



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

Facultad de Química-Farmacia

Tesis para optar por el título de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

**Evaluación toxicológica y farmacológica del
extracto hidroalcohólico de
Jatropha gossypifolia L.**

Autor: Barbara Danay Rivero González.

Tutor: MSc. William Ortiz Fernández.

Santa Clara.

2014

Exergo



"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad."

Albert Einstein

Dedicatoria



A mi hermano que me acompaña y a la princesa que albergo en mi vientre materno.

Agradecimientos



Ante todo a mi madre por inculcarme los valores que poseo como ser humano y por demostrarme con su tenacidad y perseverancia, que a pesar de las adversidades de la vida debo darme por vencida.

A mi esposo por estar siempre presto a socorrerme en todo lo que a su alcance ha estado y además regalarme la posibilidad; Dios mediante; de convertirme en mamá.

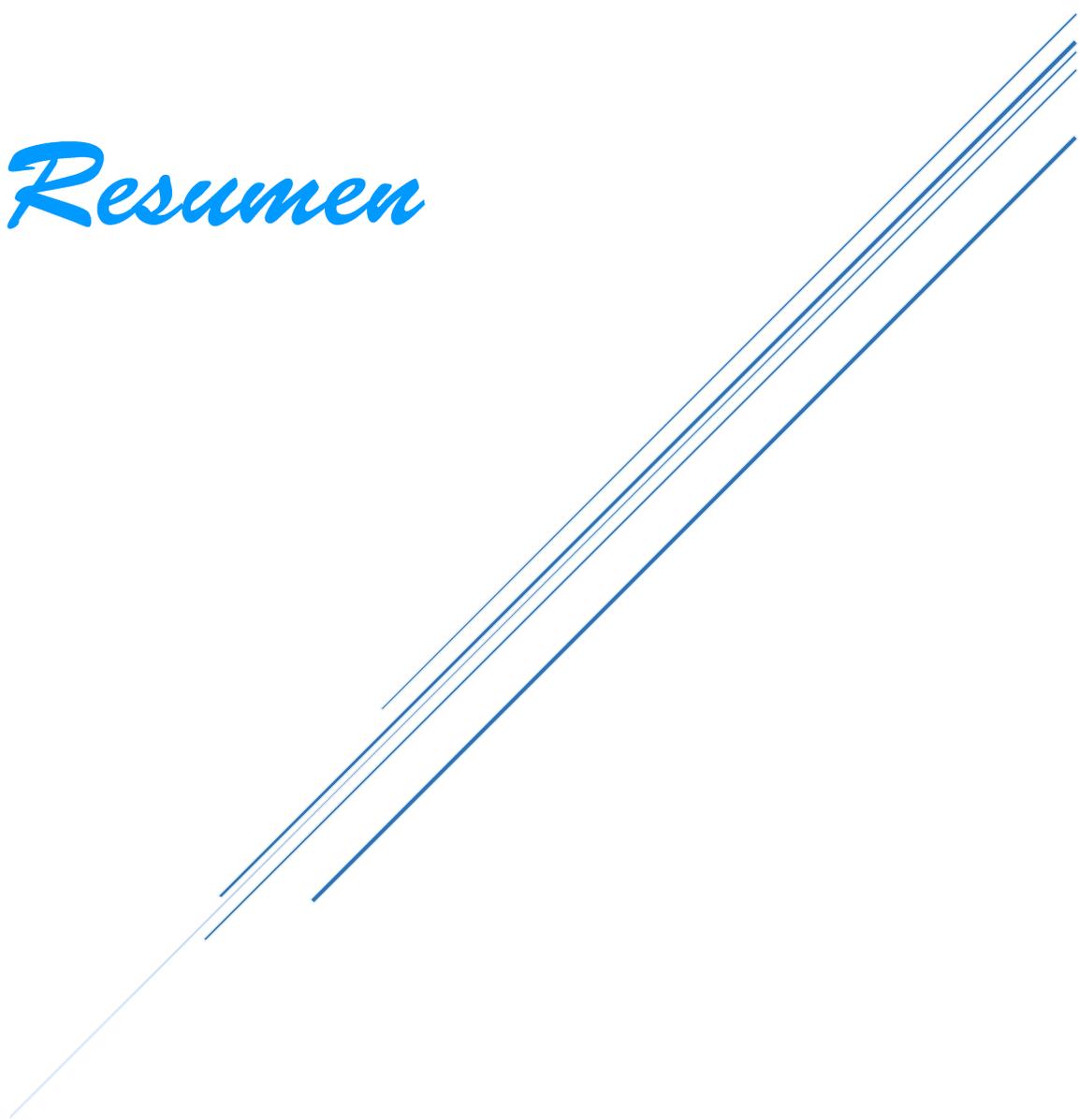
A mi familia materna, que unidos por la fuerza de la sangre, siempre hemos estado ahí los unos para los otros.

A la familia de mi esposo y amistades que han estado siempre presente en aras de mis necesidades.

A todos los profesores, técnicos y compañeros de estudio, que se han visto en muchas oportunidades obligados a interrumpir sus actividades, para acudir a mi llamado y auxiliarme en todo lo necesitado, incondicionalmente.

"A todos mil gracias".

Resumen





Resumen.

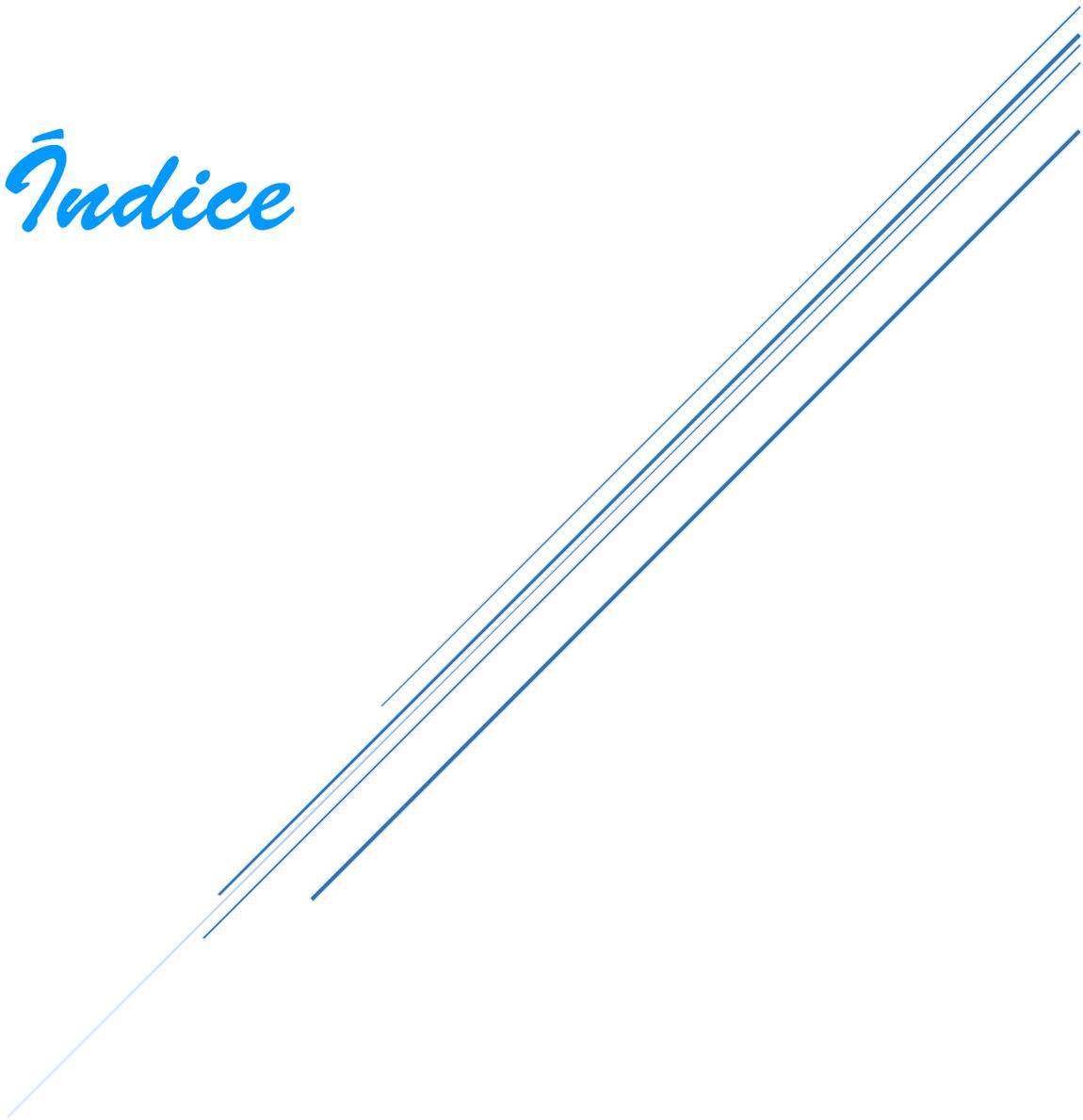
Se realizó un estudio experimental preclínico en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas con el objetivo de evaluar, desde el punto de vista toxicológico y farmacológico, el extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L., especie que en nuestro país carece de estudios científicos que justifiquen sus aplicaciones terapéuticas. Se efectuó la evaluación fitoquímica de las hojas de la planta determinándose la presencia de saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, triterpenos, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores y quinonas. La evaluación toxicológica se hizo de acuerdo al protocolo (Clasificación Toxicológica Aguda (CTA) o método de las Clases; administrando una dosis única de 2000 mg/kg y 300 mg/kg de masa corporal, en ratas Wistar, clasificándose el extracto como moderadamente tóxico. La actividad antibacteriana se determinó mediante los métodos de: difusión en agar, observándose la inhibición del extracto frente a *Staphylococcus aureus* y mediante dilución en agar, donde fue obtenida una concentración inhibitoria mínima de 2 mg/mL. La actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico se llevó a cabo a través de la técnica del edema auricular inducido por 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol en ratones Balb/c, mostrando efecto antiinflamatorio agudo *in vivo*, por vía tópica.



Abstract.

A preclinical experimental study in the Central "Marta Abreu" of Las Villas University in order to evaluate, from the pharmacological and toxicological point of view, the hydroalcoholic extract of *Jatropha gossypifolia* L., a species that in our country no studies scientists to justify their therapeutic applications. Phytochemical evaluation leaves saponins detected the presence plant alkaloids, phenols, flavonoids, triterpenes, free amino acids, coumarins, reducing sugars and quinones was carried out. The toxicological evaluation was done according to the protocol (Toxicity Classification Acute (CTA) or Class method, administering an only dose 2000 mg/kg and 300 mg/kg body mass in Wistar rats, with qualifying the statement as moderately toxic. Antibacterial activity was determined by the methods: agar diffusion extract observed inhibition against *Staphylococcus aureus* and by agar dilution, where was obtained one minimum inhibitory concentration of 2 mg/mL. Antiinflammatory activity inhibitory concentration of the hydroalcoholic extract was out through the technique of auricular edema induced by 13-ethyl-o-tetradecanoylphorbol 12 in Balb/c mice showing acute antiinflammatory effect *in vivo*, topically.

Índice





Índice.

Introducción.....	1
I. Revisión Bibliográfica.....	5
I.1 Generalidades de las Plantas Medicinales.....	5
I.1.2 Fitoterapia.....	6
I.1.3 Formas de las plantas medicinales.....	7
I.1.4 Efectos de las plantas medicinales.....	8
I.1.5 Principales argumentos a favor de las plantas medicinales:.....	8
I.2 Aspectos monográficos de la <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	9
I.2.1 Identificación taxonómica.....	9
I.2.2 Descripción botánica.....	9
I.2.3 Hábitat y distribución.....	10
I.2.4 Usos tradicionales.....	10
I.2.5 Toxina.....	11
I.2.6 Propiedades farmacológicas.....	12
I.2.7 Estudios fitoquímicos.....	12
I.3 Fitoquímica.....	13
I.3.1 Técnicas generales a aplicar en un análisis fitoquímico.....	14
I.4 Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana.....	14
I.4.1 Métodos de difusión.....	14
I.4.2 Métodos de dilución.....	16
I.4.3 Bioautografía:.....	17
I.5 Técnicas para evaluar la actividad antiinflamatoria.....	17
I.5.1 Técnicas generales.....	17
I.5.2 Técnicas específicas.....	18
I.6 Infección.....	19
I.6.1 Fases de un proceso infeccioso.....	20



I.6.2 Síntomas y signos habituales que pueden observarse cuando se desarrolla una infección.....	20
I.7 Inflamación.....	21
I.7.1 Concepto.....	21
I.7.2 Agentes inflamatorios.....	21
I.7.3 Síntomas.....	22
1.7.4 Fases de la inflamación.....	22
I.7.5 Mediadores químicos de la inflamación.....	23
I.7.6 Tipos de inflamación.....	24
II. Materiales y Métodos.....	27
II.1 Tipo de estudio.....	27
II.2 Equipos, materiales, reactivos y/o medicamentos empleados.....	27
II.3 Procedimiento y diseño experimental.....	28
II.3.1 Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar.....	28
II.3.1.1 Recolección, secado y molinado del material vegetal.....	28
II.3.1.2 Obtención del extracto.....	28
II.3.1.2.1 Procedimiento de cuantificación de la concentración del extracto vegetal.....	29
II.3.1.3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico.....	30
II.3.2 Evaluación de la toxicidad aguda.....	30
II.3.2.1 Análisis estadístico.....	31
II.3.3 Evaluación farmacológica.....	32
II.3.3.1 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	32
II.3.3.1.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar:.....	32



II.3.3.1.1.1 Microorganismo de ensayo.	32
II.3.3.1.1.2 Medios de cultivos.....	32
II.3.3.1.1.3 Preparación del Inóculo.	33
II.3.3.1.1.4 Preparación de las placas para la prueba de sensibilidad. .	33
II.3.3.1.1.5 Procedimiento.	33
II.3.3.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima mediante el Método Dilución en Agar.....	33
II.3.3.1.2.1 Microorganismo de ensayo.	33
II.3.3.1.2.2 Antibacteriano de referencia.	34
II.3.3.1.2.3 Muestra a evaluar: Extracto de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	34
II.3.3.1.2.4 Medios de cultivo.	34
II.3.3.1.2.5 Preparación del Inóculo.	35
II.3.3.1.2.6 Procedimiento.	35
II.3.3.1.3 Control de la calidad.....	36
II.3.3.2 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria aguda del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	36
II.3.3.2.1 Técnica del Edema auricular.....	36
II.3.3.2.1.1 Modelo biológico.	36
II.3.3.2.1.2 Condiciones experimentales.	36
II.3.3.2.1.3 Procedimiento experimental.....	37
II.3.3.2.1.4 Consideraciones éticas.	38
II.3.3.2.1.5 Análisis estadístico.....	38
III. Resultados y Discusión.	40
III.1 Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar.	40
III.1.1 Recolección.	40
III.1.2 Secado y molinado.	40
III.1.3 Obtención del extracto.	40
III.1.4 Evaluación fitoquímica de extracto.	40
III.1.4.1 Tamizaje fitoquímico.....	41



III.2 Estudio de Toxicidad Aguda.	42
III.3 Evaluación farmacológica.	47
III.3.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	47
II.3.1.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar.....	47
III.3.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima mediante el Método Dilución en Agar.....	48
III.3.2 Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria aguda del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. por la técnica de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.....	50
Conclusiones.....	53
Recomendaciones.....	55
Referencias Bibliográficas.....	57
Anexos.	61

Introducción





Introducción.

El uso por el hombre de plantas con fines curativos es tan remoto como su propio surgimiento, por ello es que hoy en día existe un amplio conocimiento de las mismas en todas las regiones del planeta.

Cuba no ha sido excepción, pues se conoce que nuestros antepasados usaban diferentes plantas tropicales con estos fines, seguidamente los africanos, haitianos, jamaquinos, chinos, gallegos...(Ruiz, 2012b).

En el empeño por obtener cada vez más y mejor provecho de las bondades que nos brinda la naturaleza a lo largo de la historia se han realizado muchas investigaciones en este perfil, por lo que podemos decir que hoy en día son muy sólidos los conocimientos e informaciones recopiladas y actualizadas relacionadas con esta temática, lo que ha posibilitado el desarrollo en el mundo de las industrias cosméticas y cosmeceúticas(Ruiz, 2012b).

Son muchos los múltiples metabolitos presentes en las plantas medicinales: flavonoides, coumarinas, triterpenos, mucílago, entre otros que ocupan un lugar muy importante, siendo la ingestión moderada de los extractos ricos en estos componentes, la fuente fundamental para adquirir estos metabolitos; responsable de un sin número de reacciones bioquímicas a nivel celular y en otros mecanismos tales como antibacterianos, cicatrizante, antifúngico, etc. (Ugaz, 1994).

La *Jatropha gossypifolia* L. forma parte del amplio arsenal de plantas ricas en dichos metabolitos anteriormente mencionados. La misma perteneciente a la Familia: *Euphorbiaceae* la cual se conoce comúnmente como Tuatúa; crece a la orilla de los caminos, en terrenos yermos y cultivados, calcáreos, principalmente de poca o mediana elevación. Originaria de América tropical, pero ahora se cultiva ampliamente en los países tropicales de todo el mundo. Entre los metabolitos más abundante reportados para la planta se destacan: esteroides, saponinas, flavonoides, triterpenoides, taninos, quinonas, azúcares reductores, coumarinas (Gaskin, 1994).



INTRODUCCIÓN

La mayoría de estos componentes químicos pueden ser responsables de muchas actividades farmacológicas reportadas sobre la Tuatúa, por ejemplo: Los glucósidos, flavonoides, taninos tienen actividades de hipoglucemia. Las saponinas poseen propiedades hipocolesterolemiantes y antidiabéticos. Los terpenoides también se ha demostrado que reducen el nivel de azúcar en la sangre, en los estudios en animales. Los esteroides y triterpenoides mostraron las propiedades analgésicas. Los esteroides y saponinas son responsables para las actividades del sistema nervioso central. La presencia de flavonoides y taninos en las hojas es probable que sea responsable de la actividad de captación de radicales libres. 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, antiinflamatorio, antimicrobiana y la actividad contra el cáncer. Los esteroides poseen efectos antiinflamatorios (Sarin, 2010).

Los estudios toxicológicos y farmacológicos de corte experimental constituyen un paso de la ruta crítica por la que necesita transitar un nuevo producto para su establecimiento como tal, sobre bases científicamente sustentadas que aporten los criterios de seguridad, consumo y disposición de dicho producto. La información derivada de estos estudios posibilitará la estimación preliminar del riesgo para la salud animal o humana, permitiendo también el tránsito a estudios a más largo plazo y de tipo especial que completarían el perfil toxicológico de este producto (Repetto, 2012).

Partiendo de los estudios reportados, la composición química y las múltiples propiedades atribuidas, se pretende iniciar el desarrollo de una formulación con propiedades para el acné a partir del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.; constituyendo los estudios microbiológicos, farmacológicos y toxicológicos los estudios preliminares de este trabajo, lo que justifica la evaluación de la seguridad de este preparado para ser utilizado como un futuro cosmecéutico (Sarin, 2010).



Por tanto para esta investigación se propone como **Problema Científico:**

Las acciones atribuidas a las partes aéreas (hojas) de la especie cubana *Jatropha gossypifolia* L. y la estimación de su toxicidad, no han sido comprobadas experimentalmente, no se poseen estudios que lo reporten, por lo que comprobar ello resultaría importante para avalar científicamente este uso tradicional en el país.

Por ello, y en aras de contribuir con el desarrollo de productos cosmeceúticos en Cuba, este trabajo científico parte de la siguiente **Hipótesis:**

Con la realización de estudios experimentales que permitan comprobar las acciones y el potencial tóxico de la *Jatropha gossypifolia* L., se fundamentará el uso como antiinflamatorio, antibacteriano y la no toxicidad que se le atribuye de forma tradicional a la misma.

Proponiéndose con la realización del presente estudio los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar, desde el punto de vista farmacológico y toxicológico, el extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.

Objetivos Específicos:

1. Analizar cualitativamente la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.
2. Determinar el potencial tóxico agudo del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.
3. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.
4. Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.

*Revisión
Bibliográfica*





I. Revisión Bibliográfica.

I.1 Generalidades de las Plantas Medicinales.

Planta Medicinal es aquella que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias o compuestos químicos que al entrar en contacto con el organismo humano es capaz de actuar sobre determinado proceso, produciendo un efecto terapéutico, o bien servir como materia prima en la producción de medicamento (Ruiz, 2012b).

El hombre desde su surgimiento fue creando las condiciones necesarias para vivir mejor, atenuar enfermedades y mejorar su calidad de vida. Pero no es en este siglo donde se utiliza por primera vez las plantas medicinales con el fin de curar, esta práctica data desde tiempos ancestrales (Navarro, 2002).

Nadie sabe exactamente donde se utilizaron las plantas medicinales por primera ocasión, seguramente la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en varias culturas a la vez, fruto del deseo de los hombres de sanar, ya sea por cuestiones religiosas o de algún preparado que le proporcionara una mayor felicidad temporal (Granda, 1997).

La mayoría de los descubrimientos fueron simplemente el resultado de la necesidad de encontrar nuevos alimentos. Los antepasados tenían que comprobar si las nuevas especies podían ingerirse, lo que conllevaba a que descubrieran con su propio cuerpo que muchas eran comestibles, otras eran tóxicas y algunas producían efectos diferentes (Granda, 1997).

Los conocimientos sobre las plantas medicinales antes de la escritura, se realizaban oralmente. Se sabe que el primer texto escrito sobre el uso de las plantas medicinales tiene unos 4000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los sumerios, un antiguo pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris, lo que equivaldría al actual Iraq (Granda, 1997).



El tratamiento de las enfermedades, tanto en el mundo antiguo como en el medieval es basado en el herbario o libros con descripciones de plantas medicinales. El primer herbario griego fue el de Diocles de Karisto y luego apareció la obra de Dioscórides que fue el que más influenció y fueron innumerables las traducciones, los comentarios y las ampliaciones a sus escritos. Este contemplaba que las plantas se recogían ciertos días señalados y se acompañaban de oraciones, lo cual relacionaba esta actividad con la magia (Pertierra, 2007).

En la actualidad los conocimientos sobre el uso de las plantas medicinales se extienden por todo el mundo dado la necesidad del hombre de curar sus enfermedades. Desde hace algunos años, tanto los países altamente desarrollados como aquellos del tercer mundo con escasos recursos económicos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina. Cuba, con clima tropical de una abundante flora en más de 70 % endémica, se ha sumado a este movimiento mundial del uso y aprovechamiento de la medicina verde (Hernández, 2002).

En la década de los noventa, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) determinaron que aproximadamente el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional con el objeto de solventar sus dificultades en el orden clínico la cual se basa fundamentalmente en el uso de plantas medicinales (Rojas, 2012).

I.1.2 Fitoterapia.

La prolongada tradición de uso de productos de origen vegetal en medicina y la reacción contemporánea contra los fármacos sintéticos han llevado a un resurgimiento del herbalismo, a veces denominado Fitoterapia (Vila., 2000).

La Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los extractos o preparados a partir de productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para



prevenir, atenuar o para curar un estado patológico, por ende, es el tratamiento de enfermedades con extractos de plantas medicinales (Vila., 2000).

La Fitoterapia tiene su origen 3000 años antes de C. Desde esta época, la Fitoterapia no ha dejado de progresar, ocupando actualmente y gracias a los enormes avances de la ciencia, el lugar que se merece dentro del marco de la salud (Güenechea, 1998).

Como consecuencia de ello, en el momento actual se puede disponer de fitofármacos eficaces y fiables, de los que se conocen tanto sus principios activos, como sus mecanismos de actuación, efectos secundarios, etc.(Güenechea, 1998).

Su extraordinario desarrollo mundial no es fruto ni del azar ni de la moda, sino que se debe al alto nivel de conocimiento que, mediante estudios científicos, han demostrado las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales. Este hecho unido a un importante desarrollo galénico, y fórmulas cada vez más eficaces y perfectamente adaptadas a uno u otro tipo de afección, hacen de la Fitoterapia un tratamiento más dentro del arsenal de medicamentos clásicos (Güenechea, 1998).

I.1.3 Formas de las plantas medicinales.

Las formas en las que se pueden encontrar las plantas medicinales en las farmacias son muy distintas, y se adaptan, como en el resto de los medicamentos a la naturaleza del producto, y a las necesidades de administración del mismo.

Así encontramos:

- Infusiones.
- Cápsulas de polvo.
- Cápsulas de polvo criomolido.
- Cápsulas de extractos.
- Extractos hidroalcohólicos bebibles.
- Comprimidos.
- Geles, pomadas, etc.



Estas formas farmacéuticas han hecho que la Fitoterapia se adapte perfectamente a nuestros tiempos. Las diferencias entre ellas, están perfectamente justificadas en la documentación de registro que se presenta en el Ministerio de Sanidad y, por consiguiente, cada una de ellas al tener su autorización, ha demostrado su eficacia (Granda, 1997).

I.1.4 Efectos de las plantas medicinales.

Las plantas medicinales son muy utilizadas por sus efectos, entre los que podemos mencionar:(Rivera, 2010).

- **Astringentes** son una categoría de plantas que detienen el flujo de sangre y otros fluidos.
- **Alcalinizadoras**, para mejorar los niveles de pH en el cuerpo, mientras que los acidificantes hacen lo contrario.
- **Tónicas** son aquellos que pueden reponer su fuerza y refrescar su cuerpo y mente.
- **Diuréticas** se utilizan para inducir la secreción, principalmente la micción.
- **Diaforéticas** son como los diuréticos, pero en cuanto a la sudoración.
- **Laxantes** son algunas de las más famosas de todas ya que son utilizadas para promover el movimiento intestinal, como remedio al estreñimiento.
- **Nerviosas** que afectan al sistema nervioso, ya sea para excitar o relajar los nervios.

I.1.5 Principales argumentos a favor de las plantas medicinales:

- **Un gran abanico de futuras medicinas por descubrir:** existen aproximadamente medio millón de plantas con flores, la mayoría de las cuales no ha sido investigada y cuyos principios podrían ser decisivos en la curación de enfermedades actuales o venideras.
- **Medicina sinérgica:** los componentes de las plantas tienen un efecto sinérgico, es decir interactúan todos a la vez, de manera que unos usos



pueden complementar o potenciar a otros o neutralizar sus posibles efectos negativos.

- **Apoyo de la medicina oficial:** el tratamiento de enfermedades muy complejas puede requerir en algunos casos el apoyo de las propiedades medicinales de las plantas o de los derivados que ellas nos proporcionan.
- **Medicina preventiva:** no debemos olvidar el carácter preventivo que las plantas tienen con respecto a la aparición de enfermedades. Se ha comprobado como la ingestión de alimentos naturales puede prevenir muchas patologías.

Tener conocimiento sobre la utilización de las plantas medicinales para nuestra salud es bastante importante, debido al fácil acceso y bajo costo que ellas tienen. Sin embargo la utilización de las plantas medicinales se debe llevar a cabo con mucha responsabilidad, siguiendo las indicaciones adecuadas y de forma correcta, ya que al igual que los medicamentos pueden perjudicarnos si los tomamos en las dosis no recomendadas (Ruiz, 2012a).

I.2 Aspectos monográficos de la *Jatropha gossypifolia* L.

I.2.1 Identificación taxonómica.

Reino: *Plantae*.

Subreino: *Tracheobionta*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: *Rosidae*.

Orden: *Geraniales*.

Familia: *Euphorbiaceae*.

Nombre científico: *Jatropha gossypifolia* L.

Nombre común: Tuatúa.

Otros nombres comunes: Frailecillo, frailecito, San Juan del Cobre (Torsti., 2008).

I.2.2 Descripción botánica.

La *Jatropha gossypifolia* L. es una planta herbácea de 1 a 2 m de altura, a veces algo leñoso. Hojas de 7 a 15 cm, acorazonadas en la base, de color verde oscuro,



alternas, simples, ovadas a ligeramente lobulado con 3-5 indentaciones, hasta 15 cm de ancho y pecíolos 10cm (4 pulgadas) de largo. Los tallos de las hojas están cubiertos con gruesos pelos de color marrón oscuro y las hojas son pegajosas. Las flores son pequeñas, amarillo a verde en color, transmitidas en las axilas de las hojas y al ser pequeñas se esconden en su mayoría por el follaje, pétalos 5, purpúreos. Cápsula de 1 cm, con tres surcos. Las frutas son pequeñas, con forma de cápsula, fruto redondo, alrededor de 2,5 - 4 cm (1-1,5 pulgadas) de diámetro. Estos son de color verde y carnosos cuando son inmaduros, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura y la división para liberar 2 o 3 semillas de color negro cada uno de aproximadamente 2 cm (3/4 pulgadas) de largo. La carne de las semillas es blanca y grasosa en la textura y se reporta tener un sabor agradable (Mesa., 1988, Gaskin, 1994).

I.2.3 Hábitat y distribución.

Crece a la orilla de los caminos, en terrenos yermos y cultivados, calcáreos, principalmente de poca o mediana elevación. Originaria de América tropical, pero ahora se cultiva ampliamente en los países tropicales de todo el mundo. Se observa en las Antillas Mayores y en muchas de las Menores, y en las Bahamas. Se cultiva ocasionalmente en las zonas más cálidas de Australia y está naturalizada en algunos lugares en Queensland y el Territorio del Norte. En Florida se encuentra principalmente al sur de Orlando. También es una planta común en las islas hawaianas. Introducido en el sur de África, la planta se ha extendido desde Mozambique a través de Zambia al Transvaal y Natal. Esta especie también se encuentra a través de las partes más calientes de Asia (Gaskin, 1994).

I.2.4 Usos tradicionales.

La Tuatúa es ampliamente cultivada como planta ornamental, se encuentra en los jardines y las zonas comunes, por lo que es de fácil acceso. Las raíces, tallos, hojas, semillas y frutos de la planta han sido ampliamente utilizados en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas en muchos países, ejemplo:



- En Filipinas, el cataplasma de las hojas frescas se aplica a los pechos hinchados como antiinflamatorio.
- En Venezuela, las raíces se utilizan en la lepra y la decocción de las hojas se utilizan como purgante y estomacal. El látex es utilizado para las úlceras.
- En las Antillas, las hojas se usan como febrífugo para las fiebres intermitentes. La decocción de la corteza se utiliza como emenagogo. El jugo es utilizado para llagas en la lengua de los bebés.
- En la Costa de Oro, se utilizan los tallos gruesos porque producen una sustancia amarillenta-marrón que se coloca en un paño limpio y se aprietan las fosas nasales, haciendo que el paciente estornude y curar el dolor de cabeza.
- En Nigeria, el tubérculo de la planta es molido en una pasta y se utiliza de forma local en el tratamiento de las hemorroides (Jamaluddin., 2010).

I.2.5 Toxina.

La principal toxina de la *Jatropha gossypifolia* L. es la Curcina, una fitotoxina que se encuentra principalmente en las semillas y también en la fruta. El aceite de estas semillas se conoce como aceite infierno , aceite pinheon , infernale óleo o óleum majoris ricini , que contiene pequeñas cantidades de un ácido curcanoleico irritante , que está relacionado con el ácido ricinoleico y ácido crotonoleico, ingredientes activos del aceite de ricino y aceite de crotón respectivamente (Jamaluddin., 2010, Fondeur, 1992).

Los síntomas más frecuentes ante la ingesta de las semillas de Tuatúa son principalmente aquellos asociados con irritación gastrointestinal. Hay dolor abdominal agudo y una sensación de quemadura en la garganta una media hora después de la ingestión, seguido de náuseas, vómitos y diarrea. El vómito y las heces pueden contener sangre. En severas intoxicaciones puede ocurrir deshidratación y gastroenteritis hemorrágica. Puede haber depresión en el



Sistema Nervioso Central y colapso cardiovascular, los niños son más susceptibles (Jamaluddin., 2010, Fondeur, 1992).

I.2.6 Propiedades farmacológicas.

Varios estudios han demostrado que la Tuatúa, es una planta con propiedades hemostática, procoagulante, insecticida, antidiarreico y que preparados hidroalcohólicos de la misma son analgésicos, antiinflamatorios y antibacterianos(Jamaluddin., 2010).

I.2.7 Estudios fitoquímicos.

Estudios realizados a las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. demuestran que esta posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como:

- Terpenoides.
- Esteroides.
- Saponinas.
- Flavonoides.
- Triterpenoides.
- Taninos.
- Los glucósidos cardíacos.
- Azúcares reductores.
- Proteínas.

La mayoría de estos componentes químicos pueden ser responsable de muchas actividades farmacológicas reportadas sobre la Tuatúa, por ejemplo:

Los glucósidos, flavonoides, taninos tienen actividades de hipoglucemia. Las saponinas poseen propiedades hipocolesterolemiantes y antidiabéticos. Los terpenoides también se ha demostrado que reducen el nivel de azúcar en la sangre, en los estudios en animales. Los esteroides y triterpenoides mostraron las propiedades analgésicas. Los esteroides y saponinas son responsables para las actividades del sistema nervioso central. La presencia de flavonoides y taninos en



las hojas es probable que sea responsable de la actividad de captación de radicales libres. 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, antiinflamatorio, antimicrobiana y la actividad contra el cáncer. Los esteroides poseen efectos antiinflamatorios (Sarin, 2010).

I.3 Fitoquímica.

La Fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales. Esta permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica, como es el caso de las plantas medicinales (Ugaz, 1994).

La Fitoquímica tiene una gran importancia para la determinación de los componentes activos de las plantas medicinales, su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana. Esta ciencia trata sobre los métodos de obtención de esos componentes activos, su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico a que pertenece y estudia los métodos analíticos para comprobar su calidad (Ugaz, 1994).

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados. Puesto que este último tipo de estudio requiere una inversión considerable de tiempo y recursos, lo ideal es iniciar con estudios fitoquímicos preliminares que permitan hacer una discriminación de las plantas a estudiar en términos de su composición química, con el fin de seleccionar únicamente aquellas más interesantes para posteriores estudios sistemáticos (Niño., 2009).



Estos estudios fitoquímicos preliminares persiguen evaluar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, coumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos (Niño., 2009).

I.3.1 Técnicas generales a aplicar en un análisis fitoquímico.

El análisis fitoquímico tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Evans, 1991).

I.4 Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana.

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Castaño., 2009).

I.4.1 Métodos de difusión.

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Castaño., 2009, López., 2004) .

El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Castaño., 2009, López., 2004).

La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa (uniones b-(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo (Castaño., 2009, López., 2004).

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas, luego se observa el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *In vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación. Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (Castaño., 2009, López., 2004).



I.4.2 Métodos de dilución.

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración inhibitoria mínima (CIM), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (CMBs) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Castaño., 2009, Tangarife., 2011).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM es determinada después de la incubación.(Castaño., 2009, Tangarife., 2011).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar.(Castaño., 2009, Tangarife., 2011).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CIM, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático.(Castaño., 2009, Tangarife., 2011).



I.4.3 Bioautografía:

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bio guiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada TLC (Castaño., 2009).

El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium. Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de TLC, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano (Castaño., 2009).

I.5 Técnicas para evaluar la actividad antiinflamatoria.

Se describen diversas técnicas que permiten evaluar la actividad antiinflamatoria, unas de carácter general y otras específicas, de igual manera se describen modelos para la evaluación del efecto antiinflamatorio agudo y subcrónico o crónico, destacando:(CYTED, 1995, VOGEL, 2002).

I.5.1 Técnicas generales.

a) Modelos de inflamación aguda.



- **Edema plantar:** Una hora después de la administración de la muestra, del grupo control negativo y del grupo control positivo se administra una solución de agente irritante (carragenina, dextrano, histamina, serotonina, etcétera) en la aponeurosis plantar derecha del ratón. El volumen de la pata inyectada es medido antes y después de la inyección del irritante cada un tiempo determinado (1 hora), en un pletismómetro de agua o por un pie de rey. El porcentaje de inhibición de la reacción inflamatoria se calcula en la fase aguda con los valores a cada tiempo y el valor inicial.
- **Edema auricular:** Se basa en la aplicación de 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA) en unión con el producto en estudio, en caso de que la solubilidad lo permita, en la oreja del ratón. Transcurrida 4 horas, los animales son sacrificados por dislocación cervical y se le corta una porción de la oreja inflamada e idénticamente otra de la oreja no inflamada. La media aritmética de las diferencias entre el peso de ambas porciones da la magnitud del edema de cada lote.

b) Modelo de inflamación subcrónica o crónica.

- **Granuloma inducido por discos de algodón:** El producto en estudio se administra 7 días consecutivos. Los animales se sacrifican al día siguiente a la última administración. Se extraen los granulomas formados, el timo y las glándulas suprarrenales. Se desecan los granulomas y se determina la diferencia de peso con respecto al disco de algodón implantado al comienzo del experimento.

I.5.2 Técnicas específicas.

a) Bolsa de aire en ratas.

- **Técnica de Edwards:** Consiste en la formación de una bolsa de aire en el dorso del animal, al cabo de 6 días de la inyección de un agente irritante; recogiendo posteriormente el exudado y realizando con él las pruebas de interés.



- **Técnica de Sedwick:** Los animales son anestesiados y rasurados en la zona dorsal y la nuca, procediendo a la inyección de aire en la misma. Al tercer día se inyectan nuevamente con aire. Al cuarto día se les inyecta carragenina y 6 horas después se sacrifican procediendo a la extracción del exudado inflamatorio.

b) Peritonitis inducida por carragenina.

Se comienza con la administración del producto en estudio. Después de 1 hora se les inyecta vía intraperitoneal carragenina como agente irritante y 5 horas más tarde se sacrifican los animales. Se les inyectan en la cavidad peritoneal PBS y después de un masaje se recogen los fluidos peritoneales y se procede a la determinación de los leucocitos presentes en una cámara de Neubauer.

c) Actividad ciclooxigenasa.

- **Actividad ciclooxigenasa y lipoxigenasa en leucocitos peritoneales de ratas:** Se basa en la estimulación de leucocitos peritoneales de ratas por ionóforo A23187, que determina la entrada de calcio a la célula, la activación de fosfolipasa A₂ y la producción y liberación de metabolitos del ácido araquidónico producido por ambas vías.
- **Actividad ciclooxigenasa en vesículas seminales:** Se emplea como sustrato ácido araquidónico radioactivo para separar después de los metabolitos formados y el sustrato sin reaccionar, por cromatografía en capa fina, y cuantificar los diferentes compuestos por centelleo líquido.

I.6 Infección.

Infección es el término clínico para la colonización de un organismo huésped por especies exteriores. En la utilización clínica del término infección, el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno (Delpiano., 2009).



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La evolución de una enfermedad infecciosa en un individuo implica una secuencia de interacciones entre el microorganismo y el huésped. Estos son la entrada del microorganismo, la invasión y colonización de los tejidos del huésped, la evasión de la inmunidad del huésped, y la lesión tisular o el deterioro funcional.

El sistema inmune es capaz de responder frente a estos patógenos, y en la mayoría de los casos, controlar el proceso infeccioso (Paul., 1998, Lichtman, 2009).

La interacción del sistema inmunitario con los microorganismos infecciosos es un intercambio dinámico entre los mecanismos del huésped dirigidos a la eliminación de la infección, y las estrategias de los microorganismos para sobrevivir en presencia de poderosos mecanismos efectores. Diferentes tipos de agentes infecciosos estimulan patrones diferentes de respuestas inmunitarias, y han desarrollado mecanismos únicos para evadir la inmunidad específica (Lichtman, 2009).

I.6.1 Fases de un proceso infeccioso.

- 1. PERIODO DE INCUBACION:** Entrada de gérmenes y aparición de síntomas.
- 2. PERIODO PRODRÓMICO:** Síntomas no específicos y síntomas específicos.
- 3. PERIODO DE ENFERMEDAD:** Evidencia de síntomas específicos (de la patología), síntomas sistémicos y síntomas locales.
- 4. PERIODO DE CONVALIDACION:** Remisión de los síntomas y recuperación normal. (Sellers, Paul., 1998)

I.6.2 Síntomas y signos habituales que pueden observarse cuando se desarrolla una infección (Sellers, Paul., 1998).

- Enrojecimiento
- Inflamación
- Formación de pus (en el área de una lesión o incisión)



- Tos
- Espujo
- Drenaje nasal (a causa de una infección respiratoria)
- Fiebre

I.7 Inflamación.

I.7.1 Concepto.

La inflamación es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica (Barreno., 2008).

La inflamación se denomina en medicina con el sufijo **-itis** (faringitis, laringitis, colitis, conjuntivitis...). El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos (Lichtman, 2009).

I.7.2 Agentes inflamatorios.

- **Agentes biológicos:** bacterias, virus, parásitos, hongos; las células de mamíferos disponen de receptores que captan la presencia de microbios; entre los receptores más importantes están los receptores de tipo Toll, que detectan la presencia de bacterias, virus y hongos, y desencadenan vías de señalización que estimulan la producción de diferentes mediadores;
- **Agentes o condiciones que producen necrosis de los tejidos afectados:** las células necróticas liberan moléculas que activan la respuesta inflamatoria, como ácido úrico, ADP o incluso ADN; entre estos agentes tenemos:
 - Agentes físicos: radiaciones, frío, calor, rayos UV.
 - Agentes químicos: venenos, toxinas.



- Traumatismos y cuerpos extraños, que inducen inflamación porque dañan los tejidos (necrosis) o aportan microbios.
- Alteraciones vasculares: como por ejemplo las que producen isquemia.
- **Alteraciones inmunitarias:** como por ejemplo las respuestas de hipersensibilidad o las autoinmunes; en estos casos es la propia respuesta inmunitaria la que induce la inflamación, que es la causa principal del daño tisular (Barreno., 2008).

I.7.3 Síntomas.

Actualmente se pueden reconocer sus 5 signos cardinales, que son (Barreno., 2008):

- **Tumefacción.** Aumento del líquido intersticial y formación de edema.
- **Rubor.** Enrojecimiento, debido principalmente a los fenómenos de aumento de presión por vasodilatación.
- **Calor.** Aumento de la temperatura de la zona inflamada. Se debe a la vasodilatación y al incremento del consumo local de oxígeno.
- **Dolor.** El dolor aparece como consecuencia de la liberación de sustancias capaces de provocar la activación de los nociceptores, tales como las prostaglandinas.
- **Pérdida o disminución de la función.**

1.7.4 Fases de la inflamación.

De forma esquemática podemos dividir la inflamación en cinco etapas (Raéz., 2003):

1. **Liberación de mediadores:** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
2. **Efecto de los mediadores:** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.



3. **Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio:** Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
4. **Regulación del proceso inflamatorio:** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
5. **Reparación:** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

I.7.5 Mediadores químicos de la inflamación.

Los mediadores se originan del plasma o de las células. La mayor parte de los mediadores realizan su actividad biológica uniéndose inicialmente a receptores específicos situados en las células diana (Raéz., 2003).

Un mediador químico puede estimular la liberación de mediadores por parte de las propias células diana. Los mediadores actúan sobre células o tejidos teniendo efectos diferentes sobre el sitio en el que actúan. Una vez activados y liberados de la célula, la mayoría de los mediadores dura muy poco tiempo. La mayor parte de los mediadores puede producir efectos perjudiciales (Raéz., 2003).

Nombraremos los mediadores químicos más importantes (Raéz., 2003):

- Aminas vasoactivas: Histamina y Serotonina.
- Proteasa plasmáticas: Los sistemas del complemento, LAs cinicas y los factores de la coagulación.
- Metabolitos del ácido araquidónico: Prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas.
- Factor activador de Plaquetas.
- Citosinas y quimosinas.
- Óxido nítrico.
- Constituyentes lisosomales de los leucocitos.



- Radicales libres del oxígeno.
- Neuropeptidos.

I.7.6 Tipos de inflamación.

- **Inflamación Aguda:** La fase aguda de la inflamación es sinónimo de reacción inmune innata. La evolución de la inflamación aguda va hacia la resolución completa, a la formación de un absceso, la curación (regeneración y cicatrización) o hacia la inflamación crónica (Lichtman, 2009).

Presenta tres componentes principales (Lichtman, 2009):

- Las modificaciones del calibre de los vasos, que dan lugar al aumento en el flujo de la sangre.
 - Las alteraciones en la estructura de la microvasculatura, que permite la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos.
 - La emigración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión en el que se acumulan.
- **Inflamación Crónica:** Cuando la inflamación se mantiene durante un tiempo prolongado (semanas o meses), se habla de inflamación crónica, en la que coexisten el daño tisular y los intentos de reparación, en diversas combinaciones. Puede producirse por mantenimiento de la inflamación aguda (si no se resuelve la causa), o bien empezar de manera progresiva y poco evidente, sin las manifestaciones de la inflamación aguda. Este segundo caso es el responsable del daño tisular de algunas de las enfermedades humanas más invalidantes, como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la tuberculosis o la fibrosis pulmonar. Además, es importante en el desarrollo del cáncer y en enfermedades que anteriormente se consideraban exclusivamente degenerativas, como el Alzheimer (Lichtman, 2009).



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Entre las causas de la inflamación crónica se pueden distinguir:(Lichtman, 2009)

- Infecciones persistentes.
- Enfermedades mediadas por el sistema inmune.
- Exposición prolongada a agentes tóxicos.

Mientras que la inflamación aguda se caracteriza por la aparición de cambios vasculares, edema e infiltración de neutrófilos, la inflamación crónica presenta las siguientes características distintivas (Barreno., 2008):

- infiltración con células mononucleares: macrófagos, linfocitos y células plasmáticas;
- destrucción de tejidos, debido a la persistencia del agente y/o de las células inflamatorias;
- intentos de reconstrucción, reemplazando el tejido dañado con tejido conectivo, con proliferación de vasos (angiogénesis) y, sobre todo, fibrosis.

Además de los infiltrados celulares, en la inflamación crónica es muy importante el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) y linfáticos, estimulado por factores de crecimiento, producidos por macrófagos y células endoteliales (Barreno., 2008).

Materiales y Métodos





II. Materiales y Métodos.

II.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 diciembre de 2013 y junio de 2014. La realización del estudio se llevó a cabo en tres etapas:

- 1º. Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar.
- 2º. Evaluación de la toxicidad aguda.
- 3º. Evaluación farmacológica.

II.2 Equipos, materiales, reactivos y/o medicamentos empleados.

Balanza analítica digital (Sartorius TE12000, Canadá), Plancha de calentamiento (Stuart SD 300, Ucrania), Baño de agua (Grant Sub14), Molino (IKA WERKE MF 10 basic, Alemania), Rotoevaporador (Büchi Rotovapor R-200, Alemania), equipo de reflujo (Grant Sub-14, Inglaterra), Autoclave (Hirayama HA-30D, Japón), Agitador magnético sin calor (Heidolph MR-80, Canadá).

Extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. (UCLV “Marta Abreu”, Santa Clara), Indometacina (SIGMA ALDRICH), Sulfato de Gentamicina (QUIMEFA), 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (SIGMA), Éter Dietílico (UNI-CHEM®), Acetona (SIGMA), Sonda intragástrica rígida 16 G, Micropipetas (5, 10, 20, 100 µL; EPPENDORF).

Hidróxido de sodio (UNI-CHEM), Reactivo de Sudan (UNI-CHEM), Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM), Cinta de magnesio metálica (Analar), Tricloruro de aluminio (MERCK), Etanol (UNI-CHEM), Ácido sulfúrico (UNI-CHEM), Ácido clorhídrico (UNI-CHEM), Anhídrido acético (UNI-CHEM), Reactivo de Felhing A y B (UNI-CHEM), Tricloruro férrico (Analar), Cloroformo (MERK).



Utensilios y cristalería de Laboratorio.

II.3 Procedimiento y diseño experimental.

II.3.1 Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar.

II.3.1.1 Recolección, secado y molinado del material vegetal.

Se realizó la recolección en los meses de octubre, noviembre y diciembre, entre los días 1 al 5 de cada mes en el poblado de San Fernando de camarones municipio Palmira, provincia de Cienfuegos, se trasladaron en bolsas de nylon hasta la UEB Glucosa Cienfuegos, donde se lavaron con abundante agua potable y se seleccionó las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. Previo al procesamiento del material, se efectuó la comprobación botánica de la especie por el MSc. Omar Cárdenas García, especialista en conservación de flora y fauna del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Posteriormente se procedió al secado de las hojas exponiéndolas al sol. Se extienden en capas delgadas las hojas sobre mantas, para evitar contaminaciones microbiológicas, el material se removió varias veces. Después de secado, el material se trituró en un molino utilizando un tamiz de 1mm.

II.3.1.2 Obtención del extracto.

Una vez que el material vegetal está seco y molinado, se procedió a la obtención del extracto, refluendo 50 gramos (g) con 500 mililitros (mL) de una solución hidroalcohólica al 70 por ciento (%) por 2 horas (h) a 98 grados Celsius (°C), posteriormente se filtró y se rotoevaporó hasta eliminar el solvente. El diagrama de flujo se refleja en la Figura1.

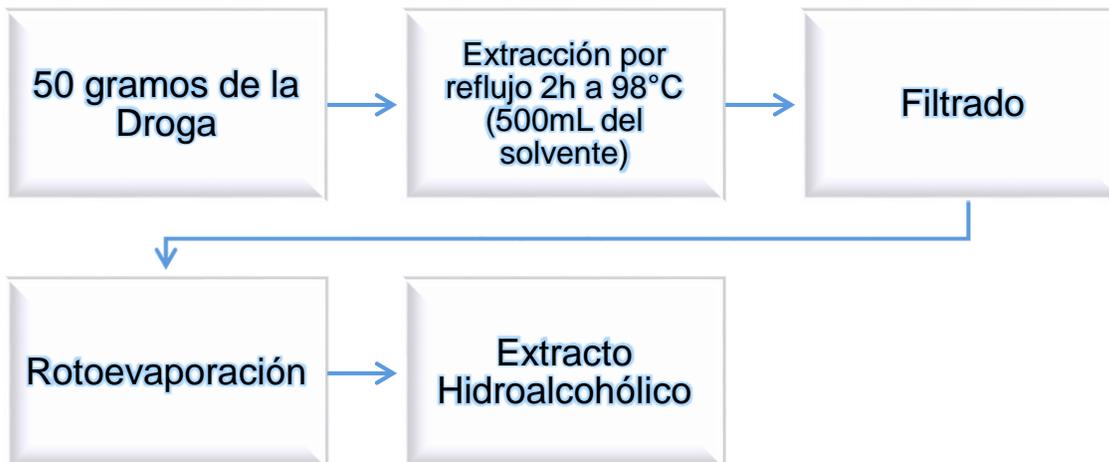


Figura1: Metodología de extracción.

II.3.1.2.1 Procedimiento de cuantificación de la concentración del extracto vegetal.

1. Tomar 3 crisoles de porcelana y pesarlos.
2. Añadir 5 mL del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.
3. Colocar en plancha de calentamiento hasta sequedad.
4. Poner en estufa a 105 °C por 2 horas.
5. Pesar nuevamente los crisoles.
6. Poner en estufa a 105 °C por 1 hora.
7. Pesar los crisoles.
8. Repetir paso 6 y 7 hasta obtener una masa constante, que no difieran en más de 0.5mg/g en dos pesadas consecutivas.

Expresión de los resultados: La cantidad de sólidos totales se calculó de la manera siguiente:

$$S_1 = M_2 - M_1$$

$$S_2 = M_2 - M_1$$

$$S_3 = M_2 - M_3$$

$$S_t = \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3}$$



Donde:

S_1, S_2, S_3 : Sólidos totales (g)

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

M_1 : Masa del crisol vacío (g).

S : Valor medio de sólidos totales (g).

Una vez calculado el valor medio de los sólidos totales en gramos, se determinó la cantidad en miligramos (mg) que había en 5 mL del extracto. Luego por regla de tres se estableció la cantidad en 1 mL; quedando expresada la concentración del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. (mg/mL).

II.3.1.3 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico.

Se realizó la detección preliminar de los constituyentes químicos de la planta a través de la aplicación de ensayos cualitativos que permitan identificar los posibles constituyentes químicos presentes. En este estudio se ejecutó el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita por Miranda y Cuéllar. (Anexo 1) (Cuéllar., 2001)

II.3.2 Evaluación de la toxicidad aguda.

Se utilizaron ratas de la línea Wistar procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 2), saludables, machos y hembras, con masa corporal entre 173 g y 233 g. Los animales se identificaron marcándose con un ponchador de oreja o sacabocados, se mantuvieron en cuarentena 5 días previos al comienzo del experimento inspeccionándose diariamente su estado general. Se conformaron cuatro grupos experimentales con 3 animales cada uno, dos grupos con animales hembras y otros dos con animales machos, pesados y distribuidos 24 h antes de iniciar la administración.

Se realizaron dos estudios experimentales, donde el producto de ensayo (extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.) se administró en un primer estudio a una dosis única por vía oral de 2000 mg/kg de masa corporal y en el segundo a



una dosis única de 300 mg/kg de masa corporal, de acuerdo con el Protocolo (Clasificación Toxicológica Aguda (CTA) o Método de las Clases) establecida por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, en inglés *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) Número 423. Cada animal recibió la dosis señalada, vía oral mediante sonda intragástrica rígida 16 G con un ayuno previo de 16 a 18 h.

Se dosificaron en ambos ensayos 3 hembras y 3 machos, a razón de 2 mL cada 100 g de masa corporal, comenzando el primer día por las hembras. Para detectar variaciones en la masa corporal de los animales de experimentación, se realizó el pesaje de los mismos a los días 1, 7 y 14. Las observaciones después de la administración se establecieron de la siguiente manera: el primer día una observación cada 6 h, para un total de 4 observaciones al día, el segundo día una observación cada 12 h, realizando 2 observaciones en 24 h y a partir del tercer día y hasta el día 14 una observación cada 24 h. Al concluir los días de observación se practicó la eutanasia de los animales mediante anestesia con éter dietílico respetando las normas éticas establecidas y se realizó el análisis anatomopatológico macroscópico con muestreo de sistema digestivo, corazón, hígado, bazo, riñones y pulmones.

II.3.2.1 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en cada ensayo fueron registrados, con los cuales se confeccionaron una base de datos para la técnica empleada. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 21.0 para Windows. La comparación entre los grupos se realizó mediante técnicas no paramétricas, utilizando el test Friedman, con un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación menor de 0,05.



II.3.3 Evaluación farmacológica.

II.3.3.1 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

II.3.3.1.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar:

II.3.3.1.1.1 Microorganismo de ensayo.

El microorganismo utilizado para el estudio fue la cepa estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida del departamento de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

II.3.3.1.1.2 Medios de cultivos.

Se preparó el caldo de Müller-Hinton para hacer el pase de la cepa y Agar Müller-Hinton para evaluar la sensibilidad del microorganismo al agente antimicrobiano.

- **Caldo de Müller-Hinton:**

Se pesó 3,15 gramos del caldo en balanza analítica, se pasó a un matraz con 150 mL de agua destilada o desionizada, se filtró, se midió el pH, ajustándolo hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH y se esterilizó a 121 grados Celsius ($^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos (min) en autoclave. Se pasó la cepa estándar *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se incubó a 37°C por 24 h.

- **Agar Müller-Hinton:**

Se pesó 5,7 gramos del Agar en balanza analítica, se pasó a un matraz, completándolo con 150 mL de agua destilada o desionizada, se colocó en un agitador magnético sin calor. Se midió el pH, ajustándolo hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH. Se distribuyó en erlenmeyer y esterilizó a 121°C por 15 min. en autoclave. Inmediatamente después del autoclaveado, se dejó enfriar el agar en un baño maría entre 45 y 50°C . Luego se vertió el medio recién preparado y



enfriado a temperatura ambiente en 6 placas Petri de vidrio con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4 milímetros (mm), esto corresponde entre 25 mL y 30 mL para las placas de 100 mm de diámetro.

II.3.3.1.1.3 Preparación del Inóculo.

El inóculo se preparó por el método, suspensión directa de colonias de la siguiente manera. Se añadió 5 mL de solución salina fisiológica estéril a un tubo de ensayo, se tomaron de 3 a 5 colonias de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se añadieron al tubo con la solución salina fisiológica, el cual se homogenizó vigorosamente. Finalmente se comparó la turbidez con el patrón 0,5 de la escala de McFarland para lograr la estandarización del inóculo aproximadamente entre 4 y 5 x 10⁸ UFC/mL.

II.3.3.1.1.4 Preparación de las placas para la prueba de sensibilidad.

Se inocularon las 6 placas, estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril rotando 3 veces la placa aproximadamente 60° cada vez, para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se pasó el hisopo sobre el agar del borde de la placa.

II.3.3.1.1.5 Procedimiento.

Mediante el método de los pozos (M02-A10, CLSI, 2010), se hicieron 4 pozos en las placas para añadir 100 microlitros (µL) del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. Las placas se incubaron a 37 °C con la modificación planteada por (Tami., 2002) y se procedió a la lectura a las 24h, 48h y 72h.

II.3.3.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima mediante el Método Dilución en Agar.

II.3.3.1.2.1 Microorganismo de ensayo.

El microorganismo utilizado para el estudio fue la cepa estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenida del departamento de Microbiología



del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

II.3.3.1.2.2 Antibacteriano de referencia.

Se utilizó el ingrediente farmacéutico activo Sulfato de Gentamicina, como antibacteriano de referencia. Como disolvente se empleó agua destilada estéril. Se preparó una disolución madre de Gentamicina a una concentración de 160 µg/mL a partir de la cual se prepararon 7 disoluciones de trabajo a diferentes concentraciones, (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 µg/mL). El rango de concentraciones seleccionadas se basó en la norma M100-S20 (CLSI, 2010) donde se reporta que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Gentamicina frente a cepas sensibles de *Staphylococcus aureus* es menor o igual a 4.

II.3.3.1.2.3 Muestra a evaluar: Extracto de *Jatropha gossypifolia* L.

La muestra a evaluar fue el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. el cual fue rotoevaporado hasta una concentración de 78,9 mg/mL. Se empleó como primera concentración de trabajo 78,9 mg/mL y se prepararon 6 diluciones de trabajo de 1 mL cada una, empleando como disolvente agua destilada estéril, (40; 20; 10; 5; 2,5; 1.25 mg/mL).

II.3.3.1.2.4 Medios de cultivo.

- **Agar Müeller-Hinton con Gentamicina.**

Se pesó 5,7 gramos del medio de cultivo Agar Müeller-Hinton en balanza analítica. Se diluyó en 150 mL de agua destilada y se midió el pH, ajustándolo hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH. Se fundió y se distribuyó con probeta 25 mL por erlenmeyer. Se esterilizó a 121 °C por 15 minutos en autoclave. Luego se colocaron en baño de maría a una temperatura entre 45 y 50 °C y se añadió a cada erlenmeyer un volumen de 2,5 mL de la disolución de trabajo correspondiente, garantizando una dilución 1:10 y que cada erlenmeyer contenga medio de cultivo con una concentración diferente del antibacteriano de referencia



(4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente el contenido de cada erlenmeyer fue distribuido en placas de Petri a razón de 2 placas por erlenmeyer.

- **Agar Müller-Hinton con extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.**

Se pesó 3,8 gramos del medio de cultivo Agar Müller-Hinton en balanza analítica. Se diluyó en 100 mL de agua destilada y se ajustó el pH hasta $7,3 \pm 0,2$ con papel indicador de pH. Se fundió y se distribuyeron 10 mL por tubo de ensayo. Se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Luego se colocó en baño de maría a una temperatura entre 45 y 50°C. Las concentraciones de trabajo fueron diluidas en medio de cultivo haciendo una dilución 1:10 en cada tubo de ensayo. Se homogenizó y se distribuyó cada tubo de ensayo en 2 placas de Petri resultando 2 placas de Petri por concentración de trabajo garantizando concentraciones finales de 7,8; 4; 2; 1; 0,5 ; 0,25 y 0.125 mg/mL.

II.3.3.1.2.5 Preparación del Inóculo.

El inóculo se preparó por suspensión directa de colonias y se estandarizó comparando la turbidez con el patrón 0,5 de McFarland como se explicó en el acápite II.3.3.1.1.3

II.3.3.1.2.6 Procedimiento.

1. Adición del medio de cultivo junto con el extracto o el antibiótico a las placas de Petri.
2. Preparación del Inóculo.
3. Inoculación de las placas con alícuotas de 2 μL del inóculo estandarizado en el centro de la placa.
4. Esperar no más de 30 min antes de invertir las placas de Petri.
5. Incubación a 37 °C entre 16 y 20 horas.
6. Lectura e interpretación de los resultados.(Cockerill, 2010)



II.3.3.1.3 Control de la calidad.

Cada ensayo se realizó dos veces en días diferentes incluyendo dos placas por cada concentración. Se trabajó con una cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en el experimento de Dilución en Agar se incluyó Sulfato de Gentamicina como antibacteriano de referencia. El diseño de experimento contó con controles negativos para garantizar la esterilidad del medio de cultivo, controles positivos para garantizar la viabilidad del inóculo estandarizado y control del disolvente.

Concentración Inhibitoria Mínima: Concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas.(Castaño., 2009)

II.3.3.2 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria aguda del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

II.3.3.2.1 Técnica del Edema auricular.

II.3.3.2.1.1 Modelo biológico.

Fueron utilizados ratones albinos machos de la línea Balb/c provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 3).

II.3.3.2.1.2 Condiciones experimentales.

La masa corporal de los animales estuvo en un rango de 16-18 g. Fueron mantenidos durante 7 días en adaptación a las condiciones experimentales con una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $60\pm 5\%$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. Recibieron alimentación controlada (Alimento concentrado EAO 1004 en forma de pellet con su correspondiente Certificado de Calidad, Anexo 4.) y agua potable apta para consumo *ab libitum*. Se alojaron en jaulas de polipropileno con tapas de acero inoxidable a razón de 6 animales por jaula.



Fueron privados de alimentación 18 horas antes de iniciar el experimento y de agua potable 1 hora antes.

Se consideró como variables informativas los registros promedios diarios de temperatura y humedad relativa en el local de alojamiento de los animales.

II.3.3.2.1.3 Procedimiento experimental.

El edema auricular fue inducido con 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol al aplicarse tópicamente en el pabellón auditivo del ratón. El 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol se disolvió en acetona (0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se aplicó con una micropipeta 10 μL por cada cara (externa e interna) del pabellón de la oreja (en total 20 μL por oreja) siendo la cantidad total aplicada del agente irritante de 2,5 μg .

La administración de las sustancias ensayadas se realizó por vía tópica, aplicando para cada una de ellas 10 μL por cada cara (externa e interna) del pabellón de la oreja derecha del ratón.

Los ratones machos fueron divididos, aleatoriamente, en grupos de 6 animales, conformándose 3 grupos experimentales:

- Grupo Control Negativo: se le aplicó 20 μL (en total) de acetona y 2, 5 μg de 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.
- Grupo Control Positivo: se le aplicó 20 μL (en total) de 0,5 mg de Indometacina y 2, 5 μg de 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol en acetona.
- Grupo Tratado: se le aplicó 20 μL (en total) de 1 mg de Extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. y 2,5 μg de 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol en acetona.

Al transcurrir 4 horas los animales fueron sacrificados, anestesiados con éter dietílico y posterior dislocación cervical y con ayuda de un sacabocados se cortó una porción circular de ambas orejas del ratón (inflamada y no inflamada) las que



fueron pesadas para determinar la magnitud del edema y calcular el porcentaje de inhibición de la inflamación mediante la expresión matemática siguiente:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 * \left[1 - \frac{Et}{Ec} \right]$$

Donde:

Et = valor medio del edema del grupo tratado.

Ec = valor medio del edema del grupo control.

II.3.3.2.1.4 Consideraciones éticas.

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de los mismos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas.

II.3.3.2.1.5 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en el ensayo fueron registrados, con los cuales se confeccionaron bases de datos para cada una de las técnicas empleadas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 21.0 para Windows. A los datos se le aplicaron los estadígrafos descriptivos media y desviación estándar. La comparación entre los grupos se realizó mediante técnicas no paramétricas, utilizando los test Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, con un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación menor de 0,05.

Resultados y Discusión





III. Resultados y Discusión.

III.1 Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar.

III.1.1 Recolección.

La recolección se realizó en horas tempranas de la mañana, y se ejecutó de forma manual, pues es la técnica que se recomienda para plantas silvestres, procurando tomar las partes de interés, y en algunas ocasiones dejar ramas suficientes que garanticen el normal desarrollo de la planta y así un uso sostenible de este recurso.

III.1.2 Secado y molinado.

El material vegetal conservó las características organolépticas propias de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. después de secado y molinado. Se almacenó en bolsas de polietileno en una desecadora protegida de la luz y la humedad, hasta el momento de su utilización.

III.1.3 Obtención del extracto.

Para la obtención del extracto, el material vegetal seco y molinado se extrajo utilizando reflujo por 2 horas (h) a una temperatura de 98 grados Celsius (°C) y una posterior rotoevaporación, dando lugar a un extracto hidroalcohólico de color verde oscuro intenso, característico de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas con una significativa extracción de pigmentos clorofílicos.

III.1.4 Evaluación fitoquímica de extracto.

Un elemento importante en la valoración de los extractos que van a ser sometidos a evaluaciones farmacológicas es la naturaleza química de los componentes, pues esta información puede orientar hacia la posible acción farmacológica que puedan ejercer y a los posibles metabolitos responsables de tales efectos. En correspondencia a este criterio se realizó la evaluación fitoquímica del extracto obtenido a partir de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L (Ugaz, 1994).



III.1.4.1 Tamizaje fitoquímico.

En este sub-epígrafe, en la Tabla 1; se hace referencia a los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en el extracto analizado.

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto para las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolitos	Ensayos	Extracto hidroalcohólico
Resinas	Resinas	Negativo
Saponinas	Espuma	Positivo
Alcaloides	Dragendorff o Mayer	Positivo
Glucósidos cardiotónicos	Kedde A+B	Negativo
Fenoles y/o Taninos	Cloruro Férrico	Positivo
Flavonoides	Shinoda	Positivo
Triterpenos y/o Esteroides	Lieberman- Burchard	Positivo
Aminoácidos libres	Nihidrina	Positivo
Coumarinas	Baljet A+B	Positivo
Azúcares reductores	Felhing A+B	Positivo
Quinonas	Borntrager	Positivo

Al realizar el tamizaje fitoquímico, se detectó en el extracto la presencia de saponinas a las cuales se le atribuyen acciones expectorante, diurética, depurativa, tónico-venosa y de disminución del colesterol. Además de disminuir el riesgo de padecer cáncer, pues un estudio del 2004 publicado en el “*Journal of Medicinal Food*”, demostró que el cáncer de colon, de mama, de útero y las tasas de cáncer de próstata son más bajas en los países donde los habitantes consumen grandes cantidades de legumbres. Esto puede ser debido a los efectos



moduladores del sistema inmunitario de las saponinas que aumentan la actividad anti-tumoral en el cuerpo. También se detectó la presencia de flavonoides, a los que se les atribuyen propiedades anticancerosas, ya que muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Además de antiinflamatorios y analgésicos, pues se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los flavonoides como isoflavonoides han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. Los Taninos forman parte de los constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. y su acción antioxidante ayuda a prevenir enfermedades degenerativas. Poseen propiedades astringentes y antiinflamatorias, desinflan la mucosa intestinal por lo que es un tratamiento eficaz contra la diarrea y también ayudan a que la sangre coagule, ejerciendo de antihemorrágico local y resultando útil para el tratamiento de las hemorroides. Ofrecen una acción antiséptica frente a bacterias, hongos y virus, las plantas que contienen taninos atacan a los microorganismos aglutinando las proteínas de su superficie y por eso estas plantas se marchitan menos (Ugaz, 1994).

La presencia de estos metabolitos en el extracto pudiera estar relacionada con algunas de las acciones atribuidas de la planta como son su efecto diurético, procoagulante, analgésico, antiinflamatorio y antibacteriano. Varios estudios realizados a diferentes extractos de *Jatropha gossypifolia* L., relacionan la presencia de sus componentes químicos con las posibles acciones de la misma (Sarin, 2010).

Estos resultados se encontraron en correspondencia con los informes fitoquímicos de la familia botánica, siendo similares a los obtenidos, para esta droga en otros países (Sarin, 2010).

III.2 Estudio de Toxicidad Aguda.

La utilización de las plantas medicinales tradicionales se recomienda que se efectúe sobre una base científica que valide la efectividad terapéutica y la relativa inocuidad de las mismas (Gómez., 1991).



La aplicación de los "métodos alternativos" en el campo de la Toxicología es reciente y ha coincidido con la creciente oposición social al uso indiscriminado de animales de experimentación (Gómez., 1991).

El protocolo de Clasificación Toxicológica Aguda (CTA) o Método de las Clases, validado internacionalmente y adoptado por la OECD proporciona información destinada tanto a la evaluación de los riesgos como a su clasificación. Este método utiliza dosis iniciales definidas y con él no se pretende calcular una Dosis Letal Media (DL50) precisa, sino determinar una gama de exposición en la que pueda esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal.

En el primer estudio, al administrar una dosis única de 2000 mg/kg de masa corporal del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. se observó que los 6 animales utilizados, al segundo día no comenzaron a presentar una respuesta normal de los estímulos nociceptivos, estaban inmóviles, con sueño y 2 de ellos tenían sangrado nasal, encontrándose muertos al cuarto día de estudio por la mañana. Los demás animales murieron al sexto día de ensayo presentando los mismos signos de toxicidad. La variable utilizada como indicador de toxicidad fue la masa corporal, donde se observó que las ratas tuvieron una disminución de la misma, tanto las que murieron al cuarto día como las demás al sexto.

En la Tabla 2, se observa el comportamiento de las masas corporales de las dos ratas, durante los cuatro días que duró el ensayo, mostrándose una disminución de masa corporal promedio (ΔP) por debajo de los 9 gramos.

Tabla 2: Relación de la media de las masas corporales y su variación en las dos ratas.

Animales	Sexo	Masa corporal		
		Día 1	Día 4	ΔP
Rata 1	Hembra	199.76	193.36	6.4
Rata 2	Macho	208.78	197.18	11.6
Valor medio		204.27	195.27	9



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3, se observa el comportamiento de las masa corporales de las cuatro ratas, durante los seis días que duró el ensayo, mostrándose una disminución de la masa corporal promedio (ΔP) por debajo de los 8.86 gramos.

Tabla 3: Relación de la media de las masas corporales y su variación en las cuatro ratas.

Animales	Sexo	Masa corporal		
		Día 1	Día 6	ΔP
Rata 1	Hembra	183.23	174.24	8.99
Rata 2	Hembra	186.37	177.0	9.37
Rata 3	Macho	189.92	180.47	9.45
Rata 4	Macho	185.84	178.21	7.63
Valor medio		186.34	177.48	8.86

Al observar los signos clínicos no se mostró un buen estado general y apariencia normal, ya que las mucosas no se encontraban normocoloreadas. Existió alteración en la frecuencia respiratoria y cardíaca. Los animales no mostraron un comportamiento normal exploratorio. No tenían una respuesta adecuada ante los estímulos, ni uniformidad en la movilidad ante el toque y fuera de las jaulas. Al practicar el análisis anatomopatológico macroscópico de los animales se pudo ver congestión de los órganos, principalmente del hígado que se visualizaba muy inflamado, tracto digestivo afectado a nivel de duodeno, con hemorragia petequiral. Esto nos permite dar un criterio de cual pudiera ser el órgano diana del tóxico, que parece ser el hígado, aunque para corroborarlo se necesitan realizar estudios toxicológicos más profundos.

En el segundo estudio, al administrar una dosis única de 300 mg/kg de masa corporal del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. se observó que los 6 animales utilizados, presentaban una respuesta normal de los estímulos nociceptivos y no se visualizó ningún signo de toxicidad evidente ni muerte en los animales de experimentación. La variable utilizada como indicador de toxicidad fue



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la masa corporal, donde se notó que las ratas tuvieron un incremento del mismo durante los 14 días.

En la Tabla 4, se observa el comportamiento de las masas corporales de las ratas hembras, durante los días que duró el ensayo, mostrándose un incremento de la masa corporal promedio (ΔP) por encima de los 90.75 gramos.

Tabla 4: Relación de la media de las masas corporales y su variación en las ratas hembras.

Animales	Masa corporal			
	Día 1	Día 7	Día 14	ΔP
Rata 1	173,66	209,68	266,28	92,62
Rata 2	185,75	218,69	273,2	87,45
Rata 3	183,6	239,06	275,78	92,18
Valor medio	181	222,47	271,75	90,75

En la Tabla 5, se observa el comportamiento de las masas corporales de las ratas machos, durante los días que duró el ensayo, mostrándose un incremento de la masa corporal promedio (ΔP) por encima de los 96.21 gramos.

Tabla 5: Relación de la media de las masas corporales y su variación en las ratas machos.

Animales	Masa corporal			
	Día 1	Día 7	Día 14	ΔP
Rata 1	233	290,64	329,44	96,44
Rata 2	228,47	286,94	323,6	95,13
Rata 3	207,22	275,23	304,3	97,08
Valor medio	222,89	284,27	319,11	96,21

Se utilizó la prueba de Friedman para comparar las masas corporales la cual arrojó que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) a los 14 días en



relación a la masa corporal, observándose una tendencia al aumento de la misma en ambos sexos.

Al observar los signos clínicos se mostró un correcto estado general y apariencia normal, evaluada por pelos, ojos brillantes y las mucosas normocoloreadas. No existió alteración en las frecuencias respiratorias y cardíacas. Los animales mostraron un comportamiento normal exploratorio. La respuesta a los estímulos fue normal y se determinó una uniformidad en la movilidad de todos los animales ante el toque y fuera de las jaulas. Al practicar el análisis anatomopatológico macroscópico de los animales no se mostró alteración en ninguno de los animales tratados.

Una vez realizado este estudio podemos afirmar que la DL₅₀ del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. se encuentra a dosis superiores a 300 mg/kg, clasificándose (según lo establecido por la OECD) como Categoría 3 (moderadamente tóxico) al no provocar mortalidad a la última dosis ensayada y no evidenciarse alteraciones morfológicas relacionadas con toxicidad.

Estudios realizados reportan que otras especies de *Jatropha*, como la *Jatropha curcas* L. posee la misma toxina que la *Jatropha gossypifolia* L., la Curcina y la dosis mínima letal de esta, cuando se administra por inyección, puede ser tan pequeña como 0.00000001 % de la masa corporal. Aunque la toxicidad oral es probablemente cien veces menos. In vitro esta fitotoxina causa aglutinación de eritrocitos. Ha sido observado que las semillas de *J. curcas* contienen proteínas que son tóxicas para los animales e inhiben la síntesis de proteínas en un sistema libre de células (lisado de reticulocitos de conejo), pero no en células enteras (Gaskin, 1994).



III.3 Evaluación farmacológica.

III.3.1 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

III.3.1.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar.

Los test de susceptibilidad antimicrobiana (AST) son una técnica esencial en muchas disciplinas de la ciencia, y son el primer paso hacia la búsqueda de nuevas drogas antiinfectivas (Castaño., 2009).

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Castaño., 2009).

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer, (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de CLSI, de Estados Unidos (Castaño., 2009).

Al aplicar el método de difusión en pozo con el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. no se observó el halo de inhibición a las 24 horas, ni a las 48 horas sino a las 72 horas (h) tanto en el experimento inicial como en la réplica.

Este resultado coincide con los tiempos de lectura (24, 48 y 72 h) realizado en otros estudios aplicando el mismo método (Bradley, 2002).

La literatura plantea que el halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba (Castaño., 2009).

Varios estudios demuestran que la solubilidad, en el solvente empleado, de los compuestos presentes en el extracto puede influir en el tiempo de difusión del mismo en la placa (Scorzoni, 2007).



Se deben tener consideraciones generales para el estudio de la actividad antimicrobiana en extractos de plantas. Así para extractos no polares o sustancias que no difundan bien en el agar es más recomendable técnicas de dilución que las de difusión. Trabajos previos han demostrado que la composición del medio de cultivo puede influir en la actividad de los extractos o compuestos evaluados (Castaño., 2009).

III.3.1.2 Concentración Inhibitoria Mínima mediante el Método Dilución en Agar.

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas (Castaño., 2009).

Al aplicar el método de dilución en agar para determinar la CIM del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se determinó que la concentración inhibitoria mínima fue de 2 mg/mL, (Tabla: 6) tanto en el experimento inicial como en la réplica del mismo y para el antibacteriano de referencia (Sulfato de Gentamicina) la concentración inhibitoria mínima fue de 1 mg/mL, (Tabla: 7) en los dos estudios realizados.

Tabla 6: CIM del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Placas:		Concentración:	Crecimiento:
1	2	7,8 mg/mL	NO
1	2	4 mg/mL	NO



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1	2	2 mg/mL	NO
1	2	1 mg/mL	SÍ
1	2	0,5 mg/mL	SÍ
1	2	0,25 mg/mL	SÍ
1	2	0,125 mg/mL	SÍ

Tabla 7: CIM del Sulfato de Gentamicina frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Placas:		Concentración:	Crecimiento:
1	2	4 µg/mL	NO
1	2	2 µg/mL	NO
1	2	1 µg/mL	NO
1	2	0,5 µg/mL	SÍ
1	2	0,25 µg/mL	SÍ
1	2	0,125 µg/mL	SÍ
1	2	0,0625 µg/mL	SÍ

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La CIM se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Castaño., 2009).

El extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. tiene entre sus constituyentes químicos compuestos polares y no polares. Estudios realizados



proponen usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Castaño., 2009).

Según la norma M100-S20 (CLSI, 2010) la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Gentamicina frente a cepas sensibles de *Staphylococcus aureus* es menor o igual a 4, lo cual coincide con los valores obtenidos en nuestro estudio.

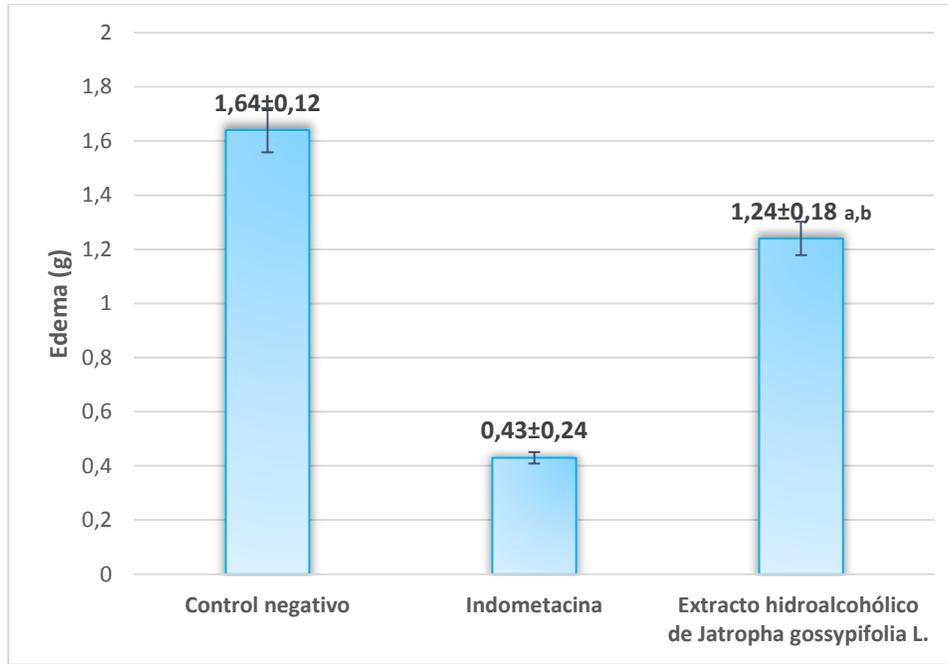
III.3.2 Evaluación in vivo de la actividad antiinflamatoria aguda del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. por la técnica de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.

La inducción del edema auricular se basa en la aplicación, en el pabellón auditivo del ratón, de 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol, uno de los componentes responsables de la acción irritante del aceite de croton. La respuesta inflamatoria consiste en eritema, edema e infiltración por leucocitos polimorfonucleares, así mismo se liberan mediadores de tipo eicosanoide y se induce la desgranulación de mastocitos. Una de las ventajas de este método reside en la pequeña cantidad de muestra que requiere, debido a la acción local del agente flobógeno que, por otro lado, está libre de posibles restricciones de índole farmacocinética (CYTED, 1995, VOGEL, 2002).

Al administrar por vía tópica el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. la inflamación es significativamente ($p < 0,05$) menor que la del grupo control negativo (Figura 2) lo que demuestra su efecto antiinflamatorio por vía tópica, que no supera el efecto alcanzado por esta vía por la indometacina ($p < 0,05$). El porcentaje de inhibición de la inflamación fue de 24,21% para el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. no superando a la indometacina empleada como sustancia de referencia cuyo porcentaje de inhibición de la inflamación fue de 73,75%.

Estudios de los extractos de éter de petróleo y metanólicos de *Jatropha gossypifolia* L. han mostrado una mayor actividad antiinflamatoria y analgésica en

comparación con los medicamentos estándares, la Indometacina y el Diclofenaco. El extracto metanólico mostró más actividad que el extracto de éter de petróleo en el tratamiento del dolor y la inflamación (Panda, 2005).



Test Mann-Whitney

a- diferencia significativa respecto al control negativo (acetona) ($p < 0,05$)

b- diferencia significativa respecto al control positivo (indometacina) ($p < 0,05$)

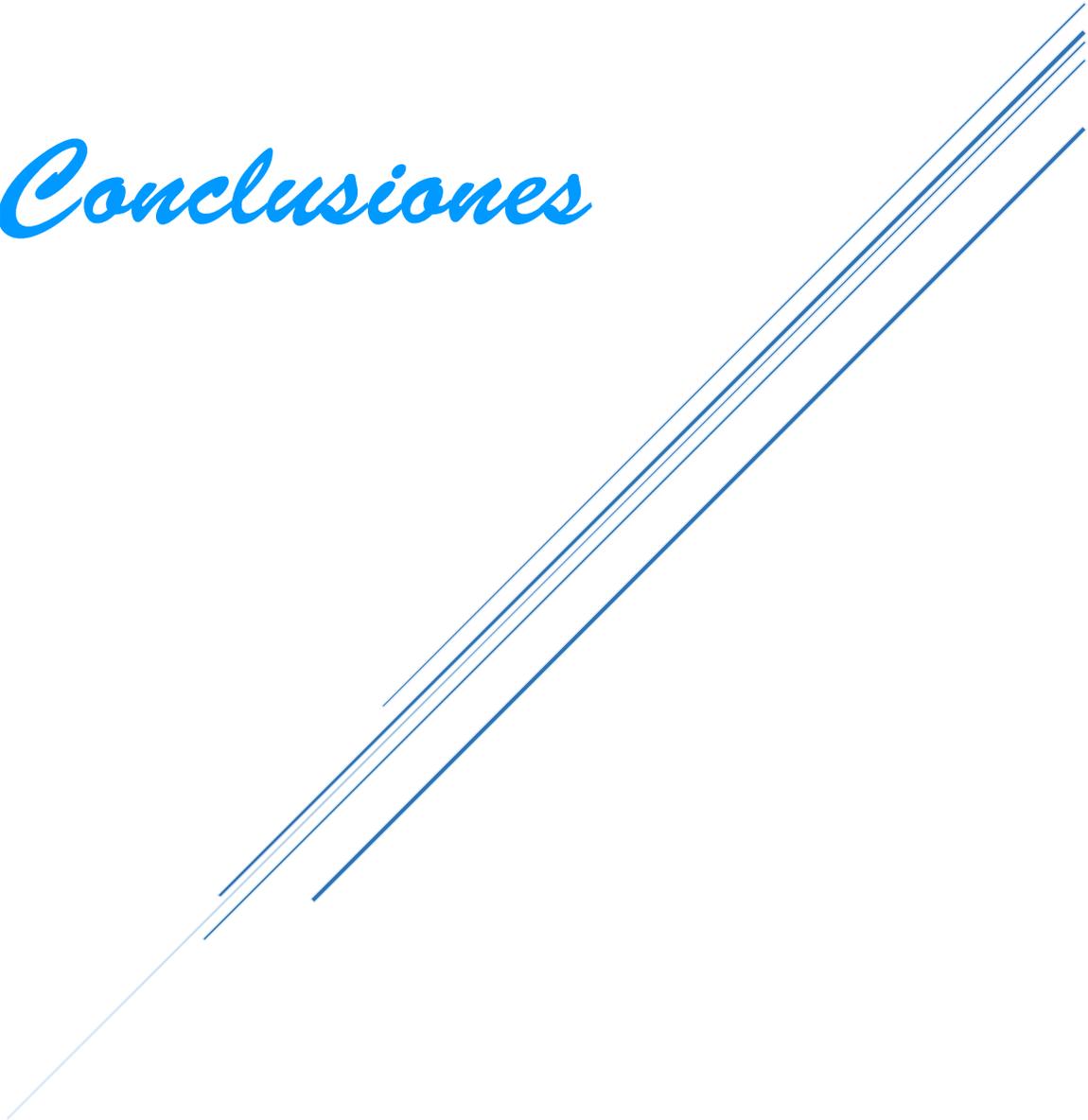
Test Kruskal-Wallis

a- diferencia significativa respecto al control negativo (acetona) ($p < 0,05$)

b- diferencia significativa respecto al control positivo (indometacina) ($p < 0,05$)

Figura 2. Edema auricular de los grupos experimentales tras la administración de las sustancias ensayadas por vía tópica.

Conclusiones





Conclusiones.

1. Las saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, triterpenos, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores y quinonas son los principales metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.
2. La Dosis Letal Media del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L. se encuentra a dosis superiores a 300 mg/kg, clasificándose como un producto moderadamente tóxico.
3. El extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. mostró inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, obteniéndose una CIM de 2 mg/mL.
4. El extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L. tiene efecto antiinflamatorio agudo *in vivo*, por vía tópica, en edemas auriculares inducidos por 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.

Recomendaciones





Recomendaciones.

1. Realizar estudios de toxicidad inmediatos como: Estudios de Dosis repetidas de 30 días, de mutagénesis y pruebas de Irritabilidad dérmica y ocular.
2. Evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L. frente a microorganismos anaerobios.

*Referencias
Bibliográficas*





Referencias Bibliográficas.

Barreno. 2008. Inflamación. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp), Vol. 102, Nº. 1., pp 91-159.

Bradley and Tami. 2002. Microscale Assay for Screening of Inhibitory Activity of Lactobacillus. BioTechniques 33:1224-1228.

Castaño. 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Scientia et Technica Año XV., No 42.

Cockerill. 2010. Performances Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth informational Supplement.

Cuéllar , Martínez 2001. Farmacognosia y Productos Naturales., La Habana., Editorial Felix Varela.

CYTED 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región.

Delpiano. 2009. Infecciones Cruzadas en las Prácticas de Salud Ambulatorias.

Evans, T. 1991. Farmacognosia, Edición Científico- Técnica; La Habana.

Fondeur. 1992. Las Plantas Venenosas en la Medicina Popular.

Gaskin 1994. *Jatropha gossypifolia* L. NEW ZEALAND.

Gómez. 1991. Toxicología aguda oral del Eucalyptus Saligna SM. por el método de las clases. Rev Cubana Plant Med. , v.4 n.2

Granda. 1997. Conozca las plantas medicinales. La Habana, Edición Científico-Técnica.

Güenechea 1998. Aspectos legales de la fitoterapia.

Hernández. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatoria. Rev Cubana Invest Biomed 2002:21(3):214-6, 3.

Jamaluddin. 2010. Basic and Clinical Pharmacology. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits.

Lichtman. 2009. Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- López. 2004. Evaluation of two methodologies to determine the antimicrobial activity of medicinal plants. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Volumen 4, 28-32.
- Mesa. 1988. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos, La Habana.
- Navarro, C. 2002. Uso racional de plantas medicinales. Pharmaceutical Care España 9, 9-19.
- Niño. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* krukoff). Revista Colombia Forestal. 2009. , Volumen 1, 161-170.
- Panda. 2005. Global Journal of Pharmacology. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Jatropha gossypifolia* in experimental animals models.
- Paul, W. 1998. Fundamental Immunology.
- Pertierra. 2007. Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales.
- Raéz. 2003. *El proceso Inflamatorio*.
- Repetto, M. 2012. Toxicología fundamental, La Habana.
- Rivera, N. 2010. Medicina tradicional.
- Rojas. 2012. Identificación y conocimiento de las plantas medicinales expedidas en los mercados principal y libre de Maracay, estado Aragua, Venezuela. Rev. Fac. Agron. (UCV) 38(2): 64-70. 2012., volumen 3.
- Ruiz, A. 2012. Importancia de las plantas para la salud de las personas. La Habana., Edición Científico-Técnica.
- Sarin. 2010. Analysis of the Phytochemical Content and Anti-microbial Activity of *Jatropha gossypifolia* L. Scholars Research Library.
- Scorzoni. 2007. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp., v. 28,n.1.
- Sellers. 2010. Aislamiento infeccioso en el hospital. Revista rol de enfermería. pag 27-38.
- Tami. 2002. Microscale Assay for Screening of Inhibitory Activity of *Lactobacillus*. BioTechniques., Volumen 33, número 6., 3.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tangarife. 2011. Métodos de dilución. Escuela de Microbiología. [Accessed 6/1/2014 2014].

Torsti. 2008. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*, Vol. 31, No. 3, 2008, 17.

Ugaz. 1994. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios.

Vila. 2000. Fitoterapia: Concepto y Límites. Fuentes de información. [Accessed 12/12/2013].

Vogel. 2002. *Drug Discovery and evaluation*, Berlin, Germany, Springer.

Anexas





Anexos.

1. Tamizaje Fitoquímico empleado para determinar constituyentes químicos presentes en las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

- **Ensayo de Lieberman- Burchard:** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mililitro (mL) de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se dejan correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Positivo: Si se produce un cambio de coloración: Rosado-azul muy rápido; Verde intenso visible aunque rápido; verde oscuro-negro final de la reacción.

- **Ensayo de Espuma:** Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénicas. Si la alícuota se encuentra en etanol, se diluye en 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 a 10 minutos (min).

Positivo: Si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 milímetros (mm) de espesor o altura y persiste por más de 2 min.

- **Ensayo de Fehling:** Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 o 2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo (recién preparado) y se calienta en baño de agua de 5-10 min.

Positivo: Si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo.

- **Ensayo de Cloruro férrico:** Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Si el extracto de la planta es etanólico, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto etanólico,



se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos; a una alícuota del mismo se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución reactiva.

Positivo: Cuando aparece una coloración rojo-vino (compuestos fenólicos en general), verde intensa (taninos del tipo pirocatecólicos) y azul (taninos del tipo pirogalotánicos).

- **Ensayo de Borntrager:** Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de NaOH, KOH o NH₄OH al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

Positivo: 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. Si la alícuota del extracto se encuentra en etanol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálica. Después de la reacción se esperan 5 min., se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que las mismas se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

Positivo: Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos.

- **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico este debe



evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de HCl (1%). Si por el contrario el extracto es acuoso a la alícuota de ensayo se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. A ambas soluciones acuosas ácidas se le añaden 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

Positivo: Se producen complejos insolubles de tal manera que, si hay opalescencia el ensayo se considera positivo (+), si turbidez definida (++) y si precipitado (+++).

- **Ensayo de Nihidrina:** Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. La alícuota del extracto en alcohol se mezcla con 2 mL de la solución de nihidrina al 2 %. La mezcla se calienta durante 10 min. en baño de agua.

Positivo: Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo.

- **Ensayo de Baljet:** Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas. Si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL del reactivo.

Positivo: La aparición de una coloración se considera positivo (+) y de un precipitado (++)

- **Ensayo de Kedde:** Permite reconocer la presencia de glucósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 min., se observan los cambios de coloración.



ANEXOS

Positivo: Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1 o 2 h.

- **Ensayo de Resinas:** Permite reconocer en un extracto la presencia de resinas. Se adiciona a 2 mL de la solución alcohólica del extracto, 10 mL de agua destilada, se agita y se deja reposar.

Positivo: La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo (+).

2. Certificado de calidad de las ratas empleadas en el estudio de Toxicidad Aguada.

GC.CG.10.13 Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **CENPALAB**
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

Folio: **016** Grupo de Aseguramiento de la Calidad

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas	
Rata				Wistar/Cenp	07-0016 14	3	
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
6	15	21	180-200g	8-9 Sem	F.C.M. Villa Clara	12/00/14	1:40

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmula **ALYco**® EMO 1002 esterilizable a razón de 22.4 a 30 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Salmonella</i> sp.	Cult/ Serot		X		24/10/13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cult/ Serot		X		30/07/13
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Cultivo			X	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Cult/ELISA		X		23/12/13
<i>Streptococcus β hemolytic</i>	Cult/ Serot		X		30/07/13	<i>Clostridium piliformis</i>	Insp. Clínica		X		11/02/13
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Cult/ ELISA		X		30/07/13	<i>Leptospira</i> sp.	ELISA/ Micg		X		14/08/13
<i>Helicobacter</i> sp	Cultivo		X		11/02/13	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	Cult/ELISA		X		24/10/13
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Cult/ ELISA		X		24/10/13	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Cult/ELISA		X		24/10/13
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		20/10/13						

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Endoparásitos	DIR/ FLOT		X		16/10/13
<i>Toxoplasma gondii</i>	ELISA		X		21/06/13
<i>Trichostrongylus axei</i>	Sedimentación			X	-
Ectoparásitos	Insp. Clínica		X		16/10/13

Resultados de Patología *

Fecha: 20/10/13
Examen macroscópico:
No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.

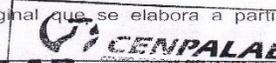
Resultados de Virología * (Serología)

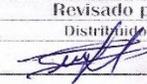
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Virus Sialodacryadentitis/ Virus corona (SDA/RCV)</i>	IFA		X		27/09/13	<i>Coriomeningitis linfocitaria (LCM)</i>	IFA		X		27/09/13
<i>Virus Pneumonia (PVM)</i>	IFA		X		27/09/13	<i>Virus Sendai</i>	ELISA/IFA		X		27/09/13
<i>Virus Encefalomielitidis Theiler (TMEV)</i>	IFA		X		27/09/13	<i>Reovirus Tipo 3 (REO 3)</i>	IFA			X	-
<i>Virus Tootan (H-1)</i>	IFA		X		27/09/13	<i>Virus Kilham (KRV)</i>	IFA		X		27/09/13
						<i>Virus Hantaan</i>	IFA			X	-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de Diciembre /2013 hasta Marzo /2014.

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

CENPALAB Aprobado por  Director de Producción de Animales de Laboratorio

CENPALAB Revisado por  Distribuidor

Cargo: Especialista Liberación de Animales de Laboratorio
Firma:  Grupo Aseguramiento de la Calidad

Barbara Danay Rivero González



3. Certificado de calidad de los ratones empleados en el estudio de la actividad antiinflamatoria.

GC.CC.14.09 Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **CENPALAB**
 Folio: 237 Grupo de Aseguramiento de la Calidad
 CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

CERTIFICADO DE CALIDAD GENÉTICA DE ROEDORES SPF

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas	
Ratón	-	-	-	BALB/c/Cenp	20023714	2	
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
100	-	100	16-18g	5-6 sem	LABIOFAM/CF605	13/03/14	2:30

Origen de la línea

Los progenitores fueron importados del Laboratorio Charles River, Italia, para la producción de la línea BALB/c Cenp.

Características zootécnicas y control de la Colonia de Producción

Los animales importados fueron inspeccionados en el momento de la recepción y son mantenidos en condiciones controladas para su reproducción con un sistema de apareamiento que permite garantizar las características de esta línea de ratón consanguíneo. Se mantiene una periódica confirmación de los rasgos fenotípicos de esta línea por medio de inspecciones clínicas sistemáticas, además se analizan los parámetros zootécnicos para evaluar el comportamiento reproductivo y productivo. Para preservar la integridad genética de cada línea son eliminados de las colonias aquellos ratones que les detectan nuevas características que indiquen la aparición de nuevas mutaciones

DISTRIBUCIÓN GENES COLOR DE LA CAPA* Fecha 28/6/13

Locus	a	b	c	d
Alelos	AA	bb	cc	DD

Control de los marcadores moleculares (PCR) Microsatélites D17mit16 (106 pb)

Control e Inspección Genética del Banco Genético

INSPECCIÓN GENÉTICA Fecha 10/03/14

Resumen conclusivo

Los animales cumplen con las características fenotípicas de la línea de ratón BALB/c. El muestreo genético se realiza según el programa establecido para el Control Genético.

* Basado en los resultados del control genético del sistema productivo de la Dirección de Roedores Gnotobióticos, efectuado por el Grupo de Genética de la Dirección de Biotecnología del CENPALAB. La frecuencia del monitoreo genético es de 1 año, los resultados del mismo son válidos por igual período de tiempo.

Realizado:  **CENPALAB** Aprobado: 
 Esp. de Genética del CENPALAB Firma Esp. Liberación de Aseg. Calidad Firma
 Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
 Grupo de Aseguramiento de la Calidad



4. Certificado de alimento.

FP.CA.01.14		Dirección de Alimentación y Nutrición			
		Grupo de Producción de Alimentos Concentrados			
CERTIFICADO DE AUTORIZO DE ALIMENTO CONCENTRADO					
Fórmula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación	
CMO 1000	III	118/2014	27/03/2014	Pellet Ø 16 mm.	
Especificaciones para su uso					
Dieta completa concentrada para el mantenimiento de rata convencional. Todo propósito. No esterilizable. No requiere suplemento dietético. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 45 días a partir de la fecha de fabricación.					
Componentes					
Trigo, Soya H, Girasol H. Pescado H, Azucar, Sal común, Carbonato de Calcio, Premezcla minero-vitamínica y Biotronip.					
Análisis calculado *					
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%	16.0	Calcio	%	0.39
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g	2.80	Fósforo	%	0.49
Fibra bruta (Máx.)	%	3.50	Relación Calcio/ Fósforo	%	0.79
Grasa bruta (Min.)	%	1.50			
* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.			Realizado por:	Cargo Dirección de Producción	Firma 
Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.			Revisado por:	Cargo Distribuidor	Firma 