

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Química-Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

**Potencial antileishmaniásico y antimicrobiano de las hojas
de la especie *Jatropha gossypifolia* L.**

Autor: Jennifer Estefanía Medina Albert

Tutores: Mirtha Mayra González Bedia

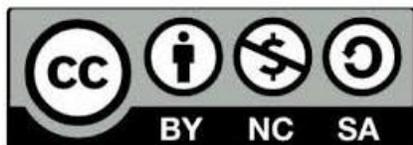
Dulce María González Mosquera

Santa Clara , Junio 2018
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo



La vida es maravillosa si no se le tiene miedo.

Charles Chaplin

Dedicatoria



A mi familia.

Agradecimientos



A mi mamá, mi papá y mi herma por su apoyo incondicional, no solo en esta etapa, sino en toda mi vida; y por enseñarme que la dedicación y el esfuerzo son las bases para lograr lo que se quiere en la vida.

A mi Abu, mi tía Eneida, Nanny, mi tío Joaquín y toda mi familia de Casilda por ser los mejores, y por demostrarme que el cariño verdadero no cambia, a pesar de la distancia entre las personas y el paso del tiempo.

A mis tutoras por todo el duro trabajo, por su dedicación y por, a pesar del estrés, siempre calmarme, hacerme reír y pasar un buen rato.

A mis niñas, porque no hubiera escogido otro grupo con el cual pasar la universidad, por las noches de estudio y de diversión, por sus consejos y por siempre estar ahí para mí. Las quiero un montón!!!!!! Espero que nuestra amistad no se quede aquí, y que cuando tenga una familia, pueda decirle a mis hijos que tienen las ocho tías más divertidas del mundo.

A Adrienne, porque a pesar de que llegó después, se siente como si hubiera estado desde el principio con nosotras. Gracias por tu ayuda en el laboratorio todo este tiempo, y por hacerme compañía aun cuando no tenías que estar ahí.

A todos mis amigos de la universidad, en especial a Merme, Peña y Elvis, por ser mis terapeutas favoritos.

A todos los profes que me ayudaron en mi investigación, Cifontes, Milagros y Niurka.

A todos los profes del departamento; gracias por sus consejos, tanto profesionales como personales, por ser ejemplos de profesionalismo.

A todos los técnicos de los laboratorios por su ayuda.

Tabla de contenido

Introducción:	1
Revisión bibliográfica	5
1.1 <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	5
1.1.1 Clasificación taxonómica	5
1.1.2 Descripción botánica	5
1.1.3 Distribución y hábitat	5
1.1.5 Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica	6
1.1.6 Estudios toxicológicos	9
1.2 Leishmaniasis	10
1.2.1 <i>Leishmania spp.</i>	10
1.2.2 Formas de presentarse la leishmaniasis	11
1.2.3 Principales regiones afectadas por la enfermedad	11
1.2.4 Principales factores de riesgo	12
1.2.5 Tratamiento	12
1.2.6 Métodos para evaluar la actividad leishmanicida	12
1.3 Microorganismos	17
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.3.3 <i>Escherichia coli</i>	21
1.3.4 <i>Candida albicans</i>	23
1.4. Métodos <i>in vitro</i> para evaluar la actividad antimicrobiana	23
1.4.1 Métodos de difusión	24
1.4.2 Cromatografía de capa delgada (TLC) -bioautografía	27
1.4.3 Métodos de dilución	29
1.4.4 Prueba de tiempo muerto (curva de tiempo muerto)	31
1.4.5 Ensayo de bioluminiscencia ATP	31
1.4.6 Método citofluorométrico de flujo	32
MATERIALES Y MÉTODOS	34

2.1 Equipos, materiales y reactivos empleados.....	34
2.2.1 Recolección e identificación	35
2.3 Secado y molinado.....	36
2.4 Evaluaciones farmacognóstica y fitoquímica del material vegetal.....	36
2.4.1 Determinación de índices numéricos.....	36
2.4.2 Caracterización fitoquímica de las hojas de <i>Jatropha gossypifolia</i> L	39
2.5 Obtención de fracciones a partir del extracto hidroalcohólico.....	43
2.5.1 Obtención del extracto hidroalcohólico.....	43
2.5.2 Cromatografía en Columna	44
2.5.3 Caracterización mediante CCD cualitativa del EHA y sus fracciones	45
2.6 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico y sus fracciones.	47
2.7 Actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	49
Resultados y discusión	52
3.1 Caracterización farmacognóstica del material vegetal.....	52
3.1.1 Índices numéricos.....	52
3.2 Caracterización fitoquímica de las hojas de <i>Jatropha gossypifolia</i> L	54
3.3 Obtención y caracterización de fracciones a partir del extracto hidroalcohólico	57
3.3.1 Obtención del extracto hidroalcohólico.....	57
3.3.2 Cromatografía en columna (CC)	58
3.4 Caracterización mediante CCD cualitativa del EHA y sus fracciones	65
3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico y sus fracciones.	67
3.6 Actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i>	72
Conclusiones	76
Recomendaciones	78
Bibliografía	80
Anexos	98

Resumen



Resumen

El presente trabajo es el primer estudio realizado en Cuba con vistas a evaluar las potencialidades antileishmaniásicas y antimicrobianas de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., Tuatúa. El uso de plantas medicinales se ha incrementado en los últimos tiempos como alternativa a algunos tratamientos. La leishmaniasis es considerada una de las enfermedades más importantes de la actualidad, para la que carecen tratamientos efectivos. La resistencia a los antimicrobianos supone un obstáculo importante en estos días. En este estudio se realizaron la determinación de índices numéricos, el tamizaje fitoquímico de diferentes extractos de las hojas de la planta. Se obtuvo un extracto hidroalcohólico al cual se le realizó tamizaje fitoquímico y cromatografía en columna. Se realizaron ensayos biológicos al extracto y a sus fracciones frente a *Leishmania amazonensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Se obtuvo como resultado que la droga posee índices numéricos que avalan la calidad del material vegetal y entre sus metabolitos están saponinas, alcaloides, quinonas, triterpenos y/o esteroides, ácidos grasos, aminoácidos y azúcares reductores. El extracto hidroalcohólico solo mostró actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las tres fracciones evaluadas mostraron actividad parasiticida frente a *L. amazonensis* hasta concentraciones muy bajas, mostrando efecto inhibitor del crecimiento que se extendió hasta concentraciones considerablemente inferiores a las obtenidas para otros extractos vegetales.

Summary

The present work is the first study carried out in Cuba with a view to evaluating the antileishmaniasis and antimicrobial potentials of the leaves of *Jatropha gossypifolia* L., Tuatúa. The use of medicinal plants has increased in recent times as an alternative to some treatments. Leishmaniasis is considered one of the most important diseases of today, for which effective treatments are lacking. Resistance to antimicrobials is a major obstacle these days. In this study, the determination of numerical indexes was carried out, the phytochemical screening of different extracts of the leaves of the plant. A hydroalcoholic extract was obtained, which was subjected to phytochemical screening and column chromatography. Biological tests were carried out on the extract and its fractions against *Leishmania amazonensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. It was obtained as a result that the drug has numerical indexes that guarantee the quality of the plant material and among its metabolites are saponins, alkaloids, quinones, triterpenes and / or steroids, fatty acids, amino acids and reducing sugars. The hydroalcoholic extract only showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The three fractions evaluated showed parasiticidal activity against *L. amazonensis* to very low concentrations, showing a growth inhibitory effect that extended to considerably lower concentrations than those obtained for other plant extracts.

Introducción



Introducción:

El empleo de plantas con fines medicinales y cosméticos se ha incrementado significativamente en los últimos años. Numerosos trabajos avalan sus usos populares, composición fitoquímica y actividad farmacológica. Entre las enfermedades en las que se investigan las potencialidades de las plantas medicinales se incluyen las leishmaniasis y las de origen microbiano.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la leishmaniasis como una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia. Se estima que afecta a 12 millones de personas mundialmente y se le atribuyen de 20,000 a 40,000 muertes anuales. Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de contraer *Leishmania*, y cada año se registran aproximadamente de 0.9 a 1.6 millones de casos nuevos.

Además, no se dispone de una vacuna eficaz contra la leishmaniasis y la quimioterapia es la única forma efectiva para tratar todas las formas de la enfermedad. Sin embargo, la terapia actual es tóxica, costosa y la resistencia se ha convertido en un problema grave, que ha obligado a la búsqueda de nuevos agentes antileishmaniásicos.

Por otra parte, la resistencia a los antimicrobianos es una creciente amenaza para la salud pública, que preocupa ampliamente a países y sectores múltiples. Cada vez más, los gobiernos de todo el mundo comienzan a prestar atención a un problema tan grave que amenaza los logros de la medicina moderna. Una era post-antibiótica, en la que las infecciones comunes y las lesiones menores pueden matar, lejos de ser una fantasía apocalíptica, es, en cambio, una posibilidad muy real para el siglo XXI. Por tanto la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos constituye un reto actual.

Una de las plantas que ha aumentado en interés en la actualidad es *Jatropha gossypifolia* L, conocida comúnmente como Tua tua, lo que se ha manifestado en el creciente número de publicaciones, la elevada cantidad de metabolitos aislados y caracterizados, así como de diferentes actividades farmacológicas ensayadas *in vitro* e *in vivo*; que incluyen actividades antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, hipoglicemiante, anticancerígena, frente al VIH, antileishmaniásica, entre otras.

En nuestro país no se han encontrado publicaciones que avalen sus usos etnomedicinales. Solo se reporta un estudio en el que se describe el empleo, en la ciudad de Camagüey, de la planta entera o de las hojas con diferentes fines.

En años recientes, en el departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), se han iniciado investigaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie que crece en diferentes localidades de la región central de Cuba. Este extracto posee actividades antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

A pesar de que esta planta se muestra como un candidato promisorio a medicamento frente a estas enfermedades, la especie cubana no se ha evaluado frente a *Leishmania* y como antimicrobiano solo frente a un microorganismo. Por estas razones sería conveniente ampliar los estudios en este sentido.

Problema científico:

Aunque existen reportes de la actividad antimicrobiana y antileishmaniásica de extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. procedente de diferentes países, se dispone de limitados estudios que avalan la actividad antimicrobiana de las hojas de la especie que crece en la región central de Cuba; y no se conoce su actividad frente a *Leishmania*.

Hipótesis:

El extracto hidroalcohólico y diferentes fracciones de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. cubana pueden mostrar actividad frente a varios tipos de microorganismos y a *Leishmania*.

Objetivos:

Objetivo general:

Establecer el potencial antimicrobiano y antileishmaniásico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., que crece en la localidad de Casilda, municipio Trinidad; a partir de su extracto hidroalcohólico y diferentes fracciones.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el material vegetal en estudio en cuanto a índices farmacognósticos y composición fitoquímica cualitativa.
2. Evaluar la actividad *in vitro* del extracto hidroalcohólico del material en estudio, y diferentes fracciones del mismo, frente a diferentes microorganismos.
3. Ensayar la actividad antileishmaniásica *in vitro* de diferentes fracciones del extracto hidroalcohólico del material en estudio.

Revisión
Bibliográfica



Revisión bibliográfica

1.1 *Jatropha gossypifolia* L.

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Familia: *Euphorbiaceae*

Subfamilia: *Crotonoideae*

Género: *Jatropha*

Especie: *Gossypifolia*

Nombre científico: *Jatropha gossypifolia* L. (Linn)

Nombre común: Tuatúa.

Otros nombres comunes: Frailecillo, San Juan del Cobre, higuiereta cimarrona, sibirigua, piñón negro, piñón rojo, etc (1).

1.1.2 Descripción botánica

Jatropha gossypifolia L es un pequeño arbusto, con hojas oscuras de color verde oscuro o rojo violáceo, de uno a dos metros de largo por 10-12.9 cm de ancho. Sus hojas son alternas, palmeadas y pubescentes, con un ápice acuminado, una base cordada y un margen aserrado (2-4).

Las flores son pequeñas, unisexuales, moradas, de inflorescencia cimosa con cáliz de cinco pétalos, que en las masculinas pueden formar un tubo petaloide. El fruto es pequeño, capsular con 1 cm de diámetro que consta de tres surcos. Es carnoso y de color verde cuando es inmaduro, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura. Contiene de una a tres semillas oscuras con puntos negros y ricas en aceite (1, 5, 6) (Anexos 1.1, 1.2, 1.3).

1.1.3 Distribución y hábitat

Tiene una distribución muy amplia, con especies que se encuentran en África, India, Sudamérica, Antillas, América Central y el Caribe (7). Es originaria de Brasil, se encuentra en terrenos baldíos, bosques y jardines. Crece en toda el África tropical, excepto en las regiones secas del sur de África y Asia.

1.1.4 Partes de la planta empleadas en etnomedicina (8-10)

Diferentes partes de esta planta, como hojas, tallos, raíces, semillas y látex se utilizan en diferentes formas de preparación (infusión, decocción y maceración,

entre otros) y por diferentes rutas y formas (orales, tópicas, baños, etc.). Los informes más frecuentes se refieren a sus actividades antiinflamatorias, antidiarreicas, antiacidias, analgésicas, antipiréticas, antimicrobianas, cicatrizantes, antianémicas, antidiabéticas y antihemorrágicas, entre muchos otros ejemplos (2, 5, 8, 9).

1.1.5 Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica

Varios componentes químicos han sido detectados en extractos de diferentes partes de la planta, la literatura ha reportado, en general, la presencia de ácidos grasos, azúcares, alcaloides, aminoácidos, coumarinas, esteroides, flavonoides, lignanos, proteínas, saponinas, taninos y terpenoides.

Los estudios que muestran el potencial biológico del extracto acuoso son raros hasta ahora, lo cual es importante mencionar ya que el uso más popular de esta planta es como té (decocción o infusión). Entre las principales actividades que se han estudiado destacan las actividades antihipertensivas, anticancerígenas, antimicrobianas, cicatrizantes, antiinflamatorias y analgésicas.

Acción antihipertensiva: Basado en el uso popular de tés de las raíces de esta planta y partes aéreas, se probaron los efectos hipotensivos y vasorrelajantes del extracto etanólico. El efecto hipotensor podría atribuirse a su acción vasorrelajante, ya que produjo un efecto relajante dependiente de la concentración en la arteria mesentérica privada de endotelio aislado de rata precontraída con norepinefrina o calcio (11).

Acción antimicrobiana: La actividad antibiótica de diferentes extractos de la planta se informa con frecuencia. En general, se observó cierta actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral. El compuesto aislado con actividad antimicrobiana es la jatrofenona, diterpeno macrocíclico, que presentó un importante efecto antibacteriano *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (12).

Acción antiinflamatoria y/o analgésica: Muchos usos populares importantes de esta planta están relacionados con el proceso inflamatorio. Se demostró que el extracto metanólico de hojas de esta especie tiene actividad antiinflamatoria aguda y crónica sistémica significativa. La pasta de las hojas mostró una reducción significativa en los cambios inflamatorios locales inducidos por TPA en el modelo de edema de oreja de ratón (13, 14).

La actividad analgésica del extracto de las hojas en metanol se evaluó en la prueba de retorcimiento inducida por ácido acético en ratones, donde se observó una inhibición altamente significativa a dosis orales (15).

Acción hemostática: El uso de esta planta, especialmente el látex, está muy extendido como agente hemostático para prevenir los trastornos hemorrágicos. Los estudios sugieren actividad procoagulante. En cuanto al posible mecanismo de acción, los autores sugieren que el látex precipita los factores de coagulación poniendo en contacto a los factores de coagulación, y luego la activación de la cascada de coagulación conduce a la generación de trombina y se produce la formación de un coágulo en cuestión de segundos en comparación con el control, que tardó minutos en completar la coagulación (16).

Acción anticolinesterásica: Con base en la hipótesis colinérgica, los inhibidores de la acetilcolinesterasa son ampliamente utilizados para tratar la enfermedad de Alzheimer. El extracto metanólico de las hojas presentó una importante actividad anticolinesterásica (17, 18).

Acción Antioxidante: Se reporta alto contenido de fenoles, taninos y flavonoides en las hojas que respaldó la evaluación de su actividad antioxidante. Se utilizaron los métodos de eliminación de radicales libres DPPH, tiocianato férrico y óxido nítrico para analizar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuoso, metanólico y en etil-acetato. Se le atribuyó la actividad a la presencia de los flavonoides (19). Otro estudio demostró que diferentes extractos de la planta completa (en éter de petróleo, cloroformo, etil acetato y n- butanol) tenían solo actividad antioxidante parcial en el ensayo DPPH y capacidad antioxidante total. Entre todos los extractos, el de etil acetato fue el más activo, lo que se relaciona con un mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con los demás extractos (20).

Acción anticonceptiva: En base a su uso popular, la planta se evaluó por su actividad anticonceptiva, como una alternativa a los agentes anticonceptivos orales. El extracto de las hojas, por vía oral, alteró las principales hormonas implicadas en la regulación del ciclo menstrual, lo que indica su efecto anticonceptivo en ratones (21). Al evaluar otros parámetros (actividades estrogénicas y abortiva temprana), se demostró una vez más el efecto anti-conceptivo del extracto (22).

Acción tocolítica: Con base en la aplicación etnofarmacológica de la planta como remedio tocolítico, se evaluaron los efectos del extracto etanólico y sus fracciones sobre la contracción del músculo liso uterino evocada por calcio. El extracto crudo y, en mayor medida, la fracción clorofórmica redujeron la respuesta contráctil evocada por calcio, así como la reducción de las contracciones máximas (23).

Acción antineoplásica: Una de las actividades farmacológicas más conocidas de esta planta es su acción antineoplásica, que se asocia frecuentemente con el contenido de lignoides y terpenoides. El extracto etanólico de las raíces, así como el diterpeno aislado jatrofona, exhibieron una actividad inhibidora significativa *in vitro* contra las células derivadas del carcinoma humano de la nasofaringe y la leucemia linfocítica P-388, e *in vivo* contra cuatro sistemas de tumores animales estándar, tales como el sarcoma 180, el carcinoma de pulmón de Lewis, la leucemia linfocítica P-388 y el carcinosarcoma intramuscular Walker 256 (24-26).

Acción anestésica local: La acción anestésica local de la planta se evaluó mediante anestesia de plexo en ranas. Los autores observaron que el extracto acuoso y el extracto de metanol (parte de la planta no especificada) presentaron una acción anestésica significativa en comparación con el grupo control (27).

Acción Neurofarmacológica: En el ensayo cruzado de agujeros, el extracto en metanol a 200 y 400 mg/kg, por vía oral, mostró un efecto sedante significativo en ratones. En la prueba de placa perforada, el extracto mostró actividad ansiolítica altamente significativa a una dosis de 200 mg/kg, mientras que la misma actividad se observó a dosis de 400 mg/kg en la prueba de laberinto elevado (15, 28).

Acción antidiarreica: A dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg en ratones, el extracto metanólico de las hojas produjo actividad antidiarreica altamente significativa, después de la diarrea inducida por aceite de ricino (15).

Acción inmunomoduladora: Esta acción se evaluó mediante el ensayo de proliferación de células de bazo de ratón *in vitro* y se comparó con el extracto de éter de petróleo de la planta entera. Los autores demostraron que tanto lignanos sintéticos como naturales podrían modular positivamente la inmunidad del huésped, ya que aumentaban significativamente la proliferación de células de bazo de ratón *in vitro* (29).

Acción Hepatoprotectora: A pesar de que algunos estudios han demostrado el potencial hepatotóxico de esta planta, se realizó un estudio para analizar la posible acción hepatoprotectora de sus extractos en el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas. De hecho, los extractos de éter de petróleo, metanol y agua, de las partes aéreas de la planta, presentaron una acción hepatoprotectora significativa en este modelo (30).

1.1.6 Estudios toxicológicos

Las especies de *Jatropha* son notablemente conocidas por su potencial tóxico (31). Esta toxicidad está relacionada principalmente con el látex y las semillas. El látex se libera de las partes aéreas de la planta por una lesión mecánica y es extremadamente cáustico e irritante para la piel y las membranas mucosas. Las semillas son ricas en toxalbuminas que causan aglutinación y hemólisis a los eritrocitos, así como daños a otros tipos de células y contienen un complejo de resina lipóide que puede causar dermatitis (8, 9, 31). La sintomatología consiste, en general, en trastornos gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos, y diarrea). Además, el curso clínico puede traer complicaciones cardiovasculares, neurológicas y renales. Los casos de envenenamiento en humanos generalmente ocurren al comer frutas y semillas.

Algunos estudios toxicológicos han demostrado las propiedades tóxicas de la planta, mientras que otros muestran la ausencia de toxicidad. Sin embargo, es importante observar los modelos utilizados, las dosis administradas y los tipos de extractos empleados (disolvente y parte de la planta), entre otros aspectos, para llegar a las conclusiones adecuadas sobre la toxicidad (32) (33).

Una evaluación toxicológica preclínica del extracto de etanol crudo de hojas mostró que presenta una toxicidad aguda oral relativamente baja en ratas Wistar (34). Se observaron ratas tratadas con dosis únicas de 1.2 g-5.0 g/kg por vía oral durante 14 días, y los signos más importantes de toxicidad fueron ptosis, reducción del peso corporal y parálisis de los miembros posteriores. Otras alteraciones significativas ocurrieron solo en machos tratados con dosis de 5.0 g/kg: aumento de creatinina, aspartato aminotransferasa, niveles séricos de sodio y potasio, reducción de urea y albúmina, leucopenia y pequeñas alteraciones en el color y consistencia de las vísceras. En la evaluación histopatológica, se observó cierta alteración en el hígado

y el pulmón solo a 5,0 g/kg, lo que sugiere una toxicidad relativamente baja del extracto (34). Sin embargo, en el estudio toxicológico crónico (trece semanas de tratamiento), este extracto mostró toxicidad crónica oral significativa en ratas (35). Los signos tóxicos más significativos indicaron una reducción de la actividad en el sistema nervioso central y trastornos digestivos. Otro estudio, por otra parte, que evaluó la toxicidad aguda por vía oral de los extractos acuoso y etanólico de las hojas, no mostró ningún signo de toxicidad en hasta 2 g/kg en ratas, lo que permitió a los autores concluir que este extracto podría considerarse seguro (14).

1.2 Leishmaniasis

La leishmaniasis es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*, que cuenta con más de 20 especies diferentes. Se conocen más de 90 especies de flebotominos transmisores de *Leishmania* (36).

1.2.1 *Leishmania* spp.

Características: *Leishmania* spp. incluye un conjunto de parásitos protozoarios pertenecientes al filo *Sarcomastigóforos*, familia *Trypanosomatidae*. Se trata de organismos esféricos u ovals, con un solo núcleo en el citoplasma (cinetoplasto) y un tamaño aproximado de 1,5-2,5 x 3-6 micras. Son parásitos intracelulares obligados de muchos mamíferos, se alimentan por difusión del contenido del citoplasma de la célula hospedadora y se reproducen por fisión binaria.

Ciclo vital: Comienza cuando la hembra de la mosca de la arena (mosquito), que actúa como vector, inocula la forma infectiva del parásito (promastigote metacíclico) al picar a un animal mamífero. Dentro de los macrófagos del mamífero infectado el parásito se transforma en amastigote (de morfología redondeada u ovalada, sin flagelo), se multiplica activamente, se libera por lisis del macrófago e infecta nuevos macrófagos. El ciclo continúa cuando un nuevo mosquito pica al animal infectado, en el tubo digestivo del mosquito, el parásito se transforma en promastigote (de morfología alargada y con un flagelo apical), se multiplica activamente y, tras un período de 6 a 8 días, migra hacia la faringe y la cabeza del mosquito, donde se transforma en la forma infectiva (promastigote metacíclico) cerrándose el ciclo (Anexo 1.4) (37).

Mecanismo de propagación y transmisión

La transmisión se produce por la picadura de la hembra de la mosca de la arena, mosquito perteneciente a los géneros *Phlebotomus* (Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (América). También se puede producir la transmisión por contacto sexual, transfusiones de sangre y por inoculación accidental debida a un pinchazo, o a una lesión con material contaminado con el estado infectante del parásito (promastigote metacíclico). Hay unas 70 especies animales, entre ellas el hombre, que son reservorios naturales de la *Leishmania* (38, 39).

1.2.2 Formas de presentarse la leishmaniasis

La enfermedad se presenta en tres formas principales:

- **Leishmaniasis visceral (también conocida como kala azar):** En más del 95% de los casos es mortal si no se trata. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. Es endémica en el subcontinente indio y África oriental.
- **Leishmaniasis cutánea:** Forma más frecuente de la enfermedad. Produce en las zonas expuestas del cuerpo lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida y son causa de discapacidad grave.
- **Leishmaniasis mucocutánea:** Conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta.

1.2.3 Principales regiones afectadas por la enfermedad

Región de África de la OMS: Las formas visceral, cutánea y mucocutánea son endémicas en Argelia y muy endémicas en los países de África oriental. En esta zona, los brotes de leishmaniasis visceral son habituales.

Región de las Américas de la OMS: La epidemiología de la leishmaniasis cutánea en las Américas es muy compleja, pues se observan variaciones en los ciclos de transmisión, los reservorios, los flebótomos vectores, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento. Además, hay varias especies de *Leishmania* en la misma zona geográfica. Brasil concentra el 90% de los casos de leishmaniasis visceral en esta región.

Región del Mediterráneo Oriental de la OMS: Se concentra el 70% de los casos de leishmaniasis cutánea del mundo. La visceral es endémica en Irak, Somalia y Sudán.

Región de Europa de la OMS: La cutánea y la visceral son endémicas en esta región. También hay casos importados, principalmente de África y de las Américas.

Región de Asia Sudoriental de la OMS: La visceral es la principal forma de la enfermedad en esta Región, y la cutánea es también endémica. Es la única región donde hay una iniciativa regional para eliminar la visceral como problema de salud pública.

1.2.4 Principales factores de riesgo

Los principales factores de riesgo incluyen: condiciones socioeconómicas, malnutrición, movilidad de la población, cambios ambientales, cambio climático.

1.2.5 Tratamiento

El tratamiento depende de varios factores, como la forma de la enfermedad, las afecciones comórbidas, la especie del parásito y la ubicación geográfica. Se puede tratar y curar, pero para ello es necesario un sistema inmunitario competente, dado que los medicamentos, por sí solos, no son capaces de eliminar el parásito del organismo. De ahí el riesgo de recidiva en caso de inmunodepresión.

El número de casos de enfermedad en el mundo va en aumento debido al inadecuado control de vectores y reservorios en las zonas endémicas, la coinfección con VIH (40), el desplazamiento de las poblaciones, el deterioro de las condiciones sociales y económicas en zonas peri-urbanas, la desnutrición, y el impacto reciente de los cambios climáticos que inciden en la distribución y el comportamiento de los vectores implicados en la transmisión de distintas enfermedades, entre estas, la leishmaniasis (41, 42).

Las leishmaniasis son enfermedades de alto impacto, consideradas como desatendidas o rezagadas y que afectan a los sectores más vulnerables y marginales de la población, por lo que se hace necesaria la producción de nuevos fármacos, asequibles en los países subdesarrollados, para su tratamiento (41) (36).

1.2.6 Métodos para evaluar la actividad leishmanicida

1.2.6.1 Ensayos sobre promastigotes

Los promastigotes flagelados se multiplican en el intestino medio del vector hematófago de la mosca de los flebótomos, después de lo cual se someten a modificaciones en el desarrollo, que terminan con la generación de formas

metacíclicas, una fase infecciosa no adherente que infecta al macrófago de los mamíferos. Este desarrollo secuencial también se demostró en cultivo: los promastigotes de cultivos en fase logarítmica son esencialmente avirulentos, mientras que los cultivos en fase estacionaria contienen promastigotes infecciosos que exhiben propiedades similares a las formas metacíclicas detectadas en los flebótomos (43).

Por lo tanto, las pruebas de inhibición del crecimiento generalmente se han realizado en promastigotes metacíclicos tempranos.

A. Conteo directo

El recuento directo consiste en la evaluación de la actividad leishmanicida del fármaco a través de un microscopio de fase invertida para determinar la presencia y la motilidad de los promastigotes, que se examinan en un hemocitómetro (44-46). Los protozoos inmóviles también se evalúan como no viables mediante el uso de tinciones vitales como el azul tripán y el rojo neutro (46). Después de la incubación de parásitos con diluciones en serie del fármaco, se calculan los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los compuestos que poseen actividad antileishmanial. Además, como control de la no reversibilidad de la actividad leishmanicida del compuesto ensayado, es posible añadir medio nuevo a los cultivos al final del tiempo de incubación y evaluar un segundo tratamiento de los protozoos con el compuesto a analizar, y luego repetir la evaluación microscópica (46). Este ensayo tiene la ventaja de no requerir equipamiento caro, pero lleva mucho tiempo y resulta engorroso.

B. Métodos colorimétricos

a) Alamar azul

El azul de Alamar es un indicador de oxidación-reducción que no es tóxico para las células, incluso durante largos tiempos de incubación; se reduce, y cambia su color de azul a rojo en células vivas. Entre los ensayos colorimétricos empleados para el cribado de fármacos contra promastigotes, se evaluó una prueba con azul de Alamar. La lectura colorimétrica es realizada por densidad óptica a 550 nm. Por lo tanto, el efecto de los medicamentos se cuantifica fotométricamente sin la necesidad de contar, a través de la correlación de número de promastigotes con la absorbancia

del azul de Alamar. Cabe señalar que la evaluación fluorométrica del azul de Alamar también es posible (47).

Este es un ensayo simple, en un solo paso, para evaluar la actividad parasiticida de los compuestos en sistemas de detección a gran escala. También para la detección de fármacos contra *Leishmania spp* (48).

b) Actividad de fosfatasa ácida

La dosificación de la actividad de la fosfatasa ácida también se emplea para evaluar el crecimiento del parásito en presencia de fármacos (49, 50). Después de la incubación de promastigotes cultivados con diluciones seriadas de los fármacos, las células se lisan y el crecimiento se mide a través de la actividad de la fosfatasa ácida mediante la adición de fosfato de p-nitrofenilo. Después de detener la reacción enzimática, la densidad óptica puede leerse a 405 nm. La hidrólisis enzimática del p-nitrofenil fosfato, monitoreado por un lector de placas de microtitulación, es un sustituto confiable para el recuento de células del parásito. El ensayo es simple, económico y altamente reproducible, lo que permite la detección rápida de candidatos para nuevos medicamentos contra estos parásitos.

c) Ensayo MTT

La reducción de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT) a formazano insoluble se ha empleado como un parámetro de viabilidad del parásito en respuesta a las drogas. Después de la adición de MTT a parásitos incubados con fármacos, la reacción se detiene con isopropanol al 50% y dodecilsulfato de sodio al 10% y la densidad óptica relativa se determina a 570 nm usando un lector de microplacas. Desafortunadamente, la prueba de MTT puede no ser precisa debido a la interacción de algunos fármacos como la meglumina antimoniada con tetrazolio, que puede tener efectos sobre la actividad del fármaco (51). Además, el método MTT tiene el inconveniente de que el complejo formazano precipita dentro de los parásitos, y debe ser extraído por desnaturalizantes antes de que se puedan realizar las mediciones, posiblemente causando daño a los parásitos. Al usar el sustrato sintético, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) - 2- (4-sulfonil) -2H-tetrazolio (MTS), el procedimiento de extracción se elimina a medida que el colorante tipo formazan se libera espontáneamente en el medio (52).

C. Citometría de flujo

La viabilidad y proliferación de promastigotes de *Leishmania infantum* expuestos a fármacos se evalúa mediante el uso de dos métodos de citometría de flujo complementaria. El primero es un método cuantitativo para medir la división celular usando tinción con éster succinimidílico de diacetato de 5,6-carboxifluoresceína (CFSE), y la segunda, viabilidad celular evaluada mediante doble tinción con la membrana permeable tinción nuclear, SYBR-14 y yoduro de propidio (PI). El PI es un fluorocromo específico del ADN incapaz de cruzar membranas intactas de células vivas, por lo que la determinación de su exclusión es un método estándar para evaluar la viabilidad celular en experimentos de clasificación celular (53, 54). La citometría de flujo, combinada con PI como colorante supravital, también se usa para estudiar la susceptibilidad del promastigote de *Leishmania panamensis* ante el antimonio de meglumina, el estibogluconato de sodio y la pentamidina (55). Este ensayo es adecuado para medir la susceptibilidad a promastigotes de este microorganismo solo a pentamidina, y podría ser útil para monitorear ensayos clínicos con este fármaco y facilitar la identificación rápida del aislado natural resistente a pentamidina.

D. Promastigotes transgénicos

El uso de genes informadores como la luciferasa de luciérnaga, o el gen de la proteína fluorescente verde ha facilitado considerablemente la detección de agentes antimicrobianos contra patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (56, 57), *Trypanosoma cruzi* (58) y *Toxoplasma gondii* (59). La proteína verde fluorescente (GFP) es una molécula intrínsecamente fluorescente obtenida de la medusa *Aequorea victoria*, que se presenta como un reportero conveniente en muchas aplicaciones en organismos eucarióticos (60-62). Al usar GFP, *Leishmania amazonensis* genera promastigotes transgénicos, con brillo medible en placas de microtitulación de pocillos en un ensayo espectro fluorométrico (63). Este ensayo se evalúa para probar fármacos cinéticamente y de una manera dependiente de la concentración en condiciones de cultivo de microplacas y permite un análisis en tiempo real de agentes antileishmaniales con promastigotes *in vivo*. Por otro lado, para este tipo de ensayo, se necesita un laboratorio capaz de realizar la ingeniería genética.

E. Citometría de flujo por promastigotes transgénicos

Los promastigotes transgénicos, obtenidos por electroporación del vector de expresión pXG-GFP y analizados por citometría de flujo para cuantificar la fluorescencia de GFP intracelular, se usan como células diana para el cribado *in vitro* de medicamentos antileishmanianos (54, 61). La proporción de células muertas se determina mediante la adición de PI. Los resultados han demostrado la utilidad de la expresión de GFP citoplásmica en parásitos de *Leishmania* transgénicos como una herramienta para controlar la inhibición inducida por fármacos por citometría de flujo. El ensayo basado en GFP proporciona una evaluación rápida y en tiempo real de los cambios en la expresión de proteínas celulares a lo largo del tiempo, no requiere preparación adicional y se puede utilizar para realizar cribado a gran escala.

F. Incorporación de nucleótidos radiactivos

La captación de 3 [H] timidina es un método establecido para evaluar la viabilidad en estudios de inhibición en *Leishmania* (64) y *Trypanosoma* (65, 66). Este ensayo se ha empleado para evaluar la inhibición inducida por fármacos contra promastigotes de *Leishmania* y amastigotes axénicos (67). Después de la incubación con los fármacos, los parásitos se cuentan en un contador de centelleo líquido utilizando 3 [H] timidina. Esta prueba tiene la desventaja de involucrar nucleótidos radiactivos, por lo que no es fácil de realizar y puede presentar riesgos para los trabajadores.

1.2.7.2 Ensayos sobre amastigotes intracelulares

Los métodos que emplean amastigotes intracelulares (AI) no son tan fáciles de realizar como los ensayos con promastigotes porque requieren cultivos celulares. Sin embargo, hay un acuerdo general sobre la conveniencia de usar AI, que es la etapa del parásito clínicamente relevante presente en el mamífero huésped, en ensayos de susceptibilidad farmacológica *in vitro*.

A. Conteo directo

Se han empleado ensayos de conteo directo después de la tinción para evaluar la actividad del fármaco hacia amastigotes intracelulares obtenidos por infección de líneas celulares monocito-macrófago (50, 68, 69). Las células infectadas, cultivadas en un sistema de cámara deslizante, se tiñen con tinción de Diff Quik o Giemsa, y la actividad del fármaco se evalúa microscópicamente, determinando el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula mediante el examen de 50-

300 macrófagos. IC₅₀ se determina sobre la base del número promedio de amastigotes/macrófagos.

B. Citometría de flujo

Se pueden emplear muchos colorantes fluorescentes para el ensayo de citometría de flujo, pero no todos dan buenos resultados.

1.2.7.3 Ensayos sobre amastigotes axénicos

Dado que los ensayos de amastigotes intracelulares son técnicamente más difíciles y más costosos, se desarrolló un sistema para el cultivo *in vitro* de amastigotes en condiciones axénicas (70) y se utilizó para realizar pruebas de detección *in vitro* de fármacos (51, 71-73).

En un estudio basado en la inhibición del crecimiento del parásito, se describe el desarrollo y la validación de este sistema de amastigotes axénicos, comparando la susceptibilidad a diferentes fármacos antileishmania de promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares. Los amastigotes axénicos se pueden contar directamente con un hemocitómetro o un contador celular (71). El ensayo de amastigotes axénicos es técnicamente más fácil, menos costoso y significativamente más rápido, tanto en términos de horas de personal, como de duración total del ensayo que el ensayo amastigoto intracelular.

Sin embargo, algunas limitaciones de este método son la imposibilidad de reproducir el modelo *in vivo* de actividad del fármaco, la falta de información sobre el comportamiento de los macrófagos durante el tratamiento con fármacos y su posible influencia en la actividad del fármaco o el posible daño recibido por toxicidad.

El ensayo MTT también se empleó para amastigotes axénicos (51, 72). Además, se evaluó un ensayo de luminiscencia sobre amastigotes axénicos transgénicos. Para la transformación del ADN, el plásmido pSPαLUC (vector episomal que expresa LUC) se introduce en amastigotes axénicos mediante electroporación. Luego se cultivan las células y después de 24 h se mide la actividad de la luciferasa utilizando un luminómetro de placa de microtitulación (73, 74).

1.3 Microorganismos

Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (75).

Estas son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos (76), en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (77).

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces más células bacterianas que células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo (78).

Solo una pequeña fracción de las bacterias causan enfermedades en los seres humanos: de las 15919 especies registradas en la base de datos de NCBI, solo 538 son patógenas (79). Aun así son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad humana, causando infecciones tales como el tétanos, la fiebre tifoidea, la difteria, la sífilis, el cólera, intoxicaciones alimentarias, la lepra y la tuberculosis.

Cada especie de patógeno tiene un espectro característico de interacciones con sus huéspedes humanos. Algunos organismos, tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*, pueden causar infecciones de la piel, pulmonía, meningitis e incluso sepsis, una respuesta inflamatoria sistémica que produce shock, vasodilatación masiva y muerte (80). Sin embargo, estos organismos son también parte de la flora humana normal y se encuentran generalmente en la piel o en la nariz sin causar ninguna enfermedad.

Las infecciones bacterianas se pueden tratar con antibióticos, que se clasifican como bactericidas, si matan bacterias, o como bacterioestáticos, si solo detienen el crecimiento bacteriano. Existen muchos tipos de antibióticos y cada tipo inhibe un proceso que difiere en el patógeno con respecto al huésped (81).

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

En una serie de observaciones clínicas y estudios de laboratorio publicados en 1880 y 1882, Ogston describió la enfermedad estafilocócica y su papel en la sepsis y la formación de abscesos (82, 83). Más de 100 años después, *Staphylococcus aureus* sigue siendo un patógeno versátil y peligroso en humanos. Las frecuencias de infecciones estafilocócicas, tanto adquiridas en la comunidad como adquiridas en el hospital, han aumentado constantemente, con pocos cambios en la mortalidad general. El tratamiento de estas infecciones se ha vuelto más difícil debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos.

A. Colonización e infección

Los humanos son un reservorio natural de *Staphylococcus aureus*. Entre el 30% y el 50% de los adultos sanos están colonizados, con un 10-20% colonizados persistentemente (84, 85). Tanto los aislados sensibles a la meticilina, como los resistentes a la meticilina, son colonizadores persistentes (85, 86). Las personas colonizadas con esta bacteria tienen un mayor riesgo de infecciones posteriores (87). Las tasas de colonización por estafilococos son altas entre los pacientes con diabetes tipo 1 (88), usuarios de medicamento intravenoso (89), pacientes en hemodiálisis (90), pacientes quirúrgicos (91, 92), y pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (93). Pacientes con defectos cualitativos o cuantitativos en la función leucocitaria también tienen un mayor riesgo de enfermedad por estafilococos (94).

B. Patogenia de la enfermedad estafilocócica

La virulencia de la infección por *Staphylococcus aureus* es notable, dado que el organismo es un comensal que coloniza las axilas, la vagina, la faringe o las superficies dañadas de la piel (84, 85). Las infecciones se inician cuando una ruptura de la piel o la barrera mucosa permiten al estafilococo acceso a tejidos contiguos o al torrente sanguíneo.

C. Respuesta del huésped a la infección

El hallazgo patológico típico de la enfermedad estafilocócica es la formación de abscesos. Los leucocitos son la principal defensa del huésped contra la infección por la bacteria (95). La migración de los leucocitos al sitio de la infección resulta de la expresión orquestada de las moléculas de adhesión en las células endoteliales. Este proceso mediado por citocinas es provocado por bacterias y macrófagos basados en tejidos. Después de la infección, las citocinas se pueden demostrar primero dentro de los vasos, extendiéndose a los tejidos a medida que las células inflamatorias migran a los sitios de infección (96).

D. Enfermedades causadas por *S. aureus* (97-99)

Entre las enfermedades se incluyen: bacteremia, endocarditis, infecciones metastásicas (97, 100, 101), septicemia (102) y síndrome de shock tóxico (103, 104).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) es uno de los patógenos nosocomiales que muy frecuentemente causa enfermedad severa en los pacientes críticos, tanto en inmunocomprometidos (cáncer, neutropénicos, enfermedades inmunológicas, etc.) como en inmunocompetentes. La mayoría de los estudios indican una tasa de mortalidad atribuible de aproximadamente el 34% a las infecciones por PAE.

La PAE es la especie más patogénica dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, es un Gram negativo con forma de bastoncitos finos con una longitud aproximada de 1 a 3 μm de largo y 0,5 a 1,0 μm de ancho.

Es un microorganismo que causa infecciones en la mayoría de los sitios del cuerpo, o coloniza cualquier lugar sometido a una injuria. Tiene un gran potencial para causar enfermedad, que dependerá de la inmunidad innata o adquirida del huésped, el lugar de la infección, y las comorbilidades, para nombrar sólo algunas de las condiciones que van a determinar si la virulencia bacteriana será un factor mayor o menor en el desarrollo de la infección (105).

A. Mecanismo de propagación y transmisión

La transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida, y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados.

Constituyen una fuente de infección para los pacientes el instrumental quirúrgico, los respiradores, los catéteres o las manos del personal sanitario contaminadas, entre otros (106, 107).

B. Infección (108, 109)

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedad en individuos sanos; en el caso de producirse esta, suele manifestarse como:

- Infecciones dérmicas: Puede causar foliculitis (foliculitis de la bañera), que se caracteriza por la aparición de pápulas pruriginosas en la zona lateral del tronco y/o en las zonas axilar, inguinal, púbica, etc., estando asociada al contacto prolongado con agua contaminada. También puede ocasionar el síndrome de la uña verde (cloroniquia).
- Neumonía: Producida por la inhalación de bioaerosoles de agua o fluidos contaminados. La infección en personas sanas es extremadamente rara, siendo el pronóstico muy grave.
- Otitis externa (otitis del nadador): Infección del canal auditivo externo ocasionada por contacto prolongado con agua contaminada.
- Infección ocular: Asociada principalmente a la contaminación del líquido utilizado para la limpieza de las lentes de contacto, pudiendo causar una queratitis que puede resultar en la perforación y derretimiento corneal, en la infección de cicatrices o, incluso, en la pérdida de visión del ojo infectado.

1.3.3 *Escherichia coli*

Por lo general, las bacterias *Escherichia coli* viven en los intestinos de las personas y de los animales sanos. La mayoría de sus variedades son inofensivas o causan diarrea breve en términos relativos. Sin embargo, algunas cepas particularmente peligrosas, como la *Escherichia coli* O157:H7, pueden causar cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos.

Se puede estar expuesto a la *Escherichia coli* proveniente del agua o de los alimentos contaminados, sobre todo de los vegetales crudos y de la carne de res molida poco cocida. Los niños pequeños y otros adultos corren un riesgo más

elevado de manifestar una forma de insuficiencia renal que puede poner en riesgo la vida, denominada «síndrome urémico hemolítico».

A. Síntomas

Los signos y síntomas de la infección normalmente comienzan tres o cuatro días después de la exposición a la bacteria, aunque se puede enfermar tan pronto como el día siguiente o más de una semana después. Estos son algunos de los signos y síntomas: diarrea, que puede variar de leve y líquida, a grave y con sangre, cólicos abdominales, dolor o sensibilidad y náuseas y vómitos en algunas personas

B. Causas

Entre las muchas cepas de *Escherichia coli*, solo unas pocas provocan diarrea. Un grupo de esta, que incluye O157:H7, produce una toxina muy potente que daña el revestimiento del intestino delgado, lo que puede causar diarrea con sangre. Puede provocar una infección aunque se ingiera en pequeñas cantidades. Las fuentes potenciales de exposición son los alimentos y agua contaminados y el contacto persona a persona.

C. Factores de riesgo

Los factores de riesgo son:

- Edad. Los niños pequeños y los adultos mayores corren un mayor riesgo de padecer una enfermedad provocada por *Escherichia coli*, así como complicaciones más graves a causa de la infección.
- Sistemas inmunitarios debilitados. Las personas que tienen sistemas inmunitarios debilitados, debido al sida, o a medicamentos para tratar el cáncer, o para prevenir el rechazo de los trasplantes de órganos.
- Comer ciertos tipos de alimentos. Los alimentos más riesgosos son las hamburguesas mal cocinadas; la leche, el jugo de manzana o la sidra sin pasteurizar; y los quesos blandos elaborados con leche cruda.
- Disminución de los niveles de ácido estomacal. El ácido estomacal ofrece cierta protección contra la *Escherichia coli*. Si se toman medicamentos para reducir los niveles de ácido estomacal, se puede aumentar el riesgo de padecer una infección por esta bacteria (110).

Hongos

El término *fungi* designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y los organismos productores de setas. Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas, en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas (111).

1.3.4 *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico perteneciente al *Phylum Ascomycota*, que presenta pseudohifas, hifas y blastoconidios subesféricos (3-8 x 2-7 µm). Asociada a animales de sangre caliente, este saprobio coloniza la vagina y los tractos digestivo y respiratorio humanos. Puede infectar la piel, uñas y membranas mucosas, pero la presentación diseminada que se desarrolla en pacientes inmunodeprimidos es la complicación más seria de la enfermedad.

La candidiasis invasora es una enfermedad de etiología fúngica que presenta una creciente incidencia, afectando sobre todo a pacientes inmunocomprometidos (transplantados, neutropénicos, enfermos de SIDA, etc.), hospitalizados de larga duración, pacientes sometidos a cirugía extensa, cateterizados o sondados y pacientes que siguen una terapia antibiótica de amplio espectro.

A. Características clínicas

Las infecciones por *Candida* afectan distintas partes del cuerpo de distintas maneras. La muguet o candidiasis oral es una infección por hongos que causa manchas blancuzcas en la boca. La esofagitis es muguet (candidiasis oral), que se disemina hacia el esófago. La esofagitis puede hacer que tragar sea difícil o doloroso. Las mujeres pueden tener infecciones vaginales por *Candida*, con picazón, dolor y secreción. Las infecciones en la piel por *Candida* causan picazón y erupciones cutáneas. La candidiasis en la sangre puede poner la vida en peligro.

B. Tratamiento

Los antimicóticos pueden eliminar las infecciones por *Candida* en la mayoría de las personas. Si se tiene el sistema inmunológico debilitado, el tratamiento puede ser más difícil (112).

1.4. Métodos *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana

1.4.1 Métodos de difusión

A. Método de difusión en disco de agar

La prueba de difusión en disco de Agar, desarrollada en 1940 (113), es el método oficial utilizado en muchos laboratorios clínicos de microbiología para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de rutina. Hoy en día, muchos estándares aceptados y aprobados son publicados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la prueba de bacterias y levaduras (114).

En este procedimiento bien conocido, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. Luego, se colocan discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de prueba a la concentración deseada, en la superficie del agar. Las placas Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba, y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de la inhibición. El antibiograma proporciona resultados cualitativos, clasificando las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes (115). Por lo tanto, es una herramienta de tipado basada en el fenotipo de resistencia de la cepa microbiana probada, sus resultados también guían a los médicos en la selección apropiada de tratamientos empíricos iniciales, y antibióticos utilizados para pacientes individuales en situaciones particulares (116).

Sin embargo, dado que la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos. Además, el método de difusión en disco de agar no es apropiado para determinar la concentración inhibidora mínima (MIC), ya que es imposible cuantificar la cantidad del agente antimicrobiano difundido en el medio de agar. Sin embargo, se puede calcular una MIC aproximada para algunos microorganismos y antibióticos comparando las zonas de inhibición con algoritmos almacenados (117).

Este ensayo ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar cantidades enormes de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados. Además, varios estudios han demostrado el gran interés en pacientes que sufren de infección bacteriana de una antibioterapia basada en el antibiograma del agente

causal (118). Este hecho se debe a la buena correlación entre los datos *in vitro* y la evolución *in vivo* (116).

Las ventajas ya mencionadas han contribuido a su uso común para el cribado de extractos de plantas, aceites esenciales y otros fármacos (119-122).

B. Método de gradiente antimicrobiano (E test)

El método del gradiente antimicrobiano combina el principio de los métodos de dilución con el de los métodos de difusión para determinar el valor de MIC. Se basa en la posibilidad de crear un gradiente de concentración del agente antimicrobiano probado en el medio de agar. En el procedimiento, una tira impregnada con un gradiente de concentración creciente del agente antimicrobiano de un extremo al otro se deposita en la superficie del agar, previamente inoculada con el microorganismo probado.

Se utiliza para la determinación de MIC de antibióticos, antifúngicos y antimicobacterianos (123). El valor MIC se determina en la intersección de la tira y la elipse de inhibición del crecimiento. Es simple de implementar; por lo tanto, se usa de forma rutinaria para satisfacer las demandas de los médicos (123).

C. Otros métodos de difusión

Se utilizan otros métodos de difusión para seleccionar extractos, fracciones o sustancias puras por su potencia antimicrobiana o para investigar el antagonismo entre microorganismos. Entre estos métodos, los más comunes son:

a) Método de difusión del pozo de Agar

El método de difusión de pozos de agar es ampliamente utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos (124, 125). De forma similar al procedimiento utilizado en el método de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula extendiendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. A continuación, se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm con un taladro de corcho estéril o una punta, y se introduce en el pocillo un volumen (20-100 mL) del agente antimicrobiano o solución de extracto a la concentración deseada. Luego, las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba. El agente

antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada.

b) Método de difusión de tapón de agar

El método de difusión de tapón de agar a menudo se utiliza para resaltar el antagonismo entre microorganismos (126, 127). El procedimiento es similar al utilizado en el método de difusión en disco. Implica hacer un cultivo de agar de la cepa de interés en su medio de cultivo apropiado mediante rayas estrechas sobre la superficie de la placa. Durante su crecimiento, las células microbianas secretan moléculas que se difunden en el medio de agar. Después de la incubación, un diagrama de agar o cilindro se corta asépticamente con un taladro de corcho estéril y se deposita en la superficie de agar de otra placa previamente inoculada por el microorganismo de prueba. Las sustancias se difunden desde el tapón al medio de agar. Entonces, la actividad antimicrobiana de las moléculas secretadas microbianas se detecta por la aparición de la zona de inhibición alrededor del tapón de agar.

c) Método de la raya cruzada

El método de la raya cruzada se usa para seleccionar rápidamente los microorganismos en busca de antagonismo (128). La cepa microbiana de interés se siembra por una sola raya en el centro de la placa de agar. Después de un período de incubación que depende de la tensión microbiana, la placa se siembra con los microorganismos probados por una sola raya perpendicular a la veta central. Después de una incubación adicional, las interacciones antimicrobianas se analizan observando el tamaño de la zona de inhibición.

d) Método de comida envenenada

El método de comida envenenada se usa principalmente para evaluar el efecto antifúngico contra los mohos (129, 130). El agente antifúngico o el extracto se incorpora en el agar fundido a una concentración final deseada y se mezcla bien. Luego, el medio se vierte en placas Petri. Después de la preincubación durante la noche, la inoculación puede realizarse mediante un disco de micelio que varía de 2 a 5 mm, que se deposita en el centro de la placa. Después de una incubación adicional en condiciones adecuadas para la cepa fúngica ensayada, se miden los

diámetros de crecimiento fúngico en las placas de control y de muestra, y se estima el efecto antifúngico.

1.4.2 Cromatografía de capa delgada (TLC) -bioautografía

En 1946, Goodall y Levi (113) combinaron el método de cromatografía en papel (PC) con bioautografía de contacto para detectar diferentes penicilinas para su determinación. A partir de entonces, Fischer y Lautner (131) introdujeron la cromatografía en capa delgada (TLC) en el mismo campo. Esta técnica combina TLC con métodos de detección biológicos y químicos. Se han realizado varios trabajos sobre la selección de extractos orgánicos, principalmente extractos de plantas, para la actividad antibacteriana y antifúngica mediante TLC-bioautografía. Como se muestra a continuación, se han descrito tres técnicas bioautográficas: difusión en agar, bioautografía directa y ensayo de sobreexpresión en agar, para la investigación de compuestos antimicrobianos mediante este enfoque.

A. Difusión en agar

También conocido como método de contacto con agar, es el menos utilizado de las técnicas. Implica la transferencia por difusión del agente antimicrobiano del cromatograma (PC o TLC) a una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo probado. Después de algunos minutos u horas para permitir la difusión, se retira el cromatograma y se incuba la placa de agar. Las zonas de inhibición del crecimiento aparecen en los lugares donde los compuestos antimicrobianos entran en contacto con la capa de agar (132).

B. Bioautografía directa

La bioautografía directa es el método más aplicado entre estos tres métodos. La placa de TLC desarrollada se sumerge o se rocía con una suspensión microbiana. Luego, el bioautograma se incuba a 25 °C durante 48 h en condiciones húmedas. (133) Para la visualización del crecimiento microbiano, las sales de tetrazolio se usan con frecuencia. Estas sales experimentan una conversión a formazano correspondiente, intensamente coloreado por las deshidrogenasas de las células vivas (134, 135). El violeta p-Iodonitrotetrazolio es el reactivo de detección más adecuado. (132, 136) Estas sales se pulverizan sobre el bioautograma, que se vuelve a incubar a 25 °C durante 24 h (137) o a 37 °C durante 3-4 h (138). El caldo Mueller-Hinton suplementado con agar ha sido recomendado para proporcionar un

fluido de nivel medio que permita una mejor adherencia a la placa de TLC y mantenga la humedad adecuada para el crecimiento bacteriano (139).

La bioautografía directa se puede utilizar con hongos o bacterias. Es la técnica más sencilla para la detección de sustancias antifúngicas y también proporciona resultados consistentes para hongos productores de esporas como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium* (140, 141). Para las bacterias, las cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se utilizan con frecuencia para identificar compuestos antibacterianos (142).

C. Bioensayo de superposición en agar

También conocida como bioautografía de inmersión, es un híbrido de los dos métodos anteriores. La placa de TLC se cubre con un medio de agar sembrado fundido. Con el fin de permitir una buena difusión de los compuestos probados en el medio de agar, las placas se pueden colocar a baja temperatura durante unas horas antes de la incubación. Después de la incubación en condiciones adecuadas que dependen del microorganismo de prueba, la tinción se puede hacer con colorante de tetrazolio. Al igual que la bioautografía directa, este método se puede aplicar a todos los microorganismos, como *Candida albicans* (143) y mohos (144). Proporciona zonas de inhibición del crecimiento bien definidas y no es sensible a la contaminación (132).

En general, la bioautografía TLC es una técnica simple, efectiva y económica para la separación de una mezcla compleja, y al mismo tiempo, localiza los constituyentes activos en la placa de TLC. Por lo tanto, puede realizarse tanto en laboratorios sofisticados como en pequeños laboratorios que solo tienen acceso a un mínimo de equipos (132). A pesar de tener un sofisticado bioensayo de cromatografía líquida en línea de alto rendimiento, que se está volviendo cada vez más popular como el método de elección para una limpieza final de fracciones extractivas para obtener compuestos puros, la bioautografía TLC ofrece una técnica rápida para la detección de un gran número de muestras para bioactividad y en el fraccionamiento guiado por bioactividad (133). Se puede usar para la detección de antimicrobianos en muestras ambientales y de alimentos, así como para buscar nuevos fármacos antimicrobianos.

1.4.3 Métodos de dilución

Los métodos de dilución son los más apropiados para la determinación de los valores MIC, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en el agar (dilución de agar) o medio de caldo (macrodilución o microdilución). Se puede usar el método de dilución en caldo o en agar para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos.

A. Método de dilución en caldo

La microdilución o macrodilución en caldo es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos. El procedimiento implica preparar diluciones dobles del agente antimicrobiano en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 ml (macrodilución) o con volúmenes más pequeños usando una placa de microtitulación de 96 pocillos (microdilución). Luego, cada tubo o pocillo se inocula con un inóculo microbiano preparado en el mismo medio después de la dilución de la suspensión microbiana estandarizada ajustada a una escala de 0,5 McFarland. Después de mezclar bien, los tubos inoculados o la placa de microtitulación de 96 pocillos se incuban (principalmente sin agitación) en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de ensayo.

La CIM es la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento del organismo en los tubos o los pocillos de microdilución detectados a simple vista (145). A diferencia del método de microdilución, las principales desventajas del método de macrodilución son la tediosa tarea manual, el riesgo de errores en la preparación de soluciones antimicrobianas para cada prueba y la cantidad comparativamente grande de reactivos y espacio requerido (115). Por lo tanto, la reproducibilidad, la economía de los reactivos y el espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba son las principales ventajas del método de microdilución. Sin embargo, el resultado final está significativamente influenciado por el enfoque, que debe controlarse cuidadosamente si se quieren obtener resultados reproducibles (intralaboratorio e interlaboratorio) (115). Para la determinación del punto final MIC, los dispositivos de visualización pueden facilitar la lectura de pruebas de microdilución y el registro de resultados con una alta

capacidad para discernir el crecimiento en los pocillos. Además, se han desarrollado varios métodos colorimétricos basados en el uso de reactivos colorantes.

La determinación de concentración bactericida mínima (MBC) o concentración fungicida mínima (MFC), también conocida como la concentración letal mínima (MLC), es la estimación más común de la actividad bactericida o fungicida. El MBC se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano necesaria para matar el 99.9% del inóculo final después de la incubación durante 24 h bajo un conjunto estandarizado de condiciones, en el que el MBC puede determinarse después de macrodilución en caldo o microdilución subcultivando una muestra de pozos o tubos, produciendo un crecimiento microbiano negativo después de la incubación en la superficie de placas de agar no selectivas para determinar el número de células supervivientes (UFC / ml) después de 24 h de incubación (113).

B. Método de dilución en agar

El método de dilución en agar implica la incorporación de diferentes concentraciones deseadas del agente antimicrobiano en un medio de agar (medio de agar fundido), habitualmente utilizando diluciones seriadas en serie, seguido de la inoculación de un inóculo microbiano definido en la superficie de la placa de agar. El punto final MIC se registra como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento en condiciones de incubación adecuadas.

Esta técnica es adecuada para las pruebas de sensibilidad antibacteriana y antifúngica. Si se prueban múltiples aislados contra un solo compuesto, o si el compuesto (o extracto) probado enmascara la detección del crecimiento microbiano en el medio líquido con su coloración, a menudo se prefiere el método de dilución de agar a la dilución de caldo para la determinación de MIC. Hoy en día, los replicadores de inóculo producidos comercialmente están disponibles y pueden transferir entre 32 y 60 inóculos bacterianos diferentes a cada placa de agar. La dilución de agar a menudo se recomienda como un método estandarizado para organismos exigentes tales como anaerobios y especies de *Helicobacter*. También se ha usado para combinaciones de fármacos antimicóticos contra *Candida sp.*, *Aspergillus*, *Fusarium* y dermatofitos (146-148). Además, las comparaciones de categorías de los métodos de dilución en agar, difusión en disco y microdilución en caldo dan excelentes resultados (149).

1.4.4 Prueba de tiempo muerto (curva de tiempo muerto)

La prueba de tiempo muerto es el método más apropiado para determinar el efecto bactericida o fungicida. Es una herramienta sólida para obtener información sobre la interacción dinámica entre el agente antimicrobiano y la cepa microbiana. La prueba de tiempo-muerte revela un efecto antimicrobiano dependiente del tiempo o dependiente de la concentración (150).

Se realiza en medio de cultivo en caldo utilizando tres tubos que contienen una suspensión bacteriana de 5×10^5 UFC/ml. El primero y el segundo tubo contienen la molécula o el extracto probado, generalmente en concentraciones finales de $0.25 \times \text{MIC}$ y $1 \times \text{MIC}$, y el tercero se considera como control del crecimiento. La incubación se realiza en condiciones adecuadas para intervalos de tiempo variados (0, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h). (120, 150) Luego, el porcentaje de células muertas se calcula con relación al control del crecimiento determinando el número de células vivas (UFC/ml) de cada tubo usando el método de conteo de placa de agar. Generalmente, el efecto bactericida se obtiene con un porcentaje de letalidad del 90% durante 6 h, que es equivalente al 99,9% de la letalidad durante 24 h. Además, este método se puede usar para determinar la sinergia o el antagonismo entre fármacos (dos o más) en combinaciones (150, 151).

1.4.5 Ensayo de bioluminiscencia ATP

El ensayo de bioluminiscencia de ATP se basa en la capacidad de medir el trifosfato de adenosina (ATP) producido por bacterias u hongos. Como el ATP es la forma química de la energía de todas las células vivas, está presente en una cantidad más o menos constante en una célula. Por lo tanto, su cuantificación se utiliza para estimar la población microbiana en una muestra. La Dluciferina en presencia del ATP experimenta conversión por luciferasa a oxiluciferina que genera luz. La cantidad de luz emitida se mide con un luminómetro y se expresa como unidad de luz relativa (RLU) que puede convertirse en RLU / mol de ATP. Por lo tanto, existe una relación lineal entre la viabilidad celular y la luminiscencia medida.

El ensayo de bioluminiscencia tiene una amplia gama de aplicaciones, como la prueba de citotoxicidad, la evaluación *in situ* del impacto de los biofilms *in situ* (152), y detección de drogas en *Leishmania* (153). Además, ha sido utilizado por varios autores para pruebas antibacterianas (154), pruebas antimicobacterianas (155,

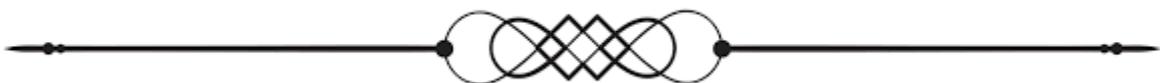
156), antimicótico contra levadura (157) y mohos (158). La rapidez es la principal ventaja de esta técnica que proporciona resultados cuantitativos. De hecho, se ha demostrado que esta técnica puede proporcionar resultados en un período de tres a cinco días para las pruebas antimicobacterianas, en comparación con la técnica de dilución convencional, que requiere de tres a cuatro semanas de incubación (155, 156). El ensayo de bioluminiscencia también tiene la ventaja de ser utilizado para pruebas antimicrobianas *in vivo* o *in situ* (159).

1.4.6 Método citofluorométrico de flujo

La detección rápida de células dañadas por este enfoque depende del uso de colorantes apropiados (160, 161). Por lo tanto, el yoduro de propidio (PI), un agente fluorescente e intercalante, se usa ampliamente como tinción de ADN (160). Se informaron varios estudios sobre la efectividad del citómetro de flujo como herramienta para el análisis antibacteriano de aceites esenciales contra *Listeria monocytogenes*, utilizando tinción combinada con PI para la evaluación del daño en la membrana y diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) para la detección de la actividad esterasa (162).

En consecuencia, además de las células lisadas, tres subpoblaciones (células muertas, viables y heridas) se pueden discriminar claramente por este método. Las células lesionadas se describen como células estresadas que muestran daños en los componentes celulares y deterioro posterior del crecimiento reproductivo (163). La cuantificación de las células lesionadas tiene un resultado interesante en la microbiología de los alimentos, ya que esta subpoblación puede ser crítica si la recuperación celular es posible, como en condiciones de abuso de temperatura durante el almacenamiento de alimentos. (162) De hecho, el método de flujo citofluorométrico permite la detección de resistencia a los antimicrobianos y estima el impacto de la molécula probada sobre la viabilidad y el daño celular del microorganismo probado (164). Además, da resultados reproducibles rápidamente (2-6 h en comparación con 24-72 h para el método de microdilución) (160).

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio experimental se realizó en la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), en el período comprendido entre febrero y mayo del 2018. La evaluación fitoquímica y farmacognóstica en los laboratorios del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química–Farmacia. Las evaluaciones biológicas en los laboratorios del Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV.

2.1 Equipos, materiales y reactivos empleados

Equipos y materiales

- Molino de cuchillas (IKA WERKE MF-10 basic, Alemania)
- Estufa (Binder, Alemania)
- Balanza analítica digital (Sartorius TE-124S, Alemania)
- Balanza técnica digital (Sartorius BS-2202S, Alemania)
- Equipo de reflujo (MEDINGEN, Alemania)
- Plancha de calentamiento (Stuart SD 300, Reino Unido)
- Manta de calentamiento (Electrothermal MX, Reino Unido)
- Rotoevaporador (IKA RV 10, España)
- Lámpara UV (CAMAG, España)
- Mufla (Nabertherm, Alemania)
- Placas de sílica gel (MERCK PF₂₅₄, Alemania)
- Lector de fluorescencia (SUMA®, Habana, Cuba)
- Incubadora (Heraeus, Alemania)
- Incubadora (Nemmert, Alemania)
- Autoclave (BK-75, URSS)
- Microscopio invertido Ollimpus HO2112 Japon
- Incubadora de Leishmania HF 151UV CO2 Incubator

Reactivos y otros productos

- Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)
- Ácido sulfúrico concentrado (UNI-CHEM)
- Agua destilada
- Alcohol amílico. (UNI-CHEM)

- Anhidrido acético (UNI-CHEM)
 - Cinta de magnesio metálica (Analar)
 - Cloroformo. (UNI-CHEM)
 - Cloruro férrico (Analar)
 - Etanol 91 % (UNI-CHEM)
 - Hidróxido de sodio (UNI-CHEM)
 - Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM)
 - Reactivo de Dragendorff
 - Reactivo de Fehling A y B (UNI-CHEM)
 - Reactivo de Kedde A y B. (UNI-CHEM)
 - Solución de Ninhidrina 2%. (UNI-CHEM)
 - Agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba)
 - Agar Sabouraud (BioCen, Cuba)
 - Caldo Mueller-Hinton (BioCen, Cuba)
 - Caldo Sabouraud (BioCen, Cuba)
 - Anfotericina B–desoxicolato de sodio (Empresa Laboratorio Farmacéutico “Julio Trigo López”, La Habana, Cuba)
 - Resazurina SIGMA R7017-1g
 - Furvina, suministrada por el Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV.
 - Dimetilsulfóxido BCBC 8998 Sigma Aldrich
 - Estreptomina MINSAP (Bulbo 1g)
 - Penicilina sódica MINSAP(Bulbo 1000000 UI)
 - Schneider suplementado con suero fetal bovino (Sigma S9895-1L) 2.2
- Obtención del material vegetal.

2.2.1 Recolección e identificación

Las hojas de *Jatropha gossypifolia* L se recolectaron en la localidad de Casilda (Anexo 2.1), en las afueras del municipio de Trinidad en la provincia de Sancti Spíritus, entre los meses de enero y mayo del 2018.

El material recolectado se trasladó en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica de la UCLV. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el MSc. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la UCLV. Ejemplares

de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario (UCLV) localizado en la citada institución, bajo el número 1305.

2.3 Secado y molinado

Para el secado de las hojas, primeramente se lavaron con abundante agua potable, se extendieron sobre secadores de malla plástica y se mantuvieron a la sombra por 3 días. Luego se colocaron en una bandeja plástica y se sometieron a secado mediante calor artificial en una estufa a 35 °C, hasta masa constante. Una vez seco, se redujo el tamaño de partícula del material vegetal mediante un molino de cuchillas, utilizando un tamiz de 3 mm. Posteriormente se envasó el material molinado en bolsas de nylon negro bien cerradas.

Hasta la realización de los estudios siguientes el material seco molinado y envasado se conservó en desecadora en un lugar fresco (165).

2.4 Evaluaciones farmacognóstica y fitoquímica del material vegetal

2.4.1 Determinación de índices numéricos

2.4.1.1 Contenido de humedad residual

Esta determinación se realizó por el Método Gravimétrico, empleando para ello una estufa. Se pesaron 2.0 g de la droga molinada y tamizada con un error máximo de 0.5 mg y se transfirieron a un pesa filtro previamente tarado donde se desecó en estufa a 105 °C durante 3h. El pesafiltro se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h. Esta operación se repitió hasta obtener masa constante. El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresada en porciento se calculó por la fórmula siguiente:

$$H = \frac{M_2 - M_1}{M} 100(\%) m/m$$

Donde:

M₂: Masa del pesa filtro con la muestra (g)

M₁: Masa del pesa filtro con la muestra desecada (g)

M: Masa de ensayo

100: Factor matemático para los cálculos

El ensayo se realizó por triplicado. Se informó como porcentaje de humedad como el promedio y la desviación estándar de las tres determinaciones.

2.4.1.2 Cenizas totales

Para la determinación de cenizas totales se procedió de la siguiente forma, según lo descrito en las Normas Ramales de Salud Pública para la determinación de drogas crudas 309/310 (166).

1. En un crisol de porcelana, previamente tarado se pesaron, con un error máximo de 0,5 mg, 2 g de la muestra de ensayo molinada y tamizada.
2. Se calentó la muestra aumentando la temperatura hasta carbonización en una plancha.
3. Se incineró en una mufla a 750 °C por 8 horas.
4. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó en una balanza analítica.
5. Se repitió el proceso, a intervalos de 30 minutos, a partir del paso 3 hasta obtener masa constante.

La cantidad de cenizas totales (C_t) en base anhidra se calculó por la fórmula siguiente:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} 100\% \quad C_t = \frac{C_1 \cdot 100}{100 - H}$$

Donde:

C_1 : Cenizas totales en base hidratadas

M: Masa del crisol vacío (g)

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

M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g)

100: Factor matemático para los cálculos

H: Porcentaje de humedad

El ensayo se realizó por triplicado y se informó el porcentaje de cenizas totales como el promedio y la desviación estándar de los datos determinados. Para esto se empleó la hoja de cálculo Excel de Microsoft Office (2010).

2.4.1.3 Cenizas solubles en agua

Para el ensayo de cenizas solubles en agua se procedió de la siguiente forma, según lo establecido en las normas descritas anteriormente:

- 1- A las cenizas obtenidas en el ensayo de cenizas totales, se adicionaron 15 mL de agua destilada.
- 2- El crisol se tapó y se hirvió suavemente en la plancha durante 5 minutos.
- 3- La solución se filtró a través de papel de filtro, libre de cenizas.
- 4- El residuo se transfirió al crisol inicial.
- 5- Se carbonizó en la plancha.
- 6- Se incineró en la mufla a 750 °C por 2 horas.
- 7- Se colocó en una desecadora y cuando alcanzó temperatura ambiente se pesó en la balanza analítica.
- 8- Se repitió el procedimiento (a intervalos de 1 hora) hasta obtener masa constante. Los cálculos se efectuaron empleando la siguiente fórmula:

$$C_1 = \frac{M_2 - M_4}{M_1 - M} 100\% \quad C_A = \frac{C_1 \cdot 100}{100 - H}$$

Donde:

C_1 : Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M_1 : Masa del crisol con la muestra de ensayo.

M_2 : Masa del crisol con las cenizas.

M_4 : Masa del crisol con las cenizas insolubles en agua.

H: Porcentaje de Humedad.

2.4.1.4 Cenizas ácido-insolubles

Para el ensayo de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (HCl) se procedió según lo establecido en las normas declaradas anteriormente:

- 1- A las cenizas obtenidas en el ensayo de cenizas totales se le adicionaron 15mL de HCl 10%.
- 2- El crisol se tapó y se hirvió la muestra por 5 minutos.
- 3- La solución se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas.
- 4- Se lavó el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido nítrico, 2 gotas de solución de nitrato de plata 0,1 mol/L no muestre presencia de cloruros.
- 5- El residuo se transfirió al crisol inicial.
- 6- Se carbonizó en la plancha.
- 7- Se incineró en la mufla a 750 °C por 2 horas.

- 8- Se colocó en una desecadora y cuando alcanzó temperatura ambiente se pesó.
- 9- Se repitió el procedimiento (en intervalos de 1 hora) hasta obtener masa constante.

Los cálculos se realizaron con el empleo de las siguientes fórmulas:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} 100\% \quad C_i = \frac{C_1 \cdot 100}{100 - H}$$

Donde:

C_1 : Porcentaje de cenizas insolubles en HCL en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

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

M_2 : Masa del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g).

H: Porcentaje de humedad.

2.4.2 Caracterización fitoquímica de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L

2.4.2.1 Preparación de los extractos

Se elaboraron tres extractos a partir del material vegetal seco: extracto etéreo (EE), extracto acuoso (EAC) y extracto alcohólico (etanólico, EA), los cuales fueron sometidos a caracterización fitoquímica.

Para cada extracto se tomaron 2.5 g del material vegetal seco y molido y se disolvieron en 50 mL de cada solvente. Se dejaron reposar por 24 horas, para su posterior filtrado.

Características organolépticas de los extractos

Determinación del olor

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Luego se determinó el olor.

Determinación del color

Una muestra del extracto se vació en un tubo de ensayo limpio y seco ocupando las tres cuartas partes de su capacidad. Se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

2.4.2.2 Tamizaje fitoquímico

A los extractos se le realizaron diferentes ensayos que permitieron identificar la presencia de metabolitos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Ensayos para identificación de metabolitos en el material vegetal.

Ensayos	Metabolitos	Tipo de extracto		
		Etanólico	Acuoso	Etéreo
Resinas	Resinas	X		
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	X		X
Espuma	Saponinas	X	X	
Nihidrina	Aminoácidos	X		
Dragendorff	Alcaloides	X	X	X
Baljet	Coumarinas	X		X
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	X		
Felhing	Azúcares reductores	X	X	
Cloruro férrico	Taninos	X	X	
Börntrager	Quinonas	X	X	
Börntrager Variante	Quinonas	X		
Shinoda	Flavonoides	X	X	X
Sudán	Ácidos grasos			X

Ensayos cualitativos del tamizaje fitoquímico (167)

- **Ensayo de Resinas:** Permite reconocer en un extracto la presencia de resinas. Se adicionaron a 2mL de la solución alcohólica del extracto, 10mL de agua destilada, se agitó y se dejó reposar. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo (+).
- **Ensayo de Liebermann- Burchard:** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Se evaporó el solvente del extracto en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1m de cloroformo. Se adicionó 1mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo se dejaron correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sin agitar. Si se produce un cambio de coloración: Rosado-azul muy rápido; verde intenso visible, aunque rápido; verde oscuro- negro, final de la reacción, indica una respuesta positiva.
- **Ensayo de Espuma:** Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas. Se tomó una alícuota de cada extracto (acuoso y etanólico), en el caso del etanólico se diluyó en 5 veces su volumen en agua. En ambos casos se agitó fuertemente durante 5-10min. La aparición de una espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persistente por más de 2 min, indica una reacción positiva.
- **Ensayo de Ninhidrina:** Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. La alícuota del extracto en alcohol se mezcló con 2mL de la solución de nihidrina al 2%. La mezcla se calentó durante 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.
- **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. En los extractos etéreo y alcohólico, se tomó una alícuota del extracto, se evaporó en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1mL de HCl (1%). En el extracto acuoso a la alícuota de ensayo se le añadió una gota de HCl concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez. A las soluciones acuosas acidas, obtenidas anteriormente, se le añadieron 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Se producen complejos insolubles de tal manera que, si hay opalescencia el ensayo se considera positivo (+), si aparece turbidez definida como positivo (++) y si aparece un precipitado como positivo (+++).
- **Ensayo de Baljet:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas. La alícuota del extracto etéreo se evaporó en baño de agua y se redisolvió en 1 mL de alcohol. A los extractos etanólico y etéreo (tratado como se indicó previamente) se les adicionó 1

mL del reactivo de Baljet. La aparición de una coloración se considera positivo (+) y de un precipitado (++).

- **Ensayo de Kedde:** Permite reconocer la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcló con 1mL del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 minutos, y se observan los cambios de coloración. Un ensayo positivo es aquel en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas.
- **Ensayo de Felhing:** Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. El extracto alcohólico se evaporó en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1-2 mL de agua. A los extractos acuoso y alcohólico, tratado según se describió previamente, se les adicionaron 2 mL del reactivo (recién preparado) y se calentaron en baño de agua de 5-10 min. Si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo, indica una reacción positiva.
- **Ensayo de cloruro férrico:** Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. En el extracto etanólico el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto etanólico se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%, en solución salina fisiológica. En el extracto acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto acuoso se le añadió acetato de sodio, para neutralizar, y 3 gotas de la solución reactiva. Cuando aparece una coloración rojo-vino (compuestos fenólicos en general), verde intensa (taninos del tipo pirocatecólicos) y azul (taninos del tipo pirogalotánicos), indica una reacción positiva.
- **Ensayo de Börntrager:** Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Los extractos se evaporaron en baño de agua y el residuo obtenido en cada caso se redisolvió en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1mL de NaOH, al 5% en agua. Se agitó, mezclando las fases, y se dejó en reposo hasta su ulterior separación. Una reacción positiva se evidencia si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo (+), coloración rosada (++) y coloración roja (+++).
- **Variante del ensayo de Börntrager:** 2 mL de la fracción clorofórmica se concentran a seco y se redisuelven en 2 mL de benceno. Se agita en tubo de ensayos con 2 mL de NaOH, al 5% en agua.
 1. 1.2-naftoquinonas: benceno (rojo), álcali (azul violáceo).
 2. 1.4-naftoquinonas: benceno (amarillo), álcali (rojo).

- **Ensayo de Shinoda:** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. A los extractos se les adiciona 1 mL de HCl concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálica. Después de la reacción se esperaron 5 min, se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que las mismas se separaron. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos evidencia una reacción positiva.
- **Ensayo Sudán III:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos. A la alícuota del extracto se le añadió 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudán III. Se calentó en baño de agua hasta evaporación del solvente. Se consideró positivo al aparecer gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos.

2.5 Obtención de fracciones a partir del extracto hidroalcohólico

2.5.1 Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la obtención del extracto hidroalcohólico (EHA) se tomaron 20 g de la droga seca y molinada y se humectaron en 200 mL de etanol 80%. A continuación se reflujo durante 2 h empleando una manta de calentamiento y la cristalería necesaria. A continuación se filtró a través de papel de filtro. Se colectó el filtrado, y el residuo de la droga se sometió al mismo proceso extractivo 4 veces. Una vez terminado el proceso de extracción, el volumen correspondiente a cada reflujo se concentró al mínimo volumen en un rotoevaporador. Seguidamente se reunió el volumen restante de las 5 extracciones, se tomaron 2 mL para la determinación del contenido de sólidos totales, que se realizó según se describe en el acápite 2.4.1.1. El resto del extracto se rotoevaporó a 40 °C hasta sequedad.

2.5.1.1 Determinación del contenido de sólidos totales

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada. La cápsula se colocó en un baño de agua y se evaporó la muestra hasta que el residuo estuvo aparentemente seco. Posteriormente se colocó en una estufa a una temperatura de 105 °C durante 3 h. A continuación se colocó en una desecadora hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó en balanza analítica. El proceso anterior se repitió empleando

solo 60 min de secado las veces necesarias, hasta obtener masa constante. El contenido se sólidos totales (S_t) se determinó por la siguiente fórmula:

$$S_t = \frac{P_r - P}{V} \times 100$$

Donde:

P: Masa de la capsula vacía (g).

P_r : Masa de la cápsula más el residuo (g).

V: Volumen de ensayo (mL).

2.5.1.2 Tamizaje fitoquímico

Se le realizó el tamizaje fitoquímico al extracto siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.4.2.2 del presente estudio, añadiendo los ensayos de Salkouski y de Mayer (167).

- **Ensayo de Salkouski:** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y esteroides. 1 mL de la fracción en cloroformo se colocó en un tubo de ensayos con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. El ensayo positivo se muestra con una coloración amarillo rojiza.
- **Ensayo de Mayer:** Permite la identificación de alcaloides. Se procedió de la forma descrita en el ensayo de Dragendorff (acápitem 2.4.2.2 del presente estudio), hasta obtener la solución ácida. Se añadió una pizca de NaCl en polvo, se agitó y filtró. Se añadieron dos o tres gotas de la solución reactiva de Mayer. El resultado es positivo si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

2.5.2 Cromatografía en Columna

- Muestras de ensayo: EHA.
- Tipo de columna: Sílica gel
- Fase móvil: Benceno-Cloroformo (1:1)
Cloroformo-Metanol (97:3)
Metanol
Metanol-Agua (1:1)

Procedimiento:

El EHA seco obtenido se redisolvió en una mezcla de las fases móviles a utilizar y se añadió a la columna. A continuación se añadieron 50 mL de benceno a la columna, que se desechó y seguidamente se adicionaron, de forma consecutiva, 500 mL de las 4 fases móviles en orden creciente de polaridad. Se reguló la velocidad de entrada y salida de la columna, de manera que se estableciera un flujo continuo y esta no se secase. Se agruparon diferentes fracciones en función del color, del resultado del ensayo para detectar la presencia de quinonas y de los resultados de la cromatografía en capa delgada (CCD).

Presencia de quinonas: A cada fracción obtenida se le realizó el ensayo de Börntrager para evaluar la presencia de quinonas, en las condiciones que se describen en el acápite 2.4.2.2 del presente trabajo.

Cromatografía en capa delgada (CCD):

- Placas cromatográficas: Sílica gel 60 F₂₅₄.
- Fase móvil: Las fases que corresponden con las empleadas en la cromatografía de columna (CC), excepto en la fracción correspondiente a la fase móvil metanol, que se utilizó n-butanol/ácido acético/agua (8:2:10).
- Reveladores: Luz Ultra Violeta (UV) a 366 nm.
- Procedimiento: Cada fracción obtenida se sometió a CCD por el método convencional unidimensional ascendente. Las placas cromatográficas se recortaron cuidadosamente (3 cm de ancho por 10 cm de largo) y se señalaron con lápiz de grafito. Se emplearon capilares de vidrio para aplicar las muestras. La cámara cromatográfica se dejó saturar por 20 min con el sistema de disolventes empleado. Las placas se mantuvieron en la cámara cromatográfica hasta que la fase móvil alcanzó una distancia de aproximadamente 1 cm del borde superior de la placa. Se sacaron, se dejaron secar a temperatura ambiente y se revelaron con luz UV (366 nm).

2.5.3 Caracterización mediante CCD cualitativa del EHA y sus fracciones

- Placas cromatográficas: Sílica gel 60 F₂₅₄
- Fases móviles y reveladores:

Tabla 2.2 Condiciones empleadas en CCD para identificación de metabolitos.

No	Fase móvil	Metabolito	Revelador	Referencia
1	Diclorometano/metanol (8:2)	Flavonoides	AlCl ₃ al 5% en etanol	(168)
2	Benceno/acetato de etilo/ácido acético (7.5:2.4:0.5)*	Antraquinonas	KOH al 10% en metanol	(169)
3	Cloroformo/acetato de etilo/hexano/ácido acético (10:5:5:0.3).	Naftoquinonas	KOH al 10% en metanol.	(169)
4	n-hexano/acetato de etilo (17:3).	Alcaloides	H ₂ SO ₄ al 10% en etanol	(170)
5	Metanol/amoniaco (20:0.3)	Compuestos terpenoides	H ₂ SO ₄ al 10% en etanol	(169)

*En este caso la placa se acondicionó previamente con NaOH 1M.

- Procedimiento: Cada fracción de interés se sometió a CCD por el método convencional unidimensional ascendente. Las placas cromatográficas se recortaron cuidadosamente (5 cm de ancho por 10 cm de largo) y se señalaron con lápiz de grafito. Se emplearon capilares de vidrio para aplicar las muestras. La cámara cromatográfica se dejó saturar por 20 min con el sistema de solvente empleado. Las placas se mantuvieron en la cámara cromatográfica hasta que la fase móvil alcanzó una distancia de aproximadamente 1 cm del borde superior de la placa. Se sacaron, se secaron en estufa a 105 °C, se asperjaron con el revelador específico (Tabla 2.2) y posteriormente se observaron con luz UV (366 nm). El movimiento de los compuestos detectados se expresó mediante el factor de retención (R_f), según:

$$R_f = \frac{D_c}{D_s}$$

Donde:

R_f : Factor de retención

D_c : Distancia recorrida por el compuesto (cm)

D_s : Distancia recorrida por el solvente (cm)

2.6 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico y sus fracciones.

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. y de diferentes fracciones de este, obtenidos mediante cromatografía en columna, frente a los microorganismos de ensayo, mediante el método de difusión en pozo, descrito por Álvarez y colaboradores en el 2005 (171).

Sustancias de ensayo:

- Extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L., que se obtuvo según se describe en el acápite 2.5.1 del presente trabajo.
- Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna:
 1. EHA
 2. FMAG
 3. FMB
 4. FMC
 5. FBC
 6. FMA

El estudio se realizó con cuatro cepas de referencia; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 2/12/09, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 7/4/10, *Escherichia coli* ATCC 25922 7/4/14 y *Candida albicans* ATCC 10231 26/10; procedentes del Laboratorio de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas.

Preparación del inóculo

Inicialmente las cepas de las bacterias se sembraron por agotamiento en placas con agar Mueller-Hinton, las mismas fueron incubadas de 24 a 48 h a 37 °C. La cepa de *Candida albicans* se sembró por agotamiento en placas con agar Sabouraud, y se incubaron de 24 a 72 h a 28 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron de tres a cinco colonias de las cepas y se suspendieron en tubos que contenían 5 mL de solución salina fisiológica estéril, los cuales se homogenizaron vigorosamente. Finalmente se comparó la turbidez con los patrones 0,5 de la escala de McFarland para lograr la estandarización del inóculo aproximadamente entre 4 y 5×10^8 UFC/mL⁻¹.

Medios de cultivo

Se emplearon para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, caldo y agar Mueller-Hinton, y caldo y agar Sabouraud.

- Caldo Mueller-Hinton

Se pesaron 1.05 g del caldo en balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se filtró la disolución, se midió el pH, ajustándolo hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH y el caldo se distribuyó en tubos de ensayos. Luego los tubos se colocaron en autoclave a 121°C por 15 min. Se pasaron las cepas al medio bajo flujo laminar y se incubaron a 37°C por 24 h.

- Agar Mueller-Hinton

Se pesaron 19 g del agar en balanza analítica y se suspendieron en 500 mL de agua destilada. El preparado se disolvió con ayuda de un agitador magnético, sin calor. Se midió el pH, ajustándolo hasta 7.3 ± 0.2 con papel indicador de pH. Se distribuyó en un erlenmeyer que fue colocado en autoclave a 121°C por 15 min. Luego se vertió 20 mL del medio recién preparado y enfriado a temperatura ambiente en 20 placas Petri de vidrio con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada.

- Caldo Sabouraud

Se pesaron 1.5 g del caldo en balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se filtró la disolución, se midió el pH, ajustándolo hasta 5.7 ± 0.2 con papel indicador de pH y el caldo se distribuyó en tubos de ensayos. Luego los tubos se colocaron en autoclave a 121°C por 15 min. Se pasaron las cepas al medio bajo flujo laminar y se incubaron a 28°C por 24-72 h.

- Agar Sabouraud

Se pesaron 13 g del agar en balanza analítica y se suspendieron en 200 mL de agua destilada. El preparado se disolvió con ayuda de un agitador magnético, sin calor. Se midió el pH, ajustándolo hasta 5.6 ± 0.2 con papel indicador de pH. Se distribuyó en un erlenmeyer que fue colocado en autoclave a 121°C por 15 min. Luego se vertió 20 mL del medio recién preparado y enfriado a temperatura ambiente en 10 placas Petri de vidrio con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada.

Procedimientos y técnicas

La secuencia de las operaciones, a través del método de difusión en pozos, fue la siguiente:

1. Las placas con Agar Mueller-Hinton y Agar Sabouraud se inocularon con las suspensiones de los microorganismos, con un total de tres réplicas por cada uno. La suspensión de microorganismos se distribuyó de forma uniforme sobre la superficie de las placas.
2. Posteriormente, con la ayuda de un sacabocado se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro en cada placa.
3. Todos los extractos se evaluaron frente a cuatro cepas de referencia. Se empleó una placa con cinco pozos, por cada muestra en estudio, para un total de tres réplicas por sustancia. En cada pozo se adicionaron 100 μ L de sustancia en estudio.
4. Las placas inoculadas con bacterias se incubaron a 37 °C y las sembradas con levadura a 28 °C, y se procedió con la lectura a las 24h, 48h y 72h.

2.7 Actividad *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Se evaluó la actividad antibacteriana de las fracciones FBC, FMB y FMAG del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L, frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*.

Se emplearon promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) recientemente aislados (menos de diez subcultivos *in vitro*) de lesiones cutáneas de ratones Balb/c previamente infectados de forma experimental. Los cultivos se realizaron en medio de Schneider suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina sódica (200 UI/mL) y estreptomina (200 μ g/mL) y se incubaron a 26 °C. Para mantener los promastigotes en multiplicación exponencial se hicieron siembras en medio fresco cada 3-4 días.

Los extractos a ensayar fueron previamente disueltos en dimetilsulfóxido a razón de 20 mg/mL y luego se realizaron diluciones seriadas con medio de cultivo en placas de 96 pozos a las que se agregaron cultivos frescos de promastigotes para lograr una concentración final de 5×10^5 promastigotes/mL. Se ensayaron ocho concentraciones de cada fracción, siguiendo una progresión geométrica de 1:2,5. De este modo, la máxima concentración probada fue 240 μ g/mL y la mínima 0,4

$\mu\text{g/mL}$. Cada concentración se ensayó por cuadruplicado. En cada placa se incluyeron pozos tratados con furvina (control positivo) a 10 $\mu\text{g/mL}$ (concentración final), pozos tratados con dimetilsulfóxido al 0,5% (concentración final) y pozos controles que no recibieron tratamiento.

Después de 72 h de incubación a 26 °C se examinaron los cultivos con ayuda de un microscopio invertido para evaluar la presencia de promastigotes móviles en las distintas concentraciones y así estimar la mínima concentración con efecto parasiticida. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 20 μL de resazurina 3 mM y se incubó por otras 8 h en iguales condiciones. Pasado este tiempo, se leyeron las placas en un lector de fluorescencia, se calcularon los valores de inhibición del crecimiento asociados a cada concentración y se estimaron las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) mediante ajuste no lineal a curvas sigmoides. Cada fracción se ensayó tres veces. Simultáneamente se probó la actividad de la anfotericina B–desoxicolato de sodio como fármaco de referencia.

Resultados y discusión



Resultados y discusión

3.1 Caracterización farmacognóstica del material vegetal

A pesar de que *Jatropha gossypifolia* L es una especie ampliamente empleada en la medicina popular cubana, existe escasa documentación que avale sus aplicaciones etnomedicinales, así como limitadas investigaciones que justifiquen su empleo tradicional.

En el departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, desde hace varios años se realizan investigaciones farmacognósticas, fitoquímicas, farmacológicas, toxicológicas y de formulación con vistas a explotar las potencialidades medicinales de la especie; ampliamente estudiada a nivel internacional. A pesar de que las mismas se han centrado en las hojas de la planta, recolectadas en la región central del país, la procedencia del material empleado en diversos estudios varía, lo que puede influir en la composición fitoquímica, así como en la respuesta obtenida en estudios farmacológicos y toxicológicos. Por esto, en todos los estudios realizados, primeramente se realiza una caracterización farmacognóstica y fitoquímica del material vegetal.

En la presente investigación, el material se recolectó en un sitio cercano a la costa en el poblado de Casilda, del municipio Trinidad. Este poblado se distingue del resto de las localidades en las que se ha recolectado la especie, por estar situada muy cerca de la costa, con condiciones diferentes al resto de las localidades en las que se ha recolectado el material para estudios en la región central del país.

3.1.1 Índices numéricos

La calidad para los medicamentos a base de plantas medicinales es un requisito básico, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. Las plantas medicinales que constituyen la materia prima para la elaboración de productos fitoterapéuticos poseen variaciones en el contenido de sus principios activos y pueden sufrir deterioro y contaminaciones. Por esta razón, el control de calidad de las materias primas vegetales es de particular importancia (172) (173). Se realizaron ensayos cuantitativos a las hojas secas y molinadas, como parte del análisis farmacognóstico de materias primas vegetales. Dichos ensayos se basaron

en la determinación de los índices numéricos: contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas ácido-insolubles.

3.1.1.1 Contenido de humedad.

Las drogas vegetales contienen todos los requerimientos esenciales para el crecimiento de hongos y bacterias. El exceso de agua se considera el principal responsable de su deterioro microbiológico, así como de la hidrólisis de algunos constituyentes de la droga. Las monografías de las farmacopeas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en aquellas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Una vez que toma lugar la infestación, el deterioro puede ser muy rápido, por lo que la determinación del contenido de humedad es de suma importancia (174).

El valor de humedad para la droga en estudio fue de 9.34 % (Tabla 3.1), por lo tanto cumple con los límites permisibles (8-14%) y establecidos por Miranda y Cuéllar (167), lo que indica que las condiciones de secado fueron las adecuadas. El contenido de humedad determinado es ligeramente superior al descrito para las hojas de la especie recolectadas en Cuba por Pérez en el 2016 en el municipio de Fomento y por Coba en el 2017 en Quemando de Güines (7.59%) (165); a pesar de que en todos los casos se emplearon las mismas condiciones de secado. Estas diferencias pudieran estar dadas por las condiciones típicas de suelo, de humedad ambiental, clima de cada localidad, época de recolección, entre otras.

Tabla 3.1 Índices numéricos obtenidos para las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Índices numéricos	Valores (%) ($\bar{X} \pm DE$)	Valores (%) ($\bar{X} \pm DE$) Pérez (2016)	Valores (%) ($\bar{X} \pm DE$) Coba (2017)
Contenido de humedad	9.39 \pm 0.043	6.53 \pm 0.16	7.59 \pm 0.05
Cenizas totales	10.96 \pm 0.244	11.61 \pm 1.5	10.73 \pm 0.54
Cenizas solubles en agua	2.50 \pm 0.108	3.38 \pm 0.29	-
Cenizas ácido-insolubles	0.22 \pm 0.035	-	-

3.1.1.2 Cenizas totales

Otro de los parámetros que caracterizan la droga seca en estudio fue la determinación de cenizas totales. La ceniza resultante de la incineración del material vegetal puede ser fisiológica y no fisiológica, por lo que el proceso de determinación de este índice engloba el análisis de ambos tipos de cenizas.

Se denomina ceniza fisiológica a aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de materia extraña, principalmente suelo y arena, que se adhieren a la superficie de la droga se denomina ceniza no fisiológica. El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga. Las cenizas totales usualmente consisten en carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice. Este ensayo es de extrema importancia e indica el extenso cuidado tomado durante la preparación de la droga (174).

El valor de cenizas totales del material vegetal en estudio fue de 10,96 %, (Tabla 3.1) y cumple con lo establecido por la USP # 28, cuyo límite es de 12 %.

Cuando el valor obtenido para las cenizas totales es elevado (>5%), es necesario conocer si las mismas están compuestas por metales pesados, lo cual se determina mediante los ensayos de cenizas insolubles, y si este valor es elevado hay que someter a la droga a otros análisis antes de aprobar su uso.

Las cenizas solubles en agua se calculan por diferencia en peso entre las cenizas totales y el residuo remanente después del tratamiento de las cenizas totales con agua.

Las cenizas ácido-insolubles son los residuos después de la ebullición de las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido. Esta determinación mide la presencia de sílica, especialmente de arena y tierra silíceas (167).

El bajo porcentaje de cenizas ácido-insolubles (Tabla 3.1) que caracteriza al material en estudio implica que el contenido fundamental de cenizas en material vegetal no corresponde a metales pesados, por lo tanto no hay que someter la droga a otros análisis.

3.2 Caracterización fitoquímica de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L

Uno de los estudios obligados cuando se trabaja con diferentes partes de especies vegetales con fines medicinales, es la caracterización cualitativa del contenido de metabolitos, debido a que estos son los responsables de su perfil farmacológico y toxicológico. Con este fin se obtienen extractos con diferentes solventes y, a partir de ellos, se realizan ensayos de identificación característicos de cada tipo de metabolito.

La adecuada selección de los tipos de disolventes que se utilizan durante la extracción, así como los métodos y condiciones empleados, son aspectos importantes para lograr la extracción del mayor número de metabolitos posible, y así obtener una caracterización fitoquímica confiable de la droga. A partir de los resultados del tamizaje, se debe orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

En la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes. Con el tamizaje fitoquímico se obtienen datos preliminares sobre los componentes químicos de la planta y constituye únicamente una orientación que debe interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico (174, 175).

Esta información puede guiarnos sobre las posibles acciones farmacológicas que pueden ejercer el extracto y los posibles metabolitos responsables de las mismas. En correspondencia con los criterios mencionados anteriormente se realizó la evaluación fitoquímica de las hojas de la especie en estudio.

Los extractos obtenidos se caracterizaron por diferencias en la coloración (Tabla 3.2), que se atribuyen a la diferencia en la composición fitoquímica, como se muestra más adelante (Tabla 3.3). La prevalencia de la tonalidad verde en el extracto etanólico es indicativo del contenido de clorofila. En ninguno de ellos se detectó la aparición de un precipitado.

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado, permitieron identificar la presencia de diferentes metabolitos secundarios en el extracto de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.: saponinas, azúcares reductores, flavonoides, fenoles y/o taninos, alcaloides, aminoácidos, triterpenos y/o esteroides, ácidos grasos y quinonas (Tabla 3.3).

Tabla 3.2 Características organolépticas de los extractos empleados en la caracterización fitoquímica.

Tipo de extracto	Color	Olor
Etanólico	Verde muy oscuro	Característico de la planta. Intenso
Acuoso	Carmelita verdoso muy oscuro	Característico de la planta
Etéreo	Carmelita verdoso oscuro	Característico del solvente

Tabla 3.3 Resultados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L, empleando diferentes solventes de extracción.

Ensayos	Metabolitos	Tipo de extracto		
		Etanólico	Acuoso	Etéreo
Resinas	Resinas	-		
Liebermann-Burchard.	Triterpenos y/o esteroides	-		+
Espuma	Saponinas	+++	+++	
Nihidrina	Aminoácidos	++		
Dragendorff	Alcaloides	+	+	-
Baljet	Coumarinas	-		-
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	-		
Felhing	Azúcares reductores	++	-	
Cloruro férrico	Taninos	++	-	
Börntrager	Quinonas	+++	+++	
Shinoda	Flavonoides	-	++	+
Sudán	Ácidos grasos			+

Leyenda:

(+; ++; +++): Respuesta positiva de presencia del metabolito en el extracto.

(-): Respuesta negativa de presencia del metabolito en el extracto.

Espacio en blanco: No se le realizó el ensayo.

Este tipo de estudio, empleando diferentes disolventes de variada polaridad, se realiza por primera vez a las hojas de la especie de la región central del país, pues los estudios anteriores lo hacían a partir del EHA. No obstante, los resultados

obtenidos coinciden en casi todos los tipos de metabolitos, excepto, que se detecta la presencia de triterpenos y/o esteroides y ácidos grasos; ensayos que no se realizaron por Pérez (2016) y Coba (2017), y que no se detecta la presencia de coumarinas en el presente estudio, que si se habían identificado por estos autores.

Los triterpenos y esteroides son un grupo de metabolitos con variadas acciones. En el caso particular de la especie en estudio son de gran importancia, pues se describe en la literatura un diterpeno, Jatrofona, aislado de las raíces, que posee actividad citotóxica, antineoplásica significativa, inhibe la liberación de insulina, efecto relajante de la contracción inducida en músculo, inhibe la activación de los leucocitos, actividad frente a protozoos, gastroprotectora, entre otras. Además, sus derivados naturales 2α -OH Jatrofona y 2β -OH Jatrofona, 2β -OH-5,6-isoJatrofona con actividad citotóxica y Jatrofenona, con actividad antibacteriana (176, 177).

3.3 Obtención y caracterización de fracciones a partir del extracto hidroalcohólico

3.3.1 Obtención del extracto hidroalcohólico

Sobre la base de los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las hojas de la especie en estudio (Acápite 3.2), caracterizado por la mayor diversidad de metabolitos en los extractos acuoso y etanólico; se decidió continuar los estudios con un extracto hidroalcohólico. Este tipo de extracto, además, utiliza solventes que no son tóxicos y son más amigables con el medio ambiente. Además, es el tipo de extracto que se ha empleado en los estudios sobre las hojas de la especie, realizados en la región central de Cuba y que ha manifestado diferentes actividades farmacológicas (178) (179).

En este caso, la extracción se realizó en condiciones similares a las realizadas anteriormente por Rivero (2014) (178), Pérez (2016) (179) y Coba (2017) (165), con la diferencia de que el proceso de extracción se realizó 5 veces sobre el mismo material, con el propósito de extraer la mayor cantidad posible de metabolitos. La desventaja fundamental del empleo de este sistema de solventes es que limita la extracción de metabolitos muy apolares como el diterpeno jatrofona, presente en diferentes especies de *Jatropha*, entre ellas *Jatropha gossypipholia* L, ampliamente estudiado como anticancerígeno, que ya se ha obtenido por vía sintética. No

obstante este metabolito se ha aislado a partir de un extracto etanólico seguido de fraccionamiento con hexano (180).

3.3.1.1 Sólidos totales

Los sólidos totales permiten tener elementos sobre la masa de metabolitos que el sistema de solventes empleado fue capaz de extraer del material vegetal. Aunque este parámetro no está normado para el EHA de la planta en estudio, es importante ensayarlo. El valor obtenido es de 0,742 g/100 mL de la mezcla de solventes empleada en la extracción, que corresponde a 7,42 mg/mL, y a un rendimiento de extracción de 0,371 g/g de material vegetal (37,1%), relativo a la planta seca. Se debe considerar que el extracto de la planta no está estandarizado, y que el valor obtenido puede estar influido por el estadio del desarrollo fenológico de la planta y por las condiciones edafoclimáticas del sitio de recolección.

3.3.1.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico del EHA de las hojas de la especie incluyó los ensayos realizados para los extractos etanólico, acuoso y etéreo. Además se incluyeron otros ensayos específicos para triterpenos y/o esteroides y alcaloides, debido a que estos grupos de metabolitos pudieran estar directamente relacionados con las actividades farmacológicas que se incluyen en el presente trabajo.

Como era de esperar los resultados de los ensayos se corresponden con los obtenidos para los extractos etanólico y acuoso (Acápite 3.2) (Tabla 3.4), y es representativo de la composición fitoquímica de las hojas de la planta. Mediante la inclusión de un segundo ensayo para los casos de triterpenos y/o esteroides y alcaloides, se pudo confirmar la presencia de los mismos en el EHA (Fig. 3.1).

3.3.2 Cromatografía en columna (CC)

Los estudios microbiológicos realizados por Coba (2017) (165) sugieren que la ausencia de quinonas en el EHA de las hojas de la especie, recolectada en Quemado de Güines, pudiera ser la causa de la inactividad del mismo frente a *Staphylococcus aureus*. Por esta razón en el presente trabajo, entre otros aspectos, se intentó probar si realmente esta hipótesis era verdadera.

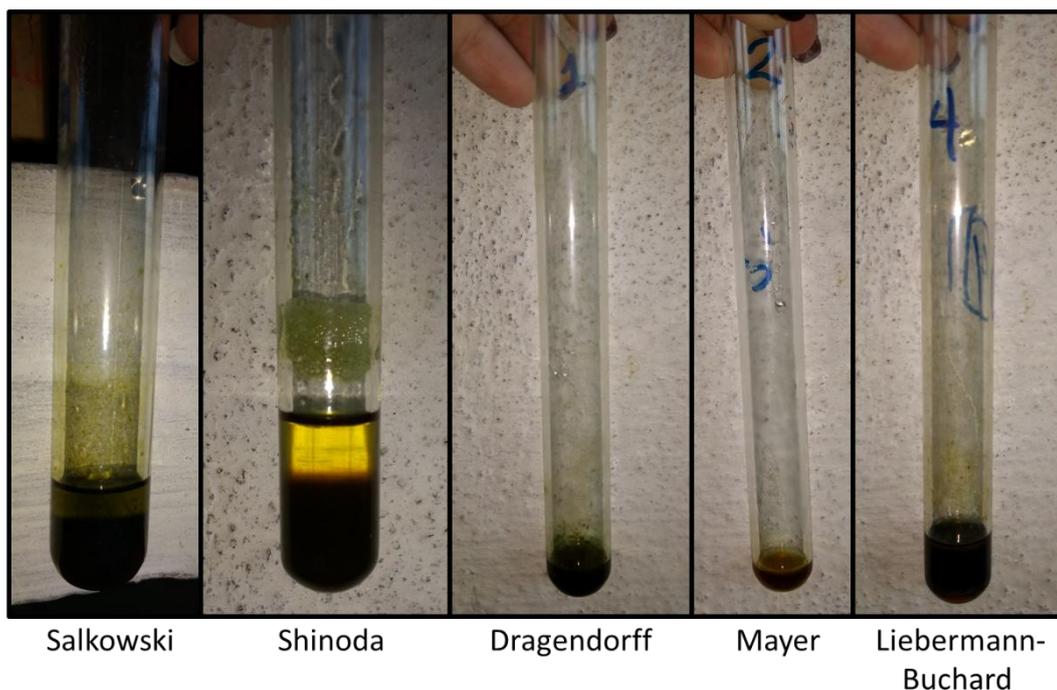


Fig. 3.1 Resultados de los ensayos de Dragendorff, Mayer, Salkowsky, Shinoda y Lieberman en el EHA.

Tabla 3.4 Resultados del tamizaje fitoquímico del EHA de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolitos	Ensayos	Resultado
Resinas	Resinas	-
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann- Burchard.	+
	Salkowsky	+
Saponinas	Espuma	+++
Aminoácidos	Nihidrina	++
Alcaloides	Dragendorff	+++
	Mayer	+++
Coumarinas	Baljet	-
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	-
Azúcares reductores	Felhing	++
Taninos	Cloruro férrico	++
Quinonas	Börntrager	+++
Flavonoides	Shinoda	+

Se conoce que las quinonas, tanto de origen natural como sintético, poseen actividad antimicrobiana. Ejemplos: hipericina, una antraquinona de la planta *Hypericum perforatum* (181); 6-(4, 7 dihidroxi-heptil) quinona, una nueva quinona aislada de *Pergularia daemia*, que mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris* (182); y se describen otros nuevos compuestos obtenidos por síntesis, que contienen en su estructura el agrupamiento quinona, que se mostraron activos frente a *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteum* y *C. tenuis* (183).

Por otra parte, a pesar de que se han aislado, e incluso obtenido por síntesis, numerosos compuestos a partir de *Jatropha gossypifolia* L, con diferentes actividades farmacológicas, incluida la antimicrobiana, dentro de ellos no se reporta ninguna quinona.

Las quinonas corresponden a anillos aromáticos con dos grupos cetona como sustituyentes. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza y son muy reactivas. Pueden presentarse en diferentes formas. Las quinonas libres son prácticamente insolubles en agua; las que se presentan en forma de glicósidos son solubles en agua y alcoholes. Así, debido a que la extracción a partir de las hojas de la especie se realizó con una mezcla alcohol/agua, las quinonas que se extraerían estarían, fundamentalmente, en su forma soluble en estos disolventes (Ejemplo: glicósidos).

Además de las quinonas, otros grupos de metabolitos de interés para las acciones farmacológicas en investigación son los terpenoides, alcaloides, flavonoides. Por esto se consideraron fracciones representativas de cada fase móvil para posteriores estudios.

Con vistas a la separación de los metabolitos en fracciones se emplearon cuatro sistemas de solventes, comenzando por el de menor polaridad. Se aseguró, en cada caso, que cuando cambiara la coloración de la fase móvil que salía de la columna se colectara por separado. Previo al paso de las fases móviles por la columna, se añadieron 50 mL de benceno, con el propósito de desengrasar la muestra, que se desechó. La separación en este caso ocurrirá fundamentalmente por la solubilidad de los metabolitos en la fase móvil en cuestión, y su afinidad por la fase estacionaria. Deben salir primero los más apolares.

3.3.2.1 Fase móvil benceno-cloroformo (1:1)

De esta fase se colectaron 10 fracciones de aproximadamente 50 mL cada una, de color carmelita, más intenso en las primeras colectas, que fue aclarando con el paso de la fase móvil. En ninguna de estas fracciones se detectó la presencia de quinonas, ya que el ensayo de Börntrager fue negativo (Fig. 3.2). Sin embargo los resultados de la CCD no revelaron diferencias entre las colectas cuando se colocaron bajo luz UV de 366 nm, con la aparición de manchas de color rosado intenso, con diferentes valores de R_f (Fig. 3.3). La coloración más intensa fue la del benceno empleado para desengrasar la muestra. La intensidad del color de estas manchas fue disminuyendo con el incremento del número de las fracciones.



Fig. 3.2 Ensayo de Börntrager para fracciones de la fase benceno-cloroformo.

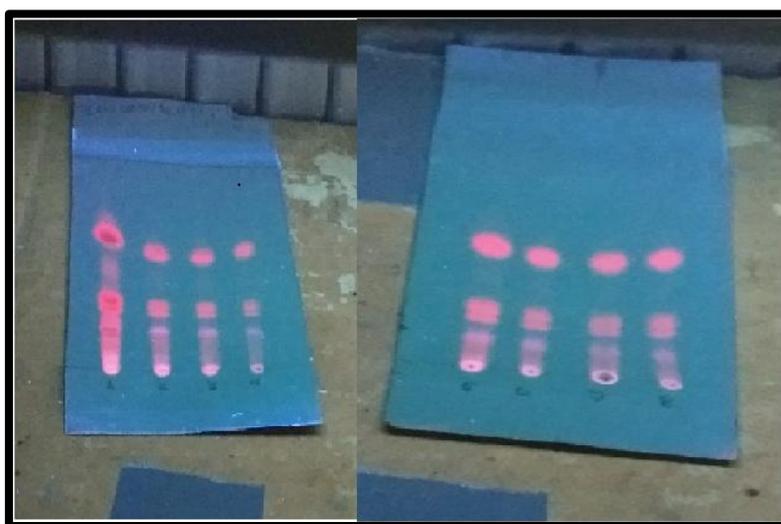


Fig. 3.3 CCD de las fracciones de la fase móvil benceno cloroformo.

Se decidió reunir las 10 fracciones en una sola: fracción benceno-cloroformo (FBC) teniendo en cuenta el color, la CCD y la respuesta al ensayo de quinonas.

Para los estudios farmacológicos que se realizarán posteriormente, se decidió concentrar la muestra al máximo posible para lo que se rotoevaporó hasta su concentración al máximo posible. El producto obtenido no correspondió a un sólido cristalino, sino a una masa gomosa de color verde muy oscuro.

3.3.2.2 Fase móvil cloroformo-metanol (97:3)

Se obtuvieron tres fracciones con volúmenes que variaron entre 100-200 mL, de color amarillo claro intenso, que iba a degradándose con el paso de la fase móvil. En ninguna de estas fracciones se detectó la presencia de quinonas, ya que el ensayo de Börntrager fue negativo (Fig. 3.4). A pesar de que la polaridad de esta fase móvil es superior a la de FBC, se detectan mediante CCD, en las primeras dos fracciones, las mismas manchas que en FBC, con igual color, pero menos intensas y similares valores de R_f , (Fig. 3.5). Sin embargo la tercera fracción dio un patrón de CCD muy diferente, caracterizado por una sola mancha, de color azul-violeta claro, con un valor de R_f muy superior al resto de las detectadas en las fracciones anteriores, por lo que debe corresponder a otro tipo de compuesto.

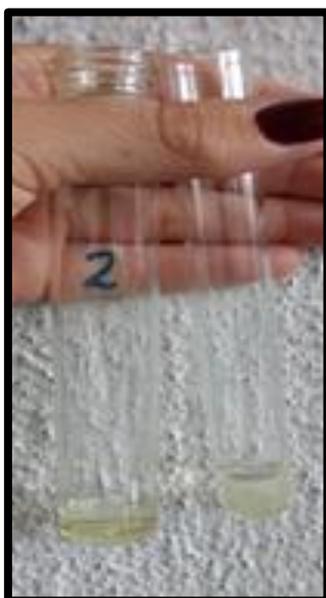


Fig. 3.4 Ensayo de Börntrager para fracciones de la fase móvil cloroformo-metanol

En este caso se decidió, en base al resultado de CCD y de Börntrager, agruparlas en dos fracciones: fracción cloroformo-metanol A (FCMA), constituida por las dos

primeras fracciones de este sistema de solventes; y fracción cloroformo-metanol B (FCMB), que correspondió a la tercera fracción. Tras la concentración de las fracciones mediante rotoevaporación se obtuvo un sólido de coloración amarilla clara, pero en muy poca cantidad, lo que hizo imposible realizar los ensayos farmacológicos a las mismas.

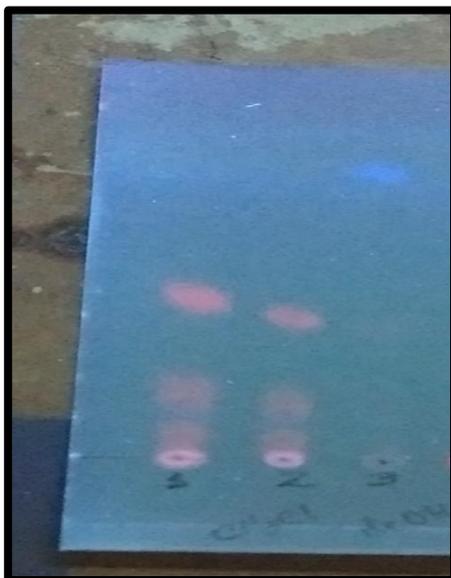


Fig. 3.5 CCD de las fracciones cloroformo-metanol.

3.3.2.3 Fase móvil metanol

Se obtuvieron 10 fracciones con volúmenes que variaron entre 30-100 mL, de color carmelita-rojo intenso que iba disminuyendo con el paso de la fase móvil, excepto la primera fracción que presentó una tonalidad verdosa. El ensayo de Börntrager solo dio positivo en las primeras ocho fracciones, lo que indica la presencia de quinonas (Fig. 3.6). Se detectan mediante CCD (Fig. 3.7), en cada fracción, tres manchas con valores de R_f diferentes entre ellas, pero similares entre fracciones, que deben corresponder a tres compuestos presentes en esta fase móvil.

En este caso, en base al resultado de CCD y del ensayo de Börntrager, se decidió agrupar la colecta en tres fracciones: fracción metanol A (FMA), constituida por la primera fracción de este sistema de solventes, que posee una coloración y resultados de CCD diferentes al resto de las colectadas, a pesar de que resulta positivo el ensayo de Börntrager; fracción metanol B (FMB), que correspondió a las fracciones de la dos a la ocho, y fracción metanol C (FMC) que agrupó las colectas nueve y diez, en las que el ensayo de Börntrager resultó negativo.



Fig. 3.6 Ensayo de Böntrager para las fracciones de la fase móvil metanol.

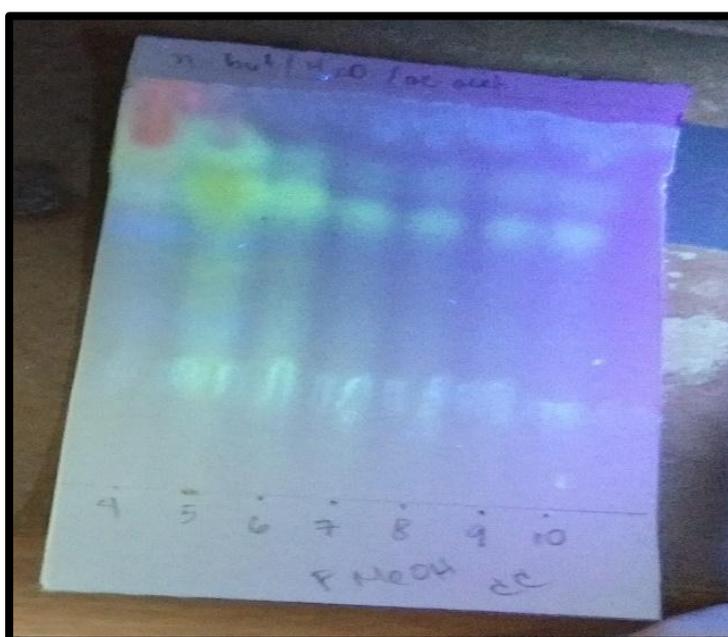


Fig. 3.7 CCD de las fracciones con fase móvil metanol.

El producto obtenido tras la rotoevaporación no correspondió a un sólido cristalino en ninguno de los casos, sino a una masa gomosa de consistencia similar a la obtenida a partir de la FBC, pero de color rojo muy oscuro.

3.3.2.4 Fase móvil Metanol-Agua (1:1)

Se obtuvieron 2 fracciones con volúmenes de aproximadamente 250 mL, de color carmelita-amarilloso, menos intenso con el paso de la fase móvil. El ensayo de Börntrager resultó positivo, lo que indica la presencia de quinonas (Fig. 3.8).



Fig. 3.8 Ensayo de Börntrager de las fracciones de la fase móvil metanol-agua.

En este caso, en base a los resultados obtenidos en el ensayo de Börntrager y al color, se decidió agrupar la colecta en una fracción: fracción metanol-agua (FMAG). El producto obtenido tras la rotoevaporación no correspondió a un sólido cristalino, sino a una masa de consistencia fangosa, de color carmelita.

3.4 Caracterización mediante CCD cualitativa del EHA y sus fracciones

Con vistas a esclarecer la naturaleza de los metabolitos presentes en el EHA y fracciones representativas del mismo (FBC, FMB y FMAG) se realizó la CCD, empleando condiciones cromatográficas, en cuanto a fases móviles, y tipos de reveladores, característicos para metabolitos de interés farmacológico en las acciones en investigación: quinonas, alcaloideos, flavonoides y terpenoides.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la detección de quinonas evidenció la presencia de antraquinonas en el EHA y en ninguna de las fracciones evaluadas (Fig. 3.9). Sin embargo, se reveló la presencia de naftoquinonas en el EHA y en FBC (Tabla 3.5). En las condiciones características para flavonoides, se

observan nuevas manchas con diferentes valores de R_f , de color amarillo verdoso, característico de flavonas y flavonoles en el EHA, en FMB y FMGA (Fig. 3.10).

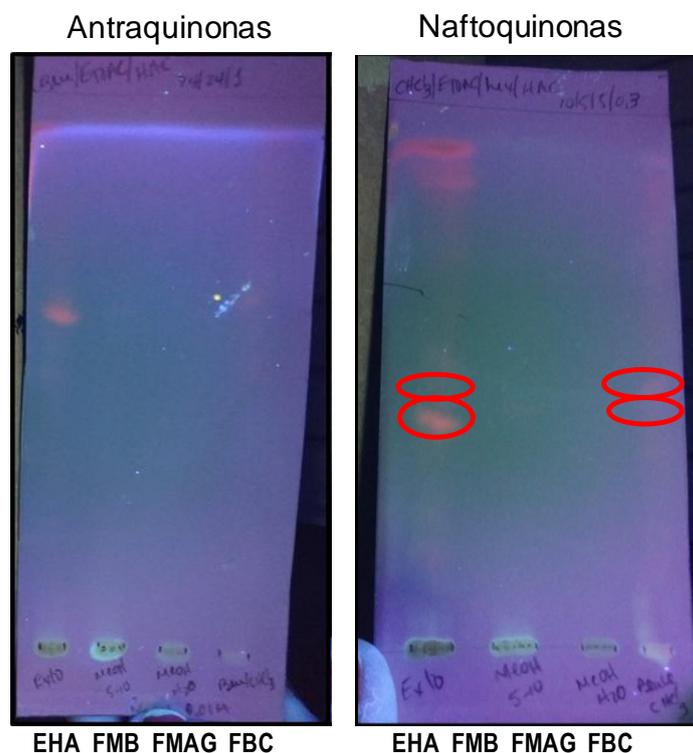


Fig. 3.9 CCD para la caracterización de quinonas.

En la CCD empleada para la detección de terpenoides, se detecta la aparición del mayor número de manchas, y de mayor intensidad, en el EHA y en FBC. Además aparecen algunas de ellas en FMAG, pero menos intensas (Fig. 3.11). En el caso de los alcaloides en las condiciones cromatográficas empleadas se aprecian manchas no bien resueltas y colas, lo que dificulta la interpretación (Fig. 3.12). No obstante en el EHA y en las tres fracciones evaluadas se detecta la presencia de manchas que podrían corresponder a alcaloides.

Estos resultados confirman la presencia de naftoquinonas, flavonoides, terpenoides y alcaloides, metabolitos que pudieran estar relacionados con las actividades frente a microorganismos y *leishmania* que se evalúa en el presente trabajo.

Tabla 3.5. Valores de R_f de las manchas detectadas para los diferentes grupos de metabolitos

Metabolito	EHA	FBC	FMB	FMAG
Antraquinonas	-	-	-	-
Naftoquinonas	0.5795	0.5795		
	0.4091			
Flavonoides	0.5974	-	0.5974	-
	0.4416		0.4416	
Terpenoides	0.5581	0.6163	-	0.5974
	0.3488	0.0930		
	0.0930	0.3837		

Flavonoides

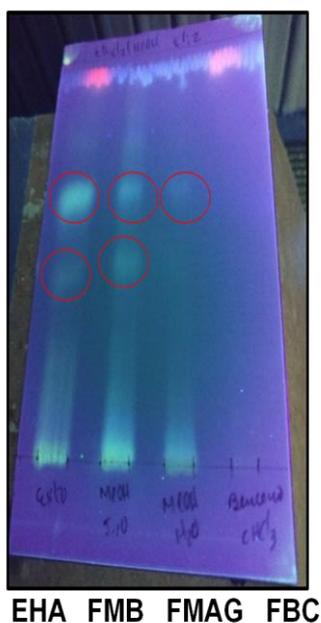


Fig. 3.10 CCD para la caracterización de flavonoides.

3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico y sus fracciones.

Varios estudios reportados en la literatura avalan la actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies del género *Jatropha*, y en particular de *Jatropha gossypifolia* L, tanto de toda la planta, como de diferentes partes de la misma. (173, 184). Los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L se han mostrado activos frente a bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*,

Staphylococcus aureus) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*). (185) Además, se describe el uso etnomedicinal de las hojas para el tratamiento de candidiasis oral y de micosis, y extractos de diferentes partes han mostrado actividad antifúngica (186).

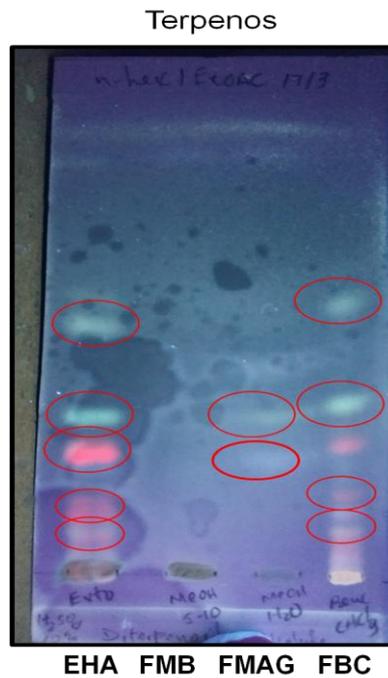


Fig. 3.11 CCD para la caracterización de compuestos diterpenoides.



Fig. 3.12 CCD para la caracterización de alcaloides.

No solo se ha descrito actividad antimicrobiana para extractos de la planta; un metabolito aislado de toda la planta (*Jatropha gossypifolia* L), un diterpeno macrocíclico, Jatrofenona, se ha referido activo frente a *Staphylococcus aureus*, con una actividad comparable a la de la penicilina, empleada como referencia (176).

En nuestro país no se ha evaluado ampliamente el potencial antimicrobiano de la especie en estudio. Solo se ha estudiado la actividad del extracto hidroalcohólico de las hojas frente a *Staphylococcus aureus* (165, 178). Los resultados de los mismos son contradictorios. Por estas razones se decidió evaluar su efectividad frente a una mayor diversidad de microorganismos, que incluyeron bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura, y se evaluaron el EHA y las fracciones del mismo que rindieron cantidad suficiente para la realización de los ensayos.

Se incluyeron todas las fracciones que resultaron positivas en el ensayo de quinonas, en busca de una respuesta a la presunción de que podrían contribuir a la actividad antimicrobiana descrita para la especie. Además se decidió evaluar otras fracciones que no contenían quinonas, pues son muchos los tipos de metabolitos que se describen poseen esta actividad (187).

Dentro de los métodos usados para evaluar, *in vitro*, la susceptibilidad de bacterias ante diferentes agentes o extractos, se destaca el método de difusión en pozo, ya que presenta la ventaja de ser altamente reproducible y sensible (188) por esto se seleccionó para el presente estudio.

Los resultados de la actividad antimicrobiana, expresados por los halos de inhibición, de las muestras en ensayo frente a los diferentes microorganismos mostraron que solo el EHA fue efectivo, inhibiendo el crecimiento de las bacterias Gram positivas ensayadas (Tabla 3.6, Fig. 3.12-3.14). Sin embargo, ninguna de las fracciones estudiada mostró actividad ante ninguno de los microorganismos.

Este resultado podría explicarse si los metabolitos que más contribuyen a la actividad antibacteriana fueran muy apolares, como Jatrofenona, diterpeno macrocíclico con potente actividad frente a *Staphylococcus aureus*, muy poco soluble en agua (12). En tal caso, como la mezcla de solventes empleada en la extracción del material vegetal, en el presente estudio, no es apolar, se extraerían en bajas cantidades; suficientes para mostrar actividad a partir del EHA, pero no en las fracciones del mismo. Además, se debe considerar, que previo al

fraccionamiento del EHA mediante CC, se desengrasó el material con benceno, solvente muy apolar, que podría haber extraído estos metabolitos apolares. Es posible, también, que algunos metabolitos hayan quedado retenidos en la fase estacionaria de la columna.

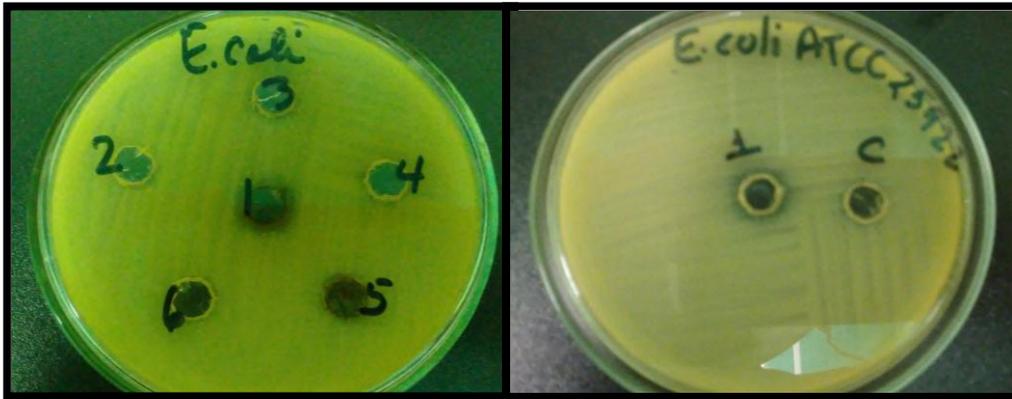


Fig. 3.12 Placas de *Escherichia coli* actividad positiva

Tabla 3.6. Actividad antimicrobiana del EHA y sus fracciones.

No	Tipo de extracto	Halos de inhibición (mm) ($\bar{X} \pm DE$)			
		<i>E. coli</i> Gram -	<i>P.aeruginosa</i> Gram -	<i>S. aureus</i> Gram +	<i>C. albicans</i> Levadura
1	EHA	12±0.21	14±0.12	0.0±0.0	0.0±0.0
2	FMAG	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
3	FMB	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
4	FMC	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
5	FBC	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
6	FMA	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0



Fig. 3.13 Placas de *Pseudomonas aeruginosa* actividad positiva.

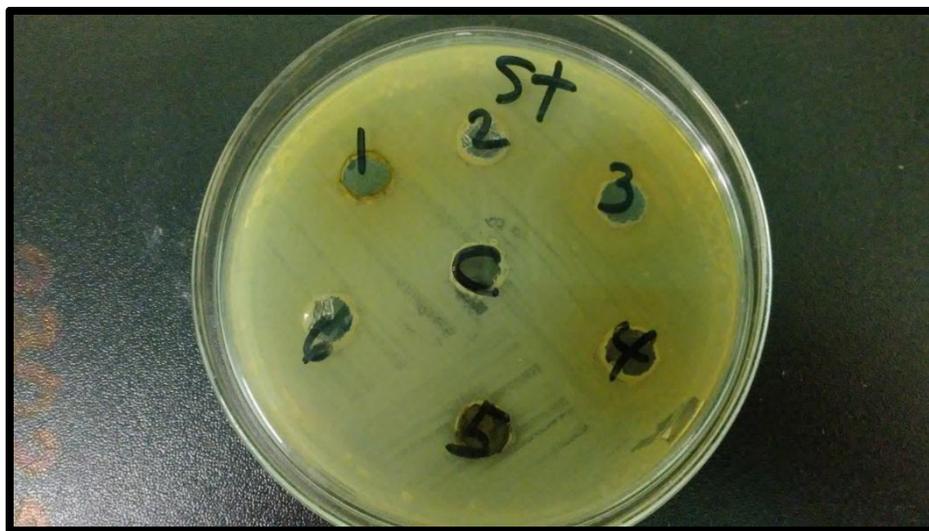


Fig. 3.14 Placa de *Staphylococcus aureus* actividad negativa

Otro elemento que pudiera influir en los resultados es el tipo de método empleado en la evaluación de la actividad antimicrobiana. El extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. tiene entre sus constituyentes químicos compuestos polares y no polares. Estudios realizados recomiendan usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (188).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que en el caso de las plantas medicinales, los mecanismos de acción son más complicados, debido a la variedad en su composición. Entre los metabolitos pueden aparecer interacciones de sinergismo y de antagonismo, que juegan un papel importante en la actividad biológica (189).

Los resultados negativos alcanzados para las fracciones que contienen quinonas (FMA, FMB, y FMAG), que fueron inactivas ante todos los microorganismos en estudio, sugieren que este grupo de metabolitos no son los principales responsables de la actividad antimicrobiana del EHA de *Jatropha gossypifolia* L. No obstante se debe considerar, que la mezcla de solventes empleada en la preparación del EHA favorece la extracción de quinonas con polaridad similar, y por tanto, es posible que quinonas que no se hayan extraído, o que se eliminaran con el solvente de desengrase, posean actividad frente a estos microorganismos.

Estos resultados confirman el potencial antibacteriano de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L que crece en la región central de nuestro país, especialmente frente a bacterias Gram negativas.

3.6 Actividad *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*

El estudio de actividad *in vitro* mostró un desempeño adecuado del sistema a juzgar por los valores mostrados por los distintos controles. A saber, valores mínimos de fluorescencia en los pozos que no contenían parásitos (solo medio de cultivo) y los tratados con furvina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (control positivo) y máximos valores en los cultivos que no recibieron tratamiento alguno (control negativo) o fueron tratados con dimetilsulfóxido a una concentración final del 1% (control de vehículo). (Fig 3.15 y 3.16).

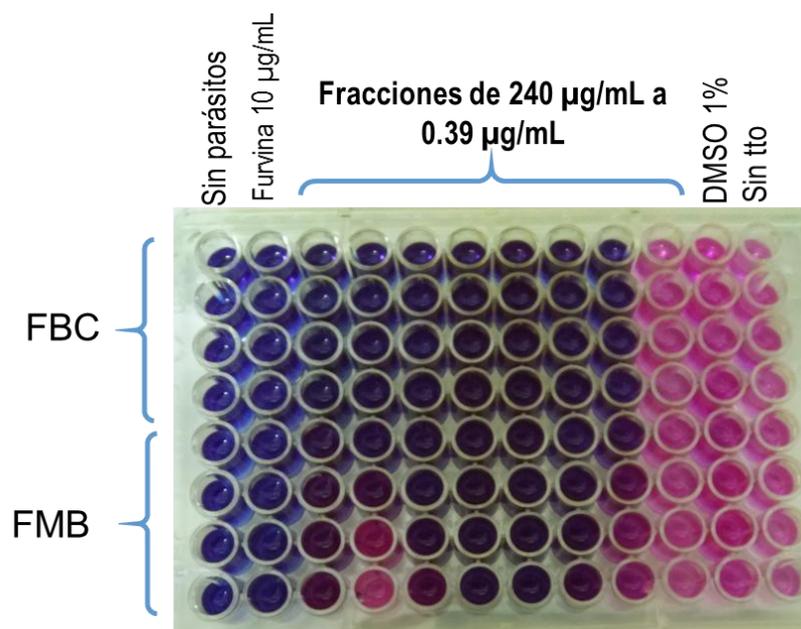


Fig 3.15 Ensayos para la actividad antileishmanial de las fracciones FBC y FMB.

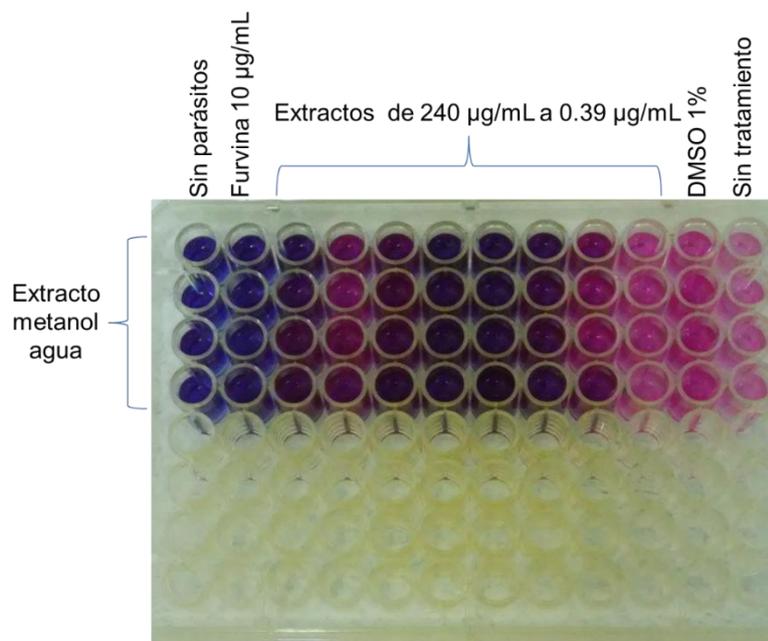


Fig 3.16 Ensayos para la actividad antileishmanial de la fracción FMAG.

Las tres fracciones evaluadas mostraron actividad parasiticida hasta concentraciones en el rango de 0.98 - 2.5 $\mu\text{g/mL}$. En cambio el efecto inhibitor del crecimiento se extendió hasta concentraciones inferiores, siendo la CI_{50} de las fracciones extraídas con benceno-cloroformo, metanol y metanol-agua de 0.45, 0.70 y 0.45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 3.7). Estos valores de CI_{50} son considerablemente bajos al compararlos con los resultados previamente obtenidos con otros extractos vegetales (190).

Tabla 3.7 Efecto inhibitor del crecimiento (CI_{50}) de *Leishmania amazonensis*.

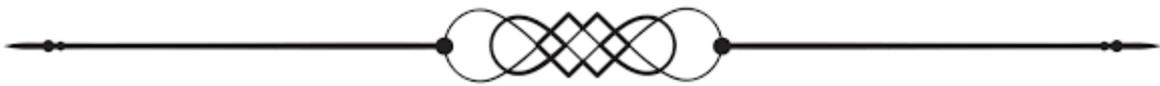
Fracción	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
FBC	0.45
FMB	0.70
FMAG	0.45

Los resultados evidenciaron la presencia de compuestos con actividad anti-leishmanial en las tres fracciones del extracto evaluadas. Sin embargo, debe probarse el efecto de estos compuestos frente al estadio biológico clínicamente relevante del parásito (amastigotes intracelulares), así como frente a otras especies de *Leishmania* spp. Igualmente importante, es evaluar su citotoxicidad para valorar

adecuadamente la selectividad de la actividad anti-leishmanial de estos compuestos.

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en el presente año en Brasil para el extracto etanólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L, con valores de IC₅₀ de 4,76 µg/mL, y principalmente con los obtenidos para el glicósido jatropham, aislado del latex de la planta (CI₅₀ de 0,47 µg/mL) (190).

Conclusiones



Conclusiones

- El sólido pulverulento obtenido de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L, procedente de Casilda, Trinidad, posee índices numéricos que avalan la calidad del material vegetal y entre sus metabolitos se sugiere la presencia de saponinas, alcaloides, quinonas, triterpenos y/o esteroides, ácidos grasos, aminoácidos y azúcares reductores.
- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L solo mostró actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo las fracciones del mismo fueron inactivas frente a todos los microorganismos, lo cual puede estar relacionado con el sinergismo de los metabolitos presentes en el extracto.
- Las tres fracciones evaluadas mostraron actividad parasitocida frente a *L. amazonensis* hasta concentraciones muy bajas, mostrando efecto inhibitor del crecimiento que se extendió hasta concentraciones considerablemente inferiores, a las obtenidas previamente para otros extractos vegetales; resultados que pudieran estar relacionados con la presencia de terpenos, alcaloides y flavonoides

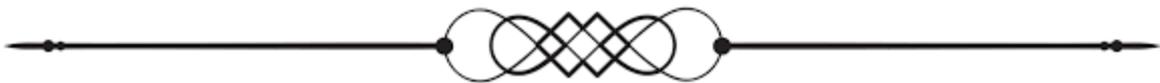
Recomendaciones



Recomendaciones

- Aislar y caracterizar metabolitos que avalen las acciones antimicrobiana y antileishmaniásica de las hojas de la especie *Jatropha gossypifolia* L.
- Evaluar la actividad antileishmaniásica frente al estadio biológico clínicamente relevante del parásito (amastigotes intracelulares), así como frente a otras especies de *Leishmania spp*; así como su citotoxicidad.

Bibliografía



Bibliografía

1. Félix-Silva J, Giordani RB, Silva-Jr AAd, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MdF. *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014.
2. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*: Editora Unesp; 2002.
3. Khyade M, Vaikos N. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*. 2011;2(1):177-80.
4. Aworinde D, Nwoye D, Jayeola A, Olagoke A, Ogundele A. Taxonomic significance of foliar epidermis in some members of euphorbiaceae family in Nigeria. *Research journal of Botany*. 2009;4(1):17-28.
5. Mariz S, Borges A, Melo-Diniz M, Medeiros I. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Rev Bras Plantas Med*. 2010;12(3):346-57.
6. Aboaba SA, Adebayo MA, Ogunwande IA, Olayiwola TO. Volatile constituents of *Jatropha gossypifolia* L. grown in Nigeria. *American Journal of Essential oils and Natural products*. 2015;2(4):08-11.
7. de Botânica S. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.(Euphorbiaceae). *Acta Farm Bonaerense*. 2005;24(1):5-13.
8. Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM, Sahidin I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. *Phytochemistry*. 2013;85:7-29.
9. De Albuquerque UP, De Medeiros PM, De Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMdFL, de Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;114(3):325-54.
10. Ajose FO. Some Nigerian plants of dermatologic importance. *International Journal of Dermatology*. 2007;46(s1):48-55.

11. Abreu IC, Marinho AS, Paes AM, Freire SM, Olea RS, Borges MO, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. *Fitoterapia*. 2003;74(7-8):650-7.
12. Ravindranath N, Venkataiah B, Ramesh C, Jayaprakash P, Das B. Jatrophene, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2003;51(7):870-1.
13. Bhagat R, Ambavade S, Misar A, Kulkarni D. Anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. leaves in albino mice and Wistar rat. 2011.
14. Nagaharika Y, Rasheed S. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*. 2013;2(2):156-8.
15. Apu AS, Ireen K, Bhuyan SH, Matin M, Hossain MF, Rizwan F. Anti-diarrheal Potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.). *J Med Sci*. 2012;12:274-9.
16. Oduola T, Adeosun GO, Oduola TA, Avwioro GO, Oyeniyi MA. Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent. 2005.
17. Feitosa C, Freitas R, Luz N, Bezerra M, Trevisan MTS. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology*. 2011;71(3):783-9.
18. Singh D, Singh A. The toxicity of four native Indian plants: Effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. *Chemosphere*. 2005;60(1):135-40.
19. Kharat A, Dolui A, Das S. Free radical scavenging potential of *Jatropha gossypifolia*. *Asian Journal of Chemistry*. 2011;23(2):799.
20. Shahwar D, Ahmad N, Ullah S, Raza MA. Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(7):1086-96.
21. Jain S, Choudhary GP, Jain DK. Pharmacological evaluation of anti-fertility activity of ethanolic extract of *Jatropha gossypifolia* leaf in female albino mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(3):S1671-S4.
22. Jain S, Choudhary GP, Jain DK. Pharmacological evaluation and antifertility activity of *Jatropha gossypifolia* in rats. *BioMed research international*. 2013;2013.
23. de Andrade Paes AM, Camara AL, de Farias Freire SM, da Rocha Borges MO. Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. *International Journal of Phytomedicine*. 2013;4(3):310-3.

24. Kupchan SM, Sigel CW, Matz M, Saenz Renauld JA, Haltiwanger RC, Bryan RF. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(14):4476-7.
25. Taylor MD, Smith III AB, Furst GT, Gunasekara SP, Bevelle CA, Cordell GA, et al. Plant anticancer agents. 28. New antileukemic jatrophone derivatives from *Jatropha gossypifolia*: structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 1983;105(10):3177-83.
26. Falodun A, Kragl U, Touem S, Villinger A, Fahrenwaldt T, Langer P. A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(2):151-2.
27. Rasheed S, Kunapareddy S, Karthikeyan R. Local Anesthetic Activity of *Jatropha gossypifolia* L. on Frogs. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2015;5(2):395-7.
28. Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M, Jamaluddin A. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2012;4(1):20.
29. Deo SS, Chaudhari TM, Inam F. Evaluation of the immunomodulatory effects of 1-phenylnaphthalene and pericarbonyl lactone lignan compounds. *Der Pharma Chemica*. 2012;4(2):771-6.
30. Panda BB, Gaur K, Nema R, Sharma C, Jain AK, Jain C. Hepatoprotective activity of *Jatropha gossypifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2 (1): 50. 2009;54.
31. Devappa RK, Makkar HP, Becker K. *Jatropha* toxicity—a review. *Journal of toxicology and environmental health, Part B*. 2010;13(6):476-507.
32. Purushothaman KK, Chandrasekharan S, Cameron AF, Connolly JD, Labbé C, Maltz A, et al. Jatropholones A and B, new diterpenoids from the roots of *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae)-crystal structure analysis of jatropholone B. *Tetrahedron Letters*. 1979;20(11):979-80.
33. Medubi L, Ukwenya V, Aderinto O, Makanjuola V, Ojo O, Bamidele O, et al. Effects of administration of ethanolic root extract of *Jatropha gossypifolia* and prednisolone on the kidneys of Wistar rats. *Electronic Journal of Biomedicine*. 2010;2:41-8.

34. Mariz SR, Araújo MS, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, Diniz MF, et al. Histopathological evaluation in rats after acute treatment with the ethanol extract from aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(2):213-6.
35. Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo WC, Dantas JG, Ramalho JA, Palomaro TV, et al. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22(3):663-8.
36. OMS. Ensayos microbiológicos. Leishmaniasis 2018. Available from: FUENTE: ensayosmicrobiologicos/LeishmaniasisOMS.htm.
37. De Gopugui M, Ruiz R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int J Dermatol*. 2003;37:801-14.
38. Bonfante-Garrido R, Barroeta S. Leishmanias y leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Barquisimeto: Tipografía y Litografía Horizonte CA. 2002:39-73.
39. Pearson R, Queiroz Souza A. Especies de *Leishmania*: Leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. Mandell, Douglas, Bennett Enfermedades infecciosas, principios y práctica 4a ed B Aires: Panamericana Ed. 1997:2724-35.
40. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(12):891-5.
41. Gündüz K, Afsar S, Ayhan S, Kandiloglu AR, Türel A, Ebru Filiz E, et al. Recidivans cutaneous leishmaniasis unresponsive to liposomal amphotericin B (AmBisome®). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2000;14(1):11-3.
42. Cruzado L, Silva C, Mantilla E, Escajadillo H. Aislamiento de *Leishmania* sp. en lesión perianal en una paciente procedente del distrito de Sanagorán, Provincia Sánchez Carrión. *PHARMACIENCIA*. 2013;1(1):24-7.
43. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 1984;223(4643):1417-9.
44. Chan-Bacab MJ, Balanza E, Deharo E, Muñoz V, García RD, Peña-Rodríguez LM. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. *Journal of ethnopharmacology*. 2003;86(2-3):243-7.

45. Khan KM, Rasheed M, Ullah Z, Hayat S, Kaukab F, Choudhary MI, et al. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2003;11(7):1381-7.
46. SAVOIA D, AVANZINI C, CONTI S, MAGLIANI V, FRAZZI R, POLONELLI U. In vitro leishmanicidal activity of a monoclonal antibody mimicking a yeast killer toxin. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2002;49(4):319-23.
47. Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. *Parasitology international*. 2000;48(3):265-9.
48. Ráz B, Iten M, Grether-Bühler Y, Kaminsky R, Brun R. The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*Tb rhodesiense* and *Tb gambiense*) in vitro. *Acta tropica*. 1997;68(2):139-47.
49. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(4):1157-9.
50. Carrió J, Riera C, Gállego M, Portús M. In vitro activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. *Acta tropica*. 2001;79(2):179-83.
51. Sereno D, Lemesre J-L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(5):972-6.
52. Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen T. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitology research*. 1994;80(3):235-9.
53. Kamau SW, Nunez R, Grimm F. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC pharmacology*. 2001;1(1):1.
54. Kamau SW, Grimm F, Hehl AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(12):3654-6.
55. Delgado G, Puentes F, Moreno A, Patarroyo ME. Flow cytometry, a useful tool for detecting the lethal effect of pentamidine on *Leishmania viannia* complex promastigote forms. *Pharmacological research*. 2001;44(4):281-6.

56. Collins L, Torrero M, Franzblau S. Green Fluorescent Protein Reporter Microplate Assay for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(2):344-7.
57. Jacobs WR, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*. 1993;260(5109):819-22.
58. Buckner FS, Verlinde C, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(11):2592-7.
59. McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(9):1849-53.
60. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-5.
61. Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1996;77(1):57-64.
62. Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*. 1995;11(8):320-3.
63. Chan M, Bulinski CJ, Chang K-P, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitology research*. 2003;89(4):266-71.
64. Mauël J, Ransijn A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Experimental parasitology*. 1997;87(2):98-111.
65. Avila JL, Avila A, Polegre MA. Inhibitory effects of sinefungin and its cyclic analog on the multiplication of *Trypanosoma cruzi* isolates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1993;48(1):112-9.
66. Brun R, Kunz C. In vitro drug sensitivity test for *Trypanosoma brucei* subgroup bloodstream trypomastigotes. *Acta tropica*. 1989;46(5-6):361-8.
67. Armson A, Kamau S, Grimm F, Reynoldson J, Best W, MacDonald L, et al. A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*. *Acta tropica*. 1999;73(3):303-11.

68. Gaspar R, Opperdoes FR, Pr eat V, Roland M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1992;86(1):41-9.
69. Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(20):11015-22.
70. Bates P. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*. 1994;108(1):1-9.
71. Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(4):818-22.
72. Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmuller P, Ouaisi A, et al. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta tropica*. 2001;80(3):195-205.
73. Sereno D, Roy G, Lemesre JL, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1168-73.
74. Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;110(2):195-206.
75. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al. Correction: A higher level classification of all living organisms. *PloS one*. 2015;10(6):e0130114.
76. Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Shu-mei WL, Kostandarithes HM, et al. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(7):4230-41.
77. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(12):6578-83.
78. Sears CL. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe*. 2005;11(5):247-51.

79. Gill EE, Brinkman FS. The proportional lack of archaeal pathogens: Do viruses/phages hold the key? *Bioessays*. 2011;33(4):248-54.
80. Fish DN. Optimal antimicrobial therapy for sepsis. *American journal of health-system pharmacy*. 2002;59(suppl 1):S13-S9.
81. Yonath A, Bashan A. Ribosomal crystallography: initiation, peptide bond formation, and amino acid polymerization are hampered by antibiotics. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:233-51.
82. Ogston A. Micrococcus poisoning. *Journal of anatomy and physiology*. 1882;16(Pt 4):526.
83. Alexander O. Classics in infectious diseases." On abscesses. *Rev Infect Dis*. 1984;6:122-8.
84. Noble W, Valkenburg H, Wolters CH. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *Epidemiology & Infection*. 1967;65(4):567-73.
85. Casewell M. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 1986;18:1-12.
86. Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 1994;19(6):1123-8.
87. Wenzel R, Perl T. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. *Journal of Hospital Infection*. 1995;31(1):13-24.
88. Tuazon CU, Perez A, Kishaba T, Sheagren JN. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients: an increased carrier rate. *Jama*. 1975;231(12):1272-.
89. Tuazon CU, Sheagren JN. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *Journal of Infectious Diseases*. 1974;129(6):725-7.
90. Yu VL, Goetz A, Wagener M, Smith PB, Rihs JD, Hanchett J, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. *New England Journal of Medicine*. 1986;315(2):91-6.
91. Weinstein HJ. The relation between the nasal-staphylococcal-carrier state and the incidence of postoperative complications. *New England Journal of Medicine*. 1959;260(26):1303-8.

92. Kluytmans J, Mouton J, Ijzerman E, Vandembroucke-Grauls C, Maat A, Wagenvoort J, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(1):216-9.
93. Weinke T, Schiller R, Fehrenbach F, Pohle H. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1992;11(11):985-9.
94. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including toxin shock syndrome). *Principles and practice of infectious diseases*. 1990:1489-510.
95. Verdrengh M, Tarkowski A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*. 1997;65(7):2517-21.
96. Yao L, Berman JW, Factor SM, Lowy FD. Correlation of histopathologic and bacteriologic changes with cytokine expression in an experimental murine model of bacteremic *Staphylococcus aureus* infection. *Infection and immunity*. 1997;65(9):3889-95.
97. Musher DM, Lamm N, Darouiche RO, Young EJ, Hamill RJ, Landon GC. The current spectrum of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital. *Medicine*. 1994;73(4):186-208.
98. Mylotte JM, McDermott C, Spooner JA. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Reviews of infectious diseases*. 1987;9(5):891-907.
99. Fernandez-Guerrero ML, Verdejo C, Azofra J, de Górgolas M. Hospital-acquired infectious endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. *Clinical infectious diseases*. 1995;20(1):16-23.
100. Chambers HF, Korzeniowski OM, Sande MA. *Staphylococcus aureus* endocarditis: clinical manifestations in addicts and nonaddicts. *Medicine*. 1983;62(3):170-7.
101. Libman H, Arbeit RD. Complications associated with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Archives of internal medicine*. 1984;144(3):541-5.
102. Sepsis became T. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med*. 1994;154:26-34.

103. Chesney PJ, Davis JP, Purdy WK, Wand PJ, Chesney RW. Clinical manifestations of toxic shock syndrome. *Jama*. 1981;246(7):741-8.
104. Wergeland HI, Haaheim L, Natås O, Wesenberg F, Oeding P. Antibodies to staphylococcal peptidoglycan and its peptide epitopes, teichoic acid, and lipoteichoic acid in sera from blood donors and patients with staphylococcal infections. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(6):1286-91.
105. Michalopoulos A, Kasiakou SK, Mastora Z, Rellos K, Kapaskelis AM, Falagas ME. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Critical Care*. 2005;9(1):R53.
106. Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Current therapies for *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical care clinics*. 2008;24(2):261-78.
107. Rossolini G, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11(s4):17-32.
108. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical care medicine*. 2009;37(5):1777.
109. Falagas ME, Bliziotis IA, Tam VH. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with Gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. *International journal of antimicrobial agents*. 2007;29(1):9-25.
110. Clinic M. Mayo Clinic 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/e-coli/diagnosis-treatment/drc-20372064>.
111. Mueller GM. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods: Elsevier; 2011.
112. Vircell. Enfermedad 2018. Available from: <https://www.vircell.com/enfermedad/27-candida-albicans/>.
113. Goodall R, Levi A. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*. 1946;158(4019):675.
114. Wayne P. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. CLSI m44-a. 2004.

115. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.
116. Caron F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician. *JOURNAL DES ANTI-INFECTIEUX*. 2012;14(4):168-74.
117. Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens J, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(8):3627-30.
118. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American journal of medicine*. 1980;68(3):344-55.
119. Fguira LF-B, Fotso S, Ameur-Mehdi RB, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*. 2005;156(3):341-7.
120. Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RR, Hilou A, Souza A, et al. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2012;11(1):18.
121. De Billerbeck V-G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 2007;5(5):249-53.
122. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*. 2010;4(2):104-11.
123. Hausdorfer J, Sompek E, Allerberger F, Dierich M, Rüsç-Gerdes S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1998;2(9):751-5.
124. Magaldi S, Mata-Essayag S, De Capriles CH, Perez C, Colella M, Olaizola C, et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004;8(1):39-45.
125. Valgas C, Souza SMd, Smânia EF, Smânia Jr A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38(2):369-80.

126. Jiménez-Esquilín A, Roane T. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2005;32(8):378-81.
127. Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, Mellouli L, Karray-Rebai I, Fguira LF-B, et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(2):579-93.
128. Lertcanawanichakul M, Sawangnop S. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2011;5(2):161-71.
129. Ali-Shtayeh M, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *mycoses*. 1999;42(11-12):665-72.
130. Kumar SN, Nambisan B, Sundaresan A, Mohandas C, Anto RJ. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Annals of microbiology*. 2014;64(1):209-18.
131. Fischer R, Lautner H. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*. 1961;294:1.
132. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676-83.
133. Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015;5(2):75-84.
134. Choma IM, Grzelak EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2684-91.
135. Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. Development of a novel direct bioautography–thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. *Journal of AOAC International*. 2011;94(5):1567-72.
136. Brantner A. Influence of various parameters on the evaluation of antibacterial compounds by the bioautographic TLC assay. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1997;7(4):152-4.
137. Silva MT, Simas SM, Batista TG, Cardarelli P, Tomassini TC. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and

physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):779-82.

138. Runyoro DK, Matee MI, Ngassapa OD, Joseph CC, Mbwambo ZH. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC complementary and alternative medicine*. 2006;6(1):11.

139. Shahat AA, El-Barouty G, Hassan RA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2008;43(6):519-25.

140. Suleiman MM, McGaw L, Naidoo V, Eloff J. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2010;7(1).

141. Homans A, Fuchs A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of chromatography*. 1970;51:327-9.

142. Hamburger MO, Cordell GA. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 1987;50(1):19-22.

143. Balouiri M, Bouhdid S, Harki E, Sadiki M, Ouedrhiri W, Ibensouda SK. Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. Rhizosphere against *Candida albicans*. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8:213-7.

144. Mehrabani M, Kazemi A, Mousavi SAA, Rezaifar M, Alikhah H, Nosky A. Evaluation of antifungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013;6(8).

145. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6(2):71-9.

146. Menon T, Umamaheswari K, Kumarasamy N, Solomon S, Thyagarajan S. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. *Acta tropica*. 2001;80(2):151-4.

147. Mock M, Monod M, Baudraz-Rosselet F, Panizzon RG. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested in vitro and in vivo. *Dermatology*. 1998;197(4):361-7.

148. Speeleveld E, Gordts B, Van Landuyt H, Vroey CD, Raes-Wuytack C. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses*. 1996;39(1-2):37-40.
149. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(3):533-8.
150. Pfaller M, Sheehan D, Rex J. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(2):268-80.
151. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(8):1914-8.
152. Bozorg A, Gates ID, Sen A. Using bacterial bioluminescence to evaluate the impact of biofilm on porous media hydraulic properties. *Journal of microbiological methods*. 2015;109:84-92.
153. Paloque L, Vidal N, Casanova M, Dumètre A, Verhaeghe P, Parzy D, et al. A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*. *Journal of microbiological methods*. 2013;95(3):320-3.
154. Finger S, Wiegand C, Buschmann H-J, Hipler U-C. Antibacterial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International journal of pharmaceutics*. 2013;452(1-2):188-93.
155. Andreu N, Fletcher T, Krishnan N, Wiles S, Robertson BD. Rapid measurement of antituberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;67(2):404-14.
156. Beckers B, Lang H, Schimke D, Lammers A. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *European journal of clinical microbiology*. 1985;4(6):556-61.
157. Finger S, Wiegand C, Buschmann H-J, Hipler U-C. Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International journal of pharmaceutics*. 2012;436(1-2):851-6.

158. Galiger C, Brock M, Jouvion G, Savers A, Parlato M, Ibrahim-Granet O. Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus*: value of real-time bioluminescence imaging. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(7):3046-59.
159. Vojtek L, Dobes P, Büyükgüzel E, Atosuo J, HyrsI P. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology*. 2014;111(3):335.
160. Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(10):2752-8.
161. Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(9):2320-4.
162. Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I, Chaves-Lopez C, Serio A, Marsilio F, et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2008;19(12):1174-82.
163. Juneja VK, Yousef AE. *Microbial stress adaptation and food safety*: CRC Press; 2002.
164. Tang Y-W, Stratton CW, Tang Y-W. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*: Springer; 2013.
165. Coba Sánchez ME. *Formulación de una crema antiacné a partir de las hojas de Jatropha gossypifolia L*: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química Farmacia. Departamento de Farmacia; 2017.
166. Ramal N. NRSP 309" *Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda Métodos de Ensayos*. 1992.
167. Martínez MM, Cuéllar AC. *Farmacognosia y productos naturales*: Editorial Félix Varela; 2012.
168. Gage TBaSHW. Quantitative determination of certain flavonol-3-glycosides. *Analytical Chemistry*. 1950;22:708-11.
169. HARBORNE JB, Springer, Dordrecht. *Phenolic compounds*. En *Phytochemical methods* 1984.
170. *Encyclopedia of Separation Science* In: Ian D. Wilson CFP, Michael Cooke, editor. Academic Press ed2000.

171. Álvarez L, Elena M, Isaza M, Echeverry L, Mauricio H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austro eupatorium inulaefolium* HBK (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* HBK (Clavo de laguna). *Biosalud*. 2005(4):46-55.
172. Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. 2009.
173. Okoh SO, Iweriebor BC, Okoh OO, Nwodo UU, Okoh AI. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L. *BioMed research international*. 2016;2016.
174. Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. universidad de Antioquia. Colombia; 2009.
175. Orozco M. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de molle (*Schinus molle*), cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) Linaza (*Linum usitatissimum* L.) en ratones (*Mus musculus*): Tesis Lic.. Riobamba, Ecuador, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2013.
176. Devappa RK, Makkar HP, Becker K. *Jatropha* diterpenes: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011;88(3):301-22.
177. Kohda H, Kasai R, Yamasaki K, Murakami K, Tanaka O. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*. 1976;15(6):981-3.
178. Rivero González BD. Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L: Universidad Central" Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
179. Blanco DBP. Formulación de un gel cosmecéutico a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.: Universidad Central Marta Abreu de las Villas; 2016.
180. Fernandes EdS, Rodrigues FA, Tófoli D, Imamura PM, Carvalho JEd, Ruiz AL, et al. Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophone terpenes from *Jatropha ribifolia* roots. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013;23(3):441-6.
181. Duke JA. *Handbook of medicinal herbs*: CRC press; 2002.
182. Chowdhury A, Mannan M, Khan M, Rahman F. Antibacterial activity of *Pergularia daemia*. *Bangladesh J Life Sci*. 1997;8:71.
183. Mickevičienė K, Baranauskaitė R, Kantminienė K, Stasevych M, Komarovska-Porokhnyavets O, Novikov V. Synthesis and antimicrobial activity of N-substituted-β-

amino acid derivatives containing 2-hydroxyphenyl, benzo [b] phenoxazine and quinoxaline moieties. *Molecules*. 2015;20(2):3170-89.

184. Ruchi S, Renu S. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. *Archives of applied science Research*. 2010;2(5):285-91.

185. Sharma V, Kumawat TK, Seth R, Sharma A. Bioefficacy of Crude Extracts from *Jatropha Gossypifolia* against Human Pathogens. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 2013;4(4):401-6.

186. Fatokun OT, Liberty O, Esievo KB, Okhale SE, Kunle OF. Phytochemistry, Ethnomedicine and Pharmacology of *Jatropha gossypifolia* L: A Review.

187. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):564-82.

188. Ramirez LS, Castaño DM. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 2009;2(42).

189. Chansukh MK. Antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants bearing quinonoids: Chulalongkorn University; 2011.

190. Eskandari EG, Doudi, M., & Abedi, S. The study of antileishmanial effect of *Medicago lupulina* leaves alcoholic extract on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) by MTT assay. 2016.

Anexos



Anexos

Anexo 1.1 *Jatropha gossypifolia* L



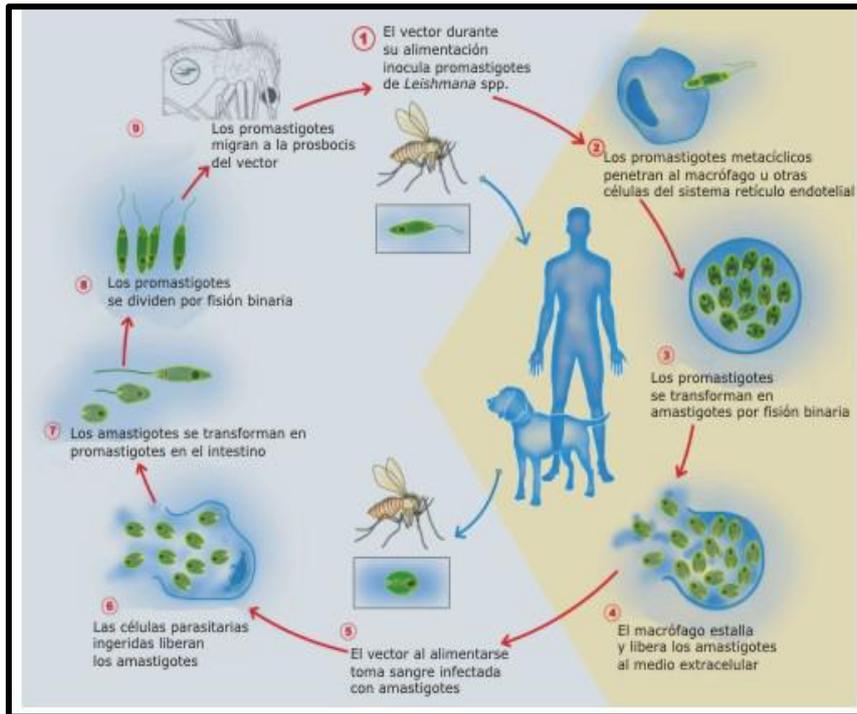
Anexo 1.2 Flores de *Jatropha Gossypifolia* L



Anexo 1.3 Frutas de *Jatropha gossypifolia* L



Anexo 1.4 Ciclo vital *Leishmania*



Anexo 2.1 Ubicación geográfica del sitio de recolección del material vegetal en estudio.

