por este motivo se pueden investigar a la misma especie fitoquímicamente en distintas partes del mundo (Chiriboga, 2005 citado por Miño, 2007).

El tamizaje fitoquímico permite determinar de manera cualitativa los grupos químicos de metabolitos secundarios más destacados que están presentes en una planta, de esta forma partiendo de esto se puede llevar a cabo la extracción y el fraccionamiento de los extractos para luego llegar a poder aislar los principios activos. Consiste en realizar distintas extracciones con varios solventes de la parte en estudio de la planta, a partir de esto aplicar reacciones de coloración y precipitación a los extractos que permitan evidenciar la presencia de un grupo de metabolitos por cada prueba; existen diversos métodos para realizar un tamizaje fitoquímico, este puede revelar datos preliminares al mostrar los componentes químicos de la especie. Por eso es importante tomar a los resultados del screening como una orientación para

luego hacer mayores análisis que puedan confirmar su existencia y acción farmacológica. En el tamizaje fitoquímico se pueden encontrar tres tipos de reacciones de identificación de metabolitos secundarios los cuales son según Palacios, (2012):

- Coloración o precipitación: Son ensayos relativamente rápidos que se complementan entre sí y que parten de un amplio esquema que permita identificar los metabolitos presentes en el extracto de una planta, mayormente, y porque realiza mejores extracciones de los componentes más importantes, se usa el extracto alcohólico de la especie como muestra inicial para las reacciones que se sucedan y que ayuden a desvelar su composición.
- Fluorescencia: Para las reacciones de fluorescencia se utilizan longitudes del espectro ultravioleta de onda corta, produciendo colores que van desde el amarillo hasta el celeste, puede distinguir metabolitos como las cumarinas, los polifenoles y los flavonoides.
- Microsublimación: Es un ensayo que comúnmente se realiza en extractos de especies con principios activos fácilmente sublimables como suelen ser las antraquinonas y los alcaloides. Para esto es necesario encontrar el punto de fusión y generar determinadas reacciones coloreadas que sean características de los cristales formados para que se pueda identificar el metabolito.

## **La Cromatografía**

En 1906 por el botánico Ruso M. Tswett colocó un extracto de colorantes vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y observó que al agregar éter, este extracto se dividía en muchos puntos coloridos a través de la columna; descubriendo de esta manera lo que hoy se conoce como la cromatografía, término que proviene de las palabras griegas: *Chroma* que significa color y *Graphy* que significa estudio, etimológicamente significando “estudio del color” (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007; Sirad, 2012).

La cromatografía es un método físico-químico de separación de sustancias dentro de un complejo o muestra, lo que la diferencia de los demás métodos es que se utilizan y ponen en contacto dos fases inmiscibles entre sí, siendo una de estas una fase

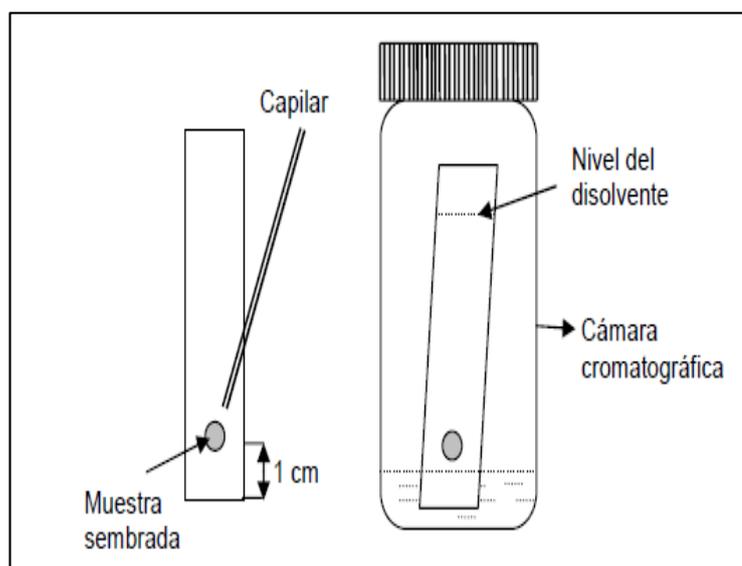
estacionaria y la otra una fase móvil, la muestra se coloca dentro de la fase estacionaria y es transportada por la fase móvil y los componentes que se encuentran en el soluto experimentan interacciones o repartos entre las fases, haciendo que los componentes se separen, cuando se finaliza el proceso se puede observar que los metabolitos emergen en orden de acuerdo a la relación de retención que tengan con la fase estacionaria, este tipo de separación aprovecha el reparto existente entre las fases y las diferentes propiedades físico-químicas que tienen los componentes de la muestra para lograr el fraccionamiento (Gomis, 2008a).

### **Cromatografía de Capa Fina o en Capa Delgada (TLC-CCD)**

En 1956 Stahl publica el primer trabajo sobre la preparación de películas adhesivas de alúmina en láminas de vidrio, en donde se depositó gotas de extractos alcohólicos de plantas y se logró hacer separaciones mucho más mejoradas de las técnicas que existían hasta esa fecha (Areal y Bessa, 1966). Al lograr separar mezclas de tinturas farmacéuticas, Stahl fue el primero que estandarizó el uso de la cromatografía en capa fina al mecanizar la elaboración de las películas de absorbente sobre el soporte de vidrio, luego de su trabajo este método se difundió y mejoró con el paso de los años, permitiendo desde la separación hasta la purificación de metabolitos secundarios (Pássaro *et. al*, 2016).

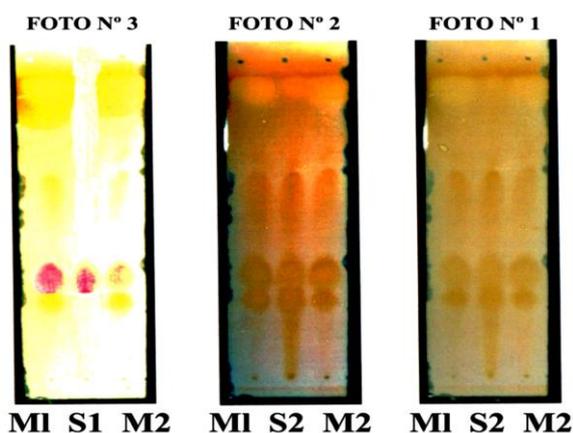
La cromatografía de capa fina, que se basa en preparar una capa fina y uniforme de un absorbente (mayormente silica gel) sobre una placa de vidrio o algún otro soporte parecido. En este tipo de método la fase móvil es líquida, en su mayoría un solvente de baja polaridad que permita la separación de los metabolitos, y la fase estacionaria es el sólido absorbente polar que retenga los metabolitos; los que lleguen a desplazarse con mayor rapidez serán los menos polares; el proceso de utilización es más simple, el tiempo es menor para que los metabolitos puedan separarse y el mismo proceso de separación es mucho mejor; otra ventaja es que se pueden usar solventes corrosivos y la fase estacionaria no se verá afectada, por todo esto es que se hace un buen método que conlleve fines analíticos. Para elegir el solvente se debe tomar en cuenta el tamaños de las partículas de la sustancia absorbente, cuando más finas son estas partículas se tiene una mayor adhesión a las placas de vidrio, pero también se puede usar un adherente (UNAM, 2007).

En la fase estacionaria se puede utilizar, la alúmina que es mucho más polar que la sílica gel por lo tanto tiene mayor capacidad de retención de componentes y por esto es mucho más utilizada para la separación de grupos químicos como hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, cetonas y aldehídos, ya que son relativamente apolares; y la sílica gel que es utilizada en sustancias mucho más polares como aminas, alcoholes y ácidos carboxílicos. En el caso de los eluyentes se muestran de forma creciente en polaridad: iniciando con el Hexano que es menos polar, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, acetona, 2-propanol, metanol y agua que es el más polar, la mayoría de solventes que se usan tienen bajos puntos de ebullición y viscosidad para que puedan moverse mucho más rápido en la fase estacionaria (Acuña, 2018).

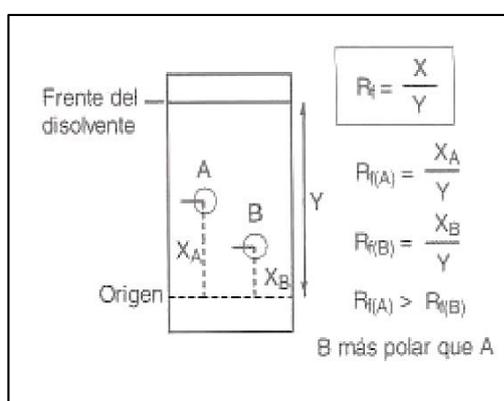


**Figura 9.** Cromatografía en capa delgada. Lamarque (2008).

En el método de separación por cromatografía de capa delgada existe una relación entre las distancias que recorre el soluto y la distancia que recorre el eluyente desde el punto de origen de la muestra en la placa, este es conocido como el  $R_f$ , que sirve para poder elegir el disolvente o la mezcla de disolventes adecuados para una disociación mejor; para calcular el  $R_f$  (Relación de Frente) se divide la distancia recorrida por el compuesto ( $x$ ) entre la distancia recorrida por el solvente ( $y$ ) es decir:  $R_f = x/y$  como se muestra en la Figura 11, un  $R_f$  adecuado se encuentra entre los valores de 0,3 a 0,5 (Acuña, 2018).



**Figura 10.** Ejemplo de cromatografía en capa delgada. Ponce, Guadalupe y Arana (2015).



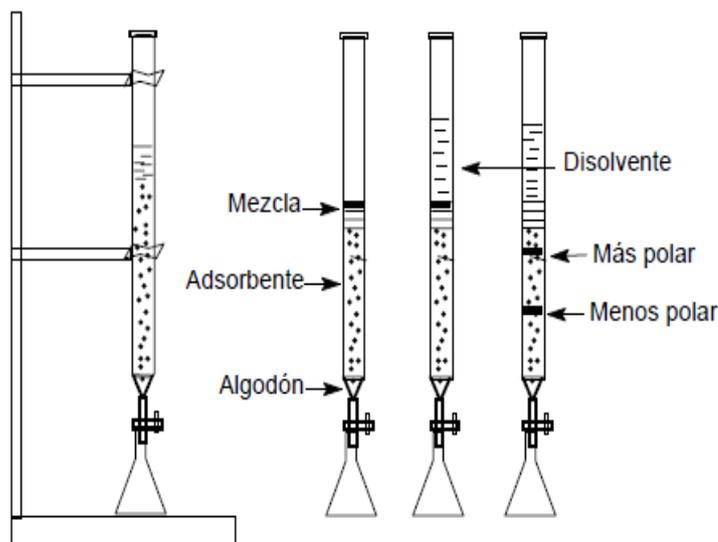
**Figura 11.** Relación entre distancia recorrida de soluto y eluyente o relación de frente (Rf). Acuña (2018).

Es muy útil para medir el grado de pureza de una muestra, ya que si existen varias manchas dentro del cromatograma significa que la muestra tiene varios componentes, por último también puede servir para obtener una medida semicuantitativa porque el tamaño de la mancha del compuesto determina cuanta concentración de esta hay en la muestra y cuantitativa porque al realizar varias separaciones y volver a recolectar la muestra para seguir un proceso de purificación con el mismo método y el mismo eluyente, una vez que esté completamente separado puede ser cuantificado (Martín-Yerga, 2010).

### **Cromatografía en Columna (CC)**

El botánico Ruso M. Tswett en 1906 fue el primero en aplicar la técnica de cromatografía en columna al mismo tiempo de descubrir la cromatografía en sí misma.

Para realizar una cromatografía en columna de tipo líquido – sólido la fase móvil es un solvente o la mezcla de solventes y la fase sólida que es depositada en una columna de vidrio que suele ser silica gel o alúmina es la que retiene e interactúa con la muestra que se quiere separar; para una cromatografía de tipo líquido – líquido, el solvente de la fase móvil debe de ser inmiscible con el solvente de la fase estacionaria que será depositado en la columna (Pássaro *et al.*, 2016).



**Figura 12.** Cromatografía en columna. Lamarque *et al.* (2008).

La cromatografía en columna se emplea principalmente para la purificación y separación de las sustancias dentro de una muestra en una escala netamente preparativa, la velocidad con la que fluye el solvente por medio de la columna se llama: velocidad de elución y su importancia radica en que muestra la efectividad con la cual se están separando los componentes de la muestra, además cuanto mayor sea la mezcla que se ha de fraccionar mayor será el tamaño de la columna por lo que se recomienda una relación de 1 en 100 entre la masa de la muestra y la masa de la fase estacionaria. Cuando se realiza el experimento es importante tomar en cuenta la velocidad de elución ya que si la velocidad de elución es muy lenta la muestra puede difundirse mucho más rápido que esta y provocará que las bandas se ensanchen y vuelvan difusas y si es muy rápido no se lograrán fraccionar bien los componentes, entonces es necesario encontrar la mezcla y proporción de solventes adecuada para una buena separación (Lamarque *et al.*, 2008).



**Figura 13.** Proceso de cromatografía en columna. Depositphotos (2018).

Para entender cómo trabaja el método de cromatografía en columna Skoog, West, Holler y Crouch (2014) explican que los componentes de la muestra se distribuyen entre las fases pero al agregar de forma continua el solvente de la fase móvil, este fuerza la elución de los componentes e través de la columna moviéndola hacia abajo donde existe una separación mayor entre fases lo que conlleva a que los metabolitos que no sean retenidos por la fase estacionaria tengan una mayor velocidad de caída por la columna, resultando que si satisfactoriamente cada soluto tenga diferentes velocidades y tiempos de retención por el solvente, se separan en diferentes bandas a lo largo de la columna; al hacer pasar la cantidad suficiente de fase móvil se logrará que cada metabolito logre llegar a la parte final de la columna empacada y ahí se podrá recolectarlos individualmente.

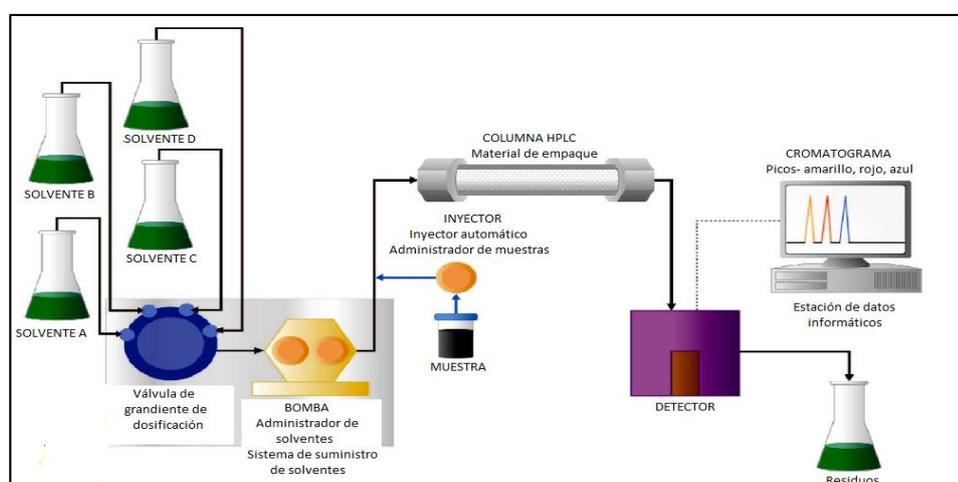
Consecuentemente a lo explicado, para obtener resultados fiables al llevar a cabo este método cromatográfico es necesario seguir ciertos pasos como: la preparación de la columna, se coloca un trozo de algodón o lana de vidrio en la parte inferior de la columna, para evitar que el absorbente se escape y se colocan tanto el absorbente como el disolvente mezclados para empaquetarla, existen varios absorbente que pueden ser

usados entre ellos la sílica gel, la alúmina, carbón activado, silicato de magnesio, celita, almidón y celulosa; la segunda parte es la siembra que consiste en colocar la muestra disuelta en un solvente sobre la parte superior de la columna y al llegar al absorbente se deposita como un disco de delgado espesor, los disolventes que más se usan solos o preferentemente en mezclas son: el éter de petróleo, hexano, ciclohexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno, éter etílico, acetona, etanol, acetato de etilo, agua, metanol y ácido acético; por último el desarrollo cromatográfico en donde la fase estacionaria es continuamente lavada por el solvente ingresando por la parte superior de la columna. Algunas ventajas que puede tener este método frente a otros es que permite colocar y separar mayores cantidades de muestra y recolectar en efecto mucha más cantidad de componentes; se puede usar cambios en solventes para aprovechar su polaridad y hacer mezclas de estos más complejas y además otra ventaja es que se hay un desplazamiento ilimitado de los solventes (Lamarque *et al.*, 2008).

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC)**

La cromatografía líquida de alta resolución se desarrolló luego de muchos años de investigación, que se sucedieron al mejoramiento y automatización de la cromatografía en columna, los científicos notaron que se podía tener una mejor eficiencia de la columna si se lograba disminuir el tamaño de las partículas del absorbente, a finales de los años 60 cuando se pudo obtener partículas del absorbente de tamaño de 3 a 10  $\mu\text{m}$  llegando a sofisticar los instrumentos, procedimientos y a usar programas computarizados para el análisis de los resultados (Gomis, 2008b). Cuando se vio que cuanto menor sea el tamaño de las partículas de la fase estacionaria se lograría una mejor separación se empezó a desarrollar y tratar de usar desde los años 2000 partículas que sean menores de 2  $\mu\text{m}$ , el problema sin embargo este tipos de columnas excedían los niveles de presión soportados por el equipo convencional, por lo que se tuvieron que diseñar nuevos instrumentos que sean capaces de soportar estas condiciones de trabajo dando como resultado la creación de la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC) que logra funcionar a presiones mayores de 400 bar y llegando a soportar hasta 1000 bar (MacNair, Lewis y Jorgenson, 1997 citados por De Zan, 2011).

Según Sirard (2012), como ya se dijo en el anterior párrafo, el HPLC es una técnica de cromatografía en columna en la que se usa un cartucho o columna que se une con un absorbente (fase estacionaria) y por el cual un líquido (fase móvil) pasa a través de la columna empaquetada, luego se inyecta una muestra disuelta (en un solvente) en la trayectoria de flujo de la fase móvil. La muestra se separa en bandas individuales de analito, ya que pasa a través de la columna de HPLC, con esto se detectan bandas de análisis y se genera un cromatograma; las bandas de analito se ven como “picos” y se pueden identificar y cuantificar, siempre y cuando se tenga conocimiento del metabolito presente y se cuente con su respectivo estándar.



**Figura 14.** Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Sirard (2012).

Para detallar la instrumentación y el proceso que realiza de un equipo de Cromatografía líquida de alta resolución que se muestra en la Figura Skoog *et al.* (2014) describen cada una de ellas:

- Recipientes para los solventes (Fase móvil): Un equipo de HPLC-UHPLC siempre cuenta con envases de vidrio que permitan contener hasta 1 L de disolvente, contienen un dispositivo para que se pueda filtrar partículas en suspensión, también se puede filtrar al vacío el disolvente por medio de un filtro de poros finos para eliminar gases y partículas antes de colocarlo en el recipiente.

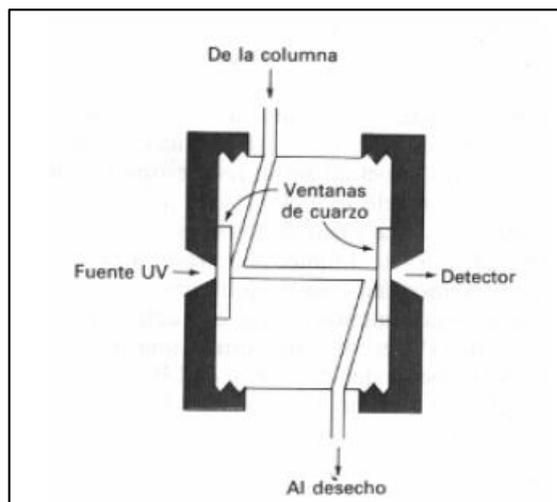
Al momento de llevar a cabo una corrida cromatográfica se debe programar el flujo del disolvente o disolventes que se ha de requerir para la prueba, si solo se usa uno o dos, el flujo puede ser constante y la cantidad de solventes se mantendrá

en todo el ensayo a esto se le llama elución isocrática; en cambio sí se usa entre dos o más disolventes y la cantidad de estos varían cada cierto tiempo de forma programada en el flujo de la prueba se le suele llamar elución en gradiente, este tipo de flujo suele mejorar en gran medida la separación de los analitos.

- Sistemas de bombeo: las bombas para los sistemas HPLC-UHPLC requieren poder soportar principalmente a altas presiones de hasta 400 bar en el caso del HPLC o mayores hasta 1000 bar en el caso del UHPLC, pulsos con libre salida, un flujo a velocidades que comprendan de 0.1 hasta 10 mL/min y que cuente con resistencia a la corrosión por distintos tipos de solventes.
- Sistemas de inyección de muestras: en el equipo se encuentra un dispositivo que está integrado basado en el asa de muestras, hoy se usan sistemas de muestreo automatizado en el HPLC-UHPLC que cuentan con un inyector automático.
- Columnas para HPLC: suelen estar hechas de tubería de acero inoxidable pero existen muchas variedades de columnas cromatográficas para el equipo, con tuberías hechas de vidrio o de polímeros (polieteretercetona o PEEK) o con doble recubrimiento primero con acero inoxidable y luego con vidrio o polímeros. Existen columnas del tipo: columnas analíticas, las que más se utilizan miden de 10 a 15 cm de largo y un diámetro interno de 5  $\mu\text{m}$  que generan hasta 70 mil platos/m, un plato es la medida adimensional del número de veces que el analito pasa entre las fases a través de su recorrido en la columna según Gomis (2008a); el otro tipo de columnas son las precolumnas, la primera llamada precolumna de desperdicios y la segunda llamada precolumna de protección.

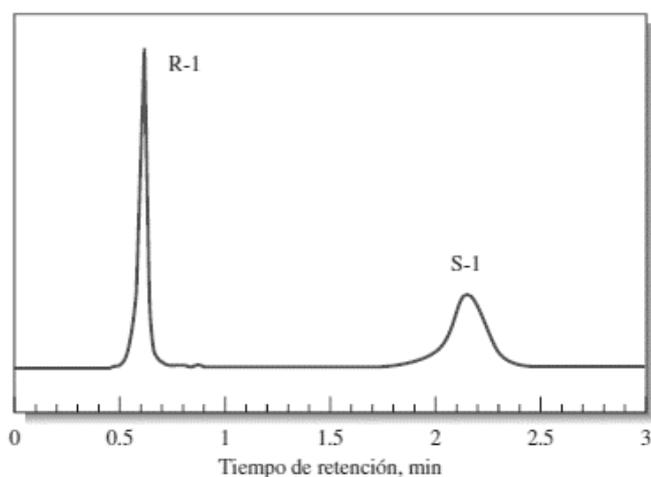
El equipo actualmente suele llevar un termostato para controlar la temperatura de trabajo de la columna esto ayuda en que se logren mejores cromatogramas y que sean más reproducibles al mantener una temperatura constante, estos suelen poder llegar hasta 150 °C.

- Detectores: el detector que se ha de usar depende de la naturaleza de la muestra que se va a analizar, porque no existe un detector universal, su nivel de volumen muerto debe ser bajo para controlar el ancho del pico, además para que el flujo se acople bien debe ser pequeño (Gomis, 2008b).



**Figura 15.** Detector de absorción de un equipo HPLC. Gomis (2008b).

Entre los diferentes detectores que se usan están: el detector de absorción, de este se puede encontrar de absorción ultravioleta con filtros con detectores de luz UV mayormente usada en 254 nm, de absorción ultravioleta con monocromadores que consiste en un espectrofotómetro de barrido donde se pueden elegir varias longitudes de onda para cada pico, y el de absorción en el infrarrojo; otro detector es el detector de fluorescencia donde la fluorescencia se revela por un detector fotoeléctrico; el detector de índice de refracción este mide la diferencia de índice de refracción entre la fase móvil y el efluente; detector de dispersión de luz que funciona con todos los compuestos no volátiles; por último el detector electroquímico divide los metabolitos por medio de cuatro métodos como la amperometría, voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría (Gomis, 2008b).



**Figura 16.** Cromatograma resultante del HPLC. Skoog, West, Holler y Crouch (2014).

Como resultado de un análisis por HPLC-UHPLC se distinguen tres tipos de datos obtenidos en un cromatograma: los datos de orden cero los que presentan solo el valor del área bajo la curva y la altura del pico del componente que se quiere estudiar; los datos de primer orden en este caso se muestra el cromatograma del analito obtenido a una fija longitud de onda; y los datos de segundo orden cuando se usan detectores DAD, DF-BR o MS con los que se registran datos de absorción, de emisión o de masa por el tiempo, o también cuando se generan cromatogramas bidimensionales (Booksh y Kowalski, 1994; Escandar *et. al*, 2007 citados por De Zan, 2011).

La técnica de separación dada por el sistema de HPLC-UHPLC es la más utilizada, la razón de esto es su gran sensibilidad y que se puede adaptar fácilmente a técnicas de determinaciones cuantitativas, además que separa eficientemente muestras no volátiles y que tiene gran aplicación para compuestos de interés industrial y en bastos campos de la ciencia como las proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, drogas, distintos metabolitos secundarios y sustancias inorgánicas (Gomis, 2008b).

### 1.3. Definición de términos básicos

**Aislamiento de componentes:** Es el proceso por el cual se busca desagregar cada una de los componentes químicos presentes en una muestra o extracto para su análisis, el método más usado para el aislamiento de analitos en fitoquímica es la cromatografía (López, Triana, Pérez y Torres, 2005).

**Columna cromatográfica:** Es un instrumento en forma tubular con orificios de entrada y salida usado en la cromatografía que puede estar hecho de vidrio, polímeros, acero inoxidable o una mezcla de estos materiales, dependiendo también de tipo de cromatografía que se llevará a cabo; la columna es la responsable de llevar en su interior la fase estacionaria y permitir fluir la fase móvil separando los analitos (Skoog *et al.*, 2014).

**Cromatografía:** Etimológicamente se define como “estudio del color” ya que proviene de las palabras griegas *Chroma* y *Graphy* que significan color y estudio respectivamente; en la ciencia es un método físico químico para separar o aislar

sustancias de una muestra con el uso de dos fases (fase móvil y fase estacionaria) que no pueden mezclarse (Sirad, 2012; Gomis, 2008a).

**Cromatograma:** Es la representación gráfica bidimensional dada por el detector de los resultados de una corrida o separación cromatográfica en los que se van generando los picos cromatográficos, los ejes en el gráfico significan la concentración del analito frente al tiempo (Bhanot, 2013).

**Espectro UV-VIS de un componente:** es un gráfico que presenta la relación entre la absorbancia frente a la longitud de onda ultravioleta o visible por medio de una función matemática entre ambos, cada metabolito tiene un único espectro UV-VIS que lo distingue de los demás (Pérez, 2008; Gamboa, 1991).

**Estudio fitoquímico:** es el estudio que “determina la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos” (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009, p. 162).

**Extracción fitoquímica:** es la técnica más común para obtener los principios activos de una planta y su finalidad es llegar a la separación de los metabolitos secundarios (materia soluble) de los tejidos vegetales (materia insoluble) por efecto de un disolvente (Flores-Morales, Castañeda, Montiel y Hernández, 2014).

**Fase estacionaria:** parte inmóvil que puede ser un sólido o un líquido donde se coloca la muestra que será desplazada y se fraccionará generando bandas y reteniendo a los metabolitos hasta ser eluidos y detectados (Pássaro *et al.*, 2016).

**Fase móvil:** es el estado o parte del método cromatográfico que arrastra los componentes de la muestra, puede ser un líquido o un gas que hará el recorrido por la fase estacionaria (Pássaro *et al.*, 2016).

**Fitoquímica:** es la ciencia que estudia los componentes químicos presentes en una especie vegetal con el objetivo de aislar, analizar, purificar, elucidar sus estructura y caracterizar sus actividad biológica (Flores-Morales *et al.*, 2014; Ambientum, 2019).

**HPLC - UHPLC:** son técnicas modernas de separación de componentes por cromatografía líquida en columna, los equipos cuentan con columnas rellenas de una fase estacionaria con partículas muy finas volviendo al sistema muy eficiente y los cromatogramas son los resultados que se originan gracias a los detectores que poseen; el UHPLC cuenta con una estructura de bombeo capaz de resistir a altas presiones ayudando que el proceso sea mucho más rápido y eficiente (Sirad, 2012; Stevan, 2013).

**Línea base cromatográfica:** “es la parte del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando solamente sale fase móvil de la columna” (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas afines, 2014).

**Longitud de onda:** una onda es una perturbación o alteración que se propaga desde el punto en que se originó hacia el medio que lo rodea, por lo tanto la longitud de una onda es la medida del periodo de espacio que existe entre cada curva de la onda y se designa con el símbolo  $\lambda$  (Medina, 2009).

**Mancha cromatográfica:** lugar de la fase estacionaria, después de haber realizado la CCD, que representa cada compuesto de la muestra (Stevan, 2013).

**Metabolito secundario:** se denominan a la amplia variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en los procesos primarios del desarrollo de una planta (fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes y otros) sino con su medio ecológico y se dividen en tres clases principales: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

**Pico cromatográfico:** es la respuesta del detector al analito separado que eluye de la columna y se muestra en el cromatograma como una curva (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas afines, 2014).

**Planta medicinal:** son aquellas especies vegetales que “contienen en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales” (Cosme, 2008, p. 23).

**Polaridad de la moléculas:** consiste en la capacidad de una molécula para realizar interacciones intermoleculares de forma equilibrada como consecuencia de la distribución irregular de las cargas eléctricas de sus átomos (Estivill, 2012).

**Principio activo:** es toda aquella sustancia química o mezcla de sustancias químicas semejantes, de origen natural o sintético, que poseen un efecto farmacológico propio y suele ser usado como medicamento (Decreto N° 150/1992, 1992, art. 1).

**Tiempo de retención:** es el tiempo que tarda un analito o componente en salir de la columna cromatográfica y ser captada por el detector luego de ser ingresada al sistema de separación, suele representarse como  $t_R$  y suele ser un parámetro característico para cada metabolito pero no suficiente para una identificación (Lancelotti, 2007).

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1. Tipo y Nivel de investigación**

El tipo de investigación de este estudio es la investigación básica, ya que por medio del uso de distintas metodologías validadas y anteriormente empleadas en el campo de la fitoquímica se busca obtener y recopilar mayor información sobre los metabolitos secundarios que podrían ser responsables de las propiedades medicinales de la *Zanthoxylum fagara* para así contruir una base de conocimiento sobre la especie.

El nivel de investigación que responde a las cualidades del presente estudio es el nivel Descriptivo, debido a que busca caracterizar el extracto de las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*, es decir que busca identificar las familias de metabolitos secundarios que puedan estar estrechamente relacionados a sus propiedades curativas.

#### **2.2. Diseño de investigación**

El diseño de investigación del presente estudio es el Cuasiexperimental, que como explica Segura (2003), es una derivación de los experimentales, se le denomina cuasiexperimental porque es un estudio donde no se puede tener control absoluto de la variable dependiente, pero se puede aplicar diversos tratamientos a la independiente para llegar a los resultados que busca el experimento, siendo el caso esta investigación donde se usó el extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara* como variable independiente o muestra y se le aplicaron distintos métodos de estudios fitoquímicos y cromatográficos para determinar cuáles son los metabolitos secundarios presentes.

Las distintas metodologías que se utilizaron fueron obtenidas de trabajos validados realizados por otros autores que han usado técnicas eficientes para determinar los metabolitos principales en diversas muestras, luego se analizaron los resultados de los experimentos por los programas informáticos Chromeleon versión 7 y Excel si eran necesarios, el primero siendo usado para los procedimientos en el HPLC con la elaboración de los cromatogramas y los espectros UV, y el segundo para el análisis de resultados para determinar el rendimiento del extracto y el porcentaje de humedad de las hojas.

### **2.3. Población y Muestra**

#### **Población**

Está constituida por la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*, que se encuentra ubicada en el Distrito de Lamas, Provincia de Lamas y Departamento de San Martín.

#### **Muestra**

Las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara* que fueron recolectadas en el Distrito de Lamas.

### **2.4. Métodos de investigación**

El método empleado en este trabajo es el Inductivo – Deductivo; según lo que expresan Rodríguez y Pérez (2017), puede ser inductivo porque parte de conocimientos particulares, el uso medicinal que le dan los pobladores de la Amazonía a las hojas de la *Zanthoxylum fagara*, a un conocimiento más profundo y general de cuáles son los subgrupos de metabolitos secundarios que pueden ser responsables de estas propiedades, y deductivo porque partiendo de la conclusión de cuáles son estos metabolitos, se busca el grupo más representativo para la medición de su concentración y el aislamiento de uno de ellos.

### **2.5. Técnicas y procedimientos experimentales**

#### **Secado del material vegetal**

Las hojas de *Zanthoxylum fagara* fueron seleccionadas y pesadas para luego ser secadas en una estufa de aire forzado a una temperatura media de 50°C por aproximadamente 24 horas para luego ser molidas y pesadas nuevamente. Estas hojas ya secas y molidas fueron guardadas en bolsas con cierre zipper y se almacenaron en una campana de desecación para evitar el paso de humedad.

#### **Obtención del extracto etanólico**

Las hojas fueron sometidas a un proceso de extracción por maceración con etanol a 80 °GL a una temperatura ambiente por una semana en un recipiente de vidrio bien cerrado, con una proporción de 1:5 entre el peso de las hojas molidas y el volumen del

alcohol etílico, fue colocado en un lugar con poca incidencia de luz y agitado diariamente por 20 min.

Una vez terminado el tiempo de maceración la solución etanólica fue separada de los restos de hojas y luego, para eliminar cualquier resto sólido, fue filtrada con papel de filtro. Este extracto obtenido se concentró a vacío en un rotavapor Buchi R-134 de 50 a 55°C hasta lograr la evaporación casi total del alcohol, por último para terminar de evaporar el solvente se colocó el extracto en una estufa a 50°C por un día siendo pesada posteriormente. El extracto fue conservado en refrigeración, en envases ámbar, a 8 °C aproximadamente, con la finalidad de ser usado en posteriores análisis cromatográficos y espectrofotométricos. El rendimiento en la obtención del extracto se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto}}{\text{peso inicial de hojas frescas}} \times 100$$

#### **Clarificación del extracto etanólico**

Obtenido el extracto, a una parte de este se lo sometió a un proceso de aclaración con Subacetato de plomo con la finalidad de precipitar la clorofila, se usó 10% de la sustancia con respecto al peso de la muestra que se quería clarificar, siendo agitado por una hora, sometido a reposo hasta la precipitación (1 h aprox.) y por último ser filtrado en papel de filtro. Fue conservado en refrigeración, en envases ámbar, a 8 °C aproximadamente, con la finalidad de ser usado en posteriores análisis cromatográficos.

#### **Determinación de humedad de las hojas**

Para la determinación de humedad de las hojas de la *Zanthoxylum fagara* se usó el método de la estufa de aire dada por IDAL (2011) con ciertas modificaciones, se recolectaron y seleccionaron hojas de la planta y se colocaron las muestras de hojas en placas Petri (ya pesadas) en una cantidad de 10 gr aproximadamente por placa, para luego ponerlas en la estufa a 105°C, se dejaron a temperatura constante por un lapso de 24 horas con el fin de eliminar todo el agua de las hojas, una vez terminado el

secado, se dejó enfriar por 3 min en una campana de desecación y por último fue pesada cada muestra. La fórmula para la determinación de la humedad es:

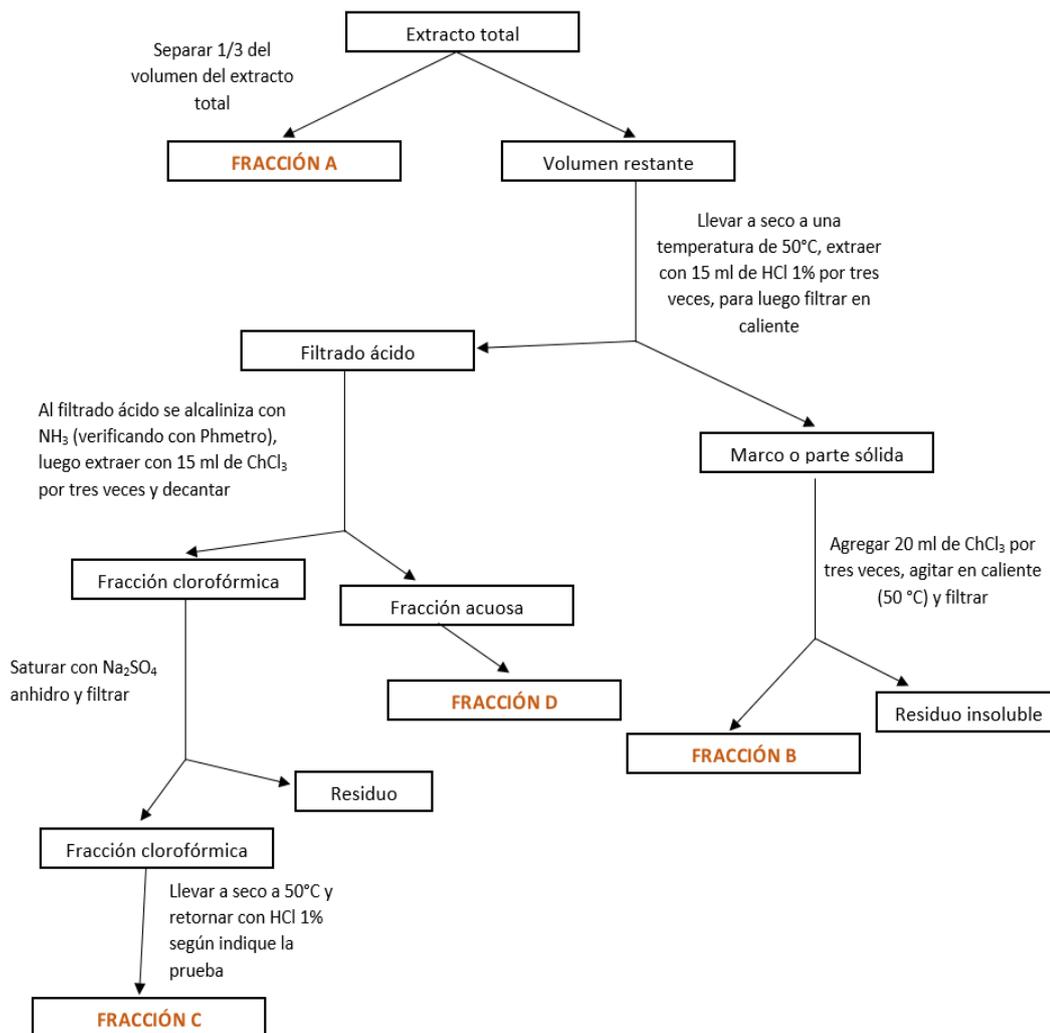
$$\text{Humedad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

### **Estudio fitoquímico – marcha o caracterización fitoquímica preliminar**

Para realizar la caracterización fitoquímica de las hojas de *Zanthoxylum fagara* se tomó como base la metodología impuesta por Lock (2016) con algunas modificaciones fundadas en Ardoino, Boeris y Toso (2013). De las hojas secas de la planta se pesaron 50 gr y se le añadió 300 ml de alcohol a 96 °GL dentro de un matraz de vidrio que fue cerrado para poder agitar el mezcla, luego se llevó a una estufa de incubación a 60°C por 2 horas y media y se filtró en caliente, descartándose la parte sólida y trabajando en los análisis con el extracto total. Luego se procede a sacar cuatro fracciones del extracto total siguiendo el procedimiento de la Figura 17, para cada reacción se realizó tres repeticiones.

#### **- Reacciones directas**

Algunas reacciones directas se pueden realizar sobre el material vegetal; en el caso de este estudio se realizó la de identificación de Saponinas en donde se procedió a calentar en baño María 0,5 gr de hojas secas molidas con 8 ml de agua destilada por 30 minutos. Luego se filtró en caliente, se tomó 1 ml de la solución y se la colocó en un tubo de ensayo, procediendo a tapar con el dedo y se agitó fuertemente por un periodo de tiempo de 15 segundos, se observó si hubo producción de espuma a los 0, a los 5 y a los 15 min de agitación.



**Figura 17.** Fraccionamiento del extracto etanólico para la marcha fitoquímica preliminar. Elaboración propia (2019).

#### - Reacciones en la Fracción A

**Flavonoides:** Por la Reacción de Shinoda, tomó 0,5 ml de la Fracción A y se agregó una granalla de Mg (puede ser de Zn también) más 0,2 ml de HCl concentrado. Se esperó la disolución total de la granalla de Mg y se agregó 0,2 ml de alcohol amílico más 2 ml de agua destilada. Se debía observar la aparición de coloración marrón, pardo rojiza o rosada en la fase orgánica para confirmar la presencia de flavonoides.

**Taninos:** Se utiliza la Reacción con Gelatina, se llevó a seco 3 ml de la Fracción A calentando a baño María. El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada

y se le agregó 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 2%. La presencia de turbidez o precipitado significaba la existencia de taninos en la muestra.

OH fenólicos: Por medio de la Reacción de Cloruro Férrico, se llevó a seco 3 ml de la Fracción A en baño María. El residuo seco se disolvió en 1 ml de agua destilada y se le agregaron 3 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1% acuoso. El color podría variar de acuerdo a la posición de los oxhidrilos fenólicos: amarillo indica la presencia de 1 -OH, verde grisácea 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Lípidos: Se sembró unas gotas de la Fracción A en un pedazo de papel filtro y se dejó secar. Se expuso a vapores de  $\text{I}_2$ , si se observaba la presencia de coloración marrón - naranja indicaba la presencia de lípidos.

Glicósidos: La Reacción con Fenol se realizó llevando a seco 2 ml de la Fracción A y se retomó con 2 ml de agua destilada, se adicionó 0.5 ml de una solución acuosa de fenol al 5% y 2,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, para confirmar su presencia se debía observar la formación de una coloración naranja - pardo.

#### - Reacciones en la Fracción B

Núcleos esteroidales y triterpenos: Se obtuvo por medio de la Reacción de Liebermann - Burchard, se mezcló con cuidado 1,8 ml de anhídrido acético con 0,2 ml de ácido sulfúrico para tener el reactivo, luego se tomó 0,2 ml de la Fracción B y agregar 0,2 ml del reactivo ya hecho de Liebermann - Burchard. Se pudo observar la formación de una coloración verde oscura que al agregar el reactivo pasa a negra, si al final se formaba un color azul verdoso indicaba presencia de esteroides pero si se formaba la coloración rosada a púrpura evidenciaba al grupo triterpeno.

Antraquinonas: Utilizando la Reacción de Borntrager directa, se agitó suavemente 3 ml de la Fracción B con 5 ml de NaOH al 5% y se observó la coloración que se formaba, si bien se mostraba un color rojizo o amarilla con fluorescencia roja en la fase acuosa se indicaba la presencia de antraquinonas.

- Reacciones en la Fracción C

Alcaloides: Para la realización de esta prueba por la Reacción de Dragendorff se disolvió 8 gr de subnitrato de bismuto en 20 ml de HNO<sub>3</sub> al 30%, colocándola luego en una que contiene 22,7 gr de KI en 20 ml de agua, se decantó y separó el KNO<sub>3</sub> y se diluyó a 100 ml. Con el reactivo ya preparado se tomó 0,2 ml de la Fracción C, se llevó a sequedad y se retomó con 2 ml de HCl 1% agregando 2 gotas del reactivo. La aparición de un precipitado pardo naranja indicaba la presencia de alcaloides.

Leucoantocianidinas: Por la Reacción de Rosenheim, se llevaron a seco 2 ml de la Fracción C y se retornan con ese mismo volumen de HCl al 1%. Se le agregó luego 1 ml de HCl concentrado, se mezcló y calentó en baño María durante 10 minutos, un vez enfriado se le adiciona unas gotas de alcohol amílico, y se agitó suavemente. Al finalizar se observó el color en la fase amílica, si era de un color carmesí a rosa pálido indicaba la presencia de leucoantocianidinas.

- Reacciones en la Fracción D

Proteínas y péptidos: Se usó la Reacción de Biuret, preparando el reactivo mezclando en partes iguales una solución acuosa de CuSO<sub>2</sub> al 0,25% y una de NaOH al 10%. Luego, se tomó 2 ml de la Fracción D y se agregó 2 ml del reactivo de Biuret, se dejó reposar de 10 a 15 minutos y se observó si había formación de coloración violeta – púrpura o violeta – rosada.

### **Cromatografía en capa delgada con placa de aluminio**

Se procedió a realizar al extracto etanólico de la *Zanthoxylum fagara* un proceso de separación por cromatografía de capa delgada con soporte de placa de aluminio, siguiendo parte de la metodología usada por Bravo y Acuña (2015) se realizó lo siguiente:

Preparación de la muestra: Se usó 5 mg aproximadamente del extracto etanólico y se disolvió en 1,5 ml de Metanol en grado reactivo y se guardó en dos viales del mismo volumen.

Procedimiento: Utilizando placas de aluminio recubiertas con silica gel de 20 cm x 20 cm se recortó placas de 1 cm x 10 cm, se marcó con lápiz a 1 cm del extremo inferior y 0,5 cm del extremo superior. Los distintos solventes que se usaron fueron: cloroformo, metanol, acetato de etilo, tolueno y acetona; estos se usaron en diferentes proporciones y mezclas binarias (5:5, 3:7, 2:8, 1:9 y 4:6) que completaran 3 ml y fueron colocados en las cámaras cromatográficas que se cerraron para permitir la impregnación con los vapores de la fase móvil. Las muestras preparadas fueron absorbidas en pequeños tubos capilares de 1 mm de diámetro y al momento de ser sembrada sobre la placa en la línea trazada a 1 cm del borde inferior se depositaron de 3 a 5 gotas del extracto se permitió que la silica gel absorbiera la muestra y luego se colocó la placa preparada en el interior de la cámara cromatográfica y se esperó para el solvente recorra hasta la línea superior; luego se sacó la placa de la cámara y se esperó que se secase, se cubrió con una cinta traslúcida para impedir el daño de la placa, se observó si a simple vista había separación de metabolitos dispersos en diferentes puntos y luego de expuso a la luz de una lámpara UV para la mejor visualización de los metabolitos comparando su fluorescencia con las literatura dada por Lock (2016) y Seminario (2017) como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Metabolitos secundarios en CCD según la fluorescencia en luz UV sin uso de revelador*

Grupos	Coloración	Subgrupos de Metabolitos
Compuestos fenólicos	Púrpura, celeste fluorescente, amarillo o naranja fluorescente	Ácidos Fenólicos, Flavonoides: Flavonas, Flavanonas y Flavonoles
	Verde, púrpura o azul	Quinonas
	Fluorescencia púrpura, celeste y amarillo opaco	Cumarinas
Terpenoides y esteroides	Púrpura o morado	Terpenoides
Alcaloides	Fluorescencia azul, verde azulado y fluorescencia amarilla	Alcaloides

Fuente: Lock (2016) y Seminario (2017).

### Cromatografía en capa delgada con placa de vidrio

Basándose y adecuando la metodología presentada por Solis y Cañedo (2018), se procedió a realizar pruebas de separación y purificación de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* valiéndose del siguiente proceso:

Preparación de la muestra: Tomando como muestras el extracto etanólico, se usó 5 mg aproximadamente y se disolvió en 1,5 ml de Metanol en grado reactivo y se guardó en viales del mismo volumen.

Preparación de las placas: Se utilizó como soporte de la fase estacionaria placas de vidrio de 10 cm x 5 cm las cuales antes de ser usado para el experimento se lavaron con agua destilada y se secaron a 105°C por 1 hora, luego dejándose enfriar en una campana de desecación. Se prepara una pasta compuesta por Silica gel 60 F<sub>254</sub> de diámetro de partículas entre 0,063 – 0,200 mm (40 gr aproximadamente para seis placas con esas dimensiones) y 12% en peso de yeso previamente tamizado a 106 µm a la cual se le agregó agua en una proporción de 1:2 respectivamente. Una vez preparada la mezcla se agarran las placas por los bordes y se sumergen en esta, buscando que toda la placa quede impregnada de la mezcla y se forme una capa fina y homogénea, luego colocando con cuidado las placas en una superficie se dejó secar al aire por unos minutos y después se pusieron a secar en una estufa a 100°C por 1 hora, posteriormente se dejaron enfriar las placas en una campana de desecación por unos 10 min.



Figura 18. Ejemplo de colocación de la muestra en cromatografía de capa fina con soporte de vidrio. Elaboración propia (2019).

Procedimiento: Se deposita la fase móvil cloroformo: acetato de etilo en proporción 9:1 en una mezcla de 8 ml dentro de la cubeta o cámara cromatográfica se deja reposar por unos 10 min para permitir que se sature con los vapores de los solventes. Lo siguiente fue el sembrado de la muestra del extracto etanólico de Shapilloja en las placas ya preparadas con una distancia de 1cm del borde colocando tres puntos de muestras en el ancho de la placa con una separación de 1 cm entre ellas como se muestra en la Figura 18, por último se coloca con cuidado la placa dentro de la cámara y se deja correr el solvente hasta cerca del borde superior en un tiempo aproximado de 30 min, luego se retira la placa y se deja secar al aire observando la separación de los metabolitos visibles y si es necesario con la ayuda de luz UV.

### **Cromatografía en columna**

Para el procedimiento de cromatografía en columna se realizaron los siguientes procesos:

Preparación de la muestra: Se usaron las muestras del extracto etanólico, se tomaron 10 mg aproximadamente y se disolvió en 6 ml de metanol en grado reactivo y se guardó en un tubo de ensayo debidamente cerrado.

Preparación de la columna: Se utilizó una columna cromatográfica de aproximadamente 50 ml que se lavó con agua destilada y se puso a secar a 105°C por 1 hora para luego dejar enfriar al ambiente, una vez seca se colocó por dentro hasta la base de salida del eluyente un pedazo de algodón y luego 20 gr de Silica gel 60 F<sub>254</sub> de diámetro de partícula entre 0,063 – 0,200 mm, es necesario agitar y compactar bien el polvo de la fase estacionaria para que en el proceso no se generen grietas que puedan influir en el resultado de la cromatografía; para empaquetar la columna se adicionó la mezcla de solventes Cloroformo:Acetato de Etilo en proporciones 8:2 en una prueba y 9:1 en otra.

Procedimiento: La columna empaquetada se coloca la muestra del extracto en la parte superior, justo cuando el volumen la fase móvil llega al inicio en la parte superior de la fase estacionaria, para evitar que la columna se quede seca ya que es un proceso continuo; después, se deja que la muestra sea absorbida por la fase estacionaria y una

vez se dé esto se agrega constantemente volúmenes de la mezcla de los solventes, observándose qué componentes son arrastrados por la fase móvil separando los analitos de la muestra creándose un anillo por cada uno. Estos metabolitos separados se recolectaron en para luego pasar análisis por UHPLC.

### **Detección de metabolitos secundarios por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC)**

Al haberse identificado por la marcha fitoquímica preliminar los grupos de metabolitos más predominantes en el extracto etanólico de las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara* se realizó los siguientes procedimientos para su detección por UHPLC:

- Protocolo de Ácidos Fenólicos y Flavonoides por UHPLC

Tomando como referencia para la detección de compuestos fenólicos y flavonoides por UHPLC se siguió los principios de la metodología utilizada por Vela (2017) que explica a continuación.

Preparación de la muestra: Tomando 1 gr de hojas secas y molidas de la especie *Zanthoxylum fagara* se le adiciona 20 ml de una solución compuesta por agua destilada, metanol y ácido acético en una proporción de 54:45:1 v/v/v respectivamente, luego se somete a agitación por 30 minutos, el sobrenadante fue colocado en tubos Falcon de 20 ml para someterlos a centrifugación por 20 minutos a 5000 RPM, los sobrenadantes resultantes se colocaron en frascos ámbar y se refrigeraron a -26°C. Los extractos fueron filtrados con filtros para jeringas de poliéstersulfona (PES) de 0,25 µm y colocados en tres viales de 1,5 ml para ser sometidos a la corrida cromatográfica.

Condiciones cromatográficas: Se empleó un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3000 with XRS autosampler and UV-DAD detector; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA., una columna C18 150 x 4,6mm, 5 µm x 100 Å y se trabajó a una temperatura de columna de 40°C y volumen de inyección de 10 µl, la fase móvil fue 100% de Metanol grado HPLC (A) y Ácido Fórmico al 1% en agua ultra pura (B), las soluciones fueron previamente filtradas en vacío, se utilizó en

una gradiente de 0% A y 100% B de 0 a 10 minutos, 60% A y 40% B de 10 a 15 minutos, 100% A y 0% B de 15 a 30 min, finalizando con 0% A y 100% B en el minuto 30. La longitud de onda en la que se trabajó fue de 272 nm, con una mínima longitud de 200 nm y una longitud máxima de 340 nm para un mayor rango de detección, la velocidad del flujo que fue usado es de 0,7 ml/min.

- Protocolo de Antraquinonas por UHPLC

Para la determinación de las Antraquinonas en las hojas de la planta *Zanthoxylum fagara* se utilizó la metodología validada por Panichayupakaranant, Sakunpak y Sakunphueak (2009) insertando algunas modificaciones que se muestran en los siguientes párrafos.

Preparación de la muestra: Se tomaron 0,5 gr de hojas secas y molidas de la especie en estudio y se mezclaron con una solución de 20 ml compuesta por 15% de agua destilada, 5% de HCl concentrado, 5% de FeCl<sub>3</sub> y 75% Metanol en volumen, luego se agitó la mezcla por 1 hora y el sobrenadante se centrifugó por 20 minutos a 5000 RPM, el extracto se conservó en frascos ámbar a una temperatura de -26°C. Para someterse al proceso de UHPLC los extractos se filtraron con filtros para jeringas de PES de 0,25 µm y fueron colocados en viales de 1,5 ml, realizándose tres repeticiones.

Condiciones cromatográficas: Se trabajó con un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3000 with XRS autosampler and UV-DAD detector; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA., con una columna C18 150 x 4,6mm, 5 µm x 100 Å, a una temperatura de la columna de 25°C y volumen de inyección de 10 µl, la fase móvil estaba compuesta por 100% Metanol grado HPLC (A) y 2% de Ácido Acético en agua ultra pura (B), ambas soluciones fueron filtradas al vacío antes de ser colocadas en el equipo para evitar la obstrucción de la bomba y el paso de cualquier material sólido que pueda afectar los resultados, se usó un flujo de solvente isocrático de 70% A y 30% B por un periodo de tiempo de 30 minutos que duró la prueba. La longitud de onda empleada para antraquinonas fue de 254 nm, con una longitud mínima de 190 nm y una máxima de 310 nm, la velocidad del flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/ min.

- Protocolo de Alcaloides por UHPLC

Tomando de guía la metodología desarrollada por Lock (2016) que se basó en el estudio de Chávez-Reyes y Plaza (2001) se procedió a realizar la detección de los alcaloides en las hojas de la *Zanthoxylum fagara*, que es explicada en los siguientes párrafos.

Preparación de la muestra: Se tomó como muestra para este procedimiento el extracto etanólico clarificado con subacetato de plomo de la especie investigada (procedimiento explicado anteriormente en la parte metodológica de obtención del extracto etanólico) y luego para someterse al proceso de UHPLC fue filtrada con filtros para jeringas de PES de 0,25  $\mu\text{m}$  y colocados en viales de 1,5 ml, preparando tres repeticiones.

Condiciones cromatográficas: El equipo usado fue el UHPLC Dionex Ultimate 3000 with XRS autosampler and UV-DAD detector; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA., una columna cromatográfica C18 150 x 4,6mm, 5  $\mu\text{m}$  x 100  $\text{A}^\circ$  y se trabajó a una temperatura de columna de 25°C y volumen de inyección de 10  $\mu\text{l}$ , la fase móvil compuesta de Buffer Fosfato (PH 6,6) (A) y 100 % de Acetonitrilo grado HPLC (B), se filtraron al vacío previamente a ser colocados en el equipo, el flujo de los solventes fue isocrático en 50% (A) y 50% (B) para un tiempo de prueba de 30 minutos. La longitud de onda usada en el procedimiento de detección del alcaloides por UHPLC fue de 254 nm con una longitud mínima de 210 nm y una longitud máxima de 310 nm, usándose además una velocidad de flujo para el desarrollo de la prueba de 1,0 ml/min.

### **Ensayo de separación y purificación del metabolito predominante**

Para el ensayo de separación y purificación del metabolito predominante se llevó a cabo un proceso que consta de una combinación entre los métodos cromatográficos en columna y capa delgada.

Preparación de la muestra: Para tener una buena purificación se tomó aproximadamente 1 gr del extracto etanólico se lo colocó en tubo falcon de 50 ml y se disolvió en 20 ml de Metanol en grado reactivo.

Separación por cromatografía en columna: Siguiendo los pasos de la cromatografía en columna ya usados se realizó una primera separación de los metabolitos de la muestra con la mezcla de solventes Cloroformo:Acetato de Etilo en la proporción 8:2, se recolectaron los metabolitos y estos fueron pasados por segunda vez por cromatografía de columna para lograr una mejor separación y purificación, se deben pasar por este proceso las veces necesarias hasta notar una separación bien definida que significa mayor purificación de los metabolitos, luego se recolectaron los analitos separados en viales diferentes para cada uno de 50 ml y se guardaron a  $-26^{\circ}\text{C}$ .

Purificación por cromatografía en capa delgada: Se usaron 4 cromatoplasmas de 20 cm x 20 cm, se preparó la fase estacionaria con 100 gr de Silica gel 60 F<sub>254</sub> de diámetro de partícula entre 0,063 – 0,200 y el 12% de yeso tamizado, se siguieron los mismos procedimientos anteriormente mencionados para la elaboración de las placas con capa delgada. Los metabolitos separados fueron sembrados en la superficie de una placa para cada uno, con la ayuda de un tubo capilar de 1 mm de diámetro se impregnaron como una línea continua a 1 cm de distancia del límite inferior de la placa. Dentro de la cámara cromatográfica se colocó 50 ml de la mezcla de los solventes Cloroformo: Acetato de Etilo en la proporción 9:1 para el procedimiento y se dejó reposar 10 min para permitir que el interior se sature con los gases de la fase móvil, por último se introdujeron las placas preparadas y se dejó correr al solvente observando la separación de los metabolitos de impurezas en cada placa para luego retirarlas de la cámara y dejarlas secar al aire.

Extracción y secado: Una vez secas las placas se procedió con la ayuda de una espátula a raspar la parte de la capa delgada donde se encontraba el metabolito más puro en cada una de ellas, a cada analito mezclado con el polvo de sílice de la placa se colocó en un vaso precipitado previamente lavado y esterilizado a  $105^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, se procedió a añadir 30 ml metanol en grado reactivo aproximadamente a cada uno, se dejó disolver los metabolitos y luego con jeringas con filtro de PES de  $0,25\ \mu\text{m}$  los sobrenadantes fueron filtrados y colectados en frascos ámbar de 50 ml (previamente pesados) y guardados a  $-26^{\circ}\text{C}$ . Para eliminar el metanol en el que estaban disueltos los metabolitos y poder pesarlos, se colocaron a secar dentro de los frascos en una estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, luego se restó con el primer peso de los frascos. De esta forma se determinó cuanto del metabolito predominante podría existir en 1 gr de extracto según el ensayo.

## 2.6. Técnicas de procesamientos y análisis de datos

- **Procesamiento y presentación de datos**

En el procesamiento de los datos presentados en el siguiente informe, se realizó una revisión y selección de los mismos, se ordenaron, clasificaron y tabularon, además algunos gráficos como los cromatogramas y espectros UV fueron procesados por el programa Chromeleon versión 7, y tablas del programa Microsoft Excel 2013 para los datos de determinación del rendimiento del extracto y el porcentaje de humedad de la hojas, todos estos con el fin de verificar la hipótesis presentada sobre los metabolitos secundarios en las hojas de la *Zanthoxylum fagara*.

- **Análisis e interpretación de datos**

Luego de haberse procesado los datos gracias a los programas Chromeleon versión 7 y Microsoft Excel 2013, el análisis de los datos se realizó por la interpretación de los resultados obtenidos, según la secuencia de los procedimientos experimentales que se realizaron, estudiando sus características y la relación e importancia que presentan según reportes en la literatura científica.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo está dividido en dos partes, la primera en donde se presentan los resultados de la investigación con referente a las siguientes pruebas: rendimiento en la obtención del extracto etanólico de las hojas de *Zanthoxylum Fagara*, determinación de la humedad de las hojas, resultados de la evaluación fitoquímica- marcha fitoquímica preliminar, determinación de solventes adecuados para cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía en columna (CC), resultados de las pruebas de CCD, resultados de las pruebas de CC, detección de metabolitos secundarios por UHPLC y un ensayo de separación y purificación del metabolito predominante. La segunda y última parte del capítulo es la discusión de los resultados, en donde se darán respuesta a las interrogantes abordadas en la presente tesis de investigación científica con respecto a los procedimientos y objetivos propuestos.

#### 3.1. Resultados de la investigación

En el análisis de los resultados de la investigación se ha de acuerdo a los procesos realizados en la parte experimental.

##### 3.1.1. Rendimiento en la obtención del extracto etanólico de las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*.

**Tabla 2**

*Rendimiento del extracto etanólico de *Zanthoxylum fagara**

Procesos	Extracto etanólico		
	Extracciones		
	1	2	3
Peso en fresco de las hojas (g)	633,8	624,6	630,2
Peso en seco de las hojas (g)	197,6	195,2	201,4
Peso del extracto (g)	43,3	46,3	44,5
Rendimiento (%)	6,83	7,41	7,06
Rendimiento promedio (%)	7,11 ± 0,28		

Fuente: Elaboración propia (2019).

En la Tabla 2 se muestran el rendimiento de las tres extracciones que se realizaron tomando un peso en fresco similar para cada una, en la primera dio un rendimiento de 6,82%, el segunda un 7,40% y en la tercera un 7,10%, obteniendo como resultado un rendimiento promedio de 7,11%, es decir por cada 100 gr de hojas frescas de *Zanthoxylum fagara* se puede obtener 7,11 gr de extracto etanólico aproximadamente.



**Figura 19.** Extracto etanólico de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

En los trabajos de Sánchez y Anicaina (2015) y Espinoza *et al.* (2009) se realizaron estudios de los rendimientos de extractos etanólicos en donde registraron porcentajes de 10% y hasta 13% con otras especies, en comparación con estas extracciones el porcentaje de rendimiento del extracto de la Shapilloja es relativamente bajo, sin embargo hay que tener en cuenta que en los estudios mencionados se utilizó etanol a 96 °GL y en esta investigación se usó etanol a 80 °GL por lo que esta diferencia puede ser la responsable del rendimiento obtenido, a pesar de ello se optó por trabajar a ese grado alcohólico para permitir la extracción de algunos compuestos solubles en agua, de esta forma determinando que el 7,11% de rendimiento promedio es efectivo de acuerdo a las condiciones usadas en el proceso.

Por otra parte cabe señalar que al momento de secado del extracto se pudo observar que este no llegaba a convertirse en polvo sino que se mantenía en una contextura semisólida, como se muestra en la Figura 19, lo que daba a suponer la presencia de azúcares que impedían su secado total.

### 3.1.2. Determinación de la humedad de las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara*.

**Tabla 3**

*Porcentaje de humedad de las hojas de Zanthoxylum fagara*

Muestra	Humedad en hojas		
	Repeticiones		
	1	2	3
Peso inicial (g)	10,0137	10,0126	10,0116
Peso final (g)	2,3952	2,8567	2,4506
Porcentaje de humedad (%)	76,08	71,47	75,52
Porcentaje de humedad promedio (%)	74,36 ± 2,89		

Fuente: Elaboración propia (2019).

El porcentaje de humedad promedio se muestra en la Tabla 3 siendo un 74,36% quiere decir que por cada 100 g hojas de *Zanthoxylum fagara* hay 74,36 g de agua y 25,64 g de residuo seco, para establecer estos datos se sacó la media de los porcentajes de humedad por cada muestra que visualizan en la tabla siendo 76,08%, 71,47% y 75,52%.

Según los estudios en secado de hojas de Otazu (2010) y Gutiérrez, Reyes y Castañeda (2017) en especies vegetales que pueden ser usadas en el ámbito medicinal obtuvieron porcentajes de humedad de 76,78% y 32,65% respectivamente, lo que da a entender que el contenido de agua en las hojas de las especies vegetales pueden ser muy variables y muchas veces depende de las características propias de cada una, en todo caso la humedad presente en las hojas de la Shapilloja, siendo una especie que habita naturalmente en los trópicos, se encuentra dentro del rango de estos autores con un 74,36%, este

alto contenido de humedad en las hojas también puede influir en el rendimiento del extracto etanólico ya que existe una pérdida moderada en el proceso de secado.

### 3.1.3. Evaluación fitoquímica – marcha fitoquímica preliminar.

Al realizar todas las evaluaciones que fueron mencionadas en la parte metodológica de la marcha fitoquímica preliminar en el extracto etanólico de las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* con tres repeticiones para cada una, se observaron los resultados a continuación.

**Tabla 4**

*Evaluación fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de Zanthoxylum fagara*

Marcha fitoquímica preliminar						
Fracciones del extracto	Metabolito a identificar	Reacciones	Repeticiones			Observaciones
			1	2	3	
Fracción A	Flavonoides	Reacción de Shinoda	++++	++++	++++	Formación de un color marrón oscuro intenso en la fase orgánica
	Taninos	Reacción con Gelatina	-	-	-	No hubo ninguna formación de precipitados
	OH fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico	++++	++++	++++	Formación de coloración verde grisácea indicando la presencia de 2-OH adyacentes
	Lípidos	Reacción con Iodo	-	-	-	Ninguna presencia de color marrón o naranja
	Glicósidos	Reacción con Fenol	+++	+++	+++	Formación de coloración naranja - pardo
Fracción B	Núcleos estereoidales y Triperpenos	Reacción de Liebermann – Burchard	+	++	++	Leve coloración purpura en la reacción, positivo para Triterpenos

	Antraquinonas	Reacción de Borntrager Directa	++++	++++	++++	Formación de coloración amarilla con fluorescencia rojiza en la fase acuosa
Fracción C	Alcaloides	Reacción de Dragendorff	+++	++	++	Presencia de coloración pardo naranja en el precipitado
	Leucoantocianidinas	Reacción de Rosenheim	++	++	++	Coloración rosa pálido en la fase amilica
Fracción D	Proteínas y péptidos	Reacción de Biuret	-	-	-	No hubo cambios en la coloración
Reacciones directas	Saponinas	Saponificación	-	-	-	No hubo formación de espuma

++++: Abundante

+++ : Moderado

++ : Leve

+ : Escaso

- : Nula

Fuente: Elaboración propia (2019).

De acuerdo a la evaluación fitoquímica el extracto etanólico de la hojas de la Shapilloja presentan una serie de metabolitos secundarios que según la escala tomada para el análisis que se expone en la Tabla 4 varían de abundante hasta escaso sin tener en cuenta los resultados nulos, la vistas de las reacciones se realizadas se pueden observar en el Anexo 3, los metabolitos que de identificaron son: los flavonoides, los OH o compuestos fenólicos, los glicósidos, los triterpenos, las antraquinonas, los alcaloides y las leucoantocianidinas; de los cuáles se explicará su importancia en la fitoquímica y el valor que tiene su presencia en la *Zanthoxylum fagara* en los párrafos siguientes.

El grupo más predominante que se presenta según la marcha fitoquímica son los compuestos fenólicos que según Lock (2016) son un grupo de sustancias que contienen un anillo aromático con varios grupos hidroxilos pero además se unen comúnmente a unidades de azúcar; también, son sustancias muy polares y solubles en agua, considerándose además como grandes antioxidantes,

gracias a la reacción de Cloruro férrico se pudo determinar que en el extracto de las hojas existen compuestos fenólicos con 2-OH adyacentes.

Dentro del grupo de compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides, también identificados como abundantes en el extracto, es quizás el grupo más numeroso de los fenoles, suelen encontrarse bajo la forma de agliconas y/o glicósidos combinados con una o tres unidades de azúcar, a través de los años y muchos estudios se demostró que estos compuestos tiene efectos muy beneficiosos en la salud humana principalmente por mostrar gran capacidad antioxidante, antimutagénicas y antiinflamatorias. En los antecedentes de la investigación en el estudio de Macías *et al.* (2011) que le realizó al extracto de la corteza ya aportaban con el conocimiento de la buena actividad antioxidante de esa parte de la planta, haciendo probable que los flavonoides en sus hojas aporten las mismas cualidades. Por otra parte la presencia de hidratos de carbono en el extracto de las hojas reafirma por qué la consistencia semisólida del mismo, su presencia moderada es la responsable de esta cualidad, a lo que también se suma la posibilidad de que esté unido a un compuesto fenólico como los flavonoides.

Otro de los compuestos con mayor predominancia y que forman parte de los compuestos fenólicos son las antraquinonas, según Peñarrieta, Tejada, Mollinedo, Vila y Bravo (2014) son parte del grupo de las quinonas y se diferencian de otros metabolitos por poseer dos anillos fenólicos en su estructura, pueden presentar actividad antibacterial, antimalárica, antitumoral o anticancerígena y antifúngica, como también actividad catártica, antirreumática, antiinflamatoria y citotóxica, también se usan para combatir la depresión leve a moderada, lo que vuelve sus estudio de gran importancia como medicina natural y también son colorantes (Lock, 2016).

Por último entre los compuestos fenólicos de presencia leve identificados se encuentran las leucoantocianidinas que pertenecen al grupo de los flavanos que a la vez son parte de los flavonoides, también se las puede conocer como flavan-3,4-dioles, son los precursores de las antocianinas, catequinas y taninos, sus propiedades más conocidas es porque son fuertes antioxidantes,

antimutagénicos y se dice que puede reducir los efectos del alzhéimer, tomando esto en cuenta aunque el metabolito no sea abundante en el extracto es parte de sus muchas propiedades curativas (Peñarrieta, Tejeda, Molinedo, Vila y Bravo, 2014; Mamani *et al.*, 2017).

La siguiente familia de compuestos que se encuentran de forma moderada a leve son los alcaloides según los resultados de la marcha fitoquímica preliminar, es el grupo más grande de metabolitos y se pueden encontrar en diversas partes de la planta, desde las raíces hasta los frutos, a diferencia de otros componentes contiene uno o más átomos de nitrógeno en su sistema cíclico ya que mayormente suelen ser derivados de aminoácidos, según Lock (2016) los alcaloides son ampliamente usados para el tratamiento de distintas enfermedades, algunos de sus usos son: antiinflamatoria, antibacterial, antitumoral y por sus diversos efectos sobre el sistema nervioso como sedante, analgésico o estimulante; en la especie *Zanthoxylum fagara* según los diversos antecedentes en el cual se realizaron estudios para la detección de estos metabolitos, en su corteza se encontraron alcaloides como la sinefrina, la skimmianina y la escopoletina, en su resina se encontraron la magnoflorina, la candicina, la tembetarina, la *N*-metilisocoridina, la laurifolina, la chelereritrina y trazas de nitidina, y en la hojas se encontraron la skimmianina y la laurifolina, por lo que es muy probable que estos mismos alcaloides estén presentes en el extracto etanólico de la hojas contribuyendo a sus propiedades analgésicas.

Para terminar con los compuestos que se pudieron identificar gracias al proceso de evaluación fitoquímica están los triterpenos con su presencia leve en el extracto etanólico de las hojas de la Shapilloja, que pertenece al grupo de metabolitos secundarios de los terpenoides y esteroides, son compuestos con seis unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) y por lo general tetracíclicos o pentacíclicos, se encuentran bastante distribuidos en las plantas, poseen una actividad antiinflamatoria, antitumoral, analgésica, hepatoprotectora y otras (Lock, 2016).

Como se puede observar a marcha fitoquímica preliminar realizada ayudó a evidenciar la presencia de ciertos grupos de metabolitos secundarios que son de alto interés farmacológico.

### 3.1.4. Cromatografía en capa fina con placa de aluminio.

El procedimiento de cromatografía en capa fina con placa de aluminio se dio con la finalidad de encontrar la mezcla de solventes apropiados para la separación y purificación de los metabolitos. El proceso de pruebas por capa fina con placa de aluminio se desarrolló para cada mezcla de solvente y proporciones en el extracto etanólico de las hojas de Shapilloja, mostrándose los resultados a continuación.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de las combinaciones de solventes utilizados en las pruebas para encontrar el que mejor separe los metabolitos del extracto etanólico, como se observa las mezclas entre metanol (MeOH):acetato de etilo (EtOAc) y metanol:tolueno (tol) dieron resultados de intermedia separación, es decir los puntos salían difusos y no llegaban a desagruparse completamente, por otra parte para la mezcla con cloroformo:tolueno también dieron resultados intermedios o nulos, la mezcla entre MeOH y cloroformo con la acetona todas dieron nulidad de separación esto debido a que la acetona presenta una mayor polaridad y retenía demasiado los compuestos haciendo imposible su total recorrido por la placa; la mezcla de solventes que mejores resultados dieron fueron de cloroformo:EtOAc en proporciones de 8:2 y 9:1.

**Tabla 5**

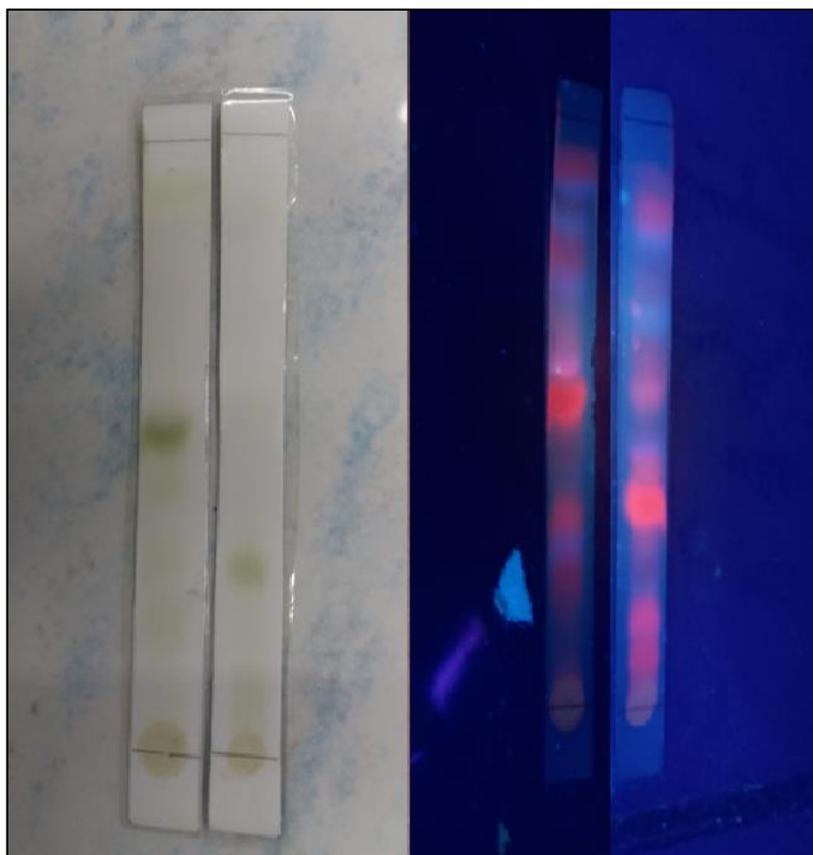
*Determinación de solventes apropiados para la separación de metabolitos*

Pruebas con solventes		
Solventes	Proporciones	Extracto etanólico
Metanol : Acetato de etilo	6:4	-
	7:3	+ -
	8:2	-
Metanol : Tolueno	6:4	-
	7:3	+ -
	8:2	-
Metanol : Acetona	6:4	-
	7:3	-
	8:2	-
	7:3	+ -

Cloroformo :	8:2	+
Acetato de etilo	9:1	+
Cloroformo :	7:3	+ -
Tolueno	8:2	-
	9:1	-
Cloroformo :	7:3	-
Acetona	8:2	-
	9:1	-

+: Buena separación  
 +-: Intermedia separación  
 -: No hubo separación

Fuente: Elaboración propia (2019).



**Figura 20.** Placas cromatográficas del extracto etanólico de *Zanthoxylum fagara* en luz visible y en luz UV con solventes Cloroformo:EtOAc en proporciones 8:2 y 9:1 respectivamente. (Elaboración propia - 2019).

Cuando se realizó las pruebas con el extracto etanólico que se encuentra en la Figura 20 se pudieron observar las manchas de metabolitos tanto a luz visible como a luz UV llegando a identificar uno predominante en las placas. Por otra

parte gracias a la fluorescencia de los metabolitos se pudieron distinguir los componentes que se presentan en la Tabla 6 que se basa en las investigaciones de Lock (2016) y Seminario (2017) como se indica en la Tabla 1 en la parte metodológica, aunque las coloraciones pueden ser parecidas para distintos compuestos si se compara con los resultados anteriores obtenidos en la evaluación fitoquímica es correcto afirmar que si pueden pertenecen a los compuestos fenólicos, terpenoides y alcaloides.

**Tabla 6**

*Posibles metabolitos secundarios en CCD según la fluorescencia en luz UV*

Fluorescencia de componentes sin uso de revelador		
Grupos	Posibles compuestos	Presencia en la placa
Compuestos fenólicos	Ácidos Fenólicos, Flavonoides, Quinonas y Cumarinas	Naranja fluorescente, celeste fluorescente y púrpura
Terpenoides y esteroides	Terpenoides	Púrpura
Alcaloides	Alcaloides	Fluorescencia azul y amarilla

Fuente: Elaboración propia (2019).

### 3.1.5. Cromatografía en capa fina con placa de vidrio.

El proceso de cromatografía en capa fina con placa de vidrio se realizó con la finalidad de encontrar la proporción adecuada de los solventes ya determinados (Cloroformo y Acetato de etilo), las proporciones a evaluar son las que tuvieron mejor separación en la CCD con placa de aluminio.

La Figura 21 muestra el resultado de las pruebas detectando que en la proporción 9:1 se puede divisar manchas más definidas, lo que da a entender que una menor adición de EtOAc significa una mayor retención de los componentes por la naturaleza polar de la fase estacionaria, determinando así que esta es la mejor relación de solventes para la purificación por CCD con placa de vidrio.



**Figura 21.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara* en luz visible con Cloroformo:EtOAc en proporción 9:1. Elaboración propia (2019).

### 3.1.6. Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna se llevó a cabo inicialmente con el objetivo de verificar si los solventes usados en la CCD lograban una buena separación de los analitos dentro del extracto etanólico de las hojas de la Shapilloja.

En la Figura 22 se puede observar los resultados de los procedimientos en la cromatografía de columna y como el metabolito predominante a luz visible se divide en dos compuestos de diferente coloración, un primer anillo color verde oscuro y un segundo anillo color similar al mostaza, siendo la proporción 8:2 de Cloroformo:EtOAc en donde se visualiza mejor la separación de los componentes por lo que se considera esta para realizar la extracción y purificación.



**Figura 22.** Cromatografía en columna del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara* en luz visible con Cloroformo: EtOAc en proporción 8:2. Elaboración propia (2019).

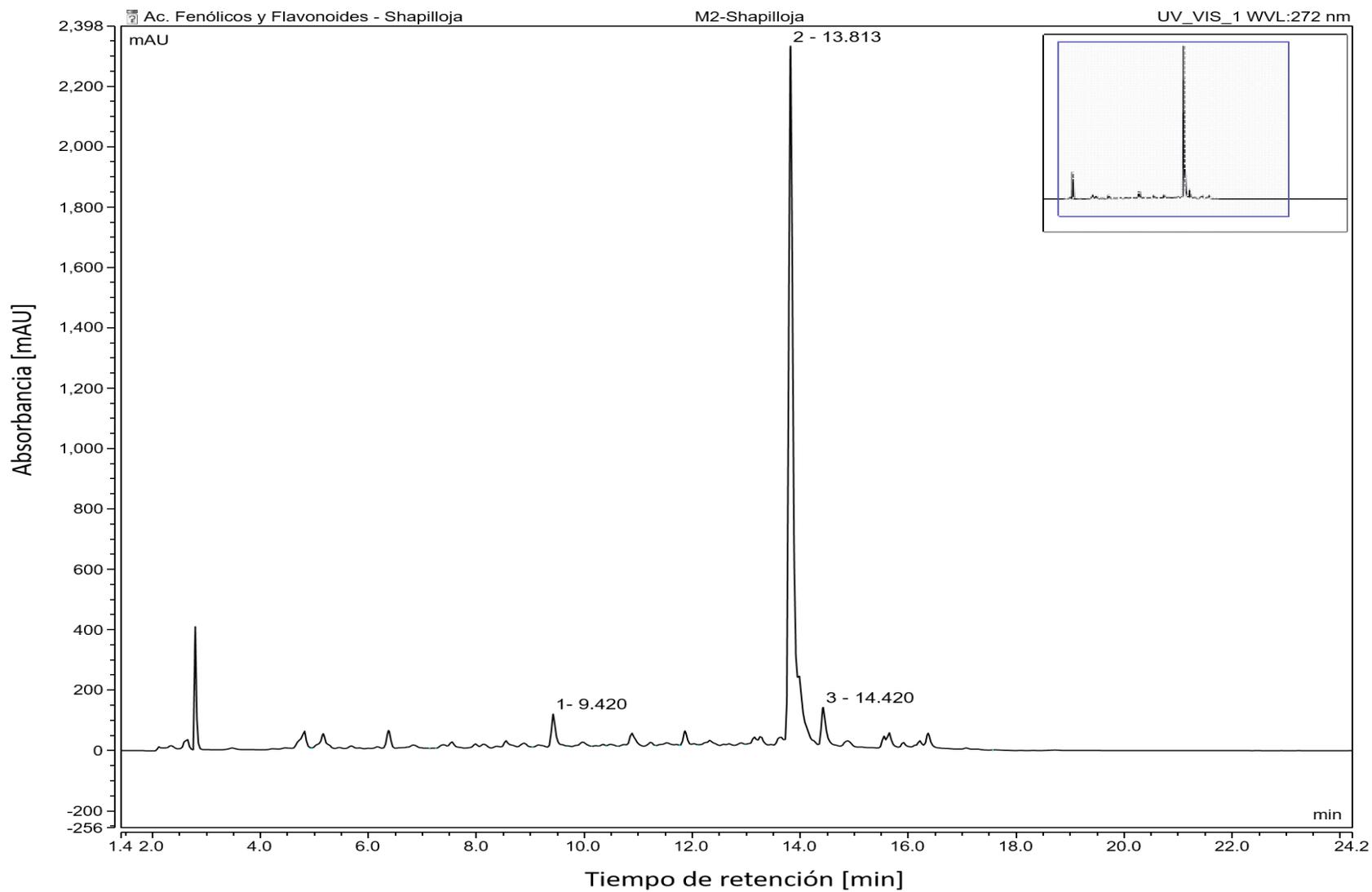
### 3.1.7. Verificación de metabolitos secundarios por UHPLC.

Para la detección de los metabolitos secundarios en las hojas de *Zanthoxylum fagara* se tomó en cuenta que en la marcha fitoquímica preliminar los compuestos más predominantes de mayor interés fueron los compuestos fenólicos dentro de los cuales están los flavonoides y otros ácidos fenólicos unidos a hidratos de carbono, las antraquinonas y los alcaloides, para cada uno de estos compuestos se realizó una metodología ya explicada para sus mejor extracción y proceso cromatográfico con tres repeticiones, se usó un equipo Dionex UltiMate 3000 con XRS autosampler y un detector UV-DAD de la marca Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA; con capacidad de soporte para presiones superiores a 620 bar (9000 psi) y velocidades de flujo de hasta 10 ml / min, con recolección de datos del detector de hasta 100 Hz y ciclos de inyección de hasta 15 s, una imagen del equipo se muestra en la Figura 23.

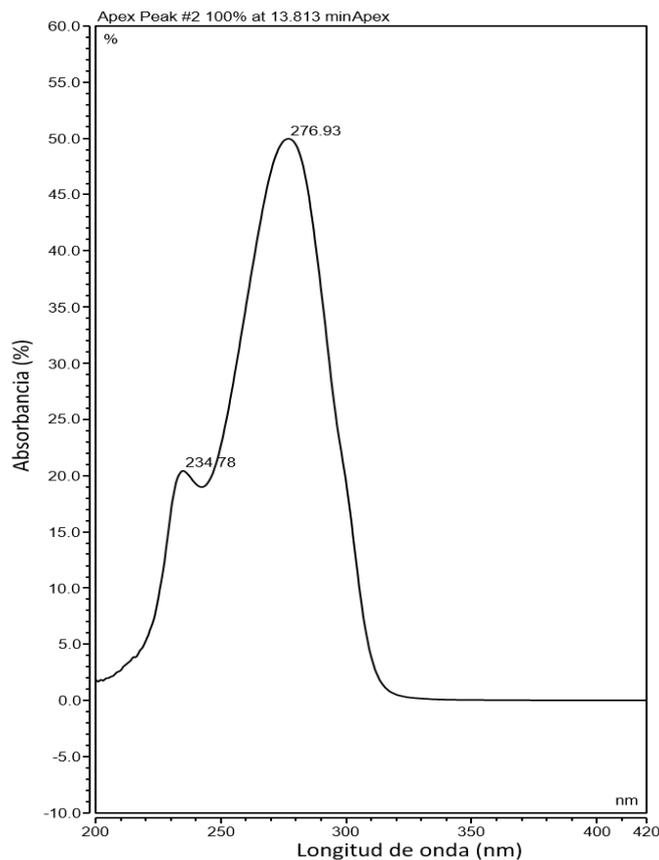


**Figura 23.** Dionex UltiMate 3000. Thermo Fisher Scientific (2016).

- *Resultados de la detección de Ácidos fenólicos y Flavonoides por UHPLC:* al seguir la metodología de detección se obtuvieron los resultados que se presentan en el siguiente cromatograma, donde se resaltan los picos más sobresalientes y también se muestra el espectro del más predominante.



**Figura 24.** Cromatograma de Ácidos fenólicos y Flavonoides de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).



**Figura 25.** Espectro UV del pico #2 con tiempo de retención 13,813 min del Cromatograma de Ácidos fenólicos y Flavonoides de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

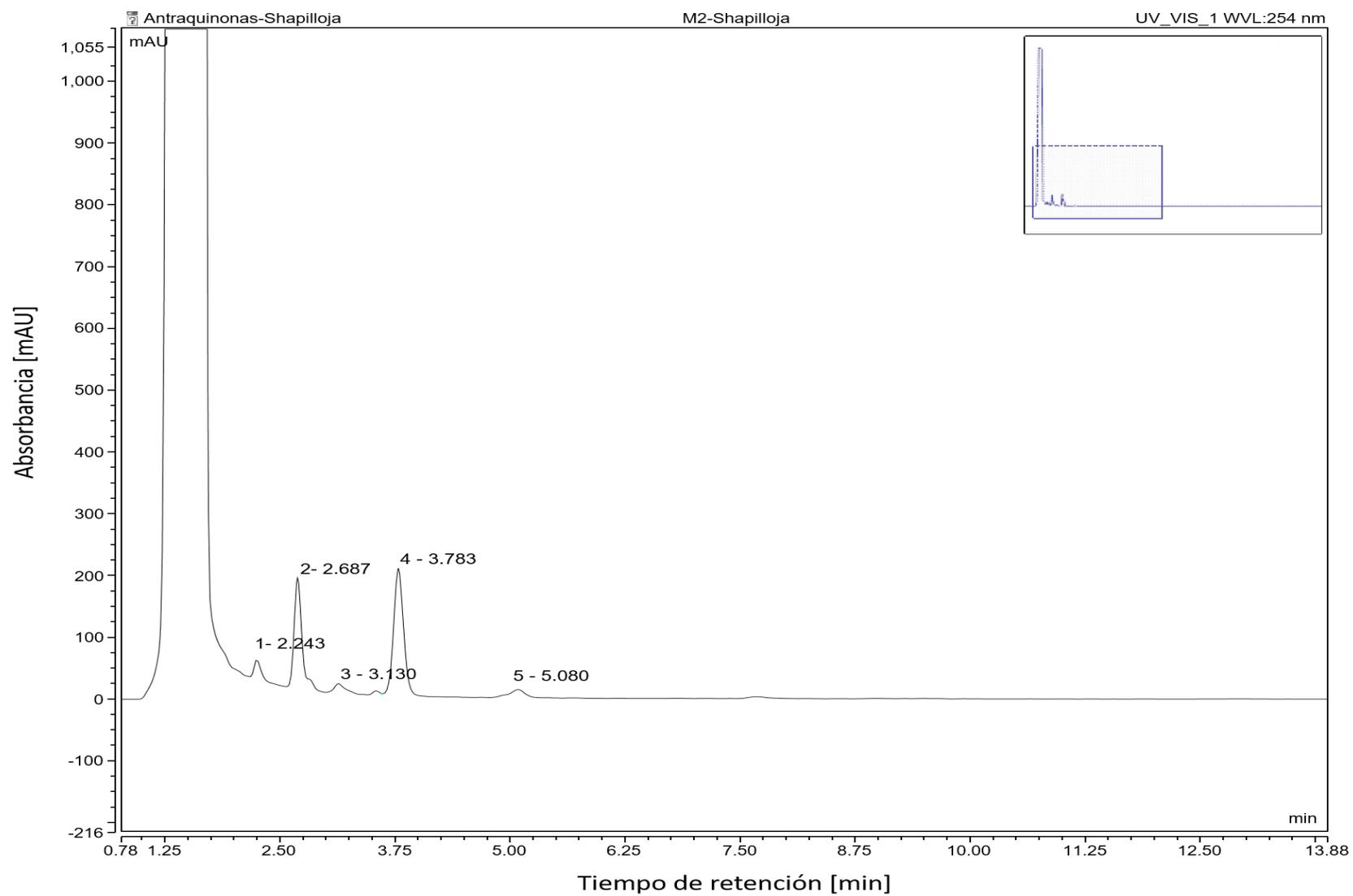
En la Figura 24 en la cual se muestra el cromatograma resultante del proceso de detección de metabolitos por UHPLC, se resaltaron los tres picos más altos, el primero a un tiempo de retención de 9,420 min con absorbancia aproximada de 150 mAU, el segundo pico a 13,813 min con 2350 mAU y el tercer pico a un tiempo de 14,420 min con 150 de mAU, como se puede observar el pico número dos exhibe unidades de absorbancia mucho mayores que los otros dos por lo que se torna de gran interés y de acuerdo a esto se puede afirmar que es el metabolito de ácidos fenólicos o flavonoides más predominante de las hojas de la especie; con respecto a otros estudios en el mismo género *Zanthoxylum* se observa en el caso de la *Zanthoxylum bungeanum* de Kai *et al.* (2014) que el pico más alto para su análisis en flavonoides equivale a unos 800 mAU y en el de la especie *Zanthoxylum armatum* de Vinod, Sushila, Neeraj, Upendra y Bikram (2016); para sus

compuestos fenólicos el pico más alto fue de 120 mAU aproximadamente, lo que hace aún más importante su investigación.

El espectro UV-VIS del metabolito del pico #2 detectado se muestra en la Figura 25 con porcentajes máximos de absorbancia de 50% y longitudes de onda máximas de 276,83 nm, encontrándose entre longitudes de onda de 200 a 300 nm, confirmando que posiblemente es un ácido fenólico por el tipo de extracción, la metodología que se siguió para la corrida cromatográfica por UHPLC y la longitud de onda en la que se reconoció, además por las similitudes con los espectros UV del Ácido gálico presentado por Verma *et al.*(2011) y con el Ácido clorogénico que se menciona en los antecedentes por Vronska y Demyd (2016) aunque presenta mucha más semejanza con el primero ya que el espectro tienen curvas de mayor absorbancia entre los 200 a 270 nm; sin embargo, se vuelve una necesidad para una mejor identificación exámenes del mismo más profundos con equipos de espectrofotometría de masas (MS) o de resonancia magnética nuclear (RMN).

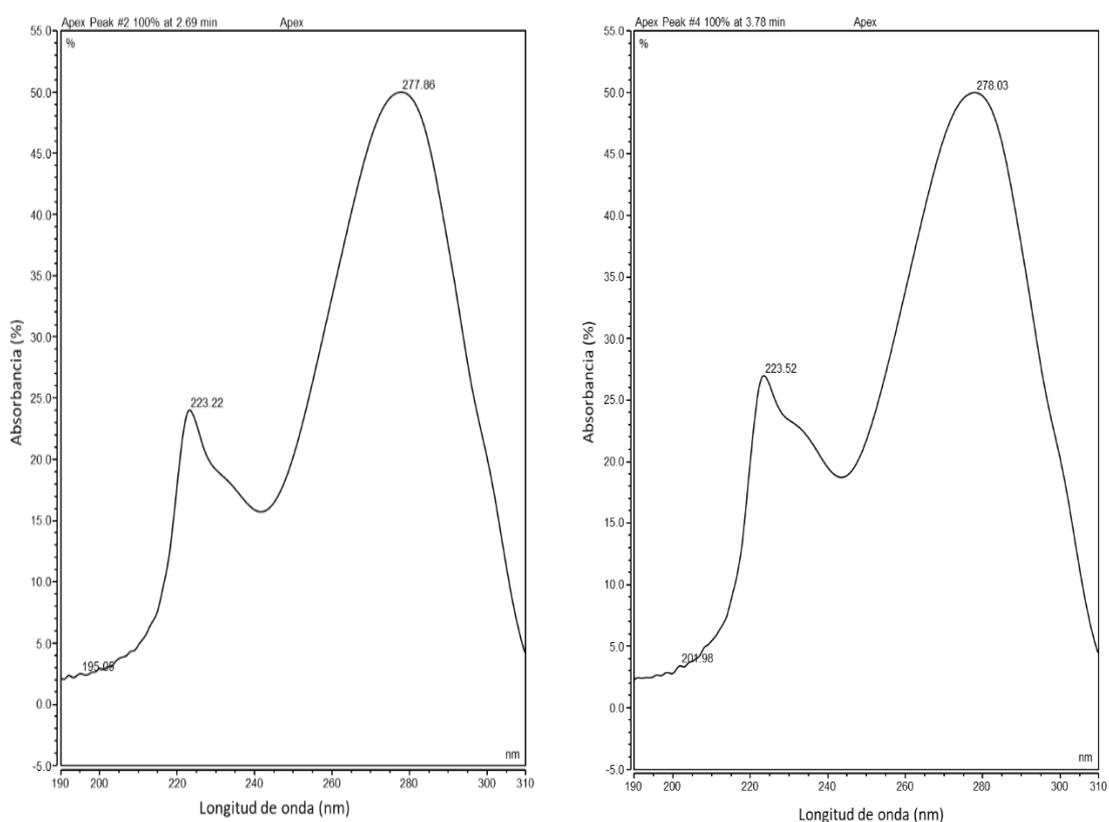
- *Resultados de la detección de Antraquinonas por UHPLC:* los resultados del proceso de detección de antraquinonas por UHPLC son producto del seguimiento de la metodología señalada en el capítulo anterior, se presentan las siguientes figuras que visualizan las antraquinonas encontradas en las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara*.

En el cromatograma que se muestra en la Figura 26 se puede observar que gracias al proceso de la corrida cromatográfica por UHPLC se lograron detectar cinco picos, el primero a un tiempo de retención de 2,243 min con miliunidades de Absorbancia de 70 mAU aproximadamente, el segundo a un tiempo de retención de 2,687 min con 200 mAU, el tercero a 3,130 min de retención con 25 mAU, el cuarto a 3,783 min con 220 mAU y el quinto a 5,080 min con 225 mAU, considerando la Absorbancia se toma en cuenta los dos picos más altos.



**Figura 26.** Cromatograma de Antraquinonas de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

Comparando con estudios anteriores en el género *Zanthoxylum* se encuentra a la especie *Zanthoxylum armatum* realizado por Dinesh, Rina y Anil (2013) donde el pico definido para una antraquinona alcanzó los 125 mAU, en el caso de la Shapilloja se encontraron cinco antraquinonas y dos de ellas superan estas unidades de Absorbancia, por otro lado en el caso del estudio en que basamos la metodología, donde se investigó a la especie *Senna alata* por Panichayupakaranant *et al.* (2009) se registró un pico con mAU de 175, lo que indica que la especie *Zanthoxylum fagara* cuenta con cantidades superiores a las especies descritas, convirtiéndola en una posible buena fuente de antraquinonas.



**Figura 27.** Espectro UV de los picos #2 y #3 con tiempo de retención 2,687 y 3,783 min respectivamente del Cromatograma de Antraquinonas de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

Los espectros UV de los picos #2 y #3 que se muestran en la Figura 27 son lo que resultaron ser los más altos, el espectro del pico #2 presenta valores de Absorbancia máximos del 50% con longitudes de onda máximos de

277,86 nm, encontrándose dentro de los 200 a 310 nm, el espectro del pico #3 tiene una Absorbancia máxima de 50% con una longitud de onda máxima de 278,03 nm, también encontrándose dentro de los 200 a 310 nm, sus similitud hace notar que son pertenecientes o derivados de un mismo tipo de antraquinona ya que según la metodología de extracción y condiciones cromatográficas se postulan como este tipo de compuestos, además por la semejanza con el espectro UV de la Dyoxamicina del estudio de Ryuichi *et al.* (1991) que se muestra en la Figura 5 encontrándose en longitudes de onda con curvas de mayor absorbancia entre los 220 a 300 nm; como se explicaba anteriormente las antraquinonas tienen propiedades antiinflamatorias y antibacteriales por lo que para una mejor determinación sería necesario el uso de técnicas de MS y RMN.

- *Resultados de la detección de Alcaloides por UHPLC:* para la detección de los alcaloides en las hojas de la especie *Zanthoxylum fagara* se siguió la metodología ya descrita para estos metabolitos ya que siendo uno de los grupos más abundantes en el extracto se tornaban de interés por que los resultados del procedimiento por cromatografía UHPLC se presentan en las siguientes figuras.

El cromatograma resultante del proceso de la corrida cromatográfica en el equipo de UHPLC se muestra en la Figura 28, donde se puede divisar que se detectaron cuatro picos, correspondiendo a cuatro metabolitos pertenecientes al grupo de los alcaloides respectivamente, el primer pico siendo el más sobresaliente fue encontrado en un tiempo de retención de 3,093 min con miliunidades de Absorbancia de 1750 mAU, el segundo a un tiempo de retención de 3,843 min con absorbancia de 75 mAU, el tercero hallado en un tiempo de 4,637 min con 275 mAU y por último el cuarto pico detectado a un tiempo de retención de 5,520 min con 100 mAU, tomando como loa más abundante por su absorbancia a los metabolitos de los picos #1 y #3.

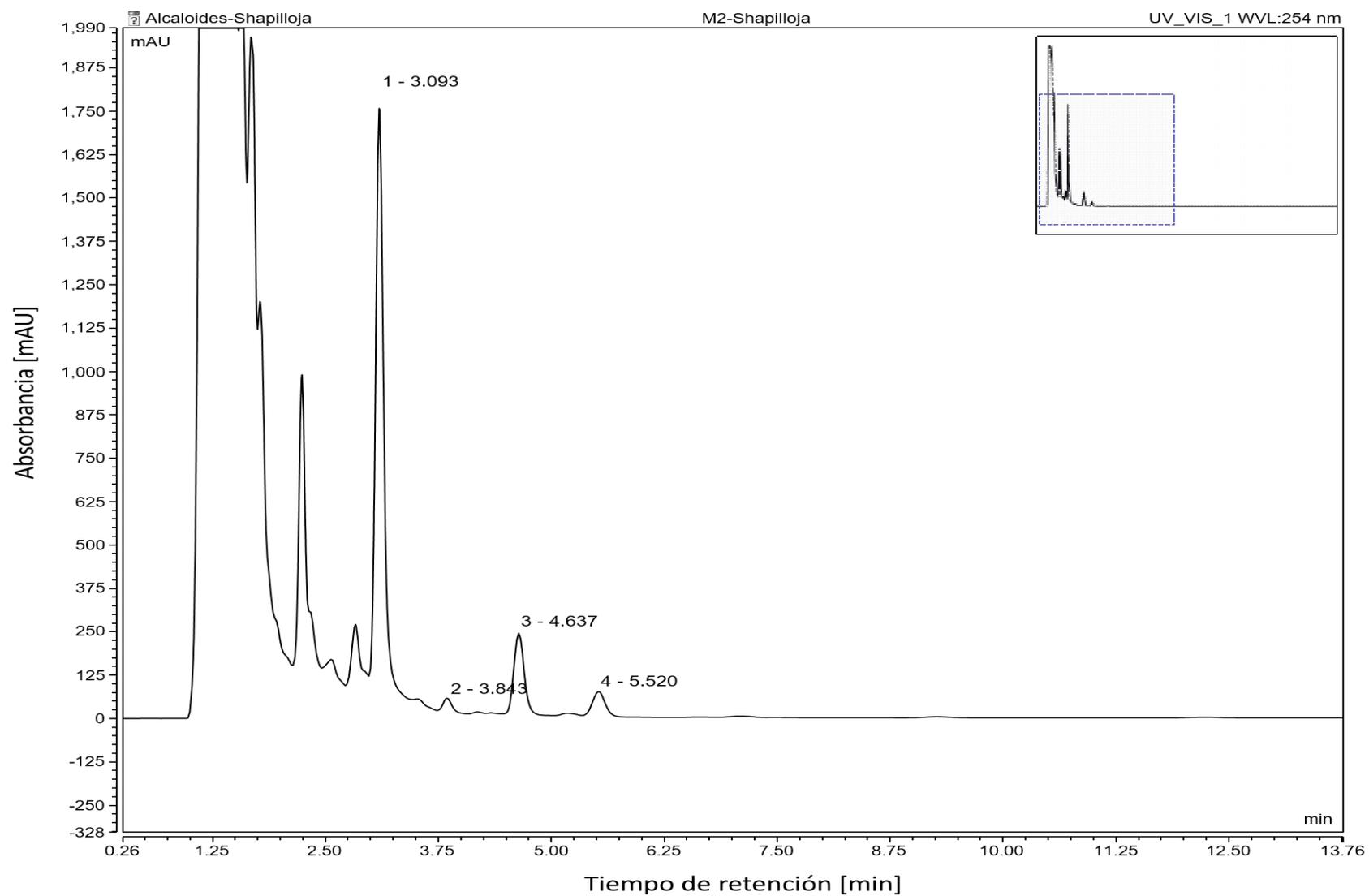
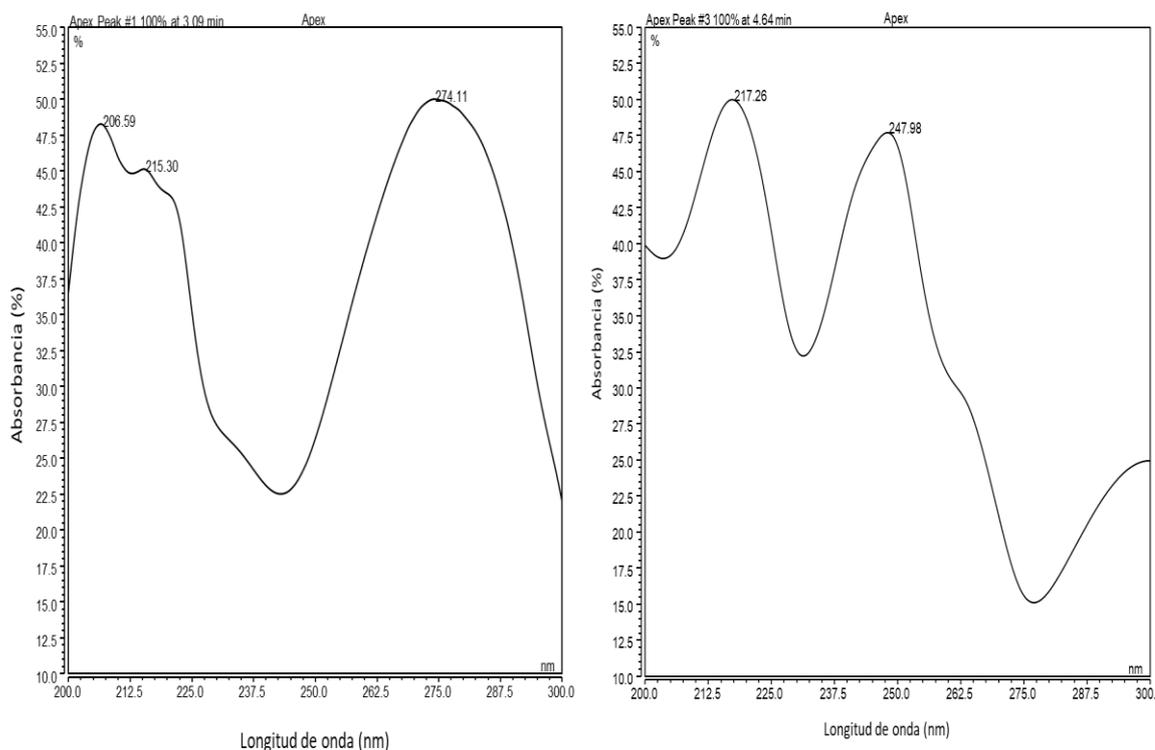


Figura 28. Cromatograma de Alcaloides de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

En los antecedentes se dice que en las hojas fueron encontrados dos alcaloides (skimmianina y laurifolina), pero según la prueba se pudo detectar más por lo que se postula que las hojas de la Shapilloja contienen hasta cuatro tipos de estos metabolitos. Al realizar la búsqueda de estudios anteriores que muestren cromatogramas para la detección de alcaloides se encontró la investigación de Yongqiang, Chuyun y Mingquan (2017) que estudiaron tres especies del género *Zanthoxylum*, las cuales son *Z. ailanthoides*, *Z. simulans* y *Z. chalybeum* en sus extractos de las cortezas, mostrando picos con Absorbancias máximas de 100 mAU, otro estudio de Min *et al.* (2007) a la especie *Zanthoxylum nitidum* obtuvo picos máximos de 60 mAU, estos datos hacen de consideración que los alcaloides encontrados en la *Zanthoxylum fagara* están dentro de las mAU para ser consideradas activas y posiblemente abundantes en el extracto, resaltando también al pico #1 que muestra grandes unidades de absorbancia.



**Figura 29.** Espectro UV de los picos #1 y #3 con tiempo de retención 3,093 y 4,637 min respectivamente del Cromatograma de Alcaloides de las hojas de *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

Los espectros UV que se muestran en la Figura 29, corresponden a los metabolitos detectados en los picos #1 y #3 respectivamente; el espectro del pico #1 muestra una absorbancia del 50% con una longitud de onda máxima en 274,11 nm, el espectro encontrándose entre 200 a 300 nm, el espectro del pico #3 también muestra una absorbancia de 50% con una longitud de onda máxima en 217,26 nm, dentro de un rango de 200 a 300 nm; según los antecedentes existen dos alcaloides en la hojas (skimmianina y laurifolina) de los que no se pudo obtener los espectros UV y aunque no se descarten, se encuentra gran similitud con los espectros UV de la Raponcicina y Berberina que se presentan en la Figura 6 del trabajo de Poudel *et al.* (2013), la Palmatina del estudio de Peiying *et al.* (2006) y el Harmane de Pereira *et al.* (2014), el espectro del pico #1 se asemeja a las mayores curvas de absorbancia en las longitudes de onda de 200 a 300 nm de la Palmatina y el espectro del pico #3 se asemeja al de la Berberina entre 210 a 260 y una curva que empieza a los 300 nm; postulándose así que pertenecen a la familia de metabolitos secundarios de los Alcaloides además de por el tipo de extracción y metodología en UHPLC siendo de gran interés por que estos compuestos presentan actividades antiparasitarias, antibacterianas, anticancerígenas, antiinflamatorias y sedantes. Pese a estas referencias se vuelve necesario el uso de técnicas con equipos de MS y RMN para determinar la estructura de los alcaloides presentes en las hojas de *Zanthoxylum fagara*.

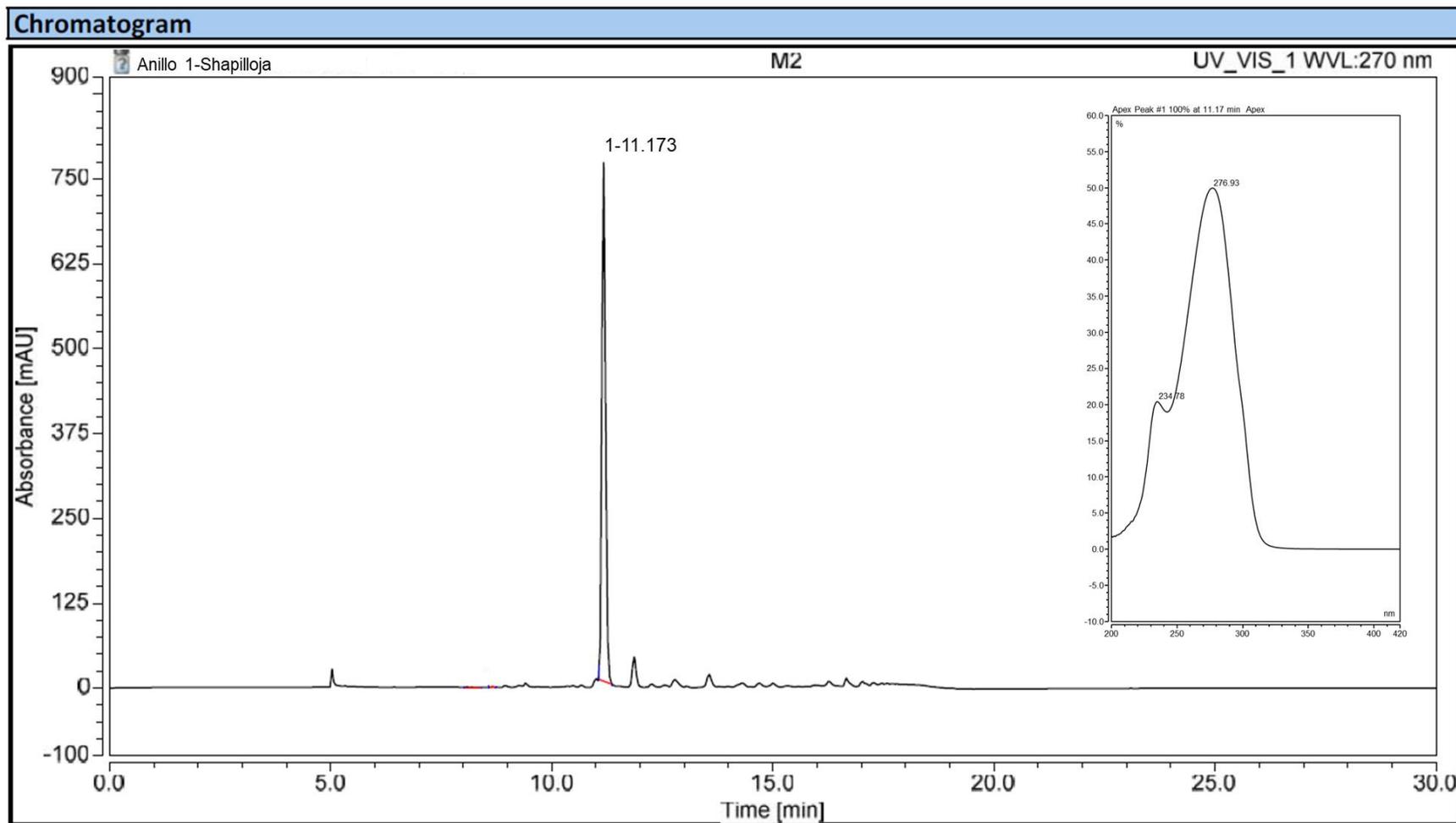
### 3.1.8. Ensayo de purificación del metabolito predominante.

Se realizó el ensayo de purificación por cromatografía en columna, notándose que al realizar el proceso este se llegaba a separar en dos anillos o analitos, por lo que procedió a hacer la recolección de ambos componentes para obtener las cantidades en las que se encuentran en 1 gr de extracto etanólico de la hojas de la especie *Zanthoxylum fagara* como se observa en la Figura 30, el primer anillo es de un color verde oscuro y el segundo de un color amarillo, el proceso se realizó tres veces logrando una separación similar como se muestra en la Figura 13 por lo que se considera aceptable, luego se los analizó por UHPLC para verificar sus estado de purificación y obtener sus espectros, como se puede

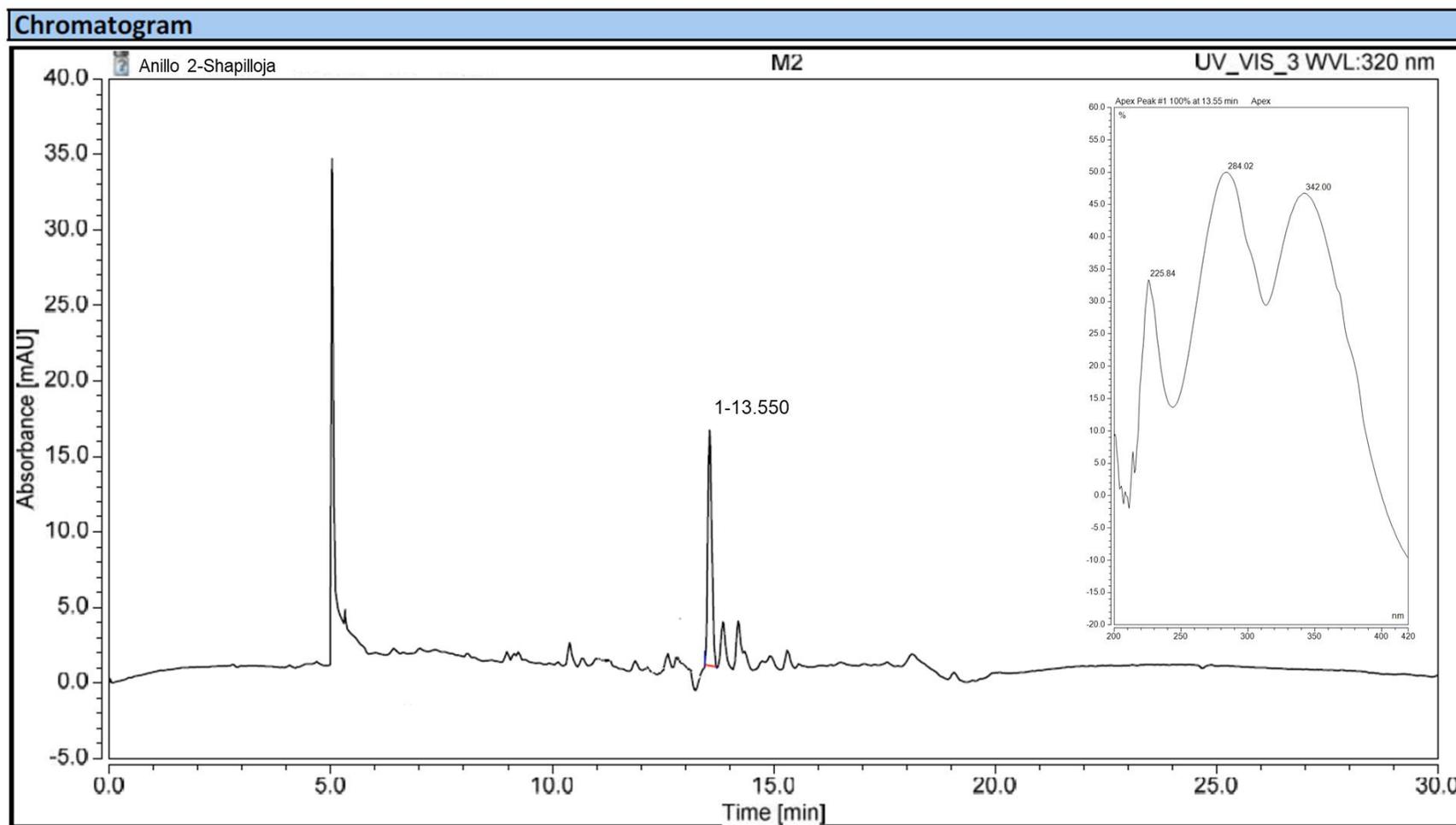
ver en los cromatogramas mostrados en la Figura 31 y Figura 32, como se observa en el caso del Anillo 1 el metabolito se encuentra en un buen estado de pureza, con un tiempo de retención de 11,173 min, se procedió a verificar gracias a su espectro UV que coincide con el metabolito predominante obtenido en la detección de ácidos fenólicos y flavonoides por UHPLC, por lo cual se afirma que es el metabolito predominante en el extracto etanólico de las hojas de la *Zanthoxylum fagara*; por otra parte, en el caso del Anillo 2 también se obtuvo un cierto grado de purificación que se podía completar por el proceso de CCD, además se pudo conseguir su espectro UV y tuvo un tiempo de retención de 13.550.



**Figura 30.** Purificación por CC del metabolito predominante del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

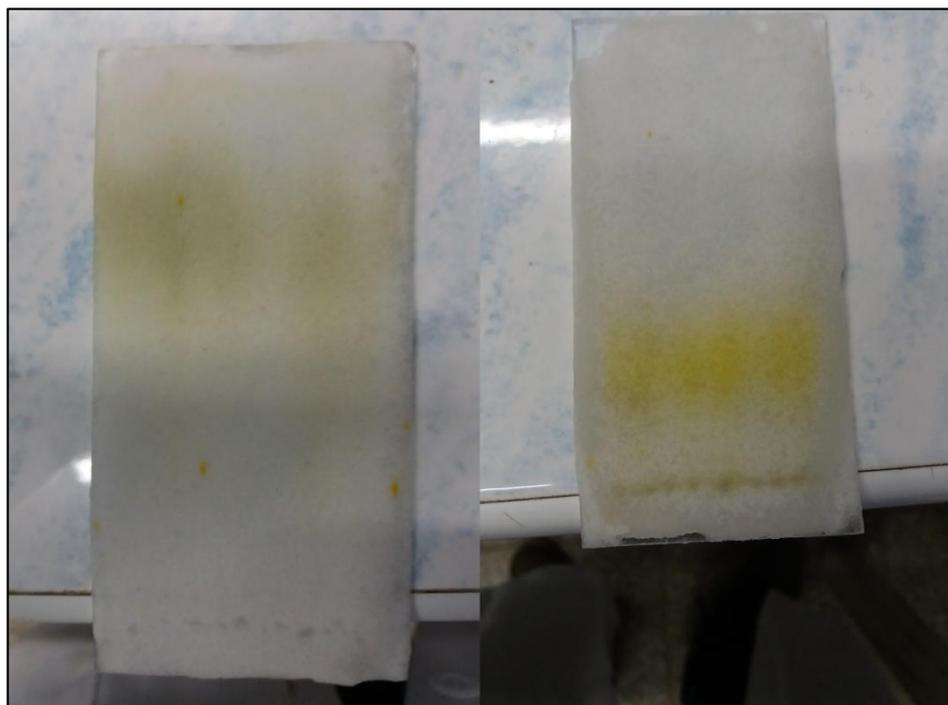


**Figura 31.** Cromatograma del Anillo 1 con su espectro UV a una longitud de onda de 270 nm del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara*. (Elaboración propia - 2019).



**Figura 32.** Cromatograma del Anillo 2 con su espectro UV a una longitud de onda de 320 nm del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara*. (Elaboración propia - 2019).

Una vez que se recolectaron los metabolitos y se analizó una alícuota de ellos por UHPLC, se procedió a purificarlos por CCD con placas de vidrio como se muestra en la Figura 33 siguiendo la metodología propuesta en donde se observa la necesidad de lograr un mejor proceso de purificación, a pesar de ello después se los diluyó en metanol y filtro para luego llevarlos a secar en una estufa a 45°C y controlar el peso de cada uno.



**Figura 33.** Ensayo de purificación por CCD de los anillos 1 y 2 respectivamente separados en CC del extracto etanólico de las hojas *Zanthoxylum fagara*. Elaboración propia (2019).

**Tabla 7**

*Resultados del ensayo de purificación del metabolito predominante*

Peso de los anillos en 1 gr de extracto			
Orden	Naturaleza	Coloración	Peso (mg)
Anillo 1	Ácido fenólico o flavonoide	Verde oscuro	75,2408
Anillo 2	Glicósido	Amarillo	16,6493

Fuente: Elaboración propia (2019).

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 7 donde se encuentran los pesos de los anillos extraídos, de esta forma para el Anillo 1 con coloración verde oscuro se obtuvo un peso de 75,2408 mg y para el Anillo 2 con coloración

amarilla se obtuvo 16,5493 mg, al momento de secado se divisó que el Anillo 2 tenía una textura parecida a un azúcar; de tal manera, como se identificó al metabolito predominante como un compuesto fenólico posiblemente un ácido fenólico que coincidió con el que se había detectado por UHPLC anteriormente y como afirma Lock (2016) que en su mayoría estos se encuentran enlazados a unidades de azúcares se puede inducir entonces que el Anillo 2 pertenece al glicósido que se encuentra unido al ácido fenólico del Anillo 1 y que se logró una aceptable separación gracias a la metodología de purificación por CC y CCD, además de que es uno de los factores por el cual el extracto tiene una consistencia semisólida. Se puede afirmar también que la cantidad extraída del metabolito puro equivalente a 75,2408 mg por cada gramo de extracto etanólico, es abundante y se vuelve de gran interés para realizar estudios más profundos para la identificación de su estructura y también de sus propiedades.

### **3.2. Discusión de Resultados**

De la obtención del extracto como primer paso para realizar la evaluación fitoquímica se discute de la Tabla 2 que el porcentaje de rendimiento de 7,11% que es relativamente bajo en comparación a otros es debido al uso de etanol al 80 °GL que contiene más agua que impide la disolución de algunos metabolitos pero también puede deberse al alto contenido de humedad de la hojas con un 74,36% tiene como consecuencia la mayor pérdida de peso en el proceso de secado.

Después de esto se realizó la evaluación fitoquímica preliminar del mismo como se muestra en la Tabla 4, este proceso de evaluación se llevó a cabo con el fin de identificar los subgrupos de metabolitos secundarios existentes en las hojas de la planta en forma general, ya que no conlleva detecciones más detalladas, dentro de los grupos que se lograron identificar están las tres familias de metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza, los compuestos fenólicos, los terpenoides y alcaloides, estas contienen diversos subgrupos, los que se pudieron identificar en el extracto fueron a los flavonoides, ácidos fenólicos, glicósidos, antraquinonas y leucoantocianidinas que están dentro de la primera familia; los triterpenos que pertenecen a la segunda y los alcaloides que son la tercera, los que mayor intensidad

de reacción tuvieron fueron los flavonoides, ácidos fenólicos, antraquinonas y alcaloides ya que los glicósidos van unidos a los compuestos fenólicos. Según Brooker (2010) en su Diccionario Médico indica los usos farmacológicos que tienen los compuestos más abundantes detectados por el tamizaje fitoquímico, en el caso de los flavonoides afirma que muchos son antibacterianos, antioxidantes, pueden brindar protección contra cardiopatías y cáncer, los ácidos fenólicos pueden presentar propiedades similares; también menciona a los alcaloides como compuestos que tienen importantes acciones farmacológicas, para las antraquinonas en el Diccionario de Cáncer (2019) se las menciona como un medicamento que actúa contra estas enfermedades pero también puede tener distintas actividades como la antibiótica; de acuerdo a esto se podría aseverar que las hojas de la Shapilloja sí contienen agentes de uso farmacológico aceptándose la hipótesis planteada siendo también una especie con un gran potencial como agente de medicina natural que ha sido usado milenariamente por los nativos de nuestra Amazonía peruana para aliviar sus enfermedades, pero también se descartaron la presencia de otros compuestos en el extracto como los taninos, compuestos que sí se encuentran en los extractos de la corteza de la planta según los antecedentes de la investigación, tampoco cuenta con saponinas ya que no se produjo espuma en su agitación lo que indica que no contiene lípidos saponificables y no se puede producir jabones a partir del extracto.

Resultante de la evaluación se obtuvo cuáles de estos subgrupos de compuestos son los más abundantes según la intensidad de reacción, estos fueron los ácidos fenólicos, flavonoides, antraquinonas y alcaloides, según su significancia y orden se procedió a realizar para cada uno de estos metabolitos secundarios su detección por medio de un equipo de UHPLC ya que para cada uno se presentan diferentes condiciones cromatográficas y de extracción, resultando de estos procesos los cromatogramas que se muestran en la Figura 24, Figura 26 y Figura 28, en el caso de los ácidos fenólicos y flavonoides se encontraron 3 metabolitos (siendo el pico #2 el que sobresalió por tener unidades de Absorbancia mayores); en las antraquinonas se llegaron a detectar 5 metabolitos diferentes y para el caso de los alcaloides se detectaron 4 compuestos; por lo que las hojas de Shapilloja pueden presentar hasta un total de 12 analitos, cabiendo la posibilidad de poderse detectar los que se encuentran en los demás como los triterpenos y leucoantocianidinas, sin embargo para obtener una confirmación de sus estructura se necesita investigarlos por Espectrofotometría de Masas o RMN.

En la evaluación fitoquímica por reacciones de coloración como ya se dijo es un paso preliminar para el estudio de los metabolitos secundarios en el extracto de una especie vegetal, en este caso en el de las hojas de la *Zanthoxylum fagara* se identificaron como subgrupos de analitos a los ácidos fenólicos, flavonoides, glicósidos, antraquinonas, leucoantocianidinas, triterpenos y alcaloides por sus reacciones positivas a las pruebas que se le realizaron a cuatro fracciones del extracto; por otra parte dentro de las pruebas que se realizaron también estuvieron la Cromatografía de Capa Delgada y la Cromatografía en Columna, más como métodos de separación y purificación sin embargo también sirvieron como respaldo a los resultados obtenidos; en la CCD con placa de aluminio se realizaron la pruebas de proporciones de solventes para la separación de los componentes pero además se identificaron metabolitos por medio de la fluorescencia que estos producen al ser expuestos a luz UV como se expone en la Tabla 6, de una manera quizás para corroborar sus presencia se distinguieron flavonoides, quinonas, terpenoides y alcaloides, pero también podría haber cumarinas, sin embargo algunos de estos pueden presentar similar fluorescencia por lo que la evaluación fitoquímica por marcha preliminar puede ser más confiable para identificar la presencia de subgrupos de metabolitos, aún a pesar de ello la CCD permitió la aceptable separación del metabolito predominante, caso similar con la CC, que permitió observar 2 compuestos a luz visible que pertenecían al mismo metabolito, es decir a un posible ácido fenólico con una unidad de glicósido siendo el más dominante dentro del extracto. El proceso de marcha fitoquímica preliminar es indispensable para la identificación de compuestos y los procesos cromatograficos como la CCD y la CC pueden ayudar a confirmarlos pero principalmente a separarlos y purificarlos.

Las pruebas por UHPLC para la detección de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la *Zanthoxylum fagara* fueron necesarias desde el punto de vista que es una de las fuentes más fiables para este proceso. Estas pruebas se le realizaron a los subgrupos de metabolitos secundarios que fueron los ácidos fenólicos y flavonoides, las antraquinonas y los alcaloides que se presentaron como los que más concentración tenían en el extracto, pero también para identificar al metabolito más predominante para que luego pueda ser separado por técnicas de CCD y CC; de la detección de metabolitos secundarios por UHPLC los cromatogramas obtenidos que se visualizan en la Figura 24, Figura 26 y Figura 28, para los ácidos fenólicos y flavonoides se detectaron 3 probables metabolitos, siendo el pico #2 de cual también se muestra su

espectro UV que tiene similitud con el espectro de Ácido gálico no solo de forma sino también de las longitudes de ondas de las curvas de absorbancia entre 200 a 270 nm como se puede observar en los antecedentes por lo que se puede inferir a que es un ácido fenólico; para el de las antraquinonas se detectaron 5 posibles metabolitos de los cuales dos son los que más se destacan y también se puede observar sus espectros UV en la Figura 27, que tienen cierta semejanza a la Dyoxamycina entre las longitudes de onda de 220 a 300 nm; en el caso de los alcaloides se encontraron 4 posibles analitos dos de ellos también siendo los más representativos, según los antecedentes se decía que en las hojas fueron encontrados solo dos alcaloides que son la skimmianina y laurifolina, pero gracias a estas pruebas se considera que pueden llegar a ser 4 alcaloides; de los dos con mayor Absorbancia se obtuvieron sus espectros UV y al querer comprobar que se trataban de los alcaloides antes mencionados no se pudo por la falta del espectro de estos por lo cual también se los comparó con otros alcaloides como la Raponcicina, Berberina, Palmatina y Harmane, siendo la Palmatina y Berberina con las que tiene mayor concordancia en longitudes de onda; en todo caso sería necesario análisis con Espectrofotometría de masas o de Resonancia magnética nuclear para poder establecer la estructura química de cada uno de ellos; sin embargo gracias, a los resultados que se obtuvieron se considera que el metabolito más predominante del extracto etanólico de las hojas de Shapilloja es el del pico #2 en el cromatograma de ácidos fenólicos y flavonoides por presentar una Absorbancia de 2350 mAU.

Para el ensayo de separación y purificación del metabolito secundario predominante que se logró identificar en las diferentes técnicas cromatográficas de UHPLC, CCD y CC, siendo el que se presenta como pico #2 en el cromatograma de ácidos fenólicos y flavonoides, que correspondía a la mancha más destacable en luz visible y UV de la CCD y al Anillo 1 en la CC que se encontraba unido al Anillo 2 el cual era un glicósido; postulándose por su espectro UV que se trata de un ácido fenólico, y planteando estudios más profundos para determinar su estructura molecular por las propiedades antibacterianas y antimutagénicas que tiene este grupo, se llevó a cabo el ensayo con el fin de tener un aproximado de la cantidad de este metabolito en un gramo de extracto (recalcando se puede mejorar este proceso para obtener mayor pureza utilizando otras mezclas de solventes) donde se obtuvo 75,2 mg por gramo del posible ácido fenólico y de su glicósido 16,6 mg/gr, cantidades que generan gran interés para futuras investigaciones.

## CONCLUSIONES

- Se concluye en la evaluación fitoquímica al extracto etanólico de la hojas de la especie *Zanthoxylum fagara* se determinó existen hasta 7 subgrupos de metabolitos secundarios los cuales fueron: flavonoides, ácidos fenólicos, glicósidos, leucoantocianidinas, antraquinonas, triterpenos y alcaloides; los más abundantes fueron por su mayor reacción fueron: flavonoides, ácidos fenólicos, antraquinonas y alcaloides que tienen un uso farmacológico como antioxidantes, antibacterianos y antimutagénicos sobre todo. La Cromatografía en Capa Delgada y Cromatografía en Columna fueron principalmente para las pruebas de separación y purificación.
- Los metabolitos secundarios que se lograron detectar por los procesos de UHPLC de los subgrupos de metabolitos secundarios que más sobresalieron fueron 3 posibles analitos de flavonoides y/o ácidos fenólicos; 5 posibles analitos de antraquinonas y 4 probables analitos de alcaloides, al compararse los espectros UV con otros componentes se encontró similitudes postulándose que pueden pertenecer a ácidos fenólicos, antraquinonas y alcaloides respectivamente, en el caso de los alcaloides se dice que en sus hojas fueron encontradas skimmianina y laurifolina, no se descartan sus presencia; sin embargo, se concluye que para conocer la estructura de cada uno de estos compuestos es necesario el uso de MS o RMN.
- Las hojas de Shapilloja obtuvieron un rendimiento en extracto etanólico promedio de 7,11% y un porcentaje de humedad promedio de 74,36%. Por último, del metabolito detectado como el más predominante en el extracto por UHPLC (que puede ser sujeta a modificaciones para mejores resultados) se logró obtener 75,2 mg/gr de extracto postulando que pertenece al grupo de ácidos fenólicos, y del glicósido al que posiblemente estaba unido 16,6 mg/gr de extracto; por otra parte para establecer las estructuras químicas de estos componentes se buscó mejorar el trabajo con el apoyo de la Universidad de Salamanca en España; pero por factores externos no se pudo concretar la colaboración, concluyéndose que los resultados son una base para futuras investigaciones al ser un trabajo preliminar e inédito sobre las hojas la especie *Zanthoxylum fagara*.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda con respecto a las metodologías a usar para la evaluación fitoquímica y de la detección de metabolitos secundarios por UHPLC que se tome en cuenta cada proceso y cada condición para realizar los experimentos debido a que si se procesa de distinta manera se pueden presentar cambios que no expresen con claridad los resultados.
- Para los procesos de evaluación fitoquímica se recomienda el uso de la marcha fitoquímica preliminar como método de detección general principal de grupos y subgrupos de metabolitos secundarios, y a los procesos de CCD y CC solo para comprobación por fluorescencia pero esencialmente para separación y purificación.
- Se recomienda mejorar la identificación de metabolitos secundarios por UHPLC, acoplando a técnicas de Espectrofotometría de Masas o Resonancia Magnética Nuclear para poder definir con certeza la estructura química de cada uno, para ello es de suma necesidad la compra de equipos que ayuden el proceso o realizar convenios con Universidades internacionales que cuenten con esta tecnología como el caso de la Universidad de Salamanca en España.
- Para los procesos referentes a la cuantificación de subgrupos de metabolitos secundarios se recomienda el uso de Espectrofotometría UV-Vis, a fin de mejorar estos procedimientos y se efectúe en un ambiente propio de un trabajo de investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, A. (2018). *Cromatografía en Placa Fina*. Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de: <https://docplayer.es/53696350-Cromatografia-en-placa-fina.html>
- Akerele, O. (1993). *Las Plantas Medicinales: Un tesoro que no debemos desperdiciar*. Foro Mundial de la Salud, vol. 14, pp (390-395).
- Albornoz, A. (1993). *Medicina Tradicional Herbaria (Guía de Fitoterapia)*. Instituto Farmacoterápico Latina. Caracas, Venezuela, pp 564.
- Amaro-Luis, L., Fronczek, F., Massanet, G., Pando, E., Rodríguez-Luis, F., Watkins, S. & Zubía, E. (1988). *Meridinol, a Lignan from Zanthoxylum fagara*. Revista Phytochemistry, vol. 27, núm. 12, (1988), pp (3933-3935). Doi: 10.1016/0031-9422(88)83048-6
- Ambientum (2019). *Fitoquímica*. Diccionario de Términos Medioambientales, Letra F. Recuperado de: <https://www.ambientum.com/diccionario-de-terminos-medioambientales-letra/f#>
- Ardoino, S., Boeris, M. & Toso, R (2013). *Caracterización Fitoquímica de Prosopis flexuosa var. flexuosa (Algarrobo) y Prosopis flexuosa var. depressa (Alpataco), plantas con Acción Farmacológica*. Revista de Ciencias Veterinarias, vol. 15, núm. 1, (2013), pp (1115-125). ISSN 1515-1883. Recuperado de: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1778>
- Areal, R. & Bessa, J. (1966). *La Cromatografía de Capa Fina y sus Aplicaciones al Campo Textil*. Boletín del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial, núm. 25, (1966), pp (6-26). ISSN 1131-6756. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/handle/2099/5544>
- Ávalos, A. & Pérez-Urria, E. (2004). *Metabolismo Secundario de Plantas*. Revista Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, vol. 2, núm. 3, (2009), pp (119-145). ISSN: 1989-3620. Recuperado de: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Baca, D. & Ramírez, H. (2008). *Estudio Etnobotánico y Etnofarmacológico de Especies Vegetales de Interés Medicinal y Análisis Fitoquímico Cualitativo de las Especies más Representativas de la Comunidad Nativa de Santa Rosa de Huacaria, Distrito de*

- K'osñipata - Cusco*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Benítez, G. (2016). *Farmagnosia I: Introducción, definición y objetivos de la disciplina. Recolección, conservación y cultivo de plantas medicinales*. Revista Micobotánica-Jaén. Año XI N° 1 (2016), ISSN 1886-854, pp (86-126). Recuperado de: <https://www.micobotanicajaen.com/Revista/Hemeroteca/PDF/A11N01.pdf>
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. & Velázquez, D. (2005). *La Investigación Etnobotánica sobre Plantas Medicinales: Una Revisión de sus Objetivos y Enfoques Actuales*. Revista Interciencia vol. 30, núm. 8, agosto (2005), ISSN 0738-1844, pp (453-459), Venezuela. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33910703.pdf>
- Bernal, E. (2013). *Estudio Etnobotánico, Etnofarmacológico de Especies Aromáticas Usadas en Ceremonias de Ayahuasca por la Etnia Huarayo (Puerto Maldonado)*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Bhanot, D. (2013). *How to Read a Chromatogram?* Lab – training, Experience Beyond Books. Recuperado de: <http://lab-training.com/2013/12/27/how-to-read-a-chromatogram/>
- Bocanegra, M. (2007). *Estudio preliminar de la Composición Fitoquímica en Extractos de Comos de la especie Jergón Sacha (Dracontium lorentense krause) y su Variación según su Ubicación Geográfica*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.
- Booksh, K. & Kowalski, B. (1994). *Theory of Analytical Chemistry*. Revista Analytical Chemistry, vol. 66, núm 15, august (1994), pp (782A-791A). Doi: 10.1021/ac00087a718
- Bravo, A. & Acuña, W. (2015). *Evaluación Fitoquímica y Determinación de Flavonoides en Hojas de Ficus benjamina L.* Universidad Agraria La Molina. Revista Xilema, vol. 28, núm. 1, (2015), pp (61-67). ISSN 1997-6496 Recuperado de: <http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/xiu/index>
- Brooker, C. (2010). *Diccionario Médico*. Editorial, El Manual Moderno S.A. de C.V. 1<sup>ra</sup> Edición en Español, traducida de la 16<sup>va</sup> Edición en Inglés.

- Bussmann, R. & Sharon, D. (2015). *Plantas Medicinales en los Andes y la Amazonía, LA Flora Mágica y Medicinal del Norte del Perú*. Centro William LBrown – Jardín Botánico de Missouri. Editorial GRAFICART SRL.
- Camacho, E. & Soncco, V. (2005). *Estudio Etnobotánico, Etnofarmacológico y Determinación de la Bioactividad de las Plantas Medicinales Más Representativas de las Comunidades de Ampay y Huandar del Distrito de Pisac - Cusco*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N. & Rueda, D. (2009). *Análisis Fitoquímico Preliminar de Hojas, Tallos y Semillas de Cupatá (Strychnos schultesiana krukoff)*. Revista Colombiana Forestal, vol. 12, núm. 1, diciembre (2009), pp (161-170). Doi: 10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2009.1.a11
- Castillo S, E., Castillo V, S., Reyes, C. (2004). *Estudio Fitoquímico de Plukenetia volubilis L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato en hígado de Rattus rattus var. albinus*. Revista UCV – SCIENTIA, vol. 2, núm. 1 (2010), pp (11-21), ISSN 2077-172X. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6181502>
- Chávez-Reyes, R. & Plaza, A. (2001). *Estudio Químico Comparativo de “Uña de gato” (Uncaria tomentosa Willd. DC y Uncaria guianensis (Aubl) Gmel)*. Primera Reunión Internacional del Género Uncaria (Villegas, L. & Lock, O., Eds). Iquitos, Perú, pp (122-132).
- Chiriboga, X. (2005). *Manual de Técnicas Experimentales utilizadas en el estudio preclínico de Fármacos con Actividad Gastrointestinal. Obtención del Material Vegetal y preparación del material vegetal para la investigación*. Proyecto X 10, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinoza-Galván, D. & Rodríguez-Landa, J. (2004). *Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*. Revista Biomed 2004; vol. 15, pp (123-136). Recuperado de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb041527.pdf>
- Cosme, I. (2008). *El Uso de Plantas Medicinales*. Universidad Veracruzana Intercultural, Revista Intercultural, Trabajo Escolar: Fragmento, enero (2008), pp (23-26). Recuperado de: <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/8921>

- De Zan, M. (2011). *Utilización de Quimiometría para Mejorar el Rendimiento de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Aplicación a la Determinación de Sustancias de Interés Biológico en Muestras de Composición Compleja*. (Trabajo de Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral – Argentina.
- Decreto N° 150/1992. *Normas para el registro, elaboración, fraccionamiento, prescripción, expendio, comercialización, exportación e importación de medicamentos. Ámbito de aplicación*. Buenos Aires, Argentina, 20 de enero de 1992.
- Depositphotos (2018). *Color de separar por cromatografía en columna*. Recuperado de: <https://sp.depositphotos.com/205910894/stock-photo-separate-color-column-chromatography.html>
- Diccionario de Cáncer (2019). *Antraquinona*. Instituto Nacional del Cáncer, de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/antraquinona>
- Diéguez-Hurtado, R., Garrido-Garrido, G., Prieto-González, S., Iznaga, Y., González, L., Molina-Torres, J., Curini, M., Epifano, F. & Marcotullio, M. (2003). *Antifungal Activity of some Cuban Zanthoxylum Species*. Elsevier Science B. V. Revista Fitoterapia vol. 74, núm. 4, junio (2003), pp (384-386). Doi: 10.1016/S0367-326X(03)00048-0
- Dinesh, K., Rina, D. & Anil, B. (2013). *Phytochemical Screening and HPLC Analysis of Flavonoid and Anthraquinone Glycoside in Zanthoxylum armatum Fuit*. Revista International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 5, núm. 3, (2013), pp (190-193). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/286852131\\_Phytochemical\\_screening\\_and\\_HPLC\\_analysis\\_of\\_flavonoid\\_and\\_anthraquinone\\_glycoside\\_in\\_Zanthoxylum\\_armatum\\_fruit](https://www.researchgate.net/publication/286852131_Phytochemical_screening_and_HPLC_analysis_of_flavonoid_and_anthraquinone_glycoside_in_Zanthoxylum_armatum_fruit)
- Dominguez, X., Benavides, L. & Butruille, D. (1974). *Les Bases Quaternaires de la Racine de Zanthoxylum fagara*. Revista Phytochemistry, vol. 13, núm. 3, march (1974), pp 680. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)91391-8
- Dreyer, D. & Brenner, C. (1980). *Chemaxonomy of the Rutaceae. Part XIII. Alkaloids of some Mexican Zanthoxylum species*. Revista Phytochemistry, vol. 19, núm. 5, (1980), pp (935-939). Doi: 10.1016/0031-9422(80)85141-7

- Escandar, G., Olivieri, A., Faber, N., Goicoechea, H., Muñoz, A. & Poppi, R. (2009). *Estudios Preliminares de los Extractos de Especies de Cassia y Evaluación de la Actividad Antiparasitaria*. Revista BIOFARBO, vol. 17, núm. 1, (2009), pp (54-58). ISSN 1813-5363. Recuperado de: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632009000100008&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632009000100008&script=sci_arttext)
- Espinoza, B., Zinnet, H., Ruiz, G., Gutierrez, D., Gimenez, A. & Ninoska, F. (2007). *Second- and Third-order Multivariate Calibration: Data, Algorithms and Applications*. Revista TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 26, núm. 7, July – August (2007), pp (752-765). Doi: 10.1016/j.trac.2007.04.006
- Estivill, G. (2012). *Polaridad y fuerzas Intermoleculares, Polaridad de las moléculas*. Qui-  
mi.com. Recuperado de: <https://quimicom.files.wordpress.com/2012/06/polaridad-de-las-molc3a9culas-v2.pdf>
- Flores-Morales, V., Castañeda, O., Montiel, T. & Hernández, G. (2014). *Análisis Fitoquímico Preliminar del Extracto Hexánico de Hojas de Hemiphylacus novogalicianus, una Especie Endémica de México*. Revista Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, núm. 63, septiembre – diciembre (2014), pp (18-23). ISSN 1665-4412. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5473852>
- Gamboa, N. (1991). *El Empleo de la Derivada en la Espectroscopia Ultravioleta-Visible*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias. Revista de Química, vol. 5, núm. 2, diciembre (1991), pp (179-195). Recuperado de: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/4630>
- Gilman, E. (1999). *Zanthoxylum fagara – Wild Lime*. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. Fact Sheet FPS-619, October (1999). Recuperado de: <http://hort.ufl.edu/shrubs/ZANFAGA.PDF>
- Gomis, V. (2008a). *Tema 2. Cromatografía: Principios Generales*. Universidad de Alicante, Departamento de Ingeniería Química. Recuperado de: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8246>
- Gomis, V. (2008b). *Tema 4. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*. Universidad de Alicante, Departamento de Ingeniería Química. Recuperado de: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8248>

- Gutiérrez, J., Reyes, H. & Castañeda, J. (2017). *Análisis Fisicoquímico de las Hojas de eucalipto camaldulensis y su hidrolizado, como sustrato en la producción xilitol*. Revista Entre Ciencia e Ingeniería, año 11, núm. 22, segundo semestre (2017), pp (76-83). ISSN 1909-8367. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1909-83672017000200076](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1909-83672017000200076)
- IDAL (2011). *Determinación de Humedad, Método en Estufa de Aire*. IDAL S. A., Área de Laboratorio – Control de Calidad 10. Recuperado de: <http://www.idal.cl/sgcidal/images/stories/Procedimientos/Laboratorio/Determinacion%20humedad%20metodo%20estufa%20de%20aire.pdf>
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (2010). *Base de Datos, Plantas Medicinales*. Programa de Investigación de Biodiversidad Amazónica, Proyecto: Prospección y evaluación de sustancias bioactivas y productos naturales. Recuperado de: [http://www.iiap.org.pe/Archivos/Publicaciones/Publicacion\\_1586.pdf](http://www.iiap.org.pe/Archivos/Publicaciones/Publicacion_1586.pdf)
- Kai, Z., Xiao-Jie, L., An-Na, G., Yi-Na, H., Qian, B. & Hong, G. (2014). *Antioxidant and Cytoprotective Activities of Flavonoid Glycosides-rich Extract from the Leaves of Zanthoxylum bungeanum*. Revista Journal of Food and Nutrition Research, vol. 2, núm. 7, (2014), pp (349-356). Doi: 10.1016/S0031-9422(00)82948-9
- Kuck, A., Albonico, S., Deulofevu, V. & Escalante, M. (1967). *Alkaloids from Argentine Fagara Species*. Revista Phytochemistry, vol. 6, núm. 11, november (1967), pp (1541-1550). Doi: 10.12691/jfmr-2-7-4
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Iabuckas, D., López, L., Torres, M. & Maestri, D. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de química Orgánica*. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Editorial Grupo Encuentro. 1<sup>ra</sup> Edición.
- Lancelotti, P. (2008). *La Cromatografía y su Aplicación en Alimentos*. Revista Alimentación Latinoamericana, núm. 270, pp (36-39). Recuperado de: <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/handle/123456789/1148>
- Llontop, N. & Rojas, L. (2016). *Tamizaje fitoquímico y efecto antifúngico in vitro del extracto fluido de las hojas de Phthirusa robusta Rusby (suelda con suelda) frente a Candida albicans*. (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Trujillo.

- Lock, O. (2016). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales*. Departamento de Ciencias – Pontificia Universidad Católica del Perú. Editorial, K&J Soluciones Gráficas de Elit León Atauqui. 3<sup>ra</sup> Edición.
- López, M., Triana, J., Pérez, F. & Torres, M. (2005). *Métodos Físicos de Separación y Purificación de Sustancias Orgánicas*. Departamento de Química, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Servicio de Reprografía, Encuadernación y Autoedición de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).
- Macías, V., Coy, E. & Cuca, E. (2011). *Análisis Fitoquímico Preliminar y Actividad Antioxidante, Antiinflamatoria y Antiproliferativa del Extracto Etanólico de Corteza de Zanthoxylum fagara (L.) Sarg. (Rutaceae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2011:16(1), pp (43-53). ISSN 1028-4796. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1028-47962011000100005&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1028-47962011000100005&lng=pt&nrm=iso)
- Mabry, T., Markham, K. & Thomas, M. (1970). *The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. In: The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp (41-164). Doi: 10.1007/978-3-642-88458-0\_5
- MacNair, J., Lewis, K. & Jorgenson, J. (1997). *Ultrahigh-pressure Reversed-phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns*. Revista Analytical Chemistry, vol. 69, núm. 6, march (1997), pp (983-989). Doi: 10.1021/ac961094r
- Mamani, R., Callata, Y., Chavez, B., Tarqui, K., Pacci, D. & Choque, E. (2017). *Leuco – Antocianinas, Taninos y Quinonas*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/391665271/LEUCOANTOCIANINAS-QUINONAS>
- Márquez, L., Agüero, J., Hernández, I., Garrido, G., Martínez, I., Diéguez, R., Prieto, S., Rivas, Y., Molina-Torres, J., Curini, M. & Delgado, R. (2005). *Anti-inflammatory Evaluation and Phytochemical Characterization of some Plants of the Zanthoxylum genus*. Revista Latinoamericana de Farmacia. Acta Farmacéutica Bonaerense, vol. 24, núm. 3, (2005), pp (325-330). ISSN 0326-2383. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/230576718\\_Anti-inflammatory\\_evaluation\\_and\\_phytochemical\\_characterization\\_of\\_some\\_plants\\_of\\_the\\_Zanthoxylum\\_genus](https://www.researchgate.net/publication/230576718_Anti-inflammatory_evaluation_and_phytochemical_characterization_of_some_plants_of_the_Zanthoxylum_genus)

- Martín-Yerga, M. (2010). *Cromatografía de Capa Fina*. KTH – Department of Chemical Engineering and Technology. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/yerga/cromatografia-de-capa-fina>
- Medina, H. (2009). *Capítulo 3. Movimiento Ondulatorio y Ondas*. Repositorio Institucional de la Pontificia Universidad Católica de Perú, Sistema de Bibliotecas PUCP, Textos, Proyecto de Digitalización de Textos editados por el Fondo Editorial y otros aportes . Física 1, Capítulo 3. Recuperado de: <http://repositorio.pucp.edu.pe/index/handle/123456789/7139>
- Min, C., Yan, Z., Xiaoling, W., Rui., L., Xun, L. & Lisheng, D. (2007). *Rapid Structural Characterization of Isomeric Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from the Roots of Zanthoxylum nitidum by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Revista Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 21, núm. 12, (2007), pp (1931-1936). Doi: 10.1002/rcm.3045
- Miño, G. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – Ecuador.
- Missouri Botanical Garden (2019). *Zanthoxylum fagara (L.) Sarg.* Tropicos – Missouri Botanical Garden. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/28100538>
- Morales, R. (1996). *Farmacología y Farmacognósia como Fuentes de Validación Contraste en Etnobotánica*. Monografías Jardín Botánico Córdoba 3:93-98 (1996). Recuperado de: <https://www.uco.es/ucopress/ojs/index.php/rejabot/article/view/8349/7824>
- Moyna, P. (2002). *Historia(s) de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 1, núm. 3, septiembre (2002), ISSN 0717-7917, pp (24-26), Chile. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85610304>
- Ordaz, C., Clemente, R., López, E., De la Garza, M. & Arriaga-Alba, M. (2014). *Estudio de Mutagenicidad y Actividad Antibacteriana de Erythrina herbacea, Zanthoxylum caribaeum y Dendropanax arboreus*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 45, núm. 1, (2014), pp (78-85). ISSN 1870-0195. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952014000100009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000100009)

- Organización Panamericana de la Salud (2019). *Situación de las Plantas Medicinales en Perú*. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales OPS/OMS Lima – Perú (2018). OPS/PER/19-001.
- Otazu, I. (2010). *Influencia de la Temperatura y Tiempo de Secado en la Calidad de las Hojas de Cymbopogon Citratus D.C. STAF*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidade Federal de Viçosa y Universidad Pública de Navarra, Brasil.
- Palacios, M. (2012). *Metabolitos Primarios y Secundarios*. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Escuela de Farmacia y Bioquímica, Curso de Farmacognosia y Fitoquímica, Tema 04. Recuperado de: [http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA\\_04.pdf](http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf)
- Panichayupakaranant, P., Sakunpak, A. & Sakunphueak, A. (2009). *Quantitative HPLC Determination and Extraction of Anthraquinones in Senna alata Leaves*. Revista Journal of Chromatographic Science, vol. 47, núm. 3, march (2009), pp (197-200). Doi: 10.1093/chromsci/47.3.197
- Pássaro, C., Rivera, C., Román, M., Cardona, L., Muños, L., David, D., Quiceno, J. & Rojas, L. (2016). *Guía Sobre Principios Básicos de Cromatografía y sus Aplicaciones*. Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/4694>
- Peiyong, S., Yufeng, Z., Qirong, S., Weidong, Z. & Yiyu, C. (2006). *Quantitative Determination of Three Protoberberine Alkaloids in Jin-Guo-Lan by HPLC-DAD*. Revista Chromatographia, vol. 64, núm. 3-4, august (2006), pp (163-168). Doi: 10.1365/s10337-006-0006-8
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. & Bravo, J. (2014). *Compuestos Fenólicos y su Presencia en Alimentos*. Revista Boliviana de Química, vol. 31, núm.2, julio – diciembre (2014), pp (68-81). ISSN 0250-5460. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339682006>
- Pereira, C., Rodrigues, T. & Yariwake, J. (2014). *Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method*. Revista Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 25, núm. 8, august (2014), pp (1472-1483). Doi: 10.5935/0103-5053.20140130

- Pérez, G. (2008). *Espectrometría Ultravioleta-Visible*. Espectrometría .com. Recuperado de: [https://www.espectrometria.com/espectrometra\\_ultravioleta-visible](https://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)
- Pérez, S., Tamayo, T., Rojas, S. & Jiménez, C. (2015). *Estudio Cualitativo de Sustancias Activas Presentes en la Planta Adiantum capillus veneris L.* Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta, vol. 40, núm. 4, abril (2015). ISSN 1029-3027. Recuperado de: <http://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/72>
- Pino, J., Agüero, J., Marbot, R. & Fernandes, P. (2005). *Composition of the essential Oil of Zanthoxylum fagara (L.) Sargent. from Cuba.* Revista Journal of Essencial Oil Research, vol. 17, núm. 4, pp (413-414). Doi: 10.1080/10412905.2005.9698947
- Ponce, J., Guadalupe, L. & Arana, C. (2015). *Estudio Bromatológico de Rosmarinus officinalis L. "Romero" y Obtención del Aceite Esencial.* Revista Ciencia e Investigación, vol. 18, núm. 1, (2015), pp (9-13). ISSN: 1609-9044. Recuperado de: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/13599>
- Poudel, A., Kim, S., Lamichhane, R., Kim, Y., Jo, H. & Jung, H. (2013). *Quantitative Assessment of Traditional Oriental Herbal Formulation Samhwangsasim-tang Using UPLC Technique.* Revista Journal of Chromatographic Science, vol. 52, núm. 2, february (2013), pp (176-185). Doi: 10.1093/chromsci/bmt008
- Puelles, M., Briz, T., Briz, J., De Felipe, I., Flores, M., Galán, J., Gómez, V., Pérez, J. & Siura, S. (2010). *Plantas Medicinales del Perú, Etnobotánica y Viabilidad Comercial.* Editorial, los libros de la catarata, 2010. Rodríguez, A. & Pérez, A (2017). *Métodos Científicos de Indagación y de Construcción del Conocimiento.* Universidad EAN, Revista Escuela de Administración de Negocios, núm. 82, (2017), pp (1-26). ISSN 0120-8160. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=20652069006>
- Rojas, N. & Del Castillo, C. (2015). *Actividad Antibacteriana in vitro del Extracto Acuoso y Etanólico de las Hojas de Chenopodium ambrosioides (Paico), Frente a Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli, Mediante los Métodos de Difusión en Agar y Macrodilución. Iquitos – Perú – 2015.* (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Ruíz, C. (2014). *Evaluación de la Actividad Tóxica de los Extractos de la Torta de Piñón Blanco (Jatropha curcas L.) en Termitas (Coptotermes formosanus).* (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

- Ryuichi, S., Naoko, M., Takeshi, U., Takako, I., Tsutomo, S., Hiroshi, N., Masa, H. & Tomio T. (1991). *Dioxamycin, a New Benzo[a]Anthraquinone Antibiotic*. Revista The Journal of Antibiotic, vol. 44, núm. 4, April (1991), pp (396-402). Recuperado de: <https://www.semanticscholar.org/paper/ANTHRAQUINONE-ANTIBIOTIC-Sawa-Matsuda/b1d2b0836beac070fafd5cd64abc099c3657596f>
- Salaverry, O. (2012). *Plantas Medicinales y Medicina Moderna*. Boletín - Instituto Nacional de Salud 2012; año 18 (7-8) septiembre – octubre, pp (155-157). Recuperado de: <https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/374/BOLETIN-2012-set-oct-155-157.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, M. & Anicaina, N. (2015). *Contenido De Polifenoles Totales Y Actividadantioxidante In Vitro Del Extracto Etanólico Dehojas Y Flores De Chuiraga spinosa Less huamanpinta*. (Tesis para Título). Facultad De Farmacia Y Bioquímica. Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" De Ica.
- Santiago, L. (2011). *Etude Phytochimique de Plante Médicinales des Andes Vénézuéliennes: Zanthoxylum rhoifolium LAM (Rutaceae) et Bulnesia arborea Cl. Gay (Zygophyllaceae)*. (Tesis Doctoral). École Doctorale Des Sciences Chimiques. L'Université Bordeaux 1. Thèse en Cotutelle, N° d' ordre 4273.
- Segura, M. (2003). *Diseños Cuasiexperimentales*. Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública. Recuperado de: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/disenos\\_cuasiexperimentales.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/disenos_cuasiexperimentales.pdf)
- Seminario, J. (2017). *Determinación de Metabolitos Secundarios en Perezia pinnatifida (Bonpl.) Wedd. y su Caracterización Morfohistológica*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Sirard, T. (2012). *Fundamentals of HPLC*. Waters Corporation, The Science of What's Possible. Recuperado de: [https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar\\_TRS\\_102012.pdf](https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf)
- Skoog, D., West, D., Holler, F. & Crouch, S. (2014). *Fundamentos de Química Analítica*. Stanford University. Editorial Brooks/Cole, Cengage Learning. 9<sup>na</sup> Edición.

- Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (2014). *El Cromatograma*. Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines – SECyTA. Recuperado de: <https://www.secyta.es/es/node/25>
- Solis, J. & Cañedo, J. (2018). *Efecto Antiinflamatorio del Extracto Metanólico de las Hojas de Achyrocline alata (H.B.K.) D.C. "Ishpingo" en Edema Subplantar Inducido en Ratas Albinas*. (Trabajo de Tesis para Título). Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.
- Stermitz, F., Caolo, M. & Swinehart, J. (1980). *Chemistry of Zanthoxylum. Part 4. Alkaloids and other constituents of Zanthoxylum williansii, Z. monophyllum, and Z. fagara*. Revista Phytochemistry, vol. 19, núm. 7, (1980), pp (1469-1472). Doi: 10.1016/0031-9422(80)80197-X
- Stevan, L. (2013). *Introducción a la Cromatografía, Seminario de la Historia de la Cromatografía*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/190123446/Introduccion-a-la-cromatografia>
- Thermo Fisher Scientific (2016). *Standard Systems more UHPLC for All*. Thermo Scientific. Recuperado de: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70154-LC-UltiMate-3000-Standard-BR70154-EN.pdf>
- Universidad Nacional Autónoma de México (2007). *Técnicas Cromatográficas*. Facultad de Química, Química Analítica Instrumental II. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Vela, R. (2017). *Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos e Minerales em Feijão Comun (Phaseolus vulgaris L.)*. (Tesis para Grado de Maestro en Ciencias). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- Verma, S., Nigam, S., Jain, C., Pant, P. & Padhi, M. (2011). *Microwave-assisted Extraction of Gallic Acid in Leaves of Eucalyptus x hybrida Maiden and its Quantitative Determination by HPTLC*. Revista Der Chemica Sinica, vol. 2, núm. 2, January (2011), pp (268-277). Recuperado de: <http://www.imedpub.com/articles/microwaveassisted-extraction-of-gallic-acid-in-leaves-of-eucalyptus-xhybrida-maiden-and-its-quantitative-determination-by-hptlc.pdf>

- Vinod, B., Sushila, S., Neeraj, K., Upendra, S. & Bikram, S. (2016). *Simultaneous Quantification and Identification of Flavonoids, Lignans, Coumarin and Amides in Leaves of Zanthoxylum armatum using UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS*. Revista Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 132, núm. 5, january (2016), pp (46-55). Doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.035
- Vronska, L. & Demyd, A. (2016). *Study on Standardization of Herb Melissa*. Atelim (2016). Recuperado de: <http://atelim.com/study-on-standardization-of-herb-melissa.html>
- Yongqiang, T., Chunyun, Z. & Mingquan, G. (2017). *Comparative Study on Alkaloids and their Anti-proliferative Activities from Three Zanthoxylum Species*. Revista BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 17, núm. 1, september (2017), pp (460). Doi: 10.1186/s12906-017-1966-y

**ANEXOS**

**Anexo 1:*****Especificaciones de Reactivos Usados***

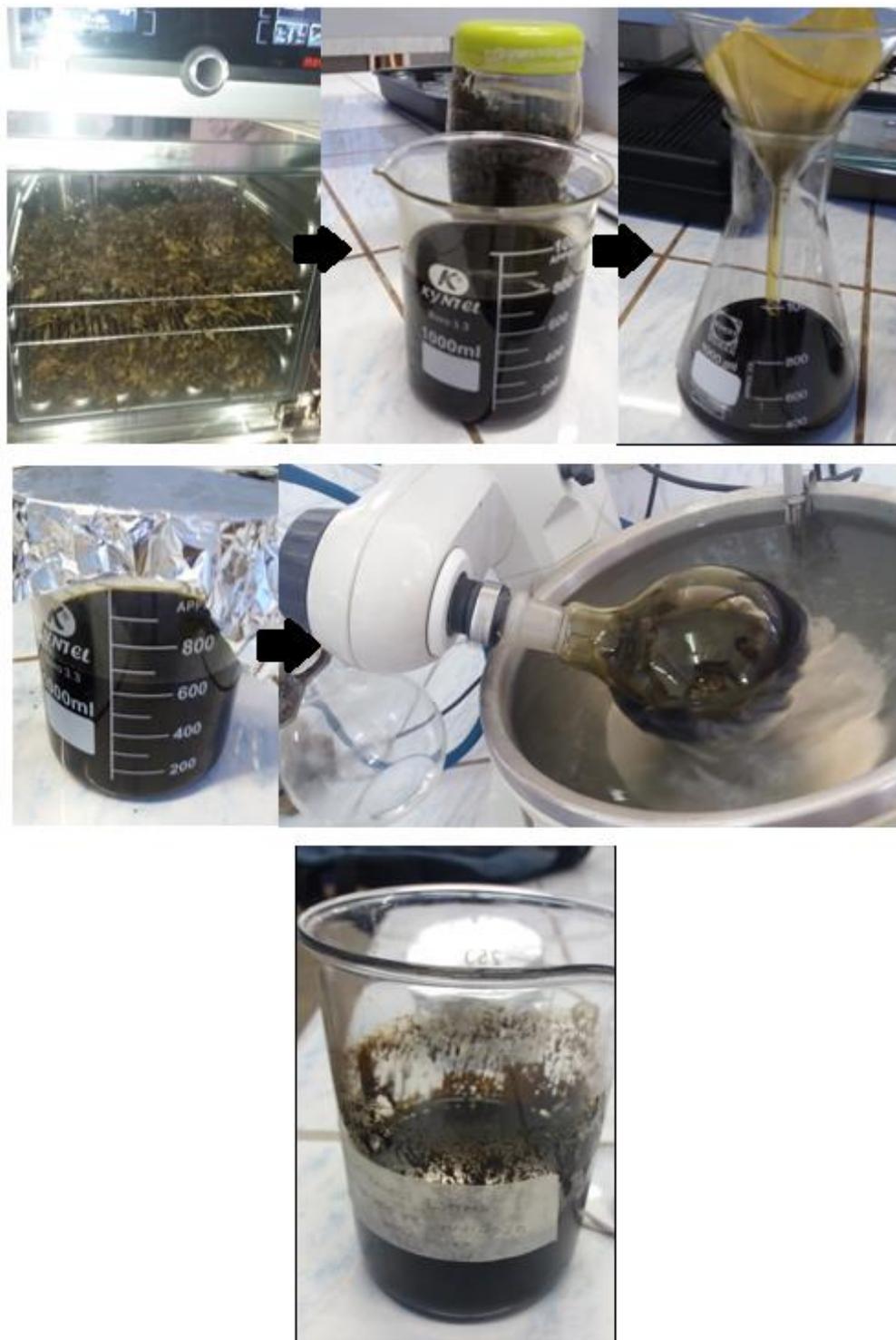
Reactivos	Especificaciones
Etanol 80 °GL	Etanol de 96 °GL reducido con H <sub>2</sub> O destilada
HCl 1%	HCl 37% de pureza reducido con H <sub>2</sub> O destilada N° CAS: 7647-01-0
NH <sub>3</sub>	N° CAS: 7664-41-7
Granallas de Zinc	N° CAS: 7440-66-6
Cloruro Férrico	98% de pureza N° CAS: 7705-08-0
Fenol	Fenol p.a. ACS, Reag. Ph Eur 99% de pureza N°CAS: 108-95-2
NaOH	NaOH EMSURE® ISO Pellets for analysis 99% de pureza CAS-No: 1310-73-2
ChCl <sub>3</sub>	Chloroform EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur for analysis 99% de pureza N° CAS: 67-66-3
Subacetato de Plomo	Subacetato de plomo Meyer® 99% de pureza N° CAS: 1335-32-6
AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur,BP,USP 97% de pureza N° CAS: 7784-13-6
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sodio EMSURE® ACS,Reag. Ph Eur for analysis 99% de pureza N° CAS: 7632-00-0
Acetonitrilo	ACN J.T. Baker® Analisis real HPLC 99.96% de pureza N° CAS: 75-05-8.
Fosfato Monobásico de Potasio	Fosfato Monobásico de Potasio EMSURE® ISO for analysis 99% de pureza N° CAS: 7778-77-0
Metanol grado HPLC	MeOH LiChrosolv® Reag. Ph Eur 99.9% de pureza N° CAS: 75-05-8
Metanol grado Reactivo	MeOH LiChrosolv® Reag. Ph Eur 99.9% de pureza N° CAS: 75-05-8

---

Ácido Fórmico	Ac. Fórmico Merck® Pro Analyti 98% de pureza N° CAS: 64-18-6
Ácido Acético	Ac. Acético Spectrum Chemical Mfg. Corp.® Reagent, A.C.S. 99.7% de pureza CAS-No: 64-19-7
Acetato de Etilo	Ethyl Acetate Spectrum® Reagent ACS N° CAS: 141-78-6
Silica Gel 60 F <sub>254</sub>	Silica Gel 60 F <sub>254</sub> (0,063-0,200 mm) Merck KGaA® adjusted to 40% relative humidity, suitable for dry- column chromatography

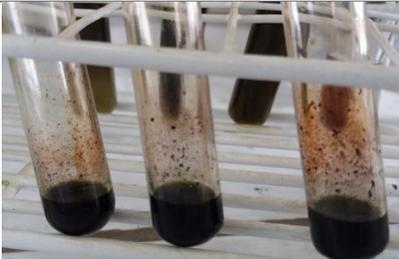
---

Fuente: Elaboración propia (2019).

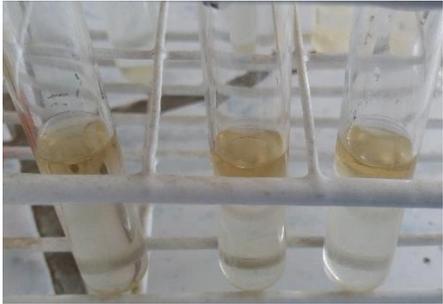
**Anexo 2:*****Obtención del extracto***

Fuente: Elaboración propia (2019).

**Anexo 3:*****Marcha Fitoquímica Preliminar***

Marcha fitoquímica preliminar			
Fracciones del extracto	Metabolito a identificar	Reacciones	Imágenes
	Flavonoides	Reacción de Shinoda	
	Taninos	Reacción con Gelatina	
Fracción A	OH fenólicos	Reacción de Cloruro Férrico	
	Hidratos de carbono	Reacción con Fenol	
Fracción B	Núcleos estereoidales y Triperpenos	Reacción de Liebermann – Burchard	

---

	Antraquinonas	Reacción de Borntrager Directa	
	Alcaloides	Reacción de Dragendorff	
Fracción C			
	Leucoantocianidinas	Reacción de Rosenheim	
Reacciones directas	Saponinas	Saponificación	

---

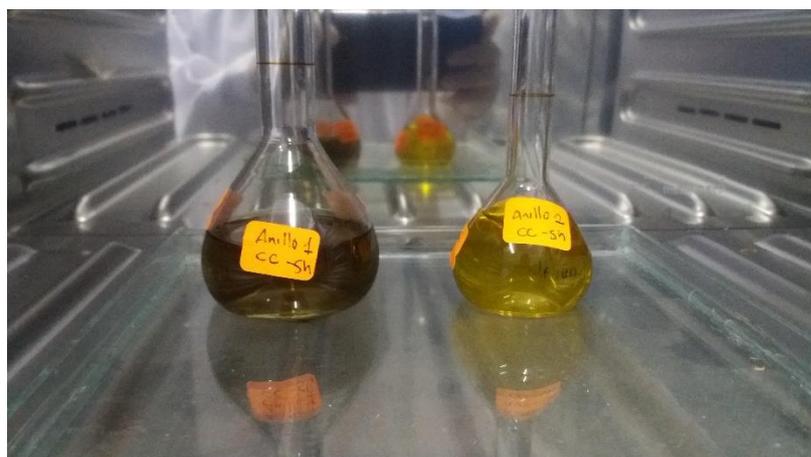
Fuente: Elaboración propia (2019).

**Anexo 4:*****Ensayo de extracción del metabolito predominante purificado***

Anillo 1



Anillo 2



Anillos extraídos en proceso de secado

Fuente: Elaboración propia (2019).