

Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg.

Rosalia González-Fernández¹, Yamilé Heredia-Díaz², Julio César Escalona-Arraz³, Yuselis Ramos-Domínguez⁴, Paul Cos⁵ & Jesús García-Díaz^{6*}

¹ Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Universidad de Ciencias Médicas, Autopista Nacional Km 11/2 s/n, Santiago de Cuba 90400, Cuba; Correo-e: rosaliagonzalez.9110@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8268-2428>

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Avenida Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500, Cuba; Correo-e: yherediad@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3863-0668>

³ Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Antofagasta 0610, Chile; Correo-e: julio.escalona@ucn.cl, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3609-4451>

⁴ Farmacia, Hospital General Docente Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso, Carretera del Caney Km 2 1/2, Santiago de Cuba 90100, Cuba; Correo-e: yusidominguez@gmail.com

⁵ Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Universidad de Amberes, Universiteitsplein 1, 2610, Amberes, Bélgica. Correo-e: paul.cos@uantwerpen.be, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4361-8911>

⁶ Departamento de Farmacognosia y Botánica Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Charles, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, República Checa. Correo-e: jgadi1990@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2309-3417>

*Autor para correspondencia: jgadi1990@gmail.com

Recibido: 1 de julio de 2024

Corregido: 21 de enero de 2025

Aceptado: 28 de enero de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115477>

RESUMEN

Introducción: El *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., es una especie medicinal usada por la población cubana, que cuenta con pocos estudios científicos. **Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y parásitos de las hojas de *Z. fagara*. **Metodología:** Al material vegetal recolectado se le determinaron los parámetros farmacognósticos según lo establecido en la norma de la OMS para materiales vegetales. La actividad antimicrobiana *in vitro* a través de métodos colorimétricos de micro-dilución se le determinó a un extracto hidroalcohólico obtenido por percolación. Al extracto se le determinaron los parámetros físico-químicos, la composición química cualitativa, así como su contenido de fenoles y flavonoides totales a través del método de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente. **Resultados:** Los parámetros farmacognósticos obtenidos fueron: humedad residual (11,5 %), cenizas totales (7,91 %), cenizas solubles en agua (2,64 %) y sustancia extraíble (agua, EtOH 30 %, 70 % y 95 %). Se identificaron los metabolitos siguientes: alcaloides, triterpenos y esteroides, aceites esenciales, flavonoides, carbohidratos, fenoles y taninos. El extracto hidroalcohólico 70% tuvo un olor característico, un color amarillo verdoso, densidad relativa de $0,9244 \pm 0,0651$; pH de 5,97, índice de refracción de 1,3605 y sólidos totales de 21,4 mg/100 mL. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 14,73 µg

de ácido gálico/mg y 3,11 µg de queracetina/mg respectivamente. El extracto no fue activo frente a bacterias y hongos, sin embargo, exhibió una potente actividad frente a los parásitos, siendo *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} = 2,48 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) el más sensible. **Conclusión:** Los resultados evidencian las potencialidades antiparasitarias de las hojas de *Z. fagara*.

Palabras claves: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., parámetros farmacognósticos, fenoles totales, flavonoides totales, actividad antimicrobiana *in vitro*

SUMMARY

Pharmacognostic study and *in vitro* antimicrobial activity of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg leaves

Introduction: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. is a medicinal species used by the Cuban population, which has scarce scientific reports. **Objective:** To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against bacteria, fungi and parasites of *Z. fagara* leaves. **Methodology:** Pharmacognostic parameters were determined as established in the WHO standard for plant materials. The *in vitro* antimicrobial activity for colorimetric microdilution methods was determined to a hydroalcoholic extract obtained by percolation. The physical-chemical parameters, qualitative chemical composition, as well as its content of phenols and total flavonoids were determined for the extract by the Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride respectively. **Results:** The pharmacognostic parameters obtained were: residual moisture (11.5 %), total ashes (7.91%), water-soluble ashes (2.64 %) and extractable substance (water, EtOH 30 %, 50 %, 70 % and 95 %). The following metabolites were identified: alkaloids, triterpenes and steroids, essential oils, flavonoids, carbohydrates, phenols and tannins. The 70% hydroalcoholic extract had a characteristic odor, a greenish-yellow color, relative density of 0.9244 ± 0.0651 ; pH of 5.97; refractive index of 1.3605 and total solids of 21.4 mg/100 mL. The content of total phenols and flavonoids was 14.73 µg of gallic acid/mg and 3.11 µg of queracetin/mg respectively. The extract was not active against bacteria and fungi, however, it exhibited potent activity against parasites, with *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} = 2.48 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) being the most sensitive. **Conclusion:** The results show the antiparasitic potential of *Z. fagara* leaves.

Keywords: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., pharmacognostic parameters, total phenolics, total flavonoids, *in vitro* antimicrobial activity.

RESUMO

Estudo farmacognóstico e atividade antimicrobiana *in vitro* de folhas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg

Introdução: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. é uma espécie medicinal utilizada pela população cubana, que possui escassos relatos científicos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias, fungos e parasitas das folhas de *Z. fagara*. **Metodologia:** Os parâmetros farmacognósticos foram determinados conforme estabelecido no padrão da OMS para materiais vegetais. A atividade antimicrobiana *in vitro* por métodos de microdiluição colorimétrica foi determinada para um extrato hidroalcoólico obtido por percolação. Os parâmetros físico-químicos, a composição química qualitativa, bem como o teor de fenóis e flavonóides totais foram determinados para o extrato pelo método de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio respectivamente. **Resultados:** Os parâmetros farmacognósticos obtidos foram: umidade residual (11,5 %), cinzas totais (7,91 %), cinzas solúveis em água (2,64 %) e substância extraível (água, EtOH 30 %, 50 %, 70 % e 95 %). Foram identificados os seguintes metabólitos: alcalóides, triterpenos e esteróides, óleos essenciais, flavonóides, carboidratos, fenóis e taninos. O extrato hidroalcoólico 70% apresentou odor característico, coloração amarelo-esverdeada, densidade relativa de $0,9244 \pm 0,0651$; pH de 5,97; índice de refração de 1,3605 e sólidos totais de 21,4 mg/100 mL. O

conteúdo de fenóis e flavonóides totais foi de 14,73 µg de ácido gálico/mg e 3,11 µg de queracetina/mg respectivamente. O extrato não foi ativo contra bactérias e fungos, porém apresentou potente atividade contra parasitas, sendo *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} = 2,48 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) o mais sensível. **Conclusão:** Os resultados mostram o potencial antiparasitário das folhas de *Z. fagara*.

Palavras-chave: *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., parâmetros farmacognósticos, fenólicos totais, flavonóides totais, atividade antimicrobiana *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de las plantas con fines medicinales se remonta desde épocas antiguas. Donde el hombre a través del tiempo ha buscado en ellas la cura para disimiles dolencias. Hoy en día, las investigaciones relacionadas con las especies vegetales se basan en fundamentar científicamente el uso etnomedicinal de estas [1]. Por lo que son cada vez más numerosas, a tal punto que en los últimos años el número de publicaciones ha ido en constante crecimiento ya que son consideradas fuentes naturales para la obtención de novedosas moléculas bioactivas [2, 3].

La medicina tradicional ha proporcionado soluciones terapéuticas para el control de agentes infecciosos [4]. Entre las enfermedades infecciosas se encuentras las bacterianas, fúngicas y parasitarias. A pesar de que existen tratamientos para estas afecciones, actualmente muchos microorganismos han creado resistencia a los antibióticos convencionales, a través de mutaciones genéticas y otros mecanismos, lo que constituye un problema de salud mundial actual [5]. Por lo que resulta de gran importancia estudiar extractos o sustancias puras aisladas de plantas medicinales, los cuales podrían contribuir a mejorar la terapéutica antimicrobiana.

A nivel mundial el género *Zanthoxylum* perteneciente a la familia Rutaceae, tiene un gran valor a nivel etnobotánico, de actividad biológica y fitoquímico [6-8]. Se reporta que diversas especies han sido utilizadas en distintas partes del mundo para el tratamiento de un sinnúmero de afecciones en humanos. Como por ejemplo en la tos, enteritis, diarrea, resfriados, reumatismo, úlceras, enfermedades de los sistemas circulatorio y respiratorio, malaria, diabetes, hipertensión, infecciones causadas por diversos agentes patógenos, entre otras [8]. Numerosos estudios de extractos y metabolitos secundarios aislados han mostrado interesante actividad anticancerígena, insecticida, antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria [9]. Estas propiedades farmacológicas ha sido asociada a la presencia de diversos compuestos tales como: alcaloides, cumarinas, terpenoides y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos) [10].

En Cuba, este género se encuentra representado por 25 especies dentro de las que se encuentra la especie *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg [11]. El cual se conoce popularmente como: amoroso, aruña gato, limoncillo, tomeguín, zarza de tomeguín y tarro de chivo. Es un arbusto muy común en todas las costas secas y pedregosas de la Isla. La hoja como la corteza se han utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades antipiréticas y sedantes. Además, se informa su uso por sus propiedades sudorífica, estimulante circulatorio y nervioso. Otros reportes en la isla, evidencia su empleo para tratar el reumatismo crónico y la sífilis [12, 13].

Se han reportado algunos estudios fitoquímicos de esta planta medicinal, en los cuales se ha demostrado la presencia de alcaloides [14], lignanos, cumarinas [15], saponinas, aceites esenciales [16], lactonas, azúcares reductores, fenoles y taninos [17]. Estos compuestos pudieran estar relacionados con las propiedades farmacológicas que han mostrado diferentes extractos, como son: antifúngica y antibacteriana [16-18]. No obstante, aún resultan limitados estos hallazgos que no permiten establecer el potencial real antimicrobiano de la especie, así como, el rol de la composición química de las hojas sobre esta actividad farmacológica. Esto

constituye un campo de interés por explorar de ahí que, se propone como objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias, hongos y parásitos de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., lo que contribuirá a enriquecer su información científica y al desarrollo futuro de preparados medicinales naturales para el tratamiento de infecciones resistentes a las terapias actuales.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., se recolectaron en la mañana, en el Palenque (poblado de Siboney; 19°58'01.1"N 75°42'49.3"W), Santiago de Cuba. Una muestra de la planta herborizada fue sometida a identificación taxonómica en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO). La misma fue depositada en el Herbario "Jorge Sierra" de dicha institución con un número de ficha 19270. El material vegetal colectado, se secó a la sombra por 10 días y fue molinada en un molino de cuchilla marca MRC Modelo KM700 (Suiza).

2.2. Determinación de los parámetros farmacognósticos de las hojas

Se determinaron parámetros farmacognósticos tales como humedad residual, cenizas totales y cenizas solubles en agua y sustancias solubles, según lo descrito en la norma *Quality control methods for herbal materials* de la organización mundial de la Salud (OMS) [19]. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se expresaron como la media ± desviación estándar.

2.2.1. Determinación de la humedad residual

La humedad residual se le determinó a través del método azeotrópico [19] y la **ecuación 1** se utilizó para el cálculo de este índice:

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

Donde, V_1 : volumen de agua inicial, V_2 : volumen final de agua (mL), M : masa de la muestra (g), y 100: factor matemático para los cálculos.

2.2.2. Determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua

Para la determinación de cenizas totales y cenizas solubles en agua [19], se empleó una mufla (Yudian/China) y las pesadas fueron realizadas en una balanza analítica (Sartorius/Alemania). Cada determinación se realizó a partir de 2 g de la muestra. Los cálculos se efectuaron por ecuaciones 2, 3, 4 y 5:

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

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

Donde, C_1 : Cenizas totales en base hidratada, C_t : Cenizas totales, M : Masa del crisol vacío (g), M_1 : Masa del crisol con la muestra de ensayo (g), M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g), 100: Factor matemático para los cálculos, y H : % humedad

Las cenizas solubles en agua (CSA) se determinaron a partir de las cenizas totales, luego de disolver las mismas en agua destilada.

$$C_1 = \frac{M_2 - M_4}{M_1 - M} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\text{CSA} = \frac{C_1 \times 100}{100 - H} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde, C_1 : % cenizas solubles en agua en base hidratada, CSA: cenizas solubles en agua, M : masa del crisol vacío (g), M_1 : masa del crisol con la muestra de ensayo (g), M_2 : masa del crisol con las cenizas totales (g), M_4 : masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g), 100: Factor matemático para los cálculos, y H : % de humedad.

2.2.3. Determinación de sustancias solubles

El ensayo de sustancias solubles [19] se llevó a cabo a partir de 5 g de la droga vegetal seca pulverizada. Los solventes utilizados fueron agua, etanol al 30%, 70% y 95%. Los cálculos fueron realizados empleando la ecuación 6:

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

Donde, H : humedad de la muestra en %, 500 y 100: factores matemáticos para los cálculos, R : residuo de la muestra (g), y M : masa de la muestra (g).

2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

2.3.1. Obtención del extracto

El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el proceso de extracción de percolación con etanol al 70 % acorde al procedimiento descrito por Díaz y colaboradores [20].

2.3.2. Determinación los parámetros físico-químicos y químicos del extracto total

Al extracto obtenido se le determinaron los parámetros físico-químicos, la composición química cualitativa y cuantitativa. Los índices numéricos son expresados como la media ($n=3$) \pm desviación estándar.

2.3.2.1. *Determinación de las características organolépticas*: al extracto total se le determinó el olor y el color.

2.3.2.2. *Determinación de pH*: se determinó en un pH-metro digital (Everich, China) con un electrodo combinado de vidrio y calomel con control de temperatura ($T 25^\circ\text{C}$).

2.3.2.3. *Determinación del índice de refracción*: se determinó con el prisma de medición de un refractómetro ABB (Carlseiss Jena, Alemania) previa calibración con agua destilada a la temperatura de 25°C .

2.3.2.4. *Determinación de la densidad relativa*: se determinó por el método de picnometría. La densidad relativa (D) se calculó mediante la ecuación matemática siguiente:

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

Donde, m : masa del picnómetro vacío (g), m_1 : masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g), y m_2 : masa del picnómetro con agua (g).

2.3.2.5. Determinación de sólidos totales: Los sólidos totales S_t se determinó por el método gravimétrico y utilizó la ecuación 8 para el cálculo:

$$S_t = \frac{P_r - P}{V} \times 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde, P_r : masa de la cápsula más el residuo (g), P : masa de la cápsula vacía (g), V : volumen de la porción de ensayo (5 mL), y 100: factor matemático.

2.3.2.6. Determinación de la composición química cualitativa: Al extracto se le determinó la composición química cualitativa (alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, saponinas, resinas, mucílagos, aceites esenciales, azúcares reductores, fenoles y taninos, aminoácidos y aminas libres, carbohidratos, flavonoides, principios amargos y/o astringentes) según lo descrito por Rivas y colaboradores [21].

2.3.2.7. Determinación de la composición química cuantitativa: Al extracto se le determinó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE.UU) [22] y por el método colorimétrico con cloruro de aluminio (Sigma-Aldrich, EE.UU) [23] respectivamente (ver material suplementario). La medición espectrofotométrica fue realizada por triplicado en un Espectrofotómetro UV/VIS de la firma PG Instruments modelo T60 a una absorbancia de 760 nm (fenoles totales) y 420 nm (flavonoides totales). Se cuantificó la cantidad de compuestos fenólicos solubles totales y flavonoides totales presentes en el extracto, mediante la construcción de una curva patrón usando como estándar ácido gálico (Sigma-Aldrich, EE.UU) y quercetina (Sigma-Aldrich, EE.UU). Los resultados se expresaron como μg equivalente de ácido gálico/mg del extracto y μg en equivalente de quercetina/mg de extracto. Las ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales, expresadas como ácido gálico y quercetina, respectivamente, fueron:

$$\text{Conc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = \frac{AGE \times D}{P} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde: AGE : ácido gálico equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$), D : factor de dilución, y P : peso de la muestra (mg)

$$\text{Conc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = \frac{QE \times D}{P} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde: QE : quercetina equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$), D : factor de dilución, y P : peso de la muestra (mg).

2.3.3. *Ensayo de la actividad antimicrobiana in vitro*

Al extracto se le determinó la actividad antimicrobiana mediante un ensayo *in vitro* integral contra un panel de microorganismos integrado por bacterias, hongos y parásitos. Se emplearon métodos de microdilución colorimétricos y de conteo directo de tinción con solución de Giemsa al 10 %. Los ensayos fueron realizados según los descrito por Diaz y colaboradores

(ver material suplementario) [24]. El extracto se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO, BDH, Poole, Inglaterra) 100% a una concentración madre de 20 mg/mL. A partir de esta disolución las muestras fueron diluidas sucesivamente 1:2 en agua desmineralizada hasta obtener 6 niveles de concentración: 128-4 µg/mL. Se emplearon como fármacos de referencia: doxiciclina (*S. aureus* y *E. coli*), flucitosina (*C. albicans*), miltefosina (*L. infantum*), benzinidazol (*T. cruzi*) y suramina (*T. brucei*); todos se compraron a Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos. Los resultados se expresaron como concentración media inhibitoria CI_{50} determinada por regresión lineal a partir de las concentraciones evaluadas, expresados como la media de dos experimentos realizados.

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

Para la actividad antiparasitaria se utilizaron las cepas de *Leishmania infantum* MHOM/MA (BE)/67, *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen CL2, β galactosidasa (sensible a nifurtimox), *Trypanosoma brucei var brucei* Squib 427 (sensible a suramina, las cuales fueron proporcionadas por el propio Laboratorio de la Universidad de Amberes. *Leishmania infantum* fue mantenida en Golden Hámster (*Mesocricetus auratus*) y las cepas de *T. cruzi* sobre células MRC-5sv2 en medio MEN, suplementado con 200 mM de L-glutamina, 16,5 mM de NaHCO₃ y 5% de suero fetal bovino. El medio Hirumi (HMI-9) fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino y se utilizó para mantener la cepa de *T. brucei var brucei*.

3. RESULTADOS

3.1. Parámetros farmacognósticos de las hojas

En la tabla 1 se muestran los resultados de los parámetros farmacognósticos obtenidos para las hojas de la especie *Z. fagara*.

Tabla 1. Comportamiento de la humedad residual, cenizas totales y solubles en agua y sustancias solubles para la hoja de *Z. fagara*.

H (%)	C _T (%)	C _{SA} (%)	SS (%)			
			agua	EtOH 30 %	EtOH 70 %	EtOH 95 %
11,5 ± 0,70	7,91 ± 0,04	2,64 ± 0,48	26,93 ± 0,00*	19,58 ± 0,00*	15,19 ± 0,00*	7,71 ± 0,00*

Leyenda: H, Humedad residual; C_T, Cenizas totales; C_{SA}, Cenizas solubles en agua, SS, sustancias solubles. El * encima de los números significa que existen diferencias estadísticas en las medias obtenidas para cada disolvente para un p-valor menor que 0,05 empleando el test de Mínimas y Máximas Diferencias Significativas de Tukey-HSD.

3.2. Determinación los parámetros físico-químicos, composición química cualitativa y cuantitativas al extracto hidroalcohólico

Los resultados de la determinación de los parámetros físico-químicos al extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Z. fagara* se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del extracto hidroalcohólico de hoja de *Z. fagara*.

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

Leyenda: DR (Densidad relativa), IR (Índice de refracción), ST (Sólidos totales).

En el extracto se evidenció la presencia cualitativa de alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, fenoles y taninos. Por su parte, cuantitativamente se determinó contenido tanto de fenoles como de flavonoides totales en el extracto de *Z. fagara*, obteniéndose que para el primero fue de $14,73 \pm 0,26$ μg de ácido gálico/mg y en el caso del segundo fue de $3,11 \pm 0,16$ μg de quercentina/mg.

3.3. Actividad antimicrobiana *in vitro*

Los resultados de actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto frente a bacterias, hongos y parásitos se muestran en la Tabla 3. Se consideró activo el extracto cuando la CI_{50} fuera menor o igual que 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [25].

Tabla 3. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de hojas de *Z. fagara* frente a bacterias, hongos y parásitos.

Bacterias y hongos CI_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$			Parásitos CI_{50} $\mu\text{g}/\text{mL} \pm S$		
Ec	Sa	Ca	Tbr	Tc	Lin
>128	>128	>128	2,48 ± 1,38	13,19 ± 13,17	13,19 ± 4,29

Leyenda: Ec (*Escherichia coli*), Sa (*Staphylococcus aureus*), Ca (*Candida albicans*), Tbr (*Trypanosoma brucei*), Tc (*Trypanosoma cruzi*), Lin (*Leishmania infantum*), CI_{50} (Concentración inhibitoria media), S (Desviación estándar).

4. DISCUSIÓN

El exceso de agua en las drogas vegetales una vez sometida a un proceso de secado puede promover el crecimiento de hongos, la presencia de insectos o provocar la hidrólisis de compuestos activos que se encuentran en el material vegetal y por consiguiente su posterior deterioro [19]. Es por ello, que los límites en el contenido de agua en el material vegetal seco deben ser determinados. La humedad residual por el método azeotrópico a las hojas de la especie *Z. fagara*, estuvo dentro de los límites establecidos por la bibliografía de referencia, la cual fue de $11,5 \pm 0,70$ % (Tabla 1). Lo que indica que el secado a la sombra utilizado permite que se conserve y se mantenga la calidad de estas, para ser usadas como posible materia prima, lográndose una mayor conservación por un tiempo prolongado. También se evita la proliferación de microorganismos y degradación de metabolitos que sean volátiles con una posible actividad farmacológica.

El contenido de cenizas totales fue otro de los parámetros determinados, indicativo de la calidad del material con que se trabaja y constituyen una base para definir su pureza e identidad. También brinda información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas, cuerpos extraños o la cantidad de estos elementos en su contenido [26]. El contenido de cenizas totales fue de $7,91 \pm 0,04$ % (Tabla 1), el cual excedió del límite permisible reportado en las Farmacopeas que es hasta el 5 % [22, 27]. Este comportamiento pudiera estar relacionado a la

presencia de cenizas fisiológicas de esta droga vegetal, que es la cantidad remanente después de la ignición del material, derivadas de los tejidos celulares [28]. Además de la posible presencia de metales alcalinos y alcalino-térreos en las hojas. Por lo que se recomienda realizar la determinación del contenido de metales en la droga seca por técnicas analítica de plasma con acoplamiento inductivo ICP. La cantidad de cenizas solubles en agua también ayudan a evaluar la pureza de la droga. Al analizar los resultados obtenidos en las hojas de *Z. fagara*, se pudo evidenciar que se haya entre $2,64 \pm 0,48$ % (Tabla 1), obteniéndose pequeños valores, lo que demuestra que una pequeña parte de las cenizas totales de esta droga presenta características polares.

Por otro lado, el ensayo de sustancias solubles evidenció que los mayores rendimientos se observan en los extractos preparados con los disolventes de mayor polaridad (agua y etanol al 30 %). No siendo así para el caso del resto de los menstruos empleados. Esto indica que las sustancias extraídas tienen un alto índice de polaridad. Según el análisis de varianza multifactorial realizado, existen diferencias estadísticas y numéricas en todos los menstruos utilizados, obteniéndose un *p*-valor menor que 0,05 (0,0000), con un nivel del 95,0 % de confianza. Teniendo en cuenta que los disolventes que resultaron ser mejores en la extracción de sustancias solubles no fueron estables microbiológicamente durante la preparación del extracto, se seleccionó el etanol al 70 % como el mejor menstruo, donde se garantiza la extracción de sustancias y la estabilidad del extracto, pues se evita la proliferación de microorganismos.

Partiendo de estos resultados se obtuvo un extracto hidroalcohólico a partir de las hojas secas de *Z. fagara* por el método de extracción de percolación y como disolvente etanol al 70%. Dentro de los parámetros físico-químicos determinados al extracto total de las hojas de *Z. fagara* (Tabla 2), se encuentran las características organolépticas, las cuales varían en los diferentes preparados farmacéuticos en dependencia del modo de preparación. En este caso al tratarse de un extracto total los parámetros evaluados fueron el color y el olor. Este presentó un olor característico propio de la especie y un color amarillo verdoso, que va en correspondencia con el que adquieren las hojas una vez que se secan. Otro de los parámetros determinados fue la densidad relativa, la cual fue de $0,9244 \pm 0,0651$ relacionando este resultado obtenido con la densidad del agua, ambas se determinaron a la misma temperatura ($T 25^{\circ}\text{C}$). También se determinó el valor del pH el cual fue de $5,97 \pm 0,061$ siendo ligeramente ácido. Este comportamiento pudiera estar relacionado con la presencia de algunos metabolitos que le aportan acidez como: fenoles, taninos y flavonoides, los cuales presentan en su estructura un grupo hidroxilo, que es el responsable de aportar la ligera acidez.

El índice de refracción (*n*) de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es valioso en la identificación de sustancias y en la detección de impurezas [29]. Se determinó el índice de refracción dando un valor de $1,36 \pm 0,0004$ a una temperatura de 25°C conociendo de esta manera el número de impurezas presentes y la transparencia del extracto. Los sólidos totales fueron de $21,4 \pm 0,042$ mg/100 mL; el cual puede ser utilizado como criterio de concentración para ensayos biológicos. Todas estas determinaciones constituyen los primeros parámetros físico-químicos de calidad a monitorear durante el proceso extractivo de las hojas de *Z. fagara*.

Los resultados de la composición química cualitativa muestran coincidencia con los descritos en otras investigaciones de *Z. fagara* pero en otros órganos. Como por ejemplo en el extracto etanólico de la corteza seca obtenido por el método de percolación con etanol al 96 %, se detectó la presencia de alcaloides flavonoides, fenoles y taninos, principalmente [17, 30-32]. También se han aislado del extracto etanólico obtenido de la corteza (estado fresco) estos mis-

mos metabolitos excepto flavonoides [17]. Y por último en los frutos de *Z. fagara* se han identificado como compuestos mayoritarios del aceite esencial el D-germacreno-4-ol, elemol y α -cadinol [6].

Para otras especies del género *Zanthoxylum*, resultan comunes los informes sobre la presencia de los mismos tipos de metabolitos. Dentro de los que podemos citar a los alcaloides, los cuales son los compuestos más relevantes, ya que se han aislado en la mayoría de las especies de este género y en todos los órganos de las plantas, por lo que son considerados marcador quimiotaxonómico para el género. La literatura científica consultada, reporta estudios en los frutos de *Z. coriaceum* y en la corteza del tallo de *Z. elephantiasis* y *Z. martinicense* a partir de los cuales se han aislado alcaloides del tipo quinolona, quinolina y benzofenantridina [30]. También se han determinado alcaloides en la especie *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb [20]. Los triterpenos son otros de los metabolitos que resultan comunes en la mayoría de las especies del género, especialmente el compuesto conocido como lupeol [6-8]. En el género *Zanthoxylum* se han aislado flavonoides glicosilados derivados de flavonol, flavonoles, flavonas y flavanonas [7, 8].

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

Para esta planta no existen reportes del contenido de fenoles ni de flavonoides totales de ahí que partiendo del resultado químico cualitativo se determinó el contenido de estos grupos de metabolitos por métodos espectrofotométricos. No obstante, existen reportes en otros órganos de especies del género *Zanthoxylum*, donde se han podido cuantificar ambos metabolitos. Tal es el caso de los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo a partir de la corteza del tallo de *Zanthoxylum alatum*, obteniéndose valores máximos del contenido de fenoles totales de 5,12 y 4,36 mg/g de ácido gálico respectivamente [33, 34]. Para esta misma especie se realizó otro estudio en el 2016, donde el contenido de fenoles y flavonoides totales en un extracto metanólico fue de $89,2 \pm 0,59$ mg/g y $63,8 \pm 0,34$ mg/g respectivamente [35]. También extractos en metanol ($59,34 \pm 0,13$ mg/g de ácido gálico) y acetona ($34,24 \pm 0,25$ mg/g de ácido gálico) de las frutas del *Zanthoxylum armatum* han presentado un alto contenido de fenoles totales. Mientras que el contenido de flavonoides fue de $0,82 \pm 0,03$ mg/g de querctetina [36].

En los tres estudios los valores reportados tanto de fenoles como de flavonoides totales resultaron ser superiores a los obtenidos en esta investigación, aunque hay que tener en cuenta que se utilizaron otros órganos de la planta diferentes al que se utilizó en *Z. fagara*. Y en dependencia del órgano que se utilice el contenido de los metabolitos secundarios puede variar, ya que ellos se acumulan en dependencia de las necesidades fisiológicas de las plantas. Además, en la producción de estos pueden influir tanto factores extrínsecos como intrínsecos [37].

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

Uno de los géneros que está constituido por especies con diversas propiedades farmacológicas es el *Zanthoxylum*. En el cual se han demostrado propiedades antimicrobianas del *Z. americanum* [38], *Z. leprieurii*, *Z. xanthoxyloides* [39], *Z. martinicense*, *Z. elephantiasis* [40], *Z.*

acanthopodium, *Z. articulatum* [41], *Z. monophyllum*, *Z. usambarens* [42], *Z. guilletii* [43], *Z. armatum* [43, 44].

El extracto evaluado no resultó activo frente a las cepas de las bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) y del hongo ensayado (*Candida albicans*). Estos resultados no coinciden con reportes realizados por varios autores donde un extracto etanólico obtenido de la corteza de esta especie se evaluó frente a *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes* y exhibió buena actividad antifúngica, en comparación con los otros extractos evaluados de otras especies de *Zanthoxylum* [17].

En otro estudio se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de esta misma especie frente a diferentes cepas gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio cholerae* caso clínico) y gram-positivas (*Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus epidermidis*), utilizando el método de difusión en agar. El mismo presentó inhibición para las cepas de *B. subtilis* (17 mm), *V. cholerae* El Tor (11 mm), *V. cholerae* caso clínico (10 mm) y *S. epidermidis* (9 mm) [43]. Para otras especies del género se ha demostrado la actividad antibacteriana y antifúngica. Los extractos metanólicos obtenidos de frutas, semillas y corteza de *Z. armatum* fueron evaluado *in vitro* contra 9 cepas bacterianas diferentes. Los extractos exhibieron notables propiedades antibacterianas, lo que sugiere el uso potencial de esta planta para el tratamiento de diferentes enfermedades bacterianas como infección de la piel, infección del tracto urinario, problemas dentales, diarrea, y disentería [32].

En una investigación realizada a extractos preparados a partir de las hojas de las especies *Zanthoxylum holtizianum* y *Zanthoxylum lindense*, se evidenció que ambos extractos presentaron menor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos que los obtenidos a partir de la corteza y la raíz. Además, de ser el *Staphylococcus aureus*, la bacteria más susceptible con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 2,5-0,625 mg/mL [45]. Por su parte un estudio conducido por Diaz y colaboradores evidenció la buena actividad de las hojas de *Z. pistaciifolium* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* [46].

En contraste a lo observado en la actividad antibacteriana y antifúngica, el extracto de mostró una potente actividad antiprotozoaria frente a todas las cepas de parásitos evaluadas (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* y *Trypanosoma brucei*), pues se obtuvieron IC₅₀ menores que 100 µg/mL [25]. En las dos primeras, se obtuvieron las mismas IC₅₀= 13,19 µg/mL; lo que demuestra que ambas tuvieron la misma sensibilidad frente al extracto. La cepa *Trypanosoma brucei*, de las tres fue la que mayor sensibilidad presentó. Estos resultados evidencian la presencia en las hojas de *Z. fagara* de posibles compuestos que pudieran afectar directamente a los parásitos o estimular mecanismos en las células hospederas para su eliminación. Dentro de estos compuestos se pueden mencionar: a los alcaloides y aceites esenciales, los cuales se identificaron cualitativamente en el extracto.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde numerosos estudios muestran la actividad frente a protozoa para varias especies de *Zanthoxylum* tanto de extractos como compuestos aislados [47]. El extracto de acetato de etilo de la corteza del tallo de *Z. chalybeum* fue activo contra cepas sensibles y resistentes de *Plasmodium. falciparum*. En estudios *in vitro*, el extracto etanólico y la fracción de hexano de la corteza del tallo de *Z. rhoifolium* mostraron actividad contra promastigotes de *Leishmania amazonensis* en 24, 48 y 72 h de tratamiento. En el mismo estudio, los alcaloides quereleritina y nitidina, aislados de *Z. rhoifolium*, mostraron actividad contra las formas amastigotes. El extracto de hojas de *Z. chiloperone* fue sensible a la cepa *Trypanosoma cruzi*, pues ocurrió la lisis total de esta a una IC₅₀ de 900 µg/mL, la cual fue superior a la que se obtuvo en este estudio contra este mismo parásito. De esta

misma especie, se aisló de extractos etanólicos obtenidos de las hojas, los frutos, la corteza y la raíz, el alcaloide 6-cantinona y algunos de sus análogos, los cuales también presentaron efecto contra *Trypanozoma* sp [48].

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta por primera vez los índices farmacognósticos de las hojas de la especie *Z. fagara* lo cual sirve de patrón de calidad preliminar. Los resultados de la composición química revelan la presencia de metabolitos bioactivos de interés para el género tales como: alcaloides, aceites esenciales y compuestos fenólicos. La actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de las hojas de *Z. fagara*, demostró una potente actividad frente a parásitos, no así frente a bacterias y hongos evaluados. El estudio revela por primera vez el potencial de las hojas de la especie para el aislamiento de compuestos con actividad antiprotozoaria.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés

AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestros agradecimientos al Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente, al Centro de Toxicología y Biomedicina (Cuba), y al Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) (Universidad de Amberes, Bélgica) por su apoyo técnico en la realización de cada uno de los ensayos y experimentos realizados. La evaluación antimicrobiana *in vitro* es resultado de la Cooperación Belga al Desarrollo a través de VLIR-UOS en el contexto del Programa de Cooperación Universitaria Institucional con la Universidad de Oriente.

REFERENCIAS

1. S. Banerjee. Introduction to Ethnobotany and Traditional Medicine. En: A.D. Talukdar, J.K. Patra, G. Das & D. Nath (editores), *Traditional Resources and Tools for Modern Drug Discovery. Ethnomedicine and Pharmacology*. Springer, Singapore, 2024; pp. 1–30. Doi: https://doi.org/10.1007/978-981-97-4600-2_1
2. E. Salmerón-Manzano, J.A. Garrido-Cárdenas & F. Manzano-Agugliaro. Worldwide research trends on medicinal plants. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, **17**(10), 3376 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
3. P.K. Mukherjee, S. Banerjee, B.D. Gupta & A. Kar. Evidence-based validation of herbal medicine: Translational approach. En P.K. Mukherjee (editor). *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Translational Research on Botanicals*. Elsevier, 2022; pp. 1–41. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00025-1>
4. H. Siddique, B. Pendry, M.A. Rashid & M.M. Rahman. Medicinal plants used to treat infectious diseases in the central part and a northern district of Bangladesh – An ethnopharmacological perception. *J. Herb. Med.*, **29**, 100484 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100484>
5. M. Rabi. The global (health) governance of antimicrobial resistance. *Globalizations*, **21**(8), 1518–1538 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1080/14747731.2024.2375455>

6. L.O.J. Patiño, R.J.A. Prieto & S.L.E. Cuca, *Zanthoxylum* genus as potential source of bioactive compounds. En: I. Rasooli (editor). *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. IntechOpen, London, 2012; pp. 185–218. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/25790>
 7. J.O. Ombito. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Zanthoxylum* (Rutaceae): a review. *J. Nat. Prod.*, **11**(1), 21–43 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2174/2210315509666191202095924>
 8. I.U. Okagu, J.C. Ndefo, E.C. Aham & C.C. Udenigwe. *Zanthoxylum* species: a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacological and nutraceutical applications. *Molecules*, **26**(13), 4023 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26134023>
 9. I.U. Okagu, J.C. Ndefo, E.C. Aham & C.C. Udenigwe, *Zanthoxylum* species: a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology in relation to cancer, infectious diseases and sickle cell anemia. *Front. Pharmacol.*, **12**, 713090 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.713090>
 10. E.S. Mutinda, F. Kimutai, E.M. Mkala, E.N. Waswa, W.O. Odago, C. Nanjala, *et al.* Ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacology of pantropical genus *Zanthoxylum* L. (Rutaceae): An update. *J. Ethnopharmacol.*, **303**, 115895 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115895>
 11. P. Acevedo-Rodríguez & M.T. Strong. *Catalogue of seed plants of the West Indies*. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington, D.C., 2012; p. 859. Doi: <https://doi.org/10.5479/si.0081024X.98.1>
 12. J.M. Amaro-Luis, F.R. Fronczek, G.M. Massanet, E. Pando, F. Rodríguez-Luis, S.F. Watkins & E. Zubía. Meridinol, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. *Phytochemistry*, **27**(12), 3933–3935 (1988). Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83048-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83048-6)
 13. J.T. Roig. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Editorial Científico-Técnica, La Habana, 2012; pp. 736–737.
 14. F. Stermitz, M. Caolo & J. Swinehart. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phytochemistry*, **19**(7), 1469–1472 (1980). Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)80197-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)80197-X)
 15. J.A. Prieto, O.J. Patiño, W.A. Delgado, J.P. Moreno & L.E. Cuca. Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. *Chil. J. Agric. Res.*, **71**(1), 73–82 (2011). URL: <https://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v71n1/at09.pdf>
 16. W.N. Setzer, J.M. Schmidt, L.C. Eiter & W.A. Haber. The leaf oil composition of *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. from Monteverde, Costa Rica, and its biological activities. *J. Essent. Oil Res.*, **17**(3), 333–335 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698923>
 17. R. Diéguez-Hurtado, G. Garrido-Garrido, S. Prieto-González, Y. Iznaga, L. González, J. Molina-Torres, M. Curini, F. Epifano & M.C. Marcotullio. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*, **74**(4), 384–386 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00048-0)
 18. Q. Li, Z. Chen, L. Zeng, Y. Bi, F. Kong, Z. Wang & S. Tan. Characterization, in-vitro digestion, antioxidant, anti-hyperlipidemic and antibacterial activities of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim essential oil nano-emulsion. *Food Biosci.*, **56**, 103082 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103082>
 19. World Health Organization. *Quality Control Methods for Herbal Materials*. WHO, Geneva, Switzerland, 2011; pp. 23–37. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241500739>
 20. Y.H. Díaz, J.C. Escalona, R.G. Fernández, A.O. Pacheco, J.G. Díaz, L.M. Fidalgo, D.G.J. Batista, C.F. da Silva & P. Cos. Trypanocidal potentialities of skimmianine an alkaloid isolated from *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb leaves. *Pharmacognosy Res.*, **12**(3), 322–327 (2020). URL: <https://phcgres.com/article/2020/12/3/104103prpr4419>
 21. C.A. Berenguer-Rivas, M. Mas-Ortiz, P.L. Batista-Corbal, J. Costa-Acosta & J.C. Escalona-Arranz. Chemical composition and *in-vitro* antioxidant activity of extracts of *Adelia ricinella* L. *Rev. Cub. Quim.*, **30**(2), 191–210 (2018). URL: <http://www.scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n2/ind02218.pdf>
 22. BP. *British Pharmacopoeia*. Her Majesty Stationery Office, London, 2016.
 23. Z. Jia, M. Tang & J. Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and theirs scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, **64**(4), 555–559 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
-

24. J. García-Díaz, E. Tuenter, J.C. Escalona-Arranz, G. Llauradó-Maury, P. Cos & L. Pieters. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. *J. Ethnopharmacol.*, **236**, 250–257 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.049>
25. P. Cos, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe & L. Maes. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.*, **106**, 290–302 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
26. I. Márquez-Hernández, T.L. Bastidas-Guerrero, G.K. Fernández-Valarezo, M. Campo-Fernández, C.G. Jaramillo-Jaramillo & L. Rojas de Astudillo. Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa Oleífera* lam cosechada en Machala. *Rev. Cubana Plant. Med.*, **22**(1), 1-8 (2017). URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla13117.pdf>
27. Z.-C. Lou. *General Control Methods for Vegetable Drugs. Comparative Study of Methods Included in Thirteen Pharmacopoeias: A Proposal on Their International Unification*. WHO/PHARM/80.502, Geneva, Switzerland, 1980; pp. 8–39.
28. M. Miranda & A. Cuéllar. *Farmacognosia y Química de Productos Naturales*. Editorial Félix Varela, La Habana, 2012; pp. 127-130, 135-147, 161-166, 186, 207, 251, 259, 276, 291-295, 292, 306, 316, 357, 664.
29. FEU/FN. Farmacopea de los Estados Unidos - Formulario Nacional. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville (MD), 2015; p. 440.
30. L. Márquez, J. Agüero, I. Hernández, G. Garrido, I. Martínez, R. Diéguez, S. Prieto, Y. Rivas, J. Molina-Torres, M. Curini & R. Delgado. Antiinflammatory evaluation and phytochemical characterization of some plants of the *Zanthoxylum* genus. *Acta. Farm. Bonaerense*, **24**(3), 325–330 (2005). URL: http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP_24_3_1_1_7XMY82Z17U.pdf
31. V.E. Macías-Villamizar, E.D. Coy-Barrera & L.E. Cuca-Suárez. Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. (Rutaceae). *Rev. Cubana Plant. Med.*, **16**(1), 43–53 (2011). URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n1/pla05111.pdf>
32. V.E. Macías, E.D. Coy B. & L.E. Cuca. Novel furocarbazole alkaloids and antibacterial activity of ethanol extract from *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. *Rev. Colomb. Quim.*, **39**(3), 333–341 (2010). URL: <http://scielo.org.co/pdf/rcq/v39n3/v39n3a03.pdf>
33. M. Mukhija & K. Nath. Antioxidant potential and total phenolic content of *Zanthoxylum alatum* stem bark. *J. Appl. Pharm.*, **6**, 388–397 (2014). <http://dx.doi.org/10.21065/19204159.6.4.357>
34. M. Mukhija, S.M. Pal, D.K. Lal & K.A. Nath. Cytotoxic and antioxidant activity of *Zanthoxylum alatum* stem bark and its flavonoid constituents. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **4**(4), 86-92 (2015). URL: <https://www.phytojournal.com/archives/2015/vol4issue4/PartB/4-3-66.pdf>
35. I. Karmakar, S. Haldar, M. Chakraborty, S. Dewanje & P.K. Haldar. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of Zanthonitrile isolated from *Zanthoxylum alatum*. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **6**(6), 119–122 (2016). Doi: <https://doi.org/10.7324/japs.2016.60621>
36. T. Seal, K. Chaudhuri & B. Pillai. Antioxidant activity of some selected wild edible fruits of North-Eastern region in India and effect of solvent extraction system. *Global J. Environ. Res.*, **6**(3), 84–90 (2012). URL: [https://idosi.org/gjer/gjer6\(3\)12/2.pdf](https://idosi.org/gjer/gjer6(3)12/2.pdf)
37. N. Verma & S. Shukla. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.*, **2**(4), 105–113 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jar-map.2015.09.002>
38. Y.N. Bafi, J.T. Arnason, J. Baker & M.L. Smith. Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. *Phytomedicine*, **12**(5), 370–377 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.005>
39. A.N. Nganea, L. Biyiti, P.H. Amvam-Zollo & P. Bouchet. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum leprieurii* Guill. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. *J. Ethnopharmacol.*, **70**(3), 335–342 (2000). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00188-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00188-9)
40. L. Ishwori, D.T. Anupam, P.K. Singh, C.M. Dutta & N. Deepa. Antibacterial activity of some selected plants traditionally used as medicine in Manipur. *Afr. J. Biotechnol.*, **13**(13), 1491–1495 (2014). URL: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/118555>
-

41. F.F.G. Rodrigues, J.G.M. Costa & H.D.M. Coutinho. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. *Indian. J. Med. Res.*, **131**, 833–835 (2010). URL: https://journals.lww.com/ijmr/Citation/2010/31060/Enhancement_of_the_antibiotic_activity_of.17.aspx
42. E.N. Matu & J.V. Staden. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, **87**(1), 35–41 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00107-7)
43. S.S. Kumar, R. Vishnoi, G.D. Kumar & K. Kishor. Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India. *J. Appl. Nat. Sci.*, **4**(1), 47–50 (2012). Doi: <https://doi.org/10.31018/jans.v4i1.220>
44. J.S. Negi, V.K. Bisht, A.K. Bhandari, R. Bisht & N.S. Kandari. Major constituents, antioxidant and antibacterial activities of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil. *Iran. J. Pharmacol. Ther.*, **11**(2), 68–72 (2012). URL: https://www.researchgate.net/publication/236328087_Major_constituents_antioxidant_and_antibacterial_activity_of_Zanthoxylum_armatum_DC_essential_oil
45. N. Phuyal, P.K. Jha, P.P. Raturi & S. Rajbhandary. *In vitro* antibacterial activities of methanolic extracts of fruits, seeds, and bark of *Zanthoxylum armatum* DC. *J. Trop. Med.*, **2020**(1), 2803063 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1155/2020/2803063>
46. D.K.B. Runyoro, O.D. Ngassapa, P. Masimba & B. Peter. Antimicrobial activity of *Zanthoxylum holitzianum* (Engl.) Waterm and *Zanthoxylum lindense* (Engl.) Kokwaro growing in Bagamoyo District, Coast region, Tanzania. *J. Pharm. Sci. Res.*, **9**(1), 49–54 (2017). URL: <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol9Issue01/jpsr09011711.pdf>
47. Y. Heredia-Díaz, J.C. Escalona-Arranz, A. Ochoa-Pacheco, R. González-Fernández, P.L. Batista-Corbal, P. Cos & A. Escalona-Caparros. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of a "lipid phase" from *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb leaves, *Acta. Pharm. Sci.*, **61**(3), 269–284 (2023). URL: https://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf_782.pdf
48. J. Correa-Barbosa, D.F. Sodré, P.H.C. Nascimento & M.F. Dolabela. Activity of the genus *Zanthoxylum* against diseases caused by protozoa: A systematic review. *Front. Pharmacol.*, **13**, 873208 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.873208>

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

R. González-Fernández, Y. Heredia-Díaz, J.C. Escalona-Arraz, Y. Ramos-Domínguez, P. Cos & J. García-Díaz. Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(1), 160–174 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.115477>