

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Potencial antimicrobiano de los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Autora: Laura Machado Hernández.

Tutora: MSc. Arelys López Sacerio.

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Academic Departament of Farmacy

DIPLOMA THESIS

Title: Antimicrobial potential of leaf extracts from *Jatropha gossypifolia* L.

Author: Laura Machado Hernández.

Thaesis Director: MSc. Arelys López Sacerio.

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

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830
Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo



“Muchas son las lecciones que se pueden extraer del estudio de las plantas, si se procura el verdadero espíritu de la sabiduría.”

John Hutton Balfour.

Dedicatoria



A mis padres Ariel y Neyma, por ser mis mayores ejemplos, mis guías y por brindarme todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermano Arielito, por ser mi príncipe, el que me inspira cada día.

A mi abuela Segunda, por enseñarme desde pequeña que todo lo que nos propongamos en la vida se logra con mucho esfuerzo y dedicación.

Agradecimientos



Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen el mayor de los reconocimientos mis padres que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible. Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; todos mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Ha sido un orgullo y un privilegio ser su hija, son los mejores padres.

A mi hermano, por ser el mayor regalo que me han dado mis padres, mi fuente de inspiración y por llenarme de alegría día tras día.

A mis abuelos por ser mis pilares fundamentales y haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

A los tíos, primos y toda mi familia porque sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una forma u otra me acompañaron en todos mis sueños y metas.

A Tamara y Ulises por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. Por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuestos a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi tutora Arellys por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el desarrollo de esta investigación.

A los profes del departamento por enseñarme cada día a ser una excelente profesional y a los que me ayudaron en mi investigación: Enoel, Milagros, Alina, Montenegro.

A todas mis amistades que han estado presente desde mi niñez y que se han robado un pedacito de mi corazón.

A mis amigos, sobre todo a Liana y a todo el grupo que ha compartido conmigo estos maravillosos 5 años, en especial a Beatriz por ser mi confidente, por todo el tiempo que pasamos juntas y que no olvidaré jamás. A José Ernesto por enseñarme a vivir la vida con alegrías, a Martha María, Adriana, Yisel, Ailin, Elianet, Dainelis, Lietsy y a todas las chicas y chicos con los que he compartido todo este tiempo que ha sido maravilloso.

En fin, quiero agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

Gracias

Resumen



Resumen

La resistencia a los antimicrobianos supone un obstáculo importante en estos días y las plantas medicinales suponen una alternativa al tratamiento de numerosas afecciones causadas por bacterias y hongos. La *Jatropha gossypifolia* L. es utilizada por la población en diferentes formas de preparación para el tratamiento de enfermedades en la piel. En este estudio el objetivo es evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólico y acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L que crece en la región central de Cuba. Primeramente, se recolectó la planta en distintas épocas del año. Se obtuvo como resultado que la droga posee índices numéricos que avalan la calidad del material vegetal. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos y acuoso que se caracterizaron por el tamizaje fitoquímico y entre sus metabolitos están saponinas, alcaloides, quinonas, fenoles, flavonoides, aminoácidos y coumarinas los cuales estuvieron presentes en todas las épocas del año estudiadas. Se cuantificaron los polifenoles, fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos y varió el contenido de los mismos en las diferentes épocas de recolección. Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos y acuoso mediante el método difusión en agar donde solo mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* el extracto hidroalcohólico.

Abstract



Abstract

Antimicrobial resistance is a major obstacle these days and medicinal plants are an alternative to the treatment of numerous conditions caused by bacteria and fungi. *Jatropha gossypifolia* L. is used by the population in different forms of preparation for the treatment of skin diseases. In this study the objective is to evaluate the antimicrobial activity of the hydroalcoholic and aqueous extracts of the leaves of *Jatropha gossypifolia* L. that grows in the central region of Cuba. First, the plant was collected at different times of the year. It was obtained as a result that the drug has numerical indices that guarantee the quality of the plant material. Hydroalcoholic and aqueous extracts were obtained which were characterized by phytochemical screening and among their metabolites are saponins, alkaloids, quinones, phenols, flavonoids, amino acids and coumarins which were present at all times of the year studied. The total polyphenols, phenols and flavonoids present in the extracts were quantified and their content varied during the different harvesting seasons. The antimicrobial activity of the hydroalcoholic and aqueous extracts was determined by means of the diffusion method in agar where it only showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in the hydroalcoholic extract.

Índice

Introducción:.....	1
Capítulo I. Revisión bibliográfica.	4
1.1 <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	4
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	4
1.1.2 Descripción botánica.	4
1.1.3 Distribución y hábitat.....	5
1.1.4 Usos tradicionales.	5
1.1.5 Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica.	7
1.1.6 Estudios toxicológicos.....	14
1.2 Actividad antimicrobiana.	16
1.2.1 Tipos de antimicrobianos.	16
1.3 Métodos in vitro para evaluar la actividad antimicrobiana.	18
1.3.1 Métodos de difusión.....	18
1.3.2 Cromatografía de capa delgada (TLC) –bioautografía.	21
1.3.3 Métodos de dilución.....	23
1.3.4 Prueba de tiempo muerto (curva de tiempo muerto).	25
1.3.5 Ensayo de bioluminiscencia ATP.	25
1.3.6 Método citofluorométrico de flujo.	26
Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 Tipo de estudio.	28
2.2 Equipos, materiales y reactivos empleados.	28
2.3 Recolección e identificación.	29
2.4 Secado y molinado.	29
2.5 Prueba de control de la calidad de la droga cruda.	30
2.5.1 Determinación de índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.	30
2.6 Obtención y caracterización físico-química de los extractos hidroalcohólicos y acuoso de las hojas de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	31
2.6.1 Obtención de los extractos.	31

2.6.2 Características organolépticas de los extractos.....	32
2.6.3 Pruebas de control de la calidad de los extractos.....	33
2.7 Evaluación fitoquímica de los extractos.....	34
2.7.1 Tamizaje fitoquímico.....	34
2.8 Determinación del índice de polifenoles totales (IPT).....	39
2.8.1 Cuantificación del contenido de Fenoles totales y Flavonoides.	39
2.9 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico y acuoso de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	40
2.9.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar:	40
2.10 Análisis estadístico.	42
Capítulo III. Resultados y Discusión.....	43
3.1 Obtención del material vegetal.....	43
3.2 Secado y molinado.	43
3.3 Pruebas de control de la calidad de la droga cruda.	44
3.3.1 Determinación de índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.	44
3.4 Obtención y caracterización del extracto.	47
3.5 Evaluación fitoquímica de extracto.....	48
3.5.1 Tamizaje fitoquímico.....	48
3.6 Determinación del índice polifenoles totales.	52
3.7 Determinación del contenido de fenoles totales.	53
3.8 Determinación de flavonoides totales.....	54
3.10 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico y acuoso de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	56
3.10.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar.	56
3.11 Correlación entre los compuestos fenólicos presentes en la planta y la actividad antimicrobiana.....	61
Conclusiones:.....	63
Recomendaciones:.....	64

Introducción



Introducción:

Encontrar propiedades curativas en las plantas constituyó la fitoterapia de nuestros antepasados. Muchas personas en todos los continentes han aplicado cataplasmas y bebido infusiones de diferentes plantas autóctonas con el fin de tratar enfermedades, curar heridas o simplemente mejorar su salud. Si nos remontamos a la prehistoria hay pruebas de que los neandertales que vivieron hace 60 000 años, utilizaban plantas como la malvarrosa para tratar insomnio, resfriados, estreñimiento o lesiones inflamatorias. Plantas que actualmente siguen siendo ampliamente utilizadas en la etnomedicina en todo el mundo⁽¹⁾.

No obstante, la mayoría de la población mundial utiliza en primer lugar la medicina convencional como tratamiento de salud. Esto es debido entre otros factores, a la falta de reconocimiento por parte de los profesionales sanitarios de la importancia del papel que puede llegar a desempeñar la “medicina tradicional”⁽¹⁾.

Con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha habido numerosos intentos recientes para investigar la seguridad, eficacia y calidad de estos nuevos medicamentos utilizando enfoques basados en la evidencia. Pero tan solo un número muy limitado de remedios a base de plantas para el tratamiento de infecciones, han sido sometidos a la evaluación basada en la evidencia. En este sentido, una evaluación más detallada de la eficacia antimicrobiana de las medicinas tradicionales, debe obviamente, llevarse a cabo antes de que tales mezclas a base de extractos de plantas puedan ser consideradas para el desarrollo de nuevas medicinas. De ese modo, se podrán evitar la comercialización de extractos de venta en farmacias, para los cuales existen dudas sobre su actividad⁽¹⁾.

La presencia de nuevos compuestos o combinaciones de compuestos con actividad antibiótica que finalmente llegan a la clínica ha sufrido un claro estancamiento. Si se observa el descubrimiento de las diferentes familias de antibióticos a lo largo de los años, se puede comprobar como las principales familias fueron descubiertas en el siglo pasado. No obstante, la generación de resistencias bacterianas como selección natural para resistir a estos tratamientos antibióticos convencionales, hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con poder bacteriostático o bactericida. Esta situación que supone un problema

de relevancia clínica, sólo puede ser resuelta con terapias basadas en nuevos compuestos, siendo las plantas una posible solución⁽¹⁾.

Una de las plantas que ha aumentado en interés en la actualidad es *Jatropha gossypifolia* L., denominada comúnmente como Tuatúa. Dicha especie es ampliamente cultivada como planta ornamental. Las raíces, tallos, hojas, semillas y frutos de la planta han sido utilizados en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas en muchos países. Varios estudios desarrollados a la planta, en especial a las hojas, han demostrado que esta posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como: esteroides, saponinas, flavonoides, triterpenos, fenoles, alcaloides, taninos, coumarinas y azúcares reductores. La mayoría de estos componentes químicos pueden ser responsables de muchas actividades farmacológicas reportadas entre estas se destacan la actividad antioxidante, analgésica, antiinflamatoria, antimicrobiana y contra el cáncer⁽²⁻⁶⁾.

En los últimos años, en el departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), se han desarrollado investigaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie que crece en diferentes localidades de la región central de Cuba. Este extracto posee actividades antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, no se han investigado la acción de los extractos hidroalcohólico y acuoso frente a otros microorganismos vinculados a diversas patologías.

Problema científico:

A pesar de que *Jatropha gossypifolia* L. es una especie muy estudiada a nivel internacional, las acciones antibacterianas tradicionales atribuidas a los extractos de las hojas de la especie que crece en Cuba, no se han estudiado científicamente.

Hipótesis:

La realización de estudios antimicrobianos de extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., que crece en Cuba, permitirán avalar usos tradicionales que se le atribuyen y posibilitarán su futura introducción como medicamento, o cosmeceútico.

Objetivo general:

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólico y acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L que crece en la región central de Cuba.

Objetivos específicos:

- Caracterizar desde el punto de vista fitoquímico los extractos de las hojas de la especie en varias épocas del año.
- Cuantificar los polifenoles, fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos de las hojas de la especie en varias épocas del año.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de la especie mediante el método difusión en agar.



Revisión Bibliográfica



Capítulo I. Revisión bibliográfica.

1.1 *Jatropha gossypifolia* L.

1.1.1 Clasificación taxonómica.

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Subclase: *Rosidae*.

Orden: *Geraniales*.

Familia: *Euphorbiaceae*

Subfamilia: *Crotonoideae*

Género: *Jatropha*

Especie: *Gossypifolia*

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

Nombre común: Tuatúa.

Otros nombres comunes: Frailecillo (Costa Rica, Venezuela, Colombia), Frailecito, San Juan del Cobre (Cuba), Higuereta cimarrona (Puerto Rico), sibidigua, Piñón negro, Piñón rojo, etc.⁽⁶⁾.

1.1.2 Descripción botánica.

Jatropha gossypifolia L. es un pequeño arbusto, con hojas de color verde oscuro, de 1 a 2 m de altura por 10-12.9 cm de ancho, a veces algo leñoso. Presenta hojas alternas, palmeadas y pubescentes, con un ápice acuminado, una base cordada y un margen aserrado^(4, 6-8).

Las flores son pequeñas, unisexuales, moradas, de inflorescencia cimosa con cáliz de cinco pétalos, que en las masculinas pueden formar un tubo petaloide. El fruto es pequeño, capsular con 1 cm de diámetro que consta de tres surcos. Es carnoso y de color verde cuando es inmaduro, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura. Contiene de una a tres semillas oscuras con puntos negros y ricas en aceite^(3, 6, 9). (Anexos 1, 2).

1.1.3 Distribución y hábitat.

Tiene una distribución muy amplia, con especies que se encuentran en África, India, Sudamérica, Antillas, América Central y el Caribe⁽¹⁰⁾. Es originaria de Brasil, se encuentra en terrenos baldíos, bosques y jardines. Crece en toda el África tropical, excepto en las regiones secas del sur de África y Asia⁽¹¹⁾. Es una yerba silvestre en terrenos yermos y cultivados, calcáreos, principalmente de poca o mediana elevación. Crece también en las demás Antillas Mayores y en muchas de las Menores, en las Bahamas y en la América tropical continental⁽¹²⁾.

1.1.4 Usos tradicionales.

Tanto las hojas como los tallos, las raíces, las semillas y el látex se utilizan en diferentes formas de preparación (infusión, decocción y maceración, entre otros) y por diferentes rutas y formas de administración (orales, tópicos, baños, etc.). *Jatropha gossypifolia* L. se usa en diferentes países de muchas maneras. Posee una importante actividad anticancerígena, hepatoprotectora y pesticida. La savia del tallo detiene el sangrado y la picazón de cortes y rasguños. En el sur de Nigeria se aplica el extracto fresco de las hojas de la planta con hojas aplastadas para detener el sangrado de la piel y la nariz. En América Latina y el Caribe, las hojas de *J. gossypifolia* se hierven y la decocción se usa para lavar heridas⁽⁴⁻⁶⁾. El baño de hojas se usa para las llagas, esguinces y erupciones. *Jatropha curcas* y extractos de hojas de *Jatropha gossypifolia* se han utilizado para limpiar llagas en Trinidad y Tobago y para tratar erupciones cutáneas y candidiasis oral en Tanzania. El tallo joven de *Jatropha gossypifolia* se usa como cepillo de dientes y también para limpiar la lengua. Otros usos etnobotánicos de *Jatropha gossypifolia* informan su empleo para el tratamiento del cáncer, diarrea, disentería, enfermedades de la piel (lepra), artritis, úlceras, infecciones de las encías y curación de heridas. En Malasia e Indonesia, las hojas de *Jatropha gossypifolia* se hierven con aceite de coco, se calientan a fuego abierto y se aplican sobre el abdomen para ayudar a aliviar el cólico abdominal debido al estreñimiento. Para aliviar el estreñimiento, las semillas se queman y pulverizan y esto se toma por vía oral. Otros investigadores informaron que la raíz de *Jatropha gossypifolia* se usa tradicionalmente en la diarrea y la disentería^(3, 5).

El aceite se utiliza como purgante y se aplica localmente en enfermedades de la piel y artritis. El látex y el jugo de la hoja se usan para tratar las úlceras, enfermedades de la piel y las infecciones de las encías^(2, 11). Al sur de Bangladesh es utilizada la *Jatropha gossypifolia* L. para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (incluyendo disentería, diarrea, indigestión, cólicos, acidez, estreñimiento, hinchazón, falta de apetito, dolor de estómago), enfermedades de la piel (incluyendo eczema, abscesos, acné, furúnculos, sarna, picazón, infecciones, dermatitis, sarpullido, llagas, cicatrices, verrugas)^(13, 14).

En Cuba se emplea como purgante y como vomitivo, afirmándose que actúa en un sentido o en otro según se emplee la parte superior o la inferior de la planta. Se plantea que es muy beneficioso para las enfermedades del vientre y muy popular entre la población de origen africano. En Camagüey la usan como abortivo y como vomitivo, y en Oriente para el catarro. Roig plantea que la planta es drástica, diurética y antihidrópica. La incluye entre los vegetales dudosos en lo que se refiere a toxicidad. Este autor afirma que las raíces de la tuatúa tienen propiedades diuréticas muy pronunciadas y que se emplean en infusión como bebida diaria en la cura de las purgaciones. Agrega que las semillas tienen propiedades purgativas drásticas muy poderosas, de manera que muchas veces ha dado lugar a envenenamientos fatales. En Venezuela los campesinos toman tantas hojas de tuatúa, cuantas deposiciones quieren promover; las pican como para ensalada y le echan sal, aceite y vinagre, y se las comen al acostarse. Usan también el cocimiento de la raíz en las hidropesías; además lo tienen por un diurético poderoso muy útil en la cura de las purgaciones. Se plantea que las semillas contienen mucho aceite y tienen propiedades purgantes y eméticas. La decocción de las hojas se emplea como purificador de la sangre y para las enfermedades venéreas y se administran como emético para los dolores de estómago. La raíz tiene alguna reputación como antídoto de las mordeduras de las serpientes y como remedio para el envenenamiento producido por el manzanillo y la yamagua. Por otra parte, el látex se emplea para curar almorranas y quemaduras, y las hojas en emplasto reducen las hinchazones⁽¹²⁾. En general, Juan Tomás Roig en su libro: "Agrupación de las plantas según sus aplicaciones" le confiere a la tuatúa diversas actividades como: abortiva, antialmorránicos, antihemorroidal, antiblenorrágica, anticatarral, antídoto,

antihidrópica, contra quemaduras, depurativa, diurética, drástica, dudosa o peligrosa, emético, emetocatártica, purgante⁽¹⁵⁾.

1.1.5 Estudios fitoquímicos y actividad farmacológica.

Varios componentes químicos han sido detectados en extractos de diferentes partes de la planta, se ha reportado, en general, la presencia de ácidos grasos, azúcares, alcaloides, aminoácidos, coumarinas, esteroides, flavonoides, lignanos, proteínas, saponinas, taninos y terpenoides. (Tabla 1)⁽³⁾.

Tabla 1: Principales constituyentes químicos de *Jatropha gossypifolia* L., con su respectivo solvente de extracción y partes vegetales.

Grupo	Sustancia	Parte vegetal	Solvente de extracción
Ácidos grasos	Ácido araquídico	Semillas	-
	Ácido araquidónico		-
	Ácido benzóico	Semillas	Éter de petróleo
	Ácido caprílico		-
	Ácido esteárico	Semillas	Éter de petróleo
	Ácido lignocérico	Semillas	-
	Ácido linoléico	Semillas	-
	Ácido mirístico		-
	Ácido oléico	Semillas	Éter de petróleo
			-
	Ácido palmítico	Semillas	Éter de petróleo
			-
Açúcares	Arabinosa	Semillas	-
	Ramnosa		
	Xilosa		
Alcaloides	Jatrofina	Hojas	Agua
	(Jatrophine)	Raíz	
	-	Hojas	Agua
			Cloroformo y metanol
		Semillas	Éter de petróleo
Aminoácidos		Látex	-
	Ácido aspártico	Semillas	-
	Ácido glutámico		
	Alanina		
	Arginina		
	Cistina		
	Glicina		
	Isoleucina		
	Leucina		

	Metionina		
	Prolina		
	Treonina		
	Valina		
Cumarinas	Cleomiscosina A Cleomiscosin A)	Tallo	Hexano-Etanol
	Cumarina (7,8-dihidróxi-6- metoxi cumarina)	Raíz	Acetato de etilo
	Fraxetina		
	Propacina (Propacin)	Toda la planta	Cloroformo y metanol
Diterpenos	Jatrofenona (Jatrophene)	Toda la planta	Cloroformo y metanol
	Jatrofolona A (Jatropholone A)	Raíz y hojas	Etanol
		Raíz	-
	Jatrofolona B (Jatropholone B)	Raíz y hojas	Etanol
		Raíz	Acetato de etilo
		Raíz	-
	Jatrofona	Raíz	Etanol
		Toda la planta	-
	2 α -OH-Jatrofona 2 β -OH-Jatrofona 2 β -OH-5,6- Isojatrofona	Raíz	Éter de petróleo y cloroformo
Esteróides	-	Tallos y hojas	Etanol
		Hojas	-
Fenoles	-	Tallos y hojas	Etanol
		Látex	-
Fibras	-	Semillas	Éter de petróleo
			-
Fitotoxinas	-	Hojas	Agua
		Hojas	Etanol
Flavonoides	Apigenina	Hojas	-
	-	Tallos y hojas	Etanol
	Ácido ferúlico	Raíces	Acetato de etilo
	2,3-bis- (hidroximetil)-6,7- metilenodioxo-1- (3'4'- dimetoxifenil)- naftaleno	Toda la planta	-
	Diidroprasantalina		
	Gadaína	Raíces, tallos y semillas	Éter de petróleo

		Toda la planta	-
	Gossypidieneo (Goss β ypidien)	Tallo	Hexano
	Gossipifana (Gossypifan)	Partes aéreas	Éter de pretróleo
		Toda la planta	-
	Isogadaína	Tallo	Éter de petróleo
		Toda la planta	-
Proteínas	Ciclo glossina A	Látex	Agua, etanol y acetato de etilo
			-
	Ciclo glossina B	Látex	-
		-	-
	-	Semillas	Éter de petróleo-
Saponinas	-	Semillas	Éter de petróleo
			Etanol y butanol
			-
Taninos	-	Raíz y hojas	Etanol
		Hojas	Agua
		Tallos y hojas	Etanol
Triterpenoides	-	Hojas	Etanol
		Tallos y hojas	Etanol
		Hojas	-

Los estudios que muestran el potencial biológico del extracto acuoso son raros hasta ahora, lo cual es importante mencionar ya que el uso más popular de esta planta es como té (decocción o infusión). Entre las principales actividades que se han estudiado destacan las actividades antihipertensivas, anticancerígenas, antimicrobianas, cicatrizantes, antiinflamatorias y analgésicas^(6, 16).

Teniendo en cuenta el uso popular de té a partir de las raíces de esta planta y partes aéreas, se probaron los efectos hipotensivos y vasorrelajantes del extracto etanólico. El efecto hipotensor podría atribuirse a su acción vasorrelajante, ya que produjo un efecto relajante dependiente de la concentración en la arteria mesentérica privada de endotelio aislado de rata precontraída con norepinefrina o calcio⁽¹⁷⁾.

La actividad antibiótica de diferentes extractos de la planta se informa con frecuencia^(16, 18-21). En general, se observó cierta actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral. El compuesto aislado con actividad antimicrobiana es la jatrofenona, diterpeno macrocíclico, que presentó un

importante efecto antibacteriano *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*⁽²²⁾. En la tabla 2 se muestran varios estudios microbiológicos que se le han realizado a la planta de acuerdo al extracto de planta, técnica empleada y tipo de microorganismo evaluado.

Tabla 2. Estudios microbiológicos realizados a la *Jatropha gossypifolia* L.

Parte de la planta	Extracto evaluado	Tipo de estudio	Microorganismo evaluado	Respuesta	Referencia
Raíces	Acuoso y etanólico		<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	El extracto etanólico es un potente inhibidor del crecimiento de los organismos gram +.	(16)
Latex, Hojas	Acetona, Metanólico, Acuoso	Dilución en agar	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>K. aero-genes</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Sh. Boydii</i> , <i>A. fu-migatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i>	MIC= 60µg MIC= 1200µg	(18)
Hojas	Metanólico	Difusión en agar	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>S. aureus</i> .	Se mostró actividad antibacteriana significativa	(19)

Tallo, hojas y raíces	Acuoso y etanólico	Difusión en disco	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas fragi</i>	Los extractos acuosos y de etanol se encontraron activos tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Los extractos de hojas se encontraron más efectivos contra <i>S. aureus</i> . Por otro lado, también el extracto de etanol del tallo y la raíz inhibió el crecimiento de <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>P. fragi</i> , respectivamente, a un nivel alto.	(20)
Hojas, semilla y corteza del tallo	Metanólico	Difusión en disco de agar	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> .	Los extractos mostraron una actividad antibacteriana significativa.	(21)

Muchos usos populares importantes de esta planta están relacionados con el proceso inflamatorio. Se demostró que el extracto metanólico de hojas de esta especie tiene actividad antiinflamatoria aguda y crónica sistémica significativa.

La pasta de las hojas mostró una reducción significativa en los cambios inflamatorios locales inducidos por TPA en el modelo de edema de oreja de ratón^(23, 24).

La actividad analgésica del extracto de las hojas en metanol se evaluó en la prueba de retorcimiento inducida por ácido acético en ratones, donde se observó una inhibición altamente significativa a dosis orales⁽²⁵⁾. En el 2016 en el Departamento de Farmacia se evaluó dicha actividad desarrollando dos métodos *in vivo*: Placa Caliente y contorsiones inducidas por ácido acético en ratones. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. fue administrado por vía intraperitoneal y oral respectivamente a concentraciones de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300mg/kg permitiendo corroborar experimentalmente la actividad analgésica de dicho extracto⁽²⁶⁾.

El uso de esta planta, especialmente el látex, está muy extendido como agente hemostático para prevenir los trastornos hemorrágicos. Los estudios sugieren actividad procoagulante. En cuanto al posible mecanismo de acción, los autores sugieren que el látex precipita los factores de coagulación poniendo en contacto a los factores de coagulación, y luego la activación de la cascada de coagulación conduce a la generación de trombina y se produce la formación de un coágulo en cuestión de segundos en comparación con el control, que tardó minutos en completar la coagulación⁽²⁷⁾.

A partir del alto contenido de fenoles, taninos y flavonoides en las hojas de la planta en estudio varios investigadores desarrollaron la evaluación de su actividad antioxidante. Se utilizaron los métodos de eliminación de radicales libres DPPH, tiocianato férrico y óxido nítrico para analizar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos acuoso, metanólico y en etil-acetato. Se le atribuyó la actividad a la presencia de los flavonoides⁽²⁸⁾. Otro estudio demostró que diferentes extractos de la planta completa (en éter de petróleo, cloroformo, etil acetato y n- butanol) tenían solo actividad antioxidante parcial en el ensayo DPPH y capacidad antioxidante total. Entre todos los extractos, el de etil acetato fue el más activo, lo que se relaciona con un mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con los demás extractos⁽²⁹⁾.

En base a su uso popular, la planta se evaluó por su actividad anticonceptiva, como una alternativa a los agentes anticonceptivos orales. El extracto de las hojas, por vía oral, alteró las principales hormonas implicadas en la regulación

del ciclo menstrual, lo que indica su efecto anticonceptivo en ratones⁽³⁰⁾. Al evaluar otros parámetros (actividades estrogénicas y abortiva temprana), se demostró una vez más el efecto anti-conceptivo del extracto⁽³¹⁾.

Con base en la aplicación etnofarmacológica de la planta como remedio tocolítico, se evaluaron los efectos del extracto etanólico y sus fracciones sobre la contracción del músculo liso uterino evocada por calcio. El extracto crudo y, en mayor medida, la fracción clorofórmica redujeron la respuesta contráctil evocada por calcio, así como la reducción de las contracciones máximas⁽³²⁾.

Una de las actividades farmacológicas más conocidas de esta planta es su acción antineoplásica, que se asocia frecuentemente con el contenido de lignoides y terpenoides. El extracto etanólico de las raíces, así como el diterpeno aislado jatrofona, exhibieron una actividad inhibidora significativa *in vitro* contra las células derivadas del carcinoma humano de la nasofaringe y la leucemia linfocítica P-388, e *in vivo* contra cuatro sistemas de tumores animales estándar, tales como el sarcoma 180, el carcinoma de pulmón de Lewis, la leucemia linfocítica P-388 y el carcinosarcoma intramuscular Walker 256⁽³³⁻³⁵⁾.

Otra actividad investigada se relaciona con su acción neurológica. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son ampliamente utilizados para tratar la enfermedad de Alzheimer basado en la hipótesis colinérgica. En el 2005 el látex de la *Jatropha gossypifolia* causó una reducción significativa de la actividad de la fosfatasa ácida/alcalina y de la actividad anti-acetilcolinesterasa en el tejido nervioso de los peces de agua dulce. La reducción de la actividad tanto de las fosfatasas como de las AChE fue dependiente del tiempo y de la dosis⁽³⁶⁾. En el año 2011 se realizó un estudio del extracto metanólico de las hojas donde presentó una importante actividad anticolinesterásica (IC₅₀ = 0.05 mg/ml)⁽³⁷⁾. En el ensayo cruzado de agujeros, el extracto en metanol a 200 y 400 mg/kg, por vía oral, mostró un efecto sedante significativo en ratones. En la prueba de placa perforada, el extracto mostró actividad ansiolítica altamente significativa a una dosis de 200 mg/kg, mientras que la misma actividad se observó a dosis de 400 mg/kg en la prueba de laberinto elevado⁽³⁸⁾.

La acción antidiarreica se evaluó a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg en ratones donde el extracto metanólico de las hojas produjo actividad antidiarreica altamente significativa, después de la diarrea inducida por aceite de ricino⁽²⁵⁾.

La acción inmunomoduladora se evaluó mediante el ensayo de proliferación de células de bazo de ratón *in vitro* y se comparó con el extracto de éter de petróleo de la planta entera. Los autores demostraron que tanto lignanos sintéticos como naturales podrían modular positivamente la inmunidad del huésped, ya que aumentaban significativamente la proliferación de células de bazo de ratón *in vitro*⁽³⁹⁾.

A pesar de que algunos estudios han demostrado el potencial hepatotóxico de esta planta, se realizó un estudio para analizar la posible acción hepatoprotectora de sus extractos en el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas. De hecho, los extractos de éter de petróleo, metanol y agua, de las partes aéreas de la planta, presentaron una acción hepatoprotectora significativa en este modelo⁽⁴⁰⁾.

En Cuba se han desarrollado pocas investigaciones relacionadas con la *Jatropha gossypifolia* L. que incluyen un estudio etnobotánico de la planta y su utilización en el tratamiento de afecciones circulatorias. En el 2008 otros investigadores plantean el uso de la decocción de la planta entera, contra las afecciones gastrointestinales y como anticatarral. En la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas se han desarrollado extractos hidroalcohólicos de las hojas de la especie *Jatropha gossypifolia* L. que crece en diferentes localidades de la región central del país, que han mostrado actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* mediante el método de Difusión en Agar, con una CIM de 2 mg/mL. Recientemente se demostró, mediante el mismo método su efectividad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁴¹⁾. Además, dichos investigadores demostraron su efecto antiinflamatorio agudo *in vivo*, por vía tópica, en edemas auriculares inducidos por 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol⁽⁴²⁾. Este extracto mostró actividad antioxidante por métodos *in vitro*, a través de los ensayos: actividad secuestradora de radicales libres (DPPH), capacidad antioxidante total, poder reductor y actividad quelante del ión ferroso⁽⁴³⁾. Por otra parte, con vistas al tratamiento del acné se formuló el extracto hidroalcohólico en forma de gel y crema cosmeceútica^(43, 44).

1.1.6 Estudios toxicológicos.

Las especies de *Jatropha* son notablemente conocidas por su potencial tóxico⁽⁴⁵⁾. Esta toxicidad está relacionada principalmente con el látex y las semillas. El látex

se libera de las partes aéreas de la planta por una lesión mecánica y es extremadamente cáustico e irritante para la piel y las membranas mucosas. Las semillas son ricas en toxalbuminas que causan aglutinación y hemólisis a los eritrocitos, así como daños a otros tipos de células y contienen un complejo de resina lipóide que puede causar dermatitis^(21, 45, 46). La sintomatología consiste, en general, en trastornos gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos, y diarrea). Además, el curso clínico puede traer complicaciones cardiovasculares, neurológicas y renales. Los casos de envenenamiento en humanos generalmente ocurren al comer frutas y semillas⁽⁴⁵⁾.

Algunos estudios toxicológicos han demostrado las propiedades tóxicas de la planta, mientras que otros muestran la ausencia de toxicidad. Sin embargo, es importante observar los modelos utilizados, las dosis administradas y los tipos de extractos empleados (disolvente y parte de la planta), entre otros aspectos, para llegar a las conclusiones adecuadas sobre la toxicidad^(47, 48).

Una evaluación toxicológica preclínica del extracto de etanol crudo de hojas mostró que presenta una toxicidad aguda oral relativamente baja en ratas Wistar⁽⁴⁹⁾. Se observaron ratas tratadas con dosis únicas de 1.2 g-5.0 g/kg por vía oral durante 14 días, y los signos más importantes de toxicidad fueron ptosis, reducción del peso corporal y parálisis de los miembros posteriores. Otras alteraciones significativas ocurrieron solo en machos tratados con dosis de 5.0 g/kg: aumento de creatinina, aspartato aminotransferasa, niveles séricos de sodio y potasio, reducción de urea y albúmina, leucopenia y pequeñas alteraciones en el color y consistencia de las vísceras. En la evaluación histopatológica, se observó cierta alteración en el hígado y el pulmón solo a 5,0 g/kg, lo que sugiere una toxicidad relativamente baja del extracto⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, en el estudio toxicológico crónico (trece semanas de tratamiento), este extracto mostró toxicidad crónica oral significativa en ratas⁽⁵⁰⁾. Los signos tóxicos más significativos indicaron una reducción de la actividad en el sistema nervioso central y trastornos digestivos. Otro estudio, por otra parte, que evaluó la toxicidad aguda por vía oral de los extractos acuoso y etanólico de las hojas, no mostró ningún signo de toxicidad en hasta 2 g/kg en ratas, lo que permitió a los autores concluir que este extracto podría considerarse seguro⁽²⁴⁾.

En la Universidad Central Martha Abreu de Las Villas se realizaron estudios toxicológicos al extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta. Se llevó a cabo

un estudio de toxicidad aguda dérmica que no muestra toxicidad dérmica a dosis inferiores a 500 mg/kg. En este estudio se aplicaron por vía tópica 4, 1.6 y 0.8 mL del extracto a ratas Sprague Dawley por 14 días. Los signos de toxicidad evaluados fueron modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, el sistema nervioso autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Se observó con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma⁽²⁶⁾.

Un segundo estudio de toxicidad realizado tuvo como objetivo evaluar la toxicidad por dosis repetida (28 días) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. en ratas Sprague Dawley. Se confeccionaron cinco grupos experimentales de 10 animales: el control, el centinela y a tres dosis de 300, 600 y 1200 mg/kg de peso corporal. Se realizaron observaciones clínicas diarias, determinaciones semanales del peso corporal, análisis hematológico y bioquímico a los 0, 7, 14, 21, 28 y 56 días (grupo centinela) durante los 28 días. Finalmente se sacrificaron los animales y se realizó la autopsia y estudio anatomopatológico macroscópico, se pesaron varios órganos internos y se dispusieron para estudio histológico. El ensayo concluyó con un 100% de supervivencia en todos los grupos experimentales. No se reportaron alteraciones en los signos clínicos evaluados, con comportamiento normal para la especie; con tendencia al aumento del peso corporal en todos los grupos. Las ligeras variaciones observadas en los indicadores hematológicos y bioquímicos carecen de significación biológica. Macroscópicamente no se encontraron lesiones en los órganos evaluados. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. a las dosis administradas durante 28 días, no evidencia efectos tóxicos en ratas de la línea Sprague Dawley⁽⁵¹⁾.

1.2 Actividad antimicrobiana.

Un antimicrobiano es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos⁽⁵²⁾.

1.2.1 Tipos de antimicrobianos.

- Según el modo de actuación.

Los antimicrobianos pueden ser esterilizantes, desinfectantes, antisépticos o quimioterápicos. Los agentes esterilizantes son sustancias o procedimientos físico-químicos que producen la muerte o inactivación total de todas las formas de vida microbiana. Entre los esterilizantes químicos se encuentran el glutaraldehído, el óxido de etileno, etc. Para la esterilización física se pueden usar el calor (seco o por vapor), la filtración y radiación ionizante⁽⁵³⁾.

Los desinfectantes se usan para eliminar microbios de materiales inertes, debido a los efectos tóxicos que suelen presentar sobre tejidos vivos. Al contrario que la esterilización, la desinfección no elimina la totalidad de microorganismos. Entre los desinfectantes habituales se cuentan el alcohol, los compuestos iodados y otros agentes líquidos⁽⁵³⁾.

Los antisépticos se aplican directamente a los tejidos vivos para impedir la proliferación de microbios. El peróxido de hidrógeno y el yodo son antisépticos. Se administran de forma externa, al contrario que los quimioterápicos, como los antibióticos⁽⁵³⁾.

- **Según el tipo de microbio.**

Algunos antimicrobianos tienen efectos solo sobre un tipo particular de microbio y se usan para tratar infecciones por organismos específicos. Entre estos se pueden distinguir los siguientes⁽⁵³⁾:

- Antibióticos.
- Antifúngicos o antimicóticos.
- Antiparasitarios, entre ellos los antihelmínticos.
- Antivirales.

1.3 Métodos in vitro para evaluar la actividad antimicrobiana.

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica⁽¹⁾.

La determinación de la sensibilidad antibiótica, no sólo implica realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. Los parámetros que determinan los resultados de sensibilidad o resistencia, cada vez más, involucran información proveniente de ambos lados: el paciente y el microorganismo⁽¹⁾.

Los métodos para el estudio de sensibilidad antibiótica se dividen en métodos cuantitativos y métodos cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar mediante la expresión de los resultados en µg/mL, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM)⁽¹⁾.

1.3.1 Métodos de difusión.

A. Método de difusión en disco de agar.

La prueba de difusión en disco de Agar, desarrollada en 1940⁽⁵⁴⁾, es el método oficial utilizado en muchos laboratorios clínicos de microbiología para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de rutina. Hoy en día, muchos estándares aceptados y aprobados son publicados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la prueba de bacterias y levaduras⁽⁵⁵⁾.

En este procedimiento bien conocido, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. Luego, se colocan discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de prueba a la concentración deseada, en la superficie del agar. Las placas Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba, y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de la inhibición. El antibiograma proporciona resultados cualitativos, clasificando las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes⁽⁵⁶⁾. Por lo tanto, es una herramienta de tipado basada en el fenotipo de resistencia de la cepa microbiana probada, sus resultados también guían a los médicos en la

selección apropiada de tratamientos empíricos iniciales, y antibióticos utilizados para pacientes individuales en situaciones particulares⁽⁵⁷⁾.

Sin embargo, dado que la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos. Además, el método de difusión en disco de agar no es apropiado para determinar la concentración inhibidora mínima (MIC), ya que es imposible cuantificar la cantidad del agente antimicrobiano difundido en el medio de agar. Sin embargo, se puede calcular una MIC aproximada para algunos microorganismos y antibióticos comparando las zonas de inhibición con algoritmos almacenados⁽⁵⁸⁾.

Este ensayo ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar cantidades enormes de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados. Además, varios estudios han demostrado el gran interés en pacientes que sufren de infección bacteriana de una antibioterapia basada en el antibiograma del agente causal⁽⁵⁹⁾. Este hecho se debe a la buena correlación entre los datos *in vitro* y la evolución *in vivo*⁽⁵⁷⁾. Las ventajas ya mencionadas han contribuido a su uso común para el cribado de extractos de plantas, aceites esenciales y otros fármacos⁽⁶⁰⁻⁶³⁾.

B. Método de gradiente antimicrobiano (E test)

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

Se utiliza para la determinación de MIC de antibióticos, antifúngicos y antimicobacterianos⁽⁶⁴⁾. El valor MIC se determina en la intersección de la tira y la elipse de inhibición del crecimiento. Es simple de implementar; por lo tanto, se usa de forma rutinaria para satisfacer las demandas de los médicos⁽⁶⁴⁾.

C. Otros métodos de difusión

Se utilizan otros métodos de difusión para seleccionar extractos, fracciones o sustancias puras por su potencia antimicrobiana o para investigar el

antagonismo entre microorganismos. Entre estos métodos, los más comunes son:

a) Método de difusión del pozo de Agar

El método de difusión de pozos de agar es ampliamente utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos^(64, 65). De forma similar al procedimiento utilizado en el método de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula extendiendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. A continuación, se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm con un taladro de corcho estéril o una punta, y se introduce en el pocillo un volumen (20-100 ml) del agente antimicrobiano o solución de extracto a la concentración deseada. Luego, las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de prueba. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada.

b) Método de difusión de tapón de agar

El método de difusión de tapón de agar a menudo se utiliza para resaltar el antagonismo entre microorganismos^(66, 67). El procedimiento es similar al utilizado en el método de difusión en disco. Implica hacer un cultivo de agar de la cepa de interés en su medio de cultivo apropiado mediante rayas estrechas sobre la superficie de la placa. Durante su crecimiento, las células microbianas secretan moléculas que se difunden en el medio de agar. Después de la incubación, un diagrama de agar o cilindro se corta asépticamente con un taladro de corcho estéril y se deposita en la superficie de agar de otra placa previamente inoculada por el microorganismo de prueba. Las sustancias se difunden desde el tapón al medio de agar. Entonces, la actividad antimicrobiana de las moléculas secretadas microbianas se detecta por la aparición de la zona de inhibición alrededor del tapón de agar.

c) Método de la raya cruzada

El método de la raya cruzada se usa para seleccionar rápidamente los microorganismos en busca de antagonismo⁽⁶⁸⁾. La cepa microbiana de interés se siembra por una sola raya en el centro de la placa de agar. Después de un período de incubación que depende de la tensión microbiana, la placa se siembra con los microorganismos probados por una sola raya perpendicular a la veta

central. Después de una incubación adicional, las interacciones antimicrobianas se analizan observando el tamaño de la zona de inhibición.

d) Método de comida envenenada

El método de comida envenenada se usa principalmente para evaluar el efecto antifúngico contra los mohos^(69, 70). El agente antifúngico o el extracto se incorpora en el agar fundido a una concentración final deseada y se mezcla bien. Luego, el medio se vierte en placas Petri. Después de la preincubación durante la noche, la inoculación puede realizarse mediante un disco de micelio que varía de 2 a 5 mm, que se deposita en el centro de la placa. Después de una incubación adicional en condiciones adecuadas para la cepa fúngica ensayada, se miden los diámetros de crecimiento fúngico en las placas de control y de muestra, y se estima el efecto antifúngico.

1.3.2 Cromatografía de capa delgada (TLC) –bioautografía.

En 1946, Goodall y Levi⁽⁵⁴⁾ combinaron el método de cromatografía en papel (PC) con bioautografía de contacto para detectar diferentes penicilinas para su determinación. A partir de entonces, Fischer y Lautner⁽⁷¹⁾ introdujeron la cromatografía en capa delgada (TLC) en el mismo campo. Esta técnica combina TLC con métodos de detección biológicos y químicos. Se han realizado varios trabajos sobre la selección de extractos orgánicos, principalmente extractos de plantas, para la actividad antibacteriana y antifúngica mediante TLC-bioautografía. Como se muestra a continuación, se han descrito tres técnicas bioautográficas: difusión en agar, bioautografía directa y ensayo de sobreexpresión en agar, para la investigación de compuestos antimicrobianos mediante este enfoque.

A. Difusión en agar

También conocido como método de contacto con agar, es el menos utilizado de las técnicas. Implica la transferencia por difusión del agente antimicrobiano del cromatograma (PC o TLC) a una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo probado. Después de algunos minutos u horas para permitir la difusión, se retira el cromatograma y se incuba la placa de agar. Las zonas de inhibición del crecimiento aparecen en los lugares donde los compuestos antimicrobianos entran en contacto con la capa de agar⁽⁷²⁾.

Bioautografía directa

La bioautografía directa es el método más aplicado entre estos tres métodos. La placa de TLC desarrollada se sumerge o se rocía con una suspensión microbiana. Luego, el bioautograma se incuba a 25 °C durante 48 h en condiciones húmedas⁽⁷³⁾. Para la visualización del crecimiento microbiano, las sales de tetrazolio se usan con frecuencia. Estas sales experimentan una conversión a formazano correspondiente, intensamente coloreado por las deshidrogenasas de las células vivas^(74, 75). El violeta p-Iodonitrotetrazolio es el reactivo de detección más adecuado^(72, 76). Estas sales se pulverizan sobre el bioautograma, que se vuelve a incubar a 25 °C durante 24 h⁽⁷⁷⁾ o a 37 °C durante 3-4 h⁽⁷⁸⁾. El caldo Mueller-Hinton suplementado con agar ha sido recomendado para proporcionar un fluido de nivel medio que permita una mejor adherencia a la placa de TLC y mantenga la humedad adecuada para el crecimiento bacteriano⁽⁷⁹⁾.

La bioautografía directa se puede utilizar con hongos o bacterias. Es la técnica más sencilla para la detección de sustancias antifúngicas y también proporciona resultados consistentes para hongos productores de esporas como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*^(80, 81). Para las bacterias, las cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se utilizan con frecuencia para identificar compuestos antibacterianos⁽⁸²⁾.

B. Bioensayo de superposición en agar.

También conocida como bioautografía de inmersión, es un híbrido de los dos métodos anteriores. La placa de TLC se cubre con un medio de agar sembrado fundido. Con el fin de permitir una buena difusión de los compuestos probados en el medio de agar, las placas se pueden colocar a baja temperatura durante unas horas antes de la incubación. Después de la incubación en condiciones adecuadas que dependen del microorganismo de prueba, la tinción se puede hacer con colorante de tetrazolio. Al igual que la bioautografía directa, este método se puede aplicar a todos los microorganismos, como *Candida albicans*⁽⁸³⁾ y mohos⁽⁸⁴⁾. Proporciona zonas de inhibición del crecimiento bien definidas y no es sensible a la contaminación⁽⁷²⁾.

En general, la bioautografía TLC es una técnica simple, efectiva y económica para la separación de una mezcla compleja, y al mismo tiempo, localiza los constituyentes activos en la placa de TLC. Por lo tanto, puede realizarse tanto en laboratorios sofisticados como en pequeños laboratorios que solo tienen

acceso a un mínimo de equipos⁽⁷²⁾. A pesar de tener un sofisticado bioensayo de cromatografía líquida en línea de alto rendimiento, que se está volviendo cada vez más popular como el método de elección para una limpieza final de fracciones extractivas para obtener compuestos puros, la bioautografía TLC ofrece una técnica rápida para la detección de un gran número de muestras para bioactividad y en el fraccionamiento guiado por bioactividad⁽⁷³⁾. Se puede usar para la detección de antimicrobianos en muestras ambientales y de alimentos, así como para buscar nuevos fármacos antimicrobianos.

1.3.3 Métodos de dilución.

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

A. Método de dilución en caldo

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

La CIM es la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento del organismo en los tubos o los pocillos de microdilución detectados a simple vista⁽⁸⁵⁾. A diferencia del método de microdilución, las principales desventajas del método de macrodilución son la tediosa tarea manual, el riesgo de errores en la preparación de soluciones antimicrobianas para cada prueba y la cantidad comparativamente grande de reactivos y espacio requerido⁽⁵⁶⁾. Por lo tanto, la reproducibilidad, la economía de los reactivos y el

espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba son las principales ventajas del método de microdilución. Sin embargo, el resultado final está significativamente influenciado por el enfoque, que debe controlarse cuidadosamente si se quieren obtener resultados reproducibles (intralaboratorio e interlaboratorio)⁽⁵⁶⁾. Para la determinación del punto final MIC, los dispositivos de visualización pueden facilitar la lectura de pruebas de microdilución y el registro de resultados con una alta capacidad para discernir el crecimiento en los pocillos. Además, se han desarrollado varios métodos colorimétricos basados en el uso de reactivos colorantes.

La determinación de concentración bactericida mínima (MBC) o concentración fungicida mínima (MFC), también conocida como la concentración letal mínima (MLC), es la estimación más común de la actividad bactericida o fungicida. El MBC se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano necesaria para matar el 99.9% del inóculo final después de la incubación durante 24 h bajo un conjunto estandarizado de condiciones, en el que el MBC puede determinarse después de macrodilución en caldo o microdilución subcultivando una muestra de pozos o tubos, produciendo un crecimiento microbiano negativo después de la incubación en la superficie de placas de agar no selectivas para determinar el número de células supervivientes (UFC / ml) después de 24 h de incubación⁽⁵⁴⁾.

B. Método de dilución en agar

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

Esta técnica es adecuada para las pruebas de sensibilidad antibacteriana y antifúngica. Si se prueban múltiples aislados contra un solo compuesto, o si el compuesto (o extracto) probado enmascara la detección del crecimiento microbiano en el medio líquido con su coloración, a menudo se prefiere el método de dilución de agar a la dilución de caldo para la determinación de MIC. Hoy en día, los replicadores de inóculo producidos comercialmente están disponibles y

pueden transferir entre 32 y 60 inóculos bacterianos diferentes a cada placa de agar. La dilución de agar a menudo se recomienda como un método estandarizado para organismos exigentes tales como anaerobios y especies de *Helicobacter*. También se ha usado para combinaciones de fármacos antimicóticos contra *Candida sp.*, *Aspergillus*, *Fusarium* y dermatofitos⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Además, las comparaciones de categorías de los métodos de dilución en agar, difusión en disco y microdilución en caldo dan excelentes resultados⁽⁸⁹⁾.

1.3.4 Prueba de tiempo muerto (curva de tiempo muerto).

La prueba de tiempo muerto es el método más apropiado para determinar el efecto bactericida o fungicida. Es una herramienta sólida para obtener información sobre la interacción dinámica entre el agente antimicrobiano y la cepa microbiana. La prueba de tiempo-muerte revela un efecto antimicrobiano dependiente del tiempo o dependiente de la concentración⁽⁹⁰⁾.

Se realiza en medio de cultivo en caldo utilizando tres tubos que contienen una suspensión bacteriana de 5×10^5 UFC/ml. El primero y el segundo tubo contienen la molécula o el extracto probado, generalmente en concentraciones finales de 0.25xMIC y 1xMIC, y el tercero se considera como control del crecimiento. La incubación se realiza en condiciones adecuadas para intervalos de tiempo variados (0, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h)^(61, 90). Luego, el porcentaje de células muertas se calcula con relación al control del crecimiento determinando el número de células vivas (UFC/ml) de cada tubo usando el método de conteo de placa de agar. Generalmente, el efecto bactericida se obtiene con un porcentaje de letalidad del 90% durante 6 h, que es equivalente al 99,9% de la letalidad durante 24 h. Además, este método se puede usar para determinar la sinergia o el antagonismo entre fármacos (dos o más) en combinaciones^(90, 91).

1.3.5 Ensayo de bioluminiscencia ATP.

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

convertirse en RLU / mol de ATP. Por lo tanto, existe una relación lineal entre la viabilidad celular y la luminiscencia medida⁽⁹²⁾.

El ensayo de bioluminiscencia tiene una amplia gama de aplicaciones, como la prueba de citotoxicidad, la evaluación *in situ* del impacto de los biofilms *in situ*⁽⁹³⁾, y detección de drogas en *Leishmania*⁽⁹⁴⁾. Además, ha sido utilizado por varios autores para pruebas antibacterianas⁽⁹⁵⁾, pruebas antimicobacterianas^(96, 97), antimicótico contra levadura⁽⁹⁸⁾ y mohos⁽⁹⁹⁾. La rapidez es la principal ventaja de esta técnica que proporciona resultados cuantitativos. De hecho, se ha demostrado que esta técnica puede proporcionar resultados en un período de tres a cinco días para las pruebas antimicobacterianas, en comparación con la técnica de dilución convencional, que requiere de tres a cuatro semanas de incubación^(96, 97). El ensayo de bioluminiscencia también tiene la ventaja de ser utilizado para pruebas antimicrobianas *in vivo* o *in situ*⁽¹⁰⁰⁾.

1.3.6 Método citofluorométrico de flujo.

La detección rápida de células dañadas por este enfoque depende del uso de colorantes apropiados^(101, 102). Por lo tanto, el yoduro de propidio (PI), un agente fluorescente e intercalante, se usa ampliamente como tinción de ADN⁽¹⁰¹⁾. Se informaron varios estudios sobre la efectividad del citómetro de flujo como herramienta para el análisis antibacteriano de aceites esenciales contra *Listeria monocytogenes*, utilizando tinción combinada con PI para la evaluación del daño en la membrana y diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) para la detección de la actividad esterasa⁽¹⁰³⁾.

En consecuencia, además de las células lisadas, tres subpoblaciones (células muertas, viables y heridas) se pueden discriminar claramente por este método. Las células lesionadas se describen como células estresadas que muestran daños en los componentes celulares y deterioro posterior del crecimiento reproductivo⁽¹⁰⁴⁾. La cuantificación de las células lesionadas tiene un resultado interesante en la microbiología de los alimentos, ya que esta subpoblación puede ser crítica si la recuperación celular es posible, como en condiciones de abuso de temperatura durante el almacenamiento de alimentos⁽¹⁰³⁾. De hecho, el método de flujo citofluorométrico permite la detección de resistencia a los antimicrobianos y estima el impacto de la molécula probada sobre la viabilidad y el daño celular del microorganismo probado⁽¹⁰⁵⁾. Además, da resultados

reproducibles rápidamente (2-6 h en comparación con 24-72 h para el método de microdilución)⁽¹⁰¹⁾.

Materiales y Métodos



Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Tipo de estudio.

El presente estudio experimental se realizó en la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (UCLV), en el período comprendido entre noviembre del 2018 y junio del 2019. La evaluación fitoquímica y farmacognóstica en los laboratorios del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química–Farmacia. Las evaluaciones biológicas en los laboratorios del Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV.

2.2 Equipos, materiales y reactivos empleados.

- Molino de cuchillas (IKA WERKE MF-10 basic, Alemania)
- Estufa (Binder, Alemania)
- Balanza analítica digital (Sartorius TE-124S, Alemania)
- Balanza técnica digital (Sartorius BS-2202S, Alemania)
- Equipo de reflujo (MEDINGEN, Alemania)
- Baño de agua (Grant Sub14)
- Plancha de calentamiento (Stuart SD 300, Reino Unido)
- Manta de calentamiento (Electrothermal MX, Reino Unido)
- Rotoevaporador (IKA RV 10, España)
- Lámpara UV (CAMAG, España)
- Mufla (Nabertherm, Alemania)
- Micropipetas (100 - 1000 μ L, 20 – 200 μ L, EPPENDORF).
- Lector de fluorescencia (SUMA®, Habana, Cuba)
- Incubadora (Heraeus, Alemania)
- Autoclave (SELECTA)
- Cristalería de laboratorio.

Reactivos y otros productos

- Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)
- Ácido sulfúrico concentrado (UNI-CHEM)
- Agua destilada

- Alcohol amílico. (UNI-CHEM)
- Anhidrido acético (UNI-CHEM)
- Cinta de magnesio metálica (Analar)
- Cloroformo. (UNI-CHEM)
- Cloruro férrico (Analar)
- Etanol 70 % (UNI-CHEM)
- Hidróxido de sodio (UNI-CHEM)
- Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fehling A y B (UNI-CHEM)
- Reactivo de Kedde A y B. (UNI-CHEM)
- Solución de Ninhidrina 2%. (UNI-CHEM)
- Agar de Mueller – Hinton (BioCen)
- Caldo de Mueller – Hinton (BioCen)

2.3 Recolección e identificación.

La recolección del material vegetal se realizó en lotes bimensuales independientes (noviembre-diciembre, enero-febrero, marzo-abril, mayo-junio) en los primeros 5 días de cada mes, en horas tempranas de la mañana en áreas rurales del municipio de Encrucijada en la provincia de Villa Clara, entre los meses de noviembre del 2018 y junio del 2019. (Latitud: N 22° 35' 25.45" Longitud: O 79° 47' 4.658").

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

2.4 Secado y molinado.

Para el secado de las hojas, primeramente se lavaron con abundante agua potable, se extendieron sobre secadores de malla plástica y se mantuvieron a la sombra por 3 días. Luego se colocaron en una bandeja plástica y se sometieron a secado mediante calor artificial en una estufa a 35 °C, hasta masa constante.

Una vez seco, se redujo el tamaño de partícula del material vegetal mediante un molino de cuchillas, utilizando un tamiz de 3 mm. Posteriormente se envasó el material molinado en bolsas de nylon negro bien cerradas.

Hasta la realización de los estudios siguientes el material seco molinado y envasado se conservó en desecadora en un lugar fresco⁽⁴⁴⁾.

2.5 Prueba de control de la calidad de la droga cruda.

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

2.5.1.1 Contenido de humedad residual.

La determinación se realizó por el método gravimétrico según se especifica en la Norma Ramal de Salud Pública # 309⁽¹⁰⁶⁾.

Procedimiento: De la muestra de ensayo con el grado de trituración que determina la norma específica, se pesaron 1,0g con un error máximo de 0,5mg y se transfirió a una placa petri previamente tarada y se desecó a 105 °C durante tres horas. La placa petri se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, repitiendo esta operación hasta obtener un peso constante.

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

$$Hg = \frac{M2 - M1}{M} * 100$$

Donde:

Hg: Contenido de humedad (%).

M2: Masa de la placa petri con la muestra de ensayo (g).

M1: Masa de la placa petri con la muestra de ensayo desecada (g).

M: Masa de ensayo.

100: Factor matemático para los cálculos.

2.5.1.2 Cenizas totales.

Para la determinación de cenizas totales se procedió de la siguiente forma, según lo descrito en las Normas Ramales de Salud Pública para la determinación de drogas crudas 309/310⁽¹⁰⁶⁾.

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

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

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

Donde:

C_1 : Cenizas totales en base hidratadas.

M: Masa del crisol vacío (g).

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

M_2 : Masa del crisol con la ceniza (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

H: Porcentaje de humedad.

El ensayo se realizó por triplicado y se informó el porcentaje de cenizas totales como el promedio y la desviación estándar de los datos determinados. Para esto se empleó la hoja de cálculo Excel de Microsoft Office (2013).

2.6 Obtención y caracterización físico-química de los extractos hidroalcohólicos y acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

2.6.1 Obtención de los extractos.

Una vez que el material vegetal está seco y molinado se procedió a la obtención de los extractos. Se elaboraron cuatro extractos hidroalcohólicos (EHA) a partir del material vegetal seco y uno acuoso (EA), los cuales fueron sometidos a caracterización fitoquímica.

Para la obtención de los extractos hidroalcohólicos (EHA) se refluja 40 gramos (g) de la planta con una solución hidroalcohólica [30%:70%] por 2 horas (h),

posteriormente se filtra y se rotoevapora hasta eliminar el solvente. El diagrama de flujo se refleja en la (Figura 1).

El extracto acuoso (EA) fue preparado refluendo 40g del material vegetal seco y molido en agua destilada, relación 1:10, por 2 horas. Posteriormente se filtra y se rotoevapora hasta eliminar el solvente.

Este procedimiento se realizó para la muestra de ensayo solo con las hojas de la planta.

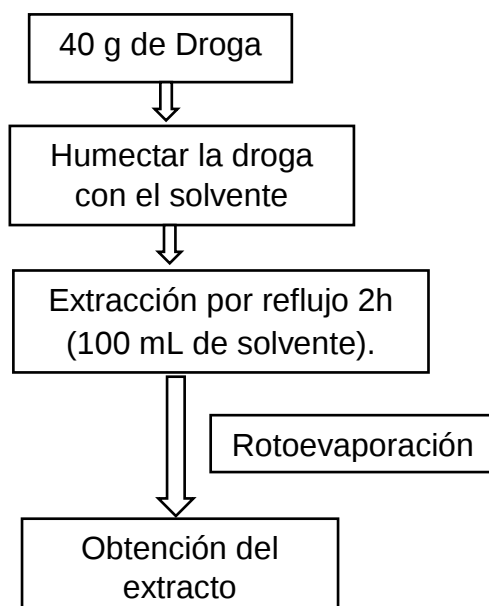


Figura 1: Metodología de extracción.

2.6.2 Características organolépticas de los extractos.

2.6.2.1 Determinación del olor.

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Luego se determinó el olor⁽¹⁰⁶⁾.

2.6.2.2 Determinación del color.

Una muestra del extracto se vació en un tubo de ensayo limpio y seco ocupando las tres cuartas partes de su capacidad. Se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas⁽¹⁰⁶⁾.

2.6.3 Pruebas de control de la calidad de los extractos.

2.6.3.1 Determinación del pH.

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada. Se introdujo directamente los electrodos del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura⁽¹⁰⁶⁾.

2.6.3.2 Determinación del índice de refracción.

Se colocó sobre el prisma de medición del refractómetro una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el instrumento seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas⁽¹⁰⁶⁾.

2.6.3.3 Determinación de la densidad relativa.

Se determinó la densidad relativa a las cinco muestras de ensayo con un densitómetro digital⁽¹⁰⁶⁾.

2.6.3.4 Determinación de sólidos totales.

Procedimiento: De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 1 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en baño de agua y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco; posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105 ± 2 °C durante tres horas. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante⁽¹⁰⁶⁾.

Expresión de los resultados: Los sólidos totales (St) se calcularon mediante la fórmula siguiente.

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

Donde:

P: Masa de la capsula vacía (g).

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

V: Volumen de ensayo (mL).

2.7 Evaluación fitoquímica de los extractos.

2.7.1 Tamizaje fitoquímico.

Para evaluar cualitativamente la posible composición química de los extractos de *Jatropha gossypifolia* Linn en cuanto a metabolitos secundarios, se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita por Miranda y Cuellar, 2012⁽¹⁰⁷⁾. (Tabla 3)

Tabla 3. Ensayos para identificación de metabolitos en el material vegetal.

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

Antocianidas	Antocianidas	X	
Mucílagos	Polisacáridos		X

Ensayos cualitativos del tamizaje fitoquímico⁽¹⁰⁷⁾.

Ensayo de Resinas

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de resinas.

Procedimiento: Se adicionaron a 2mL de la solución alcohólica del extracto, 10mL de agua destilada, se agitó y se dejó reposar.

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

Ensayo de Liebermann- Burchard

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides.

Reactivos: Anhídrido acético, ácido sulfúrico.

Procedimiento: Se evaporó el solvente del extracto en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1m de cloroformo. Se adicionó 1mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo se dejaron correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sin agitar.

Evidencia: Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

1. Rosado – azul muy rápido.
2. Verde intenso, visible aunque rápido.
3. Verde oscuro – negro, final de la racción.

Ensayo de Espuma

Fundamento: Permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénicas.

Procedimiento: Se tomó una alícuota de cada extracto (acuoso y etanólico), en el caso del etanólico se diluyó en 5 veces su volumen en agua. En ambos casos se agitó fuertemente durante 5-10min.

Evidencia: La aparición de una espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persistente por más de 2 min, indica una reacción positiva.

Ensayo de Ninhidrina

Fundamento: Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general.

Reactivos: Solución de ninhidrina al 2%.

Procedimiento: La alícuota del extracto en alcohol se mezcló con 2mL de la solución de ninhidrina al 2%. La mezcla se calentó durante 10 minutos en baño de agua.

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

Ensayo de Dragendorff

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides.

Reactivos: Reactivo de Dragendorff.

Procedimiento: En el extracto alcohólico, se tomó una alícuota del extracto, se evaporó en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1mL de HCl (1%). En el extracto acuoso a la alícuota de ensayo se le añadió una gota de HCl concentrado, se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta acidez. A las soluciones acuosas ácidas, obtenidas anteriormente, se le añadieron 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

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

Ensayo de Baljet:

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas.

Reactivos: A. Solución de ácido pícrico. B. Solución de hidróxido de sodio.

Procedimiento: A la alícuota del extracto etanólico se le adicionó 1 mL del reactivo de Baljet.

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

Ensayo de Kedde

Fundamento: Permite reconocer la presencia de glicósidos cardiotónicos.

Reactivos: A y B partes iguales.

Procedimiento: Una alícuota del extracto en etanol se mezcló con 1mL del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 minutos, y se observan los cambios de coloración.

Evidencia: Un ensayo positivo es aquel en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas.

Ensayo de Felhing

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores.

Reactivos: Soluciones A y B mezcladas en iguales cantidades y justo en el momento de realizar el ensayo.

Procedimiento: El extracto alcohólico se evaporó en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1-2 mL de agua. A los extractos acuoso y alcohólico, tratado según se describió previamente, se les adicionaron 2 mL del reactivo (recién preparado) y se calentaron en baño de agua de 5-10 min.

Evidencia: Si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo, indica una reacción positiva.

Ensayo de cloruro férrico

Fundamento: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. En el extracto etanólico el ensayo determina tanto fenoles como taninos. En el extracto acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

Reactivos: Solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica.

Procedimiento: A una alícuota del extracto etanólico se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%, en solución salina fisiológica. A una alícuota del extracto acuoso se le añadió acetato de sodio, para neutralizar, y 3 gotas de la solución reactiva.

Evidencia: Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de Börntrager

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas.

Reactivos: NaOH al 5% en agua.

Procedimiento: Los extractos se evaporaron en baño de agua y el residuo obtenido en cada caso se redisolvió en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1mL de NaOH, al 5% en agua. Se agitó, mezclando las fases, y se dejó en reposo hasta su ulterior separación.

Evidencia: Una reacción positiva se evidencia si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo (+), coloración rosada (++) y coloración roja (+++).

Ensayo de Shinoda

Fundamento: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal.

Reactivos: Ácido clorhídrico concentrado. Cinta de magnesio metálico.

Procedimiento: A un mililitro de los extractos disuelto en etanol, se les adicionó un pedacito de cinta de magnesio metálica. Se les añadió 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado gota a gota. Después de la reacción se esperaron 5 minutos hasta la aparición del color. Al no observarse bien los colores se añadieron 2mL de agua y se agitó la mezcla con 1mL de alcohol amílico y se observan los colores en esta fase. Con el extracto acuoso se procedió de igual forma hasta la adición del ácido clorhídrico concentrado y se añadió 1mL de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que las mismas se separaron.

Evidencia: El ensayo se consideró positivo cuando apareció una coloración o el alcohol amílico se coloreó de diferentes colores, intensos en todos los casos.

Flavonas	Amarillo, Naranja a rojo
Flavonoles y Flavononoles	Amarillo - carmín
Flavononas	Carmín - magenta

Ensayo Sudán III

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos.

Reactivos: Solución del colorante Sudán III.

Procedimiento: A la alícuota del extracto se le añadió 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudán III. Se calentó en baño de agua hasta evaporación del solvente.

Evidencia: Se consideró positivo al aparecer gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos.

Ensayo de antocianidas

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de antocianidas.

Procedimiento: Se calientan 2ml del extracto alcohólico durante 10 min con 1ml de HCl concentrado, se deja enfriar y se adiciona 1ml de agua y 2ml de alcohol amílico, se agitan y se dejan separar las dos fases.

Evidencia: Se consideró positivo al aparecer un color rojo a marrón en la fase amílica.

Ensayo de Mucílagos

Fundamento: Permite reconocer en un extracto la presencia de polisacáridos.

Procedimiento: Una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5°C durante 15 minutos.

Evidencia: Se consideró positivo si la solución tomaba una consistencia gelatinosa.

2.8 Determinación del índice de polifenoles totales (IPT).

Se diluyó 1 mL de los extractos obtenidos en 50 mL de agua destilada. Se realizó la lectura de la absorbancia a 280 nm utilizando el espectrofotómetro (marca Thermo SCINTIFIC, modelo G10S UV-VIS, de procedencia china), como blanco se empleó agua destilada. En el cálculo del índice se aplica la siguiente ecuación⁽¹⁰⁸⁾:

$$\text{IPT} = A_{280} \times 50$$

2.8.1 Cuantificación del contenido de Fenoles totales y Flavonoides.

2.8.1.1 Determinación del contenido de Fenoles totales.

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. se determinó empleando la reacción de *Folin-Ciocalteu*, según el método de Pekal (2014) con algunas variaciones, utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia⁽¹⁰⁹⁾.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

Solución madre de ácido gálico: Se pesó 10 mg del mismo y se disolvió en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 1 mg/mL.

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de ácido gálico las siguientes alícuotas: 68, 136, 272, 408, 544 μL . De cada una de ellas se tomaron 0.5 ml y se adicionó a continuación 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 0.3 ml de etanol y 1.1 ml de agua destilada y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1 ml de Na_2CO_3 7% y 0.4 ml de agua destilada. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos en la oscuridad se midió la

absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro marca Ray Leigh, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

Preparación de las muestras de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L.:

Extracto acuoso: a 500 µL del extracto acuoso se le añadieron 0,3 mL de etanol, 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,75 mL de agua. Se encubó durante 5 minutos y posteriormente se le añadió 0,4 mL de agua y 1 mL de Na₂CO₃ 7%. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento, pero sin la muestra.

Extractos hidroalcohólicos: a (50 µL (EHA noviembre-diciembre), 100 µL (EHA enero-febrero), 100 µL (EHA marzo-abril) y 100 µL (EHA mayo-junio)) de los extractos hidroalcohólicos (a concentración de 1 mg/mL) se le añadieron 0,275 mL de etanol, 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,6 mL de agua. Se encubó durante 5 minutos y posteriormente se le añadió 0,4 mL de agua y 1 mL de Na₂CO₃ 7%. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento, pero sin la muestra.

La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del ácido gálico y se expresó como miligramos de contenido fenólico equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES).

2.8.1.2 Determinación del contenido de Flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se estimó según la metodología descrita en la literatura⁽¹¹⁰⁾. A 1 mL de extracto se le adicionó 0.5 mL de AlCl₃ (2%) y 0.5 mL de H₂O. La mezcla reactiva se agitó e incubó 10 min, leyéndose la absorbancia a 420 nm contra un blanco de AlCl₃ en mezcla hidroalcohólica. Los extractos se prepararon a 500 µg/mL. La quercetina se preparó en etanol⁽¹¹⁰⁾.

2.9 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L.

2.9.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar:

2.9.1.1 Microorganismos de ensayo.

Los microorganismos utilizados para el estudio fueron las cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y

Escherichia coli ATCC 25922; además de dos cepas aisladas de casos clínicos de forúnculos y secreciones de heridas en el caso del *Staphylococcus aureus*, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y una de *Escherichia coli*, obtenidas del Laboratorio Provincial de Microbiología de Santa Clara, Villa Clara.

2.9.1.2 Medios de cultivos.

Se preparó el caldo de Müeller-Hinton para hacer el pase de las cepas y Agar Müeller-Hinton para evaluar la sensibilidad de los microorganismos ante los extractos evaluados.

Caldo de Müeller-Hinton:

Se pesó 5,25 gramos del caldo en balanza analítica, se pasó a un matraz con 250 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 las cepas y se incubaron a 37°C por 24 h.

Agar Müeller-Hinton:

Se pesó 19 gramos del Agar en balanza analítica, se pasó a un matraz, completándolo con 500 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 minutos 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 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.

2.9.1.3 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 las cepas a evaluar 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 5×10^8 UFC mL⁻¹.

2.9.1.4 Preparación de las placas para la prueba de sensibilidad.

Se inocularon las 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.

2.9.1.5 Procedimiento.

Mediante el método de los pozos (M02-A10, CLSI, 2010), se hicieron 3 pozos en las placas para añadir 100 microlitros (μL) del extracto hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L. Las placas se incubaron a 37 °C y se procedió a la lectura a las 24h, 48h y 72h^(55, 111, 112).

2.10 Análisis estadístico.

Para los datos obtenidos en los índices numéricos de humedad residual, cenizas totales, índices de polifenoles totales, cuantificación de fenoles y flavonoides luego de registrados se confecciona una base de datos para la técnica empleada. En los análisis se utilizó el paquete de programas estadísticos IBM SPSS Statistics, para Windows versión 23 del 2015. Para el análisis de los grupos de la droga cruda, teniendo en cuenta las variables humedad y cenizas totales se realizó un análisis de varianza no paramétrico con el test de Kruskal Wallis, y el test de Mann Whitney para el análisis de las diferencias entre los grupos. En el caso de las variables polifenoles, fenoles y flavonoides para comparar los grupos de los extractos, se realizó un análisis de varianzas paramétrico, es decir un One Way ANOVA, y para comparar las parejas de grupos, se utilizaron los intervalos LSD de Fisher. En todos los casos se empleó un nivel de confianza del 95%

Resultados y discusión



Capítulo III. Resultados y Discusión.

3.1 Obtención del material vegetal.

La recolección se realizó en horas tempranas de la mañana, y de forma manual, como se recomienda para plantas. Se procuró tomar las hojas, y dejar ramas suficientes que garantizaran el normal desarrollo de la planta y un uso sostenible de este recurso.

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas, identificándose a través de herramientas taxonómicas por el MSc. Idelfonso Castañeda Noa, Profesor Auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, como *Jatropha gossypifolia* Linn (JG). Se comparó con la muestra correspondiente a la serie UCLV 1305 del Herbario ULV del citado Centro de Estudios, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la especie citada.

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

3.2 Secado y molinado.

El material vegetal, luego de secado y molinado, conservó las características organolépticas propias de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. (color verde intenso, olor característico a la planta). Posteriormente se almacenó en bolsas de polietileno en una desecadora protegida de la luz y la humedad, hasta el momento de su utilización.

Las características organolépticas del polvo se muestran en la Figura 2, observándose que el polvo seco presentó un color distintivo (verde oscuro) y un olor característico.



Figura 2: Droga seca y molinada.

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

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

Una vez secado el material vegetal se procedió a la determinación de los índices numéricos de cada una de las muestras obtenidas de la planta según las Normas Ramales 309⁽¹⁰⁶⁾.

3.3.1.1 Contenido de humedad residual.

Las drogas vegetales contienen todos los requerimientos esenciales para el crecimiento de hongos y bacterias. El exceso de agua se considera el principal responsable de su deterioro microbiológico, así como de la hidrólisis de algunos constituyentes de la droga. Las monografías de las farmacopeas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en aquellas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Una vez que toma lugar la infestación, el deterioro puede ser muy rápido, por lo que la determinación del contenido de humedad es de suma importancia⁽¹¹³⁾.

El valor medio de humedad para las drogas recolectadas en nuestro estudio se muestran en la tabla 4. Todos los valores se encuentran por debajo de 6.6466 % con una media de 6.2308 % lo que coincide con estudios anteriores de la planta y evidencia que la época del año no influye en el contenido de humedad⁽¹¹⁴⁾. Por lo tanto, dicha droga seca cumple con los límites permisibles (8-14%) y establecidos por Miranda y Cuéllar⁽¹⁰⁷⁾, lo que indica que las condiciones de secado fueron las adecuadas.

Tabla 4 Valores de humedad residual obtenidos para las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Droga	Humedad residual %(media $\pm$ DS, n=3)
Noviembre-Diciembre	6.6033 $\pm$ 0.43 a
Enero-Febrero	5.9100 $\pm$ 0.16 a
Marzo-Abril	5.7633 $\pm$ 0.34 a

Mayo-Junio	6.6466 ± 1.58 a
Media	6.2308 ± 0.45

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$.

El test de Kruskal Wallis arrojó como resultado que los grupos eran homogéneos en cuanto a su humedad, es decir las diferencias encontradas no fueron significativas, esto mismo se apreció con el test de Mann Whitney, el cual no arrojó diferencias entre las parejas de grupo. Por lo tanto podemos plantear que la recolección en distintas épocas del año no afectó el contenido de humedad.

3.3.1.2 Cenizas totales.

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

Se denomina ceniza fisiológica a aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de materia extraña, principalmente suelo y arena, que se adhieren a la superficie de la droga se denomina ceniza no fisiológica. El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga. Las cenizas totales usualmente consisten en carbonatos, fosfatos, silicatos y sílice. Este ensayo es de extrema importancia e indica el extenso cuidado tomado durante la preparación de la droga⁽¹¹³⁾.

Los valores de cenizas totales para las drogas recolectadas en nuestro estudio se muestran en la tabla 5. Todos se encuentran por debajo de 11.9646 % con una media de 10.1351 % lo que coincide con estudios anteriores de la planta⁽¹¹⁴⁾. Sin embargo, existe variación de los valores dependiendo de la época de recolección siendo inferiores durante los meses de enero a abril. En general, los valores de cenizas totales del material vegetal en estudio en diferentes épocas del año cumplen con lo establecido por la USP # 28, cuyo límite es de 12 %.

El test de Kruskal Wallis arrojó como resultado que existen diferencias significativas (con significación $p < 0.05$) en cuanto a las cenizas totales, al igual que a través del test de Mann Whitney. Por lo tanto, podemos plantear que la recolección en distintas épocas del año influyó en los valores de cenizas totales lo que puede estar influenciado por variaciones en el contenido inorgánico del suelo.

Tabla 5. Valores de cenizas totales obtenidos para las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Droga	Cenizas totales %(media $\pm$ DS, n=4)
Noviembre-Diciembre	11.9646 $\pm$ 1.94 a
Enero-Febrero	8.2948 $\pm$ 1.08 b
Marzo-Abril	8.5519 $\pm$ 4.64 bc
Mayo-Junio	11.7291 $\pm$ 1.16 ac
Media	10.1351 $\pm$ 1.98

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$.

En el caso del estudio se tuvo especial cuidado en la selección y tratamiento del material vegetal, lavando con agua potable y eliminando toda la materia extraña, por lo que se consideró que estos valores debió corresponderse con las cenizas fisiológicas de la especie. Existen referentes en la literatura⁽⁴⁾ de este parámetro para la especie vegetal en estudio que son similares (15,8 %). Otras especies de la familia como: *Alcaiypha fimbriata*, *Euphorbia hirta* y *Jatropha curcas* L. muestran valores similares (tabla 6). No obstante, se considera que deben calcularse las cenizas insolubles en ácido clorhídrico para establecer si las mismas están vinculadas al contenido de material inorgánico extraño y por lo tanto conocer si están presentes metales pesados⁽¹¹⁵⁾.

Tabla 6: Valor de cenizas para plantas de la familia *Euphorbiaceae*.

Planta	Cenizas totales (%)
<i>Alcaiypha fimbriata</i> ⁽¹¹⁶⁾	11,50 $\pm$ 0,32
<i>Euphorbia hirta</i> ⁽¹¹⁶⁾	18,66 $\pm$ 0,17

<i>Jatropha curcas</i> L. ⁽¹¹⁷⁾	7,40 ± 3,7
<i>Jatropha gossypifolia</i> L. ⁽⁴⁾	15,8 ± 0,57

3.4 Obtención y caracterización del extracto.

Al elaborar los extractos, se utilizan solventes que no son tóxicos y son más amigables con el medio ambiente. Además, es el tipo de extracto que se ha empleado en los estudios precedentes sobre las hojas de la especie, realizados en la región central de Cuba y que ha manifestado diferentes actividades farmacológicas^(42, 43). Se incluye por primera vez el extracto acuoso teniendo en cuenta el uso tradicional de la planta en forma de decocción e igualmente su empleo posterior en ensayos farmacológicos.

Los extractos se obtuvieron por reflujo durante 2 h a partir de 40 g del material vegetal seco y molinado en la mezcla hidroalcohólica citada (70%) y acuosa. Se procedió a su rotoevaporación dando lugar a extractos hidroalcohólicos de color verde oscuro intenso, característico de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas con una significativa extracción de pigmentos clorofílicos. En el caso del extracto acuoso igualmente se observa un color verde intenso.

Dichos extractos se caracterizaron a través de variables fisicoquímicas como: la determinación del pH, densidad e índice de refracción. Los resultados aparecen en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros químico-físicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Extractos	pH	Índice de refracción (media ± DS, n=3)	Densidad relativa	Sólidos totales (g/100mL) (media ± DS, n=3)
EHA (noviembre-diciembre)	7.08	1.3644 ± 0.002	0.9524	0.0489 ± 0.0005
EHA (enero-febrero)	7.00	1.3652 ± 0.0008	0.9238	0.0411 ± 0.00

EHA (marzo- abril)	7.05	1.3648 $\pm$ 0.0007	0.9225	0.0399 $\pm$ 0.0004
EHA (mayo- junio)	7.00	1.3646 $\pm$ 0.001	0.9210	0.0297 $\pm$ 0.0005
EA	6.59	1.3360 $\pm$ 0.00	1.0067	0.1913 $\pm$ 0.003
Media	6.944	1.3590 $\pm$ 0.01	0.9452	0.0701 $\pm$ 0.06

Los sólidos totales permiten tener elementos sobre la masa de metabolitos que el sistema de solventes empleado fue capaz de extraer del material vegetal. Aunque este parámetro no está normado para el EHA de la planta en estudio, es importante ensayarlo. El valor medio obtenido es de 0.0701 g/100mL. Los valores de cada uno de los extractos son similares a los obtenidos por Medina Albert en el 2018⁽⁴¹⁾. Se debe considerar que los extractos de la planta no están estandarizados, y que los valores obtenidos pueden estar influido por el estadio del desarrollo fenológico de la planta y por las condiciones edafoclimáticas del sitio de recolección.

3.5 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. ⁽¹¹⁸⁾.

3.5.1 Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales, pero es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir

la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes.

En la tabla 8 se hace referencia a los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en los extractos analizados. Se evidencia la presencia de un gran número de metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L. como fenoles y/o taninos, flavonoides, saponinas, azúcares reductores, alcaloides, coumarinas y quinonas.

Tabla 8: Tamizaje fitoquímico de los extractos analizados de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolito	Ensayo	EHA (noviembre -diciembre)	EHA (enero- febrero)	EHA (marzo- abril)	EHA (mayo -junio)	EA (enero - febrer o)
Resinas	Resinas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Saponinas	Espuma	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Alcaloides	Dragendorf	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Aminoácidos libres	Ninhidrina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Coumarinas	Baljet	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
Azúcares reductores	Fehling	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Quinonas	Borntrager	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

Resultados y Discusión

Compuestos grasos	Sudán	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman n-Burchard	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Antocianidas	Antocianidas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Polisacáridos	Mucílagos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Leyenda:

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

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

Al realizar el tamizaje fitoquímico, se detectó en los extractos hidroalcohólicos y acuoso la presencia de coumarinas a las que se les atribuyen propiedades antitumorales, antiarrítmicas, antiinflamatorias, antisépticas, analgésicas y contra la hipertensión, la osteoporosis y el VIH. Estas son usadas en tratamientos contra el asma y contra el linfodema⁽¹¹⁹⁾.

También se observó 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 antitumoral en el cuerpo⁽¹²⁰⁾.

También se detectó la presencia de flavonoides, de los cuales se han descrito efectos terapéuticos en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas,⁽¹²¹⁾ así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de

daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer^(122, 123).

Por otra parte, los fenoles, en la actualidad se utilizan para cauterizar en ciertos procedimientos como la matriceptomía por onicocriptosis⁽¹²⁴⁾. También se usan como: desinfectantes, preparación de resinas y polímeros, preparación del ácido pícrico, usado en la preparación de explosivos, síntesis de la aspirina y de otros medicamentos.

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 acción antihemorrágica 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⁽¹¹⁸⁾.

Las quinonas corresponden a anillos aromáticos con dos grupos cetona como sustituyentes. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza y son muy reactivas. Pueden presentarse en diferentes formas. Las quinonas libres son prácticamente insolubles en agua; las que se presentan en forma de glicósidos son solubles en agua y alcoholes. Así, debido a que la extracción a partir de las hojas de la especie se realizó con una mezcla alcohol/agua, las quinonas que se extraerían estarían, fundamentalmente, en su forma soluble en estos disolventes (Ejemplo: glicósidos). A pesar de que se han aislado, e incluso obtenido por síntesis, numerosos compuestos a partir de *Jatropha gossypifolia* L., con diferentes actividades farmacológicas, incluida la antimicrobiana, dentro de ellos no se reporta ninguna quinona.

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⁽⁶⁾.

Estos resultados se encontraron en correspondencia con los informes fitoquímicos de la planta, de la cual han sido aislados y caracterizados diferentes compuestos que aparecen referenciados en la tabla 1 de la revisión bibliográfica^(6, 16).

3.6 Determinación del índice polifenoles totales.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal con más de 8000 estructuras conocidas. Son principalmente productos derivados del metabolismo secundario de las plantas que se forman a partir de las rutas metabólicas de los fenilpropanoides y del ácido siquímico⁽¹⁾.

Se caracterizan por presentar uno o más núcleos aromáticos sustituidos, como mínimo con una función hidroxilo que les confiere la propiedad de donar átomos de hidrógeno. Esta cualidad, les permite actuar como antioxidantes y desempeñar importantes funciones fisiológicas en los vegetales⁽¹⁾.

Los compuestos fenólicos, se generan durante el desarrollo normal de la planta, pero el contenido en algunos de ellos puede incrementarse bajo condiciones de estrés como por ejemplo la radiación ultravioleta, infección por patógenos o parásitos, polución del aire y exposición a temperaturas extremas⁽¹⁾.

Estos compuestos fenólicos de la planta incluyen los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y los menos frecuentes estilbenos y lignanos. De ellos los más abundantes en nuestra dieta son los flavonoides y los taninos. La concentración de todos estos compuestos fenólicos en los vegetales, se pueden ver afectadas por factores tales como las diferentes técnicas de cultivo, condiciones de crecimiento, proceso de maduración, así como condiciones de procesamiento y almacenamiento. Es importante destacar, que la distribución de los compuestos fenólicos en las plantas a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme, las capas externas de las plantas contienen niveles más altos que las internas y en el interior de la célula estos compuestos se localizan principalmente en las vacuolas, aunque los polifenoles insolubles se acumulan en las paredes celulares⁽¹⁾.

En la tabla 9 se observan los valores obtenidos en la determinación del índice de polifenoles totales en cada uno de los extractos estudiados donde se observaron diferencias significativas (con significación $p < 0.05$).

Tabla 9. Valores del Índice de Polifenoles Totales obtenidos para los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Extractos	Índice de Polifenoles Totales
EHA (noviembre-diciembre)	47.85 ± 0.05 b
EHA (enero-febrero)	49.75 ± 0.12 a
EHA (marzo-abril)	47.35 ± 0.23 c
EHA (mayo-junio)	47.75 ± 0.10 b
EA	22.8 ± 0.16 d
Media	43.1 ± 11.39

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$.

3.7 Determinación del contenido de fenoles totales.

Los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. se muestran en la tabla 10, algunos resultados son superiores a los reportados en la bibliografía para otras especies de su misma familia (Euphorbiaceae) como por ejemplo: la *Euphorbia helioscopia* L. obtenidos por lixiviación utilizando metanol como solvente y menores si se compara con *Alchornea calophylla*, la *Acalypha diversifolia* y la *Euphorbia hirta* Linn. (Tabla 11). En dichos resultados se observa que existen diferencias significativas (con significación $p < 0.05$.)

Tabla 10. Valores del contenido de fenoles totales obtenidos para los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Extractos	Contenido de fenoles ($\mu\text{g EAG/mg ES}$)
EHA (noviembre-diciembre)	39.7148 ± 0.0001 d
EHA (enero-febrero)	53.8773 ± 0.0007 a
EHA (marzo-abril)	53.7359 ± 0.0005 b
EHA (mayo-junio)	44.7760 ± 0.0006 c

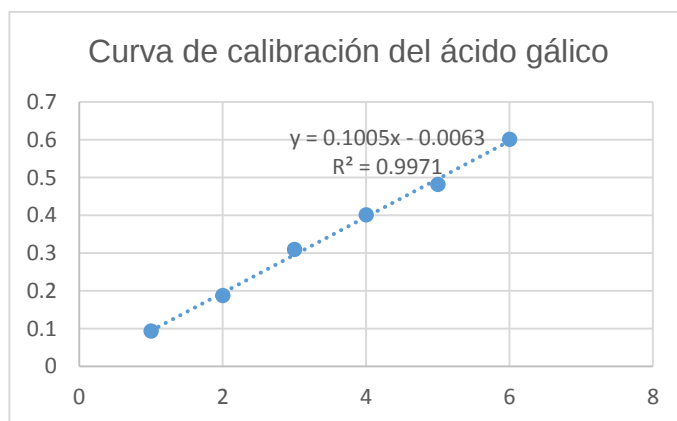
EA (enero-febrero)	9.2265 ± 0.0003 e
--------------------	-------------------

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$

Tabla 11. Contenido total de compuestos fenólicos para especies de la familia Euphorbiaceae^(125, 126).

Planta	Contenido de fenoles totales (μg EAG/mg ES)
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	51,49 ± 4,02
<i>Euphorbia hirta</i> Linn.	120,97 ± 7,07
<i>Alchornea calophylla</i>	314,0 ± 0,01
<i>Acalypha diversifolia</i>	424,0 ± 0,03

El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón, los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto seco (μg EAG/mg ES) (Figura 3).



3.8 Determinación de flavonoides totales.

Dentro de la composición química de la especie *Jatropha gossypifolia* Linn, los flavonoides constituyen uno de los metabolitos más importantes a los cuales se le atribuyen una gran diversidad de actividades farmacológicas como por ejemplo propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antitrombóticas y analgésicas⁽¹²⁷⁾.

Los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides totales de los extractos hidroalcohólicos de *Jatropha gossypifolia* L. son superiores a los

reportados en la bibliografía para otras especies de su misma familia (*Euphorbiaceae*) como por ejemplo: la *Euphorbia helioscopia* L. (Tabla 12)⁽¹²⁸⁾. Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de Quercetina por miligramos de extracto seco ($\mu\text{g EQ/mg ES}$). (Tabla 13).

Tabla 12: Contenido de flavonoides totales para la *Euphorbia helioscopia* L.

Planta	Contenido de flavonoides totales ($\mu\text{g EQ/mg ES}$)
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	11,38 $\pm$ 0.04

Tabla 13: Contenido de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* Linn.

Extractos	Contenido de flavonoides totales ($\mu\text{g EQ/mg ES}$)
EHA (noviembre-diciembre)	33.3143 $\pm$ 0.0003 d
EHA (enero-febrero)	41.8635 $\pm$ 0.0003 a
EHA (marzo-abril)	38.2194 $\pm$ 0.0002 c
EHA (mayo-junio)	39.1315 $\pm$ 0.0003 b
EA (enero-febrero)	3.3219 $\pm$ 0.0002 e

*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig. $p < 0.05$

Estos valores permiten reafirmar la presencia de los flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* Linn comprobando los resultados obtenidos cualitativamente a través del tamizaje fitoquímico donde la presencia de ellos resultó ser acentuada.

El contenido total de flavonoides fue calculado empleando la curva de calibración de la quercetina como patrón, los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de quercetina por miligramos de extracto seco ($\mu\text{g EAG/mg ES}$) (Figura 4).

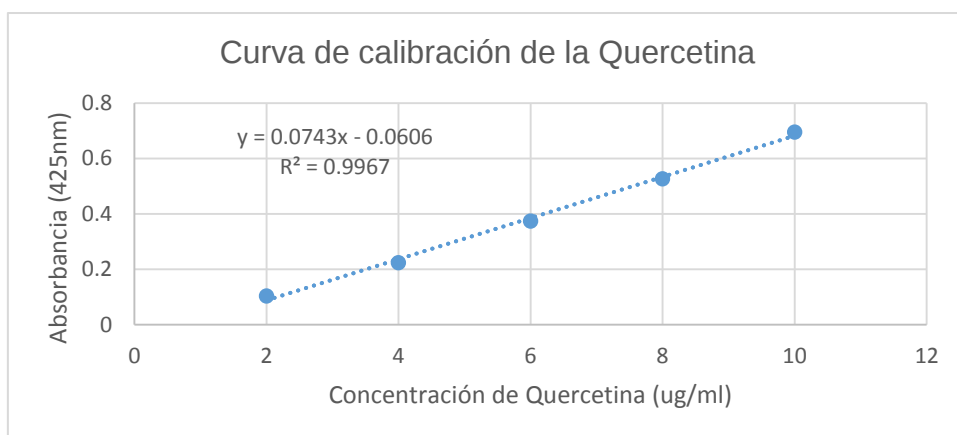


Figura 4. Curva de calibración de la Quercetina.

La *Jatropha gossypifolia* L. presenta varios flavonoides en sus hojas que ya han sido aislados con anterioridad. Entre ellos están: la apigenina que fue extraída utilizando como solvente el etanol, el 2,3-bis-(hidroximetil)-6,7- metilenodioxi-1-(3'4'-dimetoxifenil)- naftaleno, la gossipifana (Gossypifan) extraída con éter de petróleo y la isogadaína que fue extraída también con éter de petróleo. La apigenina es un flavonoide natural, del grupo de las flavonas y cuya formulación química es 4',5, 7-trihydroxyflavona. Las flavonas presentan acción antimicrobiana, aunque a concentraciones muy elevadas en comparación con los antibióticos^(129, 130). No obstante, se han encontrado que algunas flavanonas de cítricos presentan actividad frente al *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus typhosus*⁽¹²⁹⁾.

Este resultado es de gran importancia en el análisis de la actividad biológica de los productos naturales, dada la gran variedad de investigaciones que se han reportado relacionando la presencia de estos compuestos y una determinada propiedad farmacológica⁽¹³¹⁾.

3.10 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L.

3.10.1 Prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el Método Difusión en Agar.

Varios estudios informados en la literatura avalan la actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies del género *Jatropha*, y en particular de *Jatropha gossypifolia* L, tanto de toda la planta, como de diferentes partes de la misma^(2, 132). Los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L se

han mostrado activos frente a bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*)⁽²⁰⁾. Además, se describe el uso etnomedicinal de las hojas para el tratamiento de candidiasis oral y de micosis, y extractos de diferentes partes han mostrado actividad antifúngica⁽⁵⁾. No solo se ha descrito actividad antimicrobiana para extractos de la planta; un metabolito aislado de toda la planta *Jatropha gossypifolia* L, un diterpeno macrocíclico, Jatrofenona, se ha referido activo frente a *Staphylococcus aureus*, con una actividad comparable a la de la penicilina, empleada como referencia⁽¹³³⁾.

En nuestro país no se ha evaluado ampliamente el potencial antimicrobiano de la especie en estudio. Solo se ha estudiado la actividad del extracto hidroalcohólico y sus fracciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*^(41, 42, 44). Los resultados de los mismos son contradictorios. Por estas razones se decidió evaluar su efectividad frente a los mismos microorganismos e incluir el extracto acuoso por su amplia utilización por la población.

Dentro de los métodos usados para evaluar, *in vitro*, la susceptibilidad de bacterias ante diferentes agentes o extractos, se destaca el método de difusión en pozo, ya que presenta la ventaja de ser altamente reproducible y sensible⁽¹³⁴⁾ por lo que se seleccionó para el presente estudio.

Al aplicar el método de difusión en pozo con el extracto hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L. se observó el halo de inhibición a las 24 horas (h) para el caso del extracto hidroalcohólico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC y ambas cepas clínicas aisladas de forúnculos y de secreción de heridas; con un halo de inhibición de 15, 12 y 13 mm respectivamente. El extracto acuoso ni el control mostraron halo de inhibición. En el caso del control puede deberse a que en el proceso de extracción algún componente activa en las bacterias bombas de flujo que reconocen el etanol e impiden que penetre en las bacterias. Estos resultados se observan en la tabla 14 y las figuras 5, 6 y 7.

Tabla 14. Resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L.

Microorganismo	Extracto	Halo de inhibición (mm)
	Hidroalcohólico	15

Resultados y Discusión

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Acuoso	-
	Control	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica 1	Hidroalcohólico	12
	Acuoso	-
	Control	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica 2	Hidroalcohólico	13
	Acuoso	-
	Control	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Hidroalcohólico	-
	Acuoso	-
	Control	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cepa clínica	Hidroalcohólico	-
	Acuoso	-
	Control	5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Hidroalcohólico	-
	Acuoso	-
	Control	5
<i>Escherichia coli</i> Cepa clínica	Hidroalcohólico	-
	Acuoso	-
	Control	-

Ambos extractos no mostraron actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, que resultan bacterias Gram negativas las cuales muestran una mayor resistencia a los antibióticos y desinfectantes. El control negativo evaluado es el etanol con un halo de inhibición de 5 mm que no resulta significativo teniendo en cuenta el *plu* del disco de agar el cual fue de 6 mm. Estos resultados pueden estar dados por algún componente que se ha formado en el proceso de extracción y que induzca un cambio en la permeabilidad de la membrana, disminuyendo la entrada del extracto a la célula. Además el etanol puede mostrar actividad antimicrobiana *per se*.



Figura 5. Placas de *Staphylococcus aureus* ATCC actividad positiva del EHA y negativa del EA.



Figura 6. Placas de *Staphylococcus aureus* (cepa clínica 1) actividad positiva del EHA y negativa del EA.



Figura 7. Placas de *Staphylococcus aureus* (cepa clínica 2) actividad positiva del EHA y negativa del EA.

La literatura plantea 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 y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba.

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⁽⁴¹⁾. 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⁽⁴¹⁾.

Este resultado podría explicarse si los metabolitos que más contribuyen a la actividad antibacteriana fueran muy apolares, como Jatrofenona, diterpeno macrocíclico con potente actividad frente a *Staphylococcus aureus*, muy poco soluble en agua⁽²²⁾. En tal caso, como la mezcla de solventes empleada en la extracción del material vegetal, en el presente estudio, no es apolar, se extraerían en bajas cantidades; suficientes para mostrar actividad a partir del extracto hidroalcohólico y no así para el extracto acuoso.

Otro elemento que pudiera influir en los resultados es el tipo de método empleado en la evaluación de la actividad antimicrobiana. Los extractos hidroalcohólico y acuoso de *Jatropha gossypifolia* L. tienen entre sus constituyentes químicos compuestos polares y no polares. Estudios realizados recomiendan usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares⁽¹³⁴⁾.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que en el caso de las plantas medicinales, los mecanismos de acción son más complicados, debido a la variedad en su composición. Entre los metabolitos pueden aparecer interacciones de sinergismo y de antagonismo, que juegan un papel importante en la actividad biológica⁽¹³⁵⁾.

Mediante la misma técnica utilizada, otros investigadores en el 2008, demostraron que el extracto etanólico 70% de las hojas de *Polylepis australis* presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Esto evidencia que el etanol 70 % es un solvente eficaz para la extracción de productos antimicrobianos en concordancia con lo demostrado por otros autores⁽¹³⁶⁾. Muchos de los compuestos con actividad antibiótica identificados en las plantas son sustancias aromáticas o moléculas orgánicas

saturadas, para los cuales el etanol es un solvente ideal. Es relevante el hecho de que en la medicina indígena es una práctica común el uso de preparaciones con alcohol o aguardiente⁽¹³⁷⁾.

El extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. mostró actividad contra cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* que es uno de los microorganismos patógenos humanos más importantes y resulta muy común en infecciones nosocomiales muy difíciles de erradicar. Estos resultados confirman el potencial antibacteriano de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. que crece en la región central de nuestro país, especialmente frente a bacterias Gram positivas.

3.11 Correlación entre los compuestos fenólicos presentes en la planta y la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los polifenoles se ha atribuido en diversos estudios científicos a extractos de plantas, mezclas de extractos de plantas y a compuestos purificados a partir de las mismas. Algunos de estos compuestos son bien conocidos y pertenecen a la familia de los flavonoides, alcaloides, terpenos y taninos de numerosas fuentes naturales. De todas estas familias, está siendo cada vez más documentada la actividad antibacteriana de los flavonoides. Además, es interesante destacar que la materia prima seleccionada para realizar el estudio pertinente *in vitro* sobre la actividad antibacteriana, proceden de extractos de plantas con antecedentes de uso en la medicina popular⁽¹⁾.

Durante el estudio realizado con tinturas de las hojas de tamarindo, en la década de los años 90, Balbuena planteó que los flavonoides, producto de su estructura, podrían ser los responsables del efecto de inhibición de crecimiento bacteriano por la inducción de la ruptura de su ADN en un sitio determinado; por bloqueo del complejo aminoacil transferasa, por intercalación entre bases de ADN alterando la síntesis de ácido nucleico o por la formación de dímeros de timina⁽¹³⁸⁾.

También consideró que otros mecanismos provocados por los flavonoides pudieran propiciar resultados semejantes, alterando la composición de las membranas y el metabolismo celular por medio de inhibición de la fosforilación de proteínas o por la formación de complejos con proteínas solubles de la pared de las células bacterianas. Años después, Domingo D y López-Brea M.

plantearon que la actividad de las flavonas frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas, lo que refuerza el efecto observado y resulta concordante con alguna de las especulaciones realizadas en relación con el posible mecanismo de acción⁽¹³⁸⁾

Conclusiones



Conclusiones:

- Los principales metabolitos secundarios identificados en los extractos hidroalcohólico y acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. fueron: saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores y quinonas; los cuales estuvieron presentes en todas las épocas del año estudiadas.
- El contenido de polifenoles, fenoles y flavonoides totales varió en las diferentes épocas de recolección de la especie (noviembre-junio).
- De los extractos evaluados solo mostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* el extracto hidroalcohólico.

Recomendaciones



Recomendaciones:

- Continuar el estudio antimicrobiano del extracto acuoso y sus fracciones.
- Completar el estudio de la influencia de la época del año en los meses restantes (julio-octubre).

Referencias Bibliográficas



1. Tomás Menor L. Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género *Cistus* 2015.
2. Ruchi S, Renu S. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. Archives of Applied Science Research. 2010;2(5):285-91.
3. Mariz S, Borges A, Melo-Diniz M, Medeiros I. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. Rev Bras Plantas Med. 2010;12(3):346-57.
4. Khyade M, Vaikos N. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy. 2011;2(1):177-80.
5. Fatokun O, Liberty O, Esievo K, Okhale S, Kunle O. Phytochemistry, Ethnomedicine and Pharmacology of *Jatropha gossypifolia* L: A Review. Arch Cur Res Intern. 2016;5(3):1-21.
6. Félix-Silva J, Giordani RB, Silva-Jr AAd, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MdF. *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014;2014.
7. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica: Editora Unesp; 2002.
8. Aworinde D, Nwoye D, Jayeola A, Olagoke A, Ogundele A. Taxonomic significance of foliar epidermis in some members of euphorbiaceae family in Nigeria. Research journal of Botany. 2009;4(1):17-28.
9. Aboaba SA, Adebayo MA, Ogunwande IA, Olayiwola TO. Volatile constituents of *Jatropha gossypifolia* L. grown in Nigeria. American Journal of Essential oils and Natural products. 2015;2(4):08-11.
10. de Botânica S. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.(Euphorbiaceae). Acta Farm Bonaerense. 2005;24(1):5-13.
11. Lans C. Secondary metabolite compounds from *Jatropha* species. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2007;3(3):1-12.
12. Roig y Mesa JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica; 1974. p. 752-65.
13. Mollik MAH, Hossan MS, Paul AK, Taufiq-Ur-Rahman M, Jahan R, Rahmatullah M. A comparative analysis of medicinal plants used by folk medicinal healers in three districts of Bangladesh and inquiry as to mode of selection of medicinal plants. Ethnobotany Research and Applications. 2010;8:195-218.
14. Mahmud S, Mahmud S, Hasan MK, Rahman S, Kar A, Shathy EJ, et al. A survey on medicinal plants usage by folk medicinal practitioners in different villages of Jhenaigati Upazila, Sherpur district. Bangladesh, J Pharmacogn Phytochem. 2016;5(4):167-80.
15. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba (Tomo I): Nuevo Milenio; 2015.
16. A. L, A. M, JK. G, E. H. A Comparative review on the biological parameters of two species of *jatropha*. world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 2016;5(8):1664-75.
17. Abreu IC, Marinho AS, Paes AM, Freire SM, Olea RS, Borges MO, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. Fitoterapia. 2003;74(7-8):650-7.
18. Kapoor A, Kaur G, Kaur R. Antimicrobial activity of different herbal plants extracts: a review. World J Pharm Pharm Sci. 2015;4(7):422-59.
19. Rasheed S, Gutti VM, Karthikeyan R. Development and Comparative Antibacterial Evaluation of Tincture of *Jatropha gossypifolia* L. Leaves. Research in Pharmacy. 2013;3(4).
20. Sharma V, Kumawat TK, Seth R, Sharma A. Bioefficacy of Crude Extracts from *Jatropha Gossypifolia* against Human Pathogens. International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research. 2013;4(4):401-6.

21. Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM, Sahidin I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. *Phytochemistry*. 2013;85:7-29.
22. Ravindranath N, Venkataiah B, Ramesh C, Jayaprakash P, Das B. Jatrophene, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2003;51(7):870-1.
23. Bhagat R, Ambavade S, Misar A, Kulkarni D. Anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. leaves in albino mice and Wistar rat. 2011.
24. Nagaharika Y, Rasheed S. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*. 2013;2(2):156-8.
25. Apu AS, Ireen K, Bhuyan SH, Matin M, Hossain MF, Rizwan F. Anti-diarrheal Potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.). *J Med Sci*. 2012;12:274-9.
26. Mendoza Muñoz M. Evaluación farmacológica de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química ...; 2016.
27. Oduola T, Adeosun GO, Oduola TA, Awioro GO, Oyeniyi MA. Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent. 2005.
28. Kharat A, Dolui A, Das S. Free radical scavenging potential of *Jatropha gossypifolia*. *Asian Journal of Chemistry*. 2011;23(2):799.
29. Shahwar D, Ahmad N, Ullah S, Raza MA. Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(7):1086-96.
30. Jain S, Choudhary GP, Jain DK. Pharmacological evaluation of anti-fertility activity of ethanolic extract of *Jatropha gossypifolia* leaf in female albino mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(3):S1671-S4.
31. Jain S, Choudhary GP, Jain DK. Pharmacological evaluation and antifertility activity of *Jatropha gossypifolia* in rats. *BioMed research international*. 2013;2013.
32. de Andrade Paes AM, Camara AL, de Farias Freire SM, da Rocha Borges MO. Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. *International Journal of phytomedicine*. 2012;4:310-3.
33. Kupchan SM, Sigel CW, Matz M, Saenz Renauld JA, Haltiwanger RC, Bryan RF. Jatrophene, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(14):4476-7.
34. Taylor M, Smith A, Furst G, Gunasekara S, Bevelle C, Cordell G, et al. New anti-leukemic jatrophene derivatives from *Jatropha gossypifolia*-structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical society*. 1983;105(10):3177-83.
35. Falodun A, Kragl U, Touem S-MT, Villinger A, Fahrenwaldt T, Langer P. A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Natural product communications*. 2012;7(2):1934578X1200700204.
36. Singh D, Singh A. The toxicity of four native Indian plants: effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. *Chemosphere*. 2005;60(1):135-40.
37. Feitosa C, Freitas R, Luz N, Bezerra M, Trevisan MTS. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology*. 2011;71(3):783-9.
38. Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M, Jamaluddin A. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2012;4(1):20.
39. Deo S, Chaudhari T, Inam F. Evaluation of the immunomodulatory effects of 1-phenylnaphthalene and pericarbonyl lactone lignan compounds. *Der Pharma Chemica*. 2012;4(2):771-6.

40. Panda BB, Gaur K, Nema R, Sharma C, Jain AK, Jain C. Hepatoprotective activity of *Jatropha gossypifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Asian Journal of pharmaceutical and clinical research*. 2009;2(1):50-4.
41. Medina Albert JE, González Bedia MM. Potencial antileishmaniásico y antimicrobiano de las hojas de la especie *Jatropha gossypifolia* L.: Universidad central "Martha abreu" de las villas; 2018.
42. Rivero González BD. Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L: Universidad Central" Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
43. Pérez Blanco DB, González Bedia MM, Hernández Barreto E. Formulación de un gel cosmecéutico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.: Universidad central "Martha Abreu" de las villas; 2016.
44. Coba Sánchez ME. Formulación de una crema antiacné a partir de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química ...; 2017.
45. Devappa RK, Makkar HP, Becker K. *Jatropha* toxicity—a review. *Journal of toxicology and environmental health, Part B*. 2010;13(6):476-507.
46. De Albuquerque UP, De Medeiros PM, De Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMdFL, de Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;114(3):325-54.
47. Purushothaman KK, Chandrasekharan S, Cameron AF, Connolly JD, Labbé C, Maltz A, et al. Jatropholones A and B, new diterpenoids from the roots of *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae)—crystal structure analysis of jatropholone B. *Tetrahedron Letters*. 1979;20(11):979-80.
48. Medubi L, Ukwenya V, Aderinto O, Makanjuola V, Ojo O, Bamidele O, et al. Effects of administration of ethanolic root extract of *Jatropha gossypifolia* and prednisolone on the kidneys of Wistar rats. *Electronic Journal of Biomedicine*. 2010;2:41-8.
49. Mariz SR, Araújo MS, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, Diniz MF, et al. Histopathological evaluation in rats after acute treatment with the ethanol extract from aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(2):213-6.
50. Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo WC, Dantas JG, Ramalho JA, Palomaro TV, et al. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22(3):663-8.
51. Noa Mentado D, López Sacerio A. Evaluación de la toxicidad por dosis repetida del extracto acuoso de las hojas de *Jatropha gossypifolia* Linn.: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas; 2017.
52. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*. 2003;16(4):385-93.
53. Reyes Romero H, Navarro Rojas P, Reyes Barrios H. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. *Antibiot infecc*. 1998;6(2):12-9.
54. Goodall R, Levi A. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*. 1946;158(4019):675.
55. CLSI C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (M100eS22). 2012(s22nd Informational Supplement).
56. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.
57. Caron F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician. *Journal des anti-infectieux*. 2012;14(4):168-74.
58. Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens J, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(8):3627-30.

59. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American journal of medicine*. 1980;68(3):344-55.
60. Fguira LF-B, Fotso S, Ameer-Mehdi RB, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*. 2005;156(3):341-7.
61. Konaté K, Mavoungou JF, Lepengué AN, Aworet-Samseny RR, Hilou A, Souza A, et al. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2012;11(1):18.
62. De Billerbeck V-G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 2007;5(5):249-53.
63. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*. 2010;4(2):104-11.
64. Hausdorfer J, Sompek E, Allerberger F, Dierich M, Rüscher-Gerdes S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1998;2(9):751-5.
65. Valgas C, Souza SMd, Smânia EF, Smânia Jr A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38(2):369-80.
66. Jiménez-Esquilín A, Roane T. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2005;32(8):378-81.
67. Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, Mellouli L, Karray-Rebai I, Fguira LF-B, et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(2):579-93.
68. Lertcanawanichakul M, Sawangnop S. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2011;5(2):161-71.
69. Ali-Shtayeh M, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *mycoses*. 1999;42(11-12):665-72.
70. Kumar SN, Nambisan B, Sundaresan A, Mohandas C, Anto RJ. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Annals of microbiology*. 2014;64(1):209-18.
71. Fischer R, Lautner H. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*. 1961;294:1.
72. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676-83.
73. Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015;5(2):75-84.
74. Choma IM, Grzelak EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2684-91.
75. Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. Development of a novel direct bioautography–thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. *Journal of AOAC International*. 2011;94(5):1567-72.
76. Brantner A. Influence of various parameters on the evaluation of antibacterial compounds by the bioautographic TLC assay. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1997;7(4):152-4.
77. Silva MT, Simas SM, Batista TG, Cardarelli P, Tomassini TC. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):779-82.

78. Runyoro DK, Matee MI, Ngassapa OD, Joseph CC, Mbwambo ZH. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. BMC complementary and alternative medicine. 2006;6(1):11.
79. Shahat AA, El-Barouty G, Hassan RA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2008;43(6):519-25.
80. Suleiman MM, McGaw L, Naidoo V, Eloff J. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2010;7(1).
81. Homans A, Fuchs A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. Journal of chromatography. 1970;51:327-9.
82. Hamburger MO, Cordell GA. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. Journal of Natural Products. 1987;50(1):19-22.
83. Balouiri M, Bouhdid S, Harki E, Sadiki M, Ouedrhiri W, Ibnsouda SK. Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. Rhizosphere against *Candida albicans*. Asian J Pharm Clin Res. 2015;8:213-7.
84. Mehrabani M, Kazemi A, Mousavi SAA, Rezaifar M, Alikhah H, Nosky A. Evaluation of antifungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(8).
85. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis. 2016;6(2):71-9.
86. Menon T, Umamaheswari K, Kumarasamy N, Solomon S, Thyagarajan S. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. Acta tropica. 2001;80(2):151-4.
87. Mock M, Monod M, Baudraz-Rosselet F, Panizzon RG. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested in vitro and in vivo. Dermatology. 1998;197(4):361-7.
88. Speeleveld E, Gordts B, Landuyt HV, Vroey CD, Raes-Wuytack C. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs: Antimykotika-Empfindlichkeit klinischer *Fusarium*-Isolate. Mycoses. 1996;39(1-2):37-40.
89. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. Journal of clinical microbiology. 1991;29(3):533-8.
90. Pfaller M, Sheehan D, Rex J. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. Clinical Microbiology Reviews. 2004;17(2):268-80.
91. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1996;40(8):1914-8.
92. Marta CIS, Moorillón GVN. La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2010;2(3).
93. Bozorg A, Gates ID, Sen A. Using bacterial bioluminescence to evaluate the impact of biofilm on porous media hydraulic properties. Journal of microbiological methods. 2015;109:84-92.
94. Paloque L, Vidal N, Casanova M, Dumètre A, Verhaeghe P, Parzy D, et al. A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*. Journal of microbiological methods. 2013;95(3):320-3.
95. Finger S, Wiegand C, Buschmann H-J, Hipler U-C. Antibacterial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. International journal of pharmaceutics. 2013;452(1-2):188-93.

96. Andreu N, Fletcher T, Krishnan N, Wiles S, Robertson BD. Rapid measurement of antituberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;67(2):404-14.
97. Beckers B, Lang H, Schimke D, Lammers A. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *European journal of clinical microbiology*. 1985;4(6):556-61.
98. Finger S, Wiegand C, Buschmann H-J, Hipler U-C. Antimicrobial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International journal of pharmaceutics*. 2012;436(1-2):851-6.
99. Galiger C, Brock M, Jouvion G, Savers A, Parlato M, Ibrahim-Granet O. Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus*: value of real-time bioluminescence imaging. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(7):3046-59.
100. Vojtek L, Dobes P, Büyükgüzel E, Atosuo J, Hyrs I P. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology*. 2014;111(3):335.
101. Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(10):2752-8.
102. Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(9):2320-4.
103. Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I, Chaves-López C, Serio A, Marsilio F, et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2008;19(12):1174-82.
104. Juneja VK, Yousef AE. *Microbial stress adaptation and food safety*: CRC Press; 2002.
105. Tang Y-W, Stratton CW, Tang Y-W. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*: Springer; 2013.
106. Durand OE. Normas Rmales de Salud Pública# 309 (NRSP# 309)“Droga cruda. Métodos de ensayo” La Habana. 1992.
107. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. Editorial Félix Varela. 2012.
108. Cañibano M. Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia Universidad de Valladolid pp. 2012:1-28.
109. Nurmi K, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemical Ecology*. 1996;22(11):2023-40.
110. Pękal A, Pyrzyńska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 2014;7(9):1776-82.
111. El-Gied AAA, Abdelkareem AM, Hamedelniei EI. Investigation of cream and ointment on antimicrobial activity of *Mangifera indica* extract. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2015;6(2):53.
112. Nodarse Hernández R, Braña Suárez JC, Palacios Alfonso I. Determinación del poder bactericida de la crema de vancomicina al 0, 5% frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2009;38(3-4):0-.
113. Osorio E. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. 2009.
114. Mendoza Muñoz M, Bedia Gonzalez MM. Contribución a la toxicidad preclínica dérmica de la especie *Jatropha gossypifolia* L.: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas. Facultad de Química-Farmacia.; 2018.
115. Cuellar A, Miranda M. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. Cuba: Ed Universidad de La Habana. 2000.

116. Essiëtt U, Okoko A. Comparative nutritional and phytochemical screening of the leaves and stems of *Acalypha fimbriata* Schum. & Thonn. and *Euphorbia hirta* Linn. *Bull Env Pharmacol Life Sci.* 2013;2(4):38-44.
117. Ahirrao R, Patel M, Pokal D, Patil J, Suryawanshi H. Phytochemical screening of leaves of *Jatropha curcas* plant. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP).* 2011;2(4):1324-7.
118. Sánchez Gregorio A. Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv 2012.
119. Farinola N, Piller N. Pharmacogenomics: its role in re-establishing coumarin as treatment for lymphedema. *Lymphatic research and biology.* 2005;3(2):81-6.
120. Taiz L, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology.* 2006;4:315-44.
121. Vrijssen R, Everaert L, Boeyé A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *Journal of General Virology.* 1988;69(7):1749-51.
122. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997;275(5297):218-20.
123. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271-8.
124. Sardi JR. Onicocriptosis:(uña encarnada). *Dermatología Venezolana.* 1996;34(2).
125. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Trabajo de Grado Facultad de Tecnología-Universidad Tecnológica de Pereira Colombia. 2013.
126. N'Guessan Bra Yvette Fofie R, Sanogo KC, Diénéba K-B. Minerals salt composition and secondary metabolites of *Euphorbia hirta* Linn., an antihyperglycemic plant. *Pharmacognosy research.* 2015;7(1):7.
127. Pacheco DV. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica Hplc. Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile. 2004.
128. Ben Mohamed Maoulainine L, Jelassi A, Hassen I, Ould Mohamed Salem Ould Boukhari A. Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia*,(L.) aerial parts. 2012.
129. Cartaya O. Reseña bibliográfica FLAVONOIDES: CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos tropicales.* 2013;22(2):5-14.
130. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine.* 1996;20(7):933-56.
131. Doroteo VH, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú.* 2013;79(1):13-20.
132. Okoh SO, Iweriebor BC, Okoh OO, Nwodo UU, Okoh AI. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L. *BioMed research international.* 2016;2016.
133. Devappa RK, Makkar HP, Becker K. *Jatropha* diterpenes: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2011;88(3):301-22.
134. Ramirez LS, Castaño DM. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica.* 2009;15(42):263-8.
135. Chansukh K, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Antibacterial activities of selected thai medicinal plants bearing quinonoids. *RJPBCS.* 2014;5(2):425-32.
136. Romero CD, Chopin SF, Buck G, Martinez E, Garcia M, Bixby L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *Journal of ethnopharmacology.* 2005;99(2):253-7.
137. Daud Thoene A, Habib Intersimone N, Sánchez Riera A. Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2008;13(3):0-.

138. Balbuena Escalona V. Evaluación del efecto antimicrobiano de flavonoides obtenidos de extractos de hojas de *Tamarindus indica* Lin. Multimed (Granma). 2012;16(1).

Anexos





Anexo 1. Hojas, flores y frutos de la *Jatropha gossypifolia* L.



Anexo 2. Hojas, flores y frutos de la *Jatropha gossypifolia* L.