



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

EVALUACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES  
MEDICINALES DE *Jatropha neopauciflora* Pax.

T E S I S   P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

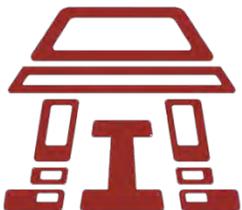
JOSÉ MANUEL OLIVARES SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

Los Reyes Iztacala 2016

Tlalnepantla, Estado de México





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Reconocimiento**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde

M. en Q. Luis Barbo Hernández Portilla

M. en C. Ana Bertha Hernández Hernández

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de los proyectos:

UNAM – PAPIIT IN 211614 y IN 213713



*“No nos hacemos sabios por recordar nuestro pasado, sino por tomar responsabilidad de nuestro futuro”*

**- George Bernard Shaw -**



*“... La ciencia y la religión son dos lenguas que cuentan una misma historias...”*

**- Anónimo -**

## **Agradecimientos y dedicatorias**

*Doy gracias a Dios por las bendiciones y el tiempo que me ha dado, por permitirme llegar hasta este punto de mi vida.-*

*A mis padres, Humberto Olivares Rosas y Lorena Sánchez Cástulo, gracias por el enorme esfuerzo y sacrificios que han hecho para que juntos pudiéramos llegar hasta aquí, por el apoyo que me dan día con día y por las lecciones más valiosas que he podido recibir.*

*A María Luisa Sánchez Cástulo, mi mamá Luisita, gracias por estar siempre al pendiente de mí, por tu atención, cariño, cuidados y por toda la ayuda que nos has dado.*

*A mi hermano Humberto, siempre has sido para mí un ejemplo de valor. Gracias.*

*A mi amiga Lorena Flores por todos los momentos que pasamos y los recuerdos que tenemos, gracias por motivarme y por ser una verdadera amiga a pesar del tiempo.*

*A mis amigos Emmanuel Nava y Alicia Castro, porque juntos hemos sufrido, reído, aprendido y crecido en el camino para alcanzar nuestras metas.*

*A la Dra. Margarita Canales por enseñarme, motivarme, y ayudarme a ser mejor persona. ¡Gracias!*

*Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez, gracias por su ayuda, tiempo, cocimiento, consejos y por los buenos momentos con todo el equipo de trabajo del laboratorio.*

*Al M. en C. Oscar Nieto por su valiosa ayuda, asesoría, amistad y por su buen humor que hizo más amenas las tardes de trabajo.*

*A RBK, Ana, Javier y Michael, que me ayudaron a familiarizarme con el laboratorio y hacerme sentir parte de él.*

*A Nelly, Ruben, Judith, gracias por el tiempo que se tomaron para enseñarnos las técnicas y tips; a Dany, Pily, Fany, Gus y Mario, por ayudarme en los momentos adecuados.*

*A los miembros del equipo de los laboratorios de Farmacognosia e Inmunobiología, por sus consejos, recomendaciones, ayuda y buenos momentos dentro y fuera de los laboratorios.*

*-En memoria de los pequeños animales que con sus vidas contribuyen al desarrollo de la ciencia-*

## **Índice General**

Índice de figuras y cuadros .....	iii
Resumen.....	1
Introducción .....	3
Antecedentes .....	8
Justificación .....	11
Planteamiento del problema .....	11
Hipótesis .....	11
Objetivos .....	12
Material y Métodos.....	13
Colecta de Material.....	13
Actividad Antiinflamatoria.....	13
Capacidad Antioxidante .....	14
Cuantificación de Fenoles Totales.....	14
Contenido de Flavonoides .....	15
Cuantificación de Proteínas.....	15
Contenido de Carbohidratos .....	16
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	17
Toxicidad General.....	17
Actividad Antibacteriana.....	18
Presencia de Saponinas y Alcaloides.....	18
Resultados .....	19
Actividad Antiinflamatoria.....	19
Capacidad Antioxidante .....	24
Cuantificación de Fenoles Totales.....	24
Contenido de Flavonoides .....	24
Cuantificación de Proteínas .....	24
Contenido de Carbohidratos.....	25
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	26

Toxicidad General.....	28
Actividad Antibacteriana. ....	29
Presencia de Saponinas y Alcaloides.....	29
Discusión .....	30
Conclusiones .....	38
----- Apéndices ----- .....	39
Apéndice 1. Inflamación.....	39
Apéndice 2. Medicamentos Antiinflamatorios .....	43
Apéndice 3. <i>Jatropha neopauciflora</i> . ....	45
Apéndice 4. Zona de Colecta.....	47
Apéndice 5. Edema Plantar Inducido por Carragenina.....	50
Apéndice 6. Capacidad Antioxidante (Okusa et al., 2007).....	51
Apéndice 7. Cuantificación de Fenoles Totales (Método modificado de Singleton et al., 1999).....	54
Apéndice 8. Contenido de Flavonoides (Ramamoorthy y Bono, 2007). ....	56
Apéndice 9. Cuantificación de Proteínas (microtécnica de Bradford).....	59
Apéndice 10. Extracción de Carbohidratos (González y Peñalosa 2000).....	61
Apéndice 11. Carbohidratos Totales (método de Antrona).....	61
Apéndice 12. Carbohidratos Reductores (Método de Nelson-Somogyi). (González y Peñalosa 2000).....	63
Apéndice 13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución .....	65
Apéndice 14. Toxicidad General.....	66
Apéndice 15. <i>Actividad Antibacteriana (Beer y Sherwood, 1945)</i> .....	68
Apéndice 16. <i>Detección de saponinas</i> .....	69
Apéndice 17. <i>Detección de alcaloides</i> . ....	69
Literatura Citada.....	71

## Índice de figuras y cuadros

### FIGURAS

Figura 1. Efecto del látex de <i>J. neopauciflora</i> administrado de forma tópica sobre el edema plantar.....	19
Figura 2. Efecto del látex de <i>J. neopauciflora</i> administrado por vía oral sobre el edema plantar.....	20
Figura 3. Efecto del látex de <i>J. neopauciflora</i> con administración de doble dosis vía oral sobre el edema plantar. ....	21
Figura 4. Comparación del efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de látex administradas de forma oral.....	22
Figura 5. Comparación del efecto antiinflamatorio de los tratamientos tópicos.....	22
Figura 6. Comparación del efecto antiinflamatorio del látex con una dosis doble.....	23
Figura 7. Cromatograma del látex con tiempos de retención de los compuestos.....	26
Figura 8. Cromatograma del látex comparado con los estándares de carbohidratos .....	27
Figura 9. Principales manifestaciones locales de la inflamación aguda.....	40
Figura 10. Generación de metabolitos del ácido araquidónico.....	42
Figura 11. <i>Jatropha neopauciflora</i> .....	45
Figura 12. Flor de <i>J. neopauciflora</i> .....	45
Figura 13 Ubicación geográfica de San Rafael Coxcatlán.....	47
Figura 14. Capacidad antioxidante del látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	53
Figura 15. Curva patrón de ácido gálico, determinación de la concentración de fenoles totales en el látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	55
Figura 16 Curva patrón de quercetina determinación de la concentración de flavonoides en el látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	58
Figura 17. Determinación del contenido de proteínas en el látex de <i>J. neopauciflora</i> en la curva patrón de albúmina.....	60
Figura 18. Determinación de la concentración de carbohidratos totales en el látex de <i>J. neopauciflora</i> en la curva patrón de glucosa.....	62
Figura 19. Determinación de la concentración de carbohidratos reductores en el látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	64
Figura 20. Determinación de la concentración letal media (CL50) del ácido gálico .....	66
Figura 21. Determinación de la concentración letal media (CL50) del látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	67

**CUADROS**

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de inflamación de cada tratamiento del látex de <i>J. neopauciflora</i> sobre el edema plantar .....	20
Cuadro 2. Comparación del efecto antiinflamatorio de los tratamientos utilizados.....	23
Cuadro 3. Resumen del análisis fitoquímico del látex de <i>J. neopauciflora</i> .....	25
Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> en interacción con látex y ácido gálico.....	28
Cuadro 5. Clasificación de toxicidad de acuerdo con el CYTED (1995) .....	28
Cuadro 6. Tamaño en mm de los halos de inhibición presentados en el control positivo y el látex.....	29

## **Resumen**

Desde la antigüedad las plantas han sido fuente de innumerables recursos para el hombre, desde material de construcción hasta alimento y medicamentos; es por esto que muchas especies vegetales fueron valiosos recursos para la medicina tradicional de todas las culturas y hoy en día siguen siendo utilizadas.

Muchas plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae han sido estudiadas, pues se les atribuyen múltiples efectos curativos, entre ellos actividad analgésica, antifúngica, antibacteriana y antiinflamatoria. Por lo cual en el presente trabajo se llevaron a cabo diversas pruebas para evaluar las propiedades del látex de *J. neopauciflora*, planta que es reportada con uso etnomedicinal en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, principalmente por su actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antifúngica. Se realizó el análisis de la capacidad antiinflamatoria por el método de edema plantar inducido por carragenina en rata, se realizó la cuantificación de fenoles totales y flavonoides, se determinó la capacidad antioxidante, así como el contenido de proteínas, carbohidratos totales y carbohidratos reductores, también se determinó la toxicidad general y se realizó la identificación de compuestos mediante HPLC, se determinó la presencia de saponinas, alcaloides y se observó de forma cualitativa la actividad antibacteriana.

El látex de *J. neopauciflora* presentó un efecto antiinflamatorio en los cuatro tratamientos empleados, tres concentraciones administradas vía oral (250, 500 y 750 mg/kg de Peso Corporal (PC)) y una tópica (100%), observando una relación dosis-dependiente en la administración por vía oral, siendo la concentración de 750 mg/kg de PC la concentración más efectiva. En la cuantificación de fenoles totales el contenido en el látex fue de 11.5 mg EqAG/mL, lo que representa el 1.15% del látex. En cuanto al contenido de flavonoides se encontró un total de 1.55 mg EqQ/mL, que representan el 0.15% del látex. La capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) mostrada en el ensayo de reducción de DPPH fue de 111.92  $\mu$ g/mL, el contenido de proteínas fue de 10.71 mg/mL y en la cuantificación de carbohidratos se encontraron 8.56 mg/ml y 6.5 mg/mL para carbohidratos totales y carbohidratos reductores respectivamente, mientras que la concentración letal

media (CL<sub>50</sub>) fue de 608.82 µg/mL, clasificando el látex como ligeramente tóxico según el CYTED, en los resultados de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los principales compuestos identificados fueron catequina, glucosa e inulina, se encontraron saponinas y alcaloides y actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Con los resultados presentados este trabajo quedan demostradas las propiedades medicinales del látex de *J. neopauciflora*, en especial su capacidad antiinflamatoria y antioxidante, así como su actividad antibacteriana. Lo cual justifica de manera científica su uso dentro de la medicina tradicional.

## **Introducción**

Desde la antigüedad las plantas han sido recursos importantes para el hombre en diversos aspectos, pues no sólo las ha empleado como alimento, sino que en cada etapa de la historia les ha dado un uso diferente y más sofisticado, así en la prehistoria apareció la paja de las chozas y a partir de entonces muchos otros usos les han sido encontrados, desde la utilización de fibras vegetales para la elaboración de cuerdas y tela, hasta el uso de pigmentos como pinturas naturales, aunado a una gran cantidad de plantas con actividades medicinales es como los vegetales se convirtieron en fuente de comida, ropa, cobijo, materiales de construcción y medicamentos, recursos útiles para el desarrollo de la humanidad (Bequette, 1997).

Debido al potencial medicinal que las plantas poseen, su utilización para curar y tratar numerosas enfermedades ha sido una costumbre de la humanidad que se remonta a miles de años, incluso desde antes de la aparición de las grandes civilizaciones, dicha costumbre surgió a partir del conocimiento que nuestros ancestros acumularon a través de la observación e imitación de distintas conductas animales, así como la ingesta accidental o voluntaria de algunas especies vegetales (Cruz, 2007). Médica e históricamente las plantas medicinales tienen una gran importancia, pues durante mucho tiempo los remedios naturales fueron el principal y en ocasiones el único recurso con el que las comunidades contaban para tratar las enfermedades, es de este modo que todas las culturas en el mundo las han usado como base de su propia medicina (Quesada, 2008).

La medicina tradicional representa el conocimiento ancestral que las comunidades poseen sobre la naturaleza y que surgió por los descubrimientos de algunos individuos a partir de experiencias propias, por medio de la experimentación y repetición de sus principios y que son transmitidos generación tras generación, dentro de estos conocimientos encontramos el uso de las plantas medicinales para el cuidado de la salud (Fagetti, 2004).

Desde hace algunos años para la ciencia, la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino, como una actividad relevante, ya que las plantas medicinales son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, en la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten con diferentes mecanismos de acción (Ramírez, 2012).

Científicamente se ha demostrado que las plantas medicinales pueden presentar una gran variedad de compuestos y efectos farmacológicos, entre los que se incluyen efectos vasodilatadores, antimicrobianos, anticonvulsivos, sedantes, antipiréticos, antiinflamatorios, etc. Aproximadamente el 40% de los medicamentos actuales derivan de plantas medicinales y otros productos naturales empleados tradicionalmente en el cuidado de la salud (Dimayuga, 2010).

Para que un ser vivo se mantenga saludable, resulta indispensable tener la capacidad de librarse de restos necróticos o lesionados, organismos patógenos e invasores extraños como pueden ser los microbios. La respuesta de un organismo enfocada a conseguir tales objetivos consiste en una reacción inflamatoria (Robbins et al., 2010), la cual favorece acciones como la fagocitosis de un agente patógeno o atrapamiento y digestión posterior de sustancias irritantes por parte de células especializadas, aunque todos los seres vivos llevan a cabo estas funciones, la diferencia con el proceso inflamatorio que realizan los seres superiores es la reacción de los vasos sanguíneos que da lugar a la acumulación de líquido y leucocitos en los tejidos extracelulares que a medida que avanza el proceso de inflamación, se hacen presentes los signos clínicos que la caracterizan: rubor, calor, tumor y dolor (García, 2008).

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas, que puede dividirse en aguda o crónica en función de su duración. Al igual que el dolor, esta condición conduce a la pérdida de funcionalidad de la parte afectada (Robbins et al., 1990). Este fenómeno se caracteriza por cambios de flujo y calibre vascular, cambios de la permeabilidad vascular y exudación leucocitaria. Inicialmente, la reacción inflamatoria está

medida por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos que son activados en fases consecutivas (Robbins et al., 1990 y Bendtzen et al., 1998).

La inflamación aguda es una respuesta rápida del anfitrión, que sirve para hacer llegar leucocitos y proteínas plasmáticas como los anticuerpos, al foco de infección o lesión tisular, tras haber ocurrido un estímulo nocivo en un tejido (Robbins et al., 2010). El proceso de inflamación inicia con la dilatación de los capilares y arteriolas locales, provocada por mediadores químicos como histamina, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> PGE<sub>1</sub>) y el factor activador de plaquetas, producidos por las células del tejido circundante, lo que causa un exceso de flujo sanguíneo local, así el paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la salida de agua, lo que clínicamente provoca el edema que se localiza en el área de la lesión (Lüllman et al., 1992).

Aunque la inflamación es una respuesta de carácter protector y está relacionada con el proceso de reparación, ésta puede llegar a ser perjudicial, pues las reacciones inflamatorias constituyen el mecanismo patógeno básico de las reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales, así mismo son parte de algunas enfermedades crónicas muy frecuentes en la actualidad, como artritis reumatoide, aterosclerosis y fibrosis pulmonar (Collins, 2001).

A partir de la década de 1960, muchos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se introdujeron en la práctica clínica y se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo, se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor, osteoartritis, artritis reumatoides y problemas musculoesqueléticos. Esta clase heterogénea de fármacos incluye varios agentes inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) (Howard, 2004), que presenta dos isoformas denominadas COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa de forma constitutiva en la mayor parte de los tejidos y es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de estos, mientras que la COX-2 es inducida en la inflamación (Vane y Botting, 1998). Los AINES no selectivos de la COX inhiben la producción de prostaglandinas en la mucosa gastrointestinal, pudiendo causar

gastroduodenitis, úlcera gástrica y sangrado digestivo (Fitzgerald y Patrono, 2001).

Los AINES, tradicionales o convencionales presentan efectos inhibitorios variados con relación a la COX-1 y COX-2 por ejemplo, la aspirina es aproximadamente 166 veces más potente como inhibidor de la COX-1 en relación a la COX-2. Otros AINES no selectivos, como naproxeno, ibuprofeno y piroxicam, ocasionan inhibición variable de la COX-1 y COX-2 y provocan inhibición plaquetaria reversible (Fitzgerald y Austin, 2001).

Por estas causas muchas plantas han sido estudiadas con el fin de tratar de aliviar las molestias causadas por los padecimientos inflamatorios. En México por ejemplo son empleadas infusiones hechas con las hojas y la corteza del capulín (*Cerasus capuli* Kunth), raíz de tejocote (*Craetaegus mexicana* Moc.) y flores de malva (*Malva sylvestris* L.) para disminuir el malestar (Tumalan, 2014), pero existen otras plantas de las cuales se sabe poseen actividad antiinflamatoria, tal es el caso de la linaza (*Linus usisatissimum* L.) cuyas hojas son utilizadas sobre la parte inflamada así como varias especies de sábila (*Aloe* sp.) (Samano, 1995).

Desde la antigüedad, se les ha atribuido efectos curativos a muchas especies de la familia Euphorbiaceae, por ejemplo, en la India el látex de *Euphorbia hirta* L. es utilizado directamente para curar heridas y resequedad en los labios, así como el tallo de *Euphorbia tirucalli* L. preparado en té para el tratamiento de enfermedades de la piel (Muthu et al., 2006). En la región del Amazonas el té de *Croton cajucara* Benth. es empleado en el tratamiento de diabetes, diarrea, malaria, fiebre, dolores abdominales, inflamaciones hepáticas y renales y es utilizado para controlar los niveles altos de colesterol en sangre. Las especies de la familia Euphorbiaceae han sido también ampliamente utilizadas en diferentes tipos de cáncer, como es el caso de la *Euphorbia peplus*, la cual es empleada en el tratamiento de cáncer de estómago, hígado y útero (Llanes, 2009).

La familia Euphorbiaceae es una de las familias de Angiospermas con mayor número de especies en el mundo. Las plantas que pertenecen a esta familia se

caracterizan por presentar en todos sus órganos tubos laticíferos por donde recorre abundante látex, generalmente de un color blanco o amarillento. Estas plantas crecen en regiones tropicales y cuentan con cerca de 8000 especies agrupadas en 317 géneros en el mundo (Llanes, 2009), para México se calcula que existen 782 especies agrupadas en 43 géneros (Steinmann, 2002).

El género *Jatropha* perteneciente a esta familia, cuenta con más de 70 especies, que se destacan por su dureza, rápido crecimiento y fácil propagación. A nivel biológico el género se utiliza ampliamente en el control de plagas por sus propiedades como insecticida y fungicida. En diferentes especies del género *Jatropha* se han evidenciado usos medicinales, en especial en el tratamiento de infecciones de la piel, enfermedades de transmisión sexual, ictericia y fiebre, en algunas especies se han identificado metabolitos como apigenina, vitexina e isovitexina, que pueden ser utilizados contra la malaria, el reumatismo y los dolores musculares. Algunos látex se utilizan como desinfectante en las infecciones bucales y se ha establecido que presentan compuestos con propiedades anticancerígenas como jatrophina, jatrofano, y curcaina. Se ha observado actividad antimicrobiana de *Jatropha curcas* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Pabón y Hernández, 2012).

## **Antecedentes**

Muchas plantas de la familia Euphorbiaceae han sido estudiadas a causa de las propiedades medicinales que presentan, e incluso en diversas partes del mundo son usadas para el alivio de algunos padecimientos, tal es el caso de *Securinega virosa* Roxb.& Willd, de la cual el extracto metanólico de hojas mostró actividad antiinflamatoria moderada utilizando el modelo de edema plantar inducido por carragenina (Yerima et al., 2009).

Otros géneros que también muestran propiedades medicinales son *Euphorbia* y *Jatropha*, como *E. heterophilla* L. (Falodun et al., 2006) planta de la cual se realizó un estudio a partir de los extractos metanólico y acuoso de las hojas, encontrándose que el extracto acuoso presentó una mayor actividad antiinflamatoria a concentraciones de 100 y 150 mg/Kg de peso corporal (PC).

También se ha probado la actividad antiinflamatoria del extracto hexánico de *Euphorbia hirta*, comparándolo con sus tres constituyentes triterpénicos principales (b-amirina, 24-metilencicloartenol y  $\beta$ -sitosterol), combinados de diferentes formas, encontrando que los triterpenos aislados así como el extracto mostraron actividad antiinflamatoria significativa con efectividad dosis-dependiente (Martínez et al., 1999).

Lorente (2006) realizó un estudio en ratas Wistar y ratones Swiss en el cual se puso a prueba la actividad antidiarreica y antiinflamatoria de *Euphorbia hirta*, de la cual se extrajo quercitina, flavonoide al que se le atribuye entre otras la actividad antiinflamatoria y de la cual se observó una reducción significativa del proceso inflamatorio a una concentración de 1 mg/Kg de PC.

Jeong et al. (2014), realizaron un estudio con el extracto etanólico de *Euphorbia hirta*, encontrando capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) de 0.225 mg/mL y actividad antiinflamatoria dosis-dependiente en macrófagos de ratón, también se evaluó su efecto citotóxico, los resultados obtenidos demostraron que hasta 200 mg/mL *E. hirta* no fue tóxica para las células RAW 264.7.

Majid et al. (2015), estudiaron la composición fitoquímica y la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica de diferentes extractos de las partes aéreas de *Euphorbia dracunculoides* Boiss, la mejor actividad antioxidante se presentó en el extracto etanólico mientras que la mejor actividad antiinflamatoria se observó en el extracto hexánico.

Falodun et al. (2013), pusieron a prueba el extracto metanólico de *Jatropha multifida* L. para evaluar su actividad analgésica, antiinflamatoria y anticancerígena, con resultados de actividad antiinflamatoria significativa a una concentración de 400 mg/Kg de PC.

Perea (2013) analizó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del extracto metanólico de testa de *Jatropha curcas*, encontrando quercetina y ácido  $p$ -cumárico como compuestos más abundantes y una capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) de 0.19 mg/mL y 12.71 mg EqAG/g en la cuantificación de fenoles totales.

Abdullah et al. (2011), evaluaron la actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena del látex y extractos metanólicos de diferentes partes de *Jatropha curcas*, encontrando mayores concentraciones de compuestos fenólicos en el látex, mostrando actividad antiinflamatoria en el ensayo de inhibición de la óxido-nítrico-sintasa en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y una citotoxicidad moderada.

También se ha comparado la efectividad de los extractos metanólicos de las hojas de *Jatropha curcas* L. *Ocimum gratissimum* L. y *Solanum scabrum* Mill. para tratar la inflamación inducida por formaldehído en patas de rata, estudio en el cual *J. curcas* presentó la mayor actividad antiinflamatoria (Olutayo et al., 2013). De *Jatropha gossipifolia* L. fue realizado un estudio del efecto del látex sobre edema plantar inducido por carragenina en ratas donde se observó una disminución del edema en las dos concentraciones utilizadas (25 y 50 mg/Kg de PC) (Ahmed et al., 2015).

Hernández (2013) estudió el extracto metanólico y látex de *Jatropha rzedowskii* los cuales mostraron actividad antiinflamatoria en un modelo de edema plantar en tres concentraciones estudiadas (250, 500 y 700 mg/Kg de PC.).

Canales et al. (2006), describen el uso tradicional del látex de la planta conocida como Sangre de grado (*Jatropha neopauciflora*) en el poblado de San Rafael Coxcatlan, Puebla. En donde el látex es utilizado para el tratamiento de fuegos bucales, infección de heridas y dolor de dientes aplicado directamente sobre las heridas.

Hernández (2010) realizó un estudio acerca de la actividad antifúngica del extracto metanólico de *Jatropha neopauciflora* obteniendo como resultado que esta especie inhibe el crecimiento de hongos filamentosos mostrando una toxicidad general fuerte y actividad antioxidante.

García y Delgado (2006) estudiaron el efecto citotóxico del extracto de la corteza de *Jatropha neopauciflora* en dos líneas celulares, U251 (células tumorales de sistema nervioso central humano) y K562 (línea celular de leucemia) encontrando una toxicidad moderada sobre las células.

## **Justificación**

Debido a que en México existe una gran diversidad de flora utilizada de manera ancestral para el remedio de numerosos malestares y ya que se conocen muchas plantas de la familia Euphorbiaceae con actividad antiinflamatoria, según su uso tradicional, en el presente trabajo se pretende corroborar de forma científica el uso del látex de *Jatropha neopauciflora* como antiinflamatorio, de igual manera identificar algunos compuestos responsables de dicha actividad, para su posible uso como complemento de fármacos antiinflamatorios.

## **Planteamiento del problema**

Se sabe que *Jatropha neopauciflora* es una especie endémica de México que se localiza en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y que tiene usos etnomedicinales documentados, por lo que en el presente estudio se evaluó el uso tradicional del látex de esta planta, abordando el siguiente problema:

¿El látex de *Jatropha neopauciflora* tendrá efecto antiinflamatorio?

## **Hipótesis**

Se sabe que los extractos y látex de muchas plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae presentan diversas actividades como antimicrobiana, antifúngica y antiinflamatoria entre otras. El uso del látex de *Jatropha neopauciflora* es común en algunas regiones de México como el valle de Tehuacán Cuicatlán, para el tratamiento de malestares en los que se observa un proceso inflamatorio, por lo cual se espera que el látex de *J. neopauciflora* disminuya la inflamación.

## **Objetivos**

Objetivo general.

Evaluar algunas propiedades medicinales del látex de *J. neopauciflora*.

Objetivos particulares.

Del látex de *J. neopauciflora*:

- I. Evaluar la capacidad antiinflamatoria (método de inducción de edema plantar inducido por carragenina).
- II. Evaluar la capacidad antioxidante (método de reducción del radical DPPH).
- III. Realizar la extracción y cuantificación de proteínas (método de Bradford).
- IV. Realizar la extracción y cuantificación de carbohidratos totales y reductores (método de Antrona y método de Nelson Smongy).
- V. Realizar la identificación de compuestos presentes en el látex mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- VI. Evaluar la toxicidad general (bioensayo de letalidad general en *Artemia salina*).
- VII. Observar de manera cualitativa la actividad antibacteriana (método de difusión en agar de Kirby-Bauer)
- VIII. determinar la presencia de saponinas y alcaloides

## **Material y Métodos**

### **Colecta de Material**

El látex de *J. neopauciflora* fue recolectado en San Rafael Coxcatlán Puebla en los meses de marzo y junio de 2011 y se mantuvo con una capa de hexano a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar su oxidación (Apéndice 4).

### **Actividad Antiinflamatoria**

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria del látex de *J. neopauciflora* se realizó el ensayo en dos formas, la primera fue la administración tópica del látex directamente sobre el área del edema y la segunda consistió en la administración por vía oral mediante una cánula a tres diferentes concentraciones del látex (250, 500 y 750 mg/Kg de PC), en ambos casos se emplearon como controles positivos dexametasona y naproxeno sódico. En los ensayos se emplearon ratas *Wistar* hembras (200 – 250 g de peso corporal (PC) con ayuno de 8 horas y acceso libre a agua, previamente separadas de forma aleatoria en 9 grupos de 5 ratas cada uno, a las cuales se les provocó un edema plantar mediante la inyección de  $\lambda$ -carragenina al 1% (Apéndice 5).

### **Grupos Experimentales**

Las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos control, un grupo testigo y cuatro grupos experimentales, para cada una de las concentraciones las cuales se designaron de la siguiente manera:

Grupo testigo:

Solución salina (30  $\mu\text{L}$ )

Grupos control ensayo oral:

1. Dexametasona [0.5 mg/Kg de PC] (30  $\mu\text{L}$ )
2. Naproxeno sódico [25 mg/Kg de PC] (300  $\mu\text{l}$ )

Grupos control ensayo tópico:

1. Dexametasona (Alcori [0.1%])
2. Naproxeno sódico (Flanax gel [5.5 %]).

Grupos experimentales tratados con el látex:

1. administración oral [250 mg/Kg de PC] (62.5  $\mu$ L en promedio).
2. administración oral [500 mg/Kg de PC] (125  $\mu$ L en promedio).
3. administración oral [750 mg/Kg de PC] (187.5  $\mu$ L en promedio).
4. administración tópica en la zona del edema [100 %]

A todos los grupos se les inyectaron 200  $\mu$ L de carragenina al 1% disuelta en solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%), en el cojinete plantar de la pata derecha una hora después de la administración del látex y los controles. En el caso del ensayo tópico el látex, la dexametasona y el naproxeno sódico se administraron al momento de la inyección de carragenina y cada hora después de realizar las mediciones del edema. Las mediciones se realizaron con un vernier electrónico de gatillo en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección). Posteriormente fueron sacrificadas en cámara de CO<sub>2</sub>.

Las extremidades posteriores fueron conservadas en EDTA para su posterior procesamiento y realización de estudios histológicos.

### **Capacidad Antioxidante**

La evaluación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) (Okusa et al., 2007) en placas de ELISA de 96 pozos de fondo plano, se determinó la Capacidad Antioxidante Media (CA<sub>50</sub>) del látex utilizando las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 ppm. Como control positivo se utilizó quercetina a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm) y como blanco, pozos con 200 $\mu$ L de MeOH grado HPLC la curva patrón y el problema se leyeron en un lector de ELISA a 492nm (Apéndice 6).

### **Cuantificación de Fenoles Totales**

La concentración de fenoles totales del látex de *J. neopauciflora*, se realizó por el método modificado de Singleton (Singleton et al., 1999) utilizando como referencia

una curva patrón de ácido gálico con una solución estándar de 0.2 mg/mL de la cual se tomaron alícuotas para seis concentraciones (0.00625, 0.012, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL) y se leyó a 760nm.

Mientras que en las muestras se emplearon las concentraciones de 2, 4, 8 y 16 mg de látex diluidas en 5 mL de agua destilada.

Posteriormente se realizó una interpolación mediante la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación  $R^2$  para determinar la concentración de fenoles en el látex. Los resultados se expresan como mg eAG/mL de látex (mg equivalentes de ácido gálico por mL de látex) (Apéndice 7).

### **Contenido de Flavonoides**

Ya que en varios antecedentes se reporta que el látex y otras partes de las plantas de la familia Euphorbiaceae contienen cantidades representativas de flavonoides, se llevó a cabo la cuantificación de flavonoides presentes en una muestra de látex de *J. neopauciflora* por el método de Dowd (modificado por Ramamoorthy y Bono, 2007) (Apéndice 8) en el cual se emplea una solución de  $AlCl_3$  al 2%. Se elaboró una curva patrón de quercetina a diferentes concentraciones (1-100  $\mu$ g/mL) que posteriormente se lee a 415nm y para determinar el contenido en las muestras con cuatro concentraciones (2, 4, 8 y 16  $\mu$ g/mL). Se interpolan los resultados de la ABS del látex en la curva patrón.

Los resultados se expresan como mg eQ/mL de látex (mg equivalentes de quercetina por mL de látex).

### **Cuantificación de Proteínas.**

Para la cuantificación de proteínas se realizó la extracción a partir de 1 mL de látex, con una mezcla de metanol-cloroformo-agua (MCA, 12: 5: 3) homogeneizado en frío, se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos y se recolectó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 2 mL más de MCA y se centrifugó nuevamente los sobrenadantes se juntaron y posteriormente se les agregó

1 mL de cloroformo y 1.5 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó nuevamente y se desechó la fase clorofórmica.

La cuantificación se realizó mediante una curva patrón de albúmina y colorante de Bradford, la curva y el problema fueron leídos a 620nm y la absorbancia del látex se interpoló en la ecuación de la regresión lineal de la curva patrón, para determinar la concentración de proteínas (Apéndice 9).

### **Contenido de Carbohidratos**

Para la cuantificación se realizó una extracción de carbohidratos a partir de 500  $\mu$ L de látex con 2 mL de etanol 80% (x2) para carbohidratos totales y carbohidratos reductores, la muestra fue centrifugada a 10,000 rpm y se extrajo el sobrenadante. La pastilla se resuspendió cuatro veces más con 2 mL de etanol y los sobrenadantes se almacenaron en frío (Apéndice 10).

Para determinar el contenido de carbohidratos totales (con el reactivo de ANTRONA) se utilizó una de las muestras antes obtenida, se evaporó el solvente y la muestra se resuspendió en 10 mL de agua destilada. Se elaboró una curva patrón con un stock de glucosa (200  $\mu$ g/mL), agua destilada y solución de ANTRONA al 2% (Apéndice 11), la curva y las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 630nm, se determinó la concentración por medio de la interpolación del valor de la muestra con la ecuación de la curva.

En la cuantificación de carbohidratos reductores se empleó una muestra de la extracción descrita previamente y al igual que en el ensayo con reactivo de ANTRONA, se evaporó el solvente, la muestra se resuspendió en 5 mL de agua destilada. Para determinar la concentración de carbohidratos reductores (método de Nelson Somogyi), se realizó una curva patrón con un stock de glucosa (200  $\mu$ g/mL), agua destilada, reactivo de arsenomolibdato y reactivo de cobre, la curva y la muestra fueron leídas en un espectrofotómetro a 660nm (Apéndice 12).

Mediante la interpolación de la absorbancia de la muestra en la ecuación de la curva patrón de glucosa se determinó la concentración de carbohidratos reductores.

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Para la identificación de azúcares presentes en el látex se utilizaron estándares de glucosa, fructuosa, sacarosa e inulina por medio de cromatografía líquida de alta resolución, empleando una columna Supelcogel Ac de 300 x 7.5mm ID a una temperatura de 80 °C con un detector de refracción de luz y una fase móvil acuosa con un flujo de 1.2 mL/min.

Del látex se inyectaron 20 µL y se cuantificó la concentración de carbohidratos presentes en la muestra mediante el área bajo la curva.

Así como la caracterización de algunos componentes fenólicos del látex, utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6mm, tamaño de partícula 5µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260nm con barrido completo de 200-400nm (Apéndice 13).

### **Toxicidad General**

Se realizó mediante el ensayo de letalidad frente a *Artemia salina* (Apéndice 14), en el cual se emplean larvas nauplio para evaluar la toxicidad de los compuestos contenidos en el látex. Se colocaron 10 larvas en cada frasco vial y se dejaron en exposición a los compuestos del látex y un control positivo de ácido gálico a tres concentraciones (10, 100 y 1,000 ppm) durante 24 horas, se registró el número de individuos vivos (IV) colocados inicialmente, pasado el tiempo se contabilizó el número de individuos muertos (IM) y se calculó el porcentaje de letalidad por cada una de las concentraciones mediante la siguiente ecuación: %Letalidad=IM/IVx100, la prueba se realizó por triplicado y con la interpolación en una curva patrón se calculó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

### **Actividad Antibacteriana.**

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden y Vlietinck, 1991) (Apéndice 15), para corroborar lo descrito por Hernández en 2013 con cepas de *Staphilococcus aureus* (caso clínico), *Escherichia coli* (caso clínico), *Vibrio cholera* (caso clínico) y *Candida albicans* (ATCC 32354). Se utilizaron sensidiscos impregnados con 10µL del látex y como control positivo discos con Cloranfenicol (25 µg por disco). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

### **Presencia de Saponinas y Alcaloides.**

Se realizaron las pruebas fitoquímicas de acuerdo con los métodos estándar, para saponinas se realizó el ensayo de espuma (Apéndice 16), se le agregaron 2 mL de agua destilada a 200 µL de látex y se agitaron durante 5 minutos. Si la espuma formada perdura por más de 5 minutos, el resultado se considera positivo.

Para la determinación de alcaloides con el reactivo de Dragendorff (Apéndice 17) se disolvió el látex en ácido clorhídrico al 5% y se filtró, se le agregó reactivo de Dragendorff (solución de yoduro potásico de bismuto). La formación de precipitado de color rojo indica la presencia de alcaloides. Además se realizó el mismo procedimiento y se agregó reactivo de Mayer en el cual la formación de precipitado blanco se considera positiva

## Resultados

### Actividad Antiinflamatoria

Se evaluó por el ensayo de edema plantar inducido por carragenina, durante cuatro horas se registró el aumento de volumen causado por el proceso inflamatorio y se calculó el porcentaje de inflamación, los resultados se muestran en las gráficas siguientes (Figuras 1 – 6 y Cuadros 1 y 2)

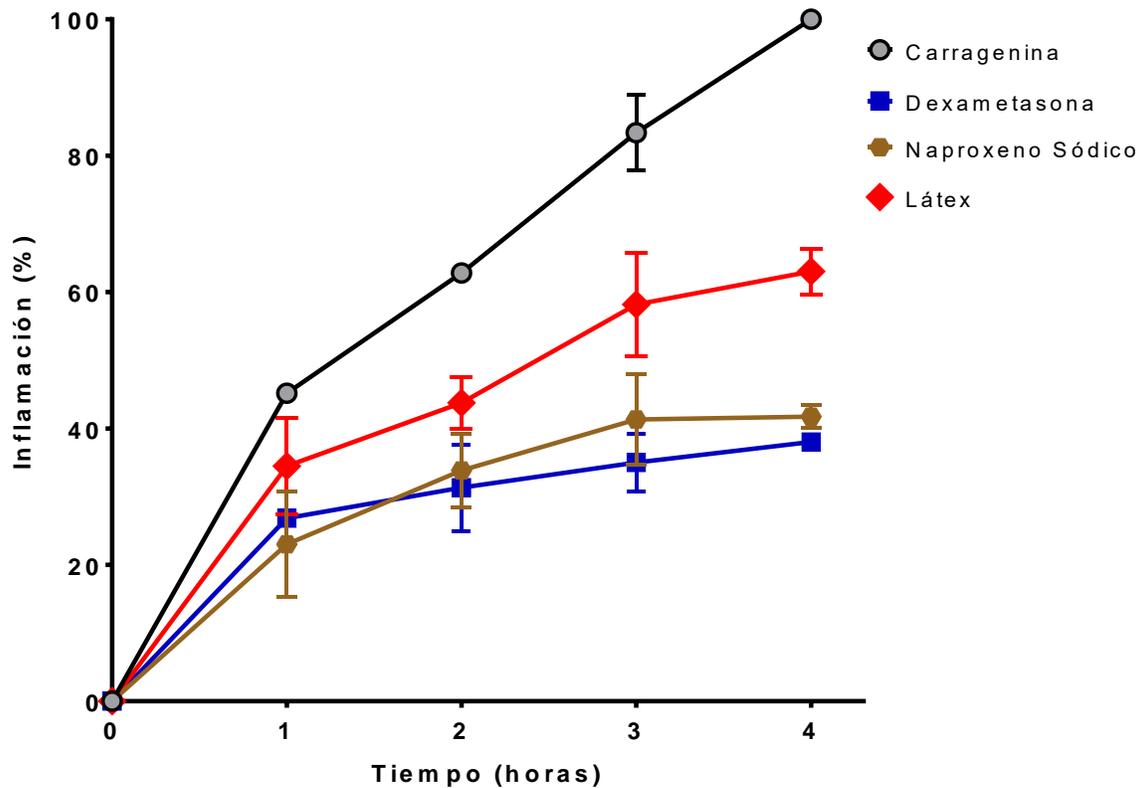
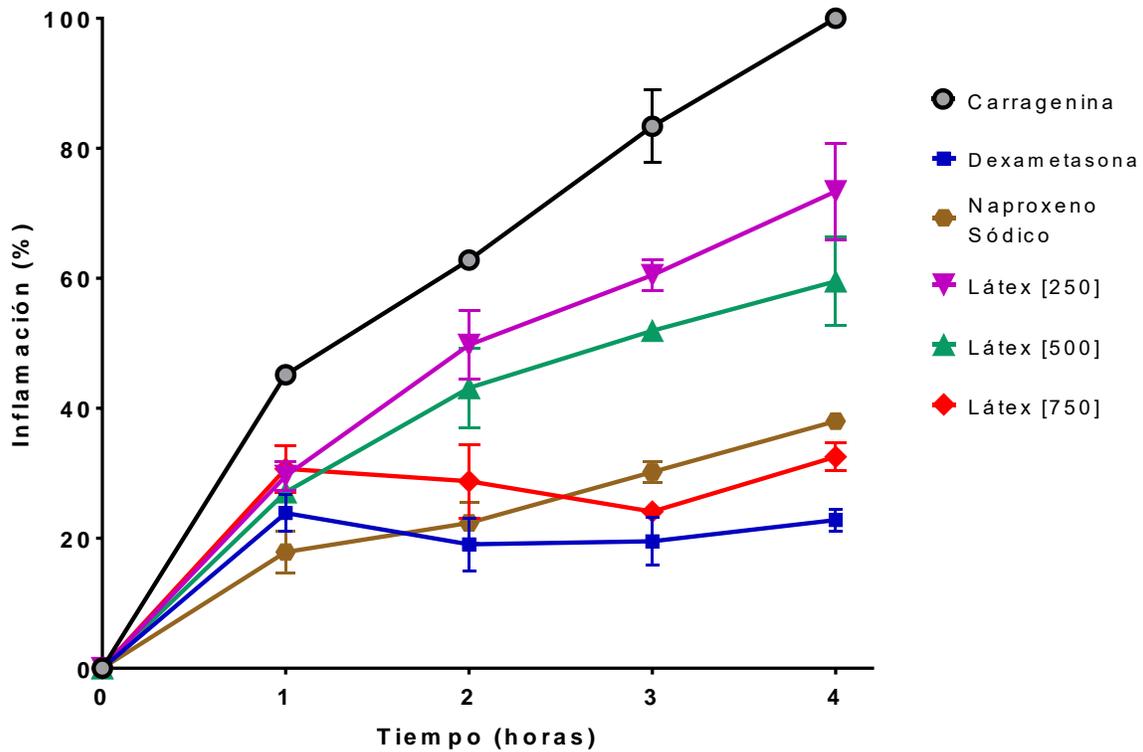


Figura 1. Efecto del látex de *J. neopauciflora* administrado de forma tópica sobre el edema plantar

Los resultados presentados en la figura 1 muestran que el látex posee actividad antiinflamatoria por vía tópica, inhibiendo el 36% de la inflamación, mientras el naproxeno sódico presentó una inhibición del 59% y la dexametasona 62%,



**Figura 2. Efecto del látex de *J. neopauciflora* administrado por vía oral sobre el edema plantar**

Al igual que en el ensayo de administración tópica, el látex mostró actividad antiinflamatoria cuando es administrado vía oral, con un efecto dependiente de la dosis, ya que los porcentajes de inhibición de la inflamación incrementaron mientras la concentración aumentó (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de inflamación de cada tratamiento del látex de *J. neopauciflora* sobre el edema plantar.**

Tratamiento	% de inflamación	% de inhibición de inflamación
Látex [250 mg/Kg de PC]	77	23
Látex [500 mg/Kg de PC]	60	40
Látex [750 mg/Kg de PC]	39	61
Látex [100% (Tópico)]	61	39

Ya que el látex presentó una mejor actividad antiinflamatoria en forma de administración oral, se realizó un segundo ensayo con la concentración más

efectiva (750 mg/kg de PC), administrando una dosis más, posterior a la segunda hora de haber inyectado la carragenina.

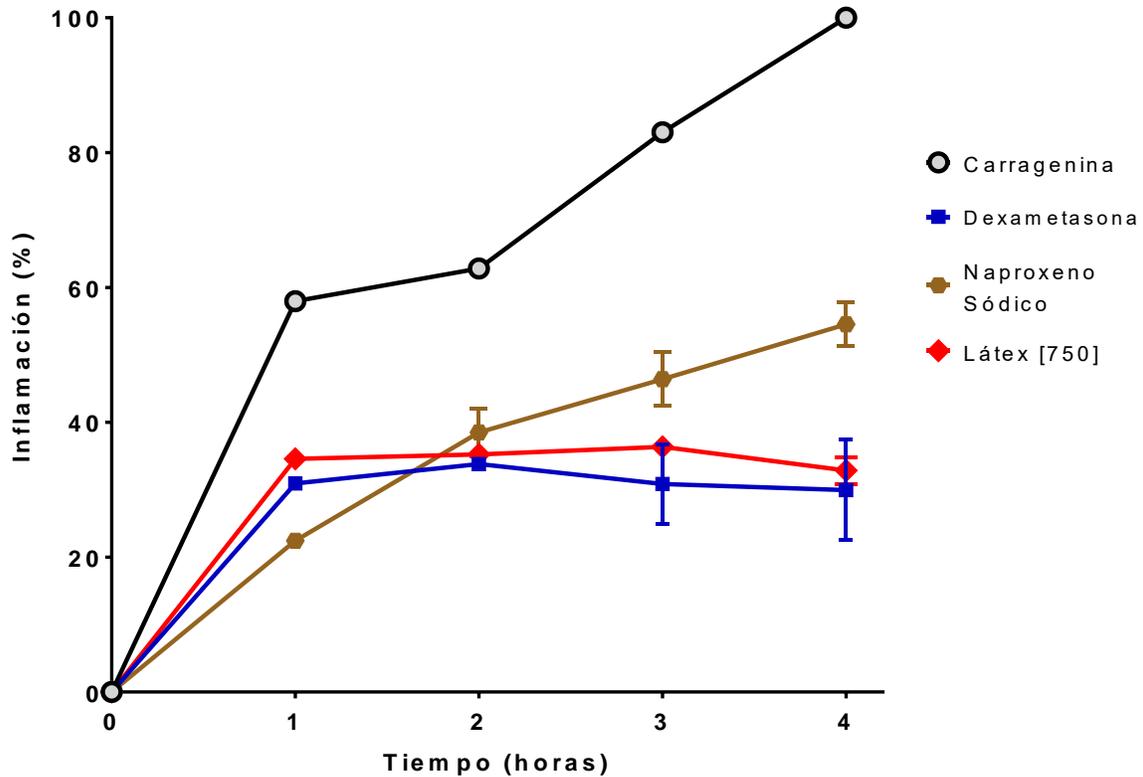


Figura 3. Efecto del látex de *J. neopauciflora* con administración de doble dosis vía oral sobre el edema plantar.

En el ensayo con doble dosis del látex, al compararlo con los controles positivos, se puede observar que la efectividad que este presenta es muy similar a la de la dexametasona, logrando mantener el volumen del edema en las primeras tres horas y posteriormente mostrando una tendencia a disminuirlo, mientras que el naproxeno sódico inhibe en menor medida el aumento del edema.

Los resultados del tiempo final (cuarta hora después de la inyección de carragenina) de cada ensayo, se analizaron utilizando ANOVA de un factor con el programa Graph Pad Prism 6 para comparar los tratamientos utilizados. Como se puede observar en las gráficas (Figuras 4 - 6). Todos los tratamientos del látex presentan diferencia significativa con respecto a la carragenina ( $P < 0.05$ ).

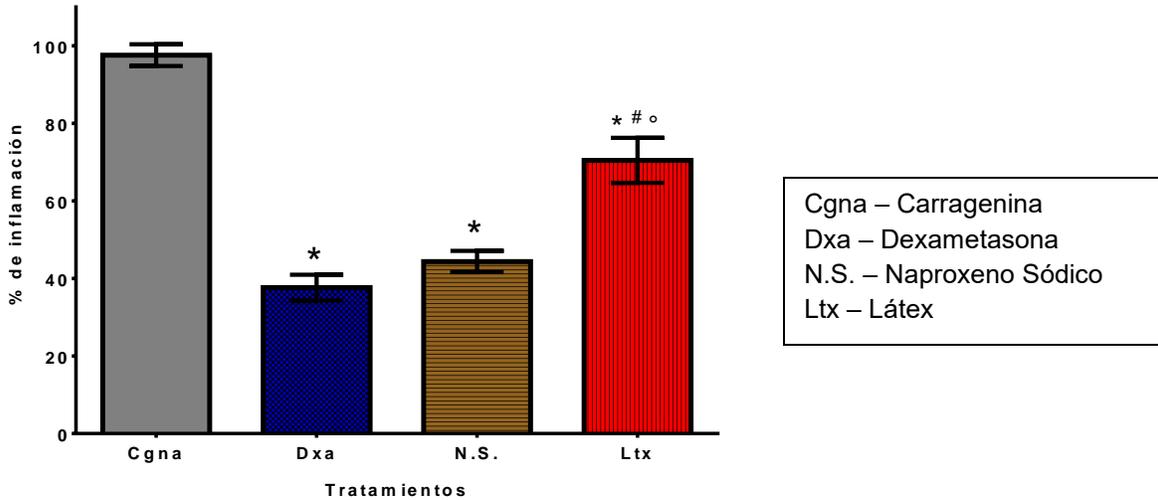


Figura 4. Comparación del efecto antiinflamatorio del látex a las cuatro horas de la inyección de carragenina, administrado de forma tópica; \*Diferencia significativa con respecto a la carragenina ( $P<0.05$ ); #Diferencia significativa con respecto a la dexametasona ( $P<0.05$ ); °Diferencia significativa con respecto al naproxeno sódico ( $P<0.05$ ).

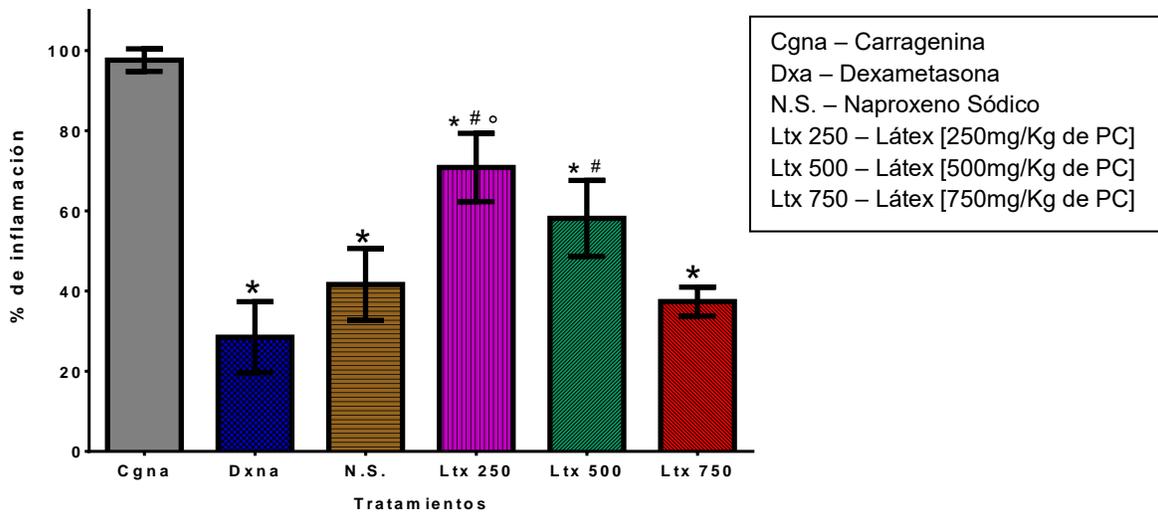


Figura 5. Comparación del efecto antiinflamatorio de las diferentes concentraciones de látex a las cuatro horas de la inyección de carragenina, administradas de forma oral; \*Diferencia significativa con respecto a la carragenina ( $P<0.05$ ); #Diferencia significativa con respecto a la dexametasona ( $P<0.05$ ); °Diferencia significativa con respecto al naproxeno sódico ( $P<0.05$ ).

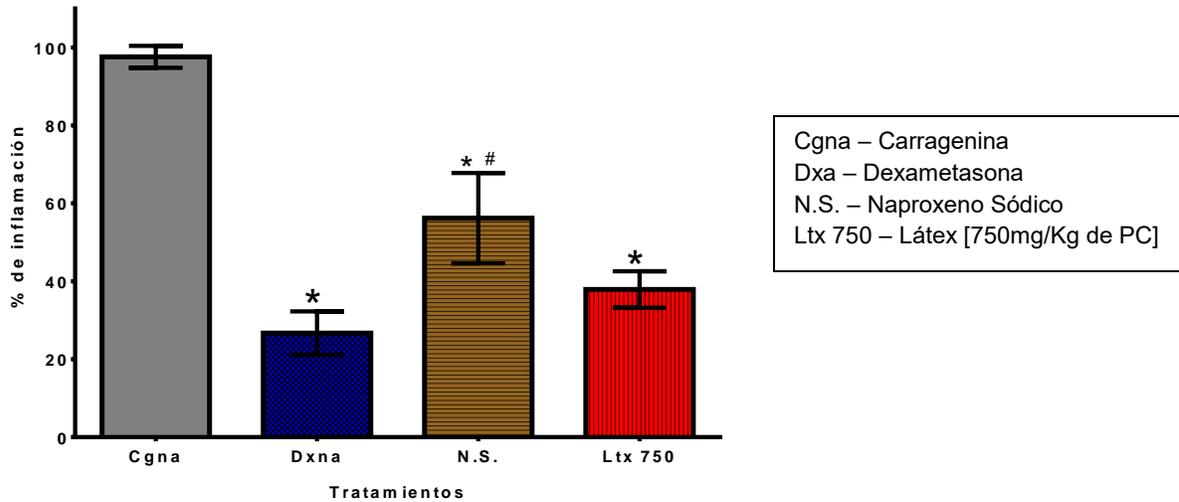


Figura 6. Comparación del efecto antiinflamatorio del látex a las cuatro horas de la inyección de carragenina, con una segunda dosis. \*Diferencia significativa con respecto a la carragenina ( $P<0.05$ ); #Diferencia significativa con respecto a la dexametasona ( $P<0.05$ ); °Diferencia significativa con respecto al naproxeno sódico ( $P<0.05$ ).

Una vez analizados los resultados del ensayo con una segunda dosis del látex se encontró que entre el látex y la dexametasona no hay diferencia significativa.

**Cuadro 2. Comparación del efecto antiinflamatorio de los tratamientos utilizados.**

Tratamiento	Inhibición de inflamación
250 mg/Kg	23% $\pm$ 3.6
500 mg/Kg	40% $\pm$ 9.4
Látex 750 mg/Kg	61% $\pm$ 8.5
100% (Tópico)	39% $\pm$ 5.8
750 mg/Kg (x2)	68% $\pm$ 4.6
Controles + Dexametasona	62.5% $\pm$ 3.3
Tópicos Naproxeno Sódico	59% $\pm$ 2.7
Controles + Dexametasona	70% $\pm$ 8.8
Orales Naproxeno Sódico	58.8% $\pm$ 8.9

Inhibición de la inflamación: media y error estándar.

### **Capacidad Antioxidante**

Ya que durante el proceso inflamatorio existe una gran generación de radicales libres que pueden afectar a las células propias del organismo mientras favorece la eliminación del agente lesivo, en caso de ser un patógeno, fue de gran importancia realizar el ensayo para determinar la capacidad antioxidante del látex de *J. neopauciflora*, en la cual la capacidad antioxidante media (CL<sub>50</sub>) fue de 111.92 µg/mL, mientras que la curva patrón de quercetina mostró una CL<sub>50</sub> de 3.4 µg/mL.

### **Cuantificación de Fenoles Totales.**

Se determinó la concentración de fenoles totales de *J. neopauciflora* debido a que muchas de las sustancias con mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria son los fenoles y los flavonoides (Gutiérrez et al., 2008).

Mediante la regresión lineal de la curva patrón, se determinó que el contenido de fenoles en el látex fue de 11.5 mg EqAG/mL (mg equivalentes de ácido gálico por mL de látex), lo que representa el 1.15% del látex.

### **Contenido de Flavonoides**

Se realizó la cuantificación de flavonoides presentes en el látex de *J. neopauciflora*, a partir de una curva patrón de quercetina, se encontró un total de 1.55 mg EqQ/mL (mg equivalentes de quercetina por mL de látex), que representan el 0.15% del látex.

### **Cuantificación de Proteínas**

La extracción y cuantificación de proteínas se realizó a partir de 1 mL de látex, mediante la interpolación de los valores de la absorbancia del látex en una curva patrón de albúmina se determinó un total de 10.71 mg/mL de proteínas, equivalentes al 1.07% del látex.

### **Contenido de Carbohidratos.**

La concentración de carbohidratos en un mililitro del látex de *J. neopauciflora* fueron de 8.56 mg/mL y 6.5 mg/mL para carbohidratos totales y carbohidratos reductores respectivamente.

**Cuadro 3. Resumen del análisis fitoquímico del látex de *J. neopauciflora*.**

Prueba	Resultado	porcentaje
Capacidad antioxidante	111.92 µg/mL	
Fenoles	11.5 mg EqAG/g	1.15%
Flavonoides	1.55 mg EqQ/g	0.15%
Proteínas	10.71 mg/mL	1.07%
Carbohidratos totales	8.5 mg/mL	17%
Carbohidratos reductores	6.5 mg/mL	13%
Toxicidad general (CL <sub>50</sub> )	609.41 ppm	

### Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Con el análisis por HPLC fue posible realizar la identificación de compuestos fenólicos y azúcares en el látex, se logró identificar la presencia de catequina como el principal compuesto fenólico.

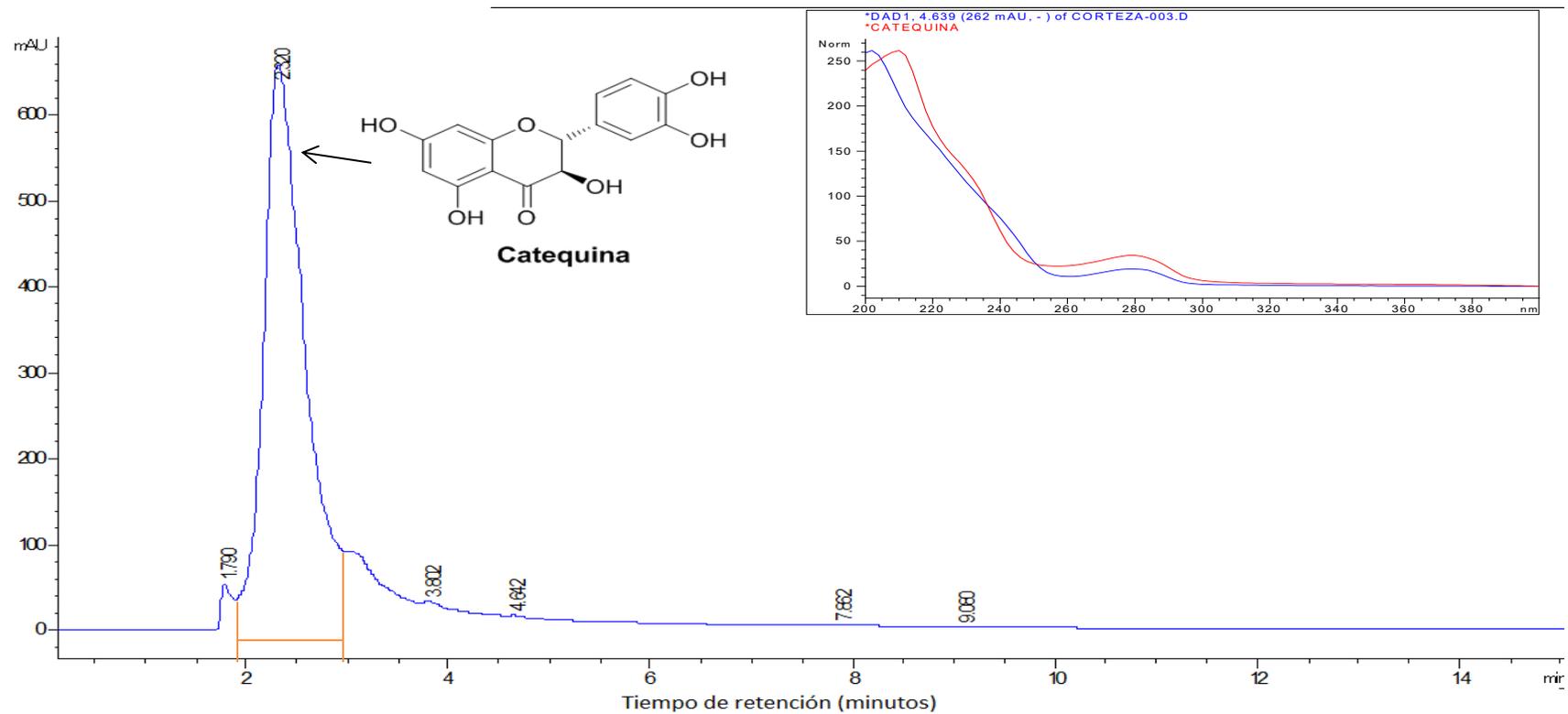


Figura 7. Cromatograma del látex con tiempos de retención de los compuestos.

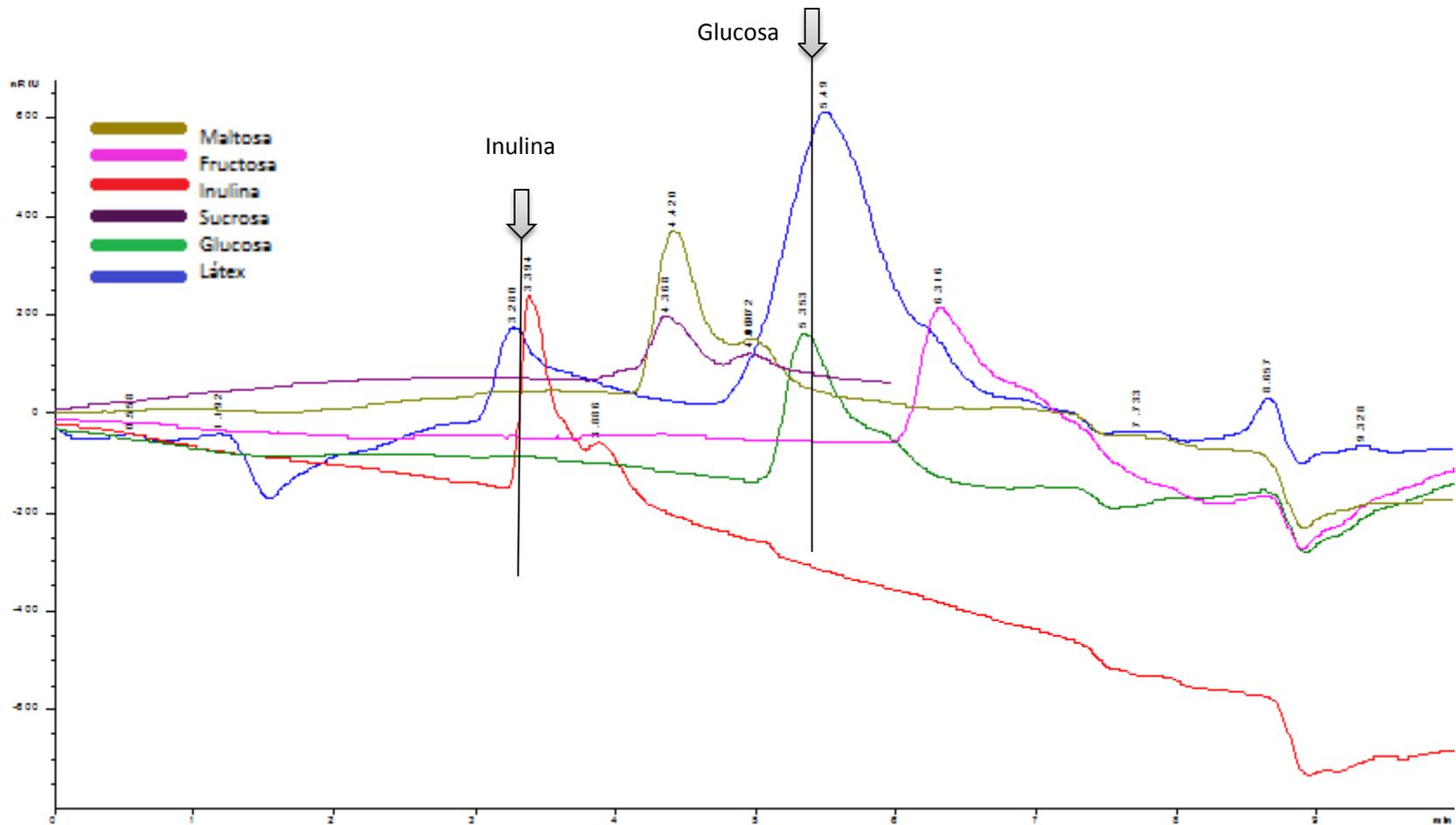


Figura 8. Cromatograma del látex comparado con los estándares de carbohidratos

En la detección de carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución, comparando los datos de los tiempos de retención, se logró determinar la presencia de glucosa e inulina.

## **Toxicidad General**

La evaluación de la toxicidad general, se realizó con el látex de *J. neopauciflora* y ácido gálico como control positivo, sobre larvas nauplio II de *Artemia salina*.

**Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* en interacción con látex y ácido gálico.**

Concentración ppm	% de letalidad	
	Látex	Ácido gálico
10	20	40
100	23.3	53.3
1000	70	100

Mediante la regresión lineal de los resultados, se calculó la concentración letal media del látex, que fue de 609.41 ppm, lo que lo clasifica como ligeramente tóxico de acuerdo a CYTED.

**Cuadro 5. Clasificación de toxicidad de acuerdo con el CYTED (1995).**

Extremadamente tóxico	1 – 10	ppm
Altamente tóxico	10 – 100	ppm
Moderadamente tóxico	100 – 500	ppm
Ligeramente tóxico	500 – 1000	ppm
Prácticamente no tóxico	1000 – 1500	ppm
Relativamente inocuo	>1500	ppm

### **Actividad Antibacteriana.**

En el ensayo de actividad antibacteriana se observó que el látex inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas, ya que en todas las cepas utilizadas se presentaron halos de inhibición. De las cepas empleadas las más sensible fue *Staphylococcus aureus*.

**Cuadro 6. Tamaño en mm de los halos de inhibición presentados en el control positivo y el látex.**

	C+	Látex
<i>Staphylococcus aureus</i>	22 ± 2	16 ± 3
<i>Vibrio cholerae</i>	28 ± 3	2.5 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	29 ± 5	N.E.
<i>Candida albicans</i>	22 ± 2	N.E.

N.E. no presentó efecto

### **Presencia de Saponinas y Alcaloides.**

En la determinación de saponinas y alcaloides las pruebas cualitativas resultaron positivas para ambos tipos de compuestos.

## **Discusión**

Actualmente se tiene el conocimiento de que muchos compuestos derivados de plantas, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario (Wink, 1999), por lo que dichos compuestos son llamados metabolitos secundarios. Muchos de éstos, ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones, poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el humano, además de que en su mayoría son utilizados como materias primas de la industria alimentaria, textil, agroquímica, cosmetología y farmacéutica (Hartmann, 2007).

Las plantas han sido utilizadas como alimento y en la medicina tradicional, práctica habitual, que representa cerca del 79% en la población mundial, por sus propiedades benéficas para la salud (Martínez, 2013). Algunas especies de la familia Euphorbiaceae específicamente del género *Jatropha*, cuyo nombre proviene de los vocablos griegos *Jatros* (doctor) y *Trophe* (Alimento), del cual se conocen más de 175 especies, son utilizadas en la medicina tradicional en varios países como: la India, África, Portugal y México (Argueta y Zolla, 2009) Algunos estudios han reportado la presencia de metabolitos secundarios en las plantas de este género como: alcaloides, terpenos (diterpenos, triterpenos) lignanos, péptidos cíclicos (Can-Aké et al., 2004), flavonoides, y fitoesteroles (Thomas et al., 2008), asociados con actividades biológicas como antiinflamatoria, antimicrobiana (Naengchomnong et al., 1986; Hernández, 2013) y antitumoral (Evans, 1983).

En México existe un gran acervo de plantas consideradas como medicinales, una de ellas es *Jatropha neopauciflora* o “Sangre de grado”, de la cual el látex e infusiones de la parte aérea son utilizados para el tratamiento de heridas e infecciones bucales y cuando existen piezas dentales flojas (Canales et al., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con lo reportado no sólo en la medicina tradicional, sino en otras investigaciones, en las cuales se evidencian las propiedades medicinales del género *Jatropha*, pues se encontró

que el látex de *J. neopauciflora* presenta capacidad antiinflamatoria considerable (Cuadro 2), al igual que *Jatropha multifida* (Falodun et al., 2013), *Jatropha curcas* (Abdullah et al., 2011 y Olutayo et al., 2013), *Jatropha gossipifolia* (Ahmed et al., 2015) y *Jatropha rzedowskii* (Hernández, 2013).

Ya que en los antecedentes (Canales et al., 2006), se describe el uso medicinal que la población de San Rafael Coxcatlán le ha dado al látex de *J. neopauciflora*, empleándolo para el tratamiento de heridas abiertas y encías inflamadas, administrado directamente sobre la región afectada, en este trabajo se decidió realizar dos ensayos para el determinar su efecto antiinflamatorio. Un ensayo de administración tópica, pues la manera en que se emplea el látex en la medicina tradicional es de forma directa, sobre heridas abiertas o en la boca; como se desconoce si la gente de la población suele ingerir el látex, se realizó un ensayo de administración oral.

A pesar de que en el ensayo del látex administrado de forma tópica la inhibición del edema fue del 36% comparada con la de la dexametasona de 62.5% y la del naproxeno sódico de 59%, se puede considerar como buena capacidad antiinflamatoria, tomando en cuenta que la dexametasona y el naproxeno sódico son compuestos puros utilizados para el tratamiento de la inflamación tanto aguda como crónica y su efectividad ha sido probada desde hace mucho tiempo, mientras que el látex es una suspensión acuosa coloidal producida por las células laticíferas de la planta (Puigdomènech, 1986) y fue utilizado directamente sin ningún tratamiento adicional.

Por otra parte en los resultados obtenidos del ensayo de administración vía oral, la concentración de 250 mg/Kg de PC presentó el valor más bajo de inhibición del edema (23%) mientras que las concentraciones de 500 y 750 mg/Kg de PC no mostraron diferencias significativas con respecto al naproxeno sódico mientras que la concentración más alta (750 mg/Kg de PC.) manifestó actividad antiinflamatoria bastante considerable (61%) además no presento diferencia significativa con respecto a la dexametasona (70%) e incluso mostro inhibición más eficaz que el naproxeno sódico (58.8%), mientras que en la comparación de

los diferentes tratamientos orales se pudo apreciar diferencias significativas entre las dosis de 250 y 500 mg/Kg de PC. con la dosis de 759 mg/Kg de PC. Con lo que se puede apreciar un efecto dependiente de la dosis.

Es por esto que se llevó a cabo otro ensayo de administración del látex vía oral con una segunda dosis de 750 mg/Kg de PC, administrada dos horas después de la inyección de la carragenina. En este segundo ensayo, se pudo apreciar que la actividad antiinflamatoria del látex aumentó considerablemente con un valor de inhibición similar al de la dexametasona (68%), encontrando que no hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre estos.

Los resultados obtenidos en los ensayos mostraron que el efecto antiinflamatorio es mejor en la administración oral, esto se debe a que la vía de administración es más rápida y efectiva. Pues para que un medicamento llegue a su sitio de acción y produzca su efecto biológico característico debe llegar al torrente sanguíneo. Ya que las vías de administración de un fármaco se clasifican en función de su sitio de aplicación en enteral y parenteral, la vía enteral incluye la administración del fármaco a lo largo del tracto digestivo. Por vía oral, el fármaco puede ser absorbido en dos sitios, el revestimiento del estómago y la mucosa intestinal que tiene una mayor absorción, mientras que por vía parenteral, en particular de manera tópica, los fármacos se depositan en el tejido y deben ser disueltos en los líquidos de los tejidos además de tener que atravesar las diferentes barreras biológicas que presentan diferente estructura, por lo que la tasa de absorción es más baja y lenta (Florez et al., 2013). De hecho en un ensayo no mostrado se pudo observar que el látex aplicado de forma tópica (10  $\mu$ L), sobre un fuego labial (con el epitelio abierto y muy dañado) disminuyó la inflamación y una segunda dosis fue suficiente para aliviar el daño.

Estos resultados nos llevan a considerar que probablemente el látex debe estar en contacto con el tejido abierto para tener una actividad antiinflamatoria más efectiva.

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se determinó la presencia de catequina como principal compuesto fenólico, concordando con lo reportado

por Hernández en 2013 y en las pruebas realizadas al látex para determinar la concentración de fenoles totales, se determinó un valor de 11.5 mg EqAG/mL, que concuerda con los resultados de Majid et al. (2015), que en diferentes extractos de *E. dracunculoides* determinó valores entre 8 y 13 mg EqAG/mg, también con lo reportado por Perea (2013) que determinó 12.7 mg EqAG/mg del extracto metanólico de testa de *J. curcas*, aunque es un valor relativamente bajo ya que Abdulla (2011) reporta un valor de 25.2 mg EqAG/mg, en el látex de *J. curcas*, más del doble de lo encontrado en este trabajo. Mientras que el contenido de flavonoides fue de 1.55 mg EqQ/mL muy cercano a lo reportado por Perea (2013), con un total de 2.3 mg EqQ/mg y que también difiere de los resultados de Abdulla (2011) que determinó un total de 16 mg EqQ/mg.

El contenido de estos compuestos resulta importante ya que los flavonoides son los principales componentes con capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Kalita et al., 2013). Los flavonoides son compuestos bioactivos relativamente no tóxicos, de los cuales se tiene evidencia del efecto que poseen sobre la inhibición de varias enzimas involucradas en los procesos inflamatorios (Kwon et al 2005, García et al., 2007). Otros compuestos fenólicos como la catequina, presente en el látex de *J. neopauciflora* también pueden ayudar a contrarrestar el proceso de inflamación, mediante la inhibición del LTB<sub>4</sub> en neutrófilos que es responsable de ligar los receptores celulares, la adhesión leucocitaria, quimiotaxis, activación leucocitaria y aumento de la permeabilidad vascular (Choyillas, 2000).

El papel que pueden tomar estos compuestos en el proceso inflamatorio es de gran importancia pues, inhiben el metabolismo del ácido araquidónico (AA) por lo tanto, evitan el incremento de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Moreira et al., 2000), inhiben la expresión de la COX<sub>2</sub> y la óxido-nítrico-sintasa inducible (NOS<sub>i</sub>) (Lee et al., 2003), efecto que reportan Jeong (2014), Majid et al. (2015) y Abdullah (2011) pero que en este trabajo no se pudo analizar. Y como se mencionó, poseen propiedades antioxidantes, por lo cual contribuyen a reducir la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), que causan daño celular y estimulan la expresión de otros mediadores.

Por ello también fue importante evaluar la capacidad antioxidante del látex ya que la generación de especies reactivas de oxígeno y liberación del contenido lisosomal a causa de la lisis celular, conduce al daño celular y tisular (Choyillas, 2000). Se ha demostrado que agentes, como la antralina, inductores de las citocinas inflamatorias, basan su acción en la producción de formas reactivas del oxígeno donde el radical  $\text{OH}^-$  y  $\text{RO}^-$  (alcohoxi) son los responsables de la expresión genética del TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ ) y de la IL-8, importantes mediadores del proceso inflamatorio (Lange et al., 1998).

Se encontró que el látex tiene una capacidad antioxidante media ( $\text{CA}_{50}$ ) de 111.92  $\mu\text{g/mL}$ , que es mucho más baja que la de la curva patrón de quercetina cuya  $\text{CA}_{50}$  fue de 3.4  $\mu\text{g/mL}$ , pero que concuerda con lo reportado por Hernández (2013) que determinó una  $\text{CA}_{50}$  de 108.8  $\mu\text{g/mL}$  del extracto metanólico de *J. neopauciflora* y Perea (2013), que determinó una  $\text{CA}_{50}$  de 140  $\mu\text{g/mL}$  del extracto metanólico de *J. curcas*, aunque difiere con los resultados que obtuvieron Abdulla et al. (2011) que del látex de *J. curcas* determinaron una  $\text{CA}_{50}$  de 10.6  $\mu\text{g/mL}$  y Hernandez (2013) que encontró una  $\text{CA}_{50}$  de 10.5  $\mu\text{g/mL}$  del látex de *J. rzedowskii*. Lo que muestra que la capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con el contenido de fenoles y flavonoide y que los látex de las plantas del género *Jatropha* poseen una capacidad antioxidante más elevada que los diferentes extractos de las mismas, ya que en él se pueden encontrar una mayor cantidad de compuestos fenólicos pues los conductos laticíferos suelen estar asociados al floema, encargado del transporte de nutrientes producidos por la parte aérea fotosintética de las plantas.

Por lo que tal vez la baja concentración de fenoles y flavonoides así como la capacidad antioxidante que exhibió el látex en estos análisis pudo haber sido causada por el tiempo de almacenamiento.

Por otra parte, en la cuantificación de proteínas se encontraron 10.71  $\text{mg/mL}$ , un valor muy próximo al contenido de fenoles hecho que resulta interesante, pues en años recientes se han realizado estudios sobre las proteínas funcionales y los péptidos bioactivos, que además de su valor nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer efectos biológicos (Rutherford y Moughan,

2005, Korhonen y Pihlanto 2003), tal como lo proponen Medina et al. (2011), que determinaron la actividad antihipertensiva de pasta de semillas de *J. curcas* de Veracruz y Puebla.

La literatura evidencia que los péptidos bioactivos pueden ejercer su acción tanto a nivel local como sistémico, ya que pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Rutherford y Moughan, 2005; Vermeirssen et al., 2004).

Así, varios péptidos y proteínas han sido propuestos para el tratamiento de varias enfermedades, por ejemplo, ya existe en el mercado una fórmula de nutrición enteral que contiene TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) que por su efecto antiinflamatorio es empleado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Fell, 2005).

Estudios en modelos animales y celulares sugieren que algunas proteínas como la lactoferrina poseen actividad inmunomoduladora. Estos estudios indican que podrían actuar mediante dos mecanismos de acción, el primero implicaría la inhibición de la producción de varias citocinas como el TNF- $\alpha$  o la interleucina (IL) 1 $\beta$ . La existencia de receptores de estas proteínas en monocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales esto sugiere que podrían tener un efecto directo en la regulación de la producción de citocinas mediante la regulación de vías de señalización mediadas por estos receptores (Legrand et al., 2004).

El látex de *J. neopauciflora* contiene carbohidratos de los cuales se determinó una concentración de 8.56 mg/mL y 6.5 mg/mL de carbohidratos totales y carbohidratos reductores respectivamente. De los carbohidratos detectados por HPLC es relevante la presencia de inulina.

Tomando en cuenta que el látex de *J. neopauciflora* es utilizado para aliviar heridas infectadas por su actividad antibacteriana y ya que la inflamación es la primera fase en la reparación de una herida (Karodi et al., 2009) es relevante la presencia de carbohidratos en el látex, pues generan un medio con bajo contenido

de agua (con una alta osmolaridad) controlando la proliferación de bacterias (Haddad et al., 2000). Cabe resaltar que uno de los carbohidratos detectados fue la inulina, que es un polímero de fructosa (fructano) los fructanos están presentes en los tejidos vegetales como carbohidratos de reserva (Hosono et al., 2003). Estos pueden estar involucrados en la modulación del sistema inmunológico, principalmente incrementando la resistencia a las infecciones y aumentando la actividad antimicrobiana (Choque et al., 2010).

Acorde a los resultados de la prueba con *Artemia salina* el látex resultó ser tóxico, ya que no todos los individuos en contacto con el látex sobrevivieron al ensayo, lo que demuestra que los nauplios en la prueba de toxicidad fueron directamente afectados aunque no en la misma medida de los que fueron expuestos al control positivo (ácido gálico). Los resultados de  $CL_{50}$  fueron medidos a partir de la regresión lineal del porcentaje de muertes en cada concentración. Lo que permite catalogar el látex de *J. neopauciflora* como moderadamente tóxico con una  $CL_{50}$  de 609.41 ppm, según la clasificación del CYTED (1995), lo que difiere con los resultados descritos por Hernández (2010) que reporta el látex con una toxicidad general fuerte.

Entre los compuestos relacionados con la toxicidad que pueden presentar las sustancias extraídas de plantas se encuentran las saponinas, que son heterósidos muy extendidos en el reino vegetal. Principalmente se caracterizan porque en contacto con el agua producen una espuma persistente, propiedad que se ha utilizado ampliamente en muchas partes del mundo. En contacto con la sangre son hemolíticas, ya que interactúan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos y tienen además la capacidad de aumentar la permeabilidad de las paredes celulares (Arteche et al., 1998). Pero también, se han reportado varias actividades biológicas importantes en extractos de plantas entre las cuales se les atribuye un rol importante en la actividad antiinflamatoria, ya que se ha visto que inhibe la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  (Bhattaram et al., 2002; Sirtori, 2001) disminuyendo la liberación de ácido araquidónico y por lo tanto reduciendo la producción de prostaglandinas.

Los alcaloides por otra parte son el grupo más extenso de metabolitos secundarios en plantas, y sus propiedades bioactivas son bastante conocidas dentro de la fitoquímica, brindando en la mayoría de los casos un efecto estimulante, sedante, analgésico o hipnótico (Primo, 2007). Pero también han sido reportados con actividad antiinflamatoria, cicatrizante y antihemorrágica, ejemplo de ello es la taspina, alcaloide aislado de *Croton lechlerii* (Persinos et al., 1979), planta perteneciente a la familia Euphorbiaceae, de la cual el látex es utilizado para detener hemorragias causadas en la piel o músculo (Whitson, 2002).

En los resultados obtenidos en las pruebas para metabolitos se determinó la presencia de saponinas y alcaloides.

En cuanto la actividad antibacteriana, se pudo corroborar que el látex de *J. neopauciflora*, inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas, con lo cual favorece el proceso de reparación del tejido, pues un proceso inflamatorio puede pasar del estado agudo a crónico en presencia de un estímulo irritante como un patógeno, concordando con lo reportado por Hernández en 2013.

## **Conclusiones**

El látex de *J. neopauciflora* presenta capacidad antiinflamatoria administrado tanto de forma tópica como oral, esta última con efecto dependiente de la dosis.

El látex de *J. neopauciflora* presenta una capacidad

El látex de *J. neopauciflora* muestra actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas.

El látex se clasifica como ligeramente tóxico.

En su composición química el látex contiene fenoles, flavonoides, proteínas, carbohidratos, saponinas y alcaloides.

Los principales compuestos identificados fueron Catequina, Glucosa e Inulina.

----- **Apéndices** -----

**Apéndice 1. Inflamación.**

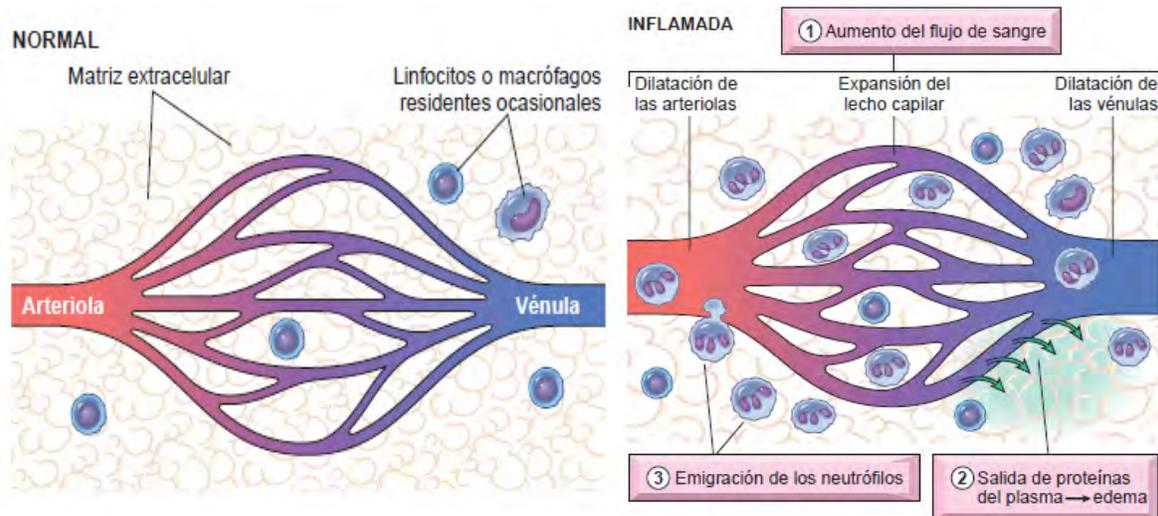
Hipócrates consideró la inflamación como el inicio de un proceso de resolución o de curación. La primera descripción comprensiva de la inflamación se encuentra en los escritos de Aulo C. Celso, quién no fue médico ni científico. En su texto “De Medicina” introdujo los que hasta hoy se consideran los síntomas cardinales de la inflamación: rubor, tumor, calor y dolor (García, 2008).

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas, la reacción inflamatoria se divide en aguda y crónica en función de su duración y al igual que el dolor conduce a la pérdida de funcionalidad de la parte afectada (Robbins et al., 1990). La inflamación aguda presenta edema de manera inmediata o transitoria, suele comenzar inmediatamente después del estímulo lesivo, alcanza un máximo de 5 a 10 minutos después y puede desaparecer en 20 o 30 minutos, si no existe otro estímulo o si no se desencadenan otros mecanismos. Este fenómeno se caracteriza por cambios de flujo y calibre vascular, cambios de la permeabilidad vascular y exudación leucocitaria. Inicialmente la reacción inflamatoria está medida por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos que son activados en fases consecutivas (Robbins et al., 1990 y Bendtzen et al., 1998).

La presencia de material extraño o de una lesión tisular induce a la activación de macrófagos residentes, los receptores de membrana de los macrófagos y los mastocitos reaccionan al estímulo liberando una serie de mediadores de la inflamación ya sean de origen lipídico derivados del ácido araquidónico, aminoácidos modificados o pequeñas proteínas que desencadenan una serie de reacciones con la intención de neutralizar la agresión.

A partir de este evento inicial, se desencadenan una serie de procesos que incluyen el reclutamiento de leucocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), los cuales ejercen un papel amplificador y una cascada de liberación de mediadores de diferentes orígenes: algunos generados por la lesión tisular (bradicinina, factores de la coagulación, serotonina, histamina, prostaglandinas etc.), factores neurogénicos, además de factores de crecimiento (Dray y Urban, 1994; Ferreira et al., 1993; Sorkin et al., 1997).

La inflamación aguda está constituida por tres componentes esenciales: 1) alteraciones del calibre vascular que aumentan el flujo de sangre; 2) cambios estructurales de los microvasos que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos y 3) emigración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de los mismos en el foco de lesión y activación para eliminar el agente lesivo (Robbins et al., 2010).



**Figura 9.** Las principales manifestaciones locales de la inflamación aguda comparadas con la normalidad. 1. Dilatación vascular y aumento del flujo de sangre (responsable del eritema y el calor). 2. Extravasación y depósito extravascular de líquido plasmático y proteínas (edema). 3. Emigración de los leucocitos, que se acumulan en el lugar de la lesión (tomado de Robbins et.al. 2010).

### **Pasos de la inflamación.**

Tras ocurrir un estímulo nocivo en un tejido, el proceso de inflamación inicia con la dilatación de los capilares y arteriolas locales, esto produce un exceso de flujo sanguíneo local.

La vasodilatación es provocada por numerosos mediadores químicos producidos por las células del tejido circundante, entre ellos la histamina prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>) y el factor activador de plaquetas. Acompañado por un aumento de la permeabilidad de las paredes de las vénulas postcapilares locales, que favorece el paso de volumen de líquido a los espacios intersticiales, el paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la salida de agua lo que clínicamente provoca el edema, que se localiza en el área de la lesión. Este incremento de la permeabilidad vascular es favorecido principalmente por la acción de la histamina y las prostaglandinas PGE-2 y PGI-1 (García y Kaski, 1999).

Como parte de la respuesta inflamatoria se activa la cascada de la coagulación para la formación de fibrina. Esto forma una red que ocluye los vasos linfáticos lo que a su vez limita la diseminación de los microorganismos (Jawetz y Melnick 1990; Ganong, 1992).

El calor, otro de los signos clásicos de la inflamación ocurre por una alteración del centro regulador de la temperatura a nivel hipotálamo. Durante el proceso de inflamación se liberan interleucinas (IL-1 y factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  pirógenos y endógenos) que actúan sobre las neuronas del órgano vascular, lo que produce la activación de la prostaglandina sintetasa (ciclooxigenasa) para la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>. Este mediador se difunde hacia la región hipotalámica anterior (subcentro del calor) y provoca un aumento de la temperatura y la liberación de citocinas que generan una respuesta autonómico endocrina (Isselbacher et al., 1994).

El dolor aparece debido a la presión del líquido sobre las terminaciones nerviosas y la irritación nerviosa directa, facilitada por mediadores como la prostaglandina (Mateos et al., 1998).

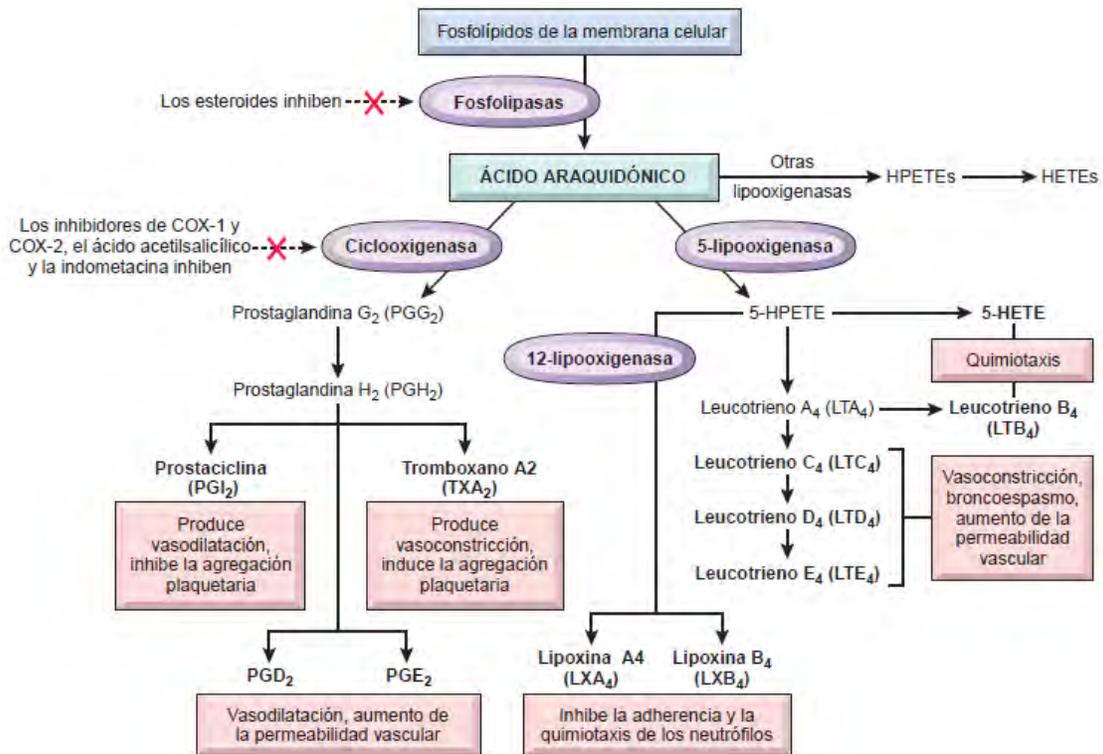


Figura 10. Generación de metabolitos del ácido araquidónico, y su papel en la inflamación, acción de algunos fármacos antiinflamatorios marcados con una X (tomado de Robbins et.al. 2010).

## **Apéndice 2. Medicamentos Antiinflamatorios**

Un medicamento antiinflamatorio es un fármaco capaz de detener el proceso inflamatorio provocado por algún daño en un tejido del cuerpo, estos medicamentos se pueden clasificar según su naturaleza en dos grandes grupos, por una parte los derivados de la hidrocortisona y el cortisol, denominados glucocorticoides o corticosteroides, que actúan básicamente a nivel intracelular, modificando factores de transcripción, el segundo grupo son los antiinflamatorios no esteroideos, mejor conocidos como AINES, que actúan interrumpiendo la producción de prostaglandinas (Aron et al., 2007).

Los antiinflamatorios esteroideos son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados de hormonas producidas por la corteza adrenal, las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras de los glucocorticoides los convierten en agentes terapéuticos invaluable en numerosas enfermedades, su efecto más importante es la inhibición de pasos cruciales de la respuesta tisular ante una lesión (Aron et al., 2007; Bondy, 1964).

Estos tienen influencia sobre el tráfico de leucocitos circulantes y las células inmunes accesorias, suprimen la activación inmunológica de estas células, inhiben la producción de citocinas y otros mediadores de la inflamación y producen resistencia a las citocinas (Serra et al., 1998). Los glucocorticoides afectan preferentemente ciertos grupos de linfocitos T, suprimen la función de linfocitos Th1 y estimulan la apoptosis de eosinófilos; todos estos efectos dependen de alteraciones a nivel de transcripción en los genes susceptibles a glucocorticoides o cambios en la estabilidad del RNA mensajero de numerosas proteínas inflamatorias, por ejemplo los glucocorticoides suprimen la producción de las interleucinas IL-6 y IL-1 $\beta$  mediante la disminución de la velocidad de transcripción de los genes de estas interleucinas y la estabilidad del RNA mensajero. También actúan suprimiendo los genes de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, la ciclooxigenasa 2 y la óxido nítrico sintasa 2, disminuyendo la producción de prostanoïdes, factor activador de plaquetas y óxido nítrico (Goodman y Gilman, 2003).

Los antiinflamatorios no esteroides (AINES) se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo. Se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como también en las osteoartritis, artritis reumatoides y disturbios musculoesqueléticos. Estos fármacos presentan también acción antipirética y analgésica además del efecto antiinflamatorio que los caracteriza. Administrados en dosis únicas o como terapia a corto plazo generan la analgesia adecuada para el tratamiento del dolor, su efecto antiinflamatorio se puede apreciar varios días y hasta por dos semanas (Lüllman et al., 1992)

Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), lo que resulta en la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico, la disminución en la síntesis de prostaglandinas y su importancia en la producción del dolor, inflamación y fiebre, es responsable de la mayoría de sus efectos terapéuticos (Hall et al., 2001)

Los principales problemas con el uso de estos dos tipos de medicamentos son los efectos secundarios a largo plazo que pueden causar, pues en el caso de los glucocorticoides, el uso prolongado puede causar una atrofia en la glándula suprarrenal, mientras que los antiinflamatorios no esteroideos bloquean de forma variable las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX1 y COX2) pudiendo llegar a causar daño a nivel gástrico (Kirwan et al., 1999).

**Apéndice 3. *Jatropha neopauciflora*.**

FAMILIA: Euphorbiaceae

NOMBRE CIENTÍFICO:

*Jatropha neopauciflora*.

NOMBRE COMÚN:

“Sangre de grado”



Figura 11. *Jatropha neopauciflora*



Figura 12. Flor de *Jatropha neopauciflora*

*Jatropha neopauciflora* pertenece a la familia Euphorbiaceae, que es una de las más grandes con más de 200 géneros y 7000 especies. Su floración es durante el periodo de sequía, en el que la planta pierde sus hojas y sólo se observan sus flores de color rojo. Es un arbusto de porte robusto que alcanza alturas hasta de 2 metros (Arias et al., 2001).

La mayoría de las plantas de la familia se distinguen por la combinación de savia lechosa (látex) y el fruto de 3-celdas. En muchas especies el látex es venenoso o al menos altamente irritante y las semillas también poseen propiedades purgativas, o en gran cantidad son venenosas (Standley y Steyermark, 1949). Dentro de esta familia algunos miembros contienen antraquinonas, triterpenoides, epoxiácidos grasos y ácidos grasos insaturados. Los alcaloides cuando están presentes suelen ser del tipo aporfina, piridina, indol, quinoleína o tropano (Trease y Evans, 1983).

El género *Jatropha* está formado por hierbas, arbustos y árboles, cuenta con alrededor de 115 especies distribuidas en las regiones tropicales de ambos hemisferios (Standley y Steyermark, 1949). *J. neopauciflora* es utilizada en San Rafael Coxcatlán, Puebla para aliviar los “granitos” que salen dentro de la boca a los niños, las postemillas, una muela que duele a causa de caries, se usa también en casos de fuegos en los labios (herpes simple), también se aplica sobre las heridas y en la elaboración de jabones para problemas de caída de pelo (Arias et al., 2001 y Canales et al., 2006).

De la planta lo que la gente del poblado de San Rafael emplea para aliviar los padecimientos antes mencionados es el látex, que al igual que en muchas otras especies de la familia Euphorbiaceae, es de color rojo y se puede obtener haciendo una incisión al tallo de la planta, del cual comienza a salir de forma lenta. Los pobladores toman directamente con los dedos y lo untan en la región afectada.

#### Apéndice 4. Zona de Colecta.

El látex de *Jatropha neopauciflora* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de San Rafael Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' latitud norte, 97°07' y 97°09' longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 13).

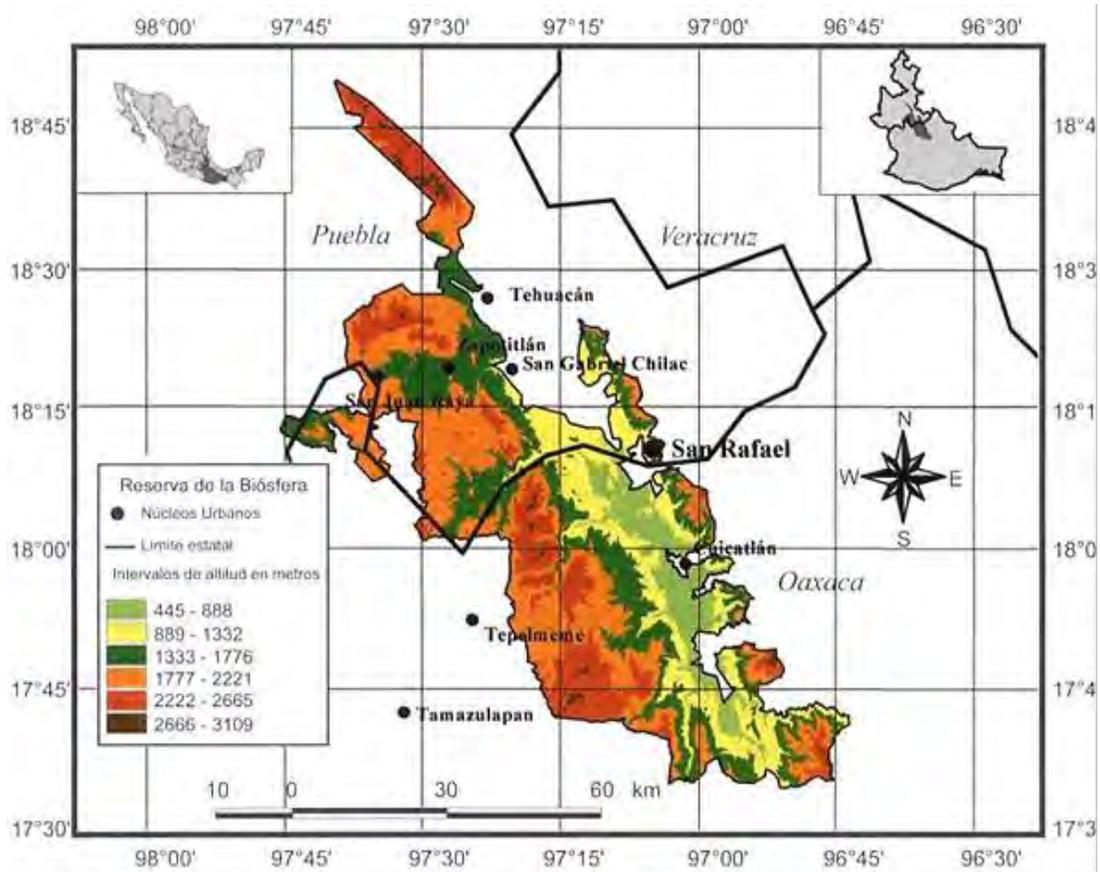


Figura 13. Ubicación geográfica del poblado.

#### Clima

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Se calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998

los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

### *Hidrografía*

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

### *Edafología*

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

### *Vegetación*

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fruticosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

### *Población*

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y para 2010 contaba con 258 habitantes (129 mujeres y 129 hombres) (SEDESOL, 2010). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

## **Apéndice 5. Edema Plantar Inducido por Carragenina.**

El método de edema plantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de  $\lambda$ -carragenina (un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondus crispus*) a nivel de la aponeurosis plantar de rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio medida por la liberación de diversos autocoides (histamina, serotonina, bradicidina y prostaglandinas) (Giráldez, 2001). En una primera fase (0-1 h) se inicia el proceso inflamatorio por la liberación de aminas y péptidos vasodilatadores (histamina, serotonina y bradicinina). En una segunda fase (1-6 h) se liberan prostaglandinas y hay infiltración de neutrófilos, cuya activación libera otros mediadores, incluyendo radicales libres que potencian la respuesta inflamatoria. El máximo es aproximadamente a las 4 h (Yueqin, 2007).

En la fase tardía, comprendida en el periodo que va desde la 1<sup>a</sup> hasta la 5<sup>a</sup> hora, es cuando los AINES tienen mayor efecto, lo que demuestra que el proceso está mediado básicamente por la COX inducida o COX-2. El método permite estudiar compuestos que se administran vía oral, lo que supone una forma común de administración en la práctica terapéutica (Yueqin, 2007).

Se utilizaron 45 ratas Wistar hembra con un peso de 200 a 250 g, procedentes del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, divididos en 9 grupos experimentales. Los animales se mantuvieron en ayuno de 8 horas y acceso libre a agua previo y durante el ensayo.

Al inicio del ensayo se les administró el látex y los medicamentos empleados como controles positivos y testigo, una hora después se procedió a registrar el tamaño de las extremidades posteriores para tener la referencia del volumen antes del proceso inflamatorio.

En la pata derecha se inyectó 0.1mL de carragenina al 1%, y en la pata izquierda se inyectó solución fisiológica (NaCl 9%), después de la inyección de carragenina se registró cada hora el tamaño de las extremidades durante 4 horas.

**Apéndice 6. Capacidad Antioxidante (Okusa et al., 2007).**

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición de un compuesto activo a diferentes concentraciones (1- 100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS.

Se utilizan las concentraciones a partir del stock de 5 mg en 5 mL de MeOH para la curva de actividad antioxidante como se muestra en la tabla. (Para las concentraciones de 1-4 ppm se toman 20 µL del stock original y se agregan 180 µL de agua destilada).

[ ] ppm	µL stock	µL MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960

[ ] ppm	µL stock	µL MeOH
5	5	995
6	6	994
7	7	993
8	8	998
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de las diferentes concentraciones (1-100 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH (0.004g en 100 mL), inmediatamente después se protege de la luz durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el blanco consistie en 200 µL de metanol y como control positivo se usará quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema.

### **Cálculo del porcentaje de reducción**

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(C - E)}{C} \times 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH.

E= Absorbancia del experimento (Mezcla DPPH + (extracto o quercetina)).

### **Cálculo de la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>)**

Se grafica la concentración contra el porcentaje de reducción, se realiza una regresión lineal y mediante la ecuación de la gráfica se realiza una despeje para sustituir la variante “Y” y así obtener la concentración del extracto que se requiere para reducir al DPPH en un 50%.

### Capacidad antioxidante

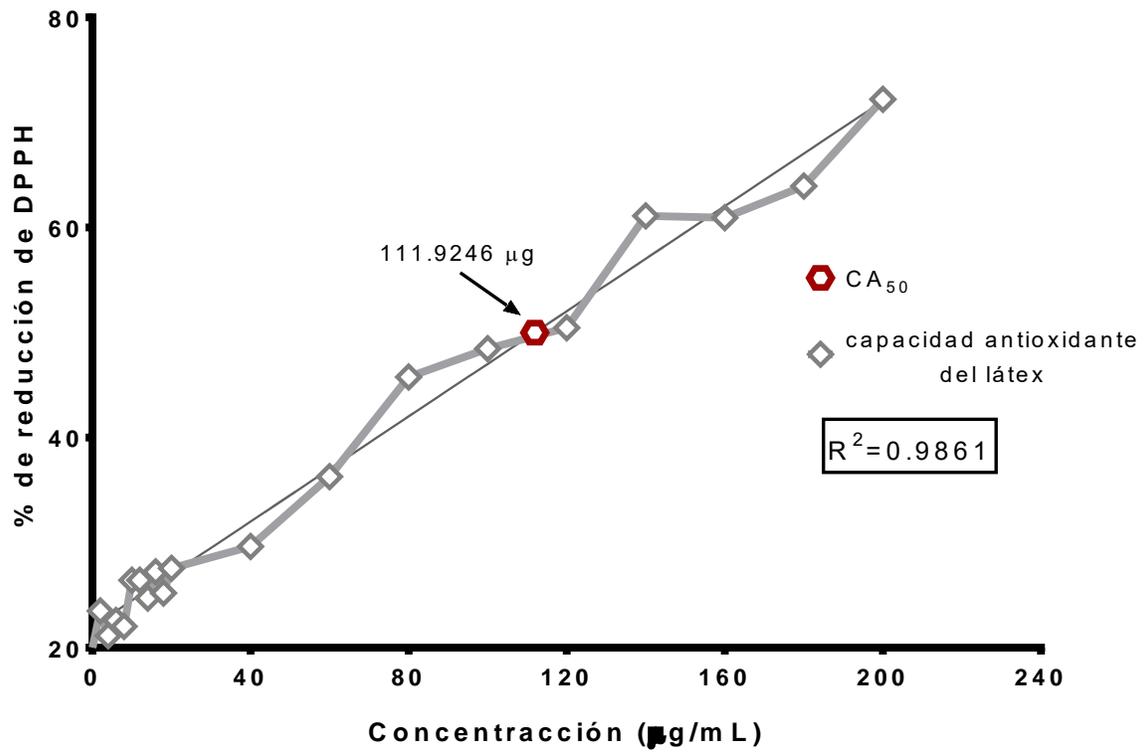


Figura 14. Capacidad antioxidante del látex de *J. neopauciflora*, determinación de la  $CA_{50}$ .

## **Apéndice 7. Cuantificación de Fenoles Totales (Método modificado de Singleton et al., 1999)**

La concentración de fenoles totales se mide por espectrofotometría, con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en el estado de oxidación  $6^+$ . La reacción con ciertos agentes reductores provoca la formación de molibdeno y tungsteno con un estado de oxidación entre  $5^+$  y  $6^+$  formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a tres grupos OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Para la curva de calibración se emplea una solución estándar de ácido gálico a 0.2 mg/mL y a partir de esta se toman alícuotas para obtener las siguientes concentraciones: 0.00625, 0.012, 0.05 0,1 y 0.2 mg/mL para la curva patrón de ácido gálico. A cada una se le agrega agua destilada para obtener un volumen final de 1mL.

Con el látex se preparó una solución estándar (200  $\mu\text{g/mL}$ ), de la cual se toma una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  y se agregan 750  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se obtienen las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

## Fenoles Totales

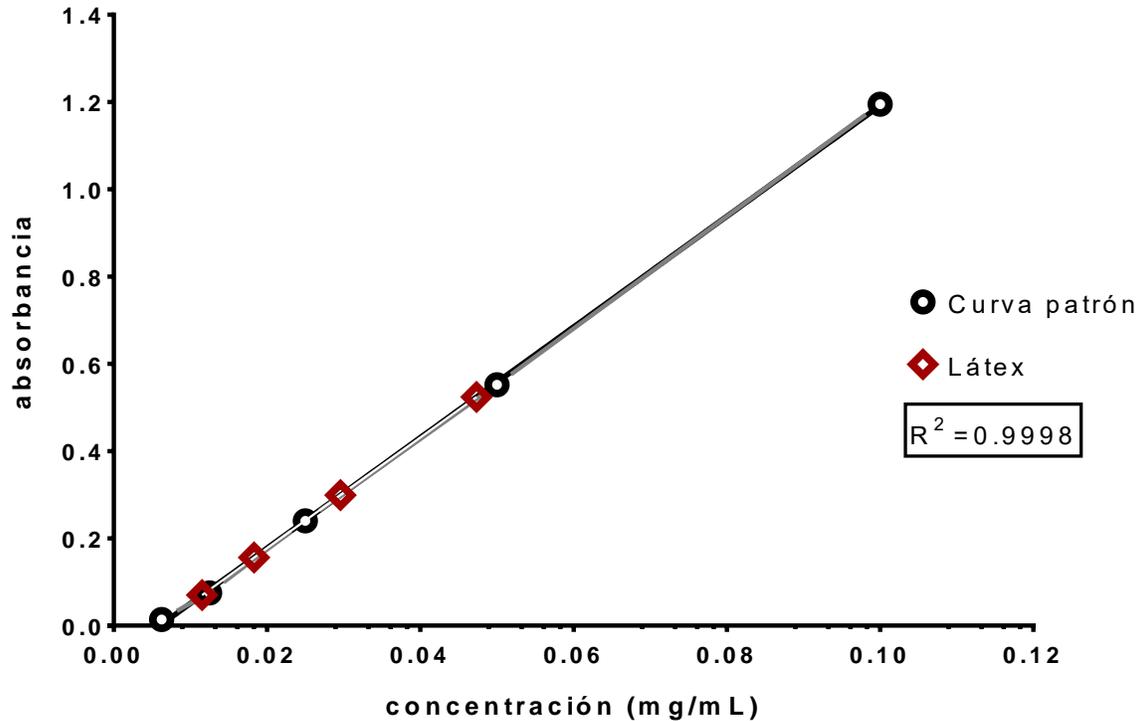


Figura 15. Curva patrón de ácido gálico, determinación de la concentración de fenoles totales en el látex de *J. neopauciflora*.

### **Apéndice 8. Contenido de Flavonoides (Ramamoorthy y Bono, 2007).**

La concentración de flavonoides se mide por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ). El catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en metanol, produciendo en el análisis espectrofotométrico un desvío a longitudes de onda más largas y una intensificación de la absorción. Por lo tanto es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, en particular los ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Esto se hace en un espectrofotómetro de 425 nm utilizando cloruro de aluminio al 2 % en metanol. En estas condiciones el complejo flavonoide aluminio absorbe a una longitud de onda mucho mayor que el flavonoide sin presencia del agente complejante. Los ácidos fenólicos, incluidos los que forman los complejos con  $\text{AlCl}_3$  absorben a longitudes de onda mucho más bajas evitando así la interferencia de las medidas de absorbancia.

Se prepara una curva de calibración con quercetina, flavonoide que consiste de 3 anillos aromáticos y 5 grupos hidroxilo. Se pesan 3 mg de quercetina y se disuelven en 3 mL de MeOH grado HPLC

A partir de esta solución se toman las alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones: 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm, para la concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 ppm se toman 20  $\mu\text{L}$  que llevan 0.02 mg (20  $\mu\text{g}$ ) y se agregan 180  $\mu\text{L}$  de MeOH, para un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . a todos se les agregara 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 2%.

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ Stock Quercetina	$\mu\text{L}$ MeOH	( $\text{AlCl}_3$ ) al 2%
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

De stock 3:3

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ Stock Quercetina	$\mu\text{L}$ MeOH	( $\text{AlCl}_3$ ) al 2%
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Para el análisis de flavonoides totales del látex, se preparó una solución estándar de 0.2mg/mL en metanol, a la cual se adiciona 1mL de solución de  $\text{AlCl}_3$  y su correspondiente blanco se prepara con 1 mL del stock y 1 mL de MeOH sin  $\text{AlCl}_3$ , el blanco para la curva patrón se prepara con 1 mL de metanol y 1 mL de solución de  $\text{AlCl}_3$ . Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.

Se grafica la concentración contra la absorbancia de la curva patrón y se realiza el análisis de regresión lineal para interpolar los datos de la muestra.

Los resultados se expresan como mg equivalentes de quercetina (EqQ)

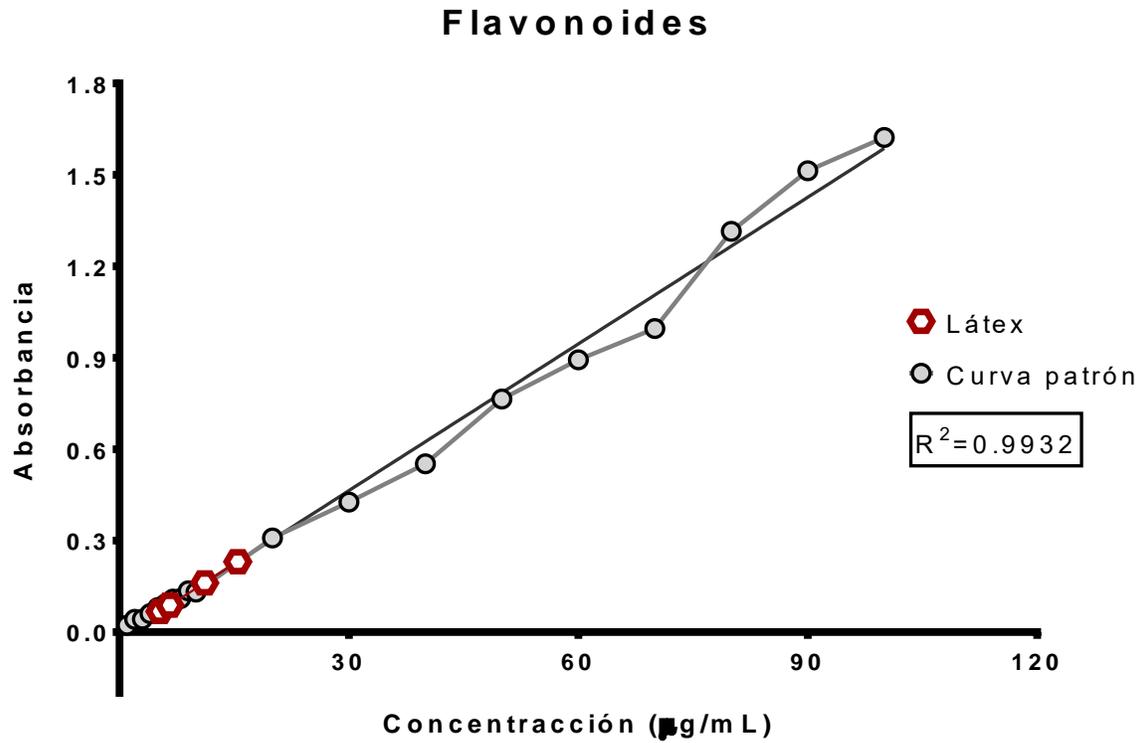


Figura 16. Curva patrón de quercetina determinación de la concentración de flavonoides en el látex de *J. neopauciflora*.

### **Apéndice 9. Cuantificación de Proteínas (microtécnica de Bradford)**

Para la extracción de proteínas se utilizó 1 mL de látex y se depositó en un tubo de microcentrífuga con 1mL de MCA (metanol:cloroformo:agua 12:5:3), y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 1 mL más de MCA (esto se realizó tres veces más). Los sobrenadantes se combinaron y se les agregó 1 mL de cloroformo. Se retiró la fase clorofórmica y el resto se empleó para realizar la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, para el cual se prepara una curva de albúmina (2 mg/5 mL agua) con la siguiente serie de tubos.

---

	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina (µg).	10	8	6	4	2	1	--
Patrón de Albúmina (µL).	100	80	60	40	20	10	--
Problema (µL).	--	--	--	--	--	--	10µL
Reactivo de Bradford (µL).	40	40	40	40	40	40	40

---

BSA: albúmina bovina sérica

Las reacciones se hacen en una placa de ELISA mezclar bien y leer a 620nm.

#### **Reactivo de Bradford**

Pesar 100mg de Azul de Commasie G250 y disolver en 50mL de etanol al 96%, agregar 100mL de ácido fosfórico al 85% y aforar a 1L con agua destilada, filtrar y almacenar en frasco ámbar, macerar durante 12 horas.

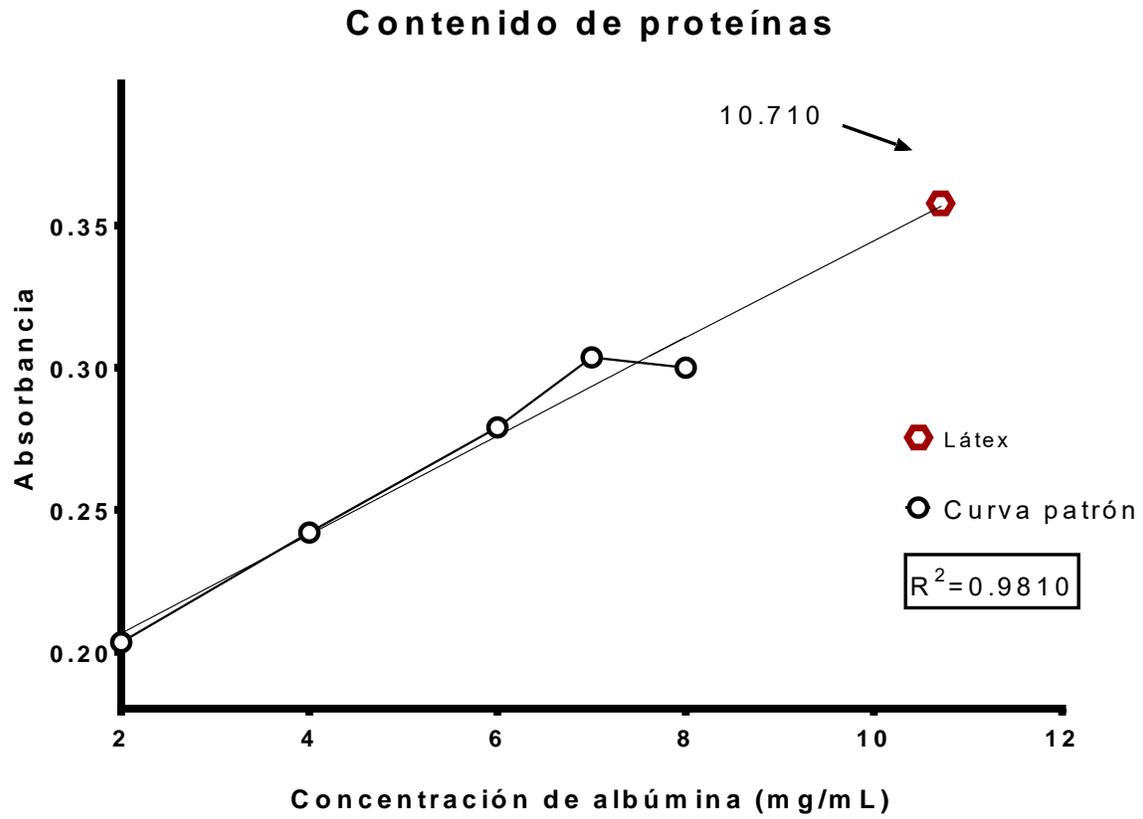


Figura 17. Determinación del contenido de proteínas en el látex de *J. neopauciflora* en la curva patrón de albúmina.

#### **Apéndice 10. Extracción de Carbohidratos (González y Peñalosa 2000).**

1. Se toman 500  $\mu$ L de látex y se le agregan 2mL de etanol frío al 80%
2. Se enfría en un baño de hielo por 15 minutos para precipitar proteínas.
3. Se centrifuga a 10,000 rpm por 15 minutos, se recupera el sobrenadante y se resuspende la pastilla 2 veces más y se juntan los sobrenadantes.
4. Se evapora el etanol hasta que se seque y se reconstituye en 5mL de agua destilada.

#### **Apéndice 11. Carbohidratos Totales (método de Antrona)**

La reacción de antrona constituye la base de un método rápido y conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexurónicos, ya sea que estén libres o formando parte de un polisacárido, la solución azul verdosa muestra absorción máxima a 630nm, aunque en algunos carbohidratos pueden dar otros colores. Esta reacción no es adecuada si en la muestra también se hallan presentes proteínas que contengan grandes cantidades de triptófano, puesto que en este caso se obtiene una coloración roja.

Para la cuantificación de carbohidratos por este método se requiere preparar una curva patrón de glucosa (stock 1mg de glucosa/5 mL de agua) de la siguiente forma:

tubo	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de glucosa (mL)	--	0.125	0.25	0.5	0.75		
Problema (mL)						0.5	1.0
Agua destilada (mL)	2.5	2.375	2.25	2.0	1.75	2.0	1.5

Los tubos se ponen en hielo y a cada tubo se le agregan 5 mL de solución de antrona al 0.2%, que se prepara al momento disolviendo 0.2g de antrona en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcla y se somete a ebullición por 10 minutos

Posteriormente se lee en un espectrofotómetro a 630 nm, con los tubos 2 a 5 se construye la curva patrón y mediante una regresión lineal se interpolan los valores de los tubos 6 y 7.

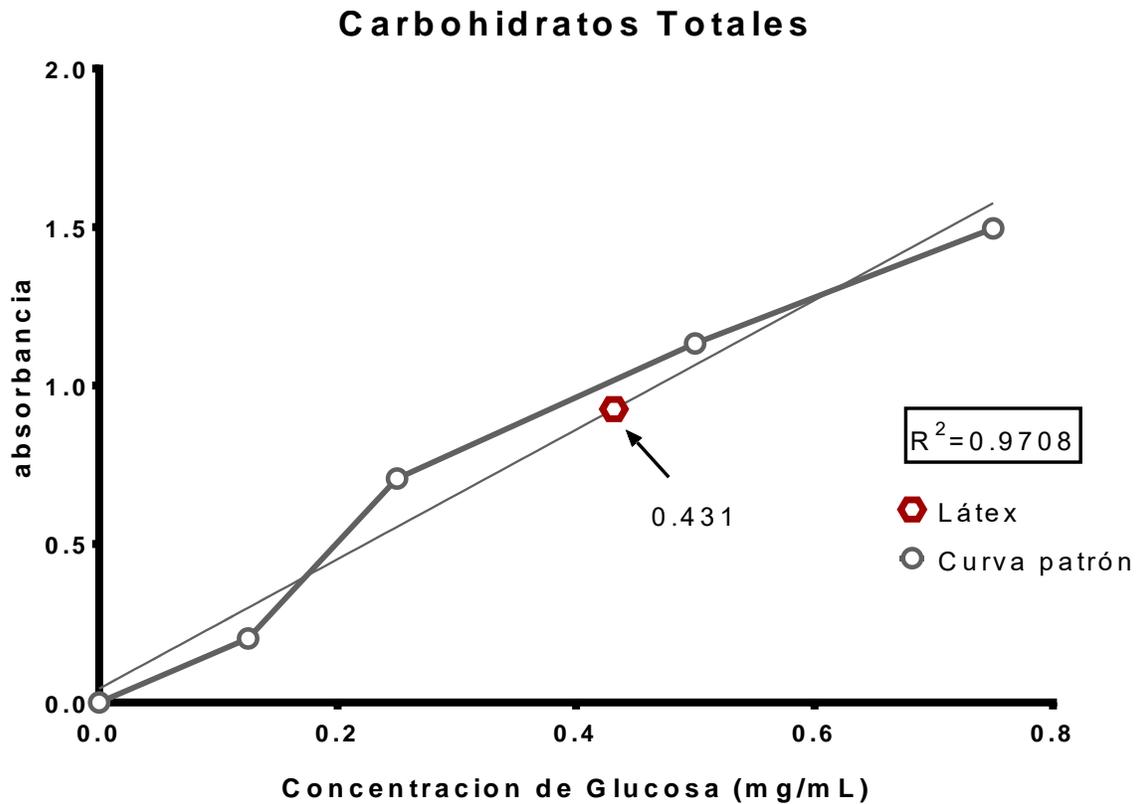


Figura 18. Determinación de la concentración de carbohidratos totales en el látex de *J. neopauciflora* en la curva patrón de glucosa.

**Apéndice 12. Carbohidratos Reductores (Método de Nelson-Somogyi). (González y Peñalosa 2000).**

Se hace reaccionar un azúcar reductora (como glucosa) se forma óxido cuproso de color rojo, debido a la donación de electrones del reductor al oxidante (el ión  $\text{Cu}^{2+}$  se transforma en ión  $\text{Cu}^+$ ). Ya que el óxido cuproso precipitado insoluble no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con reactivo de arsenomolibdato para transformarse a un ión verdoso que se mide en el espectrofotómetro.

Al estar los reactivos en exceso el agente reductor es el factor limitante; por lo cual se puede usar para determinar la cantidad de  $\text{Cu}_2\text{O}$  que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente. La sensibilidad es de 25 a  $250\mu\text{g/mL}$ .

1. Se construye la siguiente serie de tubos:

(mL)	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa	--	0.25	0.5	0.75	1.0	--
Agua destilada	1.0	0.75	0.5	0.25	--	--
Problema	--	--	--	--	--	1.0
Reactivo de cobre	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

2. Se tapan los tubos con papel aluminio y se colocan en baño maría hirviendo por 20 minutos, enfriar con agua corriente.
3. Se agrega a cada tubo 1mL del reactivo de arsenomolibdato.
4. Agregar a cada tubo 7.5mL de agua destilada.
5. Mezclar por inversión cada tubo y leer en el espectrofotómetro a 565nm utilizando el tubo 1 como blanco.
6. Se construye una curva patrón y se interpola la absorbancia de los tubos problema.

Patrón de glucosa ( $200\mu\text{g/mL}$ ).

Disolver 1mg de glucosa en 5mL de agua destilada.

#### Reactivo de Cobre

400mL de agua destilada + 40g de carbonato de sodio anhidro y disolver. Agregar 7.5g de ácido tartárico y disolver otra vez. Enfriar si es necesario. Agregar 4.5g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y disolver. Aforar a 1L y envasar en frasco ámbar. Dejar madurar por 2 semanas.

#### Reactivo de Arsenomolibdato

Disolver 50gr. de molibdato de amonio en 900 mL de agua destilada, agregar 42mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado lentamente y añadir 50 mL de solución de ortoarseniato disódico al 12% ( $\text{NaHAsO}_4$ ). Mezclar bien e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas. Envasar en frasco ámbar.

### Carbohidratos Reductores

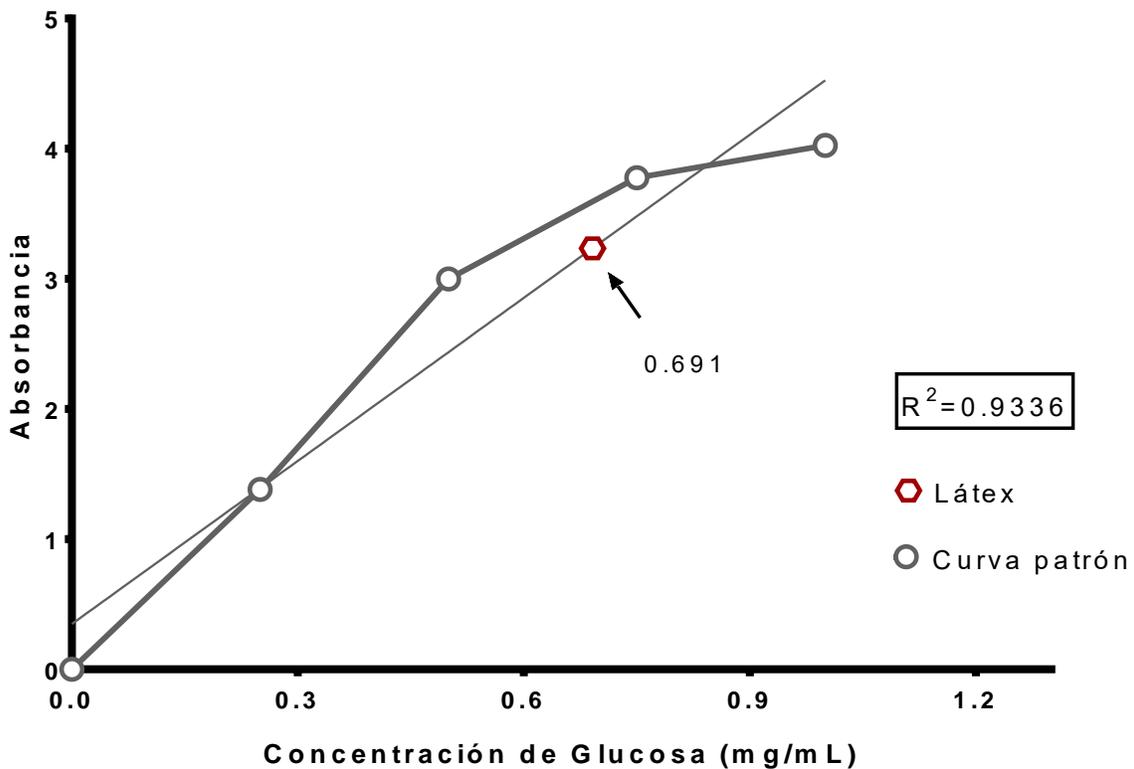


Figura 19. Determinación de la concentración de carbohidratos reductores en el látex de *J. neopauciflora* en la curva patrón de glucosa.

### **Apéndice 13. Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

**(Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002).**

Éste método es ampliamente usado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). Es un tipo de cromatografía en columna, se utilizara para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Los elementos que participarán en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra. En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presentará pequeñas partículas con ciertas características químicas en su superficie. La muestra pasará mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra que se analizará será introducida y sus componentes se retrasarán diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantarán por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra dependerá de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tardará un compuesto a ser eluído de la columna se denominará tiempo de retención y se considerará una propiedad característica que identificará a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

#### **Condiciones para la identificación de compuestos fenólicos.**

Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm.

Flujo de 1 mL/min.

Detector de arreglo de diodos (DAD)

Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm

#### **Condiciones para la identificación de carbohidratos.**

Columna Supelcagel Ac de 300 x 7.5mm ID

Temperatura de 80 °C y detector de refracción de luz

Fase móvil acuosa con un flujo de 1.2 mL/min..

## Apéndice 14. Toxicidad General

### (Método modificado de Niño et al., 2006)

El ensayo se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). Se prepara una solución para un litro de agua en el que se agregaron 5 g de NaCl y 2 g de NaHCO<sub>3</sub>, posteriormente se pesan e incorporan a la solución 0.5 g de quistes de *A. salina*.

Para hacer eclosionar los quistes se dejan durante 24 a 48 horas con buena oxigenación, iluminación (luz blanca) y temperatura de 25 °C aproximadamente.

En frascos de vidrio transparentes se colocan 10 mL de agua de mar, se aforan los frascos hasta 10 mL, posteriormente se colocan 10 larvas por frasco.

La concentración del problema a ensayar son 1000, 100 y 10 ppm.

**Control Positivo:** ácido gálico.

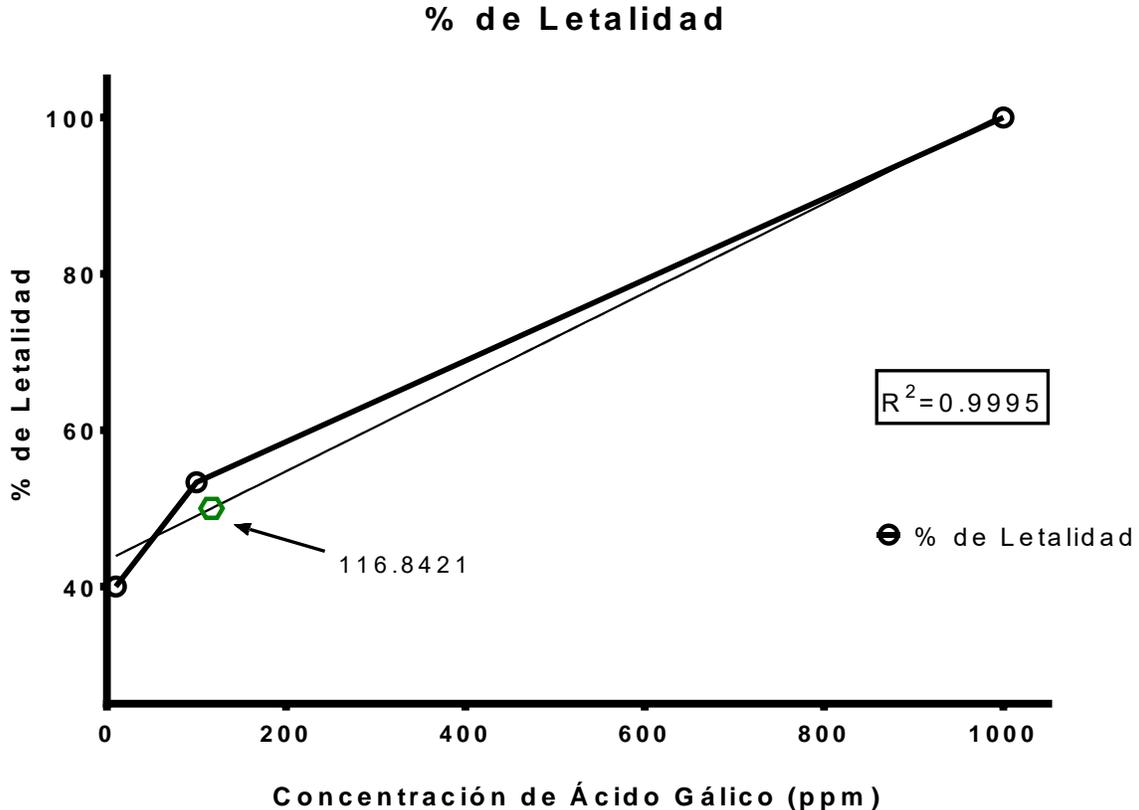


Figura 20. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del ácido gálico

Los cultivos se mantienen iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 horas.

### Interpretación de resultados

Se cuenta el número de larvas sobrevivientes, las cuales se desplazan de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determina para cada extracto interpolando en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/mL y a través del análisis de regresión lineal.

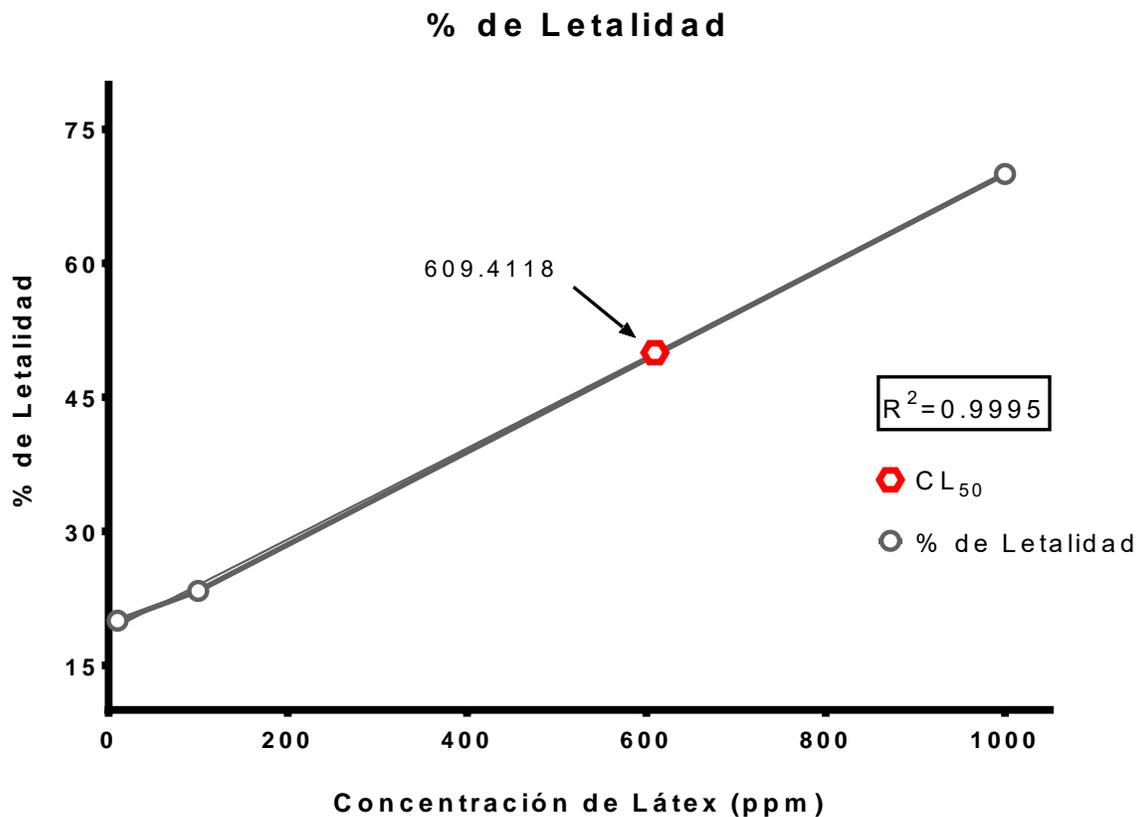


Figura 21. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del látex.

## **Apéndice 15. Actividad Antibacteriana (Beer y Sherwood, 1945)**

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer

Ésta técnica se emplea para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana, de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, los cuales se difunden a través del agar desde el disco de papel. El crecimiento del microorganismo comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco menor concentración, formándose un halo de inhibición circular donde la sustancia no alcanza a inhibir el crecimiento y cuyo diámetro será proporcional a la potencia de la sustancia frente al microorganismo.

Medio

Para el ensayo con bacterias se emplea medio de cultivo Müeller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Se debe dejar incubar las cajas 24 horas previas a realizar la prueba de susceptibilidad para verificar la ausencia de contaminación del agar.

Inóculo

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias y se sumerge en 10 mL de caldo Müeller-Hinton para el ensayo en bacterias, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 18 a 24 horas.

Posteriormente se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de bacterias, antes de retirarlo se eliminará el exceso de líquido, con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton a temperatura ambiente. Finalmente, se siembra por estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Preparación de sensidiscos

Se utiliza sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5, posteriormente se aplicará la sustancia a evaluar en la prueba de susceptibilidad.

Extracto o fracciones activas

Se emplea el látex de forma directa aplicando 10 µL por sensidisco.

Control positivo

Se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol. Posteriormente se deja evaporar el solvente de los discos impregnados durante 12 horas.

#### **Apéndice 16. Detección de saponinas.**

El método estándar para la detección de saponinas consta en agregar agua destilada a la muestra a probar, posteriormente se somete a agitación constante durante 5 minutos, en los cuales si hay presencia de saponinas, se forma una gruesa capa de espuma, ya que estos compuestos tienden a incrementar la tensión superficial, la espuma formada perdura largos periodos de tiempo.

En la prueba del látex se realizó el ensayo de espuma con 2 mL de agua destilada y 200 µL de látex.

#### **Apéndice 17. Detección de alcaloides.**

Las técnicas se basan en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio y tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio o en el campo.

Una de las técnicas más usadas para su detección se realiza con el reactivo de Dragendorff en la cual se disuelve la muestra en ácido clorhídrico al 5%, posteriormente se filtra y se le agrega el reactivo de Dragendorff (solución de yoduro potásico de bismuto). La formación de precipitado de color rojo indica la presencia de alcaloides. Para confirmar los resultados de la prueba se sigue la

misma metodología pero se agrega reactivo de Mayer, si la solución se torna blanca se considera resultado positivo.

## Literatura Citada

1. Abdullah, N., Oskoueian, E., Zuhainis, S. W., Rahman, O. A., Ahmad, S., Kuan, B. W., Zolkifli, N. A., Hendra, R. y Wan, H. Y., 2011. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* L. *Journal of Medicinal Plants*. 5, 49-57.
2. Ahmed, A. S., Chopde, C. T. y Kashmiri, Z. N., 2015. Assesment of anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *Jatropha gossypifolia* in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Scienes*. 7, 258-260.
3. Argueta, A. y Zolla, C., 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, Instituto Nacional Indigenista, México.
4. Arias, A., Valverde, M., Reyes, J., 2001. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. UNAM.
5. Aron, D. C., Findling, J. W. y Tyrrell, J. B., 2007. Glucocorticoids & adrenal androgens in Gardner DG, Shoback D, eds. Greenspan's basic & clinical endocrinology. 8a ed. McGraw Hill, New York.
6. Arteché, A., Vanaclocha, B. y Güenechea, J. I., 1998. Fitoterapia y Plantas medicinales. 3a ed, Masson. Barcelona, España.
7. Beer, E. J., Sherwood, M. B., 1945. The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *Journal of Bacteriology*. 50, 459-467.
8. Bendtzen, K., Muller, K., Herner, E., Stagg, A. y Woo, P., 1998. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *British Journal of Rheumatology*. 37, 562-569.
9. Bequette, F., 1997 Los hombres y las plantas. El Correo de la UNESCO. Organización de las Naciones Unidas. Paris, Francia.
10. Bhattaram, V. A., Graefe, U., Kohlert, C., Veit, M., Derendorf, H., 2002. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine. International Journal of Phitotherapy and Phitopharmacology*. 9, 1-33.

11. Bondy, P.K., 1964. Los corticosteroides en perspectiva, Corticosteroides en la Práctica Médica. ed. Toray Barcelona, España.
12. Can-Aké, R., Erosa, R., May, P., Peña, R. y Peraza, S., 2004. Bioactive terpenoids from roots and leaves of *Jatropha gaumeri*. Journal of the Mexican Chemical Society. 48, 11-14.
13. Canales, M., Hernandez, T., Caballero, J., Romo de vivar, A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales de San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Acta botánica. 75, 21-43 .
14. Choyillas, T., 2000. Inflamación aguda y crónica. en Patología Estructural y Funcional, ed. Mc Grawn – Hill. España.
15. Choque, G.T., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M., 2010. Immunomodulatory effects of fructans. Food Research International. 43, 1231–1236.
16. Collins, T., 2001. Inflamación aguda y crónica. Patología Humana. 9a ed. Elsevier. España.
17. Cruz, S. J., 2007. Más de 100 plantas medicinales. ed. Obra social de la caja de canarias, Canarias.
18. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), 1995. Manual de Técnicas de Investigación.
19. Dimayuga, R. E., 2010. Importancia y potencial de la medicina tradicional de México, Foro consultivo, científico y tecnológico. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
20. Dray, A. y Urban, L., 1994. New pharmacological strategies for pain relief. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 36, 253-280.
21. Evans, F. J., 1983. Proinflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. . Journal Seek entry for Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 44, 1-99.

22. Fagetti, A., 2004. Fundamentos de la medicina tradicional mexicana, Instituto de Ciencias Sociales y Humanidades, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
23. Falodun, A., Okunrobo, L.O. y Uzoamaka, N., 2006. Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae). African Journal of Biotechnology. 5, 529-531.
24. Falodun, A., Igbe, I., Erharuyi, O. y Onyinye, J., 2013. Chemical characterization, anti-inflammatory and Analgesic Properties of *Jatropha multifida* Root Bark. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 17, 357-362.
25. Fell, J. M., 2005. Control of systemic and local inflammation with transforming growth factor beta containing formulas. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 29, 126-128.
26. Fernández, B. Ma. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
27. Ferreira, S., Lorenzetti, B. y Cunha F., 1993. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. Agents Action. British Journal of Pharmacology. 38, 7 - 9.
28. Fitzgerald, G. y Austin, Y. C. S., 2001. COX-2 inhibitors and cardiovascular system. Clinical and Experimental Rheumatology. 19, 6-31.
29. Fitzgerald, G. y Patrono, C., 2001. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. The New England Journal of Medicine. 345, 433-42.
30. Florez, J., Armijo, J. y Mediavilla, A., 2013. Farmacología Humana. 6ta. Ed.. Masson. Barcelona, España.
31. Ganong, W., 1992. Fisiología medica 13a Ed. El manual moderno, México.
32. García, E., 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. Instituto de Geografía. UNAM, México.

33. García, M. y Kaski, X., 1999. Cardiopatía isquémica: marcadores de la inflamación y riesgo cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*. 52, 990-1003.
34. García, A. y Delgado, G., 2006. Cytotoxic cis-Fused Bicyclic Sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora* *Journal of Natural Products*. 69, 1618-1621.
35. García, M. V., Crespo, I., Collado, P., Esteller, A., Sánchez, C. S., Tunon, M. J. y González G. J., 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 557, 221-229
36. García, B., 2008. Inflamación. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 102, 91-159.
37. Giráldez, R., 2001. Cursos sobre modelos de inflamación. En: Taller nacional sobre inflamación. Sociedad Cubana de Farmacología. La Habana, Cuba.
38. González, M. S., Peñalosa, C. I., 2000. *Biomoléculas (Métodos de Análisis)*. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Edo. De México.
39. Goodman, L. y Gilman, A., 2003. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10a ed. McGraw-Hill, Interamericana México D.F.
40. Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M. y Burton, G., 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 25-31.
41. Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27, 1–93.
42. Gutiérrez, A. D., Ortiz, G. C. y Mendoza, C. A., 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

43. Haddad, M. C., Bruschi, L. C., Martins E. A., 2000. The effect of sugar on the process of cicatrization of infected surgical incisions. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* 8, 57-65
44. Hall, R. V., Murillo, P. N., Rocha, P.M. y Rodríguez, V. E., 2001. Antiinflamatorios no esteroidales AINES. Centro Nacional de Información de Medicamentos. Universidad de Costa Rica.
45. Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68, 2831- 2846
46. Hernández, H. A., 2010. Actividad antifúngica de *Jatropha neopauciflora* pax. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Edo. de Méx.
47. Hernández, H. A., 2013. Comparación de las propiedades biológicas de dos especies del género *Jatropha*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.
48. Hosono, A., Ozawa, A., Kato, R., Ohnishi, Y., Nakanishi, Y., Kimura, T., Nakamura, R., 2003. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67, 758– 764.
49. Howard, P., 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular Risk. *Journal of American College of Cardiology*. 43, 519-25.
50. Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson J., 1994. Principios de medicina interna 13a ed. Interamericana McGraw-Hill. España.
51. Jawetz, J., Melnick, J., 1990. Diccionario Médico 3a ed. Masson. España.
52. Jeong, D. K., Sharma, N., Samarakoon, K. W., Gyawali, R., Park, Y., Sun-Jin L., Sung, J. O., Tae-Hoon, L., 2014. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of *Euphorbia hirta* ethanolic extract. *Molecules*. 19, 14567-14581.
53. Kalita, P., Barman, T. K., Pal, T. K., Kalita, R., 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* L. *Journal of Drugs Delivery & Therapeutics*. 3, 33-37.

54. Karodi, R., Jadhav, M., Rub, R. and Bafna, A., 2009. Evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Rubia cordifolia* L. (Indianmadder) in mice. International Journal of Applied Research in Natural Products. 2, 12-18.
55. Kirwan, J. R., Bálint, G., Szebenyi, B., 1999. Anniversary: 50 years of glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 38, 100-2.
56. Korhonen, H., Pihlanto, A., 2003. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. Current Pharmaceutical Design. 9, 1297-1308.
57. Kwon, K. H., Murakami, A., Tanaka, T., Ohigashi, H., 2005. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. Journal of Biochemistry and Pharmacology. 69, 395-406.
58. Lange, R., Hayden, P., Chignell, C., Luster, M., 1998. Anthralin stimulates keratinocyte-derived proinflammatory cytokines via generation of reactive oxygen species. Inflamm. Res. 47, 74-181.
59. Lee, J. K., Choi, S. S., Suh, H. W., 2003. The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NFkappaB. Life Sciences. 73, 595 - 609.
60. Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A., Mazurier, J., 2004. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. Biometals. 17, 225-229.
61. Lorente, L. Ma. D., 2006. Estudio farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Editorial de la Universidad de Granada, España.
62. Llanes, D. S., 2009. Actividad inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae*. Tesis de maestría. Universidad nacional de Colombia.
63. Lüllman, H., Mohr, K., Ziegler, A., 1992. Atlas de Farmacología Ediciones científicas y técnicas S.A. Barcelona, España.

64. Majid, M., Rashid, K. M., Ali, S. N., Ul, Haq, I., Asad, F. M., Ullah, S., Sharif A., Zahra, Z., Younis, T., Sajid, M., 2015. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. *Complementary and Alternative Medicine*. 15, 349 – 353.
65. Martínez, G. N., 2013. Evaluación del efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de *Jatropha dioica* en ratones albinos suizos cepa ICR mediante Ensayo cometa in vivo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
66. Martínez, V. M., Ramírez, A. T., Lazcano, M. E., Bye, R., 1999. Anti-inflammatory active compounds from the n-hexane extract of *Euphorbia hirta*. *Mexican Chemical Society*. 43, 103-105.
67. Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G., 2002. *Bioquímica*. 3a ed. Addison Wesley. España.
68. Mateos, R. F., Pérez, A. J., Blazquez, C. J., Plaza, A. J., Lozada, G. J., 1998. Manifestaciones clínicas de la inflamación. *JANO*. 1266, 65-68.
69. Medina, G. S., Fuentes, G. C., Leyva, L. N., Valdez, O. A., Aréchiga, C. J., Moreno, H. C., Martínez, A. A., 2011. Identificación de actividad medicinal en pasta de semilla de *Jatropha* no toxica. Fundacion Produce AC. SAGARPA.
70. Medina, S. J., 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias, México.
71. Moreira, A. S., Spitzer, V., Schapoval, E. E., Schenkel, E. P., 2000. Anti-inflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research*. 14, 638-644.
72. Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S., 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2, 43-52.
73. Naengchomnong, W. T. Y., Wiriyachitra, P., Okamoto, K.T., Clardy, J., 1986. Isolation and structure determination of four novel diterpenes from *Jatropha curcas*. *Tetrahedron Letters*. 27, 2439–2442.

74. Niño, J., Correa, Y. M. y Mosquera, O. M., 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology*. 44, 14-18.
75. Olutayo, S. S., Busola F., Ogunnaike, I. R., Okutachi, E. S., Anucha, Omolola, O., Gdobi, F., Onajobi, D., 2013. Comparative anti-inflammatory activities of *Jatropha curcas*, *Ocimum gratissimum* and *Solanum scabrum* leaves. *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 3, 59-66.
76. Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112, 476-481.
77. Pabón, L. C., Hernández, R. P., 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales, Tesis de Doctorado. Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
78. Perea, D. X. 2013. Análisis de compuestos fenólicos y valoración de la bioactividad de extractos de testa de *J. curcas* L. no toxica Tesis de Maestría Instituto Politécnico Nacional. México.
79. Persinos, G., Blomister, R., Blake, D., Farnsworth, N., 1979. South American Plants II: Taspine Isolation and Anti-inflammatory activity. *Journal of pharmaceutical Science*. 68, 124-126.
80. Primo, E., 2007. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Reverté, Barcelona.
81. Puigdomènech, P., 1986. Enciclopedia de las Ciencias; Las plantas, el mundo de la botánica, Ediciones Orbis S.A.
82. Quesada, H. A., 2008. Las plantas medicinales. *Rev. Biocenosis*. 21, 1-5.
83. Ramamoorthy, P. K. y Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2, 70-80.
84. Ramírez, V. O., 2012. Medicina tradicional una responsabilidad social mundial, VI Encuentro Nacional de Bioética, Instituto de Salud del Estado de México.

85. Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V., 1990. Patología estructural y funcional. 4ta Ed. Interamericana McGraw Hill. Madrid, España.
86. Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V., 2010. Patología estructural y funcional. 8va Ed. Elsevier, España, S. I., Barcelona, España.
87. Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México.
88. Rutherford, M. K., Moughan, P. J., 2005. Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 88, 955-966.
89. Samano, T. L., 1995. Antiquo herbario medicinal azteca. Editorial Gómez Gómez Hermanos. México.
90. Salcedo-Sánchez, B., 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, UNAM. Facultad de Ciencias.
91. Secretaria de Desarrollo Social (SEDESOL)., 2010. Sistema de Apoyo para la planeación del PDZP. México.
92. Serra, H. A., Antúnez, P. B., Devoto, F. M., Tessler, J., Glucocorticoides. En: Zieher LM, Alvano SA, Iannantuono R., 1998. Colección de farmacología: farmacología del dolor y la inflamación, 2a ed. Ursino. Buenos Aires, Argentina.
93. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela, R, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
94. Sirtori, C. R., 2001. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*. 44, 183 - 193.
95. Sorkin, L., Xiao, W., Wagner, R., Myer, R., 1997. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*. 81, 255 - 262.
96. Standley, P. C., Steyermark, J. A., 1949. Flora of Guatemala. Vol.24, Part. VI. USA. 25-130 pp.

97. Steinmann, W. V., 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México, Acta Botánica Mexicana. 61, 61-93.
98. Trease, G. E. y Evans, W. C., 1983. Textbook of Pharmacognosy. 12th edn. Balliere Tindall and Company Publisher. London, England.
99. Thomas, R., Sah. N. K., Sharma. P. B., 2008. Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: a mini review. Current Pharmaceutical Biotechnology. 9, 315 - 324.
100. Tumalan, G. O., 2014. Determinación fitoquímica y evaluación de las actividades antiinflamatoria y analgésica de *Viguiera dentata*. Tesis de licenciatura. Universidad de la Cañada. Oaxaca.
101. Vane, J. R., Botting, R. M., 1998. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. American Journal of Medicine. 104, 2S-8S.
102. Valiente, B. A., Alcantara, A., Dávila, P., Flores, H. N., Arismendi, M. C., Ortega, R. J., Soriano, J. A., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67, 25-75.
103. Vanden Berghe, D. A. & Vlietnick A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. (Ed). Methods in plant Biochemistry, Vol 6: Assay for Bioactivity. 47-69 pp.
104. Vermeirssen, V., Camp J., Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of Nutrition. 92, 357-366.
105. Whitson, H. A., 2002. Anti-fungal plants of the Peruvian Amazon: a survey of ethnomedical uses and biological activity. Tesis de Doctorado. Cornell University. United States
106. Wink, P., 1999 Addressing end-of-life issues: Spirituality and inner life. Academic Journal Article Generations. 23, 75-80.
107. Yerima, M., Magaji, M. G., Yaro, A. H., Tanko, Y., Mohammed M. M., 2009. Analgesic and anti- inflammatory activities of the methanolic leaves extract of *Securinega virosa* (Euphorbiaceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 8, 47-53.

108. Yueqin, Z., 2007. Identificación y actividad farmacológica de principios y especies antiinflamatorias. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, España.