

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Potencial antileishmaniásico de la especie *Jatropha gossypifolia* L.

Autor: Yoan Verao Esquibel

Tutor: Dra C. Mirtha Mayra González Bedia

Santa Clara , Junio 2019
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Pharmacy Academic Department

DIPLOMA THESIS

Title: Antileishmanic potential of *Jatropha gossypifolia* L.

Author: Yoan Verao Esquibel

Thesis Director: Dra C. Mirtha Mayra González Bedia

Santa Clara , June 2019
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.



“Estas son las cosas que no se pueden detener: el paso del tiempo, los sueños humanos y una voluntad heredada. Así que mientras el hombre busque la respuesta a la libertad con todas sus fuerzas, esas son aquellas cosas que nunca se podrán parar”

Eiichiro Oda

“Conocer una realidad es, en el sentido usual de la palabra, tomar conceptos ya hechos, dosificarlos y combinarlos unos con otros, hasta que obtengamos un equivalente práctico de lo real.”

Henri Bergson

Dedicatoria.



A Dios

A mi madre

Agradecimientos



A mi madre, por su constante compañía, sin ella me habría sido muy difícil llegar a este punto en mi vida y ser el que soy.

Al resto de mi familia, por su apoyo incondicional en la mayoría de las veces.

A todos mis compañeros de estudio por estar ahí molestando y siendo molestados durante cinco cortos años.

A todos los profesores, y a mi tutora en especial, por permitirme llegar tan lejos.

A Niurka por su esmerada atención, sin ella esta tesis sería imposible.

A todos los que directa e indirectamente me han tocado con sus palabras, para bien o mal.

A todos, mis más grandes agradecimientos.

Resumen



Resumen

Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar el potencial antileishmaniásico de los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., especie a la cual se le determinó tal actividad, tanto por sus usos populares como por estudios recientes. Para ello se efectuó la evaluación fitoquímica de las hojas de la planta, determinándose la presencia de saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, triterpenos, aminoácidos libres, cumarinas, azúcares reductores y quinonas. La actividad antileishmaniásica se determinó en promastigotes de *Leishmania amazonensis*, mediante la determinación de la fluorescencia de la resazurina, se obtuvo como resultado una CI_{50} de 0.28 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto acuoso y 0.59 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto hidroalcohólico. La citotoxicidad fue determinada en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, por igual método, el extracto hidroalcohólico resultó más citotóxico a CC_{50} de 0.57 $\mu\text{g/mL}$, el acuoso obtuvo 0.91 $\mu\text{g/mL}$. Los índices de selectividad de ambos extractos fueron inferiores a diez, pero dada la baja toxicidad dérmica que han presentado en otros estudios, se determinó que existe potencialidad en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: *Jatropha gossypifolia* L., Leishmania, Leishmaniasis, Citotoxicidad.

Abstract



Abstract

An experimental study was carried out in order to evaluate the antileishmaniasis potential of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the leaves of *Jatropha gossypifolia* L., a species which was determined to have such activity both by its popular uses and by recent studies. For this purpose, the phytochemical evaluation of the leaves of the plant was carried out, determining the presence of saponins, alkaloids, phenols, flavonoids, triterpenes, free amino acids, coumarins, reducing sugars and quinones. The antileishmaniasis activity was determined in promastigotes of *Leishmania amazonensis* by means of the determination of the fluorescence of the resazurina, was obtained as result a CI_{50} of 0.28 $\mu\text{g/mL}$ for the aqueous extract and 0.59 $\mu\text{g/mL}$ for the hydroalcoholic extract. Cytotoxicity was determined in BALB/c mouse peritoneal macrophages by the same method, hydroalcoholic extract was more cytotoxic at CC_{50} of 0.57 $\mu\text{g/mL}$, and aqueous had 0.91 $\mu\text{g/mL}$. The selectivity indexes of both extracts were less than ten, but given the low dermal toxicity presented in other studies it was determined that there is potential in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Jatropha gossypifolia* L., Leishmania, Leishmaniasis, Cytotoxicity

Índices



Índice de contenido

INTRODUCCIÓN.....	2
Problema Científico	3
Hipótesis.....	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos.....	3
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1. Leishmaniasis.....	5
1.1.1. <i>Leishmania spp.</i>	5
1.1.2. Principales regiones afectadas por la enfermedad.....	7
1.1.3. Factores de riesgo.	7
1.1.4. Tratamiento farmacológico actual.....	7
1.1.5. Nuevos desarrollos farmacológicos.....	8
1.1.6. Compuestos naturales con actividad antileishmaniásica.....	8
1.1.7. Métodos para evaluar la actividad antileishmaniásica.	9
1.2. Aspectos monográficos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	15
1.2.1. Identificación taxonómica.....	15
1.2.2. Descripción Botánica.....	15
1.2.3. Distribución.	15
1.2.4. Usos tradicionales.	16
1.2.5. Aspectos fitoquímicos y farmacológicos	17
1.2.6. Aspectos toxicológicos.....	19
1.3. Métodos para evaluar la citotoxicidad.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1. Tipo de estudio.....	24
2.2. Procedimiento y Diseño Experimental.....	24
2.2.1. Equipos, materiales y reactivos empleados.....	24
2.2.2. Obtención del material vegetal.....	26
2.2.3. Secado y molinado del material vegetal.	26
2.2.4. Pruebas de control de la calidad de la droga cruda.	26
2.2.5. Obtención y caracterización de los extractos	28
2.2.6. Evaluación fitoquímica de los extractos.....	30
2.2.7. Evaluación de la actividad antileishmaniásica.	34

2.2.8. Evaluación de la citotoxicidad.....	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1. Obtención del material vegetal.....	39
3.2. Secado y molinado del material vegetal.....	39
3.3. Determinación de índices numéricos de la droga seca.....	40
3.4. Obtención y caracterización de los extractos.....	42
3.5. Tamizaje fitoquímico de los extractos.....	44
3.6. Evaluación de la actividad antileishmaniásica.....	50
3.6.1. Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> frente promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	50
3.7. Evaluación de la citotoxicidad.....	53
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

Índice de figuras.

Figura 3.1 <i>Jatropha gossypifolia</i> L. droga cruda, seca y molinada.....	41
Figura 3.2 Curva de Calibración de ácido gálico.....	48
Figura 3.3 Curva de calibración de la quercetina.....	50
Figura 3.4 Ensayo para la determinación de la actividad antileishmaniásica.....	52
Figura 3.5 Ensayo para la determinación de la citotoxicidad.....	55

Índice de tablas.

Tabla 1.1: Compuestos naturales con actividad antileishmaniásica.....	9
Tabla 1.2 Usos tradicionales de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	16
Tabla 1.3 Principales metabolitos secundarios	18
Tabla 1.4 Estudios farmacológicos más relevantes.....	19
Tabla 2.1 Ensayos para la identificación de metabolitos.....	32
Tabla 3.1 Índices numéricos de la droga seca y molinada.....	41
Tabla 3.2 Características organolépticas y fisicoquímicas de los extractos.....	43
Tabla 3.3 Resultados del tamizaje fitoquímico.....	46
Tabla 3.4 Contenido total de fenoles.....	48
Tabla 3.5 Contenido total de flavonoides.....	50
Tabla 3.6 Actividad frente a promastigotes de <i>L. amazonensis</i>.....	51
Tabla 3.7 Citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.....	54

Introducción



INTRODUCCIÓN.

La leishmaniasis es una patología crónica resultado de la acción del protozoo parásito *Leishmania spp.* que afecta principalmente a poblaciones susceptibles (pobreza, malnutrición, malas condiciones sanitarias, alteraciones del sistema inmune)^(1, 2).

La OMS estima que en todo el mundo hay alrededor de 350 millones de personas que se encuentran en riesgo de contraer leishmaniasis, con una incidencia aproximada de 2 millones de casos nuevos por año⁽³⁾.

La enfermedad presenta diversas formas y severidades lo que provoca dificultades a la hora de dar un tratamiento adecuado. Este es actualmente fuente de incertidumbre, ya que los fármacos que en la práctica usual son la primera línea contra la infección (antimoniales) han mostrado casos de resistencia, intolerancia e ineficacia en regiones de la India y Nepal^(4, 5).

Tal situación ha provocado un auge en la búsqueda de nuevos medicamentos que brinden igual eficacia con menores efectos adversos y logren evitar las situaciones de resistencia del parásito⁽¹⁾. Tarea, por demás, extremadamente cara, que aunque ha aportado resultados muchos no resultan ser totalmente viables. Una alternativa un tanto más sencilla sería el encaminar la búsqueda a metabolitos de origen natural en vez de sintetizarlos a partir de cero⁽⁶⁾.

Jatropha gossypifolia L. es una especie que presenta una gran cantidad de actividades farmacológicas avaladas, como antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, hipoglicemiante, anticancerígena, y más recientemente antileishmaniásica, lo cual se manifiesta en el creciente número de publicaciones, la elevada cantidad de metabolitos aislados y caracterizados, así como de diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*⁽⁷⁾.

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^(8, 9).

El más reciente estudio determinó la actividad parasiticida frente a leishmania de fracciones hidroalcohólicas de un extracto de esta especie⁽¹⁰⁾.

Por tanto para esta investigación se propone el siguiente

Problema Científico:

Los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. no han sido comprobados totalmente en cuanto a su potencial antileishmaniásico y su citotoxicidad por lo que su determinación resultaría importante para la realización de futuros estudios sobre las posibles aplicaciones medicinales de esta especie.

Por ello y en aras de contribuir con el desarrollo de nuevos medicamentos de origen natural se propone lo siguiente:

Hipótesis:

Los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. tienen potencialidades anti-protozoarias similares a las fracciones ya estudiadas en la Universidad Central de Las Villas.

Objetivo general:

Determinar el potencial antileishmaniásico de los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar los extractos en cuanto a índices farmacognósticos, composición fitoquímica cualitativa y presencia cuantitativa de fenoles y flavonoides.
2. Evaluar la actividad antileishmaniásica *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*.
3. Determinar la citotoxicidad *in vitro* frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

*Revisión
Bibliográfica*



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. Leishmaniasis.

Leishmaniasis es una de las enfermedades más importantes transmitida por vectores en los humanos. Es una enfermedad tropical y subtropical causada por un parásito intracelular transmitido al humano por la picadura del insecto *Lutzomyia* (desde Estados Unidos hasta el norte de Argentina) o *Phlebotomus* (Europa, norte de África, Oriente Medio, Asia y parte de Sudamérica)^(2, 3, 11). Esta parasitosis es causada por especies de *Leishmania spp.* En los humanos, diferentes especies de parásitos están asociadas a diferentes formas de la enfermedad. Es una patología que afecta principalmente a poblaciones susceptibles (pobreza, malnutrición, malas condiciones sanitarias, alteraciones del sistema inmune). La Organización Mundial de la Salud estima que en todo el mundo hay alrededor de 350 millones de personas que se encuentran en riesgo de contraer leishmaniasis, con una incidencia aproximada de 2 millones de casos nuevos por año^(2, 3). La enfermedad tiene tres diferentes formas: Leishmaniasis visceral o Kala-Azar, Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea^(2, 11).

1.1.1. *Leishmania spp.*

1.1.1.1. Generalidades.

Leishmania spp. incluye un conjunto de parásitos protozoarios pertenecientes al filo *Sarcomastigóforos*, familia *Trypanosomatidae*⁽²⁾. Aproximadamente 30 especies han sido identificadas, y al menos 20 de estos organismos son patogénicos para los mamíferos. El género *Leishmania spp.* incluye dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, que se diferencian por el lugar en el que se multiplican, dentro del tracto digestivo del insecto vector⁽¹²⁾.

La mayoría de las especies de *Leishmania* causan leishmaniasis cutánea en las personas. En el Nuevo Mundo, estos organismos incluyen los miembros del complejo *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis*, *L. shawi* y *L. peruviana*,) y el complejo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*), además de *L. lainsoni*, *L. naiffi* y *L. lindenbergi*. Las especies del Viejo Mundo que causan leishmaniasis cutánea incluyen *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, que son miembros del complejo *L. tropica*. A excepción de la especie

antroponótica *L. tropica*, todos estos organismos son zoonóticos^(2, 5, 12). Esta es la forma más común en que aparece la enfermedad. Se caracteriza por lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida y son causa de discapacidad grave⁽²⁾.

La leishmaniasis visceral humana es causada por *Leishmania donovani* (que incluye *L. archibaldi*) *L. infantum* y *L. chagasi*. *L. donovani* es antroponótica, se transmite principalmente entre personas; que actúan como reservorios, mientras que *L. infantum* es zoonótica. En ocasiones, otras especies pueden causar leishmaniasis visceral: *L. tropica* y *L. amazonensis*. Esta es la forma más severa de la enfermedad y sin tratamiento es usualmente fatal. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia⁽¹¹⁾.

La leishmaniasis mucocutánea tiene como agentes causales en el Viejo Mundo a *L. aethiopica* (raro), y en el Nuevo Mundo a *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. panamensis*. Esta forma de la enfermedad causa una destrucción extensiva de las cavidades naso-oral y faríngea con profundas lesiones desfigurativas, mutilación de la cara y gran sufrimiento de por vida^(3, 9, 11).

1.1.1.2. Ciclo vital.

La *Leishmania* existe en dos formas (i) promastigotes: estos son extracelulares, alongados, flagelados, móviles y con un tamaño de 2 μm \times 2–20 μm . Esta forma existe en los vectores y en cultivos *in vitro* (ii) amastigotes: estos son intracelulares, de forma redondeada u oval, sin flagelos ni movilidad y tamaños de 2 a 5 μm . Esta forma reside y se multiplica en los fago-lisosomas y macrófagos del sistema retículo endotelial del hospedero mamífero^(2, 3).

El ciclo comienza cuando la hembra del vector (mosca de la arena) 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, se multiplica activamente, se libera por lisis del macrófago e infecta nuevos macrófagos. El ciclo continúa cuando un nuevo mosquito pica al animal infectado y en el tubo digestivo del mosquito, el parásito se transforma en promastigote, 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^(13, 14).

1.1.2. Principales regiones afectadas por la enfermedad.

Se han informado casos de *Leishmania spp.* en todos los continentes, excepto en la Antártida. Estos organismos son endémicos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, y la enfermedad en humanos se presenta fundamentalmente en África, partes de Asia, el Medio oriente, América Latina y la región mediterránea. En Europa, la leishmaniasis parece estar propagándose hacia el norte de su foco tradicional⁽⁵⁾. Ha sido estimado que el 90 % de los casos de leishmania cutánea ocurren en 7 países: Afganistán, Algeria, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria mientras que la leishmania mucocutánea es endémica de Méjico, América Central y del Sur. Estimados anuales de los casos de Kala-Azar son de 0.5 millones y 2.5 millones, respectivamente y de ellos el 90 % ocurren en India, Nepal, Bangladesh y Sudán⁽²⁻⁴⁾.

1.1.3. Factores de riesgo.

Los principales factores de riesgo incluyen: condiciones socioeconómicas, malnutrición, movilidad de la población, cambios ambientales, y el cambio climático. Un eficiente manejo de los casos y un tratamiento basado en el diagnóstico temprano es la llave para limitar la morbilidad y prevenir la mortalidad. En adición el control de los vectores debe ser implementado siempre que sea posible. La fumigación de las casas con insecticidas fue un importante método de control en la India pero ahora ya no es muy utilizado. Tales factores de riesgo dificultan las medidas preventivas, principalmente por voluntad económica y política^(2, 15).

1.1.4. Tratamiento farmacológico actual.

En la actualidad, el único tratamiento eficaz contra la leishmaniasis con el que se logran resultados clínicos y microbiológicos satisfactorios es el que se basa en antimoniales pentavalentes en la forma de estibogluconato sódico o antimoniato de meglumina^(3, 11). Otras opciones disponibles y útiles están conformadas por pentamidina, anfotericina, azólicos, trimetoprim-sulfametoxazol, dapsona, azitromicina y miltefosina, entre otros⁽¹¹⁾. Pero en el estado de Bihar, en la India, se han reportado tasas de curación actuales del 35%, debido a intolerancia a los

antimoniales o a la falta de recursos para sostener los tratamientos, se ha sugerido el potencial desarrollo de resistencia a la miltefosina y a la anfotericina liposomal por parte de los parásitos en este lugar. Asimismo, se ha reportado falla al tratamiento con antimoniales pentavalentes en Nepal, por lo que en la actualidad el tratamiento de primera línea en este país es la anfotericina B liposomal, de manera especial contra la forma visceral^(4, 5).

1.1.5. Nuevos desarrollos farmacológicos.

Dada la resistencia a los antimoniales que se está presentando en diferentes lugares endémicos, las investigaciones están encaminados a la búsqueda de compuestos nuevos con potencialidad antileishmaniásica⁽¹¹⁾.

Está en estudio una nueva formulación de antimicóticos azólicos llamados 3-imidazoliflavanonas que ha mostrado actividad *in vitro*⁽¹⁶⁾.

Otro estudio experimental con una serie de compuestos llamados pirazolo(dihidro)piridinas demostró actividad superior a la de la miltefosina para el tratamiento de la leishmaniasis visceral causada por *Leishmania donovani*⁽¹⁷⁾.

En otro estudio, se probaron derivados de la 1,4-di-N-óxido quinoxalina donde se observó que los derivados ciclopentilo resultaron más efectivos contra *Plasmodium* y *L. amazonensis*, mientras que los derivados 3-ciclopropil fueron más eficaces contra *L. infantum*⁽¹⁸⁾.

También se ha identificado una sustancia conocida como naloxonazina que ha mostrado actividad contra parásitos intracelulares de *L. donovani* por un nuevo mecanismo que llevó a sus investigadores a la conclusión de que es posible encaminar una nueva línea farmacológica a partir de ella⁽¹⁹⁾.

1.1.6. Compuestos naturales con actividad antileishmaniásica.

El desarrollo de fármacos para tratar enfermedades parasitarias como la leishmaniasis es escaso dado al hecho que las trasnacionales farmacéuticas no reciben grandes ganancias en su desarrollo porque esas enfermedades no están muy presentes en países del primer mundo⁽²⁰⁾.

Una alternativa a la síntesis de fármacos es la búsqueda de metabolitos activos a partir de fuentes naturales como las plantas medicinales, que desde tiempos inmemoriales se están utilizando con tales fines^(6, 21).

Existe una gran cantidad de compuestos naturales a los que se les ha reportado algún tipo de actividad antileishmaniásica⁽¹⁴⁾ tal como aparecen en la **Tabla 1.1** Compuestos naturales con actividad antileishmaniásica, que se expone a continuación:

Tabla 1.1: Compuestos naturales con actividad antileishmaniásica.

Especie	Metabolito	Especie de Leishmania.	Tipo de Ensayo.	Concentración/ Dosis	Ref.
<i>Croton pullei</i> var. <i>glabrior</i>	julocrotine, alcaloide aislado de <i>C. pullei</i>	Amastigotes y promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	<i>In vitro</i>	IC ₅₀ : 19.8 µM	(22)
<i>Lippia sidoides</i> Cham. (<i>Alecrim pimenta</i>)	Aceite esencial.	Amastigotes y promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	<i>In vitro</i>	IC ₅₀ : 44.38 µg/ml	(23)
<i>Aloe vera</i>	Extracto etanólico	Promastigotes de <i>L. tropica</i>	<i>In vitro</i>	IC ₅₀ : 25-100 µg/ml	(24)
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Mammea A/BB, coumarina obtenida de <i>C. brasiliense</i>	Promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	En ratón con leishmaniasis cutánea	18 mg/kg/d IM o 0.2% tópico vs. 27 mg/kg/d de Glucantime por 30 días	(25)
<i>Moringa stenopetala</i>	1,3-dilinoleoyl-2-olein y 1,3-di-oleoyl-2 linolein triglycerido	Promastigotes de <i>L. aethiopica</i>	<i>In vitro</i>	IC ₅₀ : 0.079 y 242.5 µg/ml	(26)
<i>Bixa orellana</i>	Aceite esencial ishwarane y geranylgeraniol y 71 otros compuestos	Amastigotes y promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en ratones BALB/c	30 mg/kg, IP, 14 días; anfotericina B 1 mg/kg; IC ₅₀ : 8.5 vs. 0.03 µg/ml de anfotericina B	(27)

1.1.7. Métodos para evaluar la actividad antileishmaniásica.

1.1.7.1. Ensayos sobre promastigotes.

Los promastigotes flagelados se multiplican en el intestino medio del vector hembra de la mosca de la arena, 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 promastigotos infecciosos que exhiben propiedades similares a las formas metacíclicas detectadas en los vectores. Por lo tanto, las pruebas de inhibición del crecimiento generalmente se han realizado en promastigotos metacíclicos tempranos⁽²⁸⁾.

I. 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. Los protozoos inmóviles también se evalúan como no viables mediante el uso de tinciones vitales como el azul tripán y el rojo neutro. 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⁽²⁹⁻³¹⁾. 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. Este ensayo tiene la ventaja de no requerir equipamiento caro, pero lleva mucho tiempo y resulta engorroso⁽³¹⁾.

II. Métodos Colorimétricos.

a) Alamar azul.

El Alamar azul (resazurina) 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 evalúan pruebas con resazurina⁽³²⁾. 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 conteo, 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⁽³³⁾.

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. 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⁽³⁴⁾. 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⁽³⁵⁾.

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⁽³⁶⁾. 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. 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⁽³⁷⁾.

d) 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. 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. 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⁽³⁸⁾.

1.1.7.2. 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*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*. 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. Al usar GFP, *Leishmania amazonensis* genera promastigotos transgénicos, con brillo medible en placas de microtitulación de pocillos en un ensayo espectro fluorométrico. 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 promastigotos *in vivo*. Por otro lado, para este tipo de ensayo, se necesita un laboratorio capaz de realizar la ingeniería genética⁽³⁹⁾.

I. 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. 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⁽⁴⁰⁾.

II. Incorporación de nucleótidos radioactivos.

La captación de 3 [H] timidina es un método establecido para evaluar la viabilidad en estudios de inhibición en *Leishmania* y *Trypanosoma*. Este ensayo se ha empleado para evaluar la inhibición inducida por fármacos contra promastigotes de *Leishmania* y amastigotes axénicos. 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⁽⁴¹⁾.

1.1.7.3. 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*⁽⁴¹⁾.

I. 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. 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⁽⁴²⁾.

II. Citometría de flujo.

Se pueden emplear muchos colorantes fluorescentes para el ensayo de citometría de flujo, pero no todos dan buenos resultados. En un estudio comparativo donde diversos fluorescentes fueron utilizados para determinar las células infectadas por diferentes especies de *Leishmania* marcadas los autores concluyen que el ensayo FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) usando BCECF-Am (acetoximetilester) o SYTO 17 (un fluorescente rojo universal de cadena nucleica) es útil para estudiar macrófagos infectados si el tiempo de observación es de solo un día. Si observaciones de una duración mayor son requeridas debe usarse FITC-mAbs (*Fluorescein isothiocyanate conjugate con monoclonal antibodies*) en combinación con *digitonin*.^(41, 43)

1.1.7.4. 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 y se utilizó para realizar pruebas de detección *in vitro* de fármacos.

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.

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 amastigote 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⁽⁴¹⁾.

El ensayo MTT también se empleó para amastigotes axénicos. Además, se evaluó un ensayo de luminiscencia sobre amastigotes axénicos transgénicos. Para la transformación del ADN, el plásmido pSP α LUC (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⁽⁴⁴⁾.

1.2. Aspectos monográficos de *Jatropha gossypifolia* L.

1.2.1. Identificación taxonómica.

La planta *Jatropha gossypifolia* L. pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, subfamilia *Crotonoideae*, género *Jatropha*, subgénero *Jatropha*, especie *Gossypifolia*. De sinónimos botánicos: *Adenoropium gossypifolium* (L.) Pohl, *Manihot gossypifolia* (L.) Crantz, *Adenoropium elegans* Pohl, *Jatropha elegans* Kl., *Jatropha staphysagriifolia* Mill., *Jatropha gossypifolia*, y *Jatropha gossypifolia*. Sus nombres comunes son: Tuatúa, Frailecillo, San Juan del Cobre, higuera cimarrona, piñon negro, piñon rojo, entre otros^(7, 43, 45, 46). El género *Jatropha* posee dos subgéneros *Jatropha* y *Curcas*. El primero es el más ampliamente distribuido, posee especies en África, India, América del Sur, Antillas, América Central y el Caribe. Este género tiene gran importancia ya que, como *Jatropha gossypifolia* L., la mayoría de las especies tienen gran utilidad medicinal^(47, 48).

1.2.2. Descripción Botánica.

Jatropha gossypifolia L. es un arbusto gregario de 1 a 2 m de altura. Presenta hojas de color verde oscuro, o más frecuentemente púrpura-rojo oscuro, de 16-19 cm de largo por 10-12.9 cm de ancho. Son alternas, palmeadas y pubescentes, con un ápice acuminado, una base cordada y un margen aserrado, con 3-5 indentaciones. Las flores son pequeñas, unisexuales, de color carmín a púrpura, y de inflorescencia cimosa con cáliz de cinco pétalos, que en las masculinas pueden formar un tubo petaloide. La cápsula es de 1 cm, con tres surcos. Los frutos son pequeñas, redondos, alrededor de 2,5 - 4 cm de diámetro. Estos son de color verde y carnosos cuando son inmaduros, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura y se dividen para liberar 2 o 3 semillas de color negro cada una de aproximadamente 2 cm de largo. La carne de las semillas es blanca y grasosa en la textura y se reporta tener un sabor agradable^(7, 48).

1.2.3. Distribución.

Jatropha gossypifolia L. es una especie nativa de Brasil naturalizada en muchas partes de la India. Crece en casi cualquier tipo de suelo. Es común en praderas,

caminos, campos de cultivos poco atendidos y áreas afectadas por el desborde de ríos. Otra opinión dice que *J. gossypifolia* es nativa del Caribe y áreas trópicas de América pero que ahora está distribuida alrededor de todas las áreas tropicales del globo terráqueo. Está incluida en el listado de “yerbas” en la India, Brasil, Jamaica y Trinidad. En Malasia es considerada una especie invasiva y en Australia es considerada una yerba invasiva de impacto medio. Sus primeros usos que llevaron a su amplia distribución incluían: medicinales y para cercados vivos, actualmente es usada principalmente por su carácter ornamental^(43, 49).

1.2.4. Usos tradicionales.

Muchos usos tanto medicinales como veterinarios se reportan de diferentes partes de *J. gossypifolia* (hojas, tallos, raíces, semillas y látex) en diferentes preparaciones (infusión, decocción, maceración, entre otros) por diferentes rutas (oral o tópica) en la medicina tradicional. Los reportes más frecuentes indican uso como antihipertensiva, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, antimicrobiana, cicatrizante, antianémica, antidiabética, y antihemorrágica. Otros usos populares incluyen producción de biodiesel, pesticidas, insecticidas, tintes, ornamentación e incluso, rituales religiosos^(7, 9, 47, 48). (**Tabla 1.2** Usos tradicionales de *Jatropha gossypifolia* L.)

Tabla 1.2 Usos tradicionales de *Jatropha gossypifolia* L.*

Parte de la planta.	Uso tradicional.	Ref.
Toda la planta	Analgésica (dolor de cabeza)	(50)
	Antipirético	(51)
	Curación de heridas.	(52)
Partes aéreas.	Analgésica	(53)
	Antianémica	(54)
	Antidiabética	(55)
	Antiinflamatoria	(56)
	Antihemorrágica	(55)
Hojas	Antitrombótica	(55)
	Malaria	(57)
	Psicoactivo	(58)
	Estomatitis	(55)
	Tratamiento de síndromes culturales	(59)
Tallos	Dermatitis	(55)
	Lepra	(58)
	Anticancerígeno	(60)
Raíces	Anticonvulsivante	(61)
	Antidiarreico	(62)

	Antimicrobiano	(63)
Semillas	Emética	(64)

*Modificado de Félix-Silva y colaboradores (2014)⁽⁴³⁾.

1.2.5. Aspectos fitoquímicos y farmacológicos de la especie

Múltiples estudios han determinado gran parte de los metabolitos secundarios de *Jatropha gossypifolia* L. tanto de partes separadas como en su totalidad. Se reporta la presencia de cumarinas, diterpenos, triterpenos, flavonoides, fenoles, esteroides, taninos, alcaloides, saponinas, ésteres, glicósidos cardiotónicos, ácidos grasos y proteínas. Estos componentes son responsables de muchos de los usos tradicionales que se le atribuyen a la especie⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

Los glucósidos, flavonoides y taninos tienen acción hipoglucémica. Las saponinas poseen propiedades hipocolesterolemiantes y antidiabéticas. Los triterpenoides muestran propiedades analgésicas. La presencia de flavonoides y taninos es probable que sea responsable de la actividad de captación de radicales libres⁽⁶⁸⁾. Los flavonoides se han denominado como modificadores de la respuesta biológica de la naturaleza debido a la fuerte evidencia experimental de su capacidad para modificar la reacción del cuerpo a las alergias, virus y carcinógenos, mostrando actividad antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y anticancerígena⁽⁶⁹⁾.

Siguiendo tal línea de investigación se han determinado actividades farmacológicas tanto *in vivo* como *in vitro* de extractos de la especie y sus fracciones, llegando también a elucidarse metabolitos específicos a los que se les atribuye la actividad^(7, 43). Tal como puede observarse en la **Tabla 1.3** Principales metabolitos secundarios identificados en *Jatropha gossypifolia* L. con actividades farmacológicas confirmadas y en la **Tabla 1.4** Estudios farmacológicos sobre *Jatropha gossypifolia* L. más relevantes, que se presentan a continuación.

Tabla 1.3 Principales metabolitos secundarios identificados en *Jatropha gossypifolia* L. con actividades farmacológicas confirmadas

Clasificación.	Compuesto.	Parte de la planta.	Actividad Farmacológica	Ref.
Alcaloide	<i>Ricine</i>	Hojas	Insecticida in vitro	(70)
Cumarinas-lignanós	<i>Jatrophán</i>	Semillas, tallo y raíces	Antileishmaniásico	(71)
	<i>2α-Hydroxyjatrophone</i>	Raíces	Antileucémico in vitro e in vivo	(72)

	<i>2β-Hydroxy-5, 6-isojatrophone</i>	Raíces	Antileucémico in vitro e in vivo	(72)
	<i>2β-Hydroxyjatrophone</i>	Raíces	Antileucémico in vitro e in vivo	(72)
Diterpenos	<i>Abiodone</i>	N/D	Anticáncer in vitro	(73)
	<i>Falodone</i>	Raíces	Anticáncer in vitro	(74)
	<i>Jatrophene</i>	Toda la planta	Antibacteriano in vitro	(42)
	<i>Jatrophone</i>	Raíces	Anticáncer in vitro e in vivo Antileishmaniásico	(75, 76)
	<i>Japodagrín</i>	N/D	Antimicrobiano	(68)
	<i>Jatrogrossidione</i>	N/D	Antimicrobiano	(74)
	<i>9-acetoxynerylidol</i>	Semillas	Antifúngico	(74)
Esteres	<i>12-Deoxy-16-hydroxyphorbol</i>	Semillas	Irritante	(77)
Flavonas	<i>Apigenina (4',5,7-trihydroxyflavone)</i>	Hojas	Anticáncer, Antialérgico, Diurético, Antileishmaniásico	(65)
Flavonoide	<i>Vitexin</i>	Hojas	Antiinflamatorio, Anticáncer, otros	(65)

N/D No especificado.

Tabla 1.4 Estudios farmacológicos sobre *Jatropha gossypifolia* L. más relevantes.

Actividad Farmacológica.	Parte de la planta.	Extracto.	Ref.
Analgésica	Partes aéreas	Metanol y éter	(78)
Antibacteriana	Hojas	Fracciones obtenidas por extracción seriada con éter, benceno cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua	(68)
Antifúngica	N/D	Fracciones obtenidas por extracción seriada con hexano, cloroformo, acetona, metanol y agua	(62)
Anticolinesterasa	Hojas	Fracciones obtenidas por extracción seriada con acetato de etilo y metanol	(44)
Antidiarreica	Hojas	Metanol	(79)
Antiinflamatorio	Hojas	Etanol	(80)
Animalario	Hojas	Agua	(81)
Antileishmaniásico	Hojas y látex	Etanol	(71)
Antioxidante	Hojas y látex	Etanol	(71)
Antiviral	Partes aéreas	Fracciones acuosa y de acetato de etilo de un extracto metanólico	(82)
Anticonceptivo	Hojas	Etanol	(83)
Sedante y ansiolítico	Frutas	Metanol	(84)

N/D No especificado.

1.2.6. Aspectos toxicológicos de *Jatropha gossypifolia* L.

Jatropha gossypifolia L. es un ejemplo de especie con dualidad tóxica-terapéutica ya que aparece en reportes toxicológicos como especie vegetal de alta toxicidad y al mismo tiempo en publicaciones científicas que le avalan su potencial terapéutico. Está confirmado que el látex de esta especie es extremadamente cáustico para la piel y mucosas. Ante la ingestión directa puede causar problemas digestivos y depresores del sistema respiratorio y cardiovascular, además de insuficiencia renal. Los casos de intoxicación en humanos están reportados por la ingestión de frutas y semillas⁽⁴⁵⁾.

Un estudio toxicológico en ratas tratadas con extracto etanólico de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. demostró una toxicidad aguda oral relativamente baja. Mientras tanto en otro estudio se demostró una muy relevante toxicidad crónica con el extracto, dando como resultado una letalidad estadísticamente significativa y observándose daños neurológicos, gastrointestinales, hepáticos, renales y pulmonares⁽⁸⁵⁾.

Debido a la presencia de compuestos con acción repelente de insectos la especie fue evaluada en cuanto a potencial de toxicidad ambiental, presentando una concentración letal media (CL₅₀) de 3100 ppm en un bioensayo con *Poecilia reticulata*⁽⁸⁶⁾.

Existen sospechas de carcinogenicidad en la especie no solo por poseer un grupo de metabolitos denominados como "factores *Jatropha*" sino por ser utilizadas con mucha frecuencia en poblaciones con alto índice de neoplasias⁽⁴⁵⁾.

En un estudio realizado por Rivero (2014) en la UCLV se concluyó que la dosis letal media (DL₅₀) del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. se encuentra en cantidades superiores a 300 mg/kg clasificándose como moderadamente tóxico⁽⁹⁾.

1.3. Métodos para evaluar la citotoxicidad.

El término "citotoxicidad" tiene a menudo un significado amplio y mal definido en la industria del descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Para los sistemas de cultivo celular in vitro, se considera que un compuesto o tratamiento es citotóxico si

interfiere con la unión celular, altera significativamente la morfología, afecta negativamente la tasa de crecimiento celular o causa la muerte celular⁽⁸⁷⁾.

Dependiendo de los objetivos finales del estudio, se debe optar por utilizar un ensayo de viabilidad o de citotoxicidad, o alguna combinación de ambos en conjunto. Esta decisión se basa en el hecho de que existe una gran distinción práctica entre los datos derivados de las medidas de viabilidad y de citotoxicidad. La premisa científica detrás de los ensayos de metabolismo y viabilidad basados en ATP es que la actividad es proporcional al número de células viables. Como tal, se infiere fuertemente que una reducción de la actividad después del tratamiento (en comparación con el control) es el resultado de la citotoxicidad. Por el contrario, los ensayos de citotoxicidad miden parámetros proporcionales al grado de muerte celular en un pozo de ensayo. Durante la mayoría de los eventos de citotoxicidad, las medidas de viabilidad y citotoxicidad son inversamente proporcionales^(87, 88).

1.3.1. Ensayo de actividad metabólica por reducción del compuesto

MTT

La referencia original que incorpora el bromuro de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) se considera el primer ejemplo de una sal de tetrazolio que se utilizó en el desarrollo de un ensayo de viabilidad multipocilar para células de mamíferos. Originalmente descrito como un ensayo de dos adiciones, revolucionó el cribado de fármacos basado en células al ofrecer un ensayo colorimétrico HTS (quantitative high-throughput screening) que simplificaba el procesamiento de la muestra y no requería radioisótopos, pero era lo suficientemente sensible como para miniaturizarlo en formatos de placas de 96 pocillos⁽⁸⁸⁾.

El procedimiento implica la adición de un pequeño volumen de MTT contenido en solución salina tamponada con fosfato al cultivo celular. Durante 1 - 4 h de incubación a 37°C, un grupo de enzimas celulares mitocondriales y citosólicas reduce el colorante a su forma reducida como formazán morado. La reducción celular del MTT produce un formazán acuoso insoluble, con cristales visibles contenidos tanto en el medio circundante como dentro de las células. Por esta razón, se requiere una segunda adición que contenga un solvente ácido/isopropanol

para solubilizar y dispersar el formazán antes de registrar los valores de absorbancia. A medida que el procedimiento de ensayo se examinaba más a fondo, se hizo evidente que para muchas líneas celulares y protocolos, la cantidad de formazán producido y la presencia de suero de medio de cultivo garantizaban la eliminación del medio de cultivo y la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) para generar la máxima absorbancia⁽¹⁾.

Los ensayos de viabilidad con resazurina se basan en la reducción del colorante azul oxidado, que tiene poca fluorescencia intrínseca, a su producto de resorufina fluorescente rosa por células vivas. Al mismo tiempo, las propiedades de absorción de la luz visible del colorante se someten a un pequeño cambio de color azul que puede permitir controlar el ensayo por absorbancia, aunque con una pérdida de sensibilidad debido a la superposición espectral del colorante reducido y no reducido. Se cree que la reducción celular de la resazurina se logra mediante un grupo de enzimas de tipo reductasa o diaforasa derivadas de las mitocondrias y el citosol, muchas de las cuales también reducen la MTT⁽⁸⁷⁾.

1.3.2. Ensayos de ATP bioluminiscente.

Las células eucariotas que crecen in vitro contienen una cantidad relativamente constante de ATP que está estrechamente regulada para mantener la homeostasis. Durante el proceso de muerte celular, hay una pérdida de capacidad para sintetizar ATP y las ATPasas citoplasmáticas endógenas eliminan rápidamente cualquier resto de ATP. La medición de la cantidad de ATP a partir de muestras de células en cultivo ha sido ampliamente aceptada como un marcador válido del número de células viables presentes en la mayoría de las condiciones experimentales⁽⁸⁹⁾.

El método elegido para medir el ATP se basa en la capacidad de la luciferasa de la luciérnaga para generar una señal luminiscente. Los métodos originales para medir el ATP requerían un paso de extracción ácida para degradar las ATPasas endógenas y estabilizar la cantidad de ATP presente, seguido de la neutralización del pH de la muestra y su posterior combinación con luciferina y luciferasa nativa preparada a partir del abdomen de luciérnagas (*Photinus pyralis*). La señal resultante de esta reacción fue un destello de luz que duró sólo unos segundos⁽⁸⁹⁾.

Aunque esto proporcionó un método manual sensible para detectar la biomasa bacteriana o el número de células eucariotas viables en cultivo, la manipulación de la muestra y la señal de corta duración limitaron la utilidad de este enfoque para medir un gran número de muestras. El desarrollo de luminómetros con inyectores de reactivos representaba un avance, pero el número de muestras que podían procesarse convenientemente sigue siendo limitado⁽⁹⁰⁾.

1.3.3. Ensayos de citotoxicidad basados en la liberación de enzimas.

Uno de los métodos más definitivos para evaluar la muerte celular es medir la fuga de componentes celulares de células comprometidas al medio de cultivo. La lactato deshidrogenasa (LDH) ha sido favorecida durante mucho tiempo como un marcador de muerte celular para los modelos in vitro. La actividad de la LDH puede ser impulsada e indirectamente medida sometiendo la muestra a un reactivo de química enzimática acoplado que contenga lactato, NAD⁺, diaforasa y un colorante redox apropiado como la resazurina, que produce un cambio en la absorbancia o un cambio en el perfil de fluorescencia. Sin embargo, los protocolos de ensayo han sido históricamente limitados en el HTS, debido a la necesidad de eliminar una pequeña parte alícuota de medio de cultivo libre de células para su análisis en una placa separada. Recientemente se ha descrito un ensayo significativamente mejorado y verdaderamente homogéneo que permite la medición de la LDH en el mismo pozo sin necesidad de muestreo. Este ensayo muy simplificado se implementa ahora de forma rutinaria en las pantallas HTS de placas de alta densidad⁽⁸⁷⁾.

Materiales y métodos



2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Tipo de estudio.

Se realizó un estudio experimental preclínico en el Departamento de Farmacia, Facultad Química–Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido entre los meses de enero de 2019 y junio de 2019.

La realización del estudio se llevó a cabo en cuatro etapas:

1. Obtención del material vegetal.
2. Obtención de los extractos acuosos e hidroalcohólico y evaluación fitoquímica.
3. Evaluación de la actividad antileishmaniásica de los extractos.
4. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos.

2.2. Procedimiento y Diseño Experimental.

2.2.1. Equipos, materiales y reactivos empleados.

Equipos y materiales

- Balanza analítica digital (Sartorius TE124S, Alemania)
- Balanza técnica digital (Sartorius BS-2202S, Alemania)
- Plancha de calentamiento (Stuart SD 300, Ucrania)
- Baño de agua (Grant Sub14)
- Molino (IKA WERKE MF 10 basic, Alemania)
- Estufa (Binder, Alemania)
- Mufla (Nabertherm, Alemania)
- Rotoevaporador (Büchi Rotovapor R-200, Alemania)
- Equipo de reflujo (MEDINGEN, Alemania)
- Micropipetas (5, 10, 20, 100 μ L; EPPENDORF).
- 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)
- Cristalería de laboratorio.

Reactivos y otros productos

- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (UNI-CHEM)
- Ácido clorhídrico (UNI-CHEM)
- Anhídrido acético (UNI-CHEM)
- Etanol (UNI-CHEM)
- Hidróxido de sodio (UNI-CHEM)
- Reactivo de Sudan (UNI-CHEM)
- Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Felhing A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Dragendorff (UNI-CHEM)
- Reactivo de Kedde A y B. (UNI-CHEM)
- Solución de Ninhidrina 2%. (UNI-CHEM)
- Tricloruro férrico (Analar)
- Tricloruro de aluminio (MERCK)
- Cinta de magnesio metálica (Analar)
- 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)
- Resazurin sodium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Furvina, suministrada por el Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV.
- Schneider suplementado con suero fetal bovino (Sigma S9895-1L).
- Macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (suministrados por el Centro de Bioactivos Químicos).

2.2.2. Obtención del material vegetal.

Las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. se recolectaron el 29 de enero del 2019 a las 2:00 pm en las cercanías del “Callejón de los patos” localizado en el Reparto Universitario a pocos minutos del campo universitario de la UCLV.

El material recolectado se trasladó en bolsas de nylon negro al Laboratorio de Química Farmacéutica de la UCLV. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr. C. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la UCLV. Ejemplares de la especie se compararon con muestras identificadas en el herbario (UCLV) localizado en la citada institución, bajo el número 1305.

2.2.3. Secado y molinado del material vegetal.

Antes de secar las hojas estas fueron lavadas con suficiente agua potable, posteriormente fueron extendidas sobre secadores de malla plástica a la sombra durante 3 días. Luego fueron sometidas a secado mediante calor artificial en una estufa a 30 °C hasta masa constante⁽⁹¹⁾.

Una vez seco se redujo el tamaño de partícula del material vegetal mediante un molino de cuchillas utilizando un tamiz de 3 mm. El material molinado se envasó en bolsas de nylon negras bien cerradas. Hasta la realización de los estudios posteriores el material seco, molinado y envasado se almacenó en una desecadora en un lugar fresco^(91, 92).

2.2.4. Pruebas de control de la calidad de la droga cruda.

2.2.4.1. Determinación de índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.

Una vez estandarizado el secado se procedió a la determinación de los índices numéricos de la muestra del lote correspondiente al secado en la estufa a 30 °C y molinada, según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (NRSP # 309)⁽⁹¹⁾

I. Contenido de humedad residual.

La determinación del contenido de humedad residual se realizó por el método gravimétrico, empleando para ello el procedimiento general declarado en la NRSP # 309⁽⁹¹⁾.

Procedimiento: De la muestra de ensayo con el grado de trituración que determina la norma específica, se pesaron 1,0 g con un error máximo de 0,05 mg y se transfirió a una placa Petri previamente tarada y se desecó a 105 °C durante tres horas. La placa Petri se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, repitiendo esta operación hasta obtener un peso constante.

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

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

Dónde:

H: Contenido de humedad expresado en %

M₂: Masa de la placa Petri con la muestra (g)

M₁: Masa de la placa Petri con la muestra desecada (g)

m: Masa de ensayo (g)

100: Factor matemático para los cálculos.

El ensayo se efectuó por triplicado. Se informó el contenido de humedad como el promedio ± la desviación estándar de las tres determinaciones.

II. Determinación de cenizas totales.

Para la determinación de las cenizas totales se procedió usando el método gravimétrico según la descripción general descrita en la NRSP # 309⁽⁹¹⁾.

Procedimiento: De la muestra de ensayo previamente seca y molinada se pesó 1 g en un crisol de porcelana. Se calentó la muestra con un aumento de la temperatura hasta carbonización y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750 °C, durante dos horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó en una balanza analítica. Se repitió el proceso de incineración hasta obtener masa constante.

La cantidad de cenizas totales en base anhidra (C_t) se determinó por las fórmulas siguientes:

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

Donde:

C₁: Cenizas totales en base hidratadas.

M₂: Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M₁: Masa del crisol con la ceniza (g).

M: Masa del crisol vacío (g).

H: Contenido de humedad.

C_t: Cenizas totales en base anhidra.

100: Factor matemático para los cálculos.

El ensayo se realizó por triplicado y se informó el porcentaje de cenizas totales como el promedio \pm la desviación estándar de los datos determinados.

2.2.5. Obtención y caracterización físico-química de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

2.2.5.1. Obtención de los extractos.

Una vez que el material vegetal está seco y molinado se procedió a la obtención de los extractos. Fueron preparados dos: extracto acuoso (EAC) y extracto hidroalcohólico (EHA)

El extracto acuoso fue preparado refluendo 30g de materia vegetal seca y molinada en agua destilada, relación 1:10, por 2 horas. Posteriormente se filtra y se rotoevapora hasta eliminar el solvente.

El extracto hidroalcohólico se obtuvo por el mismo método: refluendo 40g de materia vegetal seca y molinada en solución hidroalcohólica al 70%, a relación 1:10, por 2 horas, posteriormente filtrado y rotoevaporado.

2.2.5.2. Características organolépticas.

I. Determinación del olor.

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si correspondía con el olor característico del producto natural. La determinación queda comprendida como una respuesta empírica del investigador⁽⁹²⁾.

II. Determinación del color.

Se tomó un tubo de ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas⁽⁹²⁾.

III. Determinación del pH.

Se realizó la determinación del pH en un pH-metro ajustado adecuadamente con una solución reguladora del pH. Los electrodos se introducen directamente en la muestra y se realizó una lectura directa sin repeticiones.

IV. Determinación del índice de refracción.

Se colocó sobre el prisma de medición del refractómetro una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el instrumento seleccionando la zona del espectro visible en que aparece la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Se realizaron tres lecturas. El índice de refracción final se determinó como el promedio de las mismas.

V. Determinación de la densidad relativa.

Se determinó la densidad relativa a las muestras de ensayo con un densitómetro digital.

VI. Determinación de los sólidos totales.

Procedimiento: De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirió 1 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en baño de agua y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco; posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105 °C durante tres horas. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante^(9, 92).

Los sólidos totales (S_t) se calcularon mediante la fórmula siguiente:

$$S_t = M_2 - M_1$$

Donde:

S_t : Sólidos totales.

M_2 : Masa del crisol con el sólido. (g)

M_1 : Masa del crisol vacío. (g)

Se efectuaron tres réplicas y el promedio \pm la desviación estándar es el valor definitorio.

VII. Estimación del rendimiento.

Dada la interpretación de que en 1 mL de extracto hay una determinada cantidad de sólido total puede determinarse el rendimiento total estimado (RT_a) a través de la siguiente fórmula:

$$RT_a = 100\% * \left(\frac{V_t * S_t}{V_{st}} / M_{ps} \right)$$

Donde:

RT_a : Rendimiento total estimado del extracto.

V_t : Volumen total de solvente añadido para la preparación del extracto. (mL)

V_{st} : Volumen de la alícuota tomada para la obtención de los sólidos totales. (mL)

S_t : Sólidos totales.

M_{ps} : Masa de material vegetal pesado para la preparación del extracto. (g)

Se obtienen tres valores, dados los tres valores de sólidos totales previamente obtenidos, el resultado definitorio se expresa como el promedio \pm la desviación estándar.

2.2.6. Evaluación fitoquímica de los extractos.

2.2.6.1. Tamizaje fitoquímico.

Para evaluar cualitativamente la posible composición química de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en cuanto a metabolitos secundarios, se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo las técnicas descritas por Miranda y Cuellar (2000)⁽⁹²⁾ (Tabla 2.1)

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

Ensayos	Metabolitos	Tipo de extracto	
		Etanólico	Acuoso
Resinas	Resinas	X	
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	X	
Espuma	Saponinas	X	X
Nihidrina	Aminoácidos	X	
Dragendorff	Alcaloides	X	X
Baljet	Coumarinas	X	
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	X	

Felhing	Azúcares reductores	X	X
Cloruro férrico	Taninos	X	X
Börntrager	Quinonas	X	X
Shinoda	Flavonoides	X	X
Sudán III	Ácidos grasos	X	

*Tomado de Miranda y Cuellar (2000)⁽⁹²⁾

- 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 rápido; verde oscuro- negro, final de la reacción, indica una respuesta positiva.
- Ensayo de Espuma: Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal 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 ácidas, 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 1 mL 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 (+++).
- Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. A los extractos se les adiciona 1mL 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.

I. Determinación del contenido de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se estimó según la metodología que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) descrita por Pełkal y Pyrzynska⁽⁹³⁾ con algunas modificaciones. La mezcla reactiva contenía 0,5 mL de extracto vegetal, 0,3 mL de EtOH, 0,1 mL del reactivo FC y 1,1 mL H₂O incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionaron 0,4 mL H₂O y 1 mL Na₂CO₃

(7 %) e incubó nuevamente durante 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm contra un blanco adecuado. Para el extracto hidroalcohólico se reajustan las cantidades de agua y etanol respectivamente. Se utilizó ácido gálico como referencia construyéndose una curva patrón en el intervalo 1-10 µg/mL. El ácido gálico se preparó en agua destilada con solución madre de concentración 1 mg/mL. El extracto se preparó a igual concentración en el solvente adecuado. Para la mezcla reactiva se realizaron las disoluciones adecuadas del extracto hasta encontrar una respuesta dentro de los límites calibrados de la alícuota del extracto vegetal. Los resultados se expresaron como µg de ácido gálico equivalente por mg de extracto seco (µgAGE/mgES).

II. Determinación del contenido de flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se estimó según la metodología descrita en la literatura por Pękal y Pyrzyńska^(69, 93), ligeramente modificada. A 2.5 ml de extracto se le adicionaron 1.25 ml de AlCl₃ (2 %) y 1.25 ml de H₂O. La mezcla reactiva se agitó e incubó durante 10 min, leyéndose la absorbancia a 425 nm contra un blanco adecuado. Para la estimación del contenido de flavonoides totales, se construyó una curva patrón con quercetina, solución madre de 0.5 mg/mL, en el intervalo de concentración de 2 a 10 µg/ml. El error de la contribución a la absorbancia de las fracciones en ausencia de AlCl₃ fue estandarizado en la curva de calibración. Los resultados se expresaron como µg de quercetina equivalente por mg de extracto seco (µgQE/mg).

2.2.7. Evaluación de la actividad antileishmaniásica de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

2.2.7.1. Actividad *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*.

Las concentraciones de producto que inhibieron el crecimiento de los promastigotes a un 50% con respecto al control no tratado (Concentración inhibitoria media o CI₅₀) y la concentración de producto que causó total inhibición de la motilidad de los promastigotes (Concentración parasitocida mínima, CPM) fueron usadas como índices de la actividad *in vitro* frente a los promastigotes⁽⁹⁴⁾.

Para ello se emplearon promastigotes de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) recientemente aislados (menos de diez subcultivos in vitro) de lesiones cutáneas de ratones BALB/c previamente infectados de forma experimental.

Procedimiento: Para este estudio se utilizó placas de 96 pozos⁽⁹⁴⁾. Columna 1: 200 μ L de medio de cultivo Schneider. Columna 2: 2 μ L de furvina + 198 μ L de medio, se homogenizó y desechó 80 μ L. Columna 3: 2 μ L de producto + 198 μ L de medio, se homogenizó. Columna 4-10: 120 μ L de medio. Se realizaron diluciones seriadas desde 3-10 1/2,5 (80 μ L) y se desechó los 80 μ L finales. Columna 11: 1 μ L de DMSO y 199 μ L de medio se homogenizó y desechó 80 μ L. Columna 12: 120 μ L de medio. Finalmente se añadió desde la columna 2-12 80 μ L de cultivo de promastigotes de *L. amazonensis* a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL. En cada placa se evaluó 2 productos (Filas A-D y E-H) con cuatro réplicas cada uno. Las placas se sellaron con Parafilm® (American National Can, Greenwich, Inglaterra) y se incubó a 26°C durante 72 h. Luego 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 μ L 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 (lector de placas de 96 pozos SUMA®, Cuba, a una longitud de onda de 405 nm⁽¹⁾). Las medias de las absorbancias para cada concentración de la formulación en los pozos, con o sin parásitos, fueron calculadas y las diferencias de estas medias se establecieron como las absorbancias netas para cada dilución. Los valores de concentración contra absorbancia neta fueron ajustados al modelo de E_{max} sigmoidea y se calculó la concentración inhibitoria media (CI₅₀)^(13, 47). Los valores de CI₅₀ para cada extracto fueron expresados como la media de al menos tres experimentos independientes.

2.2.8. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

2.2.8.1. Citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

El indicador de citotoxicidad para los macrófagos peritoneales es la concentración citotóxica media (CC_{50}), que es aquella concentración estimada que reduce a la mitad el número de células viables en comparación a cultivos controles no tratados. La viabilidad celular fue medida por el ensayo colorimétrico con rezasurina (Resazurin sodium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) el cual se basa en el cambio de coloración de azul a rosado por la actividad celular. Existe una correlación directa entre la reducción de la rezasurina y el rango de proliferación de organismos vivos. El compuesto detecta un sistema de enzimas oxidativas por la acción con aceptores de electrones ⁽⁹⁵⁾.

Procedimiento: Para el ensayo se sacrificaron ratones BALB/c por inhalación de CO_2 y se extrajeron los macrófagos residentes en el peritoneo mediante lavado con medio RPMI 1640 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) a $4^\circ C$ suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomina 200 $\mu g/mL$). La concentración de la suspensión celular fue determinada por conteo en cámara de Neubauer (se ajustó a 10^5 macrófagos/mL). En placas de 96 pozos se distribuyó de la columna 2-12, 100 μL de la suspensión celular, se incubó durante 2 h a $33^\circ C$ en una atmósfera de CO_2 al 5%. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió: Columna 1: 200 μL de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos correspondientes. Columna 2: 198 μL de medio y 2 μL de furvina. Columna 3: 198 μL de medio y 2 μL de producto. Columna 4-10: 120 μL de medio. Se realizaron diluciones seriadas desde 3-10 $1/2,5$ (80 μL) y se desechó los 80 μL finales. Columna 11: 1 μL de DMSO y 199 μL de medio. Columna 12: 200 μL de medio. Finalmente se repuso desde la columna 3-10 80 μL de medio de tal forma que la primera concentración del producto fue 300 $\mu g/mL$. En cada placa se evaluó 2 productos (Filas A-D y E-H) con cuatro réplicas cada uno. Se incubaron 72 h a $33^\circ C$ en una atmósfera de CO_2 al 5%. Posteriormente, se añadió a cada pozo 20 μL de rezasurina a 3 μM . La lectura se realizó de 16-18 h de incubación en un lector de placas de 96 pozos (SUMA®, Cuba) a una longitud de onda de 495 nm^(13, 47). Se calculó las fluorescencias netas para cada concentración y se graficaron las fluorescencias resultantes contra las concentraciones evaluadas. Estas curvas dosis-respuestas se ajustaron a un modelo de E_{max} sigmoidea y se determinó la

CC₅₀^(13, 47). Este procedimiento se repitió para cada producto al menos tres veces y los resultados son expresados como la media y su desviación estándar (DE).

El índice de selectividad de cada compuesto fue calculado dividiendo la CC₅₀ en la línea celular de mamífero entre el promedio de las CI₅₀ frente a los promastigotes de *L. amazeinsis*⁽⁹⁴⁾.

Resultados y discusión



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Obtención del material vegetal.

La recolección se realizó de manera manual como se recomienda para las plantas⁽⁹²⁾, el horario de recolección no fue el más óptimo dada la distante ubicación de la muestra vegetal y la necesidad de una correcta identificación por la amplia existencia de otras especies que podrían causar error al recolector. Esto pudo haber influido en la cantidad de metabolitos secundarios de la muestra.

Se procuró tomar las hojas dejando ramas suficientes que garanticen el normal desarrollo del vegetal. Las muestras recolectadas se encontraron en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas, todas las hojas fueron tomadas de organismos que habían alcanzado su edad media, dado el tamaño de los arbustos. A través de herramientas taxonómicas el DrC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la UCLV identificó la muestra recolectada como *Jatropha gossypifolia* L. Se comparó con la correspondiente a la serie 1305 del Herbario UCLV del citado centro de estudios, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la especie citada.

Las hojas recolectadas fueron lavadas con abundante agua potable garantizando la limpieza del material vegetal.

3.2. Secado y molinado del material vegetal.

El material vegetal fue secado y molinado tal como fue descrito previamente. Luego de tal proceso conservó las características organolépticas propias de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. dígase: color verde intenso, olor característico de la especie.

Se almacenó en bolsas de nylon negras protegidas de la humedad en una desecadora hasta el momento de su utilización.

El color característico del polvo puede apreciarse en la **Figura 3.1**, nótese la intensidad del mismo.



Figura 3.1 *Jatropa gossypifolia* L. droga cruda, seca y molinada, obtenida de las hojas.

3.3. Determinación de índices numéricos de la droga seca.

Ya seco y molinado el material vegetal se procedió a la determinación de los índices numéricos de los sólidos pulverulentos obtenido, refiérase: Contenido de Humedad y Cenizas Totales en base anhidra.

Esto resulta importante ya que las plantas poseen variaciones en el contenido de sus principios activos y pueden sufrir deterioros y contaminaciones⁽⁹²⁾. La determinación de tales parámetros actúa como una señal de calidad que permite buscar semejanzas y diferencias con los resultados obtenidos de la muestra recolectada en otros estudios hechos sobre la especie. Tales datos se muestran en la **Tabla 3.1** a continuación:

Tabla 3.1 Índices numéricos de la droga seca y molinada obtenida a partir de hojas de *Jatropa gossypifolia* L.

Índices numéricos.	Valor (%) (Media \pm DE, n=3)
Contenido de Humedad.	8,5467 \pm 0,2400
Cenizas Totales en base anhidra.	8,5771 \pm 1,5833

El contenido de humedad para la droga en el estudio fue de 8.55% por lo tanto cumple con los límites permisibles ($\leq 10\%$) establecidos por las NRSP de drogas

vegetales y La Real Farmacopea Española (2010), lo que indica que las condiciones de secado fueron las adecuadas⁽⁹⁶⁾.

Estos límites varían de una referencia a otra, oscilando frecuentemente entre el 8 al 14%, correspondiendo los valores más altos a las drogas compuestas por cortezas, tallos y raíces⁽⁹¹⁾.

El contenido de humedad de la muestra estudiada es ligeramente superior al descrito para las hojas recolectadas en Cuba en el en el municipio de Fomento por Mendoza en el 2017 (6.53%)⁽⁸⁾ y por Coba en igual año en la localidad de Quemado de Güines (7.59%)⁽⁹⁷⁾. Medina (2018) reporta un valor superior al aquí obtenido (9.39%)⁽¹⁰⁾ de una recolección en Casilda, Trinidad, Cuba.

Podemos inferir que los valores de humedad de *Jatropha gossypifolia* L. cubana son relativamente similares y que las variaciones que sufren están dados por el ambiente en que se desarrollan, relativamente diferente en cada caso. Se puede descartar la época del año como agente causal ya que todas las investigaciones referidas recolectaron en el primer trimestre del año de la investigación.

El contenido de cenizas totales indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga. Por lo general, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice. Estas permiten determinar la cantidad de material remanente después de la ignición: "cenizas fisiológicas", derivados de los tejidos de la especie y "cenizas no fisiológicas", que son el residuo después de la ignición de la materia extraña (polvo, arena, tierra, etc.) adherida a la superficie de la droga^(92, 96). En el caso del estudio se tuvo especial cuidado en la selección y tratamiento del material vegetal, lavando con agua potable y eliminando toda la materia extraña, por lo que se consideró que este valor debió corresponderse con las cenizas fisiológicas de la especie.

Se obtuvo un valor de 8.58% bastante inferior, comparándolo con los brindados por otros autores: Malpani y Sarda (2010) reportan 15.8%⁽⁹⁸⁾, Mendoza (2017) 11.39%⁽⁸⁾, Coba (2017) 10.73%⁽⁹⁷⁾, y Medina (2018) 10.96%⁽¹⁰⁾. Esto puede deberse a la presencia de metales pesados, sales y/u otros contaminantes en los suelos del lugar de recolección de tales muestras y la ausencia de los mismos en la actualmente analizada. Paralelamente el valor obtenido tiene mayor similitud con lo

reportado por otros autores, sobre la especie *Jatropha curcas* L, Ahirrao y colaboradores (2011) reportan 7.40%⁽⁹⁹⁾.

No obstante, se recomienda que en futuras investigaciones se determinen cenizas solubles en ácido clorhídrico para establecer si hay vínculos de material inorgánico extraño y el contenido actualmente reportado.

3.4. Obtención y caracterización de los extractos.

Los extractos acuoso (EAC) e hidroalcohólico (EHA) se obtuvieron por reflujo durante 2 h a partir de 30g y 40g del material vegetal respectivamente usando los solventes adecuados en cada caso: agua destilada y mezcla hidroalcohólica al 70%. Se obtuvieron dos extractos que luego de enfriamiento fueron filtrados y almacenados en un recipiente hasta posterior comprobación de las características organolépticas y otras determinaciones de calidad.

Fueron evaluados en cuanto a color, olor y variables fisicoquímicas tales como pH, índice de refracción (IR), densidad (d), sólidos totales y rendimiento total aproximado (RT_a). Los resultados aparecen en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2 Características organolépticas y fisicoquímicas de los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L

Característica.	EAC	EHA
Olor	Característico de la especie. Desagradable.	Característico de la especie. Intenso.
Color	Carmelita verdoso.	Verde muy oscuro.
pH (27,1°C)	6,59	7,00
Índice de Refracción. (media ± DE, n=3)	1,336 ± 0	1,3653 ± 0,0087
Densidad relativa g/cm ³ (27,1°C)	1,0067	0,928
Sólidos totales mg/100mL (media ± DE, n=3)	1,9133 ± 0,3013	1,42 ± 0,1414
Rendimiento Total Aproximado (%) (media ± DE, n=3)	19,13 ± 3,013	14,2 ± 1,414

Las características de color y olor detectadas corresponden a las que reporta Medina (2018)⁽¹⁰⁾, confirmando una vez más la adecuada correspondencia a la especie. El color verde oscuro del extracto hidroalcohólico puede suponerse que sea debido tanto a la clorofila, como a metabolitos con capacidad de tinter, tal como

reportan Fatokun y colaboradores (2016)⁽⁴⁸⁾, que resultan ser más solubles en alcohol que en agua. En los extractos no hubo presencia de algún precipitado, al menos visiblemente.

El pH del extracto acuoso resultó ser más bajo (ácido) que el del hidroalcohólico, puede atribuirse tal comportamiento a la presencia de metabolitos polares que modifican la contribución total al solvente (agua) o a la acción del etanol como contribuyente con pKa 15.9 en el otro extracto. Mendoza (2017)⁽⁸⁾ reporta un pH de 6.38 para un extracto hidroalcohólico preparado bajo iguales condiciones que el estudiado, la diferencia puede atribuirse a las diferencias de temperatura de un ensayo a otro y a la rotoevaporación previa que sufrió, lo cual concentró más los metabolitos secundarios y altera el resultado comparándolo con un extracto no rotoevaporado. No hay otros reportes similares al diseño seguido en esta investigación que puedan brindar datos fiables para proseguir una comparación.

Se denomina índice de refracción al cociente de la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio cuyo índice se calcula, resulta ser un valor característico para cada medio y permite corroborar que la sustancia analizada sea o esté adecuada a un patrón o referencia⁽¹⁰⁰⁾. En los extractos vegetales sirve como control de calidad ya que las respuestas deben ser semejantes para iguales extractos. El valor de 1.36 para el EHA resulta ser igual al reportado por Mendoza (2017)⁽⁸⁾, no hay valores de referencia para EAC, por lo que el aquí brindado puede servir de punto de comparación en futuras investigaciones.

La densidad relativa del extracto acuoso es superior a la del hidroalcohólico, tal resultado es comprensible dados los solventes que se están utilizando. Una mezcla hidroalcohólica, por acción del etanol que la compone, tiene usualmente a igual temperatura, una densidad inferior al agua. La densidad de EHA obtenida es equivalente con la reportada por Mendoza (2017)⁽⁸⁾.

El extracto acuoso resultó tener un mayor rendimiento con el método empleado que el hidroalcohólico, y el resultado de sólidos totales de este último resulta ser superior a lo declarado por Mendoza (2017)⁽⁸⁾ que dicta 0,47 mg/100 mL de solvente. La diferencia, dado que el método fue el mismo, radica en las cantidades de solventes empleadas, en este caso Mendoza (2017)⁽⁸⁾ para 50 g de droga vegetal seca empleo

cantidad superiores a 500 mL. El valor obtenido puede estar influido por el estadio del desarrollo fenológico de la planta y por las condiciones edafoclimáticas del sitio de recolección.

Saini, y colaboradores (2015)⁽⁴⁹⁾ obtuvieron un rendimiento superior al aquí presentado con un extracto metanólico (32%), los mismos autores declaran un extracto acuoso con rendimiento del 10%, este contraste de resultados tan amplio puede atribuirse a una diferente metodología en su evaluación y a que no son valores de rendimiento aproximado, sino total. Mientras tanto Dhale y Birari (2010)⁽¹⁰¹⁾ declaran valores extractivos de un 29.2% para el extracto acuoso y un 5.3% para el metanólico usando igual metodología que Saini y colaboradores (2015)⁽⁴⁹⁾, estos resultados están más acorde a lo aquí obtenido.

El método óptimo sería el recomendado por Pires (2014)⁽⁴⁷⁾, este plantea que la utilización de metanol como solvente de extracción para la *J. gossypifolia* L. permite una mayor solubilidad de los constituyentes de la muestra vegetal y así un mayor rendimiento comparado al uso de etanol, pues cuanto mayor la polaridad del solvente mayor es la solubilidad de los componentes de la muestra vegetal. Similar a lo planteado por Cesar y colaboradores (2016)⁽¹⁰²⁾ que, en el diseño de un método separativo para el metaboloma de la *J. gossypifolia*, determinó que con una mezcla de *i*-propanolol/cloroformo (1:1), se extraía la mayor diversidad de metabolitos de la especie.

En el presente estudio no se utilizaron tales recomendaciones ya que los extractos acuoso e hidroalcohólico son los más utilizados por la población para el tratamiento de sus afecciones y por lo tanto los metabolitos responsables de la actividad buscada deben encontrarse en ellos, aunque no necesariamente en una concentración óptima.

3.5. Tamizaje fitoquímico de los extractos.

El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales, pero es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la especie a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que 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⁽⁹²⁾.

En la **Tabla 3.3** se hace referencia a los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en los extractos analizados.

Tabla 3.3 Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolito	Ensayo	EHA	EAC
Resinas	Resinas	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(+)	(+)
Alcaloides	Dragendorf	(+)	(+)
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	(-)	(-)
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	(+)	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)	(+)
Aminoácidos libres	Ninhidrina	(+)	(+)
Coumarinas	Baljet	(++)	(++)
Azúcares reductores	Fehling	(+)	(+)
Quinonas	Borntrager	(+++)	(+++)
Compuestos grasos	Sudán	(+)	(+)
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	(+)	(+)
Antocianidas	Antocianidas	(+)	(+)
Polisacáridos	Mucílagos	(-)	(-)

Leyenda: (+; ++; +++) Positivo al ensayo. (-) Negativo al ensayo.

Quedó confirmada la presencia de flavonoides en ambos extractos, este grupo de metabolitos tiene utilidad en el tratamiento de diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias⁽¹⁰³⁾. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades quelantes, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer⁽⁹²⁾. De los flavonoides confirmados en la especie se encuentra *vitexin* del que se ha determinado actividades antiinflamatorias y

anticancerígenas⁽⁶⁵⁾ además de la apigenina que posee mismo potencial además de actividades diuréticas y antileishmaniásicas⁽⁶⁵⁾.

Otro grupo importante que quedó confirmado fueron las quinonas estos poseen según la dosis acciones variables como colagogos, laxantes o purgantes. Las 1,8-dihidroxi-antraquinonas son los principios activos de drogas laxantes como el sen, el ruibarbo, la cáscara sagrada y la zábila⁽⁶⁵⁾. Otra actividad importante que se le adjudica a este grupo son las potencialidades antibacterianas como es el caso de 6-(4, 7 dihidroxi-heptil) quinona, aislada de *Pergularia daemia*, que mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*⁽¹⁰⁴⁾. Hasta el momento no se ha reportado que alguna quinona de la *J. gossypifolia* tenga una acción farmacológica confirmada, pero no es imposible que se le puedan atribuir las actividades antimicrobianas que presentan los extractos en sinergismo con otros metabolitos secundarios.

Simultáneo a las quinonas fue determinada la presencia de compuestos terpenoides y esteroideos que tienen una mayor diversidad, tanto en estructuras químicas, como en posibles acciones farmacológicas, se citan: citoprotectoras, antiinflamatoria, antitumoral, antibacterial, antidermatitis, y antimicótica⁽⁶⁵⁾. De ellos ha sido identificado en la especie un amplio espectro de diterpenos con actividad antitumoral cítase: *Abiodone*⁽⁷³⁾, *Falodone*⁽⁷⁴⁾, y *Jatrophone*⁽⁷⁵⁾. Este último tiene confirmado en estudios recientes actividad antileishmaniásica⁽⁷⁶⁾. Con actividad antibacteriana y antimicrobiana se citan: Japodagrín⁽⁶⁸⁾, Jatrogrossidione⁽⁷⁴⁾ y Jatrophenone⁽⁴²⁾, no se puede descartar que tales metabolitos aislados tengan otras actividades farmacológicas. Estas estructuras abren nuevas líneas de investigación para el diseño de fármacos ya que los diterpenoides son novedosos, al menos, en las investigaciones antiprotozoarias⁽¹⁰⁵⁾.

Otros compuestos que dieron positivos a ambos ensayos fueron: alcaloides, saponinas, aminoácidos y antocianidas. No existió diferencia entre uno u otro ensayo en cuanto a presencia de metabolitos. Estos resultados son similares a los declarados por Mendoza (2017)⁽⁸⁾, Saini y colaboradores (2015)⁽⁴⁹⁾, Pires (2014)⁽⁴⁷⁾ y Félix-Silva y colaboradores (2014)⁽⁴³⁾.

3.5.1. Determinación del contenido de fenoles totales.

El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón, los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto seco ($\mu\text{gEAG}/\text{mgES}$) (**Figura 3.2**).

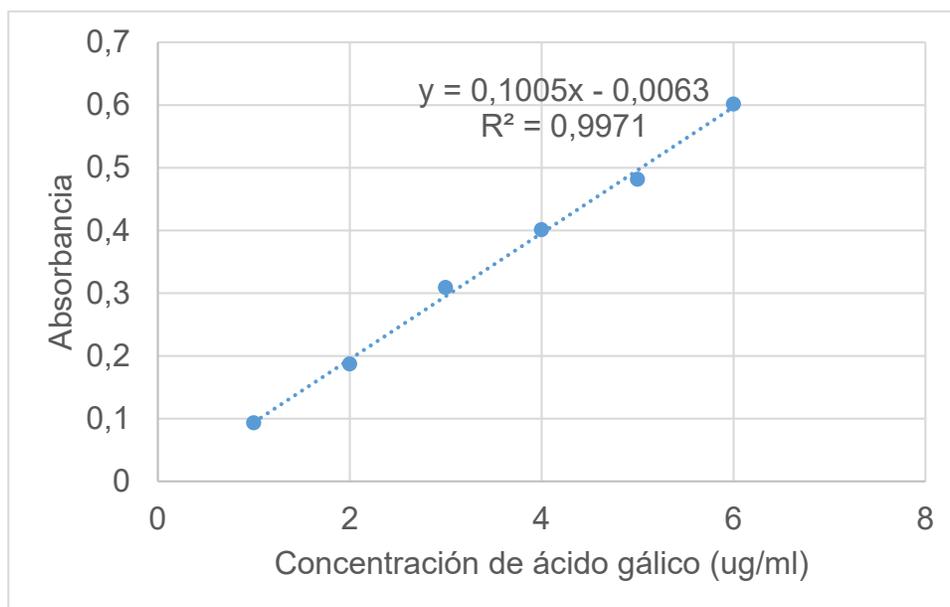


Figura 3.2 Curva de Calibración de ácido gálico, para la determinación del contenido de compuestos fenólicos por espectrofotometría visible.

Se obtuvo una mayor concentración de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico que en el acuoso tal como aparece en la **Tabla 3.4** que se muestra a continuación.

Tabla 3.4 Contenido total de fenoles.

Compuestos fenólicos	EAC	EHA
Contenido total ($\mu\text{gEAG}/\text{mgES}$) (media \pm DE, n=6)	9,2265 \pm 0,1419	53,8772 \pm 0,5409

Tal diferencia de contenido de fenoles puede estar relacionado con el solvente de extracción que fue utilizado en cada caso, los fenoles como grupo heterogéneo muestran diferencias de solubilidad, algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y el resto son polímeros muy grandes e insolubles. En el caso de estudio hay una mayor

cantidad de fenoles en el extracto hidroalcohólico por ser este solvente de polaridad intermedia y por lo tanto logra solubilizar mayor cantidad de metabolitos que el agua. Los resultados obtenidos para el extracto hidroalcohólico son superiores a los que Martins y colaboradores (2018)⁽⁷¹⁾ obtuvieron por igual método ($21,13 \pm 1,88$ $\mu\text{gEAG/mgES}$), la diferencia radica en que el extracto de este último fue obtenido por maceración a temperatura ambiente. Igualmente por maceración Pires (2014)⁽⁴⁷⁾ obtuvo 5.675 ± 0.095 $\mu\text{gEAG/mgES}$ de concentración de fenoles totales, con una metodología igual a Martins y colaboradores (2018)⁽⁷¹⁾, y el valor obtenido es igualmente muy inferior a este último. Podemos decir que el contenido de fenoles depende no solo de la metodología seguida si no del fenotipo de la especie recolectada y el tiempo de recolección, que en ningún caso fue el mismo.

Mendoza (2017)⁽⁸⁾ declara un contenido de $140,41 \pm 1,27$ $\mu\text{gEAG/mgES}$, en este caso el resultado obtenido es superior, la causa más probable es que el aquí estudiado no fue rotoevaporado antes de realizarse los análisis, aspecto diferente con la metodología seguida por Mendoza (2017)⁽⁸⁾ quien analizó su extracto una vez que quedó más concentrado.

El extracto acuoso, pese a sus bajas concentraciones, comparándolo con otras especies de *Jatropha* resulta poseer una cantidad sustancial de fenoles. Por ejemplo *J. multifida* L. solo tiene $0,130$ $\mu\text{gEAG/mgES}$ de fenoles totales en un extracto hidroalcohólico de las hojas⁽³²⁾.

De forma general las hojas de *J. gossypifolia* L. poseen una elevada concentración de fenoles lo que indica y justifica posibles aplicaciones farmacéuticas tales como su posible actividad antioxidante⁽¹⁰⁶⁾, anticancerígena⁽¹⁰⁷⁾ y antimicrobiana⁽¹⁰⁸⁾.

3.5.2. Determinación del contenido de flavonoides totales.

El contenido total de flavonoides para el extracto hidroalcohólico fue calculado empleando la curva de calibración de la quercetina (**Figura 3.3**) como patrón y expresado como microgramos de quercetina por miligramo de extracto seco.

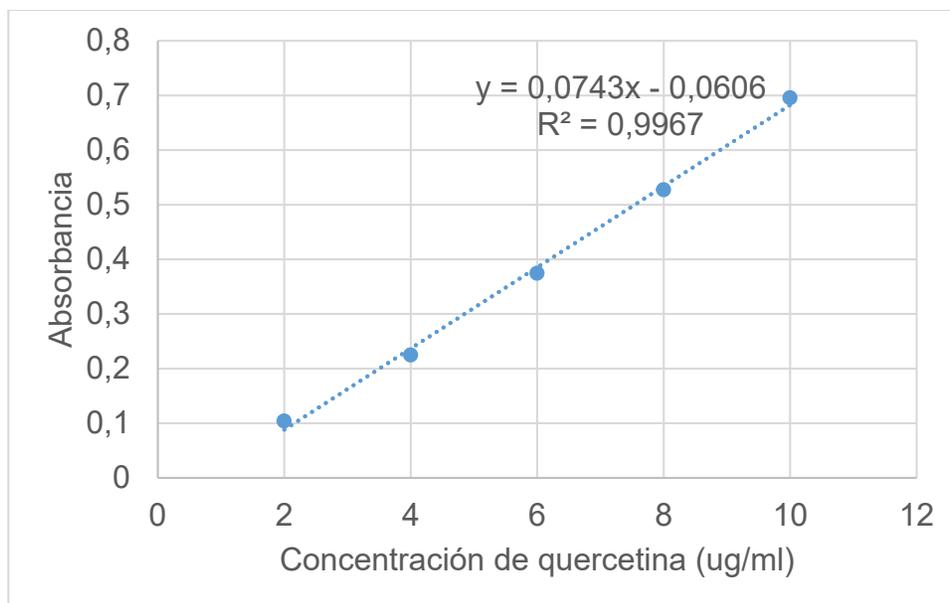


Figura 3.3 Curva de calibración de la quercetina, para la determinación del contenido de flavonoides totales por espectrofotometría visible.

Similar a lo ocurrido en la determinación de fenoles totales, los flavonoides tienen un comportamiento igual: la cantidad en el extracto acuoso es inferior a la encontrada en el hidroalcohólico. (**Tabla 3.5**) Es comprensible ya que los flavonoides están contenidos dentro de los fenoles y deben tener por lógica concentraciones equivalentes a los de estos. La causa es la misma que en el caso anterior: las diferencias de polaridad entre ambos solventes y la capacidad de la mezcla hidroalcohólica de captar metabolitos de polaridad intermedia.

Tabla 3.5 Contenido total de flavonoides.

Flavonoides	EAC	EHA
Contenido total (µgEAG/mgES) (media ± DE, n=3)	3,3218 ± 0,0109	41,9072 ± 0,0167

Los flavonoides del extracto hidroalcohólico reportado para esta muestra son superiores a los reportados por Pires (2014)⁽⁴⁷⁾, Mendoza (2017)⁽⁸⁾ y Kesumasari y colaboradores (2018)⁽¹⁰⁹⁾ la diferencia radica una vez más en el método empleado para preparar los extractos.

En un estudio llevado a cabo por Subramanian (1971), donde analizó, identificó y separó gran cantidad de flavonoides de las hojas de la especie en estudio, se llegó a la conclusión que hay presencia de flavonoides-C-glicosilados en el extracto acuoso con una mayor cuantía que con otros solventes⁽⁶⁹⁾, tales tipos de flavonoides son escasos en la familia *Euphorbiaceae*, así que en futuros estudios no debe evitarse, como ha sido hasta ahora, la fracción de flavonoides que se obtiene con solvente acuoso.

Dentro de la composición química de la especie *Jatropha gossypifolia* L., los flavonoides constituyen unos de los metabolitos más importante a los cuales se le atribuyen una gran diversidad de actividades farmacológicas como por ejemplo propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y analgésicas.

3.6. Evaluación de la actividad antileishmaniásica de los extractos.

3.6.1. Evaluación de la actividad *in vitro* frente promastigotes de *L. amazonensis*.

Tanto el extracto acuoso como el hidroalcohólico mostraron actividad frente a promastigotes de *L. amazonensis* en concentraciones inferiores a 1.0 µg/mL (**Tabla 3.6**)

Tabla 3.6 Actividad frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Promastigotes.	EAC	EHA
CI ₅₀ * (µg/mL) (media ± DE, n=3)	0,28 ± 0,15	0,59 ± 0,26

*CI₅₀ Concentración Inhibitoria 50%, concentración donde al menos ha muerto la mitad de los promastigotes.

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 solo contenían medio de cultivo (control del medio) y los tratados con furvina a 10 µg/mL (control positivo) y máximos valores en los cultivos que no recibieron tratamiento alguno (control negativo) o fueron tratados con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 1% (control de vehículo). (**Figura 3.4**)

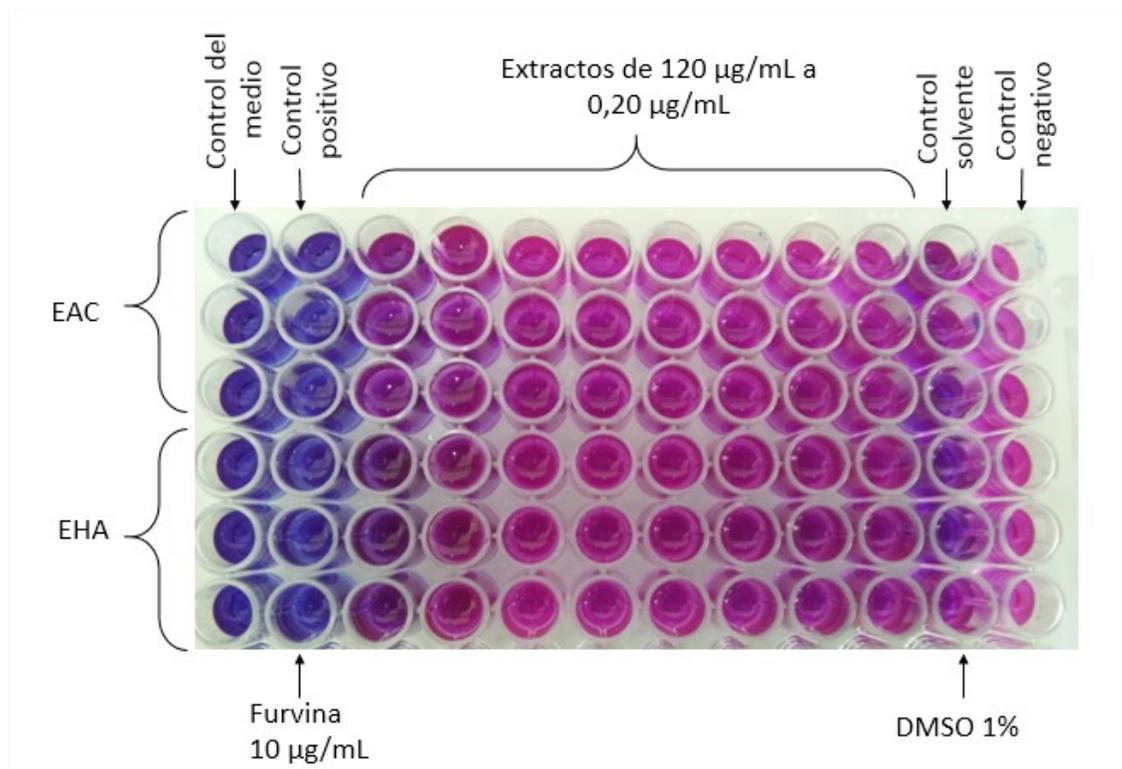


Figura 3.4 Ensayo para la determinación de la actividad antileishmaniásica de EAC y EHA.

Ambos extractos mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de los promastigotes de *L. amazonensis*, expresada como Concentración Inhibitoria 50% (CI_{50}), que se interpreta como aquella concentración del producto donde al menos la mitad de los promastigotes mueren. No presentaron actividad parasiticida a ninguna de las concentraciones evaluadas (120 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$), o sea, no ocurrió muerte total de los parásitos en el intervalo de concentración analizado.

El extracto acuoso mostró una mejor eficacia contra los promastigotes al alcanzar una CI_{50} inferior a la del extracto hidroalcohólico.

Este hecho puede deberse a varios motivos, en primer lugar, el agua podría poseer mayor penetrabilidad en las membranas proteicas del parásito que el etanol lo que permitiría que los metabolitos del extracto acuoso actúen en mayor cuantía que los del etanólico. Otra posibilidad es que el agua actué como promotor en la formación de liposomas sobre ciertos metabolitos secundarios que por su tamaño u otra característica no penetrarían normalmente la membrana. Aunque la causa más

probable es que los metabolitos con acción antileishmaniásica sean más solubles en agua que en etanol, o sea, tengan mayor polaridad.

Medina (2018)⁽¹⁰⁾ analizó la potencialidad antileishmaniásica de tres fracciones extraídas de un extracto hidroalcohólico de la especie; preparado por reflujo hasta agotamiento y luego concentrado y rotoevaporado hasta sequedad. Las fracciones que obtuvo: benceno-cloroformo (BC) y metanol-agua (MA) obtuvieron una CI_{50} de 0.45 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción metanólica (MET) 0.70 $\mu\text{g/mL}$. Las tres fracciones mostraron una concentración parasiticida de 0.98 a 2.5 $\mu\text{g/mL}$. La acción parasiticida ocurre en este caso por la alta concentración de metabolitos de la especie vegetal en estudio, dado el método de preparación del extracto, además de encontrarse los metabolitos más particularmente separados en cada fracción.

Independientemente de lo anterior, puede notarse que la fracción MA, de polaridad mayor, tiene menor CI_{50} que la fracción MET. Esto es indicativo que los metabolitos, o combinación sinérgica de metabolitos, con mayor actividad antileishmaniásica se encuentran en las fracciones más polares del extracto preparado.

Al comparar los resultados obtenidos con los de Medina (2018)⁽¹⁰⁾, vemos que el extracto más polar de los analizados (EAC) tiene menores CI_{50} que las tres fracciones de este autor, aunque la concentración de metabolitos sea menor, dado el método de preparación: reflujo simple y luego rotoevaporación hasta sequedad.

Esto es indicativo que la preparación de un extracto acuoso más concentrado debería dar como resultado concentraciones parasiticidas menores que las declaradas por Medina (2018)⁽¹⁰⁾. Igualmente la fracción hidroalcohólica del estudio actual mostró una CI_{50} superior a la fracción metanólica. Si se ordenaran estos resultados de menor a mayor CI_{50} quedaría: EAC<MA<EHA<MET que coincide justamente con las diferencias de polaridad entre solventes, por lo que se permite afirmar que EAC y sus fracciones tendría mejores resultados que los ya declarados.

Martins y colaboradores (2018)⁽⁷¹⁾ identificaron un metabolito tipo glicósido con actividad antileishmaniásica en las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. (*Jatropham*) con CI_{50} de $0,47 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ usando un extracto etanólico al cual también se le determinó la CI_{50} de $4,76 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$. Puede apreciarse la diferencia entre los resultados declarados por este autor y los aquí obtenidos. Probablemente este

metabolito está contenido en mayor cuantía en el EAC que en el EHA lo que implica la diferencia en las CI_{50} .

Además de lo anteriormente planteado, Ogbonna y colaboradores (2017)⁽⁷⁶⁾ aislaron otro metabolito (*Jatrophone*) de las raíces de *Jatropha gossypifolia* L. y determinó su actividad antileishmaniásica, dando un valor inferior a 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aunque este metabolito no se ha encontrado en las hojas de la especie no hay nada que niegue la posibilidad de su presencia o de una estructura similar.

Nótese que el EAC resulta tener mayor efectividad que ambos metabolitos aislados, lo que es indicativo de la presencia de más de un compuesto con actividad semejante, de uno más potente o de un efecto sinérgico entre metabolitos secundarios.

Comparado a otras especies *Jatropha gossypifolia* L. muestra un CI_{50} extremadamente positivo para futuras investigaciones. Por ejemplo *Aloe vera* posee un IC_{50} : 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y *Moringa stenopetala* un IC_{50} : 0.079 y 242.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁽¹¹⁰⁾. Superiores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en ambos casos.

Para futuros estudios, se recomienda obtener hasta agotamiento y luego fraccionar el extracto acuoso para obtener una mayor separación y concentración de los metabolitos secundarios con actividad antileishmaniásica.

3.7. Evaluación de la citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Tanto el extracto acuoso como el hidroalcohólico mostraron citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c en concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e índices de selectividad inferiores a 10. (Tabla 3.7)

Tabla 3.7 Citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Extractos	CC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (media \pm DE, n=3)	IS
EAC	0,91 \pm 0,11	3,26
EHA	0,57 \pm 0,12	1,44

CC_{50} Concentración Citotóxica 50%, concentración donde al menos ha muerto la mitad de los macrófagos.

IS Índice de selectividad: CC_{50} de macrófagos/ CI_{50} de amastigotes de *L. amazonensis*.

El estudio de citotoxicidad *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 solo contenían medio de cultivo (control del medio) y los tratados con furvina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (control positivo) y máximos valores en los cultivos que no recibieron ninguna sustancia citotóxica (control negativo) o fueron tratados con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 1% (control de vehículo).

En este caso el control positivo indica la citotoxicidad máxima alcanzable para el cultivo de macrófagos en estudio, y el control negativo significa ninguna citotoxicidad. (Figura 3.5)

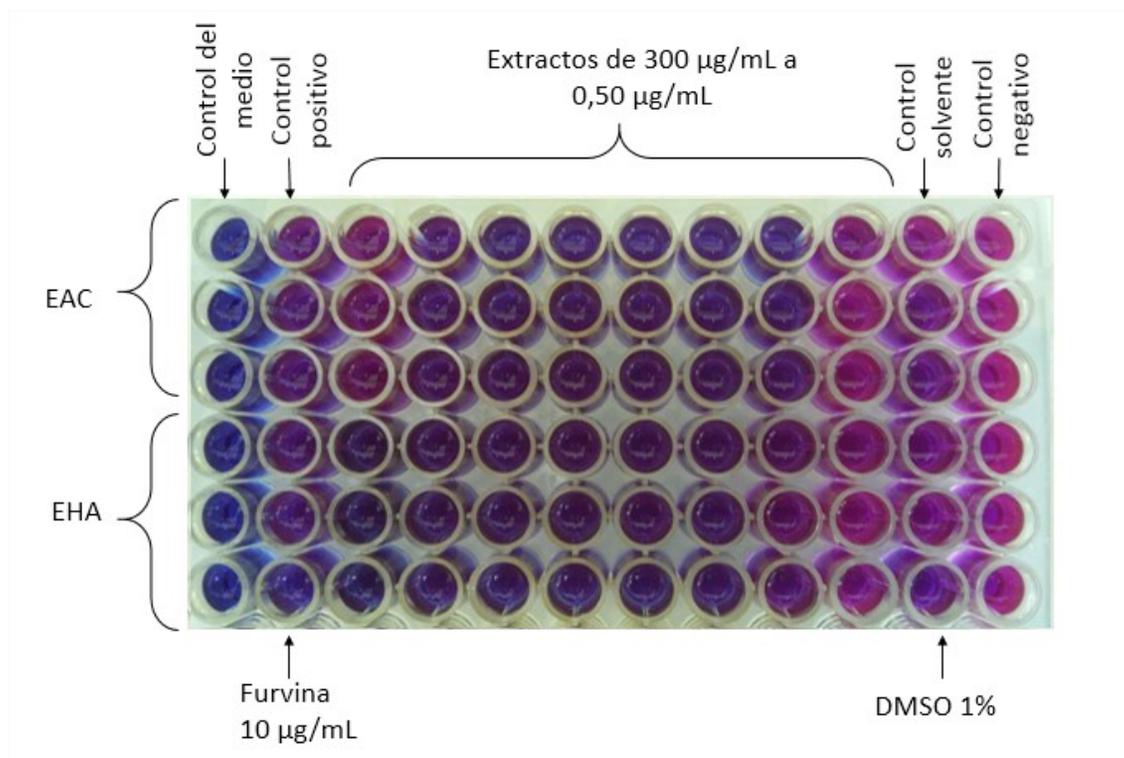


Figura 3.5 Ensayo para la determinación de la citotoxicidad de EAC y EHA.

Ambos extractos mostraron citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c expresada como CC_{50} , que es interpretada como aquella concentración del producto en la que al menos mueren el 50% de los macrófagos en medio de cultivo. El extracto acuoso mostró menor citotoxicidad que el hidroalcohólico al presentar mayor CC_{50} . Este resultado es coincidente con el obtenido por Sarker y

colaboradores (2013)⁽¹¹¹⁾ quienes analizaron la citotoxicidad de un extracto crudo metanólico y fracciones de diversa polaridad obtenidas a partir de este, en el modelo de *Artemia salina*. Sarker y colaboradores (2013)⁽¹¹¹⁾ concluyen que la toxicidad de los extractos y fracciones de *Jatropha gossypifolia* L. disminuye con el incremento de la polaridad de los mismos. Situación presente en el actual estudio.

Almeida (2014)⁽¹¹²⁾ determinó el potencial genotóxico del látex y del extracto obtenido de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. y obtuvo como conclusiones que existe una relación dosis dependiente de la toxicidad y citotoxicidad para concentraciones superiores a 1.25mL/L (según el diseño del estudio). Atribuye ese efecto a varias sustancias químicas presentes en el látex que podrían estar presentes también en el extracto de las hojas: principalmente péptidos cíclicos como la *cyclogossines A y B* ya identificada en la especie, así como posibles terpenos y alcaloides que posean alta citotoxicidad como ocurre en otras especies de la familia. El extracto acuoso presenta mayor índice de selectividad que el hidroalcohólico, este valor es la fracción CC_{50}/CI_{50} , se interpreta como la selectividad del producto para promastigotes ante la célula hospedera del protozoo. Son preferidos valores superiores a 10, inferiores a este número son usualmente criterio de exclusión en la búsqueda de nuevos metabolitos con actividad antileishmaniásica⁽¹¹³⁾.

El *jatrophone* aislado y caracterizado por Ogbonna y colaboradores (2017)⁽⁷⁶⁾ presentó un CC_{50} de 0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un ensayo *in vitro* en línea celular VERO, con un IS de 0.8 lo que, semejante a los extractos obtenidos, indica un mismo nivel de toxicidad contra la célula diana (el protozoo en este caso) que contra la célula sana. Por lo que el *jatrophone* tiene un bajo nivel de seguridad.

El *jatropham* aislado por Martins y colaboradores (2018)⁽⁷¹⁾ no tiene ningún reporte de toxicidad, lo que no quiere decir que su índice de selectividad sea alto, sino que queda por determinar.

Es común que muchos productos naturales sean tóxicos ya que las plantas son organismos que sintetizan metabolitos para su defensa biológica. La citotoxicidad de ambos extractos puede atribuirse por el momento, tanto a los posibles metabolitos antileishmaniásicos como a los identificados por Almeida (2014)^(112, 114), lo que queda claro, es que futuras investigaciones deben ir encaminadas a separar

y aislar el conjunto de compuestos que tiene capacidad antileishmaniásica en el extracto acuoso que presenta el mejor índice de selectividad.

Este alto nivel de citotoxicidad no debe actuar como limitante para futuras investigaciones sobre esta planta ya que en un estudio realizado por Xavier-Santos y colaboradores (2018)⁽¹¹⁵⁾ se determinó su nula toxicidad dérmica, esto abre puertas para la posible aplicación en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Son necesarios otros estudios con este material vegetal en orden de elucidar el mecanismo de acción de sus compuestos bioactivos mientras se reduce su toxicidad manteniendo la acción terapéutica.

Conclusiones



CONCLUSIONES.

- Las saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores, y quinonas son los principales metabolitos secundarios identificados en las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.
- Los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. presentan actividad antileishmaniásica que se incrementa a medida que aumenta la polaridad del solvente empleado.
- Los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. presentan un incremento de la citotoxicidad a medida que disminuye la polaridad del solvente empleado; resultados que limitan el empleo de los extractos a su aplicación tópica, para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea.

Recomendaciones



RECOMENDACIONES.

1. En futuros estudios con *Jatropha gossypifolia* L. los solventes polares deben ser la primera elección para la preparación de los extractos dada la mayor actividad antileishmaniásica y menor citotoxicidad que presentan.
2. Aislar y caracterizar los metabolitos que avalen la actividad antileishmaniásica de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Referencias Bibliográficas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Sifontes Rodríguez S. Descubrimiento racional de compuestos químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2017.
2. Kumar A. Leishmania and Leishmaniasis. New York: Springer-Verlag; 2013.
3. Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA). Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis. Asunción – Paraguay: OMS/OPMS, 2018.
4. Drug Resistance in Leishmania Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editors. New York: Springer-Verlag; 2013.
5. Sundar S, Chakravarty J. Mechanism of Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. In: Adak S, Datta R, editors. Leishmania Current Biology and Control. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2015.
6. Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep. 2001;18:674-88.
7. Wua Q, Patockac J, Nepovimovab E, Kucab K. *Jatropha gossypifolia* L. and its biologically active metabolites: A mini review. Journal of Ethnopharmacology. 2019;234:197-203.
8. Mendoza Muñoz M. Evaluación farmacológica de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2017.
9. Rivero González BD. Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2014.
10. Medina Albert JE. Potencial antileishmaniásico y antimicrobiano de las hojas de la especie *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2018.
11. Torres-Guerrero E, Arenas R. Leishmaniasis. Alternativas terapéuticas actuales. Dermatol Rev Mex 2018;62(5):400-9.

12. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007;64(1):1-109.
13. Monzote Fidalgo L. Potencial terapéutico del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* y algunos de sus componentes frente a *Leishmania*. La Habana, Cuba: Universidad de La Habana; 2010.
14. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *IJVR.* 2015;16(50):1-19.
15. Bonfante-Garrido R BS. Leishmanias y leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. 2002.
16. Shokri A, Emami S, Fakhar M, Teshnizi SH, Keighobadi M. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. *Acta Trop.* 2017;167:73-8.
17. Anand D, Yadav P, Patel O, Parmar N, Maurya R, Vishwakarma P, et al. Antileishmanial activity of pyrazolopyridine derivatives and their potential as an adjunct therapy with miltefosine. *J Med Chem.* 2017;60(3):1041-59.
18. Barea C, Pabón A, Pérez-Silanes S, Galiano S, Gonzalez G, Monge A. New amide derivatives of quinoxaline 1,4-dioxide with leishmanicidal and antiplasmodial activities. 2013;18(4):. *Molecules* 2013;18(4):4718-27.
19. De Muylder G, Vanhollebeke B, Caljon G, Wolfe A, McKerrow J, Dujardin J. Naloxonazine, an amastigote-specific compound, affects *Leishmania* parasites through modulation of host-encoded functions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12).
20. Gutierrez-Rebolledo GA, Drier-Jonas S, Jiménez-Arellanes MA. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2017;10(2):1105-10.
21. Salem MM, Werbovetz KA. Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry.* 2006;13:2571-98.

22. Guimaraes L, Rodrigues A, Marinho P, Muller A, Guilhon G, Santos L, et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res.* 2010;107:1075-81.
23. de Medeiros M, da Silva A, Cito A, Borges A, de Lima S, Lopes J, et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides*. *Cham Parasitol Int.* 2011;60:237-41.
24. Iqbal H, Khattak B, Ayaz S, Rehman A, Ishfaq M, Naseer Abbas M, et al. Comparative efficacy of *Aloe vera* and *Tamarix aphylla* against cutaneous leishmaniasis. *IJBMS*. 2012;2:42-5.
25. Tiunan T, Brenzan M, Ueda-Nakamura T, Filho B, Cortez D, Nakamura C. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) *mammea A/BB*. *Phytomedicine.* 2012;19:1196-9.
26. Bekele B, Adane L, Tariku Y, Hailu A. Evaluation of antileishmanial activities of triglycerides isolated from roots of *Moringa stenopetala*. *Med Chem Res.* 2013;22:4592-9.
27. Monzote L, Garcia M, Scull R, Cuellar A, Setzer W. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytother Res.* 2014;28:753-8.
28. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984;223(4643):1417-9.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Carvalho Cd, Vieira Mariano L, Negrão VS, Passarelli Gonçalves C, Marcucci MC. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of *Jatropha multifida* L. collected in

Pindamonhangaba, Sao Paulo State, Brazil. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 2018;7(5).

33. 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.

34. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(4):1157-9.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. Saleem H, Ahmad I, Shahid MN, Gill MS, Nadeem MF, Mahmood W, et al. In vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potentials of *Jatropha gossypifolia* plant extracts. *Acta Pol Pharm*. 2016b;73(2):419-23.

41. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*. 2004;155:224-30.

42. Ravindranath N, Venkataiah B, Ramesh C, Jayaprakash P, Das P. Jatrophene, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Chem Pharm Bull* 2003;51(7):870-1.
43. Félix-Silva J, Giordani, R.B., da Silva-Jr, A.A., Zucolotto, S.M., de Freitas, F.P.M., *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evid Based Compliment Altern Med* 2014b.;2014(1-32).
44. Feitosa CM, Freitas RM, Luz NNN, Bezerra MZB, Trevisan MTS. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Braz J Biol* 2011;71(3):783-9.
45. Mariz SR, et al. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Rev Bras PI Med*. 2010;12(3):346-57.
46. Roig M. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana, Cuba: Científico-Técnica ed. ; 2012.
47. Pires Dos Santos M. Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2014.
48. Temitope Fatokun O, Liberty O, Benefit Esievo K, Ehiabhi Okhale S, Folashade Kunle O. Phytochemistry, Ethnomedicine and Pharmacology of *Jatropha gossypifolia* L: A Review. *Archives of Current Research International*. 2016;5(3):1-21.
49. Saini V, Mishra R, Mandloi S, Yadav N. Analysis of the Phytochemical Content of *Jatropha gossypifolia* L. *Chemical and Process Engineering Research*. 2015b;35(2015).
50. L. C. Di Stasi and C. A. Hiruma-Lima, *Plantas medicinais na Amazonia e na Mata Atlantica*, UNESP, São Paulo, Brazil, 2nd edition, 2002.
51. C. Auvin-Guette, C. Baraguey, A. Blond, J. L. Pousset, and B. Bodo, "Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*," *Journal of Natural Products*, vol. 60, pp. 1155–1157, 1997.

52. G. D. Wadankar, S. N. Malode, and S. L. Sarambekar, "Traditionally used medicinal plants for wound healing in the Washim district, Maharashtra (India)," *International Journal of PharmTech Research*, vol. 3, no. 4, pp. 2080–2084, 2011.
53. S. L. Cartaxo, M. M. de Almeida Souza, and U. P. de Albuquerque, "Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131, no. 2, pp. 326–342, 2010.
54. M. H. Yetein, L. G. Houessou, T. O. Lough'egnon, O. Teka, and B. Tente, "Ethnobotanical study of medicinal plants used for the treatment of malaria in plateau of Allada, Benin (West Africa)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 1, pp. 154–163, 2013.
55. F. G. Coe and G. J. Anderson, "Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 29–50, 1996.
56. L. C. Di Stasi and C. A. Hiruma-Lima, *Plantas medicinais na Amazonia e na Mata Atlantica*, UNESP, Sao Paulo, Brazil, 2nd edition, 2002.
57. O. Jansen, L. Angenot, M. Tits et al., "Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, no. 1, pp. 143–150, 2010.
58. 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.
59. J.D. F. L. Santos, E. Pagani, J. Ramos, and E. Rodrigues, "Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, no. 2, pp. 503–515, 2012.
60. J. S. Ashidi, P. J. Houghton, P. J. Hylands, and T. Efferth, "Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from *Cajanus cajan* Millsp. leaves," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 128, no. 2, pp. 501–512, 2010.
61. A. Diallo, M. S. Traore, S. M. Keita et al., "Management of diabetes in Guinean traditional medicine: an ethnobotanical investigation in the coastal lowlands," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 144, no. 2, pp. 353–361, 2012.

62. R. Dabur, A. Gupta, T. K. Mandal et al., "Antimicrobial activity of some medicinal plants," *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, vol. 4, no. 3, pp. 313–318, 2007.
63. J. H. Cano and G. Volpato, "Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 90, no. 2-3, pp. 293–316, 2004.
64. T. Oduola, G. O. Adeosun, T. A. Oduola, G. O. Awwioro, and M. A. Oyeniya, "Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent," *European Journal of General Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 140–143, 2005.
65. Duke JA. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. Raton B, editor: FL. CRC Press; 1992.
66. Zhang XP, Zhang ML, Su XH, Huo CH, Gu YC, Shi QW. Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. *Chem Biodivers* 2009;6(12):2166-83.
67. Khyade M, Vaikos N. Pharmacognostical and Phytochemical Evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. *IJRAP*. 2011;2(1):177-80.
68. Seth R, Sarin R. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. *Arch Appl Sci Res*. 2010;2(5):285-91.
69. Subramanian SS, Nagarajan S, Sulochana N. Flavonoids of the leaves of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*. 1971;10:1690.
70. V. Bullangpoti N, Khumrungsee W, Pluempanupat Y, Kainoh, Saguangpong U. Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*. 2011;36(2):260-3.
71. Martins GV, Alves DR, Viera-Araújo FM, Rondon F, Braz-Filho R, Morais SM. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante, Antiacetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo). *Rev Virtual Quim*. 2018;10(1):21-36.
72. Taylor MD, Smith III AB, Furst GT, et al. 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.

73. Falodun A, et al. A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Natural Product Communications*. 2012;7(2):151–2.
74. Falodun A, Sheng-Xiang Q, Parkinson G, Gibbons S. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012b;45(10):636-9.
75. Asep S, Hening H, Gema SP, Gigih S, Widya MC, Sahhidin S. Anticancer activity of Jatrophone an isolated compound from *Jatropha gossypifolia* plant against hepatocellular cancer cell hep G2 1886. . *Biomed Pharmacol J*. 2017;10(2):667-73.
76. Ogonna et al. Biological Activities of a Macrocyclic Diterpenoid (Jatrophone) Isolated from the Roots of *Jatropha gossypifolia* *J Afr Ass Physiol Sci*. 2017;5(2).
77. Adolf W, Opferkuch HJ, Hecker E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*. 1984;23(1):129-32.
78. Panda BB, Gaur K, Kori ML, Tyagi LK, Nema RK, Sharma CS, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* in experimental animal models. *Glob J Pharmacol*. 2009;3(1):1-5.
79. Apu AS, Ireen K, Hossan Bhuyan S, et al. Evaluation of analgesic, neuropharmacological and anti-diarrheal potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.) leaves in mice. *Journal of Medical Sciences*. 2012;12(8):274-9.
80. Nagaharika Y, Kalyani V, Rasheed S, Karthikeyan R. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*. 2013;2(2):156-8.
81. M.Gbeassor, Y. Kossou, K.Amegbo, C. De Souza, K.Koumaglo, and A. Denke, "Antimalarial effects of eight African medicinal plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 25, no. 1, pp. 115–118, 1989.
82. MacBae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of amazonian euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;22(2):143-72.
83. S. Jain GPC, and D. K. Jain,. 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.

84. Apu AS, Hossain F, Rizwan F, et al. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2013;4(1):20-4.
85. MARIZ, S.R. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. *Rev. bras. farmacogn.*, v.22, n.3, Maio/Junho de 2012.
86. Siriarcharungroj S, Chuaysuwan V, Sudthonghong C, Bullangpoti V. Investigation of acute toxicity of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) and *Cleome viscosa* L. (Capparidaceae) extract on guppies, *Poecilia reticulata*. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2008;73(4):871-4.
87. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov*. 2008;3(6).
88. 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.
89. Hall M, Gruber M, Hannah R, et al. Stabilization of firefly luciferase using directed evolution. In: Roda A, Pazzagli M, Kricka L, et al, editors. *Bioluminescence and chemiluminescence – perspectives for the 21st century*. UK: John Wiley & Sons: Chichester; 1998. p. 392-5.
90. Whitehead T, Kricka L, Carter T, et al. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 1979;25:1531-46.
91. Ochamendi ED. Droga cruda. Métodos de ensayo. Normas Ramales de Salud Pública # 309. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1992.
92. Miranda MM, Cuellar A. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. La Habana, Cuba: Ed Universidad de la Habana; 2000.
93. Pękal A, Pyszynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(1776-82).
94. Bringmann G, Thomale K, Bischof S, Schneider C, Schultheis M, Schwarz T, et al. A Novel *Leishmania major* Amastigote Assay in 96-Well Format for Rapid Drug Screening and Its Use for Discovery and Evaluation of a New Class of

Leishmanicidal Quinolinium Salts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(7): 3003–11.

95. Rolón M, Vega M, Escario J, Gómez A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology* 2006;99:103-7.

96. Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. : Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia.; 2009.

97. Coba Sánchez M. Formulación de una crema antiacné a partir de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2017.

98. Malpani D, Sarda B. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of *Jatropha gossypifolia* L. *International Journal of Reseach in Ayurveda and Pharmacy*. 2010;2.

99. Ahirrao R, Patel M, Pokal D, Patil J. Phitochemical screening of leaves of *Jatropha curcas* plant. *International Journal of Reseach in Ayurveda and Pharmacy*. 2011;4:1324-7.

100. Raymond S, Jewett J. *Physics for scientists and engineers* (6th ed.). Belmont CA: Thomson-Brooks/Cole.; 2003.

101. Dhale DA, Birari AR. Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* Linn. *Recent Research in Science and Technology*. 2010;2(7):24-8.

102. Cesar Pilon A, Carnevale Neto F, Teixeira Freire R, Cardoso P, Lajarim Carneiro R, Silva Bolzani VD, et al. Partial least squares model and design of experiments toward the analysis of the metabolome of *Jatropha gossypifolia* leaves: Extraction and chromatographic fingerprint optimization. *JSSCCJ*. 2016;39(6):1017-212.

103. Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules* 2014;19:16240-65.

104. Chowdhury A, Mannan M, Khan M, Rahman F. Antibacterial activity of *Pergularia daemia*. . *Bangladesh J Life Sci*. 1997;8(71).

105. Devappa RK, Makkar HP, Becker K. *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc* 2011;88(3):301–22.
106. Rofida S. Antioxidant activity of *Jatropha curcas* and *Jatropha gossypifolia* by DPPH method. *Farmasains*. 2015;2(6).
107. Zhang CY, Zhang LJ, Lu ZC, Ma CY, Ye Y, Rahman K, et al. Antitumor activity of diterpenoids from *Jatropha gossypifolia*: cell cycle arrest and apoptosis-inducing activity in RKO colon cancer cells. *J Nat Prod* 2018;81(8):1701-10.
108. Olawale KS, Ugwueze TK. Phytochemical content and Anti-microbial Activity of Polar solvents leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. *Journal of Medical and Biological Science Research*. 2018;4(4):101-6.
109. Kesumasari NM, Napitupulu M, Rama Jura M. Analisis kadar flavonoid pada Batang Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.), Jarak Merah (*Jatropha gossypifolia* L.), Dan Jarak Keyar (*Ricinus communis* L.). *J Akademika Kim*. 2018;7(1):28-31.
110. Getti G, Durgadoss P, Dominguez-Carmona D, Martín-Quintal Z, Peraza-Sanchez S, Peña-Rodríguez LM, et al. Leishmanicidal Activity of Yucatecan Medicinal Plants on *Leishmania* Species Responsible for Cutaneous Leishmaniasis. *J Parasitol*. 2009;95(2):456-60.
111. Sarker Apu A, Hossan Bhuyan S, Khatun F, Sultana Liza M, Matin M, Hossain MF. Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. *IJPSR*. 2013;4(3):1125-30.
112. Almeida PM. Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética: Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
113. Nwaka S, Ramirez B, Brun R, Maes L, Douglas F, et al. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases—Criteria for Lead Progression. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(8).
114. Almeida PM, Araújo SS, Santos IRMR, Marin-Morales MA, Benko-Iseppon AM, Santos AV, et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. . *Genet Mol Res*. 2016;15(1): (gmr.15017415).
115. Xavier-Santos JB, Félix-Silva J, Passos JGR, Gomes JAS, Fernandes JM, Barreto Garcia V, et al. Development of an effective and safe topical anti-

inflammatory gel containing *Jatropha gossypifolia* leaf extract: results from a pre-clinical trial in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018.