

**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS**  
**FACULTAD DE QUÍMICA - FARMACIA**



**Trabajo de Diploma**

**Evaluación farmacológica de la actividad analgésica del extracto  
hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.**

Autora:

Merlin Mendoza Muñoz

Tutores:

MSc. Arellys López Sacerio

MSc. Enoel Hernández Barreto

Santa Clara  
2015 - 2016

*Pensamiento*

The word "Pensamiento" is written in a blue, cursive script font. It is centered horizontally and positioned above a decorative graphic consisting of two horizontal blue lines and two vertical blue lines that intersect to form a partial frame on the right side of the page.

*No hay nada en la vida que no contenga sus lecciones. Si estás vivo, siempre tendrás algo para aprender.*

*Benjamín Franklin*

# *Dedicatoria*



*A mis padres, por estar conmigo, por enseñarme a crecer y a que si caigo debo levantarme, por apoyarme y guiarme, por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí.*

*A mi hermano, que ha sido la guía para emprender este largo viaje.*

# *Agradecimientos*



*En estos momentos finales son muchas las personas que vienen a mi mente y que han colaborado en la realización de esta tesis y a los cuales deseo agradecer sinceramente.*

*En primer lugar a mi tutora Arellys por su compromiso y dedicación que permitió llevar a feliz término la investigación y escritura del informe.*

*A mi otro tutor Enoel por su ayuda y paciencia en el desarrollo de tareas experimentales.*

*A mis compañeros por su amistad, sus consejos y compañía, por los momentos compartidos en todos estos años que no serían igual sin ellos.*

*A Mirtha Mayra y Venancio, por su ayuda en momentos difíciles y sus sabias recomendaciones.*

*A los técnicos (Xiomarita, Yuniesky y Anita) por su colaboración con su gran experiencia, en la realización de la parte experimental.*

*A Montenegro por su colaboración con el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos.*

*A la Lic. Mileidis Expósito y al Dr. Daniel Artiles del servicio de Patología del Hospital Arnaldo Milián Castro por la realización del examen histopatológico.*

*A los profesores del departamento que colaboraron en mi formación como profesional y como persona.*

*A todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a culminar esta tesis como parte de mi desarrollo profesional. A todos, MUCHAS GRACIAS!*

# *Resumen*



## RESUMEN

La terapéutica analgésica actual resulta insuficiente para el tratamiento del dolor por lo que continúa la búsqueda de nuevos candidatos a partir de plantas medicinales con este fin. *Jatropha gossypifolia* L. es ampliamente utilizada en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas y ofrece una enorme reserva de fitoquímicos con potencial acción analgésica que no ha sido comprobada experimentalmente. El objetivo fundamental de este trabajo fue evaluar experimentalmente a través de ensayos “*in vivo*” la actividad analgésica de extractos de *Jatropha gossypifolia* L. En este sentido, se desarrolló una evaluación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. que incluyó el tamizaje fitoquímico y la cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides totales mostrando la presencia de saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores y quinonas como principales metabolitos secundarios. Los fenoles y flavonoides cuantificados se relacionan con las actividades farmacológicas demostradas para la familia de la planta. Se desarrollaron dos métodos *in vivo* para la evaluación de la actividad analgésica: Placa Caliente y contorsiones inducidas por ácido acético en ratones, que permitieron corroborar experimentalmente la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. Finalmente se llevó a cabo un estudio de toxicidad dérmica aguda que no muestra toxicidad dérmica a dosis inferiores a 500 mg/kg. Por lo tanto se puede concluir que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Jatropha gossypifolia* L. posee un efecto analgésico y la no toxicidad que fundamentará el uso que se le atribuye de forma tradicional.

# *Summary*



## SUMMARY

Because of the unsatisfactory treatment of pain by the actual analgesic therapy the search of new candidates from medicinal plants is very important nowadays. Due to its healing properties, *Jatropha gossypifolia* L. is widely used in traditional folk medicine, it offers a huge reservoir of phytochemicals compounds, most of them with potential analgesic action, but there is not experimental corroboration of their pharmacological properties. The aim of this research is to evaluate the analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* L. hydro- alcoholic extract through "in vivo" tests. We carried out a phytochemical evaluation of *Jatropha gossypifolia* L. extract including phytochemical screening and total phenols and flavonoids quantification. The presence of saponins, alkaloids, phenols, flavonoids, free amino acids, coumarins, quinones reducing sugars and main secondary metabolites was identified in the extract. There is a relationship between quantified phenols and flavonoids and the pharmacological activity of these plant family. The extract was evaluated at 100, and 200 mg/kg doses using Hot Plate test and at 100, 200, 300 mg/kg doses by the Acetic acid writhing tests; it showed analgesic activity in these two *in vivo* test. Finally, *Jatropha gossypifolia* extract shows no toxicity below 500 mg/kg dose in the dermal acute toxicity developed test. Therefore we can conclude that hydro-alcoholic extract of *Jatropha gossypifolia* L. leaves has analgesic effect and low dermal toxicity.

# *Índice*



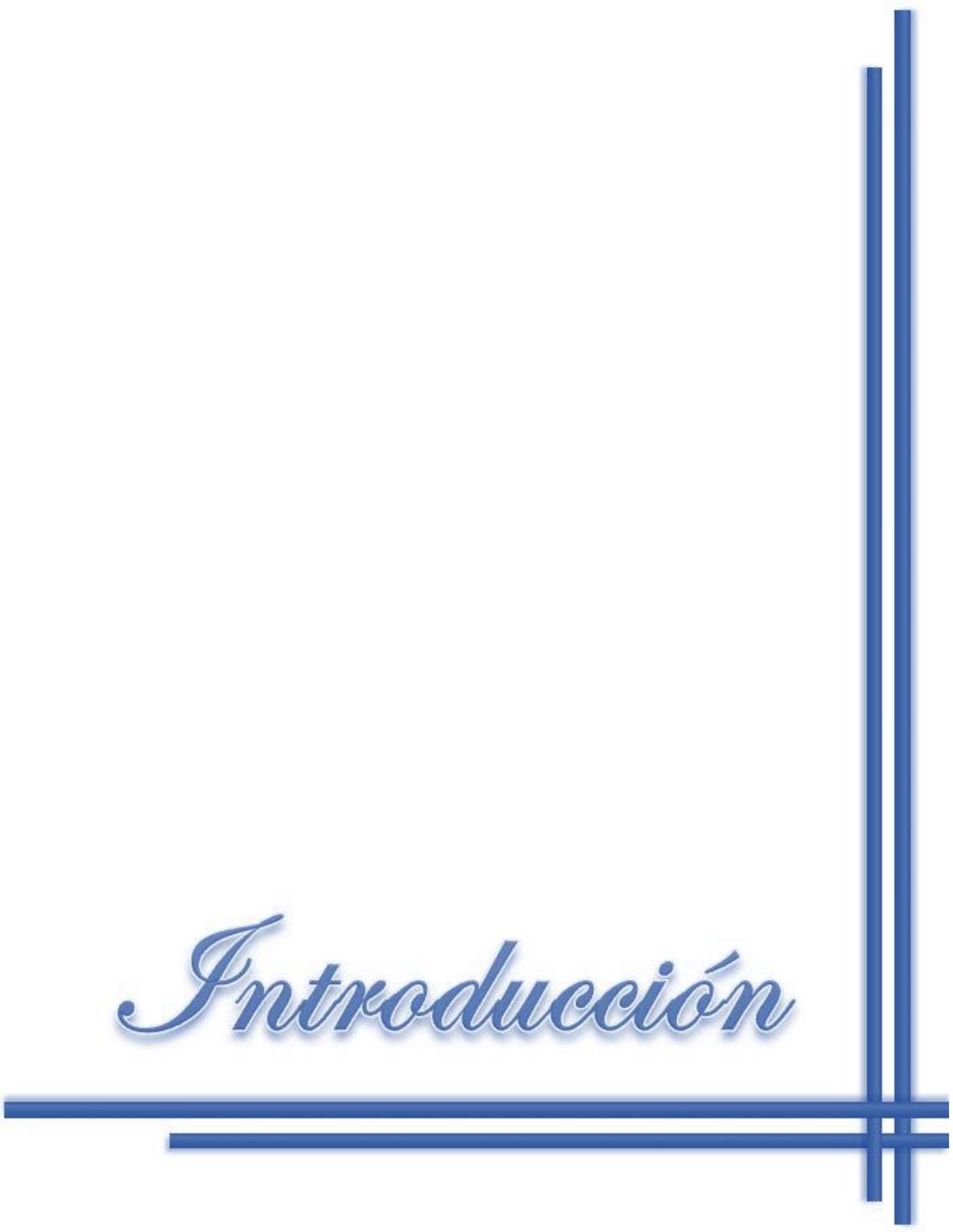
## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Capítulo 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
1.1. Aspectos monográficos de la <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	4
1.1.1. Identificación taxonómica. Descripción botánica y distribución. ....	4
1.1.2 Usos tradicionales.....	5
1.1.3 Aspectos fitoquímicos y farmacológicos de la <i>Jatropha gossypifolia</i> L....	5
1.2 Dolor. Concepto. Tipos. ....	7
1.2.1 Tipos de Dolor. ....	8
1.2.2 Fisiología del Dolor. ....	9
1.2.3 Trasmisión del dolor.....	11
1.2.4 Mediadores químicos.....	14
1.2.5 Sistema Opiode. ....	16
1.2.6 Péptidos Endógenos.....	20
1.3 Evaluación “ <i>in vivo</i> ” de la actividad analgésica” .....	22
1.3.1 Métodos “ <i>in vivo</i> ” para la determinación de la actividad analgésica. ....	22
1.3.1.1 Analgesia química. ....	22
1.3.1.2 Analgesia eléctrica. ....	23
1.3.1.3 Analgesia térmica. ....	25
1.3.1.4 Analgesia mecánica. ....	26
Capítulo 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.1 Tipo de estudio.....	28
2.2. Procedimiento y Diseño Experimental. ....	28
2.2.1. Etapa 1: Obtención del material vegetal. ....	28

2.2.1.1. Equipos, Materiales y Reactivos empleados. ....	28
2.2.1.2. Recolección, secado y molinado del material vegetal. ....	29
2.2.1.3 Prueba de Control de la Calidad de la droga cruda. ....	30
2.2.2. Determinación de índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos. ....	30
2.2.2.1. Contenido de humedad residual. ....	30
2.2.2.2. Determinación de cenizas totales. ....	31
2.2.3. Obtención y caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. ....	32
2.2.3.1 Obtención del extracto. ....	32
2.2.3.2. Características organolépticas. ....	32
2.2.4. Evaluación fitoquímica de los extractos. ....	34
2.2.4.1. Tamizaje fitoquímico. ....	34
2.2.4.2.1. Determinación del contenido de fenoles totales. ....	34
2.2.4.2.2. Determinación del contenido de flavonoides totales. ....	35
2.3 Evaluación farmacológica de la actividad analgésica. ....	35
2.3.1 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación <i>in vivo</i> de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. ....	35
2.3.1.1 Método de la placa caliente (Woolfe y Mac Donald) ....	35
2.3.1.2 Test de Contorsiones (Koster et al). ....	37
2.3.1.2.1 Análisis estadístico. ....	38
2.3.2 Evaluación de la toxicidad dérmica aguda. ....	39
2.3.2.1 Análisis estadístico. ....	41
Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	42
3.1 Obtención del material vegetal y análisis fitoquímico preliminar. ....	42

3.1.2 Secado y molinado. ....	42
3.1.3 Determinación de índices numéricos. ....	43
3.1.4 Obtención y caracterización del extracto. ....	44
3.2 Evaluación fitoquímica de extracto.....	45
3.2.1 Tamizaje fitoquímico. ....	45
3.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales. ....	50
3.2.3 Determinación del contenido de flavonoides totales. ....	52
3.3 Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de la <i>Jatropha gossypifolia</i> L. ....	53
3.3.1 Ensayo de placa caliente. ....	53
3.3.2 Ensayo de contorsiones inducidas por ácido acético.....	59
3.4 Estudio de toxicidad dérmica aguda. ....	62
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES .....	71
BIBLIOGRAFÍA .....	72
ANEXOS .....	80

# *Introducción*



## INTRODUCCIÓN

La *Jatropha gossypifolia* L. (Tuatúa) es ampliamente cultivada como planta ornamental. Las raíces, tallos, hojas, semillas y frutos de la planta han sido ampliamente utilizados en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas en muchos países. Diversos estudios a la planta, en especial a las hojas, han demostrado que esta posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como: esteroides, saponinas, flavonoides, triterpenos, fenoles, alcaloides, taninos, coumarinas y azúcares reductores (1).

En el Departamento de Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV) se han desarrollado extractos hidroalcohólicos de la *Jatropha gossypifolia* L. que han mostrado actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y efecto antiinflamatorio agudo *in vivo*. Además se evaluó la Dosis Letal Media del extracto que se encuentra a dosis superiores a 300 mg/kg, clasificándose como un producto moderadamente tóxico (2). También se inició el desarrollo de una preparación cosmecéutica para el tratamiento del acné empleando dicho extracto, por lo que resulta muy valioso continuar la evaluación fitoquímica y farmacológica del mismo.

Por otra parte, el dolor y el sufrimiento en la historia del hombre están tan presentes que puede considerarse como el quinto signo vital y debe ser explorado tal y como se hace con el pulso, la respiración, la temperatura y la tensión arterial. El dolor habitualmente no es tratado farmacológicamente de forma adecuada y ello puede traer consecuencias importantes para el paciente desde el punto de vista somático, psicológico, social, económico, laboral y de calidad de vida (3).

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) se reunió en 1979 y elaboró una definición que aún perdura: **“Experiencia sensorial y emocional desagradable relacionada con un daño real o potencial de tejidos o descrita por el paciente como ocasionada por esa lesión”**. Esta definición hace hincapié en la complejidad del dolor e incluye múltiples dimensiones(4).

Actualmente, los fármacos que producen analgesia pueden actuar en un nivel periférico y central, ya sea modulando o inhibiendo la síntesis de sustancias

## **INTRODUCCIÓN**

---

mediadoras de la inflamación y/o dolor. Dentro de los fármacos analgésicos se encuentran los AINEs (analgésicos antiinflamatorios no esteroideos), que además de ser analgésicos, comparten propiedades antiinflamatorias y antipiréticas. Otro mecanismo importante en la generación de analgesia es la realizada por los opioides, específicamente la morfina y análogos. Estos analgésicos interactúan con varios receptores llamados receptores opioides, relacionándose con ciertos péptidos endógenos, como las encefalinas, endorfinas y dinorfinas(5-7).

Ambas terapéuticas involucran efectos adversos indeseables tales como: tolerancia, depresión respiratoria, dependencia y constipación en los opioides y trastornos gastrointestinales en los AINEs (5). Por ello, la búsqueda de nuevos analgésicos más seguros e igualmente efectivos sigue siendo una tendencia en el campo de la farmacología.

Teniendo en cuenta lo anterior se plantea el siguiente problema científico:

### **Problema científico**

Las acciones analgésicas atribuidas a las hojas de la especie cubana *Jatropha gossypifolia* L. y la estimación de su toxicidad dérmica, no han sido comprobadas experimentalmente por lo que no se poseen estudios que avalen su uso tradicional en el país.

### **Hipótesis**

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

Teniendo en cuenta lo anterior se plantean como objetivos:

### **Objetivo general:**

- Evaluar experimentalmente a través de ensayos “*in vivo*” la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L.

**Objetivos específicos:**

1. Identificar los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. a través del tamizaje fitoquímico.
2. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L.
3. Evaluar la actividad analgésica “*in vivo*” del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. del test de plato caliente.
4. Evaluar la actividad analgésica “*in vivo*” del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. del test de contorsiones inducida por ácido acético.
5. Evaluar la toxicidad dérmica aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L.

# Capítulo I



## CAPÍTULO 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Aspectos monográficos de la *Jatropha gossypifolia* L.

#### 1.1.1. Identificación taxonómica. Descripción botánica y distribución.

**Reino:** *Plantae*. **Subreino:** *Tracheobionta*. **División:** *Magnoliophyta*. **Clase:** *Magnoliopsida*. **Subclase:** *Rosidae*. **Orden:** *Geraniales*. **Familia:** *Euphorbiaceae*. **Nombre científico:** *Jatropha gossypifolia* L. **Nombre común:** Tuatúa. **Otros nombres comunes:** Frailecillo, frailecito, San Juan del Cobre (8).

La *Jatropha gossypifolia* L. es una planta herbácea de 1 a 2 m de altura, a veces algo leñosa. Presenta hojas de 7 a 15 cm, acorazonadas en la base, de color verde oscuro, alterno, simple, ovadas a ligeramente lobulado con 3-5 indentaciones, hasta 15 cm de ancho y pecíolos de 10 cm de largo. Los tallos de las hojas están cubiertos con gruesos pelos de color marrón oscuro y las hojas son pegajosas. Las flores son pequeñas, amarillo a verde en color, transmitidas en las axilas de las hojas y al ser pequeñas se esconden en su mayoría por el follaje. Se observan 5 pétalos, purpúreos. La cápsula es de 1 cm, con tres surcos. Los frutos son pequeñas, en forma de cápsula, fruto redondo, alrededor de 2,5 - 4 cm de diámetro. Estos son de color verde y carnosos cuando son inmaduros, convirtiéndose en marrón oscuro cuando madura y la división para liberar 2 o 3 semillas de color negro cada uno de aproximadamente 2 cm de largo. La carne de las semillas es blanca y grasosa en la textura y se reporta tener un sabor agradable (9-11).

Crece a la orilla de los caminos, en terrenos yermos y cultivados, calcáreos, principalmente de poca o mediana elevación. Originaria de América tropical, pero ahora se cultiva ampliamente en los países tropicales de todo el mundo. Se observa en las Antillas Mayores y en muchas de las Menores, y en las Bahamas. Se cultiva ocasionalmente en las zonas más cálidas de Australia y está naturalizada en algunos lugares en Queensland y el Territorio del Norte. En Florida se encuentra principalmente al sur de Orlando. También es una planta común en las islas hawaianas. Introducida en el sur de África, la planta se ha extendido desde Mozambique a través de Zambia al Transvaal y Natal. Esta especie también se encuentra a través de las partes más calientes de Asia (9).

### **1.1.2 Usos tradicionales.**

La Tuatúa es ampliamente cultivada como planta ornamental, se encuentra en los jardines y las zonas comunes, por lo que es de fácil acceso. Las raíces, tallos, hojas, semillas y frutos de la planta han sido ampliamente utilizados en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas en muchos países (10, 12), ejemplo:

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

### **1.1.3 Aspectos fitoquímicos y farmacológicos de la *Jatropha gossypifolia* L.**

Varios estudios han demostrado que la Tuatúa, es una planta con propiedades hemostática, procoagulante, insecticida, antidiarreica y que preparados hidroalcohólicos de la misma son analgésicos, antiinflamatorios y antibacterianos (13).

Estudios realizados a las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. demuestran que esta posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como: terpenoides, esteroides, saponinas, flavonoides, triterpenoides, taninos, glucósidos cardíacos, azúcares reductores y proteínas (1).

La *Jatropha gossypifolia* L. ha sido evaluada a través de estudios *in vitro* e *in vivo*. Los múltiples efectos atribuidos se relacionan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Efectos biológicos atribuidos a la *Jatropha gossypifolia* L.

Efecto biológico	Parte vegetal	Solvente de extracción	Referencia
Analgésico	Hojas	Metanol y éter de petróleo	(12)
Antiinflamatorio	Hojas	Metanol y éter de petróleo	(12)
Antimalárico	Hojas	Agua	(14)
Antimicrobiano	Hojas	Diclorometano y metanol (1:1)	(15)
	Hojas	Etanol	(16)
	Hojas	Agua	(17)
	-	-	(18)
Antitumoral y Antineoplásico	Raíz	Cloroformo	(19)
		Etanol	(20)
Antiviral	Hojas y cáliz	Metanol	(21)
	Córtex		
Cicatrizante	Hojas y cáliz	Etanol	(22)
Hipotensor	Hojas y cáliz	Etanol	(23)
Insecticida	Hojas	-	(24)
Larvicida (combate a vectores)	-	Acetato de etilo, acetona, éter de petróleo, hexano e metanol.	(25)
Sedativo	Raíz y Hojas	-	(26)

La mayoría de estos componentes químicos pueden ser responsable de muchas actividades farmacológicas reportadas sobre la Tuatúa. Los glucósidos, flavonoides y taninos tienen acción hipoglucémica (12). Las saponinas poseen propiedades hipocolesterolemiantes y antidiabéticas. Los terpenoides también se ha demostrado que reducen el nivel de azúcar en la sangre, en los estudios en animales (22, 23). Además los esteroides y triterpenoides mostraron propiedades analgésicas. Por otra parte, los esteroides y saponinas son responsables para las actividades del sistema nervioso central. La presencia de flavonoides y taninos en las hojas es probable que sea responsable de la actividad de captación de radicales libres. Los

flavonoides se han denominado como modificadores de la respuesta biológica de la naturaleza debido a la fuerte evidencia experimental de su capacidad para modificar la reacción del cuerpo a las alergias, virus y carcinógenos, mostrando actividad antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y contra el cáncer. Los esteroides poseen efectos antiinflamatorios (1).

### **1.2 Dolor. Concepto. Tipos.**

Según la Organización Internacional del Dolor este se define como una experiencia sensorial desagradable que se asocia a una lesión tisular o que se describe como si esta hubiera ocurrido (27). Constituye un mecanismo fundamentalmente protector que previene la aparición de lesiones permanentes del organismo y aumenta las posibilidades de supervivencia. Sin embargo, no siempre es así, existen numerosas situaciones clínicas en las que el dolor pierde su capacidad protectora y se convierte en una fuente de sufrimiento inútil, incluso en la propia enfermedad (27).

Al resultar este una sensación no puede ser medido; sólo uno mismo conoce cuánto le duele algo, por lo que es una vivencia personal imposible de transmitir. De ahí que la tolerancia al mismo varía entre las personas e incluso en el tiempo. Dependiendo de las circunstancias un mismo sujeto puede reaccionar o aceptar de forma diferente la misma intensidad dolorosa. Todo dependerá si está o no preparado para ello, de la velocidad de instauración o de la existencia o no de otros estímulos emocionales simultáneos. Su razón de existir es la de avisar al organismo sobre la presencia de problemas en algún nivel por lo que es beneficioso ya que nos alerta al daño inminente del ambiente. Más allá de este propósito de la advertencia, la experiencia del dolor involucra la percepción del dolor y las sensaciones asociadas, las reacciones emocionales, y las contestaciones fisiológicas que resultan. O sea, el dolor es uno de los problemas del paciente que se encuentra de forma más frecuente, uno de los más difíciles de evaluar y uno de los más inflexibles al tratamiento (28).

### **1.2.1 Tipos de Dolor.**

Existen diferentes clasificaciones del dolor en dependencia de algunas de sus características tales como: la duración, la localización, la periodicidad, si responde o no al tratamiento (29).

- **Agudo-Crónico:** Depende de si el dolor tiene una duración corta (agudo) o lleva mucho tiempo (crónico). Por lo general de días /horas se considera agudo y si dura más de tres meses será crónico. El primero suele ser más intenso y alarmante, mientras que el segundo pierde su función de alarma ya que el paciente se acostumbra a él.
- **Sordo-Pulsátil-Latente:** Se define como dolor sordo al que es continuo u opresivo, a los pulsátiles al causado por la migraña; y los que se producen por la afectación de los nervios suelen denominarse latentes.
- **Continuo-Intermitente:** Mientras que el continuo tiene la misma intensidad todo el tiempo, el intermitente (también denominado cólico) se caracteriza por ir aumentando y disminuyendo la intensidad.
- **Refractario:** Es el que no responde al tratamiento habitual. En algunas ocasiones los calmantes no quitan el dolor, solo disminuyen la intensidad del mismo. En otras, el analgésico quita el dolor pero este vuelve al poco rato.
- **Somático-Visceral:** El somático es el que afecta zonas muy superficiales, a las que llegan muchos nervios y se puede localizar perfectamente su ubicación. Se debe a estímulos químicos (quemaduras) o mecánicos (golpes) y proviene de músculos, tendones, huesos, etc. Por su parte, el visceral es el que afecta a zonas profundas y no se localiza muy bien, pudiendo “reflejarse” en diferentes lugares alejados del sitio donde se origina el dolor. El dolor superficial es una contestación rápida a un ataque súbito y el dolor profundo demora.
- **Nociceptivo:** Se debe a la estimulación de receptores dolorosos o térmicos periféricos y es transmitido al Sistema Nervioso Central (SNC) por fibras nerviosas nociceptivas normales (ej. Traumatismo o quemaduras). En el caso del tratamiento sintomático responde a los analgésicos opioides.

- Psicógeno: Se establece directamente en el SNC. Responde al tratamiento adecuado de la afección que lo ocasiona.
- Neuropático: Causado por una afectación anatómica o metabólica de las fibras nerviosas nociceptivas (29). Suele ser un dolor de gran intensidad, que los pacientes definen a veces como calambres, o quemantes. Es muy resistente a los tratamientos habituales y suele necesitar dosis altas de medicación o incluso medicamentos específicos.

### **1.2.2 Fisiología del Dolor.**

El dolor comienza con la estimulación de uno o más de los numerosos receptores sensitivos especiales, que existen en la piel y los órganos internos, denominados nociceptores. Estos receptores reciben información sobre diferentes acciones que puedan provocar daño corporal (30). En los nociceptores cualquier estímulo lesivo activa receptores sensoriales específicos, cuya función principal es distinguir los estímulos inocuos de los lesivos, y esto lo realiza ignorando los estímulos de intensidad baja, mientras que codifican el estímulo lesivo dentro de un rango de intensidades y lo transmiten al SNC (5, 27).

Los nociceptores se localizan principalmente en tejidos cutáneos, subcutáneos, articulares, musculares y viscerales. Histológicamente son denominados como terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axón centrípeta penetra en el asta dorsal de la médula espinal. Poseen además tres propiedades básicas: un alto umbral a la estimulación cutánea, una capacidad para codificar la intensidad de los estímulos en el rango lesivo y una falta de actividad espontánea en ausencia de estimulación nociva previa. Estos pueden ser de dos tipos: nociceptores A- $\delta$  y nociceptores C (27).

Aunque existen diferencias entre ellos el mecanismo general por el cual desarrollan su papel fisiológico es similar. Los nociceptores A- $\delta$  son fibras mielínicas, de velocidad de conducción variable entre 3 y 30 m/s y conducen señales correspondientes a sensaciones de dolor de corta latencia y que precisan

respuestas rápidas. Los nociceptores C son fibras amielínicas, de velocidad de conducción lenta, vehiculizan sensaciones de dolor quemante y de latencia más larga. Por esta doble vía periférica de transmisión, un mismo estímulo doloroso aplicado en la piel se percibe como una sensación doble: primero como un dolor rápido (de inicio menor de 0,1s) por excitación de los nociceptores A- $\delta$ , seguido de un dolor de percepción más lento. También transmiten sensaciones dolorosas, los receptores A- $\delta$  sensibles al calor, los receptores A- $\delta$  y C sensibles al frío intenso y los receptores C sensibles a estímulos mecánicos muy intensos. Sin embargo, la mayoría de los nociceptores, al menos en la piel, son plurimodales, es decir, excitables por estímulos de diferentes tipos (mecánicos, térmicos y químicos). Los nociceptores A- $\delta$  son mecanoreceptores que responden preferentemente a estímulos nocivos de tipo mecánico, aunque en ocasiones también responde a estímulos térmicos en el rango de intensidades nocivas. Ellos se activan por estímulos de alto umbral, lo que lo diferencia de los mecanoreceptores del tacto y reaccionan especialmente a estímulos táctiles. Los nociceptores C, tienen un umbral de dolor más elevado al calor que a los estímulos mecánicos. La respuesta al calor puede facilitarse por gran cantidad de estímulos condicionantes ya sean por lesión tisular o por estímulos químicos endógenos o exógenos. Responden a estímulos de tipo mecánico, térmico y químico pero también se activan por sustancias que se liberan tras la lesión tisular, debido a esto han recibido el nombre de receptores polimodales (5).

La activación de los nociceptores alcanza la médula espinal a través de las vías aferentes primarias. Estas se agrupan dentro de las raíces dorsales en posición ventrolateral y en menor grado dorsomedial, y a continuación se introducen en el asta dorsal. Una excepción a esta regla general la constituyen las aferencias de la cara y del cuello que se agrupan a las ramas del nervio trigémino y tienen su soma en el ganglio de Gasser. De ahí penetran en el tronco cerebral a nivel del puente y se proyectan hacia el núcleo del trigémino (31).

### 1.2.3 Trasmisión del dolor

El asta dorsal de la médula espinal constituye un elemento importante que permite la integración de los estímulos sensoriales en el SNC y su modulación por las interneuronas espinales, dirige la información a través de las vías ascendentes y finalmente permite la elaboración de respuestas reflejas, tanto vegetativas como motoras (5). Las células de las fibras nociceptivas aferentes espinales yacen en el ganglio de la raíz dorsal, en la terminación de la materia gris del asta dorsal. La mayoría de las fibras nociceptivas aferentes terminan en la región superficial de la espina dorsal. Las fibras C y algunas fibras A- $\delta$  inervan células humanas I y II mientras otras fibras A penetran en el asta dorsal (Figura 1.1) (30).

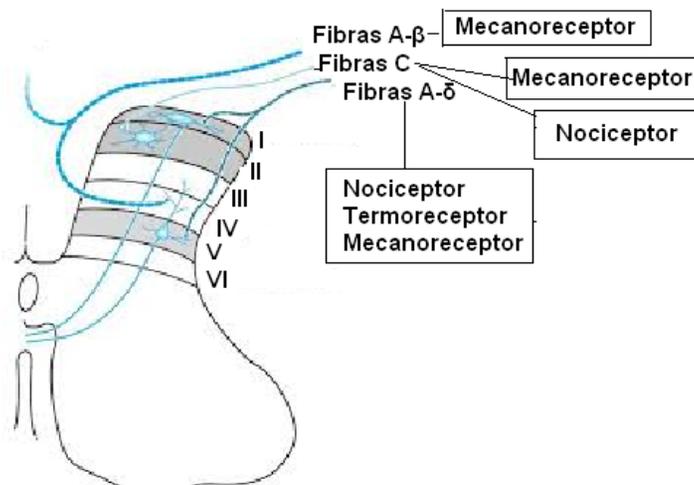


Figura 1.1 Lámina del asta dorsal de la médula espinal y fibras aferentes.

Las células de la lámina II (sustancia gelatinosa: SG) forman un red de pequeñas proyecciones, fundamentalmente a la lámina I y V. Estas células probablemente actúan regulando la transmisión entre las fibras aferentes primarias y las neuronas del tracto espinotalámico por lo que ejercen un efecto inhibitorio que puede ser pre o post sináptico. De esta manera ellas pueden irrumpir la transmisión de la primera sinapsis en la vía del dolor, mecanismo conocido por "Teoría del control de entrada" o como se conoce en inglés "*gate-control-theory*" (Figura 1.2) (30).

Después de llegar a la médula, el impulso asciende a diferentes áreas del cerebro donde se determina cual es la localización y la causa del dolor, y se integra la información sensitiva con el estado global del organismo produciendo la sensación emocional que se denomina dolor. Estos centros cerebrales pueden activar fibras nerviosas largas que descienden a la zona de la médula espinal donde se origina la señal dolorosa y la disminuye (30).

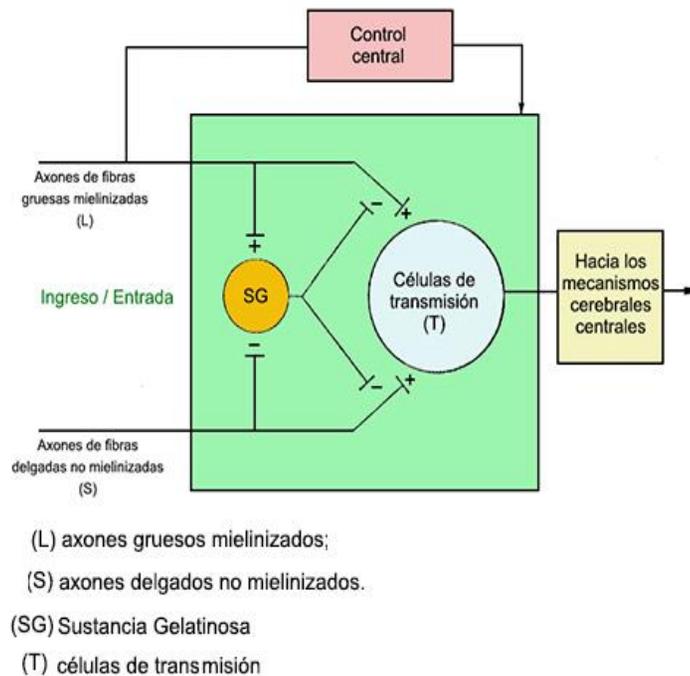


Figura 1.2 Teoría de control de entrada.

Diagrama esquemático del mecanismo del dolor por medio de la Teoría de la Compuerta (Gate Control): + Exitación; - Inhibición.

Desde el tracto espinotalámico las fibras se proyectan fundamentalmente desde la sinapsis de la parte media y central del tálamo hasta la corteza somatosensorial. En particular en el tálamo medio muchas células responden específicamente al estímulo nocivo y por ello lesiones en esta área provocan analgesia (Figura 1.3) (30).

La vía espinotalámica es considerada la vía principal del dolor y aunque es importante se conocen otras vías ascendentes involucradas en la transmisión del

dolor, incluso las vías espinoreticular y espinomesencefálica. Además núcleos específicos del cerebro, como la formación reticular, la materia gris periacueductal y el tálamo también son componentes de las vías del dolor (5).

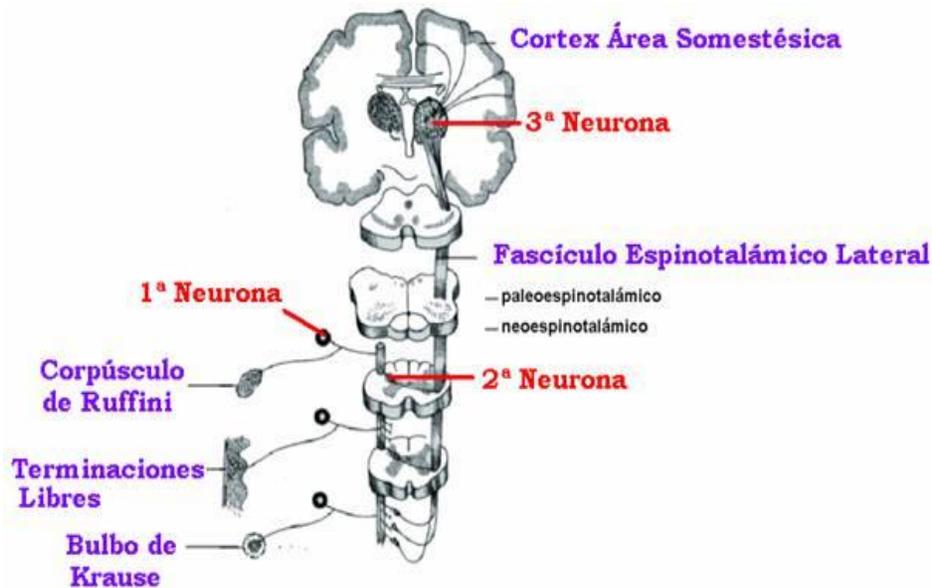


Figura 1.3 Vías del dolor y mediadores químicos involucrados.

Por otro lado, las vías descendentes constituyen uno de los mecanismos que controlan la transmisión del impulso nervioso en la médula espinal. Una parte clave del sistema descendente es el periacueducto gris (PAG), área del cerebro medio que circundando el canal central recibe entrada de diferentes partes del cerebro, incluyendo el hipotálamo, corteza y tálamo. Se piensa que este represente el mecanismo por medio del cual se controla la entrada nociceptiva en la médula espinal. La vía neuronal principal que se activa por la estimulación del PAG avanza primero a un área conocida como núcleos magnos de Raphe (NRM) y desde allí pasa al funículo dorsolateral de la médula espinal, conectándose a interneuronas de la misma. El mayor trasmisor de esta sinapsis es la serotonina (5-HT) y las interneuronas inhiben la descarga de las neuronas espinotalámicas. La activación de esta vía inhibe la transmisión en vías nociceptivas afectando en menor medida otras formas de sensación. Los NRM en sí mismos presentan una entrada desde

neuronas espinotalámicas, a través del adyacente núcleo paragingantocelular reticular (NRPG). De esta manera este sistema inhibitorio descendente puede formar parte de un circuito regulatorio de retroalimentación. Sin embargo, la médula espinal es controlada de acuerdo a la actividad alcanzada por el tálamo. Algunos investigadores plantean que la vía inhibitoria descendente es un importante sitio de acción para analgésicos opioides. El PAG y SG son ricos en neuronas que contienen encefalinas y ello es evidencia de que antagonistas opioides como la naloxona pueden impedir eléctricamente la analgesia (30).

#### **1.2.4 Mediadores químicos.**

En la mayoría de los casos la estimulación de las terminaciones nerviosas nociceptivas en la periferia, es química en su origen. Excesivos estímulos químicos y térmicos pueden obviamente causar dolor agudo pero la persistencia de cada dolor, después que el estímulo ha sido eliminado, generalmente refleja una estimulación química de las vías aferentes dolorosas. Un conocimiento de la naturaleza de estas sustancias y de los mecanismos por los cuales son estimuladas sensorialmente las terminaciones nerviosas, puede proporcionar una aproximación al descubrimiento de drogas analgésicas. Entre las sustancias que estimulan las terminaciones dolorosas en la piel se encuentran neurotransmisores incluyendo la serotonina (5-HT), histamina y acetilcolina (30).

La 5-HT es el más activo. La histamina es mucho menos activa y tiende a causar más picazón que dolor. Ambas sustancias se conoce son liberadas localmente en la inflamación (30, 32).

Las cininas son otro grupo de sustancias involucradas en el dolor. Entre estas sustancias las más activas son la bradicinina y calidina. La bradicinina es la sustancia más potente que produce dolor hasta el momento. También puede estimular otro tipo de fibras aferentes pero mucho menos que las terminaciones dolorosas. Además podría afectar la musculatura vascular lisa (generalmente causando dilatación en pequeños vasos y constricción en grandes vasos), musculatura visceral lisa (contracción), terminaciones nerviosas presinápticas

(incremento de la liberación del neurotransmisor por terminaciones pre y postganglionares y el epitelio del tracto gastrointestinal (incrementando secreciones). La bradicinina causa la liberación de prostaglandinas (PGs) en muchos tejidos y algunos de estos efectos fisiológicos son producidos por esta vía, después de ellos ser bloqueados por inhibidores de la ciclooxigenasa (COX). Esta actúa por combinación con receptores específicos y es conocido que produce efectos celulares a través de la producción de mensajeros intracelulares. Recientemente, modificaciones a la molécula de bradicinina tienen importancia en el descubrimiento de antagonistas competitivos los cuales muestran propiedades analgésicas y antiinflamatorias (32). Otros lípidos incluyendo prostaglandinas, leucotrienos y los inestables HETE derivados pueden también ser importantes en el mecanismo del dolor (30).

La capsaicina es una sustancia activa presente en pimienta roja y es responsable de su sabor picante. Otras plantas (jengibre, pimienta negra, etc.) también contienen agentes similares pero la capsaicina es el más potente y el más completamente estudiado. Esta es una sustancia altamente potente productora de dolor que estimula las terminaciones nociceptivas y los nervios sensibles a temperaturas en tejidos sin afectar otras neuronas sensoriales. La acción de la capsaicina está vinculada con algunas de sus propiedades como la relacionada con el hecho de que luego de algunas (pocas) aplicaciones que producen dolor, el efecto desaparece y la respuesta nociceptiva a otros estímulos desaparece también, llevándose a cabo sistemáticamente, ello puede producir marcada analgesia. Además esto causa liberación de sustancia P desde las neuronas aferentes, tanto periféricamente como dentro de la médula espinal. En animales adultos las neuronas aferentes son eliminadas (agotadas) toda la sustancia P y toma días o semanas recuperarla (30). Los efectos desensibilizantes de la capsaicina sugieren que sustancias de este tipo podrían ser útiles como analgésicos. La explicación de esta estimulación selectiva y los efectos neurotóxicos en células nociceptivas no se conocen hasta ahora pero existen evidencias de receptores específicos de membrana en la superficie de neuronas nociceptivas aferentes directamente acopladas a canales iónicos los que tienen una

alta permeabilidad al calcio. La entrada de calcio puede ser causante de algunos de los efectos celulares producidas (5, 30).

### **1.2.5 Sistema Opioide.**

Para el mejor conocimiento de la fisiología del dolor y del mecanismo de los analgésicos actuales es importante analizar el papel del sistema opioide. Este incluye el conjunto de sustancias endógenas que permiten una respuesta analgésica a nivel central. Existen péptidos endógenos semejantes a la morfina que se unen de manera específica a diferentes tipos de receptores conocidos como receptores opiáceos (33).

La existencia de receptores específicos fue postulada sobre la base de rigurosos datos farmacológicos como: la estereoselectividad de los diversos fármacos opiáceos, la extraordinaria potencia de algunos de ellos, la existencia de un antagonismo específico y la capacidad de fijarse a los tejidos de manera estereoselectiva, saturable y competitivo. A estos sitios específicos de reconocimiento se denominaron receptores opioides (5, 34). Además la hipótesis del receptor opioide se vio corroborada por el descubrimiento de 2 ligandos endógenos capaces de actuar selectivamente con este: los pentapéptidos metencefalina y leu-encefalina (33).

Los receptores opioides se encuentran localizados a todos lo largo del SNC y periférico así como en células de tejidos paracrinis y exocrinis y células implicadas en procesos de inflamación e inmunidad. De hecho, muchas de estas células, al igual que muchas neuronas ubicadas en diversos puntos del neuroeje, sintetizan péptidos opioides. En el Sistema Nervioso Periférico (SNP) estos receptores se encuentran en sus fibras aferentes primarias y simpáticas, en los plexos mioentérico submucoso del aparato digestivo, en la vejiga urinaria, conductos eferentes, etc.(5).

Estos receptores pertenecen al grupo de receptores acoplados a una proteína G y en su estructura se aprecian 7 dominios transmembranales conectados a 3 sitios extracelulares y 3 intracelulares. El extremo C-terminal está en la parte interna de

la célula. Junto con los dominios extracelulares, las hélices transmembranales permiten la unión de varios ligandos opioides y además poseen 2 residuos de cisternas en el primer y segundo sitio extracelular (el 1 y el 2) que posiblemente formen un enlace. Existe un 60 % de homología en la estructura para los 4 receptores opioides que contienen residuos muy conservados como: Asp-Arg-Tyr, (DRY)-TM3 (35).

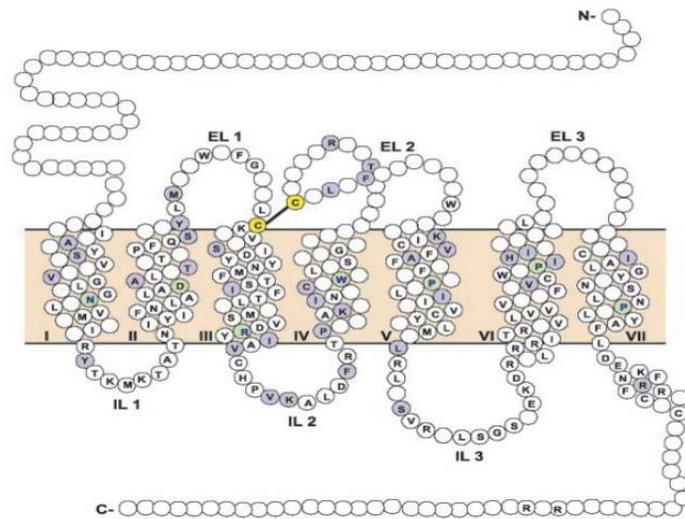


Figura 1.4 Estructura del receptor opioide.

Entre las hélices 3, 4, 5, 6 y 7 transmembranales de los receptores existe una cavidad común para la unión, dicha cavidad toma espacios extracelulares esta aumenta la diferencia en los sitios extracelulares y junto con los residuos presentes en la parte extracelular de los segmentos transmembranales, juega un rol en la selectividad del ligando fundamentalmente péptidos, permitiendo discriminar entre los tipos de receptores opioides. Los ligandos pueden unirse a través del espacio disponible en la cavidad de unión e interactuar con residuos de zonas conservadas o variables los agonistas alcaloides (morfina y sus derivados) interactúa predominantemente con residuos o zonas conservadas dentro de la cavidad (Figura 1.4) (35). El análisis minucioso de las acciones de los neuropéptidos y los fármacos opioides permitió establecer la existencia de 3 subtipos de receptores opioides

fundamentales: mu ( $\mu$ , MOR), kappa ( $\kappa$ , KOR) y delta ( $\delta$ , DOR). Luego se clonó el cuarto receptor al que se le denominó ORL (*opioid-receptor-like*) o N/OFQ, NOR (34, 36).

La analgesia ocurre con la interacción de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$ , mientras que la disforia es asociada con la interacción de los receptores  $\delta$ . Los receptores  $\mu$  son responsables de la mayoría de los efectos producidos por los analgésicos opioides y de algunos efectos mayores no deseados como son: depresión respiratoria, euforia, sedación y dependencia. La mayoría de los analgésicos opioides son agonistas del receptor  $\mu$ . Por su parte, los receptores  $\kappa$  se relacionan con la analgesia a nivel espinal y pueden provocar sedación y disforia; ellos producen relativamente pocos efectos no deseados y no contribuyen a la dependencia. Algunos analgésicos son relativamente  $\kappa$ -selectivos (30).

Los receptores  $\kappa$  producen analgesia a nivel raquídeo y la dinorfina A es el ligando endógeno más selectivo de este receptor. Mediante estudios de fijación con agonistas y antagonistas en animales de experimentación se han propuesto varios subtipos del receptor  $\kappa$  como son: Kappa 1, Kappa 2 y Kappa 3. El compuesto U50488H es un agonista que marca de manera selectiva al subtipo de receptor Kappa 1, en tanto que la nor-binaltorfimidina resulta ser un antagonista específico de este receptor. También se propuso mediante este estudio el subtipo de receptor Kappa 2 del cual no se ha podido dilucidar sus propiedades farmacológicas. Para el subtipo de receptor Kappa 3 se ha establecido, con cierta claridad, sus propiedades farmacológicas y a diferencia de los receptores Kappa 1 que produce analgesia a nivel raquídeo, los receptores Kappa 3 suprimen el dolor por medio de mecanismos suprarraquídeos. Los receptores Kappa 3 corresponden a los receptores del agonista-antagonista nalorfina propuesto por varios investigadores. Aunque los efectos farmacológicos de estos receptores se corrigen con relativa facilidad mediante la administración de diversos antagonistas de los opioides, no se han identificado antagonistas selectivos del receptor kappa 3 (35).

Los receptores  $\delta$  presentan como ligandos endógenos las encefalinas. Se han identificado y propuesto 2 subtipos de receptores  $\delta$ , con base en su sensibilidad

diferencial para el bloqueo por diversos antagonistas selectivos: delta 1 y 2. El compuesto sintético D-pen2-D-pen5-encefalina (DPDPE) es un agonista con mayor afinidad por el subtipo de receptor delta 1 mientras que el naltrexona es un antagonista altamente selectivo de este receptor. Por otra parte la buprenorfina es un agonista que se fija preferentemente a los receptores delta 2 y el análogo benzofurano del naltrexona (NTB) es el antagonista selectivo de los mismos (5, 35).

La estimulación de los receptores  $\delta$  produce analgesia y efectos de refuerzo positivo (potenciación) a nivel de los sitios suprarraquídeos y antinocicepción para los estímulos térmicos a nivel de los sitios raquídeos (5, 35).

En los tres tipos de receptores no se aprecian patrones comunes que permitan dar una visión generalizada sobre cuáles son las áreas del receptor más afines con los diversos ligandos, sugiriendo que cada tipo de receptor puede disponer de mecanismos distintos. Es importante saber también que los sitios de fijación del agonista y antagonista pueden ser diferentes. Con la activación de estos receptores acoplados a una proteína G se producen modificaciones del estado de fosforilación de diversas proteínas, cambios en la conductancia iónica y modificaciones en la expresión de proteínas nucleares que provocaran a su vez cambios en la expresión de genes. No obstante, cuando la presencia de un opioide se prolonga se genera una modificación sustancial en el tráfico de señales intracelulares que culmina con la modificación de la actividad nuclear y de la expresión de genes, que pueden ser los responsables de la aparición de la tolerancia y la dependencia. Esta acción nuclear depende inicialmente de la activación de receptores asociados a proteínas G1/G0 e interviene de forma sustancial la subunidad  $\beta/\gamma$  del receptor. La interacción con el receptor desencadena de las complejas vías de señalización relacionadas preferentemente con MAPK y ERK con sucesivas fosforilaciones de dianas tanto citoplasmáticas como nucleares. También puede intervenir la vía de la PKA ya que a diferencia de la activación aguda del opioide, la acción crónica provoca un aumento de la activación de la adenililciclase (5).

### 1.2.6 Péptidos Endógenos.

Se han identificado tres familias de péptidos endógenos genéticamente independientes con actividad analgésica: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada familia deriva de una proteína precursora diferente. Incluyen unos 20 péptidos con actividad opioide originados a partir de moléculas precursoras inactivas: prepro-opio-melanocortina (POMC), prepro-encefalina y prepro-dinorfina (33, 37). En la tabla 1.2 se muestran las estructuras de un grupo de péptidos endógenos.

Tabla 1.2 Nombre y Estructura de los péptidos endógenos.

<b>Péptidos naturales de anfibios</b>	
Dermorfinas	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NHj
	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys
Deltorfinas	A: Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NHj
	(deltorfina, dermencefalina)
	B: Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH <sub>2</sub>
	(deltorfina II)
<b>Péptidos naturales de mamíferos</b>	
Met <sup>5</sup> -encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu <sup>5</sup> -encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
β-endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Gly-Lys-Ser-Gln-
	Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-
	Ilelle-
	Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
Dinorfina A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-
	Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-
	Val-Thr
α-neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
Nociceptina	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-
	Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

Endomorfin 1	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>
Endomorfin 2	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>
<b>Péptidos sintéticos</b>	
DAMGO	[D-Ala <sup>1</sup> MePhe <sup>5</sup> , Gly (ol) <sup>6</sup> ]encefalina
DPDPE	[D-Pen <sup>1</sup> D-Pen <sup>5</sup> ]encefalina
DSBULET	Tyr-D-Ser(OtBu)-Gly-Phe-Leu-Phr(OtBu)
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-0 rn-Ther-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
Morficeptina	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH <sup>+</sup>

Las encefalinas son neurotransmisores inhibidores presinápticos que se concentran en determinadas terminaciones nerviosas y se liberan bajo un impulso despolarizante. En el SNC las encefalinas actúan como inhibidores de la liberación de noradrenalina (NA) y de la sustancia P, a su vez neurotransmisores que actúan como nexos en el impulso perceptivo del dolor. Los péptidos de encefalinas se encuentran en cerebro, núcleo espinal trigeminal, periacueducto gris, amígdala, hipocampo, locus ceruleus, corteza cerebral, núcleo caudado y globo pálido, médula oblongada, eminencia media, así como en la médula adrenal y en los plexos nerviosos y glándulas exocrinas del estómago e intestino (33).

Estructuralmente las encefalinas son pentapéptidos dentro de los que se encuentran leu-encefalina y met-encefalina. Por su parte las endorfinas y dinorfinas contienen la misma secuencia amino terminal seguida por varias extensiones carbono terminal que abarcan de 5 a 31 residuos. Estudios bioquímicos sugieren que la  $\beta$ -endorfina presenta un precursor común con respecto a la hormona del estrés (ACTH) lo que implica un vínculo entre el sistema opioide y la analgesia inducida por estrés. Este péptido se aísla de la hormona pituitaria y se localiza en neuronas supraespinales y periféricas (33).

Todos los péptidos endógenos muestran una afinidad por los diferentes tipos de receptores opioides. Las encefalinas se unen al receptor  $\mu$  y  $\delta$  al igual que las endorfinas se unen específicamente al  $\mu$  y  $\kappa$  y el OFQ al N/OFQ (33).

### **1.3 Evaluación “*in vivo*” de la actividad analgésica”**

#### **1.3.1 Métodos “*in vivo*” para la determinación de la actividad analgésica.**

La actividad analgésica de una sustancia se puede determinar mediante pruebas antinociceptivas que se cambian típicos observables en la conducta del animal. No se puede asegurar en estas pruebas que el animal tenga la sensación dolorosa de la misma manera que el ser humano. La mayor parte de los métodos de estudio se fundamentan en la administración previa del problema, pasando a determinar la elevación umbral de reacción al dolor que dicha muestra posiblemente provoque al aplicar al animal un estímulo nociceptivo de intensidad conocida y condiciones determinadas. Dichos estímulos suelen ser de tipo mecánico, térmico, eléctrico y químico. Casi todos los test ponen de manifiesto la actividad de los analgésicos narcóticos pero no la de los antiinflamatorios/antipiréticos administrados a dosis normales. Los primeros bloquean intensamente sinapsis a nivel central, mientras que los no narcóticos actúan con un componente periférico mayor (38).

En algunos laboratorios se utiliza la llamada triple prueba analgésica. Cada ratón se somete a tres pruebas, en las que se observa la reacción al estímulo doloroso térmico, mecánico, y eléctrico. Este dispositivo diferencia los analgésicos de otros depresores del sistema nervioso central. La morfina y la peptidina son ligeramente más potentes frente al dolor de origen térmico que frente a los de origen mecánico o eléctrico. El ácido acetilsalicílico es activo frente a los tres tipos de estímulos dolorosos, pero solamente a dosis que se aproximan al nivel letal (39).

##### **1.3.1.1 Analgesia química.**

Estimulación química: La estimulación química involucra la administración de agentes alogénicos, y representa un proceso lento o incluso muy lento. Los estímulos químicos son claramente diferentes de otras formas de estimulación. Son de mayor duración y tienen un carácter ineludible una vez que se han aplicado(40).

Utilizando sustancias químicas que pueden provocar dolor se desarrolla el test de contorsiones reportado inicialmente por Koster R y colaboradores en 1959 (41) que

luego ha sido modificado, empleando como agente algésico 10 mL/kg de ácido acético del 0,3-7%, benzoquinona 0,2 mg/mL y peróxido de benzoilo al 10% por vía intraperitoneal (i.p.). El fármaco patrón es el ácido acetilsalicílico generalmente a una dosis de 100 mg/Kg (i.p.). Inmediatamente después de la administración del agente algésico, cada animal se aísla en una caja individual para observar el número de retorcimientos y estiramientos que realiza el animal durante 15-20 minutos. Se describe como contorsión, a la contracción de los músculos abdominales, acompañados por una elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras.

### **1.3.1.2 Analgesia eléctrica.**

La estimulación eléctrica tiene la ventaja de ser cuantificable, reproducible y no invasivo. Sin embargo tiene serias desventajas, los estímulos eléctricos no son un tipo de estímulo natural como los encontrados por el animal en su entorno normal. Más importante aún, los estímulos eléctricos intensos excitan de una manera no diferencial todas las fibras periféricas incluidas las fibras de grandes de diámetro que no están directamente implicadas en la nocicepción, así como las fibras alfa y C las cuales están mediadas por sensaciones de frío y calor, así como la información nociceptiva (42). Estos incluyen:

✓ **Estimulación eléctrica de la cola:** Las intensidades de los estímulos eléctricos pueden aumentar de forma gradual y se pueden liberar en forma secuencial (que dura desde ciento hasta milisegundos) a través de electrodos subcutáneos de la rata o el ratón. Cuando la intensidad de los estímulos eléctricos que se aplican aumentan gradualmente se puede observar sucesivamente un movimiento reflejo de la cola, la vocalización en el momento de la estimulación, y luego continuar la vocalización más allá del período de estimulación. Estas respuestas están organizadas en una jerarquía que depende de los distintos niveles de integración de la señal nociceptiva en el sistema nervioso central, la médula espinal, el tronco cerebral, el tálamo y el rinencéfalo. La sensibilidad a la morfina en los umbrales de estas respuestas aumenta con los mismos niveles.

✓ **La estimulación eléctrica de la pata (y cola):** En estas pruebas, los estímulos eléctricos de intensidades cada vez mayores se realizan en forma secuencial en el piso de una jaula en la que el animal puede moverse libremente. Las mediciones se hacen en los umbrales para varios comportamientos: la crispación, contracción, tratar de escapar saltando. Un método en el cual se aplican incrementos continuos de corriente, permite determinar el tiempo de reacción para una amplitud dada a partir de la obtención de un chirrido en el animal. Al igual que en la prueba de plato caliente, la estimulación concomitante de las cuatro patas y la cola del animal es sin duda la fuente de los controles inhibitorios difusos que pueden modificar la respuesta que se está supervisando. Esta prueba cayó en desuso (43).

✓ **Secuencias muy cortas de los estímulos eléctricos:** La estimulación de la cola. Este ensayo difiere de los descritos anteriormente en que: 1) los estímulos eléctricos aplicados a la cola son individuales y de corta duración (10 o 20 min) y 2) las conductas observadas son diferentes aunque relacionadas. Cuando aumenta la intensidad de la estimulación se observan las siguientes respuestas: espasmos, comportamiento de escape, vocalización. Una vez más estas respuestas que están organizadas dependen de diferentes niveles de integración de la señal nociceptiva en el centro del sistema nervioso central. La sensibilidad de esta prueba a la morfina aumenta con el nivel de integración de la señal nociceptiva. Este método ha sido adaptado a ratones y parece una adecuada predicción de analgésicos, incluidos los opiáceos agonistas parciales (43).

✓ **Estimulación de la pulpa dental:** Como ya se sabe anteriormente una debilidad importante de la utilización de la estimulación eléctrica para el estudio de dolor es la forma no selectiva en que se excitan los diferentes tipos de fibras nerviosas aferentes primarias. No obstante los modelos que usan estimulación en la pulpa dental difieren de los analgésicos opioides. Son más selectivos que el test de contorsión abdominal y no puede revelar la actividad de los analgésicos no opioides que no pueden ser revelados por el test de plato caliente. Sin embargo estos modelos no son efectivos a la actividad de los AINES ya que solo muestran actividad a altas dosis. Ellos son poco usados (43).

### **1.3.1.3 Analgesia térmica.**

Estimulación térmica: El calor estimula más selectivamente los receptores cutáneos. En consecuencia, categorías específicas de los axones periféricos, tales como fibras termosensibles y nociceptivas, pueden ser excitados. Sin embargo, el débil poder calórico de los estimuladores que se utilizan generalmente (lámparas radiantes) siempre ha sido una limitación de este método. De hecho, la velocidad de calentamiento cutáneo inducido de esta manera es lento (10 °C/s) lo que resulta una asíncrona activación de las neuronas periféricas y centrales. Por lo tanto no permite un adecuado estudio de los nervios, fenómeno clásicamente visto en otros sistemas sensoriales (73). El objetivo de las técnicas a realizar es comprobar el efecto analgésico de las muestras frente a diferentes formas de calor.

✓ **Método del foco calorífico.**

Este método fue uno de los primeros en implementarse y el estímulo algésico es el foco calorífico. A la media hora de administración del fármaco, se dirige un foco calorífico a la cola de la rata, observándose el tiempo de resistencia al calor, considerando que este no ha terminado cuando la rata está inquieta y mueve la cola (39).

✓ **Tail-flick o latigazo en la cola.**

En este caso se desarrolla un dispositivo especial que permite aplicar sobre la cola del animal, que se encuentra dentro de este para mantenerlo constreñido y en reposo, un estímulo de calor radiante regulable, que proviene de una fuente de poder infrarroja. En el momento de iniciar la aplicación del calor se activa un cronómetro digital sensible al movimiento, que permite determinar el tiempo que demora el ratón en retirar la cola de la zona y es la medida que se usará para evaluar el efecto analgésico (44).

✓ **Método de la placa caliente.**

Este test es muy empleado para evaluar la analgesia a nivel central. Los resultados que se obtienen con este método son fiables y reproducibles, siendo igualmente válido para rata como para ratón. La desventaja es que no da resultados positivos

con analgésicos no narcóticos débiles, del tipo salicilato. De modo general se utiliza un aparato que consiste en una placa conectada a una resistencia termostataada de modo que se consiga la temperatura deseada ( $55 \pm 1$  °C). Para evitar que el animal huya, está provisto de un cilindro de plástico transparente que permite observar una reacción de incomodidad del animal (lamerse las patas posteriores e incluso saltar). Cada individuo puede considerarse como su propio control y después de administrar los productos se evalúa el tiempo de la reacción y este valor viene determinado por los segundos que tarda en reaccionar el ratón después del tratamiento. Cuando se pueda sospechar de un efecto analgésico central se trabajará en el test con naloxona, un conocido antagonista opioide, que se administra previamente (45).

✓ **Inmersión de la cola.**

Este test se desarrolla en ratas. Al cabo de 30, 60, 90 y 120 min de la administración de cada tratamiento, se sumerge 1/3 de la cola del animal en agua a temperatura de 50- 60 °C. El animal es sujetado de forma que puede mover libremente la cola. Cuando el animal experimenta dolor, como consecuencia de la elevada temperatura del agua, desarrolla una respuesta de retirada de la cola. Se cuantificó el tiempo de reacción o tiempo que el animal tardó en retirar la cola, expresado en centésimas de segundo. Se emplea Indometacina 10 mg/kg como control (46).

#### **1.3.1.4 Analgesia mecánica.**

Estimulación mecánica: La aplicación de los estímulos mecánicos nocivos pueden ser progresivos o gruesos. Las respuestas producidas por estímulos nocivos mecánicos son clasificados en relación con la intensidad y / o la duración del estímulo, de los reflejos a través de vocalizaciones, en última instancia a las conductas motoras complejas, pero tiene la desventaja de la activación de los mecanorreceptores bajo umbral, así como nociceptores. En consecuencia, el estímulo no es específico. También hay dificultades técnicas en la aplicación de los estímulos mecánicos, sobre todo cuando los animales se mueven libremente. Por otra parte, cuando los estímulos mecánicos son realmente nociceptivos es probable que se produzcan cambios en los tejidos (sensibilización o lesiones reales). Por

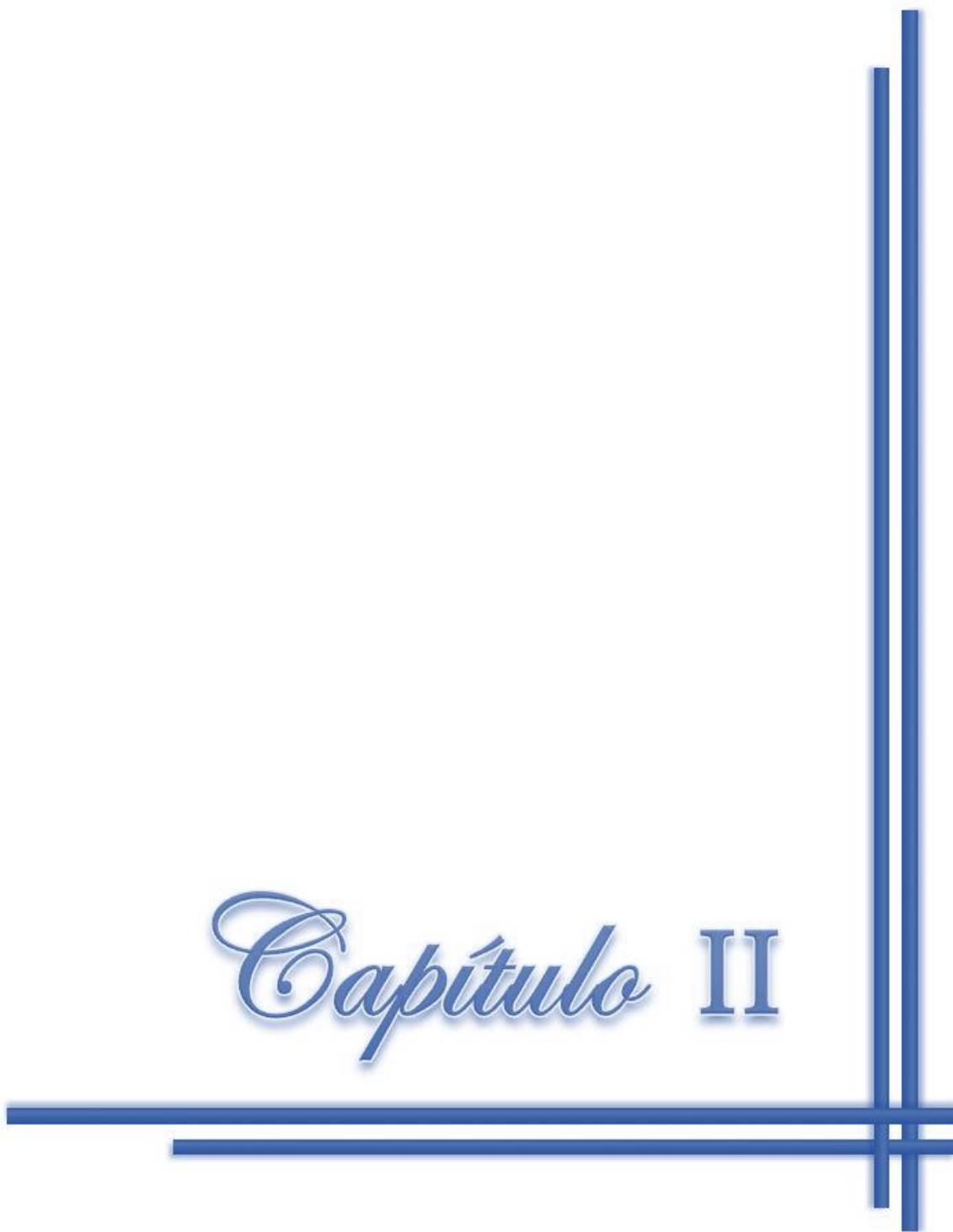
último en pequeños animales como roedores las partes del cuerpo que se estimulan son pequeñas lo que puede producir problemas para el científico en separar la causa (estímulo) y efecto (reacción) (47).

✓ **Test de Randall y Selitto.**

En este test, una pieza cónica acabada en punta roma ejerce una presión que se va incrementando de forma lineal sobre la región central de la pata posterior derecha del animal. El incremento de la presión se produce al incrementar el desplazamiento de un peso a través de una barra escalada en centímetros sobre la que realice un efecto de palanca que se transmite a la extremidad del animal. El animal es sujetado durante todo el test de forma que puede mover libremente la pata. Cuando el animal experimenta dolor, como consecuencia del incremento de la presión, desarrolla una respuesta de retirada de la pata.

Dicho test ha sido modificado usando como agente algésico una solución de carragenina al 1%. Los fármacos que actúan a nivel central producen una elevación del umbral doloroso en ambas patas, mientras que los que actúan a nivel periférico no modifican el umbral doloroso en la pata normal y si en la inflamada, como ocurre con los analgésicos-antiinflamatorios. Transcurrido una hora de la administración de los productos se mide la resistencia a la presión en cada una de las patas posteriores de la rata. Con los valores medios, se calcula el porcentaje de analgesia de la misma manera que en la prueba del foco calorífico, a partir de las unidades de presión que resisten los animales (38).

# Capítulo II



## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Tipo de estudio.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde enero 2016 hasta mayo de 2016. La realización del estudio se llevó a cabo en tres etapas:

1. Obtención del material vegetal.
2. Obtención del extracto hidroalcohólico y evaluación fitoquímica.
3. Evaluación farmacológica de la actividad analgésica.
4. Evaluación de la toxicidad dérmica aguda.

### 2.2. Procedimiento y Diseño Experimental.

#### 2.2.1. Etapa 1: Obtención del material vegetal.

##### 2.2.1.1. Equipos, Materiales y Reactivos empleados.

Equipos	Balanza analítica digital (Sartorius, BS-124S, Alemania)
	Balanza técnica digital (Sartorius, TE 12000 Alemania)
	Estufa (Binder, USA)
	Horno Mufla (B-170, Alemania)
	Rotoevaporador (BÜCHI R-200, Alemania)
	Espectrofotómetro UV-VIS (TEG-10UV, USA)
	Plancha de calentamiento (IKA, C-MAG HP7, Alemania)
	Micromolino de cuchillas (IKA-MF 10B, Alemania)
	Densitómetro (DA-130N, Kyoto, Japón)
	Refractómetro digital (ABBE, WYA-S, URRS)
	Vórtex mecánico (GILSON, Alemania)
	Micropipetas de 50, 100, 500, 1000 $\mu$ L (EPENDORF, Alemania)
	Manta de calentamiento (JP Selecta, FIBRAMAN-C, España)
	Equipo de reflujo (Grant Sub-14, Inglaterra)
Materiales y reactivos	Etanol (UNI-CHEM) 90%
	Solución amoniacal (UNI-CHEM)
	Hidróxido de sodio (UNI-CHEM)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)
Reactivo de Baljet A y B (UNI-CHEM)
Reactivo de Felhing A y B (UNI-CHEM).
Ácido gálico (SIGMA- ALDRICH)
Reactivo Folin–Ciocalteus (SIGMA-ALDRICH)
Quercetina (ACROS-ORGANICS)
Cinta de magnesio metálica (Analar)
Tricloruro de aluminio (MERCK)
Tricloruro férrico (Analar)
Cloroformo (MERK)
Alcohol amílico (MERK)
Reactivo de Dragendorff (UNI-CHEM)
Solución de Ninhidrina al 2%
Reactivo de Kedde
Agua (Destilada)
Utensilios y cristalería de Laboratorio

### **2.2.1.2. Recolección, secado y molinado del material vegetal.**

Las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. fueron recolectadas en horas de la mañana en áreas rurales de los municipios de Fomento y Sancti Spíritus, entre los meses de enero y febrero del 2016. El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica de la UCLV, donde se lavaron con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el MSc. Idelfonso Castañeda Noa, Profesor Auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario (UCLV) localizado en la citada institución, bajo el número 1305.

El secado se realizó mediante calor artificial utilizando estufa a 30°C, extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas y removiendo varias veces

para evitar contaminaciones microbiológicas, hasta peso constante. Después de secado, el material se trituró en un molino utilizando un tamiz de 1mm.

### **2.2.1.3 Prueba de Control de la Calidad de la droga cruda.**

### **2.2.2. Determinación de índices numéricos de la droga seca en forma de sólidos pulverulentos.**

Una vez estandarizado el secado se procedió a la determinación de los índices numéricos de la muestra del lote correspondiente al secado en la estufa a 30 °C y molinada, según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (NRSP # 309) (48).

#### **2.2.2.1. Contenido de humedad residual.**

La determinación se realizó por el método gravimétrico según se especifica en la Norma Ramal de Salud Pública # 309 (48).

Procedimiento: De la muestra de ensayo con el grado de trituración que determina la norma específica, se pesaron 2,0 g con un error máximo de 0,5 mg y se transfirió a una placa petri previamente tarada y se desecó a 105 °C durante tres horas. La placa petri se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, repitiendo esta operación hasta obtener un peso constante.

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

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

Donde:

Hg: Contenido de humedad (%)

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

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

100: Factor matemático para los cálculos

### **2.2.2.2. Determinación de cenizas totales.**

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

Se calentó 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 incinerización, hasta obtener masa constante y no diferir en más de 0,5 mg/g entre dos pesadas consecutivas. Para obtener masa constante el tiempo de calentamiento y pesada se hizo a intervalos de 30 minutos (48).

$$C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100 \quad Ct = \frac{C1 * 100}{100 - H}$$

Donde:

C1: Cenizas totales en base hidratada

Ct: Cenizas totales

M: masa del crisol vacío (g)

M1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M2: masa del crisol con la ceniza (g)

H: porcentaje de humedad

### 2.2.3. Obtención y caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

#### 2.2.3.1 Obtención del extracto.

Una vez que el material vegetal está seco y molido se procedió a la obtención del extracto, refluendo 50 g con una solución hidroalcohólica [1:10] por 2 h, posteriormente se filtra y se rotoevapora hasta eliminar el solvente. El diagrama de flujo se refleja en la (Figura 2.1).

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

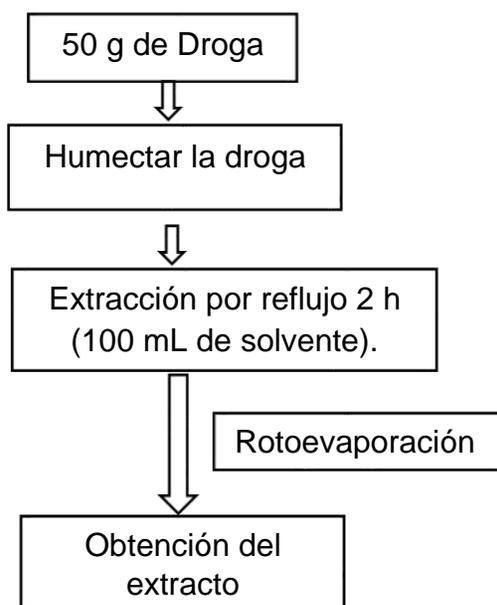


Figura 2.1: Metodología de extracción.

#### 2.2.3.2. Características organolépticas.

##### Determinación del olor.

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si correspondía con la característica del producto natural (48).

### **Determinación del 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 (48).

### **Determinación del pH.**

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada. Se introdujo directamente los electrodos del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura (48).

### **Determinación del índice de refracción.**

Se colocó sobre el prisma de medición del refractómetro una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el instrumento seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas (48).

### **Determinación de la densidad relativa.**

Se determinó la densidad relativa a las cuatro muestras de ensayo con un densitómetro digital (48).

### **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  $105 \pm 2$  °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 (48).

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

$$S_1 = M_2 - M_1$$

$$S_2 = M_2 - M_1$$

$$S_3 = M_2 - M_3$$

$$St = \frac{S1 + S2 + S3}{3}$$

Donde:

S1, S2, S3: Sólidos totales (g)

M2: Masa del crisol con el sólido (g)

M1: Masa del crisol vacío (g)

St: Valor medio de sólidos totales (g)

#### **2.2.4. Evaluación fitoquímica de los extractos.**

##### **2.2.4.1. Tamizaje fitoquímico.**

Para evaluar cualitativamente la posible composición química de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en cuanto a metabolitos secundarios, se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo las técnicas descritas por Miranda y Cuellar, 2012 (49) . Los diferentes ensayos desarrollados se refieren en el Anexo 1.

##### **2.2.4.2.1. Determinación del contenido de fenoles totales.**

El contenido de fenoles totales se estimó según la metodología descrita en la literatura mediante la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), con algunas modificaciones. La mezcla reactiva contenía 0,5 mL ácido gálico, 0,3 mL de EtOH, 0,1 mL del reactivo FC y 1,1 mL H<sub>2</sub>O incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionaron 0,4 mL H<sub>2</sub>O y 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7 %) e incubó nuevamente durante 30 min. La absorbancia se leyó a 765 nm contra un blanco de solución hidroalcohólica. Se utilizó ácido gálico como referencia construyéndose una curva patrón en el intervalo 1-10 µg/mL. El ácido gálico se preparó en agua bidestilada. El extracto se preparó a 500 µg/mL en agua bidestilada del cual se tomó un alícuota de 0,5 mL para el ensayo. Los resultados se expresaron como µg de ácido gálico equivalente por mg de extracto seco (µgAGE/mgES) (50).

### **2.2.4.2.2. Determinación del contenido de flavonoides totales.**

El contenido de flavonoides totales se estimó según la metodología descrita en la literatura. A 1 mL de extracto se le adicionó 0,5 mL de  $\text{AlCl}_3$  (2 %) y 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . La mezcla reactiva se agitó e incubó 10 min, leyéndose la absorbancia a 420 nm contra un blanco de  $\text{AlCl}_3$  en mezcla hidroalcohólica. El extracto de *Jatropha gossypifolia* se preparó a 500  $\mu\text{g/mL}$ . La quercetina se preparó en etanol (50).

### **2.3 Evaluación farmacológica de la actividad analgésica.**

#### **2.3.1 Procedimiento y diseño experimental para la evaluación *in vivo* de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.**

##### **2.3.1.1 Método de la placa caliente (Woolfe y Mac Donald) (45)**

#### **Materiales.**

Agua para solubilizar los compuestos evaluados

Compuesto analgésico de referencia (morfina 7,5 mg/kg, i.p.)

Jeringuillas de 1 mL

Placa Caliente (*Hot-plate*) Marca UGO BASILE a  $55 \pm 10$  °C

Cronómetro

#### **Modelo Biológico.**

Se emplearon ratones albinos suizos OF-1 de ambos sexos con peso promedio entre 20-30 g proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 2).

#### **Condiciones Experimentales.**

Los animales fueron proporcionados por el centro nacional de producción de animales de laboratorio (CENPALAB). Los animales fueron mantenidos durante 7 días en adaptación a las condiciones experimentales con una temperatura ambiente, humedad relativa de  $60 \pm 5$  % y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. Recibieron alimentación controlada (Alimento concentrado EMO 1002 en

forma de pellet con su correspondiente Certificado de Calidad emitido por el CENPALAB (ver anexo 3), y agua potable apta para consumo *ab libitum*. Se alojaron en jaulas de polietileno con rejilla metálica a razón de 6 animales por jaula. Fueron privados de alimentación 18 horas antes de iniciar el experimento y de agua potable 1 hora antes (51, 52).

Grupos control:

Morfina a 7,5 mg/kg, (i.p.)

Vehículo: Agua destilada a 10 mL/kg (p.o.)

Grupos experimentales:

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 100 mg/kg

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 200 mg/kg

**Proceder experimental.**

El fármaco de referencia, los extractos a evaluar y el vehículo se administran por vía intraperitoneal y oral respectivamente. El aparato consiste en una placa conectada a una resistencia termorregulada de modo que se consigue la temperatura deseada ( $55 \pm 1$  °C). Para evitar que el animal huya, está provisto de un cilindro de plástico transparente que permite observar una reacción de incomodidad del animal (lamerse las patas posteriores e incluso saltar).

Antes del tratamiento se realizaron dos mediciones espaciadas una de la otra en 10 min y se calculó la media, considerando este valor como tiempo de reacción (segundos) antes del tratamiento, constituyendo así el tiempo antes (T antes). Luego de administrar el compuesto a evaluar se efectuaron varias mediciones, espaciadas de 30 min, hasta los 120 min, constituyendo estos valores (segundos) el tiempo después (T después), denominado el mismo como tiempo que tarda el animal en reaccionar al dolor.

Para cada grupo se calculó la media de los tiempos de reacción expresando los porcentajes de analgesia aplicando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Analgesia} = \frac{T \text{ después} - T \text{ antes}}{T \text{ antes}} * 100$$

### **2.3.1.2 Test de Contorsiones (Koster et al) (41).**

#### **Materiales.**

Solución hidroalcohólica

Ácido Acético 3 %

Jeringuillas de 1 mL

Ácido acetil salicílico (ASA)

Cajas claras individuales para contener los animales

Cronómetro

#### **Grupos control:**

ASA 100 mg/kg

Vehículo: Agua destilada

#### **Grupos experimentales:**

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 100 mg/kg

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 200 mg/kg

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 300 mg/kg

#### **Modelo Biológico.**

Se emplearon ratones albinos suizos OF-1 de ambos sexos con peso promedio entre 20-30 g proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 2).

#### **Proceder experimental.**

Los compuestos a evaluar, el fármaco de referencia y el vehículo se administran por vía oral (p.o.). Luego de una hora de administrados los compuestos evaluados se

administra 0,25 mL de solución de ácido acético al 3 % a través de inyección intraperitoneal. El fármaco patrón es ácido acetil salicílico a dosis de 100 mg/kg.

Inmediatamente después de la administración del agente algésico cada animal se aísla en una caja individual para observar el número de retorcimientos y estiramientos que realiza el animal por 20 min. Se obtiene la media aritmética para cada lote con su correspondiente error y se determina el % de inhibición (41).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{\text{No. contorsiones del grupo tratado}}{\text{No. contorsiones del grupo control}} * 100$$

### **Eutanasia.**

Una vez finalizado el estudio los animales fueron sacrificados, anestesiados en atmósfera de éter dietílico y posterior dislocación cervical, cumpliendo con los procedimientos internacionales bioéticos establecidos para ello.

### **Consideraciones éticas.**

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

#### **2.3.1.2.1 Análisis estadístico.**

Primero que todo 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 de los grupos de dosis en los diferentes momentos analizados, es decir, al inicio, 30, 60, 90 y 120 minutos. Luego se compararon los porcentajes de analgesia entre los grupos de dosis, en los diferentes momentos analizados. Para ello se utilizaron el test no paramétrico de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas de los diferentes grupos y luego el test de Mann Whitney para localizar las diferencias entre las parejas de grupos. Más

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

adelante se pasa al estudio de la evolución en el tiempo de los diferentes grupos, para ello se graficaron los perfiles de la evolución del porcentaje de analgesia de cada animal destacándose la media por grupo de dosis. Luego se utiliza el test no paramétrico de Friedman para analizar si las evoluciones del porcentaje de analgesia en los diferentes grupos de dosis fueron significativas en el tiempo. Después se realiza la comparación en cada grupo de las medias en los diferentes momentos del tiempo, para ello se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon.

### **2.3.2 Evaluación de la toxicidad dérmica aguda.**

#### **Materiales.**

Tijeras estériles

Torundas de gasa

Vendaje estéril

Esparadrapo

Cajas de polietileno

#### **Grupos experimentales:**

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 100 mg/mL

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 250 mg/mL

Extracto de *Jatropha gossypifolia* L. 500 mg/mL

#### **Grupos control:**

Vehículo: Agua destilada

#### **Modelo Biológico.**

Se emplearon ratas albinas de ambos sexos de la línea Sprague Dawley con peso promedio entre 150-230 g proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB) con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 4), saludables, machos y hembras nulíparas no grávidas. Los animales se mantuvieron en cuarentena 5 días previos al comienzo del experimento

inspeccionándose diariamente su estado general. Se distribuyeron en grupos de cinco por jaula, bajo condiciones ambientales estandarizadas, alimentados y con suficiente agua potable. Los protocolos experimentales se realizaron en conciliación con las normativas establecidas por la norma N° 402. de la OECD (*OECD Guideline For Testing Of Chemical /Acute Dermal Toxicity*) (53).

**Proceder experimental.**

El extracto hidroalcohólico fue rotoevaporado y resuspendido en agua destilada hasta alcanzar las concentraciones evaluadas. Antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco de los animales, evitando cualquier lesión de la piel que pueda modificar su permeabilidad. La superficie que hay que preparar para la aplicación de la sustancia no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal (53).

Se aplicó vía tópica 4, 1,6 y 0,8 mL respectivamente de acuerdo a las concentraciones ya mencionadas (500, 250 y 100 mg/kg), además de un grupo control que solo recibió el vehículo. El área de prueba fue de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup>. Después de la aplicación se colocaron gasas sobre las áreas de prueba y fueron aseguradas sobre el dorso del animal mediante unas vendas. Enseguida, los animales fueron colocados en jaulas que limitan su movimiento. Las gasas fueron removidas 24 horas después de su aplicación y finalmente los animales fueron colocados en jaulas individuales (54). Cada animal presentó una ficha para la recogida de datos.

Las reacciones de la piel se midieron durante 14 días, siendo más frecuentes en las primeras 24 horas. La evaluación se realizó colocando los animales bajo una fuente de luz blanca fluorescente, a una distancia de 90 cm y sobre un fondo oscuro. Las observaciones se registraron sistemáticamente a medida que se efectuaron, en una ficha individual para cada animal. Las observaciones incluyeron las modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, el sistema nervioso autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las

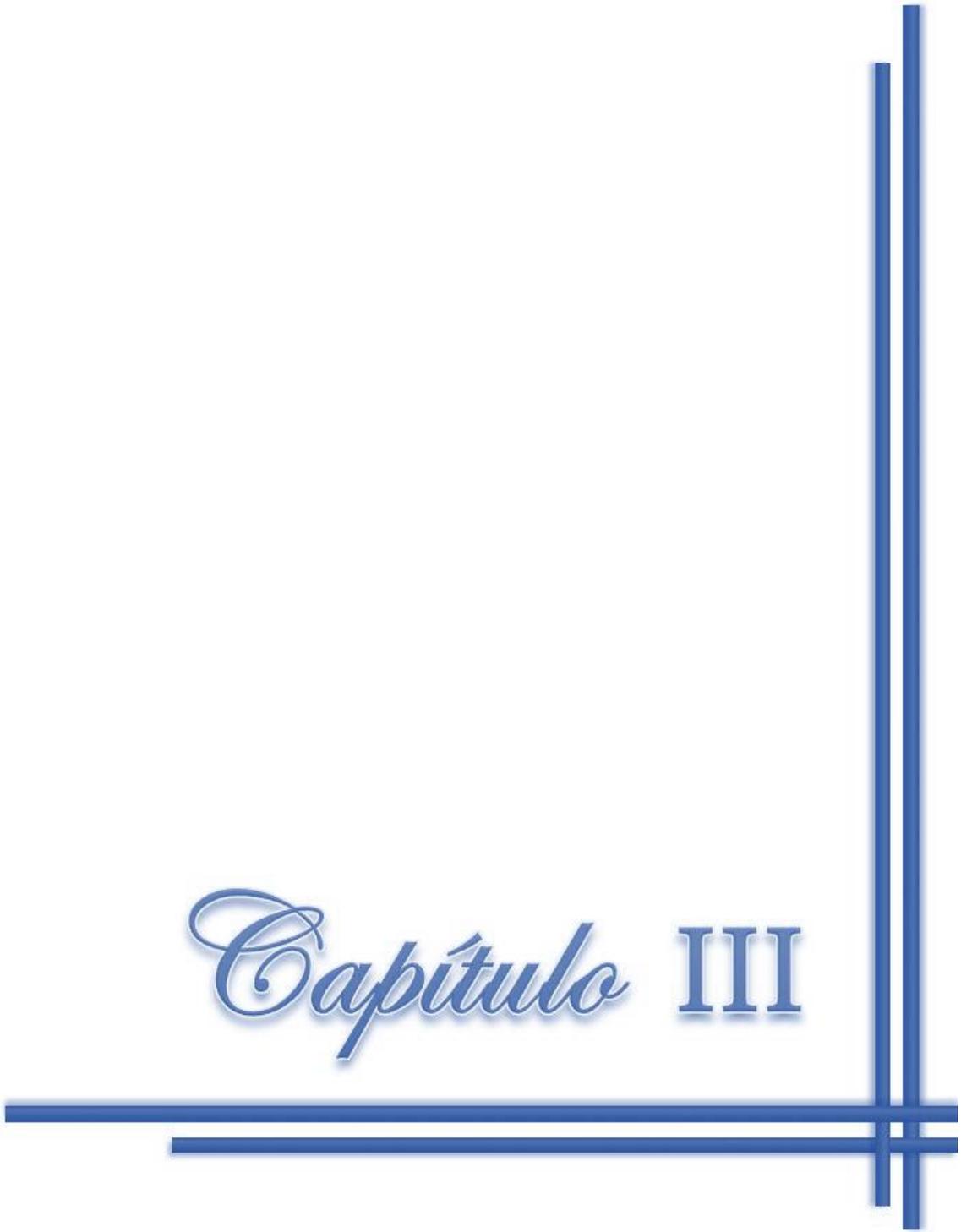
convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe anotarse con la mayor precisión posible (55).

Finalmente se realizó la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrarse todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán tejidos para un examen histopatológico posterior (56, 57).

### **2.3.2.1 Análisis estadístico.**

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

# Capítulo III



## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

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

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

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

#### 3.1.2 Secado y molinado.

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

Las características organolépticas del polvo se muestran en la Figura 3.1, observándose que el polvo secado presentó un color distintivo (verde oscuro) y un olor característico.



Figura 3.1: Droga seca y molinada.

### 3.1.3 Determinación de índices numéricos.

Una vez secado el material vegetal se procedió a la determinación de los índices numéricos de la planta secada según las Normas Ramales 309 (48). En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.1: Resultados de los índices numéricos

Índices numéricos	Valor (%) (media $\pm$ DS, n=3)
Humedad	6,53 $\pm$ 0,16
Cenizas totales	11,39 $\pm$ 0,15

Para esta planta se observa que el valor de humedad residual es de un 6,53 %, lo cual se acepta pues está dentro de los límites establecidos por La Real Farmacopea Española, (2010) y Normas Ramales de Salud Pública (1992) de drogas vegetales, no excediendo el 10 %, garantizando de este modo una calidad adecuada del material posterior al secado.

Los límites de agua establecidos en las farmacopeas varían significativamente unos de otros, oscilando frecuentemente entre 8 y 14 % según la farmacopea que se utilice como referencia, correspondiéndose los valores más altos a las drogas compuestas por cortezas, tallos y raíces (49).

Se determinó el contenido de cenizas totales, utilizando para ello la droga seca y molinada, obteniéndose un valor de 11,39 % (tabla 3.2) el cual no se encuentra

dentro de los límites que establecen las Normas Ramales de Salud Pública, (1992) los cuales plantean deben ser menores de un 5 % (48, 49).

El contenido de cenizas totales indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga. Por lo general, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice (58). Estas permiten determinar la cantidad de material remanente después de la ignición: "cenizas fisiológicas", derivados 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, por lo que se consideró que este valor debió corresponderse con las cenizas fisiológicas de la especie. Existen referentes en la literatura (59) de este parámetro para la especie vegetal en estudio que son similares (15,8 %). Otras especies de la familia como: *Alcaiypha fimbriata*, *Euphorbia hirta* y *Jatropha curcas* L. muestran valores similares (tabla 3.2). No obstante, se considera que deben calcularse las cenizas insolubles en ácido clorhídrico para establecer si las mismas están vinculadas al contenido de material inorgánico extraño y por lo tanto conocer si están presentes metales pesados (49).

Tabla 3.2 Valor de cenizas para plantas de la familia *Euphorbiaceae*.

Planta	Cenizas totales (%)
<i>Alcaiypha fimbriata</i> (60)	11,50 ± 0,32
<i>Euphorbia hirta</i> (60)	18,66 ± 0,17
<i>Jatropha curcas</i> L. (61)	7,40 ± 3,7
<i>Jatropha gossypifolia</i> L. (59)	15,8 ± 0,57

### 3.1.4 Obtención y caracterización del extracto.

El extracto se obtuvo por reflujo durante 2 h a partir de 50 g del material vegetal seco y molinado en la mezcla hidroalcohólica citada (70 %). Se procedió a su rotoevaporación dando lugar a un extracto hidroalcohólico de color verde oscuro

intenso, característico de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas con una significativa extracción de pigmentos clorofílicos.

Se caracterizó dicho extracto a través de variables fisicoquímicas como: la determinación del pH, densidad e índice de refracción. Los resultados aparecen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Parámetros químico-físicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

pH	6,38
Índice de refracción	1,3622
Densidad relativa (g/cm <sup>3</sup> )	0,982
Sólidos totales (mg/100 mL de extracto)	0,47 ± 0,025

### 3.2 Evaluación fitoquímica de extracto.

Un elemento importante en la valoración de los extractos que van a ser sometidos a evaluaciones farmacológicas es la naturaleza química de los componentes, pues esta información puede orientar hacia la posible acción farmacológica que puedan ejercer y a los posibles metabolitos responsables de tales efectos. En correspondencia a este criterio se realizó la evaluación fitoquímica del extracto obtenido a partir de las hojas de la *Jatropha gossypifolia* L. (62).

#### 3.2.1 Tamizaje fitoquímico.

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

En la tabla 3.4 se hace referencia a los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos presentes en el extracto analizado.

Se evidencia la presencia de un gran número de metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L. como fenoles y/o taninos, flavonoides, saponinas, azúcares reductores, alcaloides, coumarinas y quinonas.

Tabla 3.4: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolitos	Ensayos	Extracto hidroalcohólico
Resinas	Resinas	(-)
Saponinas	Espuma	(+)
Alcaloides	Dragendorff	(+)
Glucósidos cardiotónicos	Kedde A+B	(-)
Fenoles y/o Taninos	Cloruro Férrico	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)
Aminoácidos libres	Nihidrina	(++)
Coumarinas	Baljet A+B	(++)
Azúcares reductores	Felhing A+B	(+)
Quinonas	Borntrager	(++)

Al realizar el tamizaje fitoquímico, se detectó en el extracto la presencia de cumarinas a las que se le atribuyen propiedades como: antitumoral, antiarrítmicas, antiinflamatorias, antisépticas, analgésicas y contra la hipertensión, la osteoporosis y el VIH. Estas son usadas en tratamientos contra el asma y contra el linfedema (63).

El tamizaje también dio positivo a saponinas a las cuales se le atribuyen acciones expectorante, diurética, depurativa, tónico-venosa y de disminución del colesterol. Además de disminuir el riesgo de padecer cáncer, pues un estudio del 2004 publicado en el "*Journal of Medicinal Food*", demostró que el cáncer de colon, de

mama, de útero y las tasas de cáncer de próstata son más bajas en los países donde los habitantes consumen grandes cantidades de legumbres. Esto puede ser debido a los efectos moduladores del sistema inmunitario de las saponinas que aumentan la actividad anti-tumoral en el cuerpo (64).

También se detectó la presencia de flavonoides, de los cuales se han descrito efectos terapéuticos en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas (65), así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (66, 67).

Por otra parte, los fenoles, en la actualidad se utilizan para cauterizar en ciertos procedimientos como la matriceptomía por onicocriptosis (68). También se usan como: desinfectantes, preparación de resinas y polímeros, preparación del ácido pícrico, usado en la preparación de explosivos, síntesis de la aspirina y de otros medicamentos.

Los taninos forman parte de los constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. y su acción antioxidante ayuda a prevenir enfermedades degenerativas. Poseen propiedades astringentes y antiinflamatorias, desinflan la mucosa intestinal por lo que es un tratamiento eficaz contra la diarrea y también ayudan a que la sangre coagule, ejerciendo acción antihemorrágica local y resultando útil para el tratamiento de las hemorroides. Ofrecen una acción antiséptica frente a bacterias, hongos y virus, las plantas que contienen taninos atacan a los microorganismos aglutinando las proteínas de su superficie (62).

La presencia de estos metabolitos en el extracto pudiera estar relacionada con

algunas de las acciones atribuidas de la planta como son su efecto diurético, procoagulante, analgésico, antiinflamatorio y antibacteriano. Varios estudios realizados a diferentes extractos de *Jatropha gossypifolia* L., relacionan la presencia de sus componentes químicos con las posibles acciones de la misma (12).

Estos resultados se encontraron en correspondencia con los informes fitoquímicos de la planta, de la cual han sido aislados y caracterizados diferentes compuestos que aparecen referenciados en la tabla 3.5 (69).

Tabla 3.5: Principales constituyentes químicos de *Jatropha gossypifolia*, con su respectivos solventes de extracción y partes vegetales.

<b>Grupo</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Parte vegetal</b>	<b>Solvente de extracción</b>
Ácidos grasos	Ácido araquídico	Semillas	-
	Ácido araquidónico		-
	Ácido benzóico	Semillas	Éter de petróleo
	Ácido caprílico		-
	Ácido esteárico	Semillas	Éter de petróleo
	Ácido lignocérico	Semillas	-
	Ácido linoléico	Semillas	-
	Ácido mirístico		-
	Ácido oléico	Semillas	Éter de petróleo
			-
	Ácido palmítico	Semillas	Éter de petróleo
			-
	Ácido palmitoléico	Semillas	-
Ácido ricinoléico	Semillas	-	
Ácido vernólico	Semillas	Éter de petróleo	
		-	
Azúcares	Arabinosa	Semillas	-
	Ramnosa		-
	Xilosa		-
Alcaloides	Jatrofina	Hojas	Agua
	( <i>Jatrophine</i> )	Raíz	
	-	Hojas	Agua
		Semillas	Cloroformo y metanol
		Látex	Éter de petróleo
		-	
Aminoácidos	Ácido aspártico	Semillas	-
	Ácido glutámico		-
	Alanina		-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Arginina		
	Cistina		
	Glicina		
	Isoleucina		
	Leucina		
	Metionina		
	Prolina		
	Treonina		
	Valina		
Cumarinas	Cleomiscosina A (Cleomiscosin A)	Tallo	Hexano-Etanol
	Cumarina (7,8-dihidróxi-6- metoxi- cumarina)	Raíz	Acetato de etilo
	Fraxetina Propacina (Propacin)	Toda la planta	Cloroformo y metanol
Diterpenos	Jatrogenona (Jatrogenone)	Toda la planta	Cloroformo y metanol
	Jatrogenona A (Jatrogenone A)	Raíz y hojas	Etanol
		Raíz	-
	Jatrogenona B (Jatrogenone B)	Raíz y hojas	Etanol
		Raíz	Acetato de etilo
	Jatrogenona	Raíz	Etanol
2 $\alpha$ -OH-Jatrogenona 2 $\beta$ -OH-Jatrogenona 2 $\beta$ -OH-5,6- Isojatrogenona	Toda la planta	-	
Esteroides	-	Tallos y hojas	Etanol
		Hojas	-
Fenoles	-	Tallos y hojas	Etanol
		Látex	-
Fibras	-	Semillas	Éter de petróleo
			-
Fitotoxinas	-	Hojas	Agua
Flavonoides	Apigenina	Hojas	Etanol
	-	Tallos y hojas	-
	Ácido ferúlico	Raíces	Etanol
			Acetato de etilo

	2,3-bis-(hidroximetil)-6,7-metilenodioxi-1-(3'4'-dimetoxifenil)-naftaleno	Toda la planta	-
	Diidroprasantalina		
	Gadaína	Raíces, tallos y semillas	Éter de petróleo
		Toda la planta	-
	Gossypidieneo (Goss β ypidien)	Tallo	Hexano
	Gossipifana (Gossipifan)	Partes aéreas	Éter de petróleo
		Toda la planta	-
Isogadaína	Tallo	Éter de petróleo	
	Toda la planta	-	
Proteínas	Ciclo glossina A	Látex	Agua, etanol y acetato de etilo
			-
	Ciclo glossina B	Látex	-
		-	-
-	Semillas	Éter de petróleo	
Saponinas	-	Semillas	Éter de petróleo
			Etanol y butanol
			-
Taninos	-	Raíz y hojas	Etanol
		Hojas	Agua
		Tallos y hojas	Etanol
Triterpenoides	-	Hojas	Etanol
		Tallos y hojas	Etanol
		Hojas	-

### 3.2.2 Determinación del contenido de fenoles totales.

Los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. son superiores a los reportados en la bibliografía para otras especies de su misma familia (*Euphorbiaceae*) como por ejemplo: la *Euphorbia helioscopia* L. y la *Euphorbia hirta*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

L. obtenidos por lixiviación utilizando metanol como solvente y menores si se compara con *Alchornea calophylla* y la *Acalypha diversifolia* (tabla 3.6).

Tabla 3.6: Contenido total de compuestos fenólicos para especies de la familia *Euphorbiaceae* (70, 71).

Planta	Contenido de fenoles totales ( $\mu\text{gEAG/mgES}$ )
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	51,49 $\pm$ 4,02
<i>Euphorbia hirta</i> L.	120,97 $\pm$ 7,07
<i>Alchornea calophylla</i>	314,0 $\pm$ 0,01
<i>Acalypha diversifolia</i>	424,0 $\pm$ 0,03

Tabla 3.7: Contenido total de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Compuestos fenólicos	Extracto hidroalcohólico
Contenido Total ( $\mu\text{gEAG/mgES}$ )	140,41 $\pm$ 1,27

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

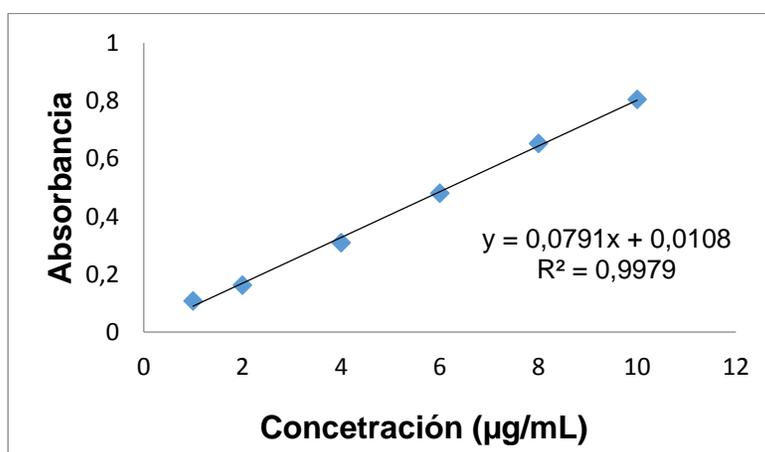


Figura 3.2 Curva de Calibración de ácido gálico, para la determinación del contenido de compuestos fenólicos por espectrofotometría visible.

### 3.2.3 Determinación del contenido de flavonoides totales.

Los flavonoides, constituyen unos de los compuestos fenólicos más importantes, al atribuírseles una gran diversidad de acciones farmacológicas.

Dentro de la composición química de la especie *Jatropha gossypifolia* L., los flavonoides constituyen unos de los metabolitos más importante a los cuales se le atribuyen una gran diversidad de actividades farmacológicas como por ejemplo propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y analgésicas (72).

Los resultados obtenidos para el contenido de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. son superiores a los reportados en la bibliografía para otras especies de su misma familia (*Euphorbiaceae*) como por ejemplo: la *Euphorbia helioscopia* L. (tabla 3.8).

Tabla 3.8 : Contenido de flavonoides totales para la *Euphorbia helioscopia* L. (73)

Planta	Contenido de flavonoides totales ( $\mu\text{gEQ/mgES}$ )
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	11,38 $\pm$ 0,04

El contenido total de flavonoides para el extracto hidroalcohólico fue calculado empleando la curva de calibración de la Quercetina (Figura 3.3).

Tabla 3.9: Contenido de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Flavonoides	Extracto hidroalcohólico
Contenido Total ( $\mu\text{gEQ/mgES}$ )	27,23 $\pm$ 0,16

Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de Quercetina por miligramos de extracto seco ( $\mu\text{gEQ/mgES}$ ) (tabla 3.9).

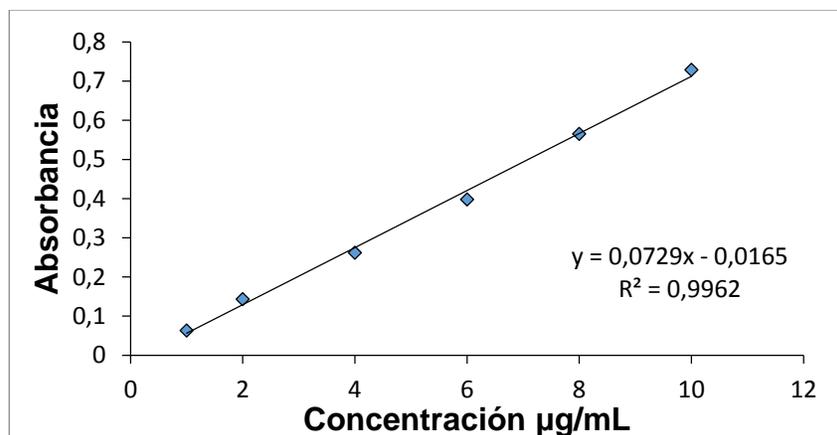


Figura 3.3: Curva de calibración de la Quercetina para la determinación de flavonoides totales por espectrofotometría visible.

Este valor permite reafirmar la presencia de los flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. comprobando los resultados obtenidos cualitativamente a través del tamizaje fitoquímico donde la presencia de ellos resultó ser acentuada.

Este resultado es de gran importancia en el análisis de la actividad biológica de los productos naturales, dada la gran variedad de investigaciones que se han reportado relacionando la presencia de estos compuestos y una determinada propiedad farmacológica de las anteriormente citadas (74).

### 3.3 Evaluación farmacológica del extracto hidroalcohólico de la *Jatropha gossypifolia* L.

#### 3.3.1 Ensayo de placa caliente.

En la tabla 3.10 se refieren los resultados obtenidos en el ensayo de placa caliente desarrollados para el extracto de *Jatropha gossypifolia* a dos niveles de dosis (100 y 200 mg/kg), el vehículo y la morfina como control.

En ambas dosis se aprecia un incremento en los tiempos de reacción, lo que se relaciona con el efecto analgésico.

Tabla 3.10: Resultados obtenidos en el ensayo de placa caliente (Tiempo antes y Tiempo después) para el extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg, el vehículo y la morfina a los 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. (n=5).

Grupo	Dosis (mg/kg)	T antes (segundos)	Tiempo (segundos)			
			30 min	60 min	90 min	120 min
Vehículo	-	8,00	9,06	8,88	9,00	9,00
Morfina	7,50	7,63	19,80	28,55	22,80	19,65
Extracto	100	7,89	12,18	16,28	17,34	14,98
Extracto	200	7,88	14,46	21,38	15,44	16,46

\* Los resultados representan la media de los valores obtenidos para cada tiempo.

El análisis estadístico a través del test de Mann Whitney muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos de dosis y los controles en el tiempo cero (T antes) (Sig.  $P > 0,05$ ) como se observa en la tabla 3.11.

Tabla 3.11: Resultados de la comparación con el test no paramétrico de Mann Whitney.

Grupo	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Vehículo	8,00 a	9,06 c	8,88 c	9,00 c	9,00 c
Morfina	7,63 a	19,80 a	28,55 a	22,80 b	19,65 b
Extracto 100 mg/Kg	7,89 a	12,18 b	16,28 b	17,34 a	14,98 a
Extracto 200 mg/Kg	7,88 a	14,46 b	21,38 ab	15,44 a	16,46 a

\*Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig.  $p < 0,05$  (Análisis Vertical)

A los 30 minutos se observa que el grupo con dosis de 100 mg/kg fue el de menor respuesta analgésica y el grupo con dosis de 200 mg/kg el de mayor respuesta, entre los grupos tratados con el extracto de *Jatropha gossypifolia* L. Globalmente el grupo tratado con morfina (control positivo) fue el de mayor porcentaje de analgesia como se aprecia en la tabla 3.12.

Tabla 3.12: Porcentaje de analgesia para el extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg, el vehículo y la morfina a los 30 min, 60 min, 90 min y 120 min.

Grupo	Analgesia (%)			
	30	60	90	120
Vehículo	13,25	11,00	12,50	12,50
Morfina	159,41	274,07	198,69	157,37
Extracto 100 mg/kg	54,37	106,34	119,77	89,86
Extracto 200 mg/kg	83,50	171,32	95,94	108,88

El análisis estadístico (tabla 3.11) revela que existen diferencias significativas entre los grupos de dosis y los controles a este tiempo (30 minutos) (Sig.  $p < 0,05$ ). Al comparar los grupos de dosis con el control positivo se aprecia que todos los grupos de dosis tienen porcentajes de analgesia inferiores a los de la morfina, y estos a su vez son superiores a los del grupo con el control negativo (vehículo). Entre los grupos de dosis no se observan diferencias significativas, pero se puede apreciar que a los 30 minutos todos ellos aumentaron significativamente sus respectivos porcentajes de analgesia con relación al inicio del experimento.

En la tabla 3.12 se observa el porcentaje de analgesia de los grupos de dosis junto con los controles positivo y negativo al cabo de los 60 minutos. Entre los grupos de dosis el grupo con dosis de 100 mg/kg fue el de menor porcentaje de analgesia y el grupo con dosis de 200 mg/kg el de mayor porcentaje de analgesia, globalmente el grupo con el control negativo (vehículo) fue el de menor porcentaje de analgesia y el control positivo el de mayor porcentaje de analgesia. EL test de Kruskal Wallis revela que existen diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles. (Sig.  $p < 0,05$ ) (Ver tabla 3.11).

Al comparar los grupos tratados con el control positivo se aprecia que todos estos tienen porcentajes de analgesia inferiores a los de la morfina, aunque las diferencias entre el grupo de mayor dosis y el de la morfina no llegan a ser significativas, los porcentajes de analgesia de los grupos tratados son superiores a los del grupo con el control negativo (vehículo). Entre las dosis evaluadas no se observan diferencias significativas, pero se puede decir que a los 60 minutos todos ellos aumentaron

significativamente sus respectivos porcentajes de analgesia a los 30 minutos, aunque las diferencias en el grupo de dosis de 100 mg/kg no llegan a ser significativas. También se observa que el grupo con el control negativo (vehículo) tiene un comportamiento distinto a los demás grupos en el experimento ya que es el único que disminuye significativamente su porcentaje de analgesia a los 30 minutos.

A los 90 minutos se observa entre los grupos tratados que el grupo con dosis de 100 mg/kg fue el de mayor porcentaje de analgesia a diferencia de otros tiempos y el grupo con dosis de 200 mg/kg el de menor. Globalmente el grupo con el control negativo (vehículo) fue el de menor porcentaje de analgesia. Al comparar los grupos tratados con diferentes dosis con el control positivo se puede apreciar que todos estos tienen porcentajes de analgesia diferentes a los de la morfina, es decir, las diferencias entre ellos son significativas. Sin embargo, los porcentajes de analgesia de los grupos de dosis son superiores a los del grupo con el control negativo (vehículo). Entre los grupos tratados no se observan diferencias significativas, pero se puede decir que a los 90 minutos el grupo de menor dosis aumenta su porcentaje de analgesia con relación a los 60 minutos aunque estas diferencias no llegan a ser significativas. Por otra parte, el grupo de mayor dosis disminuye su porcentaje de analgesia con relación a los 60 minutos. También se observa que el grupo con el control negativo (vehículo) aumenta significativamente su porcentaje de analgesia mientras que el grupo con la morfina disminuye significativamente su porcentaje de analgesia con relación a los 60 minutos, lo cual puede atribuirse a la farmacocinética del producto.

En la tabla 3.12 se observa el porcentaje de analgesia de los grupos tratados a diferentes dosis junto con los controles positivo y negativo al cabo de los 120 minutos. Entre los grupos de dosis el grupo con dosis de 100 mg/kg fue el de menor porcentaje de analgesia y el grupo con dosis de 200 mg/kg el de mayor porcentaje de analgesia. Globalmente el grupo con el control negativo (vehículo) fue el de menor porcentaje de analgesia y el grupo con dosis de 200 mg/kg el de mayor. El test de Kruskal Wallis revela que existen diferencias significativas entre los grupos de dosis y los controles (Sig.  $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los grupos tratados con el control positivo se aprecia que todos estos tienen porcentajes de analgesia superiores a los de la morfina, y estos a su vez son superiores a los del grupo con el control negativo (vehículo). Entre los niveles de dosis no se observan diferencias significativas, pero se puede decir que a los 120 minutos todos ellos tuvieron un comportamiento similar al de los 90 minutos, ya que las diferencias observadas no llegan a ser significativas. Los grupos controles sí cambian a los 120 minutos. El control negativo aumenta significativamente su porcentaje de analgesia mientras que el control positivo (morfina) disminuye significativamente su porcentaje de analgesia (Figuras 3.4- 3.7). La tabla 3.11 refleja esas diferencias con letras diferentes.

Con relación a la evolución de los grupos en el tiempo, todos ellos mostraron un cambio significativo a lo largo del tiempo, el test de Friedman arrojó resultados significativos en todos los grupos.

De forma general se aprecian valores de analgesia que superan el 50 % a partir de los 60 minutos del estudio a cada una de las dosis ensayadas. Este ensayo brinda información acerca de los efectos analgésicos vinculados al sistema nervioso central por lo que hipotéticamente podemos plantear que su mecanismo antinociceptivo involucra estructuras ubicadas a este nivel.



Figura 3.4 Tiempo de reacción (s) para el vehículo, morfina y extractos de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg a los 30 min.

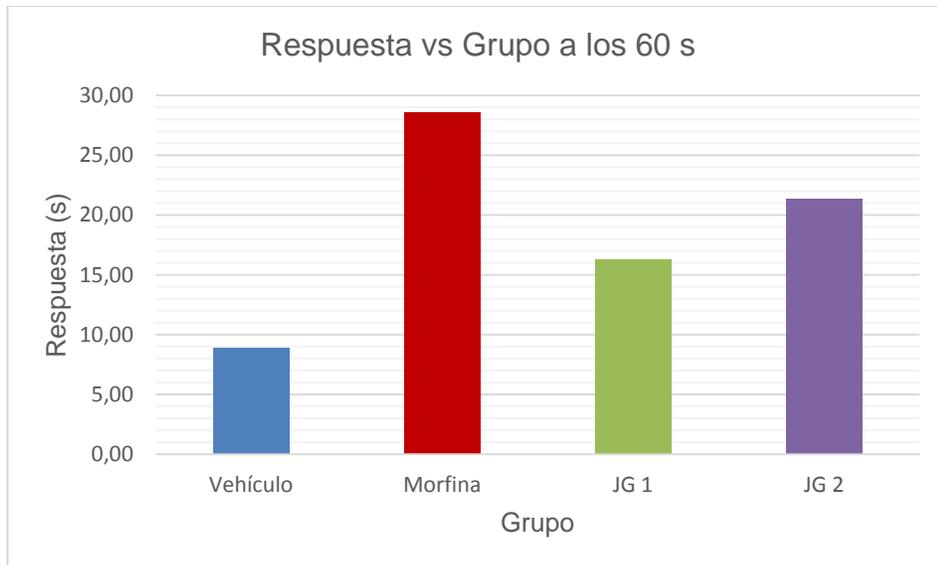


Figura 3.5 Tiempo de reacción (s) para el vehículo, morfina y extractos de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg a los 60 min.

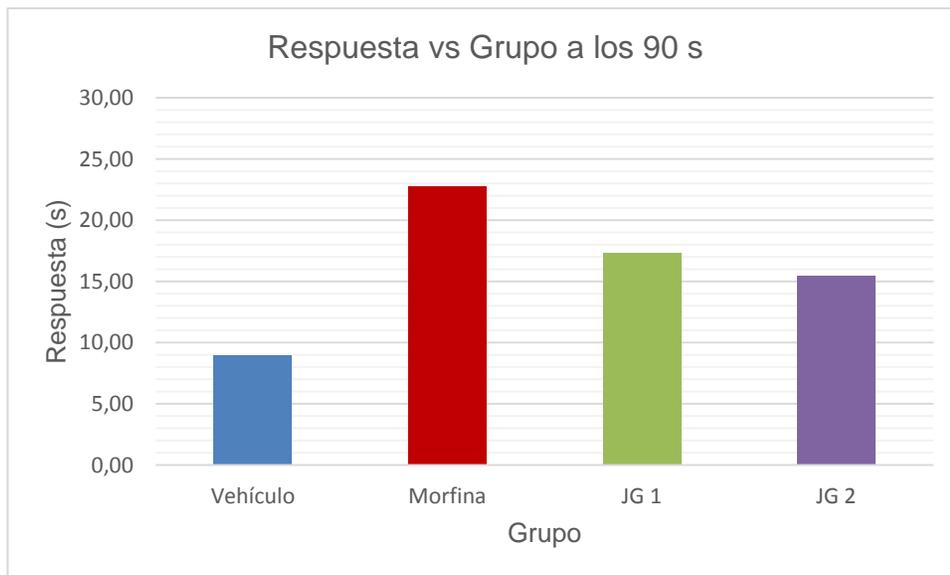


Figura 3.6 Tiempo de reacción (s) para el vehículo, morfina y extractos de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg a los 90 min.



Figura 3.7 Tiempo de reacción (s) para el vehículo, morfina y extractos de *Jatropha gossypifolia* L. a 100 y 200 mg/kg a los 120 min.

Esta actividad analgésica puede atribuirse a la presencia de flavonoides en el extracto. Varios flavonoides han sido reportados con actividad antiinflamatoria y analgésica (75-77).

Los flavonoides inhiben la enzima prostaglandin – sintetasa, más específicamente la endoperoxidasa y ello produce un efecto antiinflamatorio (78). Además las prostaglandinas están involucradas en la percepción del dolor, inhibiendo su síntesis, lo cual explica la actividad analgésica del extracto. Por tanto la presencia de flavonoides identificados previamente en este trabajo, puede justificar la actividad analgésica mostrada para el extracto hidroalcohólico (75, 79).

### 3.3.2 Ensayo de contorsiones inducidas por ácido acético.

El dolor y la inflamación están asociados con la fisiopatología de varias condiciones clínicas, como la artritis, el cáncer, entre otras, y se utiliza una gran cantidad de productos naturales en la medicina popular para tratar el alivio de síntomas del dolor (80, 81).

En este trabajo se estudió la actividad antinociceptiva de *Jatropha gossypifolia*, utilizando uno de los modelos clásicos experimentales *in vivo*: el test de contorsiones inducidas por ácido acético. En este se indujo un modelo de dolor agudo, por medio de la estimulación química, caracterizándose por la respuesta al estímulo en forma automática y en un desarrollo temporal breve (82). Se utilizó un modelo estandarizado de dolor visceral, localizando el estímulo doloroso en la cavidad peritoneal de los ratones, produciendo contorsiones. Estas están definidas como una distensión exagerada del abdomen combinada con el estiramiento de las patas traseras (83).

El test de contorsiones da una medida de la analgesia producida a nivel periférico usando como fármaco de referencia el ácido acetil salicílico (ASA). La administración intraperitoneal de una noxa química, como el ácido acético, en los ratones, induce una irritación peritoneal que produce contorsiones en el tronco y la extensión de las patas traseras (84). El bloqueo de esta respuesta inducida químicamente sirve como método para la evaluación de drogas con potencial acción analgésica. En la tabla 3.13 se muestran los resultados del ensayo y el porcentaje de inhibición en cada caso.

Tabla 3.13 Resultados del test de contorsiones por ácido acético para el vehículo, ASA y los extractos hidroalcohólicos de *Jatropha gossypifolia* L. a 100, 200 y 300 mg/kg respectivamente.

Grupo	Dosis (mg/kg)	No. Contorsiones $\pm$ DS	% Inhibición
<b>Vehículo</b>	-	24,8 $\pm$ 4,43	-
<b>ASA</b>	100	12,4 $\pm$ 1,81 a	50
<b>Extracto 100</b>	100	12 $\pm$ 5,74 a	51,61
<b>Extracto 200</b>	200	10,4 $\pm$ 3,91 a	58,06
<b>Extracto 300</b>	300	9,6 $\pm$ 7,36 a	61,29

a- diferencia significativa respecto al control negativo (agua destilada) ( $p < 0,05$ ). \* Los resultados representan la media de los valores obtenidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto fue ensayado a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg p.o. Los resultados revelaron que el extracto de *Jatropha gossypifolia* tiene actividad analgésica en las condiciones estudiadas (85).

En la tabla 3.13 se aprecia una reducción del número de contorsiones abdominales para todos los grupos excepto para el vehículo. El análisis estadístico arrojó que existen diferencias significativas entre este último y el resto de los grupos. No existen diferencias significativas entre cada una de las dosis de los extractos y entre estos y la ASA. Por lo tanto se aprecian buenos porcentos de inhibición para las diferentes dosis de extractos de *Jatropha gossypifolia* L. evaluados, comparables al control, como se aprecia en la Figura 3.8.

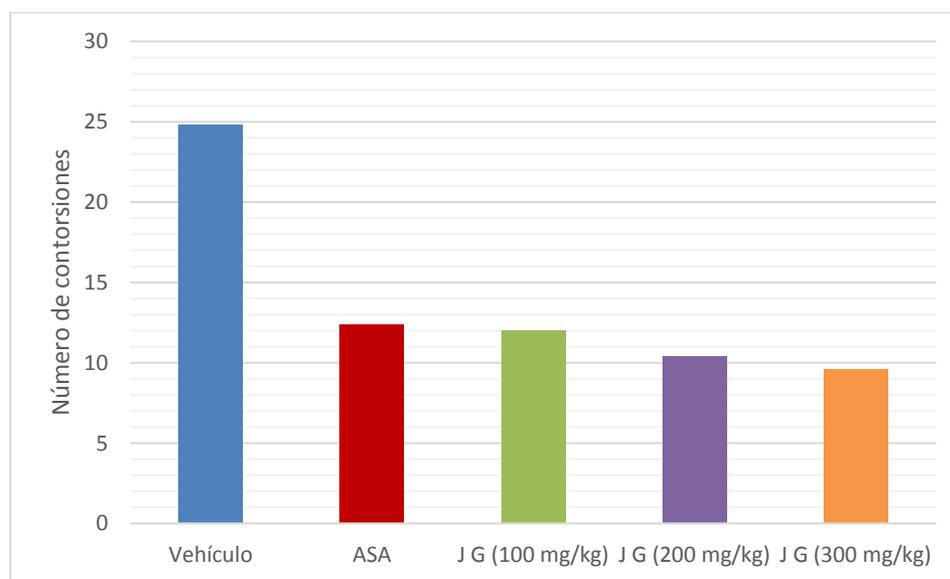


Figura 3.8 Número de contorsiones abdominales para el vehículo, ASA y extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a 100, 200 y 300 mg/kg durante 20 min. (n=5).

El extracto ensayado a dosis de 300 mg/kg p.o. obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (61,29 %) comparable a la aspirina o ácido acetilsalicílico, un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (AINE) con actividad antinociceptiva. En este modelo fue utilizada como fármaco de referencia en la concentración (100 mg/kg p.o.), y produjo aproximadamente un 50 % de inhibición de las contracciones inducidas químicamente (13). Se ha postulado que en dolores relacionados con procesos inflamatorios, las prostaglandinas, citoquinas y aminas simpaticomiméticos median

el estímulo nociceptivo y, en este modelo en particular, a través de receptores peritoneales locales (86). Por lo tanto, el efecto del extracto hidroalcohólico observado y descrito anteriormente, podría estar mediado por una acción periférica, que conduce a la reducción de la síntesis de prostaglandinas o puede interferir en el mecanismo de transducción de los nociceptores primarios aferentes involucrados en este modelo (87).

Estudios previos reportan actividad analgésica del extracto metanólico de los frutos de *Jatropha gossypifolia* evaluando el mismo a través del test de contorsiones por ácido acético (13).

Los resultados obtenidos son coincidentes con los reportados para el extracto metanólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* evaluados a dosis de 200 y 400 mg/kg con porcentos de inhibición de 67,56 y 65,14 % respectivamente (88).

Además varios reportes evidencian la presencia de fitoquímicos en extractos de *Jatropha gossypifolia* L. como: alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos (89, 90). El rol de estos metabolitos en la actividad analgésica ha sido evaluado por otros investigadores fundamentalmente los que involucran flavonoides y que justifican el uso de extractos de la *Jatropha gossypifolia* en la medicina tradicional. Otros investigadores plantean la necesidad de determinar el mecanismo a través del cual la planta muestra dicha actividad analgésica (88).

En nuestro estudio la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* fue evaluada a través de dos métodos: Placa caliente y contorsiones inducidas por ácido acético, mostrando un significativo efecto analgésico comparable a los controles empleados. Dicho efecto parece involucrar estructuras y mediadores químicos a nivel central y periférico.

### **3.4 Estudio de toxicidad dérmica aguda.**

En el estudio, al administrar una dosis única de 500 mg/kg de masa corporal del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. se observó que los 10 animales utilizados (5 machos y 5 hembras), presentaban una respuesta normal de los

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estímulos nociceptivos y no se visualizó muerte en los animales de experimentación. De forma general, los animales tratados con dosis de 500 mg/kg de peso no presentaron efectos tóxicos significativos, no existiendo mortalidad en el período de estudio. La variable utilizada como indicador de toxicidad fue la masa corporal, donde se aprecia que las ratas tuvieron un incremento durante los 14 días. En la tabla 3.14, se observa el comportamiento de las masas corporales de las ratas hembras y machos, durante los días que duró el ensayo, mostrándose un incremento de la masa corporal promedio ( $\Delta P$ ) por encima de los 90 g para los machos y de los 51 g para las hembras.

Esta dosis resulta superior a la dosis límite calculada en la evaluación toxicológica aguda por vía oral (300 mg/kg) (2).

Tabla 3.14: Relación de las masas corporales y su variación ( $\Delta P$ ) en las ratas machos y hembras tratadas con dosis de 500 mg/mL de extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Ratas	Masa corporal (g) - JG 500			$\Delta P$
	día 1	7 días	14 días	
1 M	191,3	276,6	298,4	107,1
2 M	216,2	249,3	290,6	74,4
3 M	186,6	244,9	279,3	92,7
4 M	179,3	243,2	276,1	96,8
5 M	193,9	242,7	276,6	82,7
<b>Media</b>	193,5	251,3	284,2	90,7
1 F	182,8	202,6	231,0	48,2
2 F	191,3	225,4	249,0	57,7
3 F	199,9	228,2	242,7	42,8
4 F	186,5	216,5	250,6	64,1
5 F	174,8	205,4	218,2	43,4
<b>Media</b>	187,1	215,6	238,3	51,2

Teniendo en cuenta lo anterior se evaluaron dos dosis inferiores: 250 y 100 mg/kg con una secuencia similar a la relatada anteriormente así como se evaluó un grupo

control que fue tratado con el vehículo (agua destilada). Los resultados de los valores de las masas corporales y su variación ( $\Delta P$ ) en las ratas machos y hembras tratadas a dosis de 100, 250 mg/mL y grupo control aparecen en las tablas 3.15, 3.16 y 3.17 respectivamente.

Tabla 3.15: Relación de las masas corporales y su variación ( $\Delta P$ ) en las ratas machos y hembras tratadas con dosis de 250 mg/mL del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Ratas	Masa Corporal (g) - JG 250			$\Delta P$
	día 1	7 días	14 días	
<b>1 M</b>	195,3	237,2	262,2	66,9
<b>2 M</b>	228,6	268,2	295,3	66,7
<b>3 M</b>	180,8	218,8	246,8	66,0
<b>4 M</b>	213,9	273,3	301,8	87,9
<b>5 M</b>	222,4	274,2	297,8	75,4
<b>Media</b>	208,2	254,3	280,8	72,6
<b>1 F</b>	219,3	236,8	251,8	32,5
<b>2 F</b>	181,9	215,2	228,0	46,1
<b>3 F</b>	209,3	232,9	257,8	48,5
<b>4 F</b>	176,2	213,8	227,5	51,3
<b>5 F</b>	200,8	223,3	233,5	32,7
<b>Media</b>	197,5	224,4	239,7	42,2

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.16: Relación de las masas corporales y su variación ( $\Delta P$ ) en las ratas machos y hembras tratadas con dosis de 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Ratas	Masa Corporal (g) - JG 100			$\Delta P$
	día 1	7 días	14 días	
1 M	191,3	227,2	258,3	67,0
2 M	220,3	254,8	282,6	62,3
3 M	193,5	227,9	262,5	69,0
4 M	210,4	242,5	279,4	69,0
5 M	220,8	251,6	284,7	63,9
Media	207,3	240,8	273,5	66,2
1 F	224,6	220,3	238,0	13,4
2 F	192,3	209,7	214,8	22,5
3 F	200,9	237,3	238,1	37,2
4 F	190,8	215,8	217,6	26,8
5 F	217,6	234,6	237,2	19,6
Media	205,2	223,5	229,1	23,9

Se observa para la dosis de 250 mg/kg un incremento de la masa corporal promedio ( $\Delta P$ ) por encima de los 72 g para los machos y de los 42 g para las hembras (tabla 3.15). En el caso de la dosis de 100 mg/kg se aprecia un incremento de la masa corporal promedio ( $\Delta P$ ) por encima de los 66 g para los machos y de los 23 g para las hembras (tabla 3.16).

Igualmente para las ratas tratadas con dosis de 250 y 100 mg/kg no existió mortalidad para los 14 días de ensayo. Todos los animales mostraron buen estado general y apariencia normal, ya que las mucosas se encontraban normocoloreadas y un comportamiento exploratorio normal. Tenían una respuesta adecuada ante los estímulos, uniformidad en la movilidad ante el toque y fuera de las jaulas.

Entre los animales del grupo control, tanto hembras como machos, no fueron observados indicios de toxicidad significativos. Los valores de  $\Delta P$  representan el

incremento de la masa corporal promedio que fue de 74 g para los machos y 45 g para las hembras (tabla 3.17).

Tabla 3.17: Relación de las masas corporales y su variación ( $\Delta P$ ) en las ratas machos y hembras tratadas con vehículo.

Ratas	Masa Corporal (g) - Control			$\Delta P$
	día 1	7 días	14 días	
1 M	208,3	247,2	273,5	65,2
2 M	198,8	258,6	288,5	89,7
3 M	213,8	258,2	285,1	71,3
4 M	199,2	239,9	279,6	80,4
5 M	252,8	286,0	320,9	68,1
<b>Media</b>	214,6	258,0	289,5	74,9
1 F	199,3	220,5	241,0	41,7
2 F	171,9	192,3	215,3	43,4
3 F	209,9	229,4	245,5	35,6
4 F	178,2	203,6	236,1	57,9
5 F	200,3	223,2	250,5	50,2
<b>Media</b>	191,9	213,8	237,7	45,8

En las figuras 3.9 y 3.10 aparece reflejado la variación de peso (media) para las ratas tratadas con extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a dosis de 500, 250 y 100 mg/kg y el control, machos y hembras respectivamente, no existiendo ninguna disminución en la masa corporal a ninguna de las dosis evaluadas en ambos sexos.

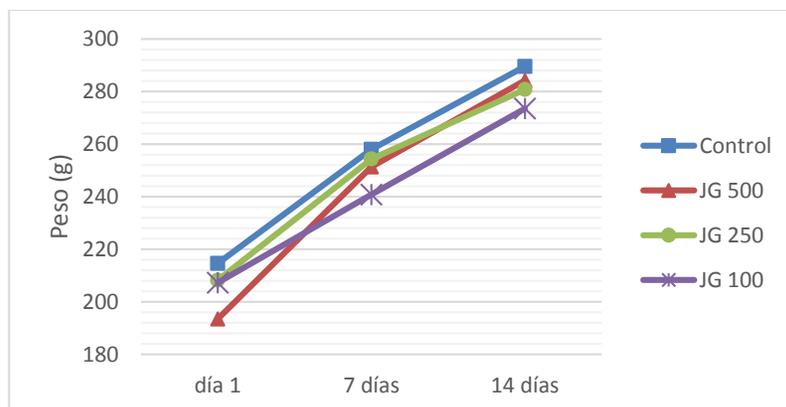


Figura 3.9: Variación de peso (media) para las ratas machos tratadas con extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a dosis de 500, 250 y 100 mg/kg y el control.

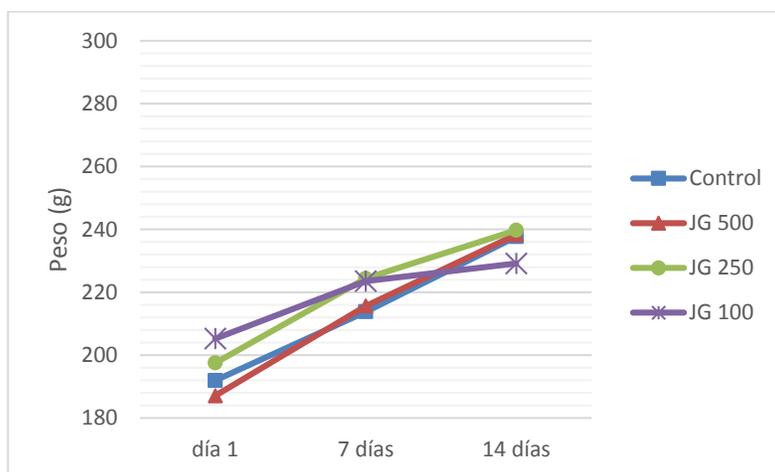


Figura 3.10: Variación de peso (media) para las ratas hembras tratadas con extracto de *Jatropha gossypifolia* L. a dosis de 500, 250 y 100 mg/kg y el control.

En ambos casos se observa un comportamiento similar con incrementos de la masa corporal como promedio de 76,1 g para los machos y 40,7 g para las hembras.

Otros investigadores han desarrollado estudios toxicológicos agudos del extracto etanólico de las hojas de la planta vía oral encontrándose una ligera toxicidad a dosis de 1,2 hasta 5 g/kg con pérdida de peso y escasa mortalidad (55, 91). Hasta el momento no se reportan estudios toxicológicos vía dérmica de la *Jatropha gossypifolia*, sin embargo estos estudios han sido empleados en otras especies vegetales con interés farmacológico (92).

En cuanto al análisis anatomopatológico de los órganos fundamentales (corazón, pulmón, hígado y riñón) no fueron observadas alteraciones orgánicas de importancia entre los animales que recibieron las tres dosis señaladas. Dosis mayores que las evaluadas fueron estudiadas (5 g/kg) para el extracto etanólico de las hojas de la planta evidenciando hepatotoxicidad y una potencial toxicidad pulmonar del producto (56).

El examen histopatológico de la piel tratada incluyó tanto a la epidermis como a la dermis superficial y profunda, incluyendo anejos cutáneos. En ninguno de los grupos se presentan signos de inflamación aguda ni crónica, ni edema ni cambios por hipersensibilidad. Se observan las mismas características histológicas en todos los grupos tratados que no evidencian histopatologías agudas ni crónicas. Las imágenes histológicas de cada uno de los grupos tratados aparecen en las figuras siguientes (Figura 3.11-3.14):

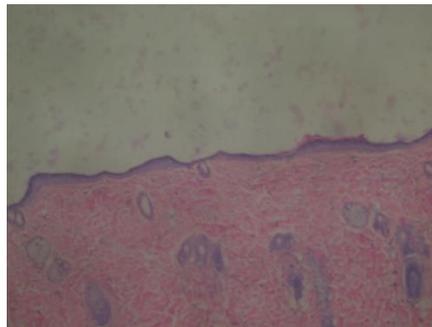


Figura 3.11: Imagen histológica de la piel tratada con una dosis de 500 mg/kg de extracto de *Jatropha gossypifolia* L.

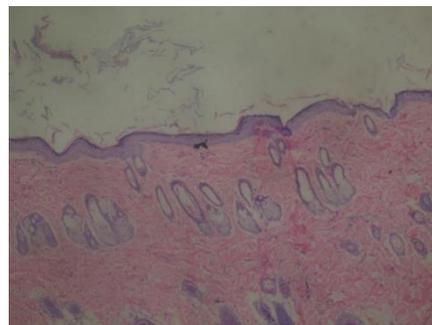


Figura 3.12: Imagen histológica de la piel tratada con una dosis de 250 mg/kg de *Jatropha gossypifolia* L.

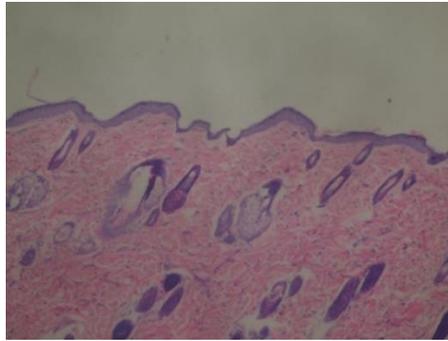


Figura 3.13: Imagen histológica de la piel tratada con una dosis de 100 mg/kg de *Jatropha gossypifolia* L.

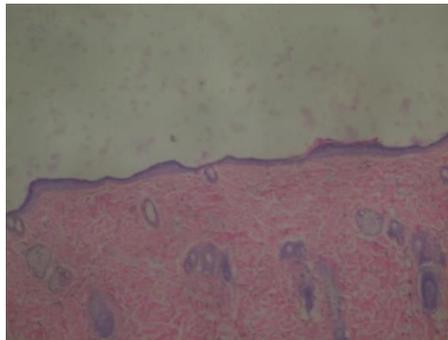


Figura 3.14: Imagen histológica de la piel tratada con el control (agua destilada).

Estos resultados indican una toxicidad aguda vía dérmica relativamente baja para el extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia*, considerando que una dosis relativamente alta (500 mg/kg) no causó alteraciones orgánicas significativas en ninguno de los sexos. Estos datos avalan el límite de seguridad del extracto en términos de toxicidad aguda por esta vía.

# *Conclusiones*



**CONCLUSIONES**

1. Las saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, aminoácidos libres, coumarinas, azúcares reductores y quinonas son los principales metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.
2. Los fenoles y flavonoides cuantificados en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. se relacionan con las actividades farmacológicas demostradas por la familia de la planta.
3. Se corroboró experimentalmente la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. a través de dos modelos “*in vivo*”: Placa Caliente y Contorsiones inducidas por ácido acético.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. no mostró toxicidad dérmica aguda a dosis inferiores a 500 mg/kg.

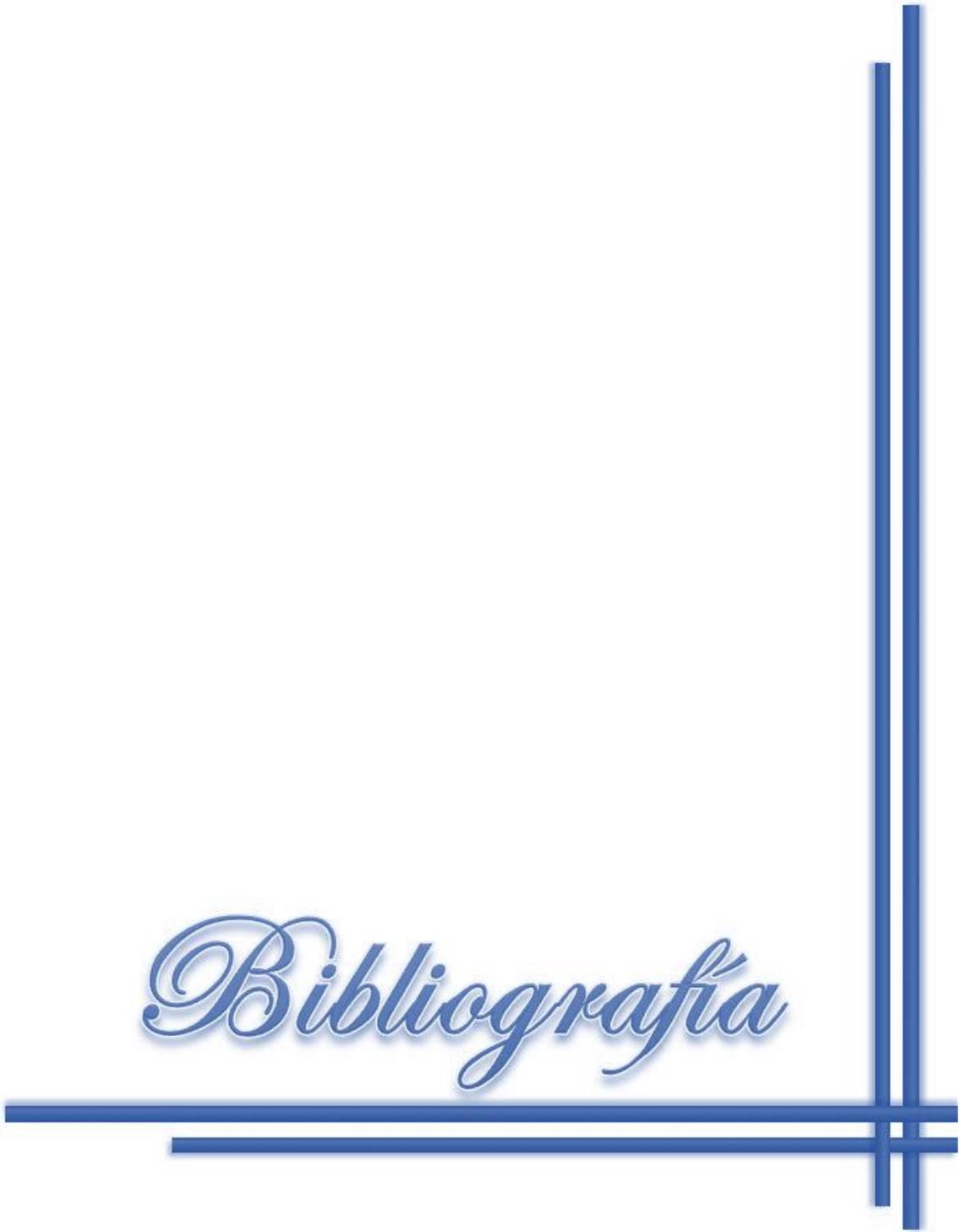
# *Recomendaciones*



**RECOMENDACIONES**

- Llevar a cabo un estudio biodirigido a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.
- Continuar el estudio toxicológico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* por un tiempo más prolongado.

# *Bibliografia*



### **BIBLIOGRAFÍA**

1. S. R, Renu S. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. Archives of Applied Science Research. 2010;2:285-91.
2. Rivero González D, Ortiz Fernández W. Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Jatropha gossypifolia* L. Santa Clara: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas; 2014.
3. Toro CO, Marrero PY, Casañola M, G., López SA, Castillo GJA. Identificación “*in silico*” y corroboración “*in vitro*” de nuevos compuestos con actividad analgésica.: Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas.; 2009.
4. Clark B. Drugs That Provide Pain Relief. Philadelphia: Kuhn MA; 1994. p. 334-97.
5. Jesús F. Farmacología humana. Sexta edición ed. Barcelona, España2014.
6. Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. Clinical Journal of Pain 2002 18:S3-S13.
7. C. A, E. C. Acción analgésica de los AINEs. Interés terapéutico en el dolor agudo y crónico. En acción analgésica periférica y central. 1994:37-61.
8. Torsti M. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. Pastos y Forrajes. 2008;31(3):17.
9. Gaskin. *Jatropha gossypifolia* L. 1994.
10. Roig MJT. Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. Científico-Técnica ed. La Habana.2012.
11. Mesa, cartographer Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. La Habana 1988
12. Félix-Silva J, Brandt GR, Silva-Jr AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa M. *Jatropha gossypifolia* L. (*Euphorbiaceae*): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014:32.
13. Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M, Jamaluddin AT. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. Journal of basic and clinical pharmacy. 2013;4(1):20.

14. Gbeassor M. Antimalarial effects of eight African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989;25:115-8.
15. Kumar VP. Search for antibacterial and antifungal gents from selected indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;107:182-8.
16. Awachie PIA, Ugwu FO. Preliminary investigation of the antimicrobial and Brine Shrimp lethality properties of some nigerian medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy*. 1997;35(5):338-43.
17. Nair R, Kalariya T, Chanda S. Antibacterial activity of some plant extracts used in folk medicine. . *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2007;7:191-201.
18. Dabur Rea. Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2007;4:313-8.
19. Taylor MDea. New antileukemic *Jatrophone* derivatives from *Jatropha gossypifolia*: structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society*. 1983;105:3177-83.
20. Kupchan SMea. Structure and stereochemistry of *Jatrophone*, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor. . *Journal of the American Chemical Society*. 1976;98:2295-300.
21. Macrae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of amazonian *Euphorbiaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;1:143-72.
22. Aquino JUea. Avaliação fitoterápica da *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006;21:61-6.
23. Abreu IC, Marinho AS, Paes MA, Freire MF, Olea SG, Borges OR, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of the ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. *Fitoterapia*. 2003;74(7):650-7.
24. Phowichit S, Buatippawan S, Bullangpoti V. Insecticidal activity of *Jatropha gossypifolia* L. (*Euphorbiaceae*) and *Cleome viscosa* L. (*Capparidaceae*) on *Podoptera litura* (*Lepidoptera: Noctuidae*). Toxicity and carboxylesterase and glutathione-S-transferase activities studies. *Communications in Agricultural and Applied Biological Science*. 2008;73(3):611-9.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

25. Abdul RAea. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. *Parasitology Research*. 2008;102:981-8.
26. Adesina SK. Studies on some plants used as anticonvulsants in amerindian and african tradicional medicine. *Fitoterapia*. 1982;53(1):147-62.
27. Clark BK. Drugs That Provide Pain Relief. In: Kuhn MA, editor. *Pharmacotherapeutics: A Nursing Process Approach 3ed*. Philadelphia: F. A. Davis Company; 1994. p. 334-97.
28. Bader P, Echte D, Fonteyne V, Livadas K, De Meerleer G, Paez A, et al. Guía clínica sobre el tratamiento del dolor. *European Association of Urology*. 2010:1179-288.
29. L. MEB. *Manual de Farmacoterapia. Síndromes dolorosos*. ELSEVIER 2005:18.
30. Donald D P. Sensory and Affective Dimensions of Pain. *Molecular Interventions*. 2002;2(6):393-402.
31. Rang H. P. DMM, Riter J. M., Flower R. J. . *Rang and Dale's Pharmacology*. Seven edition ed. Rio de Janeiro2007. 503-22 p.
32. Rang HP DM. Analgésicos. *Pharmacology*. 1991:706-31.
33. Gustein HB AH. Opioid Analgesics. *Goodman and Gidman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2005:547-90.
34. Besson JM CA. Peripheral and Spinal Mechanisms of Nociception. *Substances Causing Pain and itch Edward Arnold*. 1987:67-186.
35. Baños-Díez J, Navarro Acebes X. Aspectos actuales de la transmisión nociceptiva: mecanismos periféricos y modulación espinal. *Rev Neurol*. 1996;24:769-78.
36. Cheping SN, Antunez ME. Analgesicos, Antipireticos, AINE, Antigotosos y Agentes Modificadores de la enfermedad con Trastornos Reumatoideos. *Formulario Nacional de Medicamentos*. La Habana2003. p. 42-69.
37. EJ. DFM. Receptores Farmacologicos. *Farmacologia General La Habana: Ciencias Medicas*2002. p. 55-99.

38. E. R, Lengu D, H. L, Granara AS, L. Román SI. Actividad Analgésica. En: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. In: Cytel, editor. Manual de técnicas de investigación 1995.
39. Bowman WC, Rand MJ, West GB. Farmacología. In: Revolución, editor. La Habana. Cuba. 1996.
40. Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain*. 1996;67:179-88.
41. Koster R AM, De Beer J. Acetic acid for analgesic screening. . *Federal Procceeding*. 1959;18:412-7.
42. Fennessy MR, Lee JR. The assessment of and the problems involved in the experimental evaluation of narcotic analgesics, in *Methods in Narcotic Research*. Ehrenpreis S and Neidle A eds. 1975:73-99.
43. Daniel LB, Manuela G, Cadden SW. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53:597–652.
44. Villanueva GV. Interacción analgésica de paracetamol y nimesulida en dolor experimental térmico agudo. Santiago – Chile: UNIVERSIDAD DE CHILE; 2006.
45. Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther*. *Brit J Pharmacolo*. 1944;1(1):4-14.
46. Janssen PAJ, Niemegeers CJY, Dony GH. The inhibitory effect of phentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneim Forsch/Drug Res*. 1963;13:502-7.
47. Handwerker HO, Brune K. *Deutschsprachige Klassiker der Schmerzforshung—Classical German Contributions to Pain Research*. 1987.
48. Ochamendi ED. “Droga cruda. Métodos de ensayo”. *Normas Ramales de Salud Pública # 309* La Habana: Editorial Pueblo y Educación. 1992.
49. Miranda M, M., , Cuellar A. *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. Cuba. Ed Universidad de la Habana. 2000.
50. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7:1776–82.

## BIBLIOGRAFÍA

---

51. Netoa AG, Costaa JMLC, Belatia CC, Vinh´olisa AHC, Possebomc LS, Da Silva Filhob AA, et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;966:87-91.
52. Yaksh TL, Yeung JC, Rudy TA. Systematic examination in the rat of brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Research*. 1976.
53. Toxicidad aguda dérmica. Norma N° 402. de la OECD (OECD Guideline For Testing Of Chemical /Acute Dermal Toxicity), (1987).
54. Tamez RA. Estudios de toxicidad dérmica de la t-514 (peroxisomicina ao aislada del género *karwinskia* en conejos nueva zelandia: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON; 2001.
55. Rios MS. Estudio toxicológico pre-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.: UNIVERSIDAD FEDERAL DE PARAÍBA; 2007.
56. Mariz SR, Araújo MST, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, Diniz MFFM, et al. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008:213-6.
57. Mariz R. S, Cerqueira S. G, Duarte J. C. ea. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006:372-8.
58. Enríquez FA, Prieto VE, De los ríos ME, Ruiz RG. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo. *Rev Med Vallejana*. 2008;5(1):50-64.
59. Malpani DJ, Sarda BN. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of *Jatropha gossypifolia* L. *International Journal of Reseach in Ayurveda and Pharmacy*. 2010;2.
60. Essiett UA, Okoko AI. Comparative Nutritional and Phytochemical screening of the Leaves and Stems of *Acalypha fimbriata* Schum. & Thonn. and *Euphorbia hirta* Linn. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 2013;2(4):38-44.

61. Ahirrao RA, Patel MR, Pokal DM, Patil JK. Phitochemical screening of leaves of *Jatropha curcas* plant. intrnational Journal of Reseach in Ayurveda and Pharmacy. 2011;4:1324-7.
62. Sánchez Gregorio A. Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv. Santiago de Querétaro: UNVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO; 2012.
63. Farinola N, Piller, N. . Pharmacogenomics: Its Role in Re-establishing Coumarin as Treatment for Lymphedema. Lymphatic Research and Biology. 2005;3:81–6.
64. Lincoln T, Zeiger E. "Secondary Metabolites and Plant Defense". Fourth ed2006.
65. Vrijisen R, Everaert L, Boeté A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. Journal of General Virology. 1988:1749-51.
66. Jang M CL, Udeani GO. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 1997:218-21.
67. S. Martínez FJG, Gallego; J. M. Culebras. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición hospitalaria. 2002:271-8.
68. B. S, R. J. Onicocriptosis: (Uña encarnada). Revista Dermatología Venezolana. 1996;34 57–60.
69. Mariz SR, Borges ACR, Melo-Diniz MFF, Medeiros IA. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. Plantas medicinales Botánica. 2010;12:346-57.
70. Tovar RJ. Determinación de la actividad antioxidante por dpsh y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera [Grade]: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA; 2013.
71. Sanogo R.,Coulibaly K., Kone D.B. Minerals salt composition and secondary metabolites of *Euphorbia hirta* Linn., an antihyperglycemic plant. Pharmacognosy Research. 2015;7(1):7-13.
72. Varas PD. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile contécnica Hplc. Química - Farmacia: Austral de Chile; 2004.

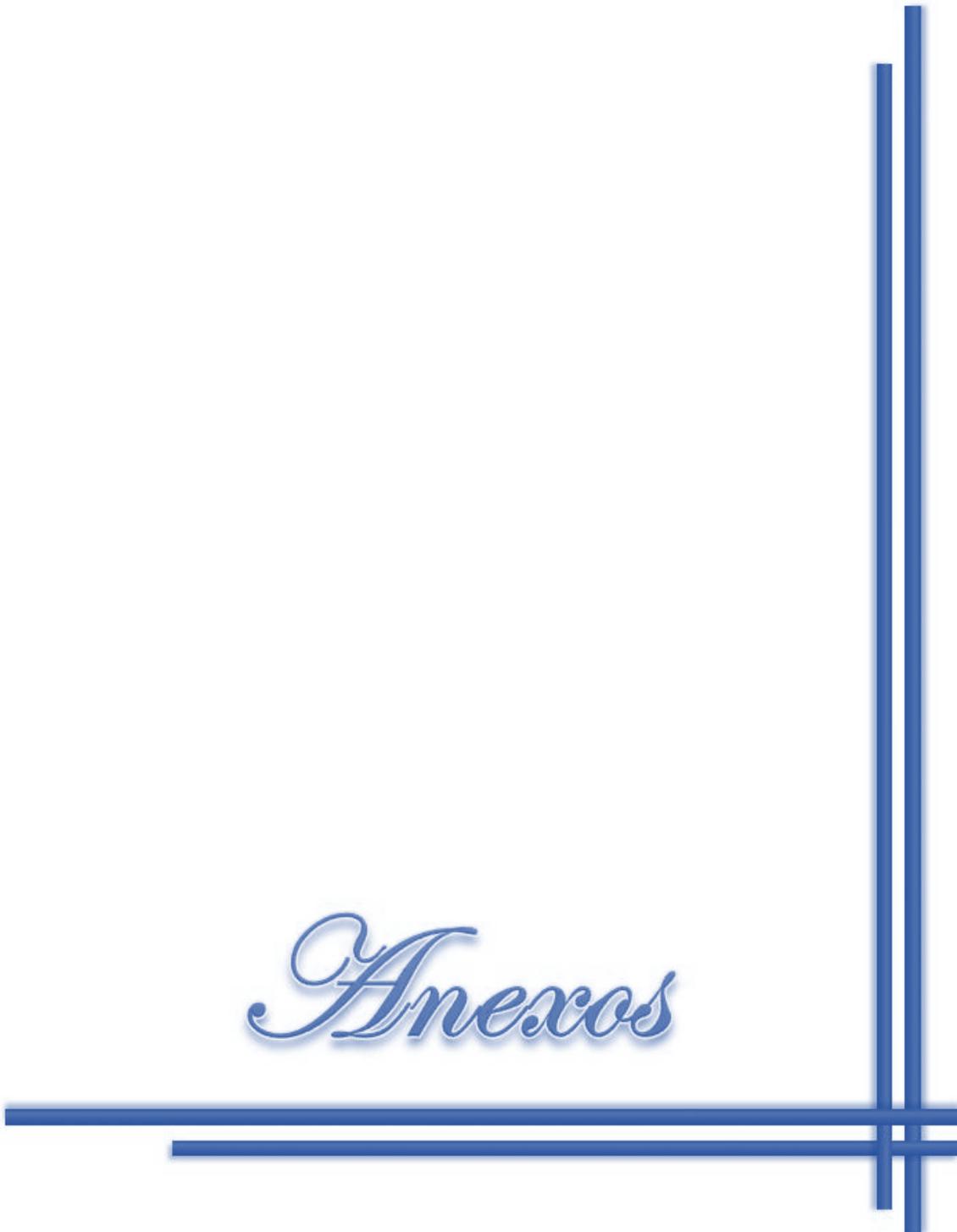
## **BIBLIOGRAFÍA**

---

73. Maoulainin LBM, Jelassi A, Hassen I. Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia*, (L.) Aerial parts". International Food Research Journal. 2012;19(3):1125-30.
74. Doroteo VH, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. Rev Soc Quím. 2013;79(1).
75. Panda BB, Kalpesh G, Kori ML, Tyagi LK, Nema RK, Sharma CS, et al. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. Global Journal of Pharmacology. 2009;3(1).
76. Hossinzadeh H, Ramezani M, Fedishei M, Mahmoudi M. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of zhumeria majdae extracts in mice and rats. Phytomedicine. 2002;9:135-41.
77. Ramaswamy S, Pillai NP, Gopalkrishnan V, Parmar NS, Ghosh MN. Analgesic effect of O-( -hydroxyethyl) rutoside in mice. Exp Biol. 1985;23:219.
78. Alcaraz MJ, Jimenez MI. Flavonoids as anti-inflammatory agents. Fitoterapia. 1988;59:25.
79. Gaur K, College G, Kheda M. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. Global Journal of Pharmacology 2009;3(1).
80. Ahmed S, Anuntiyo J, Malemud C, Haqqi T. "Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A review". Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2005;2(3):301-8.
81. Kaplan M, Mutlu E, Benson M, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. "Use of herbal preparations in the treatment of oxidantmediated inflammatory disorders". Complementary Therapies in Medicine. 2007;15(3):207-16.
82. Ortega A, Roca A, Micó JA. "Animal models of pain. A critical view". Soc Esp Dolor. 2002;2:447-53.
83. Reichert JA, Daughthers RS, Rivard R, Simone DA. "Peripheal and preemptive opioid antinoception in a mouse visceral pain model". Rev Soc Esp Dolor. 2002;9:423-31.

84. Al-Solabarry M, Alwashli A, Cherrah Y, Katim A. Analgesic activity of methanolic extract of *Jatropha unicostata* balf, as endemic plant in Yemen. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011;2(4):375-81.
85. Yusuf SO, Maxwell. IE. Analgesic Activity of the Methanolic Leaf Extract of *Jatropha curcas* (Linn). African J Biomedical Research. 2010;13:149-52.
86. Nguemfo E, Dimo T, Azebaze A, Asongalem E, Alaoui K, Dongmo A, et al. "Antiinflammatory and antinociceptive activities of the stem bark extracts from *Allanblackia monticola* STANER L.C. (Guttiferae)". Journal of Ethnopharmacology. 2007;114(3):417-24.
87. Marrassini C, Acevedo C, Miño J, Ferraro G, Gorzalczany S. "Evaluation of antinociceptive, antinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L.". Phytotherapy Research Rev Dominguezia. 2010;26(1).
88. Apu AS, Ireem K, Bhuyan SH, al. e. "Evaluation of analgesic, neuropharmacological and anti-diarrheal potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.) leaves in mice,". Journal of Medical Sciences. 2012;12(8):274-9.
89. Oduola T, Adeosun GO, Oduola AT, Avwioro GO, Oyeniyi MA. Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stems latex as a haemostatic agent. Eur J Gen Med. 2005;3:140-3.
90. Khumrungsee N, Bullangpoti V, Pluempanupat W. Efficiency of *Jatropha gossypifolia* L.(*Euphorbiaceae*) against *Spodoptera exigua* Hübner (*Lepidoptera: Noctuidae*): Toxicity and its detoxifying enzyme activities. . ScienceOpen Research. 2009;37:50-5.
91. Mariz RM, Cerqueira GS, Washington CA, Duarte CJ, al. e. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2006;16(3):372-8.
92. Beiro O, García G, Carballo O, Ramírez Y, Valdivieso A, Dios LA. Estudio de toxicidad dérmica aguda de HeberNem en ratas. Biotecnología Aplicada. 2006;23:40-2.

# *Anexos*



## ANEXOS

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

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

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

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

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

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

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

✓ **Ensayo de Cloruro férrico:** Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Si el extracto de la planta es etanólico, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto etanólico, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos; a una alícuota del mismo se le añade acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de la solución reactiva.

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

✓ **Ensayo de Borntrager:** Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de NaOH, KOH o NH<sub>4</sub>OH al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

**Positivo:** Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo (+), coloración rosada (++) y coloración roja (+++).

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

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

✓ **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Si la alícuota está disuelta en un solvente orgánico este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de HCl (1%). Si por el contrario el extracto es acuoso a la alícuota de ensayo se le añade una gota de ácido clorhídrico concentrado, se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. A ambas soluciones acuosas ácidas se le añaden 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Certificado de calidad de los ratones empleados en el estudio de la actividad analgésica.

**GC.CC.09.13** Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **CENPALAB**  
 Folio: **0080** 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	
Ratón	-	-	-	Cenp:OF1	14007816	2	
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
40	40	80	16-18g	4-5 Sem	F.C.M. Uila Claro	07/04/16	9:00AM

**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 fórmulas **ALYco**® EMO 1002 y EAO 1004 esterilizables a razón de 3.40 a 6 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.

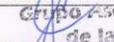
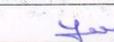
Resultados de Bacteriología *											
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Salmonella sp.	Cult/ Sert		X		26/01/16	Streptococcus pneumoniae	Cult/ Serot		X		26/01/16
Streptococcus β hemolítico	Cult/ Sert		X		26/01/16	Pasteurella pneumotropica.	Cult/ ELISA		X		26/01/16
Bordetella bronchiseptica	Cult/ ELISA		X		26/01/16	Clostridium piliformis	Insp. Clínica		X		26/01/16
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		26/01/16	Leptospira sp	ELISA		X		21/05/15
Helicobacter sp	Cultivo		X		26/01/16	Cytrobacter freundii	Cultivo		X		26/01/16
Streptobacillus moniliformis	Cultivo			X	-	Mycoplasma pulmonis	Cult/ ELISA		X		19/10/15
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		26/01/16						

Resultados de Parasitología *				Resultados de Patología *							
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Endoparásitos	DIR/FLOT		X		20/01/16	Fecha: 20/01/16					
Toxoplasma gondii	ELISA		X		28/07/15	Examen macroscópico:					
Ectoparásitos	INSPECCIÓN		X		20/01/16	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.					

Resultados de Virlogía * (Serología)											
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA		X		07/10/15	Coriomeningitis inf. (LCM)	ELISA/IFA		X		07/10/15
Reovirus Reo Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		07/10/15	Sindai	ELISA/IFA		X		07/10/15
Encefalomielititis (TEMV)	IFA		X		07/10/15	Polyoma	IFA		X		07/10/15
Pneumonia del ratón (PVM)	ELISA/IFA		X		07/10/15	Adenovirus (MAD)	ELISA/IFA		X		07/10/15
Virus diminuto del ratón (MVM)	ELISA/IFA		X		07/10/15	Citomegalovirus (MCMV)	IFA		X		07/10/15
Rotavirus (EDIM)	ELISA/IFA		X		07/10/15	Deshidrogenada Láctica (LDH)	Test LDH Plasma			X	-
Ectromelia	ELISA/IFA		X		07/10/15	Virus K	IFA		X		07/10/15
Hantaan	IFA			X	-	Virus Timico (MTV)	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 **ABRIL /2016** hasta **JUNIO /2016**

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

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

## 3. Certificado del alimento concentrado EMO 1002 en forma de pellet.

FP.CA.01.14 **Dirección de Alimentación y Nutrición**  
**Grupo de Producción de Alimentos Concentrados**

0566

**CERTIFICADO DE AUTORIZO DE ALIMENTO CONCENTRADO**

Fórmula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación	
CMO 1000	II	1322016	22/03/2016	Pellet Ø 16 mm	
<b>Especificaciones para su uso.</b>					
Dieta completa para el mantenimiento de ratas y ratones. Todo propósito. No esterilizable. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 60 días a partir de la fecha de fabricación.					
<b>Componentes</b>					
Maiz, Trigo, Cebada, Soya, Azucar, Fosfato dicálcico, Carbonato de calcio, Sal común, Premezcla de Vitaminas y Minerales y Biotronic.					
<b>Análisis calculado *</b>					
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%	16.00	Calcio	%	0.39
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g	2.80	Fósforo	%	0.49
Fibra bruta (Máx.)	%	3.40	Relación Calcio/ Fósforo	%	0.79
Grasa bruta (Min.)	%	1.50			
* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.			Realizado por:	Cargo Dirección de Producción	Firma
			Revisado por:	Cargo Distribuidor	Firma

FP.CA.01.14 **Dirección de Alimentación y Nutrición**  
**Grupo de Producción de Alimentos Concentrados**

**CERTIFICADO DE AUTORIZO DE ALIMENTO CONCENTRADO**

Fórmula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación	
<b>Especificaciones para su uso.</b>					
<b>Componentes</b>					
<b>Análisis calculado *</b>					
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%		Calcio	%	
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g		Fósforo	%	
Fibra bruta (Máx.)	%		Relación Calcio/ Fósforo	%	
Grasa bruta (Min.)	%				
* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.			Realizado por:	Cargo Dirección de Producción	Firma
			Revisado por:	Cargo Distribuidor	Firma

4. Certificado de calidad de las ratas empleadas en el estudio de Toxicidad Dérmica Aguda.

**GC.CC.10.13** Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **CENPALAB**  
 Folio: 0035 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				Cenp:SD	14003514	4					
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora				
15	15	30	125-150g	6-8 sm	J. Q. R. U. I. C. E. L. C.	7/04/16	8:50				
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 <b>ALYco</b> ® 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		08/02/16	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cult/ Serot		X		08/02/16
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Cultivo			X	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Cult/ELISA		X		08/02/16
<i>Streptococcus β hemolítico</i>	Cult/ Serot		X		08/02/16	<i>Clostridium piliformis</i>	Insp. Clínica		X		08/02/16
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Cult/ ELISA		X		08/02/16	<i>Leptospira</i> sp.	ELISA/ Micg		X		21/05/15
<i>Helicobacter</i> sp	Cultivo		X		08/02/16	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	Cult/ELISA		X		19/10/15
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Cult/ ELISA		X		08/02/16	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Cult/ELISA		X		19/10/15
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		08/02/16						
Resultados de Parasitología *						Resultados de Patología *					
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha	Fecha: 03/02/16 Examen macroscópico: No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas.					
Endoparásitos	DIR/ FLOT		X		03/02/16						
<i>Toxoplasma gondii</i>	ELISA		X		14/07/15						
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	Sedimentación		X		03/02/16						
Ectoparásitos	Insp. Clínica		X		03/02/16						
Resultados de Virología * (Serología)											
Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test	Fecha
<i>Virus Sialodacryadentis/ Virus corona</i> (SDA/RCV)	IFA		X		19/10/15	<i>Coriomeningitis linfocitaria</i> (LCM)	IFA		X		19/10/15
<i>Virus Pneumonia</i> (PVM)	IFA		X		19/10/15	<i>Virus Sendai</i>	ELISA/IFA		X		19/10/15
<i>Virus Encefalomielitidis Theiler</i> (TMEV)	IFA		X		19/10/15	<i>Reovirus Tipo 3</i> (REO 3)	IFA		X		19/10/15
<i>Virus Toxigeno</i> (H-1)	IFA		X		19/10/15	<i>Virus Kilham</i> (KRV)	IFA		X		19/10/15
						<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 <u>ABRIL /2016</u> hasta <u>JUNIO /2016</u>											
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 Aseguramiento de la Calidad			Aprobado por			Revisado por			Distribuidor	
Firma	