



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA, 1948

FACULTAD DE QUÍMICA – FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis para optar por el Título de Máster en
Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural

**EVALUACIÓN FARMACOGNÓSTICA, TOXICOLÓGICA Y
GASTROPROTECTORA DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE
Cnidoscolus chayamansa Mc. Vaugh.**

AUTOR: Lic. Yilka Mena Linares.

TUTOR: Dra.C. Dulce Ma. González Mosquera

CONSULTANTE: MSc. Arianna Valido Díaz

Santa Clara

2015

CON SU ENTRAÑABLE TRANSPARENCIA



A Dios por haberme permitido el milagro de la vida, por ser mi luz, mi fuerza, mi verdad y por dejarme alcanzar este sueño.

A mi madre, que con su frase de “no pude” despertó en mi un deseo inquebrantable de ser lo que soñó, que con su esfuerzo, entereza, dedicación y entrega hizo que fuese menos difícil para mí llegar hasta este hermoso momento.

A mi padre, que ya no está, por hacerme entender lo importante de cultivarme como profesional y como ser humano, por demostrarme que mis sueños serían mis metas si me las proponía, por partir confiado de que iba a poder.

A mi hermana, por el orgullo con que habla de mí y por darle el ser a dos niños maravillosos que con su inocencia traviesa y su imaginación hacen mágicos mis fines de semana.

A mis hermanos pequeños, a los cuales quiero con todo mi corazón.

A ti mi Amor por tu incondicionalidad y apoyo, por quererme, por doblegarte a mis caprichos, por estar siempre. 

Agradecimientos

- *A mami y Diego por ser lo más grande que tengo, por darme tanto amor y cariño.*
- *A Elia y Jorge por quererme como mis padres.*
- *A Luisi por hacerme reír en los momentos de más tensión, por quererme.*
- *A mi tutora Dra.C. Dulce Ma. González y a la Consultante MSc. Arianna Valido quienes supieron combinar interés, constante apoyo y ternura durante la realización de este trabajo.*
- *A la MSc. Yannarys Ortega por su ayuda y su apoyo todo el tiempo.*
- *A la Dra.C. Lilita Vicet por su conocimiento, por ayudarme tanto y por sus acertados comentarios que contribuyeron a un trabajo mejor terminado.*
- *A mis compañeros de trabajo porque sin ellos no hubiera podido concluir este trabajo. En especial a mis amigos Arelia, Yuniesky, Dayli, Adalkys, Orestes, Liuba, Magdevis, Carmen Luz y Freisman.*
- *A Irene, la patóloga del Hospital Mariana Grajales, por su desinteresada ayuda.*
- *A Josefa, técnica del laboratorio de química del CBQ, por su paciencia y cooperación.*
- *A Osvaldo Norman Montenegro por su tiempo y su considerable colaboración.*
- *A mis amigos George y Santiaguito por ser siempre una puerta abierta y por su amistad sin límites.*
- *A todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo. ✍*

“Las ciencias están todas entrelazadas entre sí: es mucho más fácil aprenderlas todas juntas a la vez que separar una de las otras.”

René Descartes (1596-1650).

SÍNTESIS

La especie *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh (chaya) es una fuente alimenticia importante por su alto contenido de proteínas y minerales. Se ha recomendado tradicionalmente para diversos padecimientos incluyendo la diabetes, la obesidad, las piedras del riñón, hemorroides, acné y artritis. En este trabajo se realizaron evaluaciones farmacognósticas, toxicológicas y gastroprotectoras de esta planta para determinar si es posible su uso en la medicina tradicional. En esta investigación se realizaron dos técnicas básicas de toxicología y farmacología experimental: "Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija" (5 000 mg/kg) y "Modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto" (1 000, 2 000 y 4 000 mg/kg). En ambos estudios se emplearon ratas de la línea Sprague Dawley con peso comprendido entre 180-250 g de masa corporal. Con la evaluación farmacognóstica se pudo constatar que para esta especie el secado artificial mantuvo los más bajos valores de humedad residual (5,2%) con respecto al secado a la sombra (10,0%). El valor que se obtuvo de las cenizas totales es indicativo de la baja composición inorgánica de la planta, resultado que coincide con estudios anteriores. Como resultado de la administración de una dosis única de 5 000 mg/kg se obtuvo un 100% de supervivencia. La masa corporal, como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado. En el estudio de gastroprotección se pudo observar un aumento progresivo del porcentaje de inhibición del grado de ulceración (desde 21% a la dosis de 1 000 mg/kg, hasta un 99 y 100% a las dosis de 2 000 mg/kg y 4 000 mg/kg, respectivamente). Con la mayor dosis utilizada se obtuvo la mayor inhibición. Los valores obtenidos en este caso no presentaron diferencias estadísticamente significativas con relación al Omeprazol (99%), utilizado como control positivo. Los resultados avalan el potencial gastroprotector del extracto evaluado y su inocuidad por vía oral.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1 MARCO TEÓRICO	5
1.1 Generalidades sobre el uso de las plantas medicinales.....	5
1.2 Familia Euphorbiaceae.....	5
1.2.1 Generalidades.....	5
1.2.2 Descripción botánica.....	6
1.3 Especie <i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh. Aspectos Monográficos....	7
1.3.1 Origen y distribución geográfica.....	7
1.3.2 Clasificación botánica	8
1.3.3 Descripción Botánica.....	9
1.3.4 Composición química.....	9
1.4 Estudios de evaluación de la actividad biológica.....	14
1.5 Úlcera péptica. Concepto. Generalidades.	15
1.5.1 Bases fisiopatológicas de la úlcera péptica.....	16
1.6 Citoprotección. Terapias actuales.	19
1.7 Fitoterapia gastroprotectora.	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Equipos, Materiales y Reactivos empleados.	24
2.2 Procesamiento del material vegetal.....	24
2.2.1 Recolección.....	24
2.2.2 Procesamiento de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos...25	
2.2.2.1 Estandarización del secado. Parámetros evaluados.....	25
2.2.2.2 Determinación de la composición química	27
2.2.2.3 Determinación de los índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.....	28
2.2.3 Caracterización fotoquímica del extracto	29
2.2.3.1 Obtención del extracto. Extracción por Soxhlet.....	29

2.2.3.2 Determinación de los índices de calidad del extracto.....	29
2.3 Evaluaciones preclínicas.....	31
2.3.1 Modelo biológico.....	31
2.3.2 Suministro y Cuarentena.....	32
2.3.3 Aleatorización y alojamiento.....	32
2.3.4 Método de identificación.....	32
2.3.5 Alimentación y agua de bebida.....	33
2.3.6 Preparación del producto de ensayo.....	33
2.3.7 Procedimiento experimental.....	33
2.3.7.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija.....	33
2.3.7.2 Modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.....	34
2.4 Control de la Calidad, Bioética y Bioseguridad.....	36
2.5 Análisis estadístico.....	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1 Procesamiento de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.....	39
3.1.1 Estandarización de secado. Parámetros evaluados.....	39
3.1.2 Determinación de la composición química.....	41
3.1.3 Determinación de los índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.....	42
3.2 Caracterización fotoquímica del extracto.....	43
Se puede apreciar que el valor de la densidad relativa.....	43
3.3 Evaluaciones preclínicas.....	44
3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija.....	44
3.3.2 Evaluación de la actividad gastroprotectora de <i>Cnidoscopus</i> <i>chayamnasa</i> Mc. Vaugh en el modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.....	48
CONCLUSIONES.....	54

Tabla de Contenido

RECOMENDACIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	70

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos remotos como nuevos agentes terapéuticos y sus usos han sido transmitidos de generación en generación, bien en forma oral o escrita, hasta nuestros días y es esto lo que se conoce como la "práctica terapéutica tradicional o conocimiento etnobotánico", el empleo de extractos o principios activos de las plantas, la cual ha sido importante en el cuidado de la salud de la población en el primer nivel de atención (Pazmiño, 2011).

En la actualidad, hay un sensible aumento de la demanda de fármacos con extractos vegetales estandarizados y existe un enfoque particular en la búsqueda de nuevos principios activos provenientes de las plantas (Marrassini *et al.*, 2010).

Las plantas medicinales siempre han sido usadas para el cuidado de la salud y actualmente lo hace más del 80% de la población mundial, con una tendencia creciente en los países industrializados. Este significativo aumento en la utilización de los vegetales, que constituyen una importante alternativa terapéutica, obedece no solo a los cambios culturales de muchos pueblos, sino también fundamentalmente al elevado costo de los fármacos (Vivo *et al.*, 2012).

Las Euphorbiaceae son plantas representadas por 300 géneros y alrededor de 8000 especies, se distribuyen principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Martínez *et al.*, 2002), dentro de estas encontramos a la especie *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh (chaya). La chaya es una fuente alimenticia importante por su alto contenido de proteínas y minerales como: calcio, potasio, hierro, fósforo, vitaminas(A, C y E) además de riboflavina y tiamina (Ventura, 2004). Se ha recomendado tradicionalmente para diversos padecimientos incluyendo la diabetes, la obesidad, las piedras del riñon, hemorroides, acné, artritis, problemas visuales y de encías (Figueroa *et al.*, 2009). Las hojas de la planta se han tomado como laxante, diurético, para

mejorar la circulación, la digestión, para estimular la lactancia y endurecer las uñas. Las hojas crudas contienen glucósidos cianogénicos, los cuales son tóxicos por formar ácido cianhídrico (HCN) un compuesto tóxico el cual es destruido fácilmente por medio de la cocción (Molina *et al.*, 2013, González *et al.*, 2003).

En algunas regiones de Cuba se conoce a la chaya como “salva hombre”, ya que consumida en decocciones cura afecciones de la próstata por sus propiedades antiinflamatorias (Curbelo, 2012). Investigadores evaluaron la toxicidad aguda de extractos de la especie obtenidos por tres métodos (decocción, maceración e infusión) las dosis se incrementaron en orden creciente desde 25 mg/kg hasta 8000 mg/kg empleando la vía intraperitoneal (ip), Los resultados obtenidos permiten apreciar que la DL₅₀ y sus límites de confianza al 95% son similares (7100 mg/kg) en los tres tipos de preparaciones de la planta (Torrico *et al.*, 2003).

La información disponible acerca de evaluaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas de la misma resultan insuficientes por lo que se requiere profundizar en el conocimiento sobre este recurso natural para lo cual se plantea el siguiente problema científico:

Problema Científico

La especie *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh, es empleada en la medicina tradicional como antiinflamatoria, en diversas afecciones asociadas a procesos inflamatorios, lo cual sugiere que también pueda comportarse como protectora de la mucosa gástrica, sin embargo, no existen investigaciones preclínicas referenciadas que corroboren dicho uso para las hojas de esta planta, ni que avalen su seguridad por vía oral, por lo que es preciso realizar estudios farmacológicos y toxicológicos en este sentido.

Este trabajo científico parte de la **hipótesis** de que el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh pueda

presentar efectos protectores de la mucosa gástrica, resultando no tóxico por vía oral.

Objetivo General

Realizar evaluaciones farmacognósticas, toxicológicas y gastroprotectoras de la especie *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh que permitan su uso en la medicina tradicional.

Objetivos Específicos

1. Determinar índices farmacognósticos que avalen la calidad de la droga.
2. Evaluar la toxicidad por vía oral del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh en modelos agudos.
3. Comprobar la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades sobre el uso de las plantas medicinales

Desde tiempos inmemorables los seres humanos han dependido de la naturaleza para su alimentación y curación, estos conocimientos se han transmitido de generación en generación confiriéndole un carácter mágico a las plantas medicinales (Pérez *et al.*, 2011).

Las plantas medicinales representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados. Sin embargo en los países en desarrollo el uso de las plantas medicinales representa hasta el 80% del arsenal terapéutico tradicional y son utilizadas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, por lo que representan un área en franca expansión (Cruz, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica. Analizando el interés por el estudio y empleo de medicina tradicional en la asistencia terapéutica y el reconocimiento de la importancia de las plantas medicinales para el sistema de salud de países en desarrollo, la OMS acordó promocionar la medicina tradicional y establecer pautas para la identificación de medicamentos herbarios que sean inocuos y eficaces (Velásquez, 2007).

1.2 Familia Euphorbiaceae

1.2.1 Generalidades

Las familias Euforbiáceas (Euphorbiaceae) es una de las más grandes y diversificadas de las angiospermas, conteniendo alrededor de 8000 especies en 300 géneros, perteneciente al orden Euphorbiales o malpigiales pertenecen a zonas tropicales o subtropicales y templadas. Las subfamilias son: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae y

Euphorbioideae, las dos primeras con dos óvulos por lóculo (condición plesiomórfica) mientras que las tres últimas sólo tienen un óvulo (condición apomórfica) (Martínez *et al.*, 2002) que contiene alcaloides, glicósidos cianogénicos, ácidos grasos, glucosinolatos y terpenoides entre otros. Además algunas de sus especies contienen un latex de color lechoso. Actualmente, sus usos más frecuentes son en la alimentación (tapioca) y en la producción de medicinas, venenos, aceites y grasas, ceras, gomas, caucho y componentes para pinturas, barnices y otros productos industriales. Algunas de ellas se cultivan como ornamentales (Collantes, 2012). Según Bittner *et al.* (2011), en estudios químicos realizados recientemente en el género *Euphorbia*, muestran la presencia principalmente de derivados terpénicos y flavonoides. De *Croton chilensis*, especie monotípica, se aislaron especialmente alcaloides del tipo de la morfina y aporfina. De las restantes especies estudiadas en esta familia se aislaron especialmente triterpenos y flavonoides conocidos. Igualmente se estudió, en ocho especies, la distribución de n - alcanos en las fracciones de hidrocarburos refinados. Otros investigadores demostraron la capacidad antioxidante de *Cnidocolus aconitifolius* especie perteneciente a la familia euphorbiaceae por presentar en su composición compuestos polifenólicos y flavonoides (Mercado *et al.*, 2013).

1.2.2 Descripción botánica

Las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae presentan las siguientes características (Collantes, 2012)

Porte: arbóreas, arbustivas o herbáceas.

Hojas: hojas simples o compuestas, pinnadas o palmeadas, generalmente alternas.

Flor: Incompleta, imperfecta Simetría floral: Radial. Cáliz (K) = 0,5 Corola (C) = 0,5, Androceo (A) = 1, 5,10 (- ∞) Gineceo: sincárpico, Óvulos / lóculo = 1 (2). Pistilo = 1 Ovario: Supero, flores actinomorfas, pentámeras, unisexuales.

Perianto: pueden presentar o no periantio.

Gineceo súpero: ovario formado por tres carpelos soldados.

Androceo: formado por uno o muchos estambres libres o soldados.

Semilla: de embrión recto o curvo, con gran cantidad de endospermo oleaginoso.

Fruto: es una cápsula tricora (3 lóbulos), con apertura valvica. Algunas especies presentan fruto drupa o baya.

Otras características distintivas: generalmente se presentan látex lechoso.

1.3 Especie *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh. Aspectos Monográficos

1.3.1 Origen y distribución geográfica

Cnidoscolus aconitifolius, arbusto cultivado por sus hojas nutritivas, es una planta que pertenece a la familia Euphorbiaceae y es de origen Mesoamericano. En 1997 Ross-Ibarra y Molina-Cruz formaron cuatro variedades cultivadas dentro de la subespecie *aconitifolius*. Los cuatro cultivares semidomesticados se clasifican como *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill) I.M. Jonhston, y por la forma de sus hojas incluye 4 variedades: Estrella, Mansa, Picuda, Plegada (Figura 1.1). El cultivar “Mansa” fue clasificado previamente como *Cnidoscolus chayamansa* (Yurrita, 2008).



Figura 1.1. Comparación entre las cuatro variedades de la especie *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh.

Fuente:(Yurrita, 2008)

La chayamansa tiene origen de Honduras Británicas, habita en climas cálido y semicálido desde el nivel del mar hasta los 700m. Asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio (Rojas, 2003). Esta planta se distribuye en el sureste mexicano, principalmente en Yucatán, Tabasco, sureste de Chiapas, centro y sur de Veracruz, parte de Campeche, sur de Quintana Roo, norte de Morelos y Nuevo León, es fácil de cultivar en climas templados o cálidos, sufre pocos daños causados por insectos. Tolerancia a lluvias fuertes y sequía y se propaga a través de cortes de diez centímetros de sus estacas leñosas, ya que no dan fruto. Las raíces toman tiempo en generarse a partir de las estacas y crecen lentamente una vez que están plantadas, por lo cual se recomienda cosechar las hojas sólo hasta el segundo año, después del cual lo ideal es sólo recolectar la mitad de las hojas para garantizar su continua y saludable reproducción (Curbelo, 2012). Aunque la floración es más común en los meses del verano, se puede encontrar flores y frutos todo el año (Ross-Ibarra, 2003).

1.3.2 Clasificación botánica (Vaugh, 1994)

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Nombre científico: *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh

Sinonimia: *Jatropha urens* var. *inermis* Calvino

Nombres comunes: chaya, chaya mansa, chaya de castilla, guarumbo, hormiguillo, guarumo, chancarro, trompeta, koochle, guarina y samura entre otros.

1.3.3 Descripción Botánica

Cnidoscolus chayamansa Mc. Vaugh es un arbusto caracterizado por ser una planta suculenta, de unos 2 a 3 m de altura, con ramas muy delgadas, con los tallos numerosos con látex abundante, médula blanca y gruesa con pocos pelos urticantes, con 1 ó 2 glándulas en el ápice del pecíolo (Vaugh, 1994). El tallo de chayamansa es generalmente más grueso, pero parece que este carácter podría reflejar más las condiciones de cultivo que diferencias genéticas (Ross-Ibarra, 2003).

Las hojas son truncado-cordadas, trilobuladas (Martínez, 1979), toscamente ondulado dentadas, más anchas que largas, verde brillante, de 10 a 16 cm de ancho y de 4 a 8 cm de largo, pecíolo de 8 a 15 cm de longitud (suelen ser del tamaño de una mano adulta extendida, presentando cinco lóbulos prominentes.) y se puede alcanzar hasta 32 cm de largo y 30 cm de ancho, con pecíolos hasta 28 cm de largo (Ross-Ibarra, 2003), usualmente con vello urticante; flores tubulares y blancas, unisexuales, las masculinas de 6-7 mm con 10 estambres; las femeninas de 9-10 mm (Vaugh, 1994) y en forma de racimo (Krohnengold, 2012); fruto una cápsula con 3 semillas (Vaugh, 1994).

La planta es dócil, quebradiza y se siembra por estacas, manteniéndola con abundante agua y sombra (Aguilar M, 2011). Crece rápido de manera frondosa, es un arbusto liso que mide de 3 a 4 metros de alto. Hoja oblonga con tres lóbulos de la parte media hacia arriba (Vaugh, 1994). Todas las partes de la planta contienen una savia blanca, espesa y muy pegajosa (Curbelo, 2012).

Hay por lo menos 35 especies de chaya. Algunas variedades tienen vellos en el pecíolo, que causan irritación al tocarlas, al igual que sus flores blancas, porque contienen cianuro (Curbelo, 2012).

1.3.4 Composición química

Kuti y Torres (1996) realizaron un estudio sobre la Chayamansa tan codiciada, se reveló que al cocinar la hoja, aumenta considerablemente su composición de

carbohidratos, grasa, su nivel de calcio, fósforo y hierro y disminuye su composición de fibra, proteína, y potasio en relación a las muestras crudas (Curbelo, 2012). El aumento de algunos nutrientes minerales puede deberse al proceso de cocción, el cual libera la extracción de nutrientes de los tejidos, aumentando el porcentaje de elementos minerales a medida que disminuye el contenido de humedad. También descubrieron que las hojas crudas de chaya son tóxicas, ya que los pelillos que tiene en el pecíolo que es la parte que une a la hoja con el tallo, contienen un glucósido que libera cianuro, por lo cual es imprescindible remojarla durante por lo menos una hora antes de consumirla, o cocinarla para desactivar este componente. Afortunadamente, en sólo un minuto de hervor se volatiliza y desaparece el cianuro haciendo posible incluso beber el agua en la que se coció, la cual también tiene propiedades nutritivas y medicinales. Se sugiere no cocinarla en recipientes de aluminio, ya que producen una reacción tóxica que causa diarrea.

Es posible que por esto los mayas la veneraran y le hacían un ritual antes de cortarla, sabiendo y advirtiendo que era una planta que si no se respetaba, así como podía curar, podía matar (Curbelo, 2012).

En esta misma época otros investigadores hicieron muchos estudios sobre esta planta y obtuvieron una composición variada de metabolitos, donde pudieron inferir la presencia de: proteína, grasas, carbohidratos, diferentes tipos de vitaminas(A, C, K, complejo B-excepto la B12), compuestos minerales (hierro, potasio, fósforo, calcio), oligoelementos, enzimas y fibra vegetal (Martínez, 1979).

En 1939, el Laboratorio Analítico de Henequeneros de Yucatán hizo el análisis de las hojas de chaya con los siguientes resultados: humedad 77,21%, materia seca 22,79%, proteína cruda 5,79% y 1,95% de cenizas (Vaugh, 1994).

Castro (2014) indica que la chaya constituye un alimento muy barato todo el año, y es rara la casa que no tenga sus plantas de chaya. El presenta un análisis cuyos resultados se muestran: humedad 79%, ceniza 1,65%, proteína cruda

8,25%, extracto etéreo 1,93%, fibra cruda 1,94%, carbohidratos totales asimilables 7,23%. En lo que respecta a los minerales reporta calcio 421,00 mg/100g, fósforo 63,00 mg/100g y hierro 116,61 mg/100g; además menciona algunas vitaminas como son: caroteno 8,52 mg/100g, tiamina 0,23 mg/ 100g, riboflavina 0,35 mg/100g y niacina 1,74 mg/100g.

Un análisis bromatológico de la chaya (1973) realizado por los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial de la Cd de México, arrojó los siguientes resultados: Proteínas de hoja de chaya en base húmeda: 8,3 g/100 g y 39,5 g/100g en base seca y hacen una revisión acerca de las especies potenciales para la obtención de concentrados proteínicos foliares, dentro de las cuales menciona a *Cnidocolus chayamansa* como una fuente potencial. Además reporta la composición aminoacídica (g de aminoácidos/ 100g de proteína) en esta especie (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de aminoácidos contenido en 100mg de proteína.

Aminoácidos	Contenido en 100mg de proteína (porción cloroplástica-citoplásmica)
lisina	5,9 - 8,3
fenilalanina	6,3-4,8
metionina	1,8-1,8
treonina	5,0-4,4
leucina	10,1-8,4
isoleucina	5,6-4,5
valina	6,9-5,8
triptofano	1,7-0,5
arginina	6,6-7,0
histidina	1,1-4,3
tirosina	5,5-4,6
cistina	1,3-1,9
ácido aspártico	9,0-10,7
serina	4,9-4,6

ácido glutámico	10,3-12,5
prolina	5,3-4,5
glicina	6,0-5,2
alanina	6,5-5,6

En la India en el 2010 se realizó un estudio sobre efecto hiperglicémico de los extractos etanólicos de la misma planta encontraron que ella tiene una elevada cantidad de proteína (5,7%), fibra cruda (1,9%), calcio 199,4% mg/100gm, potasio 7,02mg/100gm, hierro 11,4mg/gm, Vitamina C 164,7 mg/100gm y carotina 0,085 mg/100gm (K. Kulathuran Pillai, 2012).

Para determinar el nivel de algunos minerales de interés nutricional y concentración de HCN en hojas de chaya, se planteó el objetivo de realizar un estudio en plantas fertilizadas orgánicamente y químicamente. Se establecieron 49 plantas de chaya. Se formaron siete tratamientos con siete repeticiones. Un control y tres con niveles diferentes de fertilización orgánica y química. La recolección de hojas se realizó en tres épocas del año. Los minerales fueron cuantificados por absorción atómica y el HCN por espectrofotometría. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de medias de Turkey. Las concentraciones de Ca fueron de 1240 a 3080 mg, Mg de 313 a 421 mg, K de 179 a 328 mg, Zn de 1,2 a 2.4 mg, Cu de 0,4 a 1.0 mg, Mg de 10 a 20 mg, P de 130 a 150 mg, Na de 6,7 a 14,0 mg, Fe de 5,0 a 24,3 mg y Mn de 7,0 a 11,0 mg/100g de hoja seca respectivamente. Mientras que las concentraciones de HCN fueron de 10,38 a 97,24 mg/100 g de hoja verde. Los valores de los minerales están en cantidades importantes en las hojas de chaya, mientras que la concentración de HCN no es tóxico. Por lo que en términos generales la hoja de chaya puede ser considerada como un aporte de minerales en la dieta y una buena alternativa nutricional. No se observó una marcada influencia de la fertilización orgánica ni química sobre las concentraciones de Ca, K y Mn en las

tres estaciones del año. Se observó una influencia de la fertilización orgánica y química aumentando las concentraciones de Na y Zn en el otoño.

Se observó una influencia de la fertilización orgánica y química disminuyendo las concentraciones de Mg, Fe, Cu y P en las estaciones de verano y otoño. El contenido de HCN se mantiene bajo en primavera y otoño, pero en verano aumenta con la fertilización química. En términos generales la hoja de chaya puede ser considerada como un aporte de minerales en la dieta (Quesada *et al.*, 2007).

Como un resumen podemos representar la composición de *Cnidoscolus chayamansa* en la Tabla 2 y 3.

Tabla 2. Composición de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh.

Compuesto	En base húmeda (%)	En base seca (%)
Humedad	77 - 79	11
Material seca	23 - 21	89
Cenizas	1,65 - 1,95	14,97
Proteínas crudas	5,6 - 8,3	26,68
Carbohidratos	7,23 - 9,2	
Grasa		5,55
Fibra cruda	1,9 - 3,2	14,68

Tabla 3. Composición de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh en hojas frescas.

Minerales	Contenido en 100g (20 hojas frescas)
Calcio	236 mg
Polifenoles totales	104 mg
Vitamina C	24,7 mg
Hierro	7,2 mg
Zinc	3,1 mg
Selenio	0,08 mg

Los resultados indicaron que la chaya en las ratas diabéticas no modificó el consumo de alimento, ni líquido, y no modificó los niveles sanguíneos de glucosa y colesterol; pero sí redujo los triglicéridos, comparados con su grupo control diabético que solo recibió agua. El funcionamiento renal valorado por la microalbuminuria y creatinina urinaria mostraron niveles que indicaron un probable daño renal que fue similar tanto en el grupo de ratas diabéticas que recibieron chaya como en sus controles con agua. Estos resultados nos indican que la chaya puede mejorar algunas de sus complicaciones cardiovasculares al reducir el nivel de triglicéridos en sangre (Palos and Reynoso, 2007).

1.4 Estudios de evaluación de la actividad biológica

El tamizaje farmacológico constituye una de las etapas iniciales en la investigación sobre plantas medicinales (Heinrich *et al.*, 2014) Se entiende por tamizaje un conjunto de técnicas relativamente simples que permiten al investigador evaluar la posible acción farmacológica y la toxicidad de una planta. El tamizaje farmacológico de extractos de plantas busca descubrir aquellas que presentan actividad farmacológica. El tamizaje farmacológico debe ser cuidadosamente realizado, para que sea seguro y reproducible; sin embargo, las técnicas y los procedimientos no deben de ser exageradamente elaborados y caros. La cantidad de material necesario para el tamizaje debe ser pequeña y los procedimientos deben programarse de tal manera que se pueda utilizar el material bruto, como extractos de plantas o fracciones de extractos. El tamizaje sea general o específico, produce solo probabilidades sobre la actividad que la muestra tendría en un ser humano enfermo (Osorio, 2009).

Estas pruebas se llevan a cabo utilizando ratones o ratas, se observan los animales que reciben la droga y los animales que sirven como control. Las vías de administración más comunes son la oral y la intraperitoneal. Las drogas deben disolverse previamente o deben de estar en una suspensión en un vehículo acuoso (Osorio, 2009). El uso de ácidos de bases y de solventes orgánicos puede enmarcar la verdadera actividad biológica. Cuando están en

suspensión el material vegetal debe de reducirse, como mínimo a 20 mesh, para asegurar la exactitud de la dosis y la uniformidad de la respuesta, las observaciones se hacen cada 30 minutos, así como a las 1, 2, 3, 4 y 24 horas después de la administración de la droga. Se observa: 1) el estado consciente y la disposición 2) la actividad y la incoordinación del sistema motor, 3) el tono muscular 4) los reflejos 5) la actividad sobre el sistema nervioso central y 6) la actividad sobre el sistema nervioso autónomo.

Cuando la anotación normal es cero (ausencia), la intensidad de los síntomas observados de varia de 0 a 4. Cuando la anotación es de 4, la intensidad de los síntomas varía de 4 a 0 (disminución) y de 4 a 8 (aumento) (Osorio, 2009).

1.5 Úlcera péptica. Concepto. Generalidades

Actualmente el concepto de úlcera péptica presupone la existencia de una lesión de carácter erosivo en la pared interna de la mucosa gástrica (úlcera gástrica) o de la primera porción del intestino delgado (úlcera duodenal) (Chirri, 2013).

La lesión consiste en una pérdida de la continuidad de la mucosa y en grado variable, las restantes capas de la pared gástrica, suelen ser únicas, redondeadas u ovals, aunque pueden ser lineales y su diámetro es en general menor de 4 cm. Aparecen en cualquier porción del estómago, pero más de la mitad de los casos se localiza a lo largo de la curvatura menor, cerca de la incisura angular y en la unión del cuerpo con el antro gástrico (Regalado *et al.*, 2012).

La úlcera gástrica es una enfermedad que afecta al 10% de la población mundial, presenta una incidencia anual cercana a 0,5 casos por 1.000 habitantes. Afecta preferentemente a personas entre los 55 y 65 años de edad, no tiene predilección por el sexo y los grupos de mayor riesgo son los fumadores y alcohólicos (Bofill *et al.*, 2007). Esta tiende a aparecer más tarde en la vida y son menos comunes que las lesiones duodenales, tal vez debido a la alta probabilidad de que la úlcera gástrica empiece de una forma silente y se haga

presente solo después del desarrollo de complicaciones. Por el contrario, las autopsias sugieren una incidencia similar de úlcera duodenal y gástrica (Arrieta *et al.*, 2009).

1.5.1 Bases fisiopatológicas de la úlcera péptica

Las úlceras pépticas pueden persistir durante meses o años y se manifiestan por la presencia de reacciones inflamatorias agudas y crónicas. En la fase aguda, existe un denso infiltrado polinuclear y dilatación vascular en los márgenes del defecto. En las fases de cronicidad, aparecen en los márgenes y base de la úlcera proliferación fibroblástica, cicatrización y acumulación de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas (Sáinz *et al.*, 2008).

El desarrollo de la enfermedad ulcerosa péptica depende de un desequilibrio entre factores agresivos: ácido, pepsina, tabaco, alcohol, ácidos biliares, AINEs, *Helicobacter pylori* y factores defensivos: barrera mucosa gástrica, formación y secreción de mucus, secreción de bicarbonato, regeneración epitelial, flujo sanguíneo, prostaglandinas, mecanismos intrínsecos de secreción gástrica y hormonales, estado de salud y factor básico de crecimiento de los fibroblastos , (Chirri, 2013, Sáinz *et al.*, 2008). En la úlcera duodenal predomina la acción de los factores agresivos, mientras que en la úlcera gástrica fracasarían los factores defensivos (Ferrer *et al.*, 2004, Sánchez *et al.*, 2002).

Se afirma que el estrés constituye uno de los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad ácido péptica. En una situación de estrés, el sistema nervioso autónomo descarga una gran cantidad de neurotransmisores que, a su vez, producen la secreción de gastrina y de ácido clorhídrico; aunado a ello se encuentran los malos hábitos higiénico-dietéticos que condicionan la aparición de la enfermedad. Además los sistemas de defensa natural que posee el estómago pierden su capacidad de funcionamiento con la edad, de ahí que el paciente senil presente mayor riesgo (Ferrer *et al.*, 2010, Pentón, 2006). Este tipo de úlcera se suele dar en pacientes politraumatizados, en grandes quemados, enfermos con hipertensión endocraneal, también después de una

cirugía muy mutilante y en general, en los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos con motivo de enfermedades muy graves (Atherton and Blazer, 2005, Ferrer, 2007). Estas lesiones, son a menudo múltiples y más frecuentes en la porción de estómago secretora de ácido. Se dan en torno al 80 o 90% de los pacientes con lesiones y quemaduras masivas.

El etanol causa lesiones extensas en la mucosa, acompañado por el incremento de 9.5 veces la apoptosis celular y de 2,5 veces la del factor de necrosis tumoral (TNF α). El TNF α es otro componente que está relacionado con el daño de la mucosa gástrica y juega un importante papel en la patogenia a este nivel, se ha demostrado su activación en el suministro crónico de etanol al 40%. Además cuando el consumo de alcohol es relativamente intenso disuelve el moco protector de la mucosa gástrica, lo cual priva a la mucosa de esta sustancia protectora y la hace vulnerable a la acción lesiva de los agentes agresivos. La consecuencia puede ser una lesión celular con una mayor liberación de histamina, con una mayor estimulación de la secreción de ácido, lesión de los pequeños vasos sanguíneos, hemorragia de la mucosa, y finalmente una erosión y ulceración (Ferrer *et al.*, 2010, Pentón, 2006).

Las úlceras tienen una alta prevalencia de coexistir con la gastritis crónica, el etanol al 80%, suministrado a ratas en 3 ocasiones durante días alternos y con un tratamiento final de ácido acético al 60% inyectado en la serosa, produce úlceras crónicas, en donde se demuestra un incremento del TNF α y de la apoptosis (Liu and Cho, 2000).

El hábito de fumar favorece el desarrollo, la cronicidad y la tendencia a la recidiva de las úlceras pépticas, esto es algo reconocido desde hace años. Esta influencia se debe a que el tabaco estimula la secreción ácida, disminuyendo el flujo sanguíneo de la mucosa, altera la motilidad gástrica, impide la cicatrización a través de su capacidad de favorecer el reflujo duodeno-pancreático (líquido que pasa al intestino y que no debiera regresar al estómago), disminuyendo la secreción alcalina biliopancreática y además

afecta la producción y secreción luminal de bicarbonato de sodio que la neutraliza (Ferrer *et al.*, 2010, Peskar *et al.*, 2002, Paz, 2003).

El *Helicobacter pylori*, es un bacilo espiral flagelado Gram (-), productor de ureasa, exclusivo de la especie humana, que se adquiere principalmente en la infancia y que se encuentra en el estómago de cerca del 80%-90% de los pacientes con úlcera duodenal y del 60-80% de los paciente con úlcera gástrica (Ferrer *et al.*, 2010, Ferrer, 2007, Suerbaum and Michetti, 2003).

La bacteria expresa diversos factores que contribuyen a su capacidad para colonizar las mucosas y lesionarlas: catalasa, lipasa, adhesinas, factor activador plaquetario, genes que codifican proteínas inmunógenas citotóxicas y una exotoxina, la citotoxina vacuolizante (Vac A), cuya presencia o ausencia podría relacionarse con la gravedad de la enfermedad (Sánchez *et al.*, 2002).

Actualmente, se ha comprobado que los niveles de somatostatina a nivel de la mucosa gástrica de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, son más bajos que en pacientes no infectados. Esta sustancia hormonal, secretada por las células D de los islotes pancreáticos, tiene un papel inhibitor sobre la secreción de gastrina, por lo que se piensa que el descenso de esta hormona altera el control normal de la síntesis y/o liberación de gastrina, con la consiguiente hipergastrinemia que origina un aumento de células parietales y un aumento de la secreción ácida (Atherton and Blazer, 2005).

Teniendo en cuenta que alrededor del 85% de las úlceras gástricas se asocian a infección por *Helicobacter pylori*, la asociación de este microorganismo con el consumo de AINEs puede suponer mayor riesgo de aparición de lesiones y de complicaciones asociadas, como el sangrado (Delgado and Bellido, 2004), que se incrementan sobre todo en pacientes mayores de 65 años (Ferrer *et al.*, 2010).

Una de las causas más frecuentes de úlceras gástricas y duodenales es la disminución del umbral de citoprotección por consumo de AINEs (Pentón, 2006,

Ferrer, 2007, Boffill *et al.*, 2007, Prieto, 2008). Las propiedades fisicoquímicas y el mecanismo de acción de estos fármacos, están directamente implicados en la patogenia de las lesiones gastrointestinales, al inhibir la síntesis de prostaglandinas, de esta manera alteran los mecanismos de protección y permite que los ácidos biliares, la pepsina y el ácido clorhídrico ataquen a la mucosa (Ferrer, 2007).

Se estima que entre el 15 y el 40% de los pacientes que toman AINEs de forma crónica, experimentan dispepsia. Sin embargo, estos síntomas frecuentes no son predictores fiables de las complicaciones gastrointestinales. De hecho, el 50-60% de los pacientes que desarrollan una úlcera o complicación grave no presenta síntomas o signos de alerta previos. Lo que sí parece estar claro es que la frecuencia de aparición de la úlcera gástrica en pacientes consumidores de AINEs de forma crónica es el doble que la úlcera duodenal (Ferrer *et al.*, 2010, Ferrer *et al.*, 2004).

Las alteraciones gastrointestinales producidas por los AINEs aparecen como consecuencia de dos mecanismos toxicológicos básicos: uno local o tópico, dependiente del pH y del pKa del medicamento; otro sistémico, mediado por la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), con la consiguiente reducción de la síntesis de prostaglandinas. Asimismo, hay un efecto mediado por la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular (Ferrer, 2007).

La necesidad de la administración de AINEs se debe tener muy en cuenta, debido al riesgo gastrointestinal asociado, si fuera indispensable el tratamiento resulta necesario valorar una forma eficiente de protección.

1.6 Citoprotección. Terapias actuales

Aunque la secreción ácida gástrica y la presencia del *Helicobacter pylori* han dominado en los últimos tiempos la fisiopatología de la enfermedad ulcerosa péptica, la apreciación de los medios por los cuales la mucosa gástrica se

protege a sí misma del daño ha sugerido enfoques terapéuticos adicionales, llevando a establecer el concepto de “citoprotección” (Ferrer *et al.*, 2010).

Hoy día, se estudia el efecto citoprotector de las prostaglandinas, prostaciclina, óxido nítrico, sulfhídricos y otros mediadores y mecanismos endógenos de la gastroprotección (Arrieta *et al.*, 2009). Muchos otros tipos de estructuras flavonoides (Rao *et al.*, 1997, Lorente, 2003), péptidos, terpenoides (Abad and Bermejo, 1994), xantinas y otros; así como compuestos que muestran ciertas acciones farmacológicas (unión al receptor de 5-hidroxitriptamina, unión al receptor adrenérgico, estabilización de los mastocitos y otras) se han asociado también de alguna forma a la gastroprotección (Ares, 1998). De esta manera, la adquisición de conocimientos cada vez más profundos en el campo de la fisiopatología del sistema gastrointestinal ha devenido en el desarrollo de una gran variedad de productos sintéticos que, tomando como base los conceptos actuales de citoprotección, son capaces de ejercer múltiples efectos beneficiosos en este sentido.

Los antihistamínicos H₂ (Cimetidina, Ranitidina, Famotidina, Nizatidina) producen la inhibición de la secreción ácida por bloqueo de los receptores específicos de producción de ácido (H₂ de la histamina). Los efectos adversos aparecen en aproximadamente el 3% de los casos. Los protectores de la mucosa como el Sucralfato actúan formando como un parche que se deposita en la úlcera y esto impide el ataque de los ácidos del estómago en la zona dañada. Estos medicamentos no se absorben. El Dicitrato bismutato tripotásico además de producir una tapa protectora de la mucosa, puede tener un efecto inhibitorio de la bacteria *Helicobacter pylori*. Otra sustancia protectora es el Acexamato de zinc, que parece también estabilizar los mastocitos e inhibir la secreción de histamina. La Pirenzepina produce un bloqueo nervioso (colinérgico) de la secreción de ácidos, por ello también produce sequedad de boca (3,9%) y visión borrosa (1,7%) (Ferrer, 2007).

El Omeprazol se comporta, como un inhibidor de la bomba de protones. Se comprobó que el mecanismo antiulceroso de este fármaco está determinado por el bloqueo del daño oxidativo y la apoptosis que se produce durante el proceso de ulceración (Biswas *et al.*, 2003). El Misoprostol es un compuesto análogo a la prostaglandina E1 (Sainz *et al.*, 2003), aumenta la resistencia de la pared del estómago a los ácidos, y a dosis altas bloquea la secreción de ácidos. Estos últimos compuestos son los más eficaces en la disminución de la aparición de las úlceras asociadas a los antiinflamatorios no esteroideos (Sheiman, 2001, Laszlo, 2002). Ahora bien, el tratamiento con Misoprostol es caro y produce efectos colaterales gastrointestinales como diarreas en un 10% de los casos y no se puede utilizar en el embarazo, y el Omeprazol por su parte, en tratamientos prolongados, puede producir anaclorhidria.

Como se puede apreciar el cada vez más sofisticado arsenal de medicamentos conlleva a un elevado costo de producción, lo que encarece también su adquisición, y a la par de sus efectos beneficiosos sobre la patología gastrointestinal, también provocan en su gran mayoría, una serie de efectos adversos o secundarios que comprometen otras funciones. De aquí que haya ido cobrando mayor importancia, de una manera más pronunciada en los últimos tiempos, el rescate de la medicación a partir de productos de origen natural, opción conocida y practicada por el hombre desde su propio surgimiento.

1.7 Fitoterapia gastroprotectora

Muchas especies vegetales usadas tradicionalmente con propiedades gastroprotectoras, han sido objeto de investigaciones en los últimos años, en aras de evaluar sus usos tradicionales y descubrir los metabolitos responsables de tal acción. En la literatura se informa el empleo de muchas preparaciones galénicas obtenidas de plantas que tienen efecto gastroprotector, haciendo especial énfasis dentro de estas, a extractos hidroalcohólicos o infusiones que poseen compuestos fenólicos en su composición química (Vanaclolta *et al.*,

2003, Lorente, 2003, Borgi *et al.*, 2007, Akindele and Adeyemi, 2007, Clavin *et al.*, 2007).

La gastroprotección la producen muchos extractos vegetales que presentan terpenoides, flavonoides, taninos, gomas, mucílagos, glucósidos y esteroides (Singh *et al.*, 2000) y en algunos casos como en los extractos hidroalcohólicos de *Phordendian crassifolium* y de *Franseuri artemisiodes*, su efecto citoprotector es comparable con la atropina (González *et al.*, 2000).

Los alcaloides oxidólicos presentes en el extracto de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato), parecen inhibir la producción del FNT α y actúan como agentes antiinflamatorios (Rojas, 2003), también actúan como antioxidantes, y se plantea además que son estimulantes del sistema inmunológico (Sandoval *et al.*, 2002), ya promueven la actividad de los granulocitos neutrófilos y los macrófagos en la sangre, así como de los macrófagos tisulares del sistema retículo-endotelial, planteándose la posibilidad de que los macrófagos activados por la *U. tomentosa* eliminen por fagocitosis los complejos inmunizantes que provocan las inflamaciones.

Los fenoles en general protegen a las plantas de la oxidación (Tojo and Leis, 2003). Los taninos pueden funcionar como antioxidantes capturando los radicales libres y deteniendo las reacciones de deterioro celular (García, 2003), presentan acción antiinflamatoria local y son astringentes es decir, disminuyen la secreción, coagulan los exudados y deshidratan los tejidos facilitando así la cicatrización de las heridas, además, provocan la precipitación de proteínas sobre la mucosa gástrica ejerciendo efecto gastroprotector y evitan además el paso de agua hacia la luz intestinal, asimismo se le atribuye también a los taninos, azúcares reductores, entre otros compuestos, las propiedades digestivas y antiulcerosas (Sánchez *et al.*, 2002, Boffill *et al.*, 2007).

Así pues, el reino vegetal puede proporcionar una fuente muy útil de nuevos compuestos gastroprotectores que se desarrollen como preparaciones farmacéuticas alternativas o complementarias a las terapias ya existentes.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, y en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), en el año 2014.

2.1 Equipos, Materiales y Reactivos empleados

Balanza analítica digital (Sartorius, BS-124S, Alemania), Balanza técnica digital (Sartorius, TE 12 000, Alemania), Estufa (Binder USA), horno Mufla (B-170, Alemania), Rotoevaporador (BUCHI R-200, Alemania), Bomba de vacío de membrana (ILMVAC, Suiza), Plancha de calentamiento (IKA , C-MAG HP7, Alemania), Micromolino de cuchillas(IKA- MF 10B, Alemania), Densitómetro (DA-130N, Kyoto, Japón), Lámpara UV(CAMAG, Alemania), Refractómetro Digital de ABBE (WYA-S, URRS), Destilador A3-25, URRS), jaulas de polipropileno con tapas de acero inoxidable (cajas T- 4) , Sonda intragástrica rígida 16G, Utensilios y cristalería de Laboratorio.

Éter dietílico, carbón activado, etanol Absoluto, Carboximetilcelulosa (CMC) todos de la marca (UNI- CHEM®), etanol al 70%, Omeprazol (cápsulas de 20 mg), Agua destilada.

2.2 Procesamiento del material vegetal

2.2.1 Recolección

La recolección del material vegetal se realizó en horas tempranas de la mañana, en áreas cercanas a la Universidad de Ciencias Médicas, en el mes de Junio del 2014. Esta se ejecutó de forma manual como en Miranda y Cuellar (2012) y se procuró tomar las hojas, y dejar ramas suficientes que garantizaran el normal desarrollo de la planta y un uso sostenible de este recurso. Las partes aéreas se trasladaron en bolsas de nylon hasta el laboratorio de Farmacognosia y Química Farmacéutica de la UCLV, donde se lavaron con abundante agua potable y se procedió a la selección de las hojas como material de interés. Previo al

procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr. C. Alfredo Noa Monzón especialista en Taxonomía Vegetal del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Mediante la comparación con la muestra correspondiente a la serie UCLV 10718 del Herbario ULV del citado Centro de Estudios, se observó una total correspondencia con las características del material recogido en herbario y con la descripción botánica establecida en la literatura (Aguilar *et al.*, 2010, Vázquez, 2011, Cifuentes *et al.*, 2008, Stephens, 1996, Vaugh, 1994). Las características macromorfológicas de *Cnidoscolus chayamnasa* Mc. Vauhg se muestran en la figura 2.1.



Figura 2.1.Características macromorfológicas de *Cnidoscolus chayamnasa* Mc. Vauhg. Fuente: (Yurrita, 2008).

2.2.2 Procesamiento de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos

2.2.2.1 Estandarización del secado. Parámetros evaluados

El secado se realizó por dos vías: a la sombra utilizando secadores con fondo de malla fina, y mediante calor artificial durante 5 días a una temperatura de 40°C con aire recirculado (Jimoh *et al.*, 2009), utilizando estufa marca (Binder USA), extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas.

La droga seca se trituró en un Micromolino de cuchillas (IKA- MF 10B, Alemania) de 5 pulgadas, con un tamaño de partículas de 3 mm.

Los parámetros evaluados para la estandarización del secado se describen a continuación:

Características organolépticas

a) Olor:

Se tomó una pequeña muestra del material vegetal en una placa petri y se huele quedando registrado el olor en las fosas nasales (Vázquez, 2011).

b) Color:

Se tomó una pequeña muestra del material vegetal en una placa petri y se observan los colores de la droga pulverizada después del estudio de secado (Vázquez, 2011).

Tiempo de secado

El registro de secado se siguió con una frecuencia de 12 horas entre una pesada y otra hasta obtener peso constante, en todos los casos el material se removió varias veces para evitar fermentaciones o contaminaciones microbiológicas. Las mediciones se realizaron en balanza analítica digital. En todos los casos se realizaron tres replicas para cada lote (CYTED, 1995).

Humedad residual

La determinación se realizó por el método gravimétrico según se especifica en la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (Ochamendi and Durand., 1992a).

Procedimiento: De la muestra de ensayo con el grado de trituración que determina la norma específica, se pesaron 2,0g con un error máximo de 0,5mg y se transfirió a un pesafiltro previamente tarado y se desecó a 105 °C durante tres horas. El pesafiltro se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar a la

temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, se repitió esta operación hasta obtener una masa constante.

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

$$H_g = \frac{M_2 - M_1}{M} 100 \quad (1)$$

Donde:

H_g : Contenido de humedad (%)

M_2 : Masa del pesafiltro con la muestra de ensayo (g)

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

100: Factor matemático para los cálculos

2.2.2.2 Determinación de la composición química

Se evaluó la influencia del método de secado en la posible composición química de las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh, siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico por Miranda y Cuéllar (2012). Se realizaron los ensayos para lípidos, alcaloides, coumarinas, quinonas, triterpenos y esteroides, resinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y taninos, aminoácidos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, mucílagos y principios amargos, realizando tres réplicas en cada caso.

Se utilizó la maceración en reposo como metodología de extracción y se empleó de manera sucesiva tres disolventes de diferente polaridad: éter de petróleo, etanol y agua destilada, macerando durante 24 horas para cada disolvente. Se realizaron los ensayos para los grupos de metabolitos fundamentales establecidos para cada disolvente (Miranda and Cuéllar, 2012).

Previo al tamizaje fitoquímico, cada lote de la planta fue molinado en un micromolino de cuchillas a 3000 rpm, pasando el material vegetal molinado por un tamiz interno de 3 mm con un flujo continuo.

2.2.2.3 Determinación de los índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos

Una vez estandarizado el secado se procedió a la determinación de los índices numéricos de la muestra del lote correspondiente al secado en la estufa a 40 °C, según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (NRSP # 309) (Ochamendi and Durand., 1992b).

Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad residual se especifica en el epígrafe 2.2.2.1.3 (Ochamendi and Durand., 1992a).

Determinación de cenizas totales

Procedimiento: En un crisol de porcelana previamente tarado, se pesó 1g de la muestra pulverizada y tamizada.

Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750 °C, durante dos horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó. Se repitió el proceso a partir de la incineración, hasta obtener masa constante, hasta que no difirió en más de 0,5 mg/g dos pesadas consecutivas. Para obtener masa constante en el tiempo de calentamiento y pesada se hizo a intervalos de 30 minutos (Ochamendi and Durand., 1992b).

La determinación de cenizas totales se calculó como sigue:

$$C_t = \frac{C_1 * 100}{100 - M} \quad (2)$$

Donde:

C_t : cenizas totales.

M : masa del crisol vacío (g).

C_1 : cenizas totales en base hidratada, que se calcula:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} 100 \quad (3)$$

Donde:

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

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

2.2.3 Caracterización fotoquímica del extracto

El extracto fue obtenido mediante la metodología de extracción continua por Soxhlet determinando las características organolépticas, índice de refracción, densidad relativa y sólidos totales para el extracto hidroalcohólico obtenido.

2.2.3.1 Obtención del extracto. Extracción por Soxhlet

Procedimiento: El material vegetal seco y molido (40 g), con tamaño de partícula 3mm se somete a una extracción por el método de extracción continua por Soxhlet empleando 300 mL de etanol al 70% en agua, durante 56 h, se filtra el extracto a través de carbón activado para eliminar clorofila. Posteriormente el extracto se concentró hasta sequedad en un rotoevaporador. Se tomaron como parámetros de análisis la determinación de sólidos totales, siguiendo las especificaciones de la NRSP # 310 del 1992 (Hawthorne *et al.*, 2000).

Para la caracterización del extracto se determinaron los siguientes parámetros según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 312: " Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo" (Ochamendi and Durand., 1992a).

2.2.3.2 Determinación de los índices de calidad del extracto

Características organolépticas.

a) Olor:

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente un centímetro de ancho por 10cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió

y se determinó si correspondía con las características del producto natural (Ochamendi and Durand., 1992a).

b) Color:

Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas (Ochamendi and Durand., 1992a).

Determinación de pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada. Se introdujo directamente los electrodos de pH -metro en la muestra y se realizó la lectura (Ochamendi and Durand., 1992a).

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 seleccionado 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 claros y oscuros. Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas (Ochamendi and Durand., 1992a).

Determinación de la densidad relativa

Se determinó la densidad relativa a la muestra de ensayo con un densitómetro digital (Ochamendi and Durand., 1992a).

Determinación de sólidos totales

Procedimiento: de la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada, la cápsula se colocó en 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 (Ochamendi and Durand., 1992a).

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

$$S_t = \frac{P_t - P}{V} 100 \quad (4)$$

Donde:

P_t : masa de la cápsula más el residuo (g)

P : masa de la cápsula vacía (g)

V : volumen de la porción de ensayo (g)

2.3 Evaluaciones preclínicas

En el estudio se realizaron dos técnicas básicas de toxicología y farmacología experimental:

- Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija.
- Modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.

2.3.1 Modelo biológico

En ambos estudios se emplearon ratas de la línea Sprague Dawley, con una masa corporal comprendida entre 180–250 g. Para el estudio de toxicidad se utilizaron ratas hembras (5 animales), mientras que para la técnica de gastroprotección se usaron ratas machos (40 animales).

2.3.2 Suministro y Cuarentena

Los animales se suministraron por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Estos se recibieron con su correspondiente certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria (Anexos 1 y 2).

Una vez recibidos los animales procedentes del Centro Suministrador, se inspeccionaron para corroborar el estado de salud general de la colonia y se seleccionaron, al azar, el 10% de los animales recibidos, incluyendo los moribundos, para realizarles exámenes de hematología y patología. El período de cuarentena fue de 15 días para ambos estudios.

2.3.3 Aleatorización y alojamiento

Los animales que presentaron un estado de salud general aceptable al finalizar la cuarentena se asignaron de forma aleatoria a los grupos experimentales. Para el estudio de toxicidad se alojaron en cajas T-2 de makrolón, con encamado a razón de 1 animal por caja, mientras que para el estudio de gastroprotección se alojaron a razón de 8 animales en cajas T-4 con fondo de rejilla.

Los cambios de frascos de agua, cajas y encamado se realizaron dos veces por semana, así como la limpieza del cubículo. Durante todo el estudio se mantuvo una temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 70% y ciclo de luz oscuridad 12/12.

2.3.4 Método de identificación

Los animales se identificaron individualmente mediante el método de ponche en la oreja. Las cajas se identificaron mediante tarjetas que contuvieron la siguiente información: número del Protocolo, número de la caja, grupo de tratamiento, número del animal, sexo, especie y línea.

2.3.5 Alimentación y agua de bebida.

El alimento consistió en pienso peletizado esterilizable, específico para ratas y ratones todo propósito, con fórmula CMO 1 000 en forma de pellet con su correspondiente certificado por el productor (CENPALAB) (Anexo 3), el cual se suministró a razón de 25 g/animal/día y agua de bebida apta para el consumo humano.

2.3.6 Preparación del producto de ensayo

La obtención del extracto se especifica en el epígrafe 2.2.3.1

2.3.7 Procedimiento experimental

2.3.7.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija

La metodología empleada para evaluar la toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico fue el Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP) con la administración de una dosis única de 5 000mg/kg de masa corporal según la metodología descrita por la guía para el ensayo de sustancias químicas 420 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, siglas en inglés) (OECD, 2008).

Los animales fueron pesados 24 horas antes de comenzar el estudio. El extracto hidroalcohólico de *Cnidocolus chayamnasa* Mc. Vaugh se administró a dosis única por vía oral de 5 000 mg/kg mediante sonda intragástrica 16 G con ayuno previo de 16 a 18 horas (OECD, 2008).

Los animales se observaron constantemente durante las primeras 4h, la evaluación continuó diariamente durante 14 días. El estudio tuvo previsto registrar las muertes en las primeras 24 h y cualquier signo clínico durante los 14 días de observación, el peso se controló el día 1 a los 7 y 14 días del ensayo. Al sacrificar los animales se realizó un estudio anatomopatológico macro y microscópico de los órganos (estómago, corazón, hígado, bazo, riñones, pulmones).

2.3.7.2 Modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto

Este modelo se encuentran establecido en el manual elaborado por especialistas del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) en el subprograma X. Química Fina Farmacéutica (1995).

Se confeccionaron 5 grupos experimentales de 8 animales cada uno:

- Grupo 1: Tratado únicamente con el vehículo, agua destilada (control negativo).
- Grupo 2: Tratado con el fármaco patrón, Omeprazol (se disolvió en CMC al 0,05%), la cantidad necesaria para administrar una dosis de 20 mg/kg.
- Grupo 3: Extracto dosis 1 000 mg/kg.
- Grupo 4: Extracto dosis 2 000 mg/kg.
- Grupo 5: Extracto dosis 4 000 mg/kg.

Los productos se administraron en una dosis de 10 mL/kg de peso del animal por vía oral, mediante entubación con cánula intragástrica, media hora antes de la administración del etanol absoluto; sustancia utilizada como agente ulcerogénico a razón de 1 mL/200g. Transcurrida 1 hora de la administración del etanol, los animales se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se les efectuó la laparotomía en el tercio anterior de la línea media. Luego se extrajeron los estómagos, los cuales fueron abiertos por la curvatura mayor. Posteriormente se lavaron cuidadosamente con una corriente suave de agua y se extendieron sobre una tabla de poliespuma mediante alfileres (Figura 2.2). Dicho procedimiento permitió la observación y la cuantificación de las úlceras formadas.

El recuento se efectuó visualmente utilizando un microscopio estereoscópico para la detección de las lesiones, midiéndose la longitud de las mayores usando un pie de rey y sumándolas.

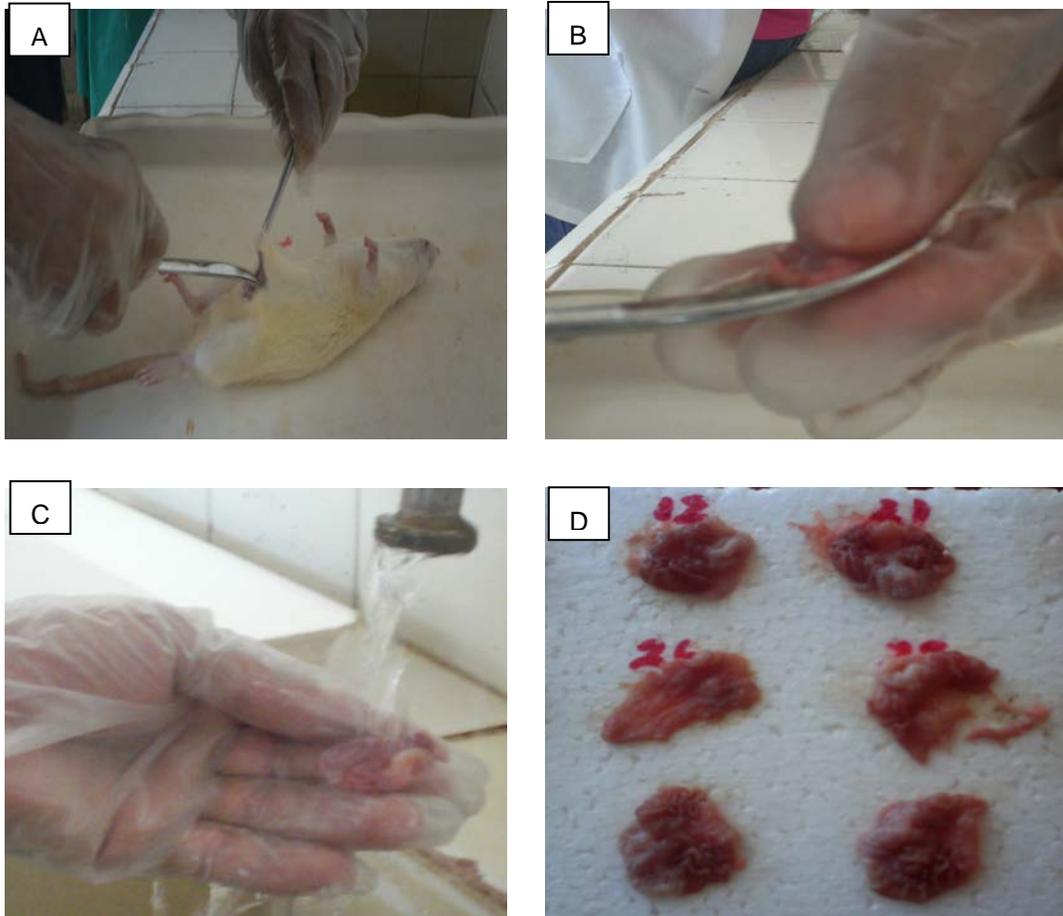


Figura 2.2. Procedimiento para la observación y cuantificación de las úlceras gástricas. A) Laparotomía. B) Abertura de los estómagos. C) Lavado de los estómagos. D) Extensión de los estómagos en poliespuma.

El grado de ulceración se cuantificó mediante la escala de Marhuenda (CYTED, 1995):

- 0: sin lesión.
- 1: Úlceras hemorrágicas, finas, dispersas y de longitud menor de 2mm.
- 2: Una úlcera hemorrágica fina de longitud mayor de 2mm.
- 3: Más de una úlcera de grado 2.
- 4: Una úlcera de longitud menor de 5mm y diámetro menor de 2mm.

5: De una a tres úlceras de grado 4.

6: De cuatro a cinco úlceras de grado 4

7: Más de seis úlceras de grado 4

8: Lesiones generalizadas de la mucosa con hemorragia.

Los resultados se expresan en porciento de inhibición respecto al índice de ulceración del lote control según la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{I.U.c - I.U.p}{I.U.c} 100 \quad (5)$$

Donde:

I .U.c: Índice de ulceración medio del lote control

I.U.p: Índice de ulceración medio del lote problema o patrón

2.4 Control de la Calidad, Bioética y Bioseguridad

Los estudios se ejecutaron teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio en Farmacología Experimental y todas las actividades se ejecutaron según lo establecido por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO) y sujetos a las inspecciones programadas por la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX).

Se cumplieron las normas de Bioética y Bioseguridad relacionadas con la experimentación animal (Anexo 4). El protocolo y el informe final se archivaron en la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC) de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX).

2.5 Análisis estadístico

El procesamiento estadístico se realizó a partir de la información obtenida en los modelos de datos primarios, con los cuales se confeccionaron bases de datos para cada una de las técnicas empleadas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 22 para Windows.

En el estudio de toxicidad se realizó un análisis descriptivo de los datos para conocer su naturaleza y sus principales tendencias. Para ello se calcularon las principales medidas de tendencia central y de dispersión en los diferentes momentos analizados, es decir, al inicio, a los 7 días y a los 14 días. Luego se compararon las medias del peso del grupo en los diferentes momentos para conocer si la ganancia de peso observada era significativa. Para ello se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas. Por último se realizó un análisis del incremento del peso a lo largo del tiempo para conocer si este como tendencia era significativo. Para ello se utilizó el test no paramétrico de Freidman sobre la variable peso a los diferentes momentos del tiempo con un intervalo de confianza del 95%. En el estudio de gastroprotección fueron aplicados los tests de Kruskal Wallis, para el análisis de varianza y el test de Mann Whitney para localizar las diferencias entre grupos 2 a 2.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Procesamiento de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos

3.1.1 Estandarización de secado. Parámetros evaluados

El proceso de secado es uno de los pasos más importantes en el tratamiento de las drogas vegetales. El exceso de agua puede provocar el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro, seguido de la hidrólisis de los principios activos (Miranda and Cuéllar, 2012). De los dos métodos utilizados para realizar este proceso, se seleccionó el secado en estufa por obtenerse los menores índices de humedad residual (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros para la estandarización del secado se explican a continuación:

Características organolépticas

Con respecto a las características organolépticas del polvo secado en la sombra, se pudo apreciar la aparición de un color distintivo (verde claro) en comparación con el color producido en la estufa (verde oscuro). Es posible que, a pesar de secar la planta a temperatura ambiente en una habitación con un deshumidificador, la atmósfera se haya saturado con vapor de agua, de forma que favoreciera la aparición de procesos fermentativos con cambios subsiguientes en las características organolépticas (Miranda and Cuéllar, 2012). El polvo obtenido por el secado en la sombra y en la estufa mantuvo su olor característico.

Tiempo de secado

Las hojas de la planta sometidas al secado a la sombra demoraron en secarse 9 días, mientras que las que se secaron en la estufa solo tardaron 5 días. Estos resultados pueden deberse fundamentalmente a las variaciones en cuanto a la humedad relativa ambiental durante el período de estudio; inferencia que se

asume debido a que el peso del material vegetal fluctuaba mucho de un día a otro. De ambos métodos de secado, se seleccionó el secado artificial como el más adecuado para la droga, teniendo en cuenta que para el secado en la estufa existe un control continuo de temperatura, lo cual no es posible lograr con el secado a la sombra, donde ocurren cambios bruscos de temperatura entre el día y la noche. Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas por Jimoh *et al.* (2009).

Humedad residual

Los límites de agua establecidos en las farmacopeas varían significativamente unos de otros, oscilando frecuentemente entre 8 y 14%, correspondiéndose los valores más altos a las drogas compuestas por cortezas, tallos y raíces (Miranda and Cuéllar, 2012). Los valores obtenidos para el porcentaje de humedad residual en los dos métodos evaluados estuvieron dentro de los límites establecidos por La Real Farmacopea Española (2010) y Normas Ramales de Salud Pública, (1992) de drogas vegetales. Ninguno de estos valores excedió el 10%, garantizando de este modo una calidad adecuada del material posterior al secado. En la Tabla 4 se observan los resultados del tiempo de secado y humedad residual para los dos métodos desarrollados.

Método	Tiempo de secado en días	Humedad residual (%) $X \pm DS$
Sombra	9	$10 \pm 0,033$
Estufa	5	$5,2 \pm 0,081$

Tabla 4. Resultados del análisis de secado de las hojas de *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh.

Fuente: Registro de datos primarios

3.1.2 Determinación de la composición química

Se evaluó cualitativamente la composición química de cada lote siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico por Miranda y Cuéllar (2012), reflejándose los resultados en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del tamizaje fitoquímico para ambos métodos de secado.

Extracto	Metabolito	Sombra	Estufa
Etéreo	Alcaloides	-	-
	Ácidos grasos	+	+
	Coumarinas	-	-
Etanólico	Resinas	-	-
	Triterpenos y/o esteroides	++	++
	Saponinas	+	-
	Alcaloides	+	+
	Glicósidos cardiotónicos	-	-
	Azúcares reductores	+	+
	Coumarinas	-	-
	Fenoles y/o Taninos	++	++
	Quinonas	-	-
	Flavonoides	+	+
	Aminoácidos	+	+
Acuoso	Saponinas	++	++
	Azúcares reductores	-	-
	Flavonoides	++	++
	Compuestos fenólicos y/o taninos	-	-
	Mucílagos	-	-
	Principios amargos	-	-

Leyenda: ++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo).

Fuente: Registro de datos primarios

En los dos métodos de secado se observa la presencia de metabolitos secundarios, como flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas. La presencia de estos metabolitos también han sido reportada por otros autores para la planta en estudio (Insuasty *et al.*, 2013, Figueroa *et al.*, 2009, Florence *et al.*, 2009, Heimler *et al.*, 1992) y para otras especies de la familia Euphorbiaceae, como es el caso de *Cnidoscolus aconitifolius* (Awoyinka *et al.*, 2007, Wallenka, 2006).

En cuanto al tamizaje fitoquímico, no se observaron diferencias entre ambos métodos de secado. Sin embargo, la presencia de saponinas tuvo un comportamiento excepcional, pues esta fue identificada en los dos tipos de extractos cuando fueron secados a la sombra, mientras que con el secado artificial no se determinaron.

Teniendo en cuenta el tamizaje fitoquímico se puede sugerir que en la composición de la especie se encuentran: compuestos reductores, alcaloides y fenoles y/o taninos, flavonoides y saponinas. Esta técnica es ampliamente usada para evaluar la composición de las drogas vegetales. Sin embargo, es importante señalar que esta ofrece solo una valoración cualitativa de la composición química de la planta y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que en la presencia o ausencia de un metabolito puede influir la concentración de los mismos, solubilidad, en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes.

3.1.3 Determinación de los índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos

Determinación de cenizas totales

Se obtuvo un valor de 10,7% de cenizas totales, el cual se encuentra dentro de los límites que establecen las Normas Ramales de Salud Pública (1992) y La Real Farmacopea Española (2010), los cuales tienen que ser menor que un 12% (Miranda and Cuéllar, 2012, Ochamendi and Durand., 1992b).

El contenido de cenizas totales indica en cierta medida el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga y por lo general se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice (Enríquez *et al.*, 2010). Estas permiten determinar la cantidad de material remanente después de la ignición: "cenizas fisiológicas", derivadas de los tejidos de la planta y "cenizas no fisiológicas", que son el residuo después de la ignición de la materia extraña (polvo, arena, tierra etc.) adherida a la superficie de la droga. 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 (Miranda and Cuéllar, 2012) por lo que se consideró que este valor debió corresponderse con las cenizas fisiológicas de la especie. Es importante destacar que la planta posee hierro, zinc, magnesio, cobre, fósforo, potasio, sodio y calcio en su composición lo que puede estar relacionado con el valor obtenido (Florence *et al.*, 2009, Quesada *et al.*, 2007).

3.2 Caracterización fotoquímica del extracto

En la tabla 6 se observan las características organolépticas para el extracto procedente de las hojas de *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh.

Tabla 6. Resultado de la caracterización físico-química del extracto.

Extracto	Densidad relativa	Índice de Refracción	pH	Sólidos totales (g/100mL)(media \pm DS, n=3)
Hidroalcohólico	0,8252	1,3652	6	0,359 \pm 0,04

Fuente: Registro de datos primarios

El valor del Índice de refracción de *C. chayamansa* (1,3652) constituye el promedio de tres determinaciones y tiene marcado interés a la hora de detectar adulteraciones y envejecimiento y sus principales ventajas son la rapidez y

sencillez con que se puede obtener. Similares valores se reportan por Armas (2014), Navas (2011), Salomón (2009), Milanés (1999).

El pH del extracto posee un valor de 6, lo cual lo hace más viable desde el punto de vista biológico. Mientras que los sólidos totales fueron de $0,359 \pm 0,04$. Resultados similares muestran estudios donde se evalúan extractos de plantas como *Hibiscus elatus Sw*, *Morinda citrifolia L*, *Smilax domingensis willd*, *Eucalyptus globulus labill* (Navas, 2011, Salomón *et al.*, 2009, Milanés *et al.*, 1999).

Aunque estos parámetros no están normados para este extracto de la planta en estudio podemos plantear que son adecuados tomando en consideración la correspondencia con otras drogas oficiales (Ochamendi and Durand., 1992a).

3.3 Evaluaciones preclínicas

3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral mediante el procedimiento de dosis fija

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad aguda imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas (Dipascuale and Wallace, 2001).

El Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP), validado internacionalmente y adoptado por la OECD # 420 ha permitido la introducción de una nueva variante para la estimación de la toxicidad de una sustancia por vía oral, que tiene como objetivo describir la clase de toxicidad sin precisar un valor exacto de la dosis letal media (DL50) (OECD, 2008).

Como resultado de la administración de una dosis única de 5 000 mg/kg se obtuvo un 100% de supervivencia. Las observaciones sistemáticas diarias no

mostraron evidencias de ningún signo de toxicidad, solo se manifestaron síntomas de piloerección en los primeros 30 min post administración, que pudieran estar relacionados con el momento de la administración, observándose una rápida recuperación de los animales.

El análisis de signos clínicos evidenció buen estado general de los animales y apariencia normal a partir de las cuatro horas de administrada la sustancia en estudio, caracterizada por pelos brillantes, ojos claros y brillantes, mucosas normo coloreadas. Los signos vitales resultaron normales, no existiendo alteraciones en las frecuencias cardíacas y respiratorias. El análisis de la conducta evidenció un comportamiento normal exploratorio. La respuesta a los estímulos fue normal y estuvo caracterizada por una uniformidad en la movilidad del total de los animales ante el toque y fuera de sus jaulas.

La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (CCPA, 1998) (Tabla 7).

Tabla 7. Evolución de la masa la masa corporal en función del tiempo.

Masa corporal (g)			
Día 1	Día 7	Día 14	Dif.
202,0	250,6	258,6	56,6
204,4	218,2	231,0	26,6
203,3	231,4	238,8	35,5
203,8	245,7	242,4	38,6
184,0	222,4	236,0	52

Fuente: Modelo de registro de pesos corporales en la investigación.

Al interpretar los resultados del test de Wilcoxon (Figura 3.1), la ganancia del peso observada entre el peso inicial y el peso a los 7 días es significativa y también lo es la ganancia observada entre el peso inicial y el peso a los 14 días, no ocurriendo lo mismo con la ganancia observada entre el peso a los 7 días y el peso a los 14 días. Por otro lado se demuestra también mediante el test no paramétrico de Freidman que el incremento del peso a lo largo del tiempo en el grupo es significativo.

Las tablas referidas a la aplicación de los citados tests se encuentran en el Anexo 5. En este se refleja el análisis descriptivo de los datos, el cálculo de las principales medidas de tendencia central y de dispersión en los diferentes momentos analizados. Además se incluyó la comparación de las medias del peso del grupo en los diferentes momentos para conocer si la ganancia de peso observada era significativa; así como los resultados del test no paramétrico de Freidman sobre la variable peso a los diferentes momentos del tiempo ($p < 0.05$).

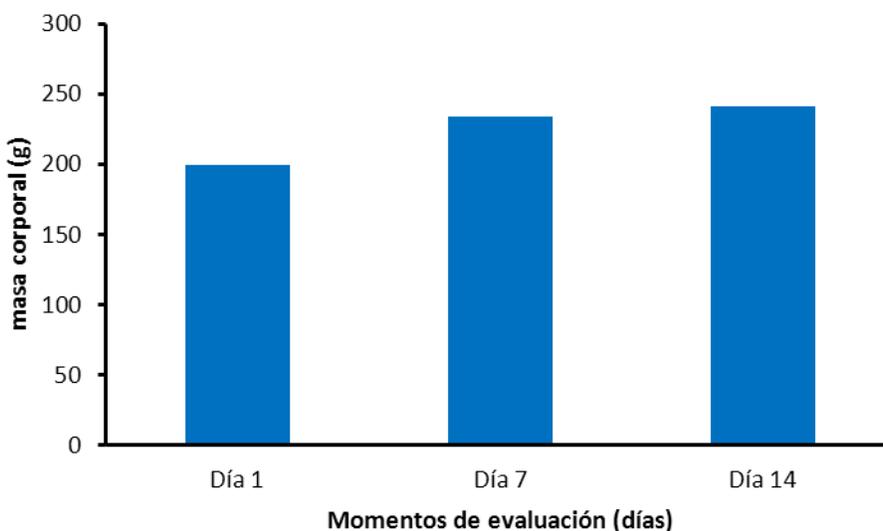


Figura 3.1. Comparación de las medias del peso corporal en cada grupo al inicio, a los 7 días y a los 14 días del experimento.

Durante la realización del estudio de toxicidad se prestó especial atención al consumo diario de agua y alimento y se observó que estos parámetros trascurrieron de forma normal.

Finalmente se realizó el análisis macroscópico de los órganos, no observándose afectación en ninguno de ellos. Los estudios anatomopatológicos no mostraron alteración alguna.

Es importante destacar que Torrico *et al.* (2003) reportaron un estudio de toxicidad aguda de extractos obtenidos de la planta en estudio por tres métodos (decocción, maceración e infusión) las dosis se incrementaron en orden creciente desde 25 mg/kg hasta 8000 mg/kg durante un tiempo de 90 min empleando la vía intraperitoneal (ip). Aunque en este artículo se evidenciaron como principales signos de toxicidad la contorsión y piloerección, junto con la diarrea (observada en menor grado) estos pudieron estar relacionados con trastornos gastrointestinales según describe el autor, siendo la piloerección y la diarrea, consecuencia de la contorsión intestinal.

Los efectos tóxicos observados, en la evaluación realizada por vía oral no se mostraron tales signos que pudieran atribuirse a la vía de administración de la planta.

En este sentido podemos afirmar que el extracto hidroalcohólico de *Cnidocolus chayamanasa* Mc. Vaugh en las condiciones evaluadas, no induce mortalidad ni aparecen signos de toxicidad. Por lo que puede clasificarse (según lo establecido por la OECD) como Categoría 5 (no tóxico) al no provocar mortalidad a la dosis ensayada y no evidenciarse alteraciones morfológicas relacionadas con toxicidad.

Similares resultados mostraron los extractos *Argyrochosma* (Taype *et al.*, 2013) y *Bixa orellana* L. (Shilpi *et al.*, 2006), donde se evaluaron dosis únicas de 5 000 y 4 000 mg/kg de m.c. respectivamente, clasificándose a ambas como no tóxicas.

3.3.2 Evaluación de la actividad gastroprotectora de *Cnidocolus chayamnasa* Mc. Vaugh en el modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol absoluto.

Para el estudio del efecto de los medicamentos sobre la úlcera gástrica, se han establecido una serie de investigaciones que han permitido la profundización en el conocimiento de los mecanismos de acción de varios agentes ulcerogénicos. La producción de úlceras agudas puede lograrse mediante varios modelos experimentales, dentro de los más utilizados están: el etanol absoluto y administración oral de indometacina (CYTED, 1995).

Al analizar macroscópicamente los animales sacrificados del grupo control negativo, encontramos en los estómagos una gran distensión, sus mucosas estaban enrojecidas y en ocasiones completamente hemorrágicas. Además se pudo constatar en ellas un número considerable de ulceraciones, la mayoría de gran severidad (Figura 3.2 A). Por el contrario, en los grupos a los cuales se les administraron las dosis del extracto, los estómagos se mostraron menos distendidos, sus mucosas no presentaban enrojecimiento y se apreció en ellas una evidente disminución en el número y la severidad de las lesiones ulcerosas, incluso en algunos casos el estado de la mucosa se mantuvo más conservado en relación con la de los animales que conformaron el grupo patrón (Figura 3.2 B y C).



Figura 3.2. Observación macroscópica de los estómagos. A) Control negativo. B) Control positivo. C) Dosis de 4 000 mg/kg

El etanol absoluto reduce la secreción de bicarbonato y la producción de moco, alterando la composición glicoproteica, desestabilizando los lisosomas de las

células glandulares, que liberan las hidrolasas ácidas. La administración de una dosis única produce un daño que ocupa de un 30 a un 40% de la superficie total de la mucosa, con bandas hemorrágicas necróticas en la zona del cuerpo del estómago (Boffill *et al.*, 2008).

Varios estudios experimentales han demostrado que los radicales libres generadores de oxígeno y la peroxidación lipídica juegan un papel importante en la patogénesis de las lesiones gástricas agudas inducidas por etanol (Sorbye and Svanes, 1994). Este agente produce una rápida y fuerte vasoconstricción que es acompañada por una rápida y vigorosa dilatación arteriolar. Los oxirradicales generados durante los episodios mencionados de isquemia-repercusión provocan severos cambios a nivel celular conduciendo a la muerte de la célula porque debido a su extrema reactividad atacan constituyentes celulares esenciales como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de membrana, formando compuestos tóxicos, tales como epóxidos, aldehídos y nuevos radicales libres (Bucciarelli and Skliar, 2007). Esto produce en la mucosa gástrica características lesiones necro-hemorrágicas en bandas que afectan sobre todo al cuerpo del estómago. La peroxidación lipídica produce y libera sustancias que suministran y activan leucocitos polimorfonucleares (González, 2010).

En los estudios de gastroprotección además de la apreciación visual se tienen en cuenta dos variables, el número de lesiones y su severidad. El número de úlceras aunque es indicativa de posible protección en la mucosa en la mayoría de los casos no se corresponde con la severidad de las lesiones (Pizarro, 2011, Boffill *et al.*, 2008) por lo que el grado de ulceración es determinante y decisivo en este tipo de técnicas.

La tabla 8 nos muestra las diferencias entre los diferentes grupos de dosis luego del análisis de varianzas no paramétrico realizado. En el mismo se utilizó el test de Kruskal Wallis, para el análisis de varianzas y el test de Mann Whitney para localizar las diferencias entre grupos 2 a 2.

Tabla 8. Análisis entre los diferentes grupos experimentales.

Grupos	Cantidad úlceras	Grado de ulceración
Control Vehículo	9.13 ^a	107.7250 ^a
Control Positivo	.13 ^c	.2500 ^b
Dosis I (1 000 mg/kg)	5.13 ^b	62.3750 ^a
Dosis II (2 000 mg/kg)	.25 ^c	.6250 ^b
Dosis III (4 000 mg/kg)	.00 ^c	.0000 ^b
Total	2.92	34.1950

Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos para un 95% de confianza.

Como se puede apreciar el control negativo y el grupo experimental de 1 000 mg/ kg conservan el mayor grado de ulceración promedio (107,7 mm² y 62,4 mm²), estos no se diferenciaron estadísticamente. Por otro lado, tampoco se diferenciaron los grupos experimentales de 2 000 mg/kg (0,625 mm²), 4 000 mg/kg (0.00 mm²), y el control positivo (0.25 mm²) y mostraron todos diferencias con el grupo control negativo y la dosis de 1 000 mg/kg.

Se pudo observar un aumento progresivo del porcentaje de inhibición del grado de ulceración (desde 21% a la dosis de 1 000 mg/kg, hasta un 99 y 100% a las dosis de 2 000 mg/kg y 4 000 mg/kg, respectivamente). Con la mayor dosis utilizada se obtuvo la mayor inhibición. Los valores obtenidos en este caso no presentaron diferencias estadísticamente significativas con relación al Omeprazol (99%), utilizado como control positivo (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de los grupos experimentales y el control positivo.

Grupo	% de inhibición
Control positivo (Omeprazol 20 mg/kg)	99
Dosis 1 000 mg/kg	21
Dosis 2 000 mg/kg	99
Dosis 4 000 mg/kg	100

Los porcentos de inhibición del modelo desarrollado se comportaron estadísticamente similares al control positivo en las dosis de 2 000 mg/kg y 4 000 mg/kg. Lo que demuestra la capacidad protectora de esta planta sobre la mucosa gástrica. Se aprecia en este caso un incremento del efecto gastroprotector a medida que aumenta la dosis, el extracto administrado a la dosis de 4 000 mg/kg ofreció el mayor porcentaje de inhibición en el modelo ensayado (Anexo 6).

Al evaluar la actividad gastroprotectora de extractos hidroalcohólicos, utilizando etanol absoluto como agente ulcerogénico, (Bucciarelli and Skliar, 2007). *Artemisia annua*, *Aloysia gratissima*, y *Maytenus ilicifolia*, reflejan porcentos de inhibición más bajos (87,6%, 71,5% y 68,3%) que los obtenidos en nuestro trabajo.

Este mismo autor también evaluó la actividad gastroprotectora del extracto de *Solidago chilensis* en otras de sus investigaciones la cual arrojó un porcentaje de inhibición de 91,9% muy cercano pero ligeramente inferior al obtenido en nuestro trabajo (Bucciarelli A y Skliar M I, 2007). Similares resultados se obtuvieron por Pinto y Bustamante (2008), los cuales evaluaron la especie *Plantago major* (llantén) en modelo de etanol absoluto utilizando dosis de 500 mg/kg, para varios extractos, donde el extracto hidroalcohólico mostró un porcentaje de inhibición de 90.72%. Estos autores atribuyeron tal acción a la presencia de flavonoides y taninos metabolitos que como se dijo anteriormente han sido identificados en la especie objeto de estudio en la presente investigación (Mercado *et al.*, 2013, Insuasty *et al.*, 2013, Figueroa *et al.*, 2009, Florence *et al.*, 2009, Heimler *et al.*, 1992).

El *Aloe vera*, con comprobado efecto antiulceroso y protector de la mucosa gástrica, incluye a los taninos dentro de los compuestos químicos a los cuales se le atribuyen estos efectos (Álvarez *et al.*, 1999).

Por otra parte, los principales metabolitos secundarios a los que se le atribuyen las propiedades antiulcerosa y antimicrobiana de la *Bidens pilosa* L son fundamentalmente los taninos y flavonoides (Bucciarelli and Skliar, 2007).

Se puede apreciar que los compuestos fenólicos, en especial los flavonoides, parecen ser metabolitos determinantes en la protección de la mucosa gástrica. Numerosos mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto gastroprotector de los flavonoides, como por ejemplo el aumento del contenido mucosal de prostaglandinas, disminución de la secreción de histamina, eliminación de radicales libres, aumento de la perfusión vascular y reducción de la adherencia leucocitaria. Algunos de ellos, reducen la motilidad gastrointestinal prolongando el tiempo de contacto de los extractos con las paredes del estómago y aumentando de esta manera el efecto gastroprotector. Por tanto previenen lesiones en la mucosa gástrica inducida por diferentes métodos y la protegen contra distintos agentes necróticos (Bucciarelli and Skliar, 2007).

Palomino *et al.* (2010) refieren que en muchos de los compuestos fenólicos se ha comprobado la acción protectora de la mucosa gástrica los cuales son considerados citoprotectores frente a los rayos ultravioletas, virus, etc. También se ha comprobado que el tratamiento con una fracción enriquecida de flavonoides induce al incremento de la producción de prostaglandinas, somastostatina y la reducción de gastrina que participan en el mecanismo bioquímico de protección a la mucosa gástrica al inhibir la secreción del ácido clorhídrico y estimular la producción de mucus.

De esta manera se comprueba que la especie *Cnidocolus chaymansa* Mc. Vaugh, en las condiciones evaluadas posee actividad como protectora de la mucosa gástrica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Tomando en consideración las normas vigentes para drogas vegetales, la especie *Cnidoscolus chayamanasa* Mc. Vaugh cumple con los parámetros farmacognósticos establecidos según las evaluaciones realizadas.
2. El extracto hidroalcohólico de *Cnidoscolus chayamanasa* Mc. Vaugh en las condiciones evaluadas, puede clasificarse (según lo establecido por la OECD) como Categoría 5 (no tóxico) al no provocar mortalidad a la dosis ensayada y no evidenciarse alteraciones morfológicas relacionadas con toxicidad.
3. El extracto hidroalcohólico de *Cnidoscolus chayamanasa* Mc. Vaugh posee actividad gastroprotectora en las condiciones evaluadas. Los porcentajes de inhibición del modelo desarrollado se comportaron estadísticamente similares al control positivo utilizado en las dosis de 2 000 mg/kg y 4 000 mg/kg.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Realizar otras evaluaciones que permitan corroborar la composición química de la especie.
2. Realizar evaluaciones del efecto antiinflamatorio que aporte nuevos elementos para corroborar la actividad evaluada.
3. Evaluar la actividad gastroprotectora a metabolitos aislados de la especie que permitan justificar la acción comprobada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2010. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. Orden spi/2891. BOE núm. 273, RCL, 2888. Editorial Aranzadi SA, 4ta Edición.
- ABAD, M. J. & BERMEJO, P. 1994. Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Med*, 60 (3), 228-31.
- AGUILAR, M., MACARIO, P., HUERTA, E., HERNÁNDEZ, S., ALBA, R. & GARCÍA, E. 2010. Crecimiento y productividad de chaya (*Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh, euphorbiaceae) con densidad de plantación variable. *Cultrop* [Online], 31(4). Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362010000400002&script=sci_arttext.
- AKINDELE, A. J. & ADEYEMI, O. 2007. Antiinflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78(1), 25-28.
- ÁLVAREZ, A., RAMOS, I., ROBAINA, Y. & PÉREZ, G. 1999. Efecto antiulceroso de fórmulas que contienen un extracto de *Aloe vera* L. (sábila). *Rev Cubana Plant Med*, 1(3), 31-6.
- ARES, J. J. 1998. Gastroprotective agents for the prevention on NSAID- induced gastropathy. *Curr Pharm Des*, 4 (1), 17-36.
- ARMAS, Y. 2014. *Evaluación fitoquímica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de Mosiera bullata (Britton & P. Wilson) Bisse*. Tesis de Maestría, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- ARRIETA, J., REYES, B., REYES, A., RODRÍGUEZ, J. & E., S. M. 2009. Papel de los grupos sulfhidrilos, las prostaglandinas y el óxido nítrico endógeno, en la gastroprotección del lanosterol sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Online], 40 (3). Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912963004>.
- ATHERTON, J. C. & BLAZER, M. J. 2005. *Helicobacter pylori* infections. En: *Kasper D. Braunwald, Fauci AS, Harrisons Principles of Internal Medicine, 16 ed.* New York: McGraw-Hill.

- AWOYINKA, O. A., BALOGUN, I. O. & OGUNNOWO, A. A. 2007. Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* [Online], 1(3). Available: <http://www.academicjournals.org/JMPR>.
- BISWAS, K., BANDYOPADHYAY, V., CHATTOPATHYAY, I., VARADARAY, A., ALI, E. & BANERJEE, R. K. 2003. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem*; (en prensa).
- BITTNER, J. M., ALARCÓN, P., AQUEVEQUE, J., HERNÁNDEZ, M. V., HOENEISEN & SILVA, M. 2011. *Bol Soc Chil. Quím* [Online], 46 (4). Available: <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442001000400006>
- BOFFILL, M. A., MARCEL, R., MONTEAGUDO, E., SÁNCHEZ, C., DÍAZ, L. & IGLESIAS, N. 2007. Actividad gastroprotectora del fruto de la musa sp ABB sobre úlceras inducidas por etanol. *Medicentro*, 11(1).
- BOFFILL, M. A., MARCEL, R., MONTEAGUDO, E., SÁNCHEZ, C., DÍAZ, L. & IGLESIAS, N. 2008. Efecto gastroprotector del fruto de la musa ABB sobre las úlceras experimentales inducidas por indometacina. *Medicentro*, 12(1).
- BORGI, W., GHEDIRA, K. & CHOUCANE, N. 2007. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root bark. *Fitoterapia*, 78, 16-19.
- BUCCIARELLI, A. & SKLIAR, M. I. 2007. Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. *Ars Pharm*, 48 (4), 361-369.
- CASTRO, J., VILLA, R., RAMÍREZ, G. & MOSSO, G. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Rev Cubana de Plant Méd* [Online], 19(1). Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962014000100012.
- CCPA. 1998. Consejo Canadiense de Protección de Animales, Manual sobre el cuidado y uso los animales de experimentación. Ottawa. [Online]. Available: <http://www.ccac.ca/en/CCAC-Programs/Guidelines-Policies/GUIDES/SPANISH/V/1-93/CHAP/CH1.HTM>.

- CIFUENTES, R., POLL, E., BRESSANI, R. & YURRITA, S. 2008. Caracterización botánica, molecular, agronómica y química de los cultivares de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) de Guatemala. *Revista de la universidad del Valle de Guatemala*. [Online].
- CLAVIN, M., GORZALCZANY, S., MACHO, A., MUÑOZ, E., FERRARO, G., ACEVEDO, C. & MARTINO, V. 2007. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J Ethnopharmacol*, 112(3).
- COLLANTES, D. 2012. Botánica de las Euphorbiaceae. Available: <http://es.slideshare.net/darwincollantes/familia-euphorbiaceae>.
- CRUZ, V. S. M. 2012. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth y *L. guatemalensis* Mez).
- CURBELO, L. K. C. 2012. Chaya: la prodigiosa espinaca maya. Aclaraciones sobre la planta conocida como salvahombre.
- CYTED 1995. Manual de técnicas de investigación. *Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos en Plantas de la Región. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*, 81-98.
- CHIRRI, W. H. 2013. *Estudio comparativo de la acción gastroprotectora del Plantago major y el omeprazol sobre la gastritis inducida por la administración de Ketocoralo en dosis usuales en la terapia analgésica – antiinflamatoria estomatológica*. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- DELGADO, R. & BELLIDO, J. D. 2004. Importancia fisiopatológica de la secreción clorhidro - péptica. Available: <http://gastrohvm.medynet.com/ueap.htm>.
- DIPASCUALE, L. & WALLACE, H. 2001. Acute toxicity and eye irritancy. *En: Principles and Methods of Toxicology. 4 ed. Philadelphia: Taylor and Francis.*, 4a, 853-917.

- ENRÍQUEZ, M. L., CRUZ, A. D., BILBAO, R. O., MIRANDA, M. M. & RUENES, G. M. 2010. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos. *La Habana. Editorial Ciencias Médicas.*
- FERRER, I., PÉREZ, J. & HERRERÍAS, J. 2010. Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre úlcera péptica. *España: Espai Gráfic Anagrafic.*
- FERRER, J., PÉREZ, J. M. & HERRERÍAS, J. 2004. Guía de Seguimiento farmacoterapéutico. Úlcera péptica. *Granada: MJ Faus.*
- FERRER, J. M. 2007. *Prescripción de antiulcerosos en Granada en el período 2000-2005 y efecto de la autorización de especialidades farmacéuticas genéricas, de los precios de referencia y de los precios máximos en los medicamentos.* Tesis, Universidad de Granada.
- FIGUEROA, V. L., DÍAZ, C. F., CAMACHO, L. A. & LÓPEZ, R. M. 2009. Efeitos induzidos por *Ruta graveolens* L., Rutaceae, *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh, Euphorbiaceae, e *Citrus aurantium* L., Rutaceae, nos níveis de glucose, colesterol e triacilglicerídeos num modelo do rato diabético. *Braz J Pharmacogn.*, 19 (4), , 898-907.
- FLORENCE, O. J., BABALOLA, S. A. & YAKUBU, M. T. 2009. Assessment of the antioxidant potential of *Cnidocolous chayamansa*. . *Pharmaceutical Biology* [Online], 47(9). Available: <http://www.informahealthcare.com/phb>.
- GARCÍA, I. N. 2003. Caracterización fisicoquímica y funcional de los residuos fibrosos del mango criollo (*Mangifera indica* L.) y su incorporación en galletas. [Online]. Available: <http://jupiter.utm.mx/Tesis/8487.pdf>.
- GONZÁLEZ, E., IGLESIAS, I., CARRETERO, E. & VILLAR, A. 2000. Gastric citoprotection of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 70, 329-33.
- GONZÁLEZ, L. R. F., FLORES, H. M. E., QUINTERO, R. M. J. & KARCHESY, J. J. 2003. Flavonoid and cyanogenic contents of chaya (spinach tree). *Plant foods for humannutrition*, 58, 1-8.
- GONZÁLEZ, R. 2010. *Efecto citoprotector de extractos acuosos de Indigofera guatemalensis e Indigofera suffruticosa en modelos de úlceras gástricas*

- inducidas por etanol en ratones*. Tesis. Doctorado en Medicina, Universidad. Dr. José Matías Delgado.
- HAWTHORNE, S., GRABANSKI, C., MARTIN, E. & MILLER, D. 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J Chromatogram*, 892, 421-433.
- HEIMLER, D., PIERON, A., TATTINI, M. & CIMATO, A. 1992. Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europae* L. leaves. *Chromatographie* 33, 349-373.
- HEINRICH, M., BARBES, J., GIBBONS, S. & WILLIAMSON, E. M. 2014. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Ed. Elsevier. Madrid.
- INSUASTY, S. E., APRÁEZ, G. E. & GÁLVEZ, C. A. 2013. Caracterización botánica, nutricional y fenológica de especies arbóreas y arbustivas de bosque muy seco tropical. *Ciencia Animal*, 6, 109-124.
- JIMOH, F. O., BABALOLA, S. A. & YAKUBU, M. T., PP. . 2009. Assessment of the antioxidant potential of *Cnidocolus chayamansa*. *Pharmaceutical Biology*, 47(9), 903-909.
- KROHNENGOLD, L. 2012. Chaya: la prodigiosa espinaca maya. Aclaraciones sobre la planta conocida como salvahombre.
- KUTI, J. O. & TORRES, E. S. 1996. Potential nutritional and health benefits of tree spinach. In: *J. Janick(ED.), progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA., 516-520.
- LASZLO, A. 2002. Prophylaxis and therapy of gastropathy caused by non steroidal anti-inflammatory drugs. *Orv Hetil*, 143, 1643-8.
- LIU, E. S. & CHO, C. H. 2000. Relationship between ethanol-induced gastritis and gastric ulcer formation in rats. *Digestion*, 62, 232-9.
- LORENTE, M. D. 2003. *Estudio farmacognóstico de Euphorbia hirta L.* Tesis, Universidad de Granada.

- MARRASSINI, C., GORZALCZANY, S. & FERRARO, G. 2010. Actividad analgésica de dos especies de *Urtica* con usos etnomédicos en la República Argentina. *Dominguezla*, 26(1).
- MARTÍNEZ, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. *FCE. México*, 1220 pp.
- MARTÍNEZ, M., JIMÉNEZ, J., CRUZ, R., JUÁREZ, E., GARCÍA, R., CERVANTES, A. & R., M. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Serie Botánica*, 73(2), 155-281.
- MERCADO, G., CARRILLO, L., WALL, A., LÓPEZ, J. A. & ÁLVAREZ, E. 2013. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr Hosp*, 28(1), 36-46.
- MILANÉS, R., ALONSO, D. & G, G. 1999. Farmacognosia de la droga "flores de majagua" (*Hibiscus elatus* Sw., familia Malvaceae). IV. Estandarización del extracto fluido. *Rev Cubana Plant Med*, 4 (2).
- MIRANDA, M. M. & CUÉLLAR, C. A. 2012. Farmacognosia y Productos Naturales. *La Habana: Editorial Félix Varela 2da Edición*.
- MOLINA, C. A., CURLE, W. L. & BRESSANI, R. 2013. Redescubriendo el valor nutritivo de las hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*; Euphorbiaceae). *Cienc Acción (Gua) [Internet]*. 1997 [Online], (3). Available: <http://kirika.uvg.edu.gt/info-academica/u-academicas/inst-invest-old/boletin/b3/cienac3.html>].
- NAVAS, C. M. 2011. *Obtención de tinturas del rizoma de Zarzaparrilla (Smilax domingensis willd) y de las hojas de Eucalipto (Eucalyptus globulus labill) por percolación y maceración dinámica a escala de laboratorio determinando las condiciones de operación con el mayor rendimiento de extracción y actividad antibacteriana*. Tesis. Ingeniera Química, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- OCHAMENDI, E. & DURAND. 1992a. Norma Ramal de Salud Pública #312: "Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo". *La Habana: Editorial Pueblo y Educación*.
- OCHAMENDI, E. & DURAND. 1992b. Normas Ramales de Salud Pública # 309 (NRSP # 309) "Droga cruda. Métodos de ensayo". *La Habana: Editorial Pueblo y Educación*.
- OECD. 2008. Organization for Economic Co-operation and Development. *Revised Draft Guideline 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Guideline for Testing of Chemicals* [Online]. Available: <http://www.oecd.org>.
- OSORIO, J. D. 2009. Aspectos básicos de farmacognosia Edison. *Introducción a la Farmacognosia y la Química de los productos naturales. Follow@pharmacognosy*.
- PALOMINO, M., HUAMÁN, Ó. G., BÉJAR, E., JURADO, B. & PALOMINO, C. 2010. Evaluación gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de hojas de *Guilleminea densa* (Hum. Bonpl. ex Willd.) Moq. (Sanguinaria) en úlceras inducidas con etanol. *Rev Acad Peru Salud*, 17(2).
- PALOS, G. M. & REYNOSO, R. 2007. *Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (Cnidoscolus chayamansa) en un modelo experimental de diabetes en ratas Wistar*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México.
- PAZ, A. 2003. Incremento de la calidad del moco producido por la mucosa gástrica, debido a la acción del rocoto arequipeño (*Capsicum pubescens arequipenses*) en un modelo de úlcera experimental en ratas, como alternativa en la prevención de la gastritis crónica. *Rev Diag*, 4 (3), 47-8.
- PAZMIÑO, C. 2011. *Determinación de la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcohólico de Justicia chlorostachya Leonard (Insulina) en ratones con hiperglicemia inducida*. Tesis, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- PENTÓN, A. 2006. *Evaluación preclínica del efecto gastroprotector de la Morinda citrifolia L.* Tesis, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zarate Ruiz”.
- PÉREZ, J. L., ALFONSO, C. A., SALAS, M. H., PUENTE, Z. E., BETANCOURT, H. J., JACKSON, H. E. & MORA, T. 2011. Toxicidad aguda oral de *Solanum torvum* Sw. (prendejera). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [Online], 16(4). Available: <http://scielo.sld.cu>.
- PESKAR, B. M., EHRLICH, K. & PESKAR, B. A. 2002. Role of ATP sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 30(1), 969-74.
- PINTO, J. & BUSTAMANTE, Z. 2008. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de llantén (*Plantago major*). *BIOFARBO*, 16, 40-41.
- PIZARRO, A. 2011. *Evaluación del efecto gastroprotector del extracto acuoso de Matricaria recutita.* Tesis de Maestría, Unidad de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zarate Ruiz”.
- PRIETO, T. 2008. *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de un crudo de flavonoides extraído a partir de las hojas de Boldoa purpurascens, Cav.* Tesis, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara “Dr. Serafín Ruiz de Zarate Ruiz”.
- QUESADA, T. T., ACERO, G., MARTÍNEZ, V. R., LÓPEZ, G. M. A., VALDIVIA, F. A. & MARTÍNEZ, A. A. 2007. Evaluación del Contenido de Minerales y Ácido Cianhídrico en Hojas de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) con Tres Niveles de Fertilización Orgánica y Química. *IX Congreso de ciencia de los alimentos y v foro de ciencia y tecnología de alimentos.* [Online].
- RAO, V. S., SANTOS, F. A. & SOBREIRA, T. T. 1997. Investigations on gastroprotective and antidiarrheal properties of ternatin, a tetrametoxiflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Med*, 63 (2), 146-9.

- REGALADO, A. I., SÁNCHEZ, L. M. & B, M. 2012. Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la úlcera péptica. *Rev Cubana Farm*, 46(1).
- ROJAS, P. A. 2003. Efecto de un extracto de uncaria tomentosa (uña de gato) sobre la producción de factor de necrosis tumoral-alfa en un modelo *in vivo* y su acción como un agente antiinflamatorio. *Rev Diag*, 4(3), 47-8.
- ROSS-IBARRA, J. 2003. Origen y domesticación de la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* Mill I. M. Johnst): La espinaca Maya. 19, 287-302.
- SAINZ, M. L., REDIN, M. D., SAN MIGUEL, R., BALESTENA, J., SANTOS, M. A. & PETRI, M. 2003. Problemas de utilización de medicamentos en pacientes enterostomizados. *An Sist Sanit Navarra*, 26 (3), 339-480.
- SÁINZ, S. R., CABRERIZO, G. J., IRAZOLA, Á. C. & O, E. 2008. Úlcera péptica: manejo general y extrahospitalario. *Medicine*, 10(3), 133-40.
- SALOMÓN, S., LÓPEZ, O., GARCÍA, C., GONZÁLEZ, M. & V, F. 2009. Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de hojas de *Morinda citrifolia* L. (noni). . *Rev Cubana Plant Med*, 14 (2).
- SÁNCHEZ, L. M., BATISTA, Y., CAMARGO, M., MAYET, D., LORENZO, M., FARRADAZ, F. & RODRÍGUEZ, A. 2002. Evaluación de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) en úlceras gastroduodenales, fuente de un candidato a medicamento. *En: Revista Cubana de farmacia. edn especial. Ciudad de la Habana*, 36(2), 61-63.
- SANDOVAL, M., AYALA, S., ORÉ, R. & ARROYO, J. 2002. Inducción de la formación de moco gástrico por sangre de grado (croton palanostigma). *An Facultad Med Univ Nac Mayor San Marcos*, 63 (4), 251-6.
- SHEIMAN, J. M. 2001. The impact of non steroidal antiinflammatory drug-induced gastropathy. *Am Fam J Manag Care*, 7.
- SHILPI, J. A., TAUFIQ-UR-RAHMAN, M., UDDIN, S. J., ALAM, M. S., SADHU, S. K. & SEIDEL, V. 2006. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. *J.Ethnopharmacol*, 108, 264-271.

- SINGH, R. K., BHATTACHARYA, S. K. & ACHARYA, S. B. 2000. Pharmacological activity of abies pindrow. *J. Ethnopharmacol*, 73, 47-51.
- SORBYE, H. & SVANES, K. 1994. The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing. *Dig Dis Sci Sep*, 12, 305-17.
- STEPHENS, J. M. 1996. Chaya—*Cnidoscopus chayamansa* Mc. Vaugh. . *University of Florida IFAS Extension*.
- SUERBAUM, S. & MICHETTI, P. 2003. *Helicobacter pylori* infection. *N Eng J Med*, 347 (15), 1175-86.
- TAYPE, A., CAIRA, Y. & CASTILLO, C. 2013. Efecto hipolipemiente del extracto acuoso de las hojas de *Argyroschisma nivea* en *Rattus rattus* variedad albinus. *ReNut* [Online], 7(2). Available: <http://www.iidenut.org/pronj/kaslos/solidos/pdf>
Efecto_hipoglicemiente_del_extracto_acuoso_de_las_hojas.pdf.
- TOJO, T. & LEIS, R. 2003. Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. *Bol Pediatr*, 43, 376-95.
- TORRICO, F. M., GABAY, J., SUÁREZ, A. I. & COMPAGNONE, R. S. 2003. Estudio Toxicológico de *Cnidoscopus chayamansa*. *Revista facultad de farmacia* [Online], 66 (2). Available: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/article/view/76/60.
- VANACLOXTA, V. B., ARTECHE, A. & GUENECHEA, J. L. 2003. Fitoterapia Vademecum de prescripción de Plantas medicinales. 4^{ta} edición, España: Masson.
- VAUGH, M. 1994. Chaya (*Cnidoscopus chayamansa*). *The Horticultural Sciences Departament, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Document HS578*.
- VÁZQUEZ, A. B. 2011. *Estudio etnobotánico de la flora medicinal utilizada en el control de la diabetes tipo2 en la comunidad de Agua de Perro, municipio de Acapulco Juárez Guerrero, México*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.

- VELÁSQUEZ, A. L., LA PAZ, BOLIVIA. 2007. Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* y *Enterococcus faecalis*.
- VENTURA, P. R. 2004. *Evaluación nutrimental y nutracéutica de la hoja de chaya (Cnidocolus chayamansa)*. Tesis, Universidad Autónoma de Querétaro.
- VIVO, T. E., SÁNCHEZ, C., CACIK, F. & SEQUIN, C. 2012. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Cienc. docencia tecnol.*, 45.
- WALLENKA, B. A. C. 2006. *Estudio del procesamiento tecnológico para la elaboración de un té a partir de Cnidoscolus aconitifolius (chaya)*. Tesis De Ingeniero Químico., Universidad de Guayaquil.
- YURRITA, R. C. 2008. Caracterización botánica, molecular, agronómica y química de los cultivares de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) de Guatemala,. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 49.

ANEXOS

ANEXO 1. CERTIFICADOS DE SALUD DE LOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA

Fecha: 03/10/13
Fecha: 13-11-013

GC.CC.10.13		Dirección de Aseguramiento de la Calidad									
Folio: 0118		Grupo de Aseguramiento de la Calidad									
CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia											
Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas					
Rata				SD/Cenp	46009913	5					
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición					
50	-	50	180-200g	9-10 sem	F. del Valle Ucaro	13/11/13					
Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica											
<p>Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmula ALYco® EMO 1002 esterilizable a razón de 22.4 a 30 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.</p>											
Resultados de Bacteriología *											
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Salmonella</i> sp.	Cult/ Serot		X		30/07/13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cult/ Serot		X		30/07/13
<i>Streptococcus moniliformis</i>	Cultivo			X	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Cult/ELISA		X		30/07/13
<i>Streptococcus β hemolítico</i>	Cult/ Serot		X		30/07/13	<i>Clostridium piliformis</i>	Insp. Clínica		X		11/02/13
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Cult/ ELISA		X		30/07/13	<i>Leptospira</i> sp.	ELISA/ Micg		X		14/08/13
<i>Helicobacter</i> sp.	Cultivo		X		11/02/13	<i>Mycoplasma arthritis</i>	Cult/ELISA			X	-
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Cult/ ELISA		X		30/07/13	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Cult/ELISA			X	-
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		17/07/13						
Resultados de Parasitología *				Resultados de Patología *							
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Fecha: 17/07/13					
Endoparásitos	DIR/ FLGT		X		16/07/13	Examen macroscópico: No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.					
<i>Toxoplasma gondii</i>	ELISA		X		21/06/13						
<i>Trichostrongylus axei</i>	Sedimentación			X	-						
Ectoparásitos	Insp. Clínica		X		16/07/13						
Resultados de Virología * (Serología)											
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona</i> (SDA/RCV)	IFA		X		27/09/13	<i>Coriomeningitis linfocitaria</i> (LCM)	IFA		X		27/09/13
<i>Virus Pneumonia</i> (PVM)	IFA		X		27/09/13	<i>Virus Sendai</i>	ELISA/IFA		X		27/09/13
<i>Virus Encefalomielitís Theiler</i> (TMEV)	IFA		X		27/09/13	<i>Reovirus Tipo 3</i> (REO 3)	IFA		X		-
<i>Virus Teolan</i> (H-1)	IFA		X		27/09/13	<i>Virus Kilham</i> (KRV)	IFA		X		27/09/13
						<i>Virus Hantaan</i>	IFA			X	-
	Realizado por	Aprobado por	Revisado por								
Cargos	Especialista Liberación de Asg. Calidad	Dirección de Producción	Distribuidor								
Firma											

ANEXO 2. CERTIFICADOS DE SALUD DE LOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE GASTROPROTECCIÓN

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Rata				SD/Cenp	07001114	11

Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
05	15	100	100-120g	6-7 Sem	F.C.M. Villa Clara	12/02/14	1:30

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

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

Resultados de Bacteriología *

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

Resultados de Parasitología *

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

Resultados de Patología *

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

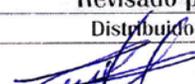
Resultados de Virología * (Serología)

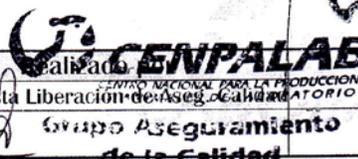
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
<i>Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona</i> (SDA/RVCV)	IFA		X		27/09/13	<i>Coriomeningitis linfocitaria</i> (LCM)	IFA		X		27/09/13
<i>Virus Pneumonia</i> (PVM)	IFA		X		27/09/13	<i>Virus Sendai</i>	ELISA/IFA		X		27/09/13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

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

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

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

Cargo	Especialista Liberación de Aseg. Calidad	Aprobado por	Revisado por
Firma			



ANEXO 3. CERTIFICADO DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

GC.CC.23.13 Dirección de Aseguramiento de la Calidad

Grupo de Aseguramiento de la Calidad


CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN
DE ANIMALES DE LABORATORIO

Folio: 1

CERTIFICADO DE CALIDAD DEL ALIMENTO CONCENTRADO

Fórmula	Lote	Fecha Prod.	Presentación	Centro de destino
CMO 1000	428	14/10/13	Pellets	ICMedicas Villa Clara

Especificaciones para su uso

Dieta completa concentrada para el mantenimiento de rata convencional. Todo propósito. No esterilizable. No requiere suplemento dietético. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 45 días a partir de la fecha de fabricación

Componentes

Trigo, cebada, harina de soya, girasol, harina pescado, sal común, azúcar, carbonato de calcio, bentonita, pre-mezcla minero-vitaminica. Esta fórmula no contiene antibióticos

Control de Calidad de los Parámetros Físicos*			Parámetros Bromatológicos**		
Descripción	UM	Valor emitido	Descripción	UM	Valor emitido
Diametro medio del pellet	mm	15.0	Materia Seca	%	90.75
Longitud media del pellet	mm	14.2	Humedad	%	9.25
Peso medio del pellet	g	4.2	Proteína Bruta	%	15.98
Polución	%	-	Grasa Bruta	%	2.03
Abrasión	%	98.5	Fibra Bruta	%	5.33
Granulometria	-	-	Cenizas	%	-
Partículas grandes	%	-	Calcio	%	0.39
Partículas medianas	%	-	Fósforo	%	0.49
Partículas finas	%	-	Calcio/ Fósforo	%	0.79

Parámetros Microbiológicos*				Otros análisis*		
Descripción	Aceptado	No aceptado	No Realizado	Descripción	UM	Valor emitido
Microorganismos viables	X					
Coliformes totales	X					
Salmonella sp	X					
Hongos	X					
Levaduras	X					

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio y que consta en los archivos de nuestra institución. Válido para el presente ciclo.

** Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación y Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio.

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

	Realizado por	Aprobado por	Revisado por
Cargo	Especialista Liberación de Aseg. Calidad	Dirección de Producción	Distribuidor
Firma			

ANEXO 4. AVAL DE CALIDAD DE LAS INVESTIGACIONES



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE VILLA CLARA
"Dr. Serafin Ruiz de Zarate Ruiz"

Unidad de Toxicología Experimental (UTEX)

AVAL

Se certifica que los trabajos de investigación titulados: "Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto acuoso de *Cnidoscopus chayamansa*. Mc. Vaugh" y "Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Cnidoscopus chayamansa*. Mc. Vaugh." de la Lic. **Yilka Mena Linares**, fueron ejecutados en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX).

En las visitas efectuadas por personal de la Unidad de Garantía de la Calidad (UGC), se pudo constatar que se cumplió con las normas establecidas en las Buenas Prácticas de Laboratorio y en las regulaciones contenidas en el Manual de Calidad del Centro, con lo que se garantiza la veracidad y rigurosidad de los resultados obtenidos y así consta en el expediente de dichas investigaciones.

Además se trabajó en todo momento acorde a los requerimientos de Bioseguridad y se cumplieron las normas de Bioética, contenidas en los Manuales de Bioseguridad y de Ética de las Investigaciones Experimentales del centro, cumpliéndose con las normas establecidas para garantizar la protección y seguridad tanto de los investigadores involucrados en los ensayos con los animales de experimentación como la protección del medio ambiente.

Dado en Santa Clara a los 14 días del mes Enero del 2014.

"Año 56 de la Revolución".

Ing. Orestes A. Castillo Alfonso
Responsable de la UGC
UTEX

MSc. Dra. MV Arelia Pizarro Espín
Presidenta Comité de Ética de la Investigación
UTEX

ANEXO 5. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS PERTENECIENTES AL ESTUDIO DE TOXICIDAD

Tabla 10. Incremento del peso.

Estadística Descriptiva					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Est
Peso Inicial	5	184.00	203.80	198.7000	8.32226
Peso 7 días	5	218.20	250.60	233.6600	14.16715
Peso 14 días	5	231.00	258.60	241.3600	10.49895
Valido N (listwise)	5				

Tabla 11. Comparación del promedio de los pesos en los diferentes momentos: Wilcoxon Signed Ranks Test.

Ranks				
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Peso 7 días - Peso Inicial	Negative Ranks	0 ^a	.00	.00
	Positive Ranks	5 ^b	3.00	15.00
	Ties	0 ^c		
	Total	5		
Peso 14 días - Peso Inicial	Negative Ranks	0 ^d	.00	.00
	Positive Ranks	5 ^e	3.00	15.00
	Ties	0 ^f		
	Total	5		
Peso 14 días - Peso 7 días	Negative Ranks	1 ^g	1.00	1.00
	Positive Ranks	4 ^h	3.50	14.00
	Ties	0 ⁱ		
	Total	5		

a. Peso 7 días < Peso Inicial

b. Peso 7 días > Peso Inicial

c. Peso 7 días = Peso Inicial

d. Peso 14 días < Peso Inicial

e. Peso 14 días > Peso Inicial

f. Peso 14 días = Peso Inicial

g. Peso 14 días < Peso 7 días

h. Peso 14 días > Peso 7 días

i. Peso 14 días = Peso 7 días

Test Statistics^{a,c}

			Peso 7 dias - Peso Inicial	Peso 14 dias - Peso Inicial	Peso 14 dias - Peso 7 dias
Z			-2.023 ^b	-2.023 ^b	-1.753 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)			.043	.043	.080
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.		.063	.063	.126
		99% Confidence Interval			
		Lower Bound	.057	.057	.118
		Upper Bound	.069	.069	.135
Monte Carlo Sig. (1-tailed)	Sig.		.033	.033	.064
		99% Confidence Interval			
		Lower Bound	.028	.028	.057
		Upper Bound	.037	.037	.070

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.

Tabla 12. Análisis del incremento del peso a lo largo del tiempo.

Rangos medios según Test de Friedman

Rangos Medios	
Peso Inicial	1.00
Peso 7 dias	2.20
Peso 14 dias	2.80

Test Statistics^a

N	5	
Chi-Square	8.400	
df	2	
Asymp. Sig.	.015	
Monte Carlo Sig. Sig.	.009	
	99% Confidence Interval	
	Lower Bound	.007
	Upper Bound	.012

a. Friedman Test

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS PERTENECIENTES AL ESTUDIO DE GASTROPROTECCIÓN

Tabla 13. Resultados estadísticos del estudio de gastroprotección: Aplicación de los tests de Mann-Whitney y Wilcoxon.

Test Statistics ^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	36.000	36.000
Z	-3.525	-3.508
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b	.000 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 14. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo control negativo en mm².

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Vehiculo	8	12.50	100.00
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	4.50	36.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Vehiculo	8	12.50	100.00
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	4.50	36.00
	Total	16		

Tabla 15. Comparación del grado de ulceración entre los grupos experimentales y el grupo control negativo en mm².

Ranks			
	Grupos	N	Mean Rank
Cantidad Ulceras	Control Vehiculo	8	28.13
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	19.81
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	9.56
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.50
	Total	32	
Grado de Ulceración	Control Vehiculo	8	26.63
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	21.31
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	9.56
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.50
	Total	32	

Tabla 16. Aplicación del test Chi-Square:

Test Statistics^{a,b}		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Chi-Square	26.943	24.697
df	3	3
Asymp. Sig.	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupos

Tabla 17. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo control negativo en mm².

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Vehiculo	8	12.13	97.00
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	4.88	39.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Vehiculo	8	10.63	85.00
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	6.38	51.00
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	3.000	15.000
Wilcoxon W	39.000	51.000
Z	-3.096	-1.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002	.074
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b	.083 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 18. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo control negativo en mm².

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Vehiculo	8	12.50	100.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	4.50	36.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Vehiculo	8	12.50	100.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	4.50	36.00
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	36.000	36.000
Z	-3.608	-3.590
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b	.000 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 19. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	5.06	40.50
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	5.06	40.50
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	4.500	4.500
Wilcoxon W	40.500	40.500
Z	-3.087	-3.085
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 20. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	12.00	96.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	5.00	40.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	12.00	96.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	5.00	40.00
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	4.000	4.000
Wilcoxon W	40.000	40.000
Z	-3.243	-3.240
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 21. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupo

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		

Test Statistics ^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	28.000	28.000
Wilcoxon W	64.000	64.000
Z	-1.000	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.721 ^b	.721 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 22. Comparación del grado de ulceración entre los grupos experimentales y el grupo control positivo en mm²

Ranks			
	Grupos	N	Mean Rank
Cantidad Ulceras	Control Positivo	8	13.50
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	26.88
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	13.63
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	12.00
	Total	32	
Grado de Ulceración	Control Positivo	8	13.50
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	26.88
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	13.63
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	12.00
	Total	32	

Test Statistics^{a,b}		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Chi-Square	20.984	20.978
df	3	3
Asymp. Sig.	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupos

Tabla 23. Comparación del grado de ulceración entre la dosis de 1 000 mg/kg y el grupo control positivo en mm².

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Positivo	8	5.06	40.50
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Positivo	8	5.06	40.50
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Total	16		

Test Statistics ^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	4.500	4.500
Wilcoxon W	40.500	40.500
Z	-3.087	-3.085
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 24. Comparación del grado de ulceración entre la dosis de 2 000 mg/kg y el grupo control positivo en mm²

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Positivo	8	8.44	67.50
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	8.56	68.50
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Positivo	8	8.44	67.50
	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	8.56	68.50
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	31.500	31.500
Wilcoxon W	67.500	67.500
Z	-.091	-.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.927	.927
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.959 ^b	.959 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 25. Comparación del grado de ulceración entre la dosis de 4 000 mg/kg y el grupo control positivo en mm².

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Control Positivo	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Control Positivo	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	28.000	28.000
Wilcoxon W	64.000	64.000
Z	-1.000	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.721 ^b	.721 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 26. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupos en mm² (dosis: 1 000 – 2 000 mg/kg).

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	5.06	40.50
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	11.94	95.50
	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	5.06	40.50
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	4.500	4.500
Wilcoxon W	40.500	40.500
Z	-3.087	-3.085
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 27. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupos en mm² (dosis: 1 000 – 4 000 mg/kg).

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	12.00	96.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	5.00	40.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (1 000 mg/kg)	8	12.00	96.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	5.00	40.00
	Total	16		

Test Statistics ^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	4.000	4.000
Wilcoxon W	40.000	40.000
Z	-3.243	-3.240
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.

Tabla 28. Comparación del grado de ulceración por parejas de grupos en mm² (dosis: 2 000 – 4000 mg/kg).

Ranks				
	Grupos	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cantidad Ulceras	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		
Grado de Ulceración	Dosis I (2 000 mg/kg)	8	9.00	72.00
	Dosis III (4 000 mg/kg)	8	8.00	64.00
	Total	16		

Test Statistics^a		
	Cantidad Ulceras	Grado de Ulceración
Mann-Whitney U	28.000	28.000
Wilcoxon W	64.000	64.000
Z	-1.000	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.721 ^b	.721 ^b

a. Grouping Variable: Grupos

b. Not corrected for ties.