

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios
Mayoritarios Presentes en las Hojas de *Croton gossypifolius* Vahl y Evaluación
de la Actividad Citotóxica y Antibacteriana.**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Chávez Zapata Jairo Arturo, para
optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, Diciembre 2015.

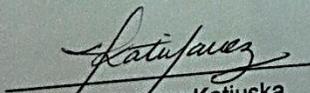
Yo Profesora Chávez Katuska, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora Rodríguez María, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

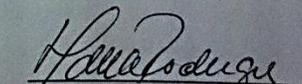
Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios Presentes en las Hojas de *Croton gossypifolius* Vahl y Evaluación de la Actividad Citotóxica y Antibacteriana”

Que presenta el Br. Chávez Jairo, para aspirar al Título de Licenciado en Química, se está realizando en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2014 y 2015, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Diciembre de 2015


Dra. Chávez Katuska


Dra. Rodríguez María

Dedicado con mucho amor
A mis madres Yajaira y Yurvi.
A mi tutora Dra. Katuska Chávez.

AGRADECIMIENTOS

En una página no puedo expresar todo lo que siento y quiero decir sobre las personas que me acompañaron en este pequeño sendero de mi vida, el cual recordare con mucho amor y nostalgia.

Más allá de lo académico, también me llevo experiencias, recuerdos que me hacen sonreír y sobre todo amigos que nunca olvidare, ellos hicieron de este camino uno más fácil y más feliz. Te agradezco a ti Abraham Blanco por todas tus oraciones y apoyo incondicional, a ti Jessica Pérez por no dejar que nunca me rindiera por más perdida que estuviese la batalla, a ti Vanessa Fernández por hacerme reír tanto y por tus mensajes de aliento, a ti Jessica Goncalves y a ti José Colmenares por formar parte de todos mis inventos y en especial por sobrevivir junto a mí y a ti Ricardo Higuera por creer en mí y mostrarme que atrás de las nubes el cielo es siempre azul.

Es por esto que les doy las Gracias por todo lo que compartimos y los momentos que vivimos, pero así como el día sigue a la noche, cada uno de nosotros debe seguir su destino y volver a empezar una nueva historia.

Gracias Edgar Del Carpio por permitirme conocer a mi tutora Katuska Chávez que a pesar de tener el mismo apellido que yo, no somos de la misma familia. Ella fue y será fundamental para mi formación como investigador, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su motivación y sobre todo su personalidad son dignas de admirar.

Gracias a mi tutora María Rodríguez y la profesora Alírica Suarez por tendernos esa mano amiga que más de una vez necesitamos, por sus guías y consejos basados en su enorme trayectoria que muchos desearían tener.

Gracias a la profesora Beth Díaz y a mis compañeros del laboratorio de productos naturales por darme ánimos cuando la flojera se apoderaba de mí y por hacer más grato esos días de trabajo, en especial a Janetsi Caro, mi compañera que más tarde se convirtió en mi amiga.

Gracias al Dr. Francisco Arvelo y al Dr. Felipe Sojo por permitir que fuera parte de su laboratorio, por enseñarme y dejar que realizara los ensayos citotóxicos, fue una experiencia nueva para mí.

Gracias al grupo del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia, UCV, por realizar los ensayos antimicrobianos.

Gracias a mis hermanos Marvin Chilbery y Marlon Chilbery, sabemos que no hay pasado ni futuro ni distancias que nos separen.

Gracias Yurvi González, mi cuñada, mi madrina, mi vecina, mi comadre y mi amiga por tu contención cuando más lo he necesitado y por todo tu amor, compañía, palabras y comprensión. Estoy en deuda contigo.

Gracias a mis sobrinas Stephany y Valeria por alegrarme día a día con sus sonrisas. A mi sobrino Michael un ser muy especial para mí. Ustedes son el motor de mi vida y Los amo profundamente.

Gracias a mis padres Yajaira Zapata y Víctor Chávez por su amor, sus enseñanzas, trabajo y sacrificios, por corregir mis faltas y celebrar mis triunfos, sino fuera por ustedes no sería quien soy hoy en día. Sus palabras, sus abrazos y sus miradas vivirán en mí.

Gracias a la Universidad Central de Venezuela, por abrirme las puertas y permitir que fuera parte de la casa vence la sombra...

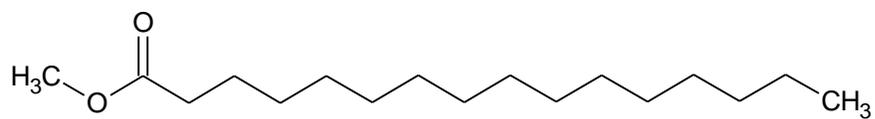
Jairo Chávez.

RESUMEN

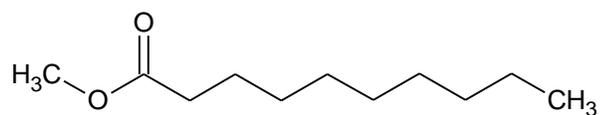
Se realizó el estudio fitoquímico de las hojas de la especie *Croton gossypifolius* Vahl (Euphorbiaceae), colectada en la Cortada del Guayabo, Estado Miranda, Venezuela. A partir del extracto metanólico de las hojas de esta especie, se obtuvieron tres fracciones de distinta polaridad. De la fracción de hexano se lograron aislar 2 ésteres de ácidos grasos y un triterpeno, identificados como: hexadecanoato de metilo **(I)**, decanoato de metilo **(II)** y β -sitosterol **(III)**. De la fracción de diclorometano se logró aislar una mezcla de hidrocarburos saturados, y finalmente, de la fracción de acetato de etilo, se aisló el flavonoide identificado como quercitrina **(IV)**.

Estos compuestos, a excepción de quercitrina, se reportan por primera vez para esta especie y sus estructuras fueron caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN en 1D (^1H , ^{13}C) y 2D (HETCOR y FLOCK), DEPT, y espectrometría de masas.

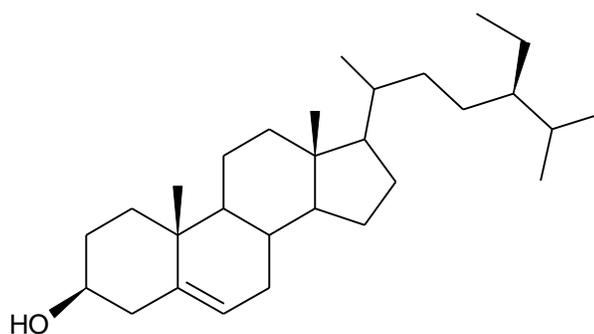
Se evaluó la actividad citotóxica de las fracciones y los compuestos aislados a través del método MTT sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 (carcinoma mamario). Encontrándose que tanto los compuestos como las fracciones presentaron actividad, siendo la mezcla de hidrocarburos saturados la más potente. Se evaluó la actividad antibacteriana de las fracciones a través del método de difusión sobre placas de agar, obteniéndose como resultado que las tres fracciones resultaron activas contra las bacterias Gram-positivas e inactivas frente a las Gram-negativas empleadas.



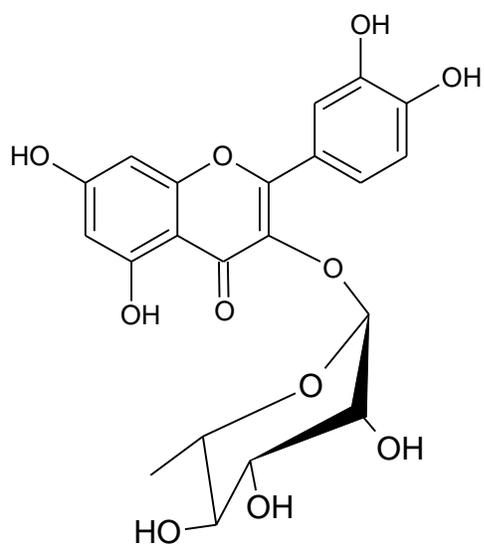
(I)



(II)

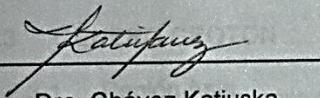


(III)



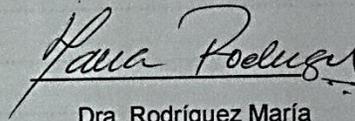
(IV)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Aislamiento, Purificación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios Mayoritarios Presentes en las Hojas de *Croton gossypifolius* Vahl y Evaluación de la Actividad Citotóxica y Antibacteriana", presentado por el Br. Jairo Arturo Chávez Zapata, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



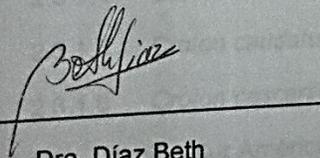
Dra. Chávez Katuska

(Tutora)



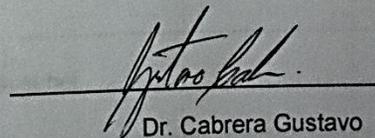
Dra. Rodríguez María

(Tutora)



Dra. Díaz Beth

(Jurado)



Dr. Cabrera Gustavo

(Jurado)

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	4
2.1	FAMILIA EUPHORBIACEAE.	4
2.2	PRINCIPALES COMPUESTOS QUÍMICOS AISLADOS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE.	6
2.2.1	Terpenos.	6
2.2.2	Flavonoides.	8
2.2.3	Alcaloides.	9
2.3	GÉNERO CROTON	10
2.3.1	Región Asia.	12
2.3.1.1	<i>Croton kongensis</i> Gagnep.....	12
2.3.1.2	<i>Croton oblongifolius</i> Roxburgh.	13
2.3.1.3	<i>Croton gratissimus</i> Burch.....	16
2.3.1.4	<i>Croton tonkinensis</i>	17
2.3.1.5	<i>Croton caudatus</i> Geisel.....	18
2.3.1.6	<i>Croton cascarilloides</i> Räuschel.....	20
2.3.2	Región Sur América.....	22
2.3.2.1	<i>Croton cajucara</i> Benth.	22
2.3.2.2	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	23
2.3.2.3	<i>Croton eluteria</i> Bennett.	24
2.3.2.4	<i>Croton nepetaefolius</i> Baill.	25
2.3.2.5	<i>Croton palanostigma</i> Klotzsch.....	27

2.3.2.6	<i>Croton schiedeanus</i> Schlecht.....	28
2.3.2.7	<i>Croton urucurana</i> Baillon.....	29
2.3.2.8	<i>Croton zehntneri</i> Pax and Hoffman.....	31
2.3.2.9	<i>Croton stipuliformis</i> Bark.....	32
2.3.2.10	<i>Croton adenocalyx</i> Baill.....	34
2.3.2.11	<i>Croton macrobothrys</i> Baill.....	35
2.3.2.12	<i>Croton lechleri</i> Mull. Arg.....	36
2.3.2.13	<i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.....	39
2.3.2.14	<i>Croton argyroglossum</i> Baill.....	40
2.3.2.15	<i>Croton campestri</i>	41
2.3.2.16	<i>Croton malambo</i> H. Karst.....	43
2.3.2.17	<i>Croton matourensis</i> Aubl.....	44
2.3.2.18	<i>Croton micans</i> Sw.....	46
2.3.2.19	<i>Croton cuneatus</i> Klotz.....	48
2.3.2.20	<i>Croton pungens</i> Jacq.....	49
2.3.2.21	<i>Croton huberi</i> Steyerm.....	50
2.3.2.22	<i>Croton gossypiifolius</i> Vahl.....	52
3	JUSTIFICACIÓN.....	55
4	OBJETIVOS.....	56
4.1	Objetivo General:	56
4.2	Objetivos Específicos:	56
5	PARTE EXPERIMENTAL	58
5.1	Instrumentos.....	58

5.2	Materiales.....	58
5.2.1	Solventes.....	58
5.2.2	Solventes para análisis de RMN.....	58
5.3	Material para cromatografía	59
5.3.1	Reveladores.....	59
5.4	Metodología experimental.....	59
5.5	Colecta del material vegetal.....	59
5.6	Extracción.....	60
5.7	Esquema de separación.....	62
5.8	Fraccionamiento.....	63
5.8.1	Separación de la Fracción de hexano.....	63
5.8.2	Separación de la fracción de diclorometano.....	66
5.8.3	Separación de la fracción de acetato de etilo.....	68
5.9	Actividad Citotóxica.....	71
5.9.1	Cultivo celular.....	71
5.9.2	Ensayo de citotoxicidad de los compuestos y extractos.....	71
5.10	Actividad Antibacteriana.....	73
6	Resultados y discusión.....	74
6.1	Sección fitoquímica.....	74
6.1.1	Compuesto I:.....	74
6.1.2	Compuesto II:.....	79
6.1.3	Compuesto III:.....	82
6.1.4	Compuesto IV:.....	89

6.1.5	Aspectos físicos y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de las hojas de <i>Croton gossypifolius</i> Vahl.....	97
6.2	Sección biológica.	99
6.2.1	Evaluación citotóxica de las fracciones.	99
6.2.2	Evaluación citotóxica de los compuestos aislados.	100
6.2.3	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	102
7	CONCLUSIONES	104
8	RECOMENDACIONES.....	105
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
10	ANEXOS.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura del isopreno.....	7
Fig. 2 Estructura química de la quercetina.	8
Fig. 3: Estructura química de la Morfina.	9
Fig. 4: Distribución a nivel mundial del género <i>Croton</i>	10
Fig. 5: Estructura del compuesto I: Hexadecanoato de metilo.	74
Fig. 6: Espectro de masas del compuesto I.....	75
Fig. 7: Espectro de RMN ^1H del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz).	76
Fig. 8: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto I (CDCl_3 , 67.5 MHz).	76
Fig. 9: Espectro DEPT-135 del compuesto I (CDCl_3 , 67.5 MHz).....	77
Fig. 10: Espectro de RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz).....	79
Fig. 11: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz).	80
Fig. 12: Espectro DEPT-135 del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz).....	80
Fig. 13: Espectro de masas del compuesto II.....	81
Fig. 14: Estructura del compuesto II.....	81
Fig. 15: Estructura del compuesto III.....	82
Fig. 16 Espectro de RMN ^1H del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).....	83
Fig. 17 Espectro de RMN ^1H a campo alto del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).	83
Fig. 18 Espectro de RMN ^{13}C a campo alto del compuesto III (CDCl_3 , 67.5 MHz).....	84
Fig. 19 Espectro de RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto III (CDCl_3 , 67.5 MHz).....	85
Fig. 20 Espectro DEPT-135 del compuesto III (CDCl_3 , 67.5 MHz).....	85

Fig. 21 Espectro de masas del compuesto III.....	86
Fig. 22 Estructura del compuesto IV.	89
Fig. 23 Espectro de RMN ^1H del compuesto IV (MeOD, 270 MHz).....	90
Fig. 24 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto IV (MeOD, 67.5 MHz).	92
Fig. 25 Espectro DEPT-135 del compuesto V (MeOD, 67.5 MHz).	92
Fig. 26 Espectro de masas del compuesto IV.	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de los datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto I con los datos reportados en la literatura.....	78
Tabla 2: Comparación de los datos de RMN ^1H para el compuesto III con los datos reportados en la literatura.	87
Tabla 3: Comparación de los datos de RMN ^{13}C para el compuesto III con los datos reportados en la literatura.	88
Tabla 4: Comparación de los datos de RMN ^1H para el compuesto IV con los datos reportados en la literatura.	93
Tabla 5: Comparación de los datos de RMN ^{13}C para el compuesto IV con los datos reportados en la literatura.	94
Tabla 6: Valores de de CI50 (μM) \pm DE de las fracciones de Hex, CH_2Cl_2 y AcOEt sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3.	99
Tabla 7: Valores de de CI50 (μM) \pm DE de los compuestos I, II, III, IV, V y de la mezcla de hidrocarburos saturados sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3.....	100
Tabla 8: Actividad antimicrobiana de las fracciones de Hex, CH_2Cl_2 y AcOEt expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).....	102

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro HETCOR del compuesto I, tomado en CDCl_3	118
Anexo 2: Ampliación del espectro HETCOR del compuesto I, tomado en CDCl_3	119
Anexo 3: Espectro FLOCK del compuesto I, tomado en CDCl_3	120
Anexo 4: Ampliación del espectro FLOCK del compuesto I, tomado en CDCl_3	121
Anexo 5: Espectro HETCOR del compuesto II, tomado en CDCl_3	121
Anexo 6: Espectro HETCOR del compuesto IV, tomado en MeOD.	121

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

δ	Desplazamiento químico.
λ	Longitud de onda.
AcOEt	Acetato de etilo.
°C	Grado centígrado.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
CHCl ₃	Cloroformo.
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano.
CH ₃ COOH	Ácido acético.
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50.
CO ₂	Dióxido de carbono
CPP	Cromatografía en placa preparativa.
d	Doblete.
dd	Doblete de doblete.
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization Transfer.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
DO	Densidad óptica.
EtOH	Etanol.
FLOCK	Multiple Bird long Range Correlation Spectroscopy.
g	Gramo (s).

h	Hora (s).
H ₂ O	Agua.
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy.
Hex.	Hexano.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz).
μL	Microlitro
μM	Micromolar
m	Multiplete.
MeOD	Metanol deuterado.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramo.
MgSO ₄	Sulfato de magnesio.
MHz	Mega hertz.
mL	Mililitro.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
Mult.	Multiplicidad.
nm	Nanómetro.
p.a.	Para análisis.
p.f.	Punto de fusión.
ppm	Partes por millón.
R _f	Factor de retención.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.

RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de protones.
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono.
s	Singlete.
sa	Singlete ancho.
t	Triplete.
UV	Ultravioleta.

1 INTRODUCCIÓN

Para poder vivir, crecer y reproducirse, los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren energía que la obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas, mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo. ^[1] Cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo se conoce como metabolito.

Los metabolitos pueden ser primarios o secundarios, donde se ha designado como metabolito primario a todos aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos primordiales para la planta, mientras que los metabolitos secundarios son aquellos que permiten interacciones ecológicas de la planta con su entorno pero no son esenciales para la supervivencia de la planta, como lo son los metabolitos primarios, aunque poseen características muy interesantes, tales como: sus funciones biológicas, sus complejas estructuras y su reactividad química. Estos metabolitos son los que a partir de ahora se definirá como productos naturales.

En un sentido más amplio se puede definir un producto natural, como todo compuesto que provenga de la naturaleza, y en un sentido más restrictivo un producto natural sólo es un metabolito secundario.

El interés en estos productos naturales como fuente de nuevos medicamentos se debe a la inmensa diversidad de la naturaleza y a los amplios antecedentes de su uso para tratar enfermedades humanas desde los comienzos mismos de la medicina. Además,

en su estado no modificado o modificado químicamente, los productos naturales pueden ser adaptados para actuar en un sin número de actividades biológicas.^[2]

Las plantas medicinales fueron durante mucho tiempo nuestra principal fuente de productos terapéuticos, pero con la aparición de la industria farmacéutica y los avances de farmacología, las plantas pasaron a ser la fuente de principios activos de medicamentos de síntesis, y más tarde, fueron desplazadas por éstos. Ahora hay una “vuelta a la naturaleza” con el consiguiente aumento de consumo de productos a base de plantas medicinales.^[3]

La tendencia de volver a la naturaleza en los diferentes aspectos de la vida del hombre, de los cuales no se escapa el nutricional y por demás, aquel que trata de aprovechar las fuentes naturales para el tratamiento de varias enfermedades, ha encontrado en el estudio de las plantas principalmente terrestres y en menor grado plantas acuáticas, insectos y otros, un beneficio que pareciera inagotable. De hecho, desde hace unos cuantos años, las industrias farmacéuticas grandes, así como las agencias estatales dedicadas a la salud de diferentes partes del globo, han invertido considerables sumas con el afán de lograr nuevos fármacos menos tóxicos y más eficientes.^[4]

Asimismo, este interés en lo natural ha impulsado al desarrollo de la Fitoquímica como disciplina científica, encargándose del estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal, con el fin de extraerlos, purificarlos, elucidar su estructura y evaluar su actividad biológica.

La familia Euphorbiaceae ha sido de gran interés en estudios fitoquímicos, por su gran variedad de especies y géneros. En especial el género *Croton* que es el más grande de la subfamilia Crotonoideae, en el cual se reportan unas 1.300 especies. En Venezuela,

existen unas 80 especies endémicas y muchas plantas del género *Croton* son utilizadas en América, África y Asia con diferentes propiedades terapéuticas tales como: antiinflamatoria, antinociceptiva, antineoplásica, hipo-glicemiante y para el tratamiento de problemas gastrointestinales. Sus aceites esenciales son también de uso común para tratar trastornos de salud. ^[5]

2 ANTECEDENTES

2.1 FAMILIA EUPHORBIACEAE.

La familia Euphorbiaceae, con 322 géneros y 8910 especies, ^[6] posee una gran variedad de morfología genética, la cual dificultó su clasificación por ser una familia muy grande. Sin embargo, aunque esta familia ha sido estudiada por un grupo que comprende botánicos de diferentes países, se llevaron a cabo investigaciones de taxonomía, anatomía, fitoquímica, botánica económica y sistema molecular, ^[7] y Según Webster (1994), usando la clasificación de Müller como base, empleó estructuras filogenéticas como morfología del polen y la anatomía para crear la siguiente clasificación de la familia Euphorbiaceae, dividiéndola en cinco subfamilias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Phyllanthoideae y Oldfieldioideae. ^[8] De acuerdo con esta clasificación, las primeras tres subfamilias se caracterizan por poseer un óvulo, mientras que las dos últimas subfamilias tienen dos óvulos. ^[9]

La familia Euphorbiaceae posee las siguientes características:

- Tipos de plantas: hierbas, arbustos y árboles con látex, a veces carnosos y cactiformes.
- Hojas: generalmente simples, palmadas; alternas u opuestas, con estípulas que pueden estar transformadas en espinas o glándulas.
- Flores: imperfectas monoicas o dioicas, dispuestas en espigas o racimos, en el género Euphorbia la inflorescencia característica es el ciatio.

- Perianto: generalmente de 5 piezas, simples, sepaloideas y en otros casos el perianto está totalmente ausente.
- Estambres: filamentos libres o soldados, a veces ramificados, insertos sobre un disco nectarífero; con anteras bitecas y dehiscencia longitudinal.
- Gineceo: ovario súpero, con 3 carpelos soldados, con 3 lóculos con 1 o 2 óvulos cada uno, placentación axilar, estilos libres o unidos en forma variable.
- Fruto: generalmente esquizocarpo, algunas veces drupa.
- Semillas: con embrión recto o curvo, a menudo con ornamentación muy variada y de alto interés taxonómico, en ocasiones con abundante endosperma oleaginoso.

Esta familia heterogénea de plantas tiene importancia en diferentes áreas: como en la obtención de productos industriales (de *Hevea brasiliensis* se obtiene el caucho), alimentos (de *Manihot esculenta* se obtiene la yuca o mandioca), en medicina (de *Ricinus communis* se obtiene el aceite de ricino), ornamentación y entre otras. Experimentalmente numerosos trabajos resaltan la actividad de esta familia de plantas en la medicina. Como por ejemplo, *R. communis* ha mostrado actividad insecticida y actividad contra promastigotes de *L. major*, cuando es utilizado como parte de la dieta del vector *Phlebotomus papatasi*, extractos o componentes del látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (*E. milli*) han presentado actividad contra los moluscos hospederos intermediarios de los esquistosomas; siendo según sus autores uno de los más potentes y específicos molusquicidas descubiertos hasta la fecha, extractos de *Euphorbia prostrata* Ait han mostrado actividad antiinflamatoria, antiglicemiante,

insecticida y antihelmíntica. Especies del género *Croton* han presentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales, leishmanicidas y antimalárica.^[9]

Desde el punto de vista químico esta es una familia muy diversa, ya que en los estudios fitoquímicos realizados a muchas de sus especies se han reportado terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas, ésteres, glicósidos, taninos, lectinas y glicoproteínas.^[10]

Además de estos compuestos, muchas especies tienen sustancias irritantes y/o citotóxicas, por ejemplo la savia de muchas especies de Euforbiáceas posee compuestos altamente irritantes para la piel y las membranas mucosas. Esto no se limita solamente a la savia, sino que también se observa a menudo en otras partes de dichas plantas. Por ejemplo la fracción resinosa del aceite de *Croton*, purgante obtenido a partir de las semillas de *Croton tiglium*, posee ésteres forbólicos altamente irritantes y además generadores de tumores.^[11]

2.2 PRINCIPALES COMPUESTOS QUÍMICOS AISLADOS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE.

A continuación se generaliza como aspecto químico característico, que la familia Euphorbiaceae contiene como principales metabolitos secundarios los terpenos seguidos de flavonoides y alcaloides.^[12]

2.2.1 Terpenos.

Los terpenos son hidrocarburos complejos de fórmula general C_nH_{2n-4} , de la serie del isopreno como se muestra en la Figura 1, constituyen uno de los grupos más amplios

de fitonutrientes y actúan como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies de oxígeno. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como *regla del isopreno*, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. Sin embargo, esto no es siempre cierto por cuanto el número de átomos de carbono puede no ser un múltiplo de cinco, pues son frecuentes las reacciones de degradación, o bien suceden rearrreglos esqueléticos que conducen a secuencias anormales de la unidad de C₅. El descubrimiento de un gran número de compuestos que presentan diferentes grupos funcionales ha generado el uso del término “*terpenoide*” para designarlos en lugar de “*terpeno*” cuya terminación (-eno) denota más bien hidrocarburos.^[4]

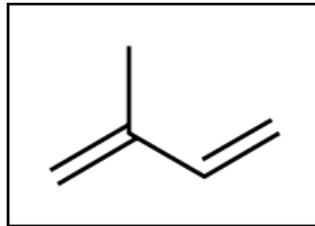


Fig. 1: Estructura del isopreno.

El género *Euphorbia*, es el que ha llamado más la atención y ha sido estudiado precisamente por su contenido en diterpenos biológicamente activos. Un estudio de la distribución de estos diterpenos en aproximadamente 60 especies de *Euphorbia* demostró que un 90% de las especies estudiadas contenían estos compuestos.^[11]

En las especies de la familia Euphorbiaceae se han identificado más de 55 triterpenoides (tetra y pentacíclicos), principalmente del látex pero también presentes en otras partes de la planta como corteza, flores, hojas, raíces, etc. Algunos de ellos se encuentran libres y otros en forma de ésteres (acetatos) o glicósidos. El látex de *Euphorbia* contiene mayormente triterpenos y sus ésteres.^[13]

Se ha encontrado diterpenoides en los tallos, hojas y látex de algunas especies de la familia Euphorbiaceae, dentro de los reportes se encuentran estructuras con una gran diversidad de diterpenoides con esqueletos macrocíclicos y policíclicos. Algunos de estos compuestos han presentado actividad antimicrobiana y otros han resultado tóxicos e irritantes de la piel. ^[14]

2.2.2 Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos vegetales no nitrogenados, que tienen varias funciones en la planta. Así, se consideran como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, además los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, un anillo B y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondiente a la parte alquílica del fenil propano. Es por esto que se les conoce como unidades C_{15} : $C_6-C_3-C_6$ y el esqueleto recibe el nombre de *núcleo de flavano*. Estos pueden contener un anillo central heterociclo (γ -pironas) que son los más abundantes, o una cadena abierta. ^[4]La Figura 2 muestra la estructura química de uno de los flavonoides más comunes: La quercetina.

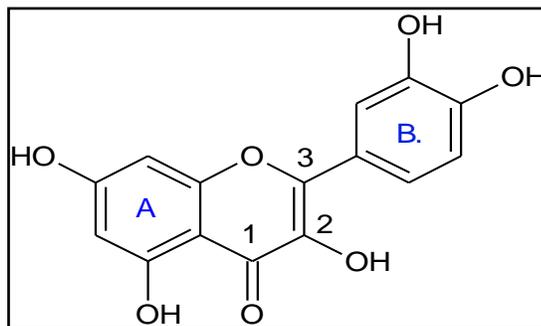


Fig. 2 Estructura química de la quercetina.

La familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles, que se han identificado en varios géneros. Estos se presentan como O- y C-glicósidos y como metil ésteres. También se han encontrado flavononas pero en relativamente pocas especies. Los dos flavonoles comunes, kaempferol y quercetina (y sus glicósidos) son los más ampliamente distribuidos en los diferentes géneros de la familia. ^[11]

2.2.3 Alcaloides.

Los alcaloides son bases orgánicas y su actividad biológica, principalmente a nivel del sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas, son drogas comúnmente usadas en medicina, por ejemplo la Morfina que se muestra en la Figura 3.

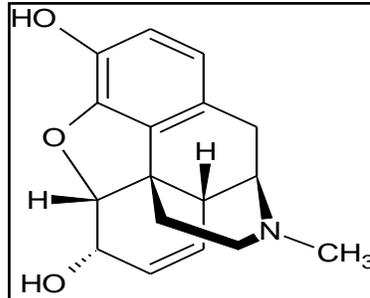


Fig. 3: Estructura química de la Morfina.

La variedad estructural es muy grande, tanto en su esqueleto carbonado como en el tipo y número de sustituyentes. El nitrógeno, que debe estar presente para que una molécula sea catalogada como alcaloide y además debe provenir de un aminoácido, pueden estar como una amina primaria, secundaria, terciaria, o sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos, o puede haber más de un nitrógeno con diferente funcionalidad en la misma molécula. Los aminoácidos no son alcaloides, pero son sus precursores. ^[4]

Se han detectado diversas clases de alcaloides, que se encuentran principalmente en los géneros *Croton* y *Phyllanthus*. Los glucósidos cianogénicos, que como se sabe pueden ser tóxicos, se han encontrado en algunas especies de los géneros *Euphorbia*, *Hevea*, *Jatropha*, *Manihot* y *Mercurialis*.^[12]

2.3 GÉNERO CROTON

El género *Croton* es el segundo género más importante de la familia Euphorbiaceae, comprende aproximadamente 1300 especies^[15] entre árboles, arbustos y hierbas, distribuyéndose ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Figura 4). Este género es bien conocido por sus diferentes tipos de diterpenos con una amplia gama de actividad biológica.^[16] Otros metabolitos secundarios frecuentemente reportados en este género son los alcaloides, flavonoides, saponinas y fenil propanoides.^[17]

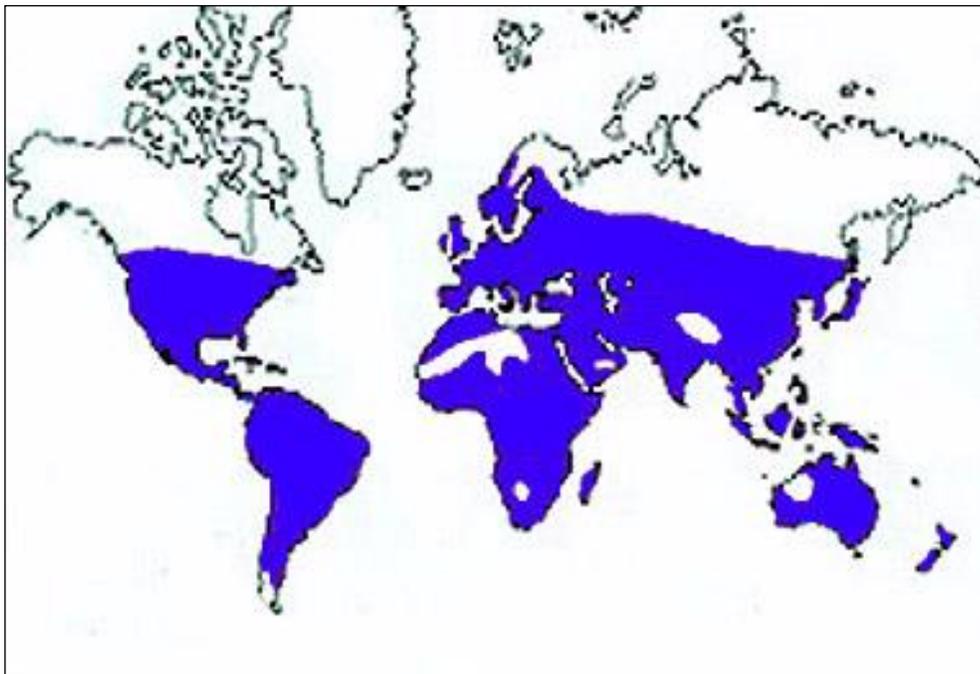


Fig. 4: Distribución a nivel mundial del género *Croton*.

A algunas especies de este género se le adjudican usos populares que incluyen el tratamiento para el cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, inflamación, lombrices intestinales, malaria, úlceras y pérdida de peso.^[19] Se conoce que varias especies de este género poseen una sabia roja o látex rojo conocido como “Sangre de Drago” o Sangre de Dragón” que tiene componentes químicos que actúan en el tratamiento de algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como: diarreas, úlceras y en la cicatrización de heridas,^[20] también se ha reportado actividad citotóxica de este látex contra varias líneas celulares de tumores humanos.

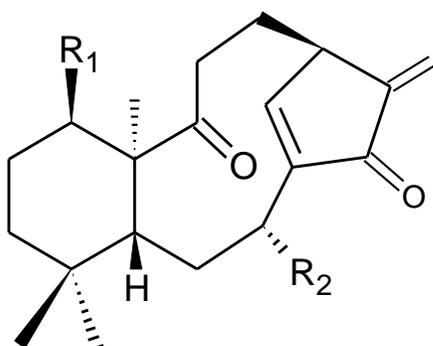
Diferentes clases de diterpenoides con variedad estructural se han identificado en este género entre los cuales se encuentran: labdanos, cembranoides, traquilobanos, pimaranos, clerodanos y *ent*-kauranos y muchos de estos compuestos han presentado actividad citotóxica contra varias líneas de cáncer humano.^[21]

A diversas especies del género *Croton* se le han realizado estudios fitoquímicos y biológicos, que ayudaron al conocimiento de su taxonomía, sus principales metabolitos secundarios y su(s) actividad(es) biológica(s). Estas propiedades pueden variar por cada especie del género, mayormente se adjudica a la localidad de la planta, en este mismo sentido se exponen diferentes especies del género *Croton* que han sido estudiadas en los últimos 5 años separándolas por regiones.

2.3.1 Región Asia.

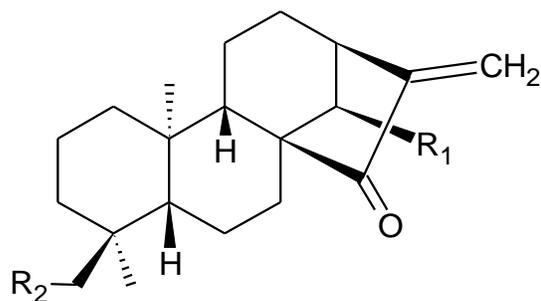
2.3.1.1 *Croton kongensis* Gagnep.

Es una planta china conocida como “Ba-duo”, que se utiliza con frecuencia en la medicina popular para tratar la dismenorrea. Del extracto etanólico de las hojas secas de la planta se aisló el diterpeno, *ent*-8,9-*seco*-kaurano (**1**), junto con los compuestos rabdombrosanin (**2**), *ent*(7 α , 14 β)-7,14-dihidroxi-*ent*-kaur-16-en-15-ona (**3**), *ent*-7 β -hidroxi-15-oxokaur-16-en-18-il-acetato (**4**), ácido vanílico (**5**), ácido 4-hidroxi-benzoico (**6**), ácido 4-metoxi-benzoico (**7**) y el 2,6-di-*terc*-butil-4-metil-fenol (**8**).^[22] Estos compuestos exhibieron actividad antimicobacteriana a concentraciones mínimas inhibitorias de 25.0, 6.25 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. También presentaron actividad antimalárica con valores de CI_{50} en un intervalo de 1.0-2.8 $\mu\text{g/mL}$.^[23]



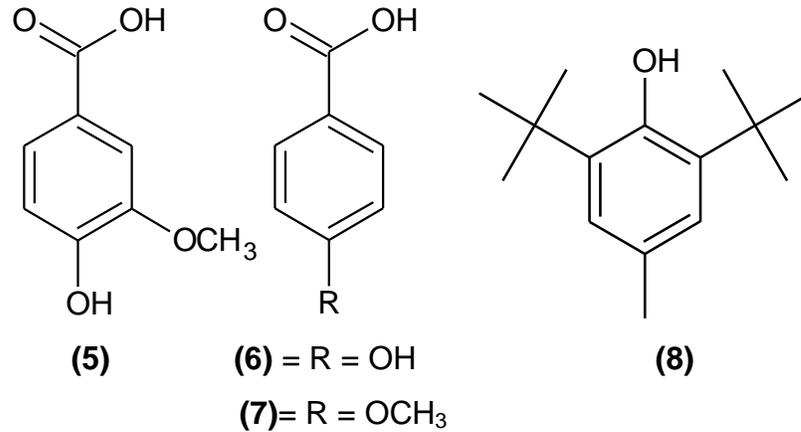
(1) = $\text{R}_1 = \text{OCOCH}_3$; $\text{R}_2 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$

(2) = $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{OH}$



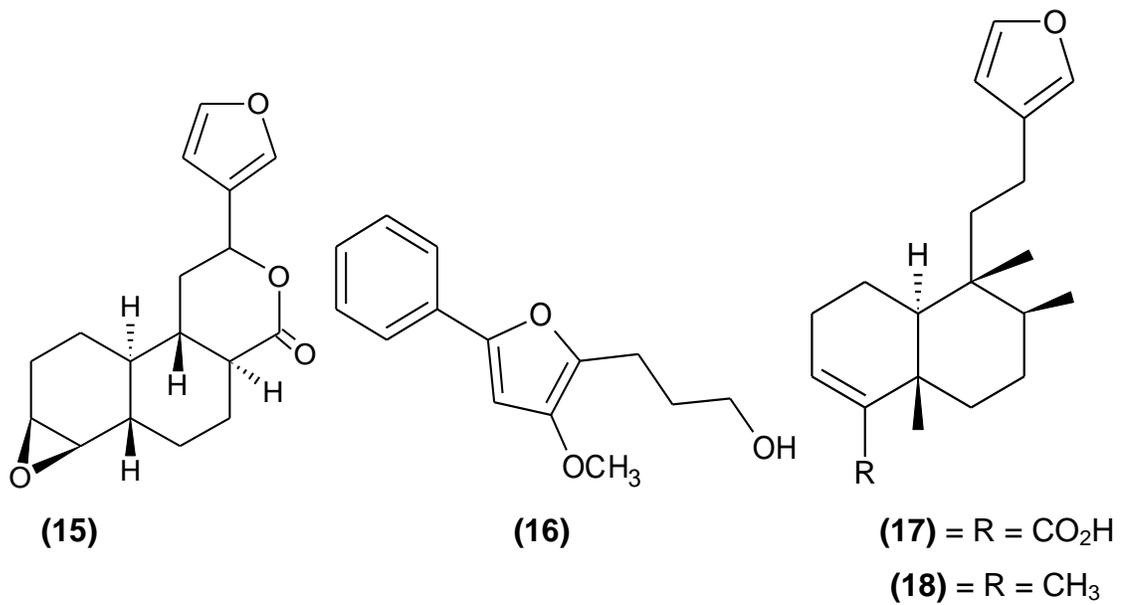
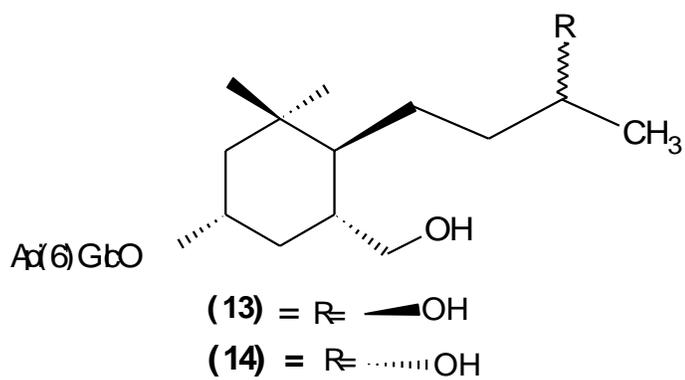
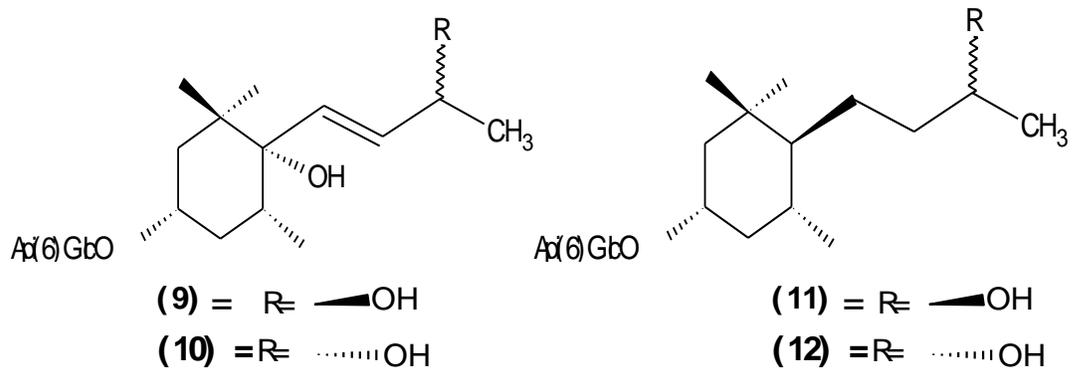
(3) = $\text{R}_1 = \text{OH}$; $\text{R}_2 = \text{H}$

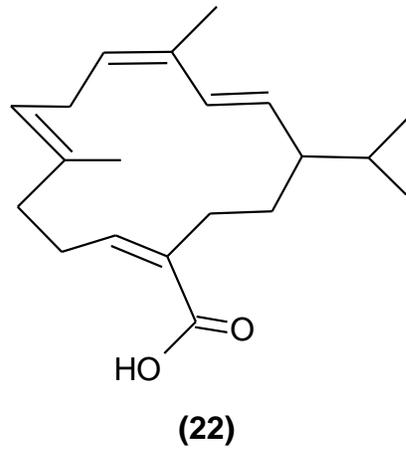
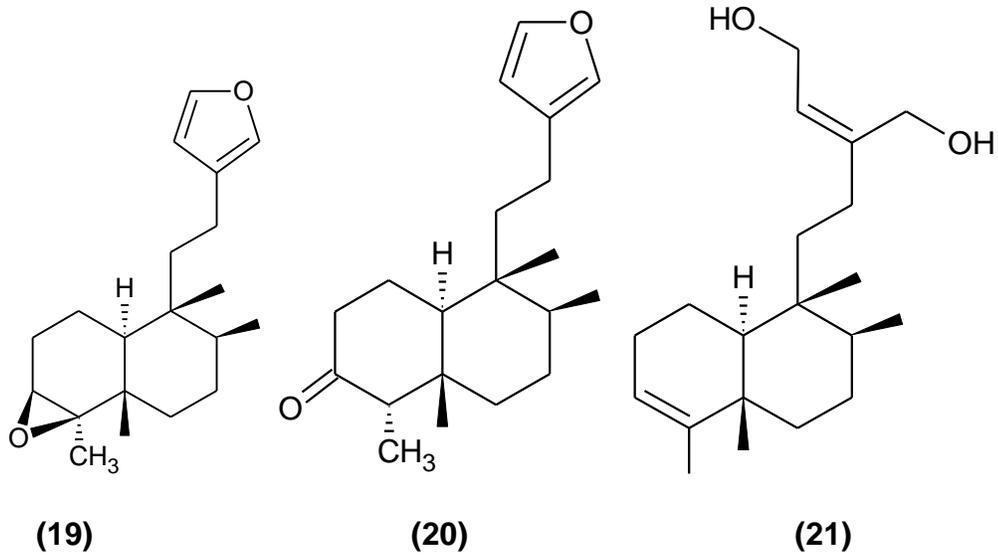
(4) = $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{OAc}$



2.3.1.2 *Croton oblongifolius* Roxburgh.

Es un árbol de aproximadamente 8 m de altura que crece en aéreas silvestres pantropical de Asia, como Tailandia, Myanmar e Indonesia. *Croton oblongifolius* Roxburgh es utilizada en la medicina popular tradicional, donde sus flores se utilizan como antihelmíntico, su fruto macerado con 28 a 40% de alcohol como un oxiótico para el post-parto, y su corteza del tallo o las hojas como antidiarreico. En esta especie se han encontrado diterpenoides tipo labdanos, halimanos, clerodanos y cembranos.^[24] En un estudio fitoquímico realizado en las hojas de *Croton oblongifolius* Roxburgh, se lograron aislar tres pares de glucósidos megastigmano, nombrados: oblongionosidos A-F (9-14).^[23] En la corteza recogida de la provincia de Loe, se logró identificar un diterpeno clerodano (15), un furano trisustituido (16), junto con seis diterpenoides (17-22).^[25]



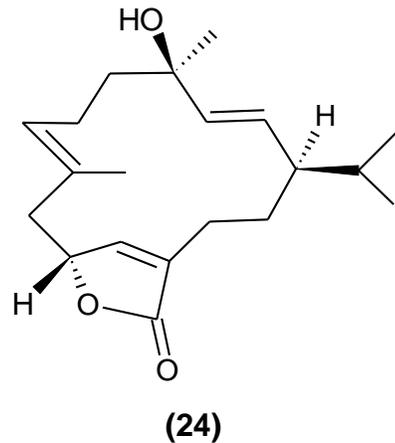
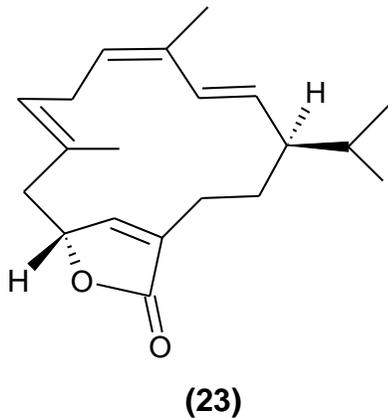


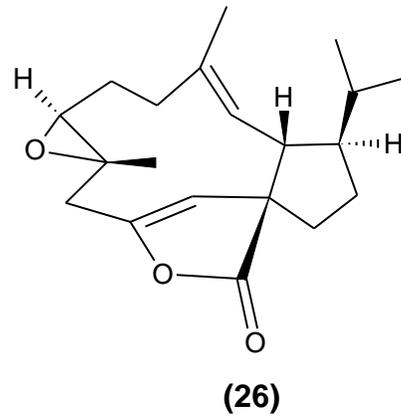
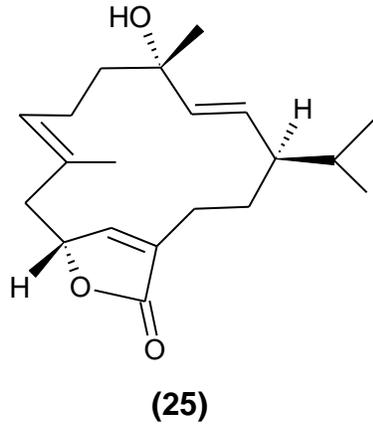
Se ensayó la actividad citotóxica de los compuestos aislados contra las siguientes líneas celulares de cáncer: KATO-3 (carcinoma gástrico), SW620 (adenocarcinoma de colon), BT474 (carcinoma de mama), HEP-G2 (hepatoblastoma de hígado) y CHAGO (carcinoma de pulmón) donde mostraron acción citotóxica moderada contra KATO-3 (CI_{50} 2,2 $\mu\text{g/mL}$), SW620 (CI_{50} 2,7 $\mu\text{g/mL}$), BT474 (CI_{50} 4,6 $\mu\text{g/mL}$), HEP-G2 (CI_{50} 3,7 $\mu\text{g/mL}$) y CHAGO (CI_{50} 3,3 $\mu\text{g/mL}$).^[26]

2.3.1.3 *Croton gratissimus* Burch.

Es un árbol que se produce en zonas pedregosas o laderas rocosas a lo largo de gran parte de las regiones cálidas y secas que van desde el noreste hasta el cuerno de África. Las hojas se utilizan secas o en polvo porque producen un olor agradable (lavanda) y se considera como una especie etnomedicinal, ya que los zulúes utilizan la savia de la corteza en infusiones como purgantes para trastornos estomacales e intestinales, a pesar de su reputación tóxica.^[27]

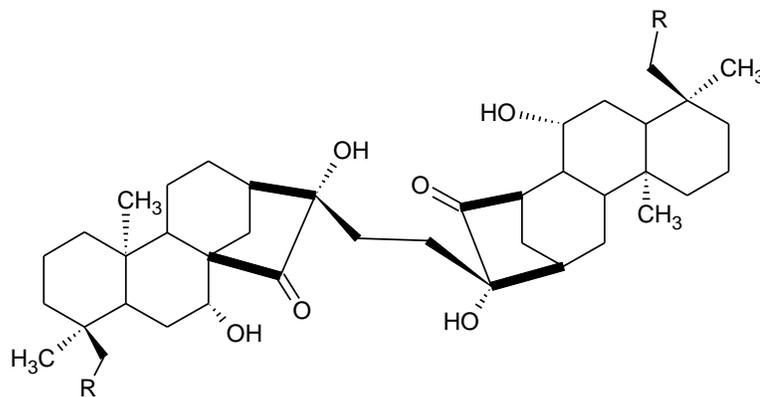
En un estudio fitoquímico de los extractos de hexano y diclorometano realizados en la corteza del tallo de *Croton gratissimus* Burch, se aislaron cuatro diterpenoides cembranos (**23-26**).^[27]





2.3.1.4 *Croton tonkinensis*.

Es un arbusto nativo del norte de Vietnam y es utilizado en la medicina popular para tratar las quemaduras, dolor abdominal y úlceras gástricas. Se reportaron la presencia de alcaloides, diterpenoides y flavonoides. En un estudio fitoquímico en busca de nuevos compuestos se logró aislar dímeros simétricos de diterpenoides *ent*-kauranos **(27-28)**.^[28]

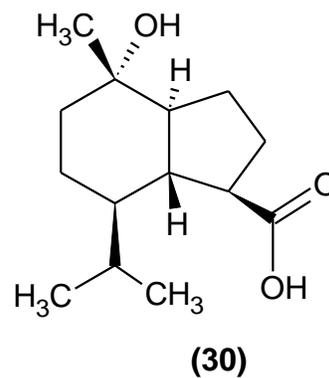
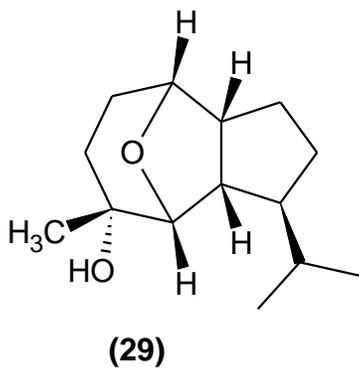


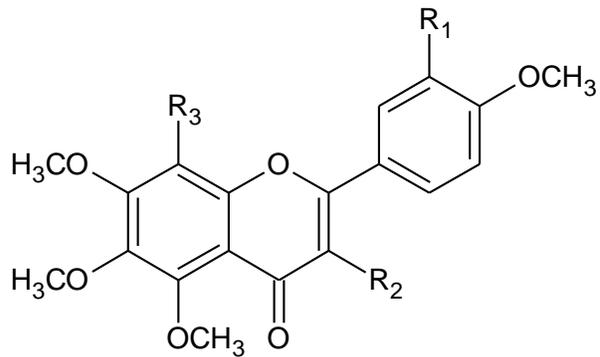
(27) = R = OH

(28) = R = OAc

2.3.1.5 *Croton caudatus* Geisel.

Es un arbusto trepado que se utiliza a menudo por las comunidades Chakma y Hmar, las tribus locales del noreste de la India utilizan esta planta con fines medicinales y veterinarios. En los extractos de etanol de las hojas se encontró un inhibidor de crecimiento (JDHex) contra los promastigotes y amastigotes de *Leishmania*.^[29] En otro trabajo, a partir del estudio fitoquímico del extracto etanólico del tallo de la planta *Croton caudatus* Geisel, se aislaron el sesquiterpeno crocaudatol **(29)** junto con oplopanona **(30)** y los siguientes compuestos: 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona **(31)**, tangeretina **(32)**, nobiletina **(33)**, 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona **(34)**, sinensetina **(35)**, kaempferol **(36)**, tilirosido **(37)**, kaempferol-3-O-rutinosido **(38)**, rutina **(39)** y una flavona llamada *Croton caudatin* **(40)**.^[30]





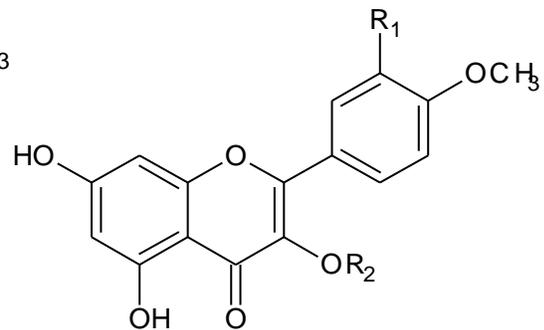
(31) = R₁ = R₂ = R₃ = OCH₃

(32) = R₁ = R₂ = H; R₃ = OCH₃

(33) = R₁ = R₃ = OCH₃; R₂ = H

(34) = R₁ = R₂ = R₃ = H

(35) = R₁ = OCH₃; R₂ = R₃ = H

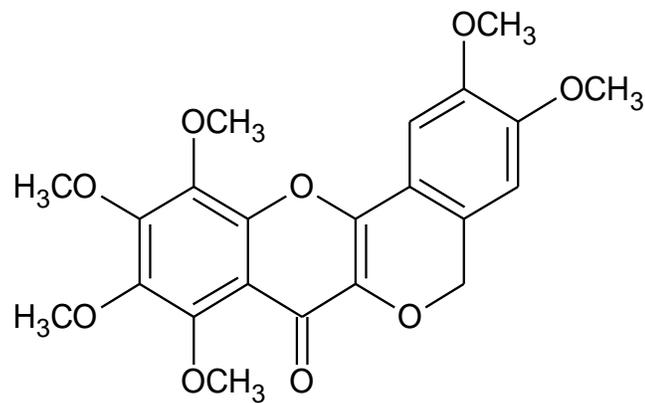


(36) = R₁ = R₂ = H

(37) = R₁ = H; R₂ = Glu-6-O-E-Coumaroil

(38) = R₁ = H; R₂ = Rutinosa

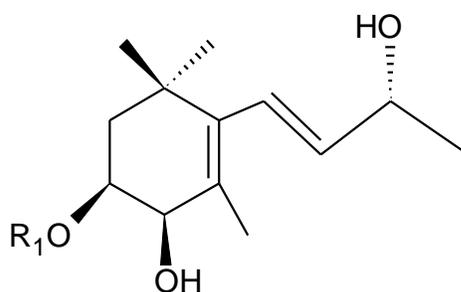
(39) = R₁ = OH; R₂ = Rutinosa



(40)

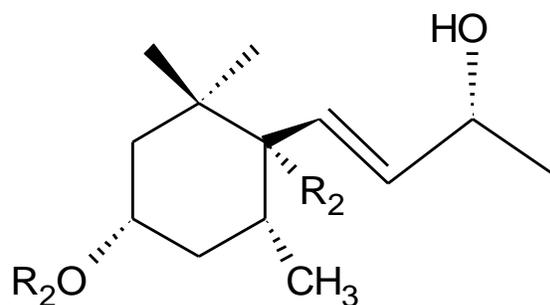
2.3.1.6 *Croton cascarilloides* Rauschel.

Es un árbol que se distribuye en Japón (Kagoshima y Okinawa), Taiwán, Tailandia y Vietnam de aproximadamente 0,5 a 2 m de altura. A partir del extracto metanólico de las hojas se aislaron siete glicósidos megastigmano **(41-52)**.^[31] En otra investigación de los tallos de *Croton cascarilloides* Rauschel, se aislaron ocho diterpenoides llamados crotocascarin, que tienen un esqueleto del tipo crotofolano, junto con dos nor-diterpenoides llamados crotocascarin α y β , derivados del reordenamiento del esqueleto crotofolano **(53-54)**.^[32]



(41) = R₁ = Glc; R₃ = H; R₄ = Fer

(42) = R₁ = Glc; R₃ = H



(43) = R₁ = H

(44) = R₁ = Glc; R₂ = OH; R₃ = H; R₄ = Fer

(45) = R₁ = Glc; R₂ = OH; R₃ = H; R₄ = Sin

(46) = R₁ = Glc; R₂ = OH; R₃ = Api; R₄ = H; R₅ = H

(47) = R₁ = H; R₂ = OH

(48) = R₁ = Glc; R₂ = OH; R₃ = Api; R₄ = H; R₅ = pOHBz

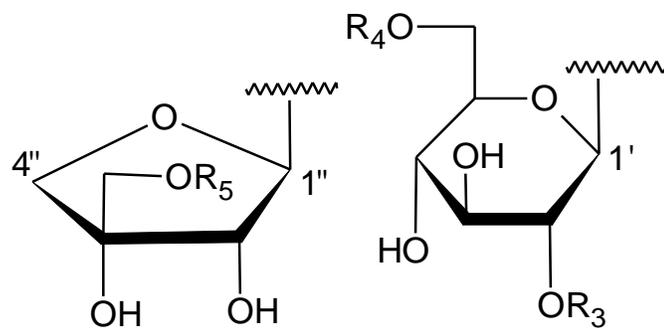
(49) = R₁ = Glc; R₂ = OH; R₃ = Api; R₄ = H; R₅ = Sin

(50) = R₁ = Glc; R₂ = H; R₃ = Api; R₄ = H

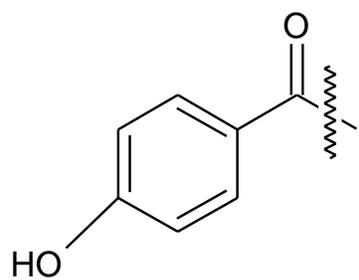
(51) = R₂ = H

(52) = R₁ = Glc; R₂ = OH

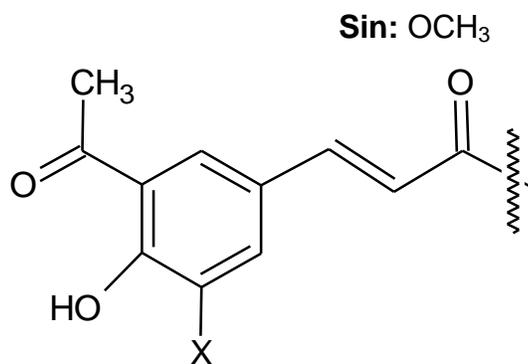
Api: Glc:



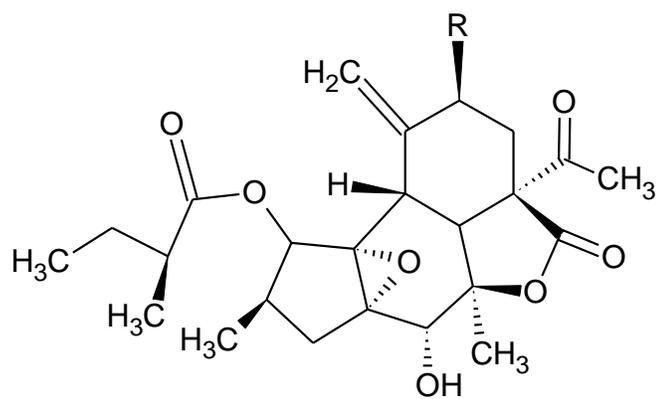
pOHBz:



Fer: H



Sin: OCH₃



(53) = R = OH

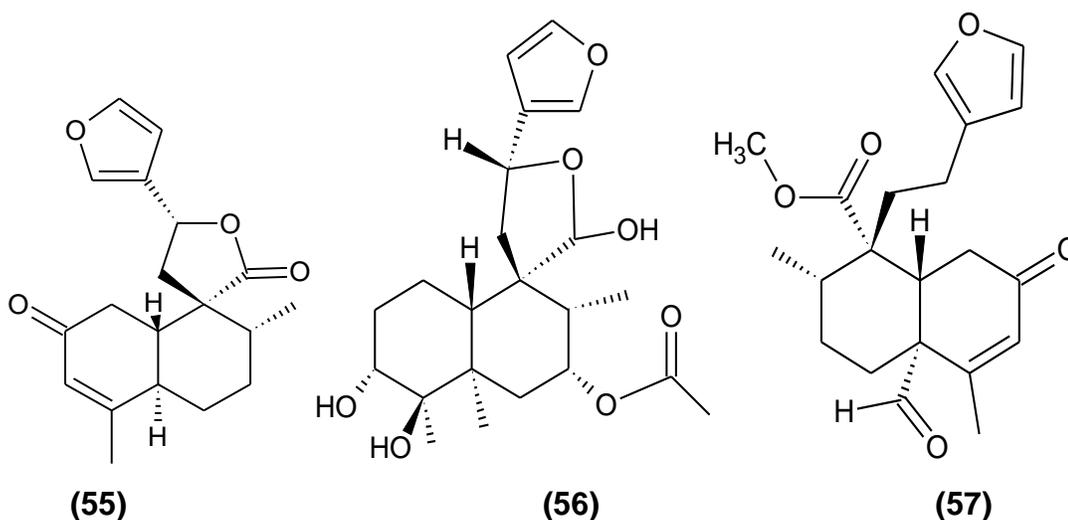
(54) = R = H

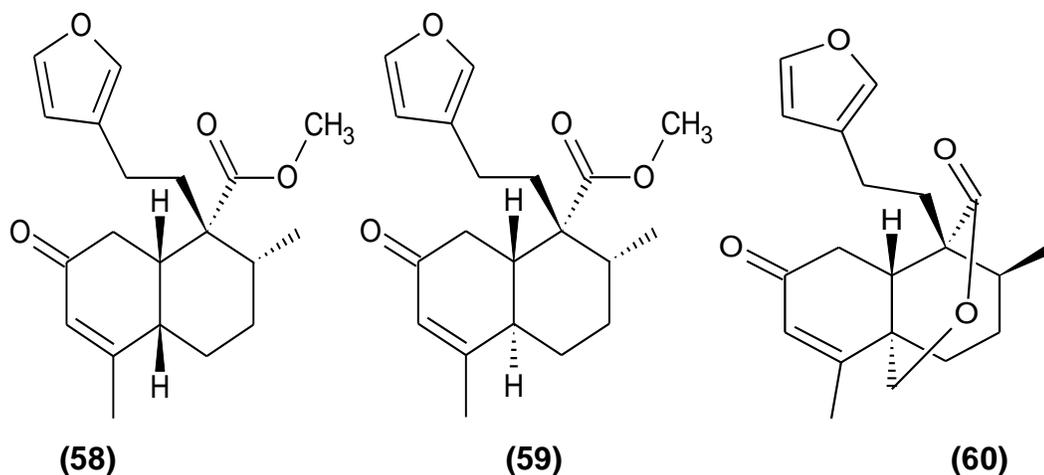
2.3.2 Región Sur América.

2.3.2.1 *Croton cajucara* Benth.

Es un arbusto comúnmente conocido como Sacaca, que se encuentra exclusivamente en la selva amazónica mayormente al norte de Brasil. ^[33] Se utiliza en la medicina popular para la diabetes, el tratamiento de la diarrea, trastornos gastrointestinales y enfermedad hepática. La corteza y las hojas de la planta se utilizan comúnmente en infusiones o en polvo para la preparación de píldoras. ^[34]

Se han aislado de la corteza los siguientes diterpenos: *trans*-dehidrocrotonina (DCTN) (**55**), *trans*-crotonina (TCN) (**56**), cajucarín A (**57**), *cis*-cajucarín B (**58**), *trans*-cajucarín B (**59**), sacacarin (**60**). En un estudio se realizaron pruebas *in vitro* y se evaluó la actividad leishmanicida del diterpeno DCTN contra la forma promastigote de *Leishmania* mostrando actividad con un $CI_{50} = 6,3\mu\text{g/mL}$ ($20,13\mu\text{M}$), Contra amastigotes axénicos presentó actividad con un $CI_{50} = 19,9\mu\text{g/mL}$ ($63,75\mu\text{M}$). ^[34]

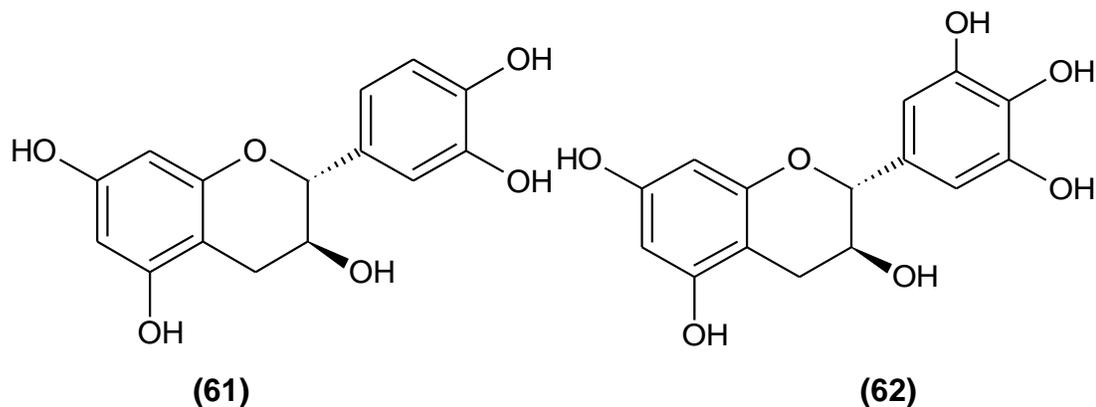




2.3.2.2 *Croton celtidifolius* Baill.

Esta especie es originaria de las regiones de la Mata Atlántica y se encuentran con frecuencia desde el Estado de Río de Janeiro hasta Goiás. La planta cuenta con numerosos nombres populares, que cambian con la región donde se encuentre, entre los cuales está "Pau-Sangre", "Sangre de Dragón", "Sangre de Adave", y otros. Se recomienda su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y ulcerosas, ya sea por masticar la corteza o por medio de una infusión. ^[36]

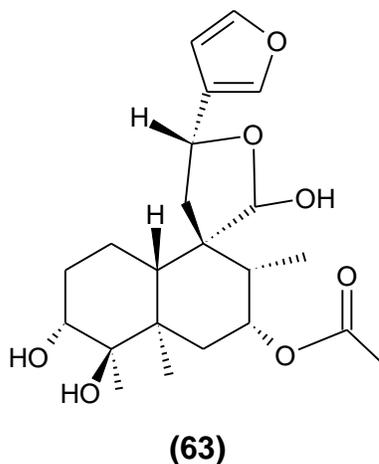
Los estudios para la caracterización química de los constituyentes de *Croton celtidifolius* mostraron que los compuestos principales son taninos condensados (proantocianidinas) incluyendo catequina (**61**), galocatequina (**62**), oligómeros y proantocianidinas poliméricas. También se demostró la presencia de alcaloides y saponinas en la corteza de esta planta. La actividad biológica relacionada a la planta incluyen las propiedades antiinflamatoria, antioxidante, anti-inflamatoria y neuroprotectora. ^[36]



2.3.2.3 *Croton eluteria* Bennett.

Es un arbusto o pequeño árbol tropical que se encuentra en las Antillas y en el norte de América del sur,^[19] es comúnmente conocido como la cascarilla y ha sido ampliamente utilizado en la medicina popular tradicional como estimulante digestivo y para reemplazar cortezas más valiosas como Chinchona y Cáscara. Hoy en día su uso principal es en el campo de la aromatización, donde su fragancia y su sabor amargo la han convertido en un agente saborizante de licores.^[37]

La investigación química de la cascarilla comenzó en 1845 cuando se aisló su principal metabolito secundario, el cascarillin (**63**). Este descubrimiento se erige como un hito en la historia de la química de productos naturales porque el cascarillin fue el primer diterpeno que se obtuvo en forma pura, además también fue una de las primeras sustancias amargas no alcaloidal que se aisló de una fuente vegetal.^[37]



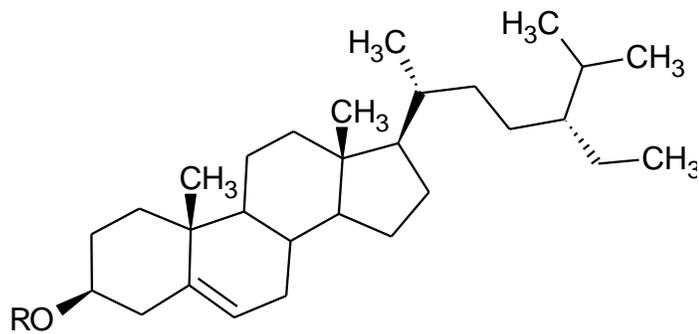
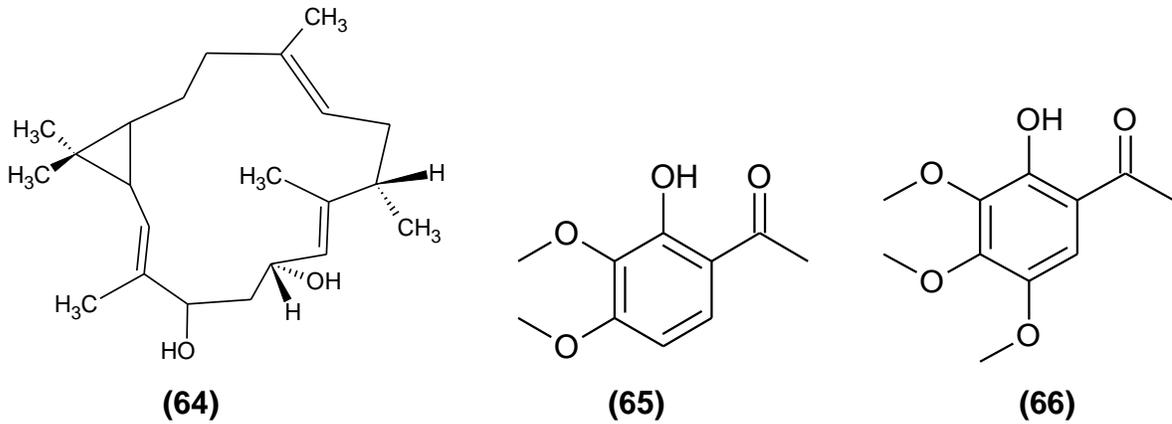
2.3.2.4 *Croton nepetaefolius* Baill.

Esta planta es popularmente llamada "membrillo rojo" y es abundante en el noreste de Brasil, donde se utiliza en la medicina popular como un sedante, un antiespasmódico y para el tratamiento del cólico intestinal.^[38]

A pesar de su popularidad, la planta ha recibido poca atención científica. Los estudios disponibles han tratado sólo con la composición química del aceite esencial de *Croton nepetaefolius* Baill descubriendo así, sus efectos a nivel intestinal y en las vías respiratorias. Los estudios farmacológicos han demostrado que tiene potente actividad antiespasmódica, en consonancia con su uso en la medicina popular. No se sabe, sin embargo, si tiene otras actividades biológicas.^[38]

En el estudio fitoquímico del extracto etanólico en los tallos del *Croton nepetaefolius* Baill, se pudieron aislar los diterpenos 1,4-dihidroxi-2E,6E,12E-trien-5-onacasbeno o 4-hidroxi- 2E,6E,12E-trien-5-onacasbeno

(64), 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona (65), 2-hidroxi-3,4-dimetoxiacetofenona (66) y los estirenos 3-O- β -D-gluco-piranosilsterol (67), β -sitosterol (68) y el estigmasterol (69).^[38]



(67) = R = 3-O- β -D-Glicopiranosil

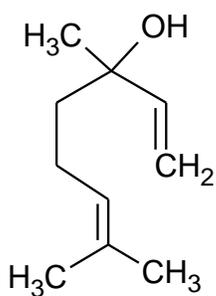
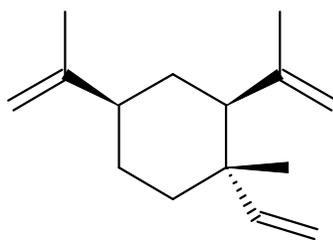
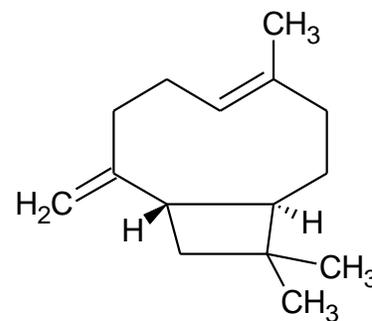
(68) = R = H, 22,23-dihidro

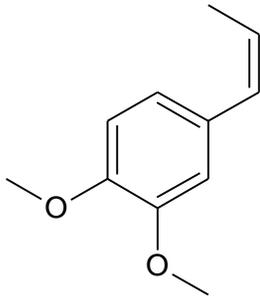
(69) = R = H, Δ^{22-23}

2.3.2.5 *Croton palanostigma* Klotzsch.

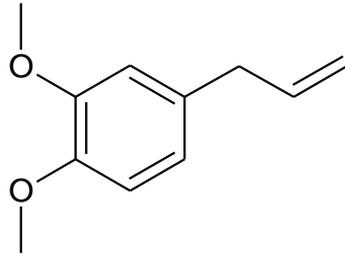
Es un árbol de tamaño mediano, nativo de la costa brasileña del Norte. Estudios fitoquímicos de la corteza de *Croton palanostigma* Klotzsch produjeron dos diterpenos con un esqueleto clerodano (aparisthman y cordatin). Estos compuestos mostraron actividad anti-úlceras similar a la cimetidina (Tagamet®) el compuesto utilizado para el tratamiento de úlceras pépticas.^[39]

Esta especie, junto con diversos *Croton spp*, son conocidas por producir una savia viscosa de color rojo llamada sangre de dragón.^[37] A partir de los aceites esenciales de hojas, ramas, cortezas del tronco y frutos de esta especie, se aislaron los compuestos linalool (**70**), β -elemeno (**71**), *trans*-cariofileno (**72**), *trans*-metilisoeugenol (**73**) metileugenol (**74**), α -pineno (**75**), limoneno (**76**), sabineno (**77**) y β -pineno (**78**).^[40]

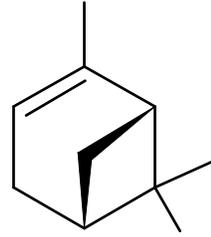
**(70)****(71)****(72)**



(73)



(74)



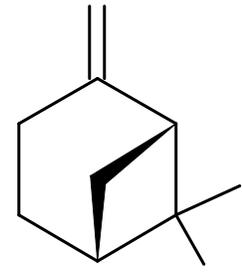
(75)



(76)



(77)

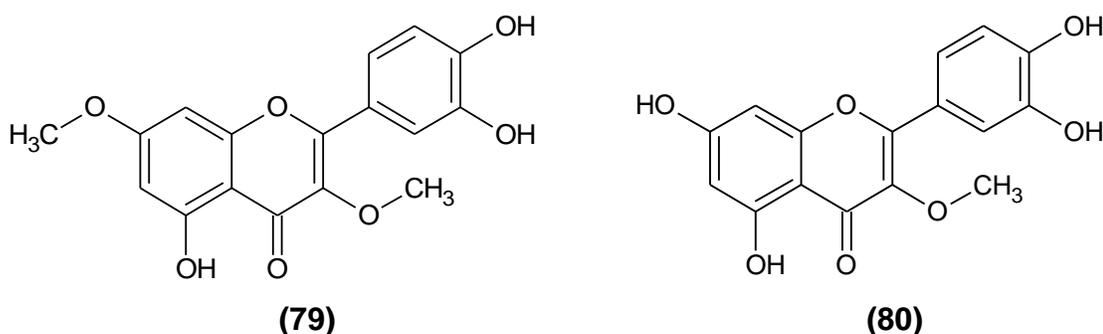


(78)

2.3.2.6 *Croton schiedeanus* Schlecht.

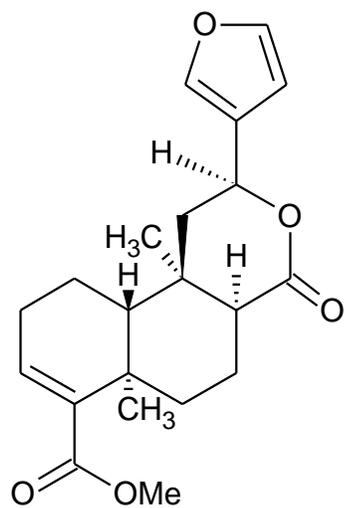
Es una especie medicinal cuyas hojas en infusión se utilizan popularmente en Colombia para la hipertensión arterial. Estudios previos señalan que el extracto acuoso y en mayor medida el extracto etanólico, ejercen efectos hipotensores y vasodilatadores en ratas de laboratorio. El análisis fitoquímico ha llevado al aislamiento e identificación de metabolitos secundarios del tipo flavonoide, diterpenoide, esteroide y fenilbutanoide. ^[41]

La ayanina su metabolito mayoritario presentó efectos vasodilatadores vinculados especialmente con la ruta metabólica de guanilato ciclasa y da soporte al uso tradicional de esta especie. Además de la ayanina también la quercetina, 3,7-di-O-metilquercetina **(79)** y 3-O-metilquercetina **(80)**, serían los principales responsables de la actividad biológica. Si bien los mecanismos vasodilatadores de estos metabolitos están ligados a la activación de óxido nítrico, hasta la fecha no se ha precisado el o los principales mecanismos vasodilatadores del extracto total de *C. schiedeana*.^[41]

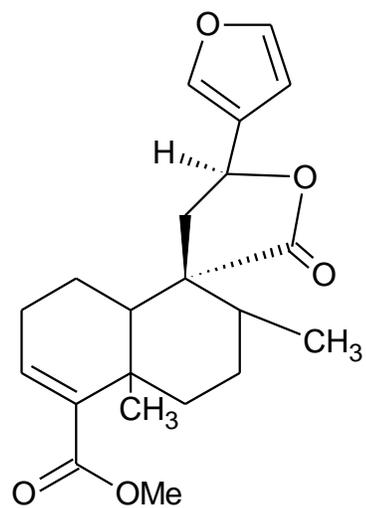


2.3.2.7 *Croton urucurana* Baillon.

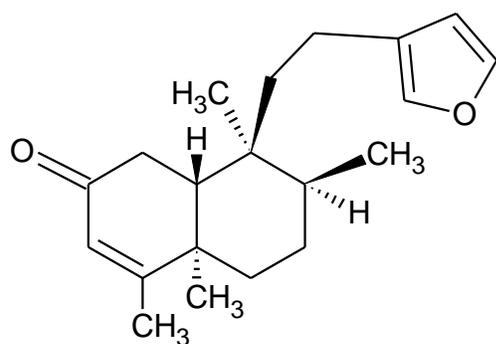
Es un árbol que se encuentra comúnmente en la región de Ciudad Dourados, de Brasil. Es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas con infección y para acelerar la cicatrización. En estudios fitoquímicos de la corteza de esta planta, se aislaron tres diterpenos clerodanos y se identificaron como: metil-12-epibarbascoata **(81)**, sonderianin **(82)** y 15,16-epoxiclerodan-3,13,14-trien-2-ona **(83)**, junto con los compuestos metil-3-oxo-12-epibascoato **(84)**, ácido acetil aleuritólico **(85)**, β -sitosterol **(68)**, β -sitosterol-3-O-glucosido **(86)**.^[42]



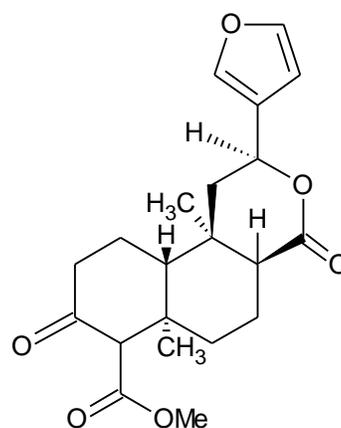
(81)



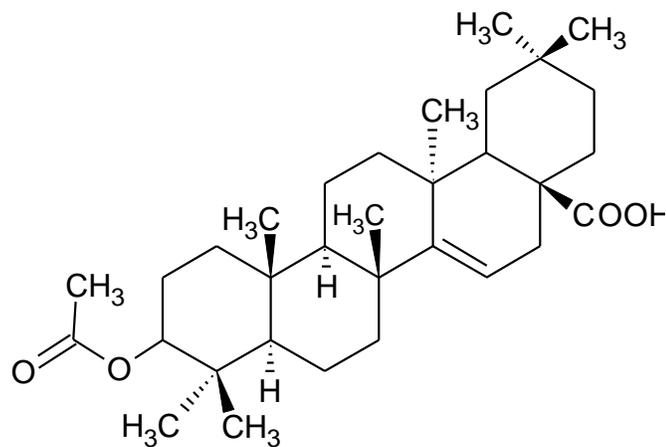
(82)



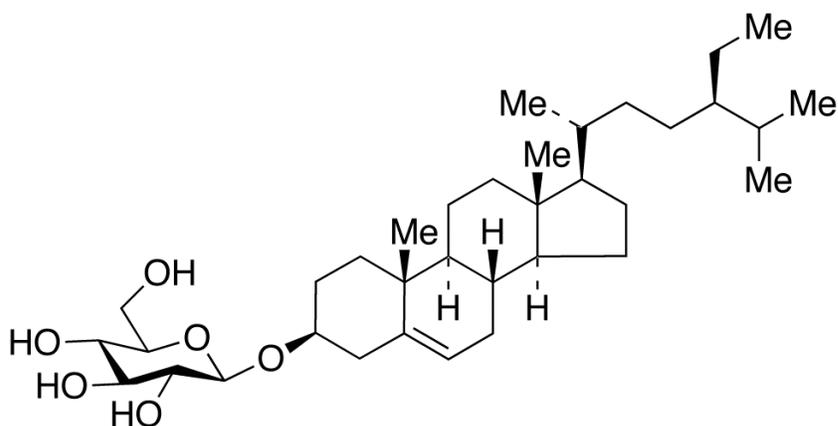
(83)



(84)



(85)

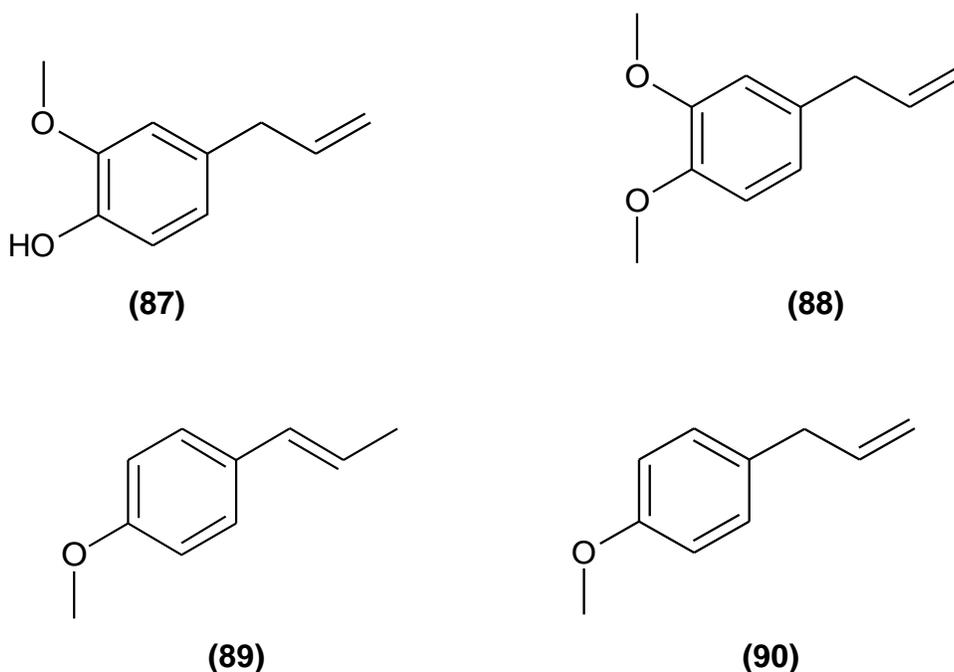


(86)

2.3.2.8 *Croton zehntneri* Pax and Hoffman.

Esta planta aromática cuyas hojas y tallos están equipados con un aroma que recuerda a una mezcla de hinojo y clavo India^[43], es nativa de la región nororiental de Brasil y es popularmente conocida como “canela de cuña”, sus hojas tienen un aceite esencial principalmente compuesto por terpenos, que corresponden al 3,2% de su peso seco.^[44]

Esta planta se utiliza principalmente en la medicina popular para el tratamiento de la ansiedad, anorexia o para el alivio de trastornos gastrointestinales. Los principales compuestos terpenoides presentes en el aceite esencial de este *Croton* son: eugenol **(87)**, metil-eugenol **(88)**, anetol (1-metoxi-4-(1-propenil) benceno) **(89)**, que es un líquido incoloro con sabor a anís y es 10 veces más dulce que el azúcar común. Estragol (1-alil-4-metoxibenceno) **(90)**, es un fenilpropeno y un isómero de anetol que comparte su sabor a anís, pero no posee el sabor dulce.^[44]

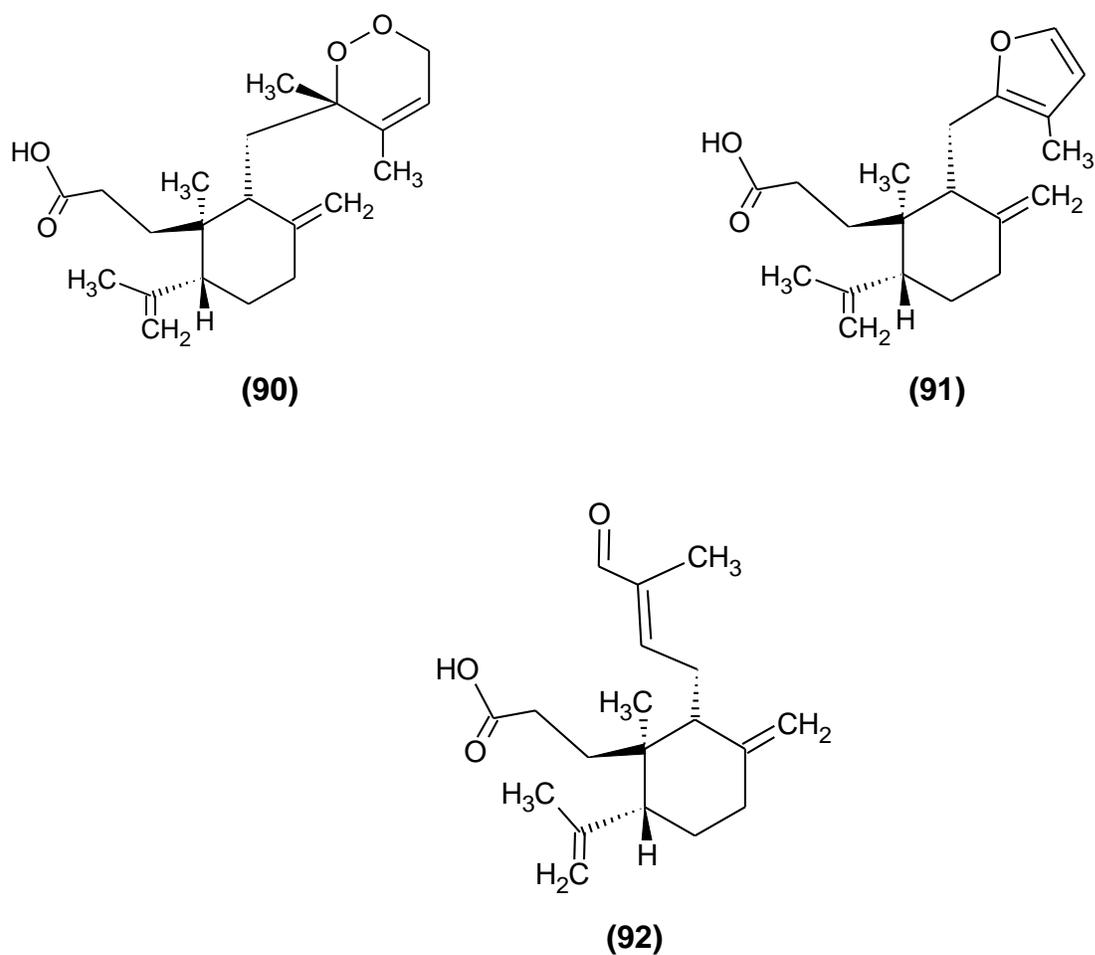


2.3.2.9 *Croton stipuliformis* Bark.

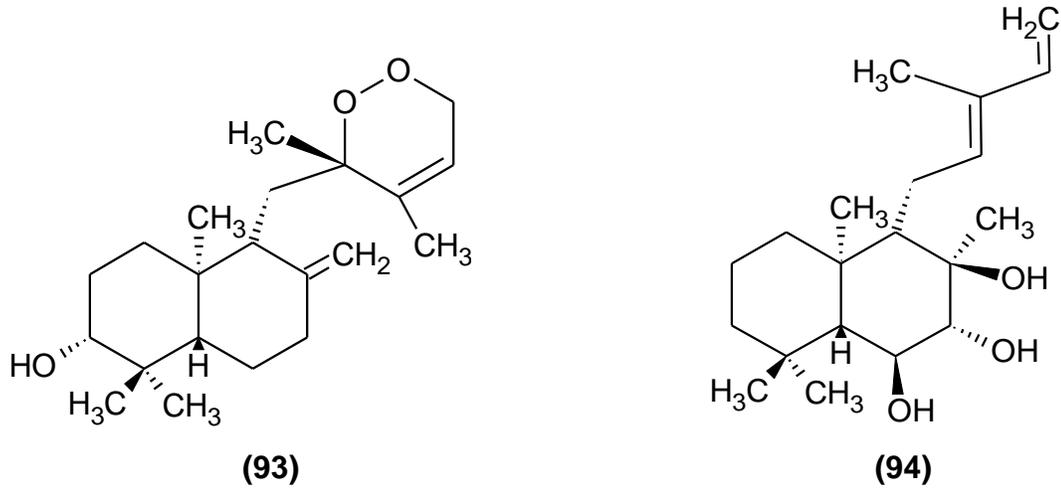
Es una especie nativa de Colombia y crece bajo climas suaves entre 500 y 1.800 metros sobre el nivel del mar, en la zona de los Andes correspondiente a la región centro-oeste de Colombia. Este árbol alcanza una altura de 25 a 30 metros, y se le conoce comúnmente como "guacamayo" o "candelero", su corteza produce el látex

llamado “Sangre de Drago”, que se utiliza para diferentes fines farmacológicos, como el tratamiento de úlcera, el dolor, anemia y cáncer. [21]

A partir de un extracto metanólico de las hojas de *Croton stipuliformis* Bark, se aislaron tres diterpenos del tipo *ent*-3,4-*seco*-labdanos (**90-92**). [45]

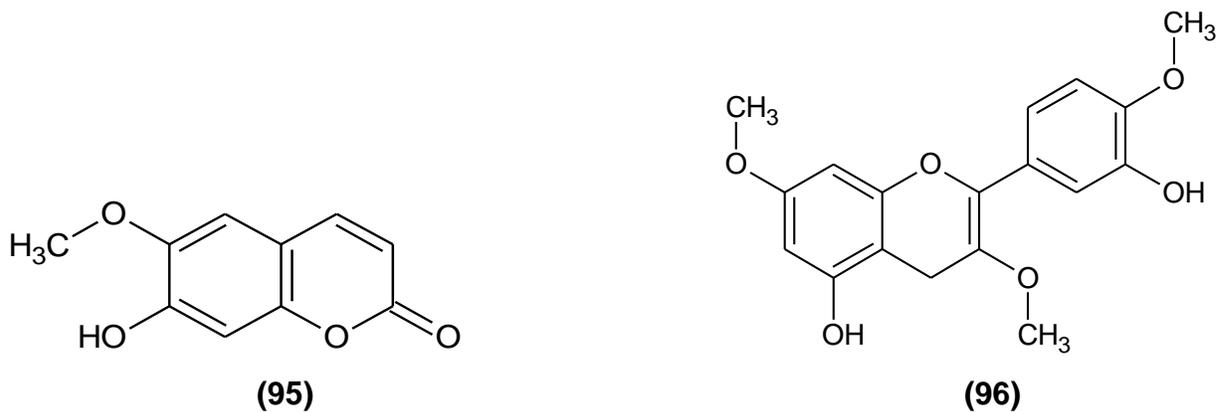


Además, también se lograron aislar el *ent*-labdano (**93**), 6-hidroxinidorelol (**94**) y β -sitosterol (**68**). [45]



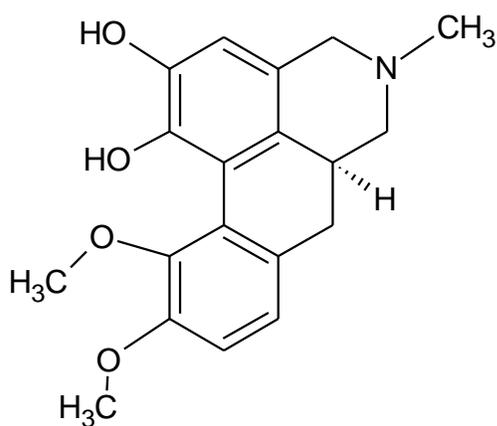
2.3.2.10 *Croton adenocalyx* Baill.

Es una planta representativa de Brasil. La purificación de la fracción de hexano, obtenida a partir del extracto etanólico de la corteza del tronco de esta especie, dio como resultado el aislamiento de la cumarina 6-metoxi-7-hidroxicumarina **(95)** y el flavonoide 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona **(96)**.^[46]

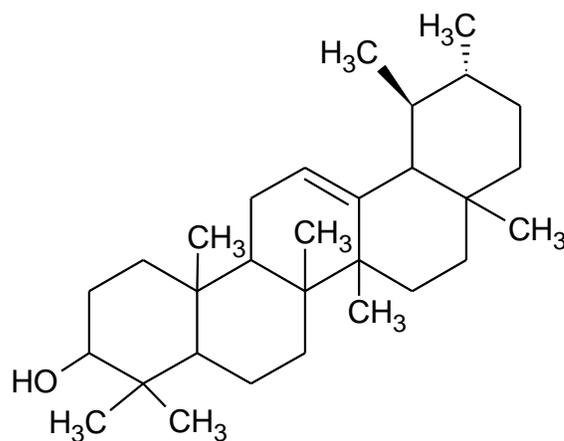


2.3.2.11 *Croton macrobothrys* Baill.

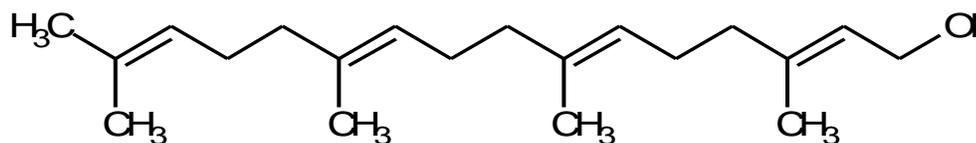
Es un árbol de la Mata Atlántica en el sur de Brasil.^[47] A partir del estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de la especie, se aislaron e identificaron los siguientes compuestos: acoridina (**97**), β -sitosterol (**68**), β -amirina (**98**), así como el geranilgeraniol (**99**) y la salutaridina (**100**). Compuestos que ya eran conocidos para el género *Croton*.^[48]



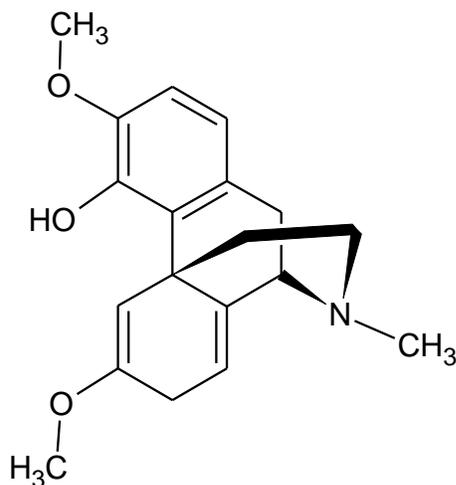
(97)



(98)



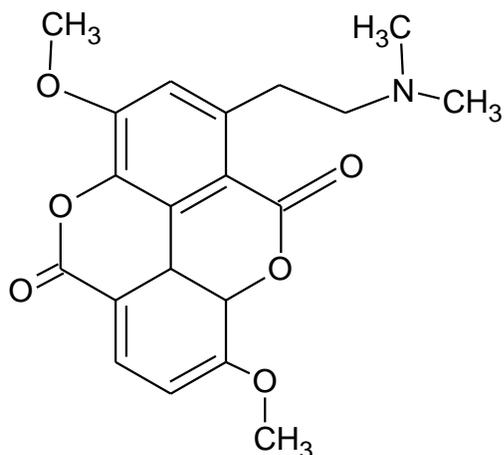
(99)



(100)

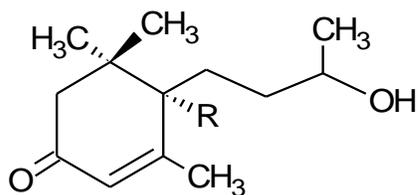
2.3.2.12 *Croton lechleri* Mull. Arg.

Es un árbol amazónico de pequeño tamaño y es conocido por su savia roja que utilizan los nativos para tratar enfermedades como la cicatrización de heridas, enfermedades gastrointestinales y también el cáncer.^[49] La caracterización fitoquímica de la savia ha llevado a la conclusión de que las proantocianidinas oligoméricas y flavonoles constituyen casi el 90% del peso en seco de la especie. Sin embargo, diversos compuestos menores también se han encontrado; uno de ellos es la taspina (**101**) un alcaloide que se encuentra en la savia de los árboles maduros, el cual presenta buenas propiedades de curación de heridas.^[50]



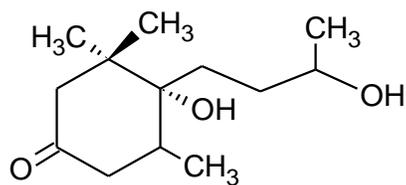
(101)

En otra investigación de la savia de *Croton lechleri* Mull. Arg fueron aislados e identificados tres megastimanos (102-104), tres lignanos (105-107), cuatro 3-flavonoles (108-111), tres fenilpropanoides (112-114) y un clerodano (115).^[51]

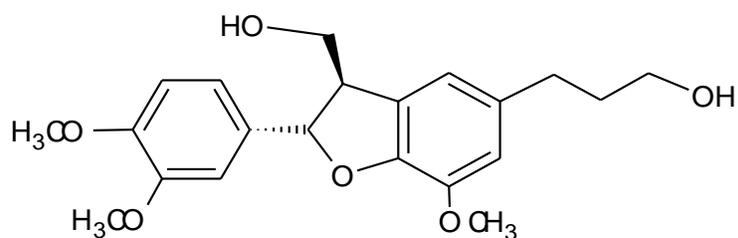


(102) = R = OH

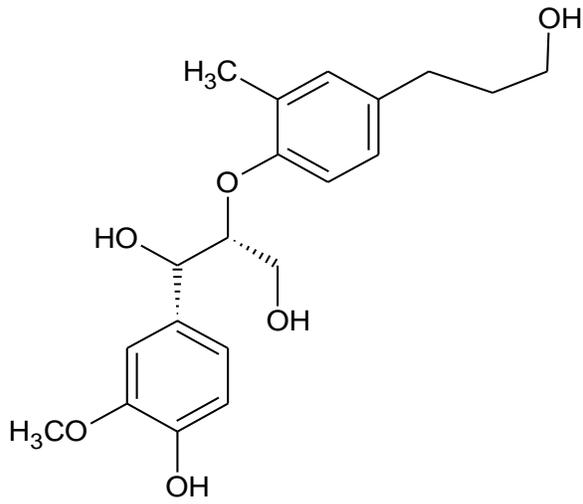
(103) = R = H



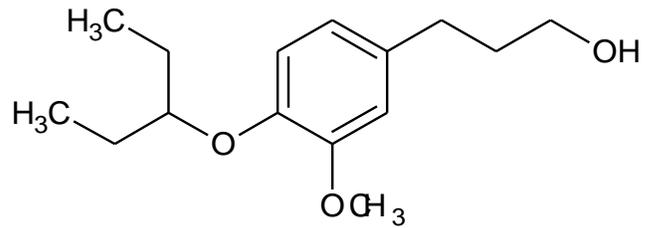
(104) = 4,5-dihidroxi-blumenol



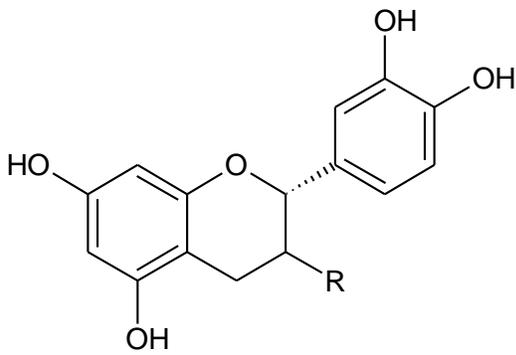
(105) = 3',4-O-dimetilcedrusin



(106) = (\pm)-*eritro*-guaiacil-glicerol-O-4'-dihidroconiferileter

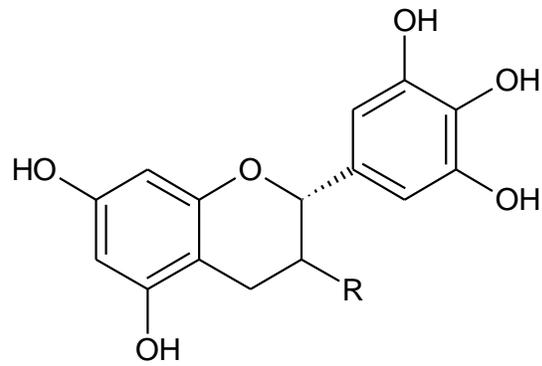


(107) = 2-[4-(3-hidroxiopropil)-2-metoxifenoksi]-propano-1,3-diol



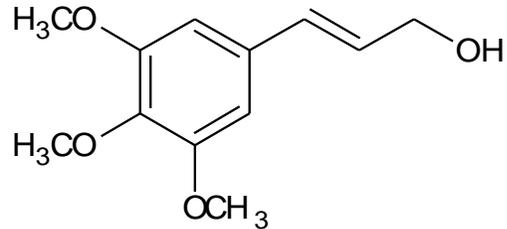
(108) = R \blacktriangle OH

(109) = R \cdots OH

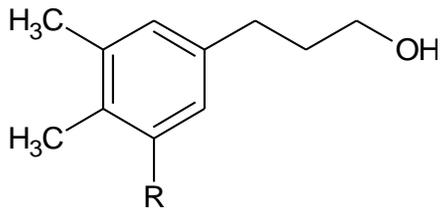


(110) = R \blacktriangle OH

(111) = R \cdots OH

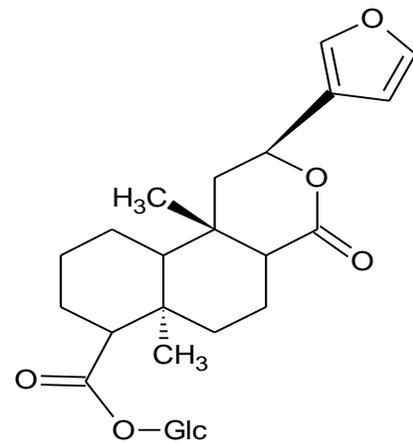


(112) = alcohol *trans*-3,4,5-trimetoxi-cinámico



(113) = R = H

(114) = R = OCH₃

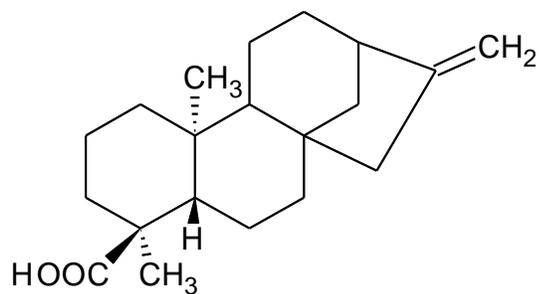


(115) = glucósido del ácido floribundico

2.3.2.13 *Croton antisiphiliticus* Mart.

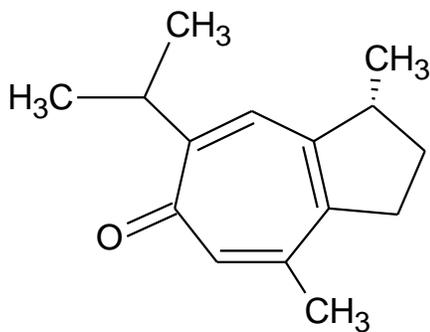
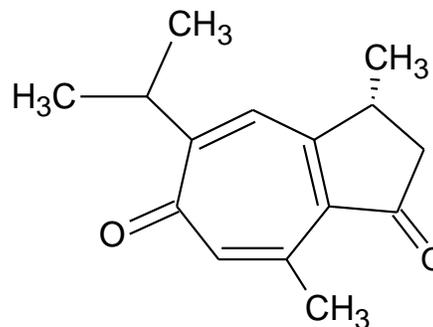
Es un arbusto conocido como la “fiebre aftosa” y la “perdiz alcanforeira”, es ampliamente utilizado por las poblaciones que habitan en el bioma del Cerrado. Según datos etnofarmacológicos, el extracto alcohólico de las raíces se utiliza para tratar algunas enfermedades de transmisión sexual y las infecciones del sistema reproductivo femenino y masculino. ^[52]

El fraccionamiento del extracto de cloroformo de la raíz de *Croton antisiphiliticus* Mart dio como resultado el aislamiento de un compuesto, que se identificó como ácido *ent*-kaur-16-en-18-oico **(116)**.^[53]

**(116)**

2.3.2.14 *Croton argyroglossum* Baill.

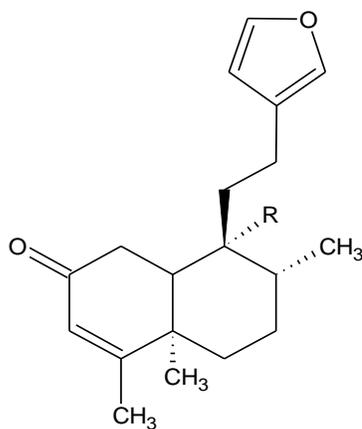
Es un arbusto que crece en la flora del noreste brasileño.^[54] Por lo general, se hacen infusiones con las hojas o flor del arbusto para el tratamiento de enfermedades del corazón, gripe y como tranquilizante.^[55] De la corteza del tallo se aislaron dos derivados del tropeno, uno de estos se identificó como orobanona **(117)** y el otro como pernambucona **(118)**.^[56]

**(117)****(118)**

2.3.2.15 *Croton campestri*.

Es un arbusto de Brasil conocido popularmente como “Velamo Do Campo” que es utilizado como un potente depurativo, también para combatir la escrófula (proceso infeccioso que afecta a los ganglios linfáticos), enfermedades venéreas, dermatofitosis, tumores, enfermedades de la piel, reumatismos, úlceras del útero, la diarrea y la artritis. ^[57]

Del extracto de diclorometano de las raíces de esta planta se aislaron tres furano-diterpenos llamados, velamone (**119**), velamolone (**120**) y acetato de velamolone (**121**). ^[57]



(119) = R = CH₃

(120) = R = CH₂OH

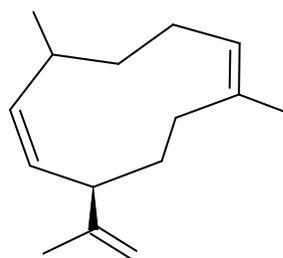
(121) = R = CH₂OAc

En nuestro grupo de investigación liderado por Dra. Alírica Suárez, como parte de un macroproyecto basado en el estudio fitoquímico de plantas de la familia Euphorbiaceae presentes en Venezuela, se han desarrollado varias investigaciones de las especies pertenecientes a esta familia, incluyendo las del género *Croton*. Las especies de este género que han sido estudiadas hasta ahora por nuestro grupo son *C. malambo*, *C. cuneatus*, *C. huberi*, *C. matourensis*, *C. micans*, *C. rodolens*, *C. pungens*, *C. hircinus*, *C. sucrensis*, *C. rhamnifolius* y *C. gossypifolius*. Los resultados de algunos de estos estudios se muestran a continuación.

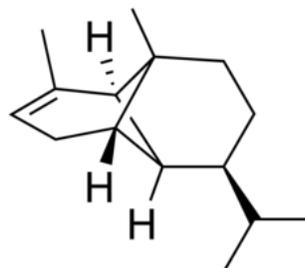
2.3.2.16 *Croton malambo* H. Karst.

Es un árbol pequeño que crece en la costa norte colombiana y en la región oriental venezolana, conocido por los nativos como “malambo” y “palomatías”. Esta especie presenta actividad citotóxica, proapoptótica y actividad antiinflamatoria. La corteza de esta especie es ampliamente utilizada en infusiones como agente antiinflamatorio, analgésico y para el tratamiento de diversas enfermedades como la diabetes, diarreas, reumatismo y úlceras gástricas. ^[58]

En estudios fitoquímicos realizados a la corteza del árbol *Croton malambo*, se lograron aislar los compuestos que se nombran a continuación: linalool (**70**), β -elemeno (**71**), *trans*- β -cariofileno (**73**), germacreno D (**122**), *trans*-metilisoegenol (**88**), α -copaeno (**123**) y el compuesto mayoritario fue metil-eugenol (**75**). ^[58]



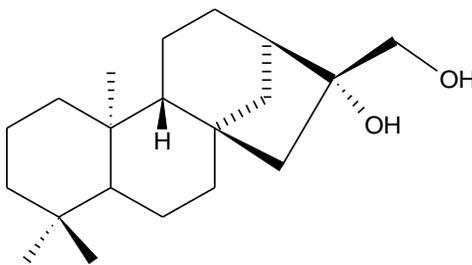
(122)



(123)

En otro estudio realizado a esta especie se aisló del extracto de diclorometano un diterpeno *ent*-kaurano, 16β - 17α -diol-*ent*-kaurano (**124**). Se evaluó la actividad citotóxica y proapoptótica de este compuesto mediante el método colorimétrico MTT sobre líneas celulares del tipo MCF-7 (carcinoma mamario humano). Cuando las células del carcinoma mamario fueron tratadas con concentraciones crecientes del *ent*-kauranoide,

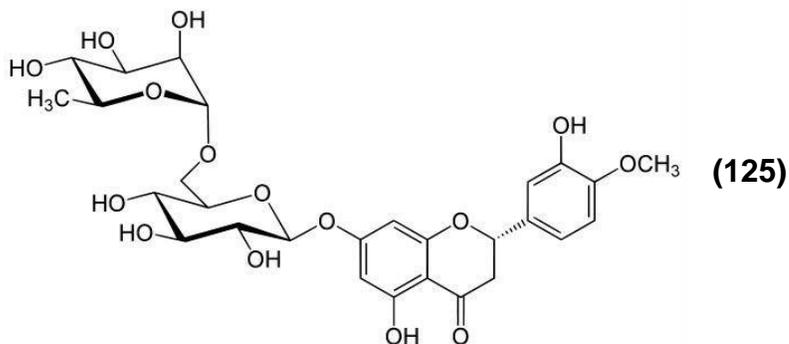
su actividad citotóxica mostró un CI_{50} de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, dosis que es 2,66 veces menor que los correspondientes valores para células no malignas. ^[59]



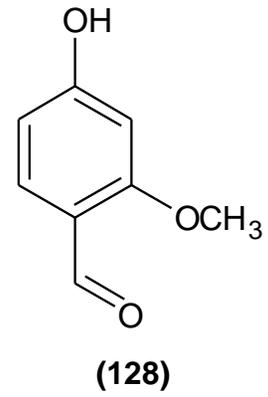
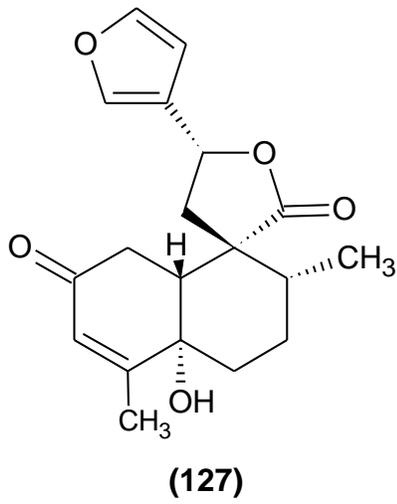
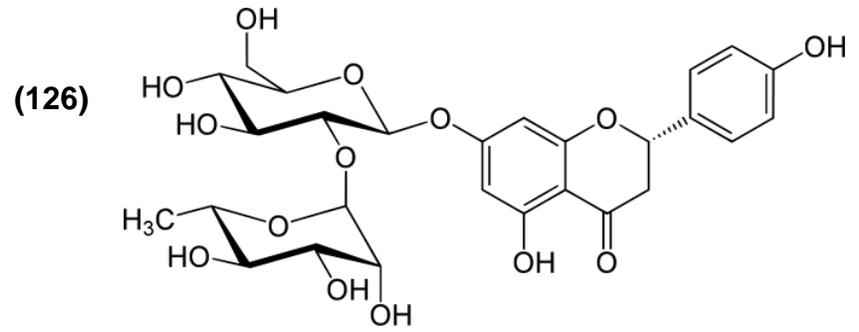
(124)

2.3.2.17 *Croton matourensis* Aubl.

Es un árbol pequeño o mediano que se encuentra en Brasil, Guayana y Venezuela. En la investigación fitoquímica de los extractos orgánicos obtenidos en las hojas de esta especie se pudieron aislar e identificaron dos flavonas glucosiladas: hesperidina (**125**) y naringina (**126**); dos diterpenos del tipo neoclerodano: *trans*-dehidrocrotonina (**55**) y 5 α -hidroxi-*trans*-dehidrocrotonina (**127**); el monoterpene vainillina (**128**) y el triterpene β -amirina (**98**). ^[60]

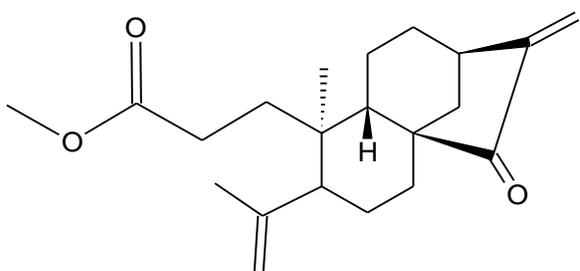


(125)

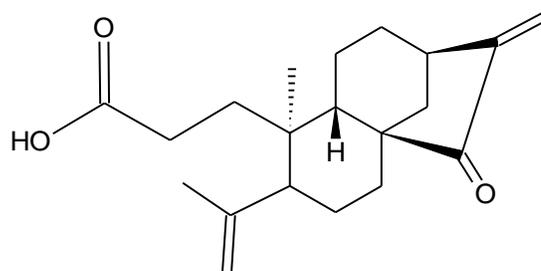


2.3.2.18 *Croton micans* Sw.

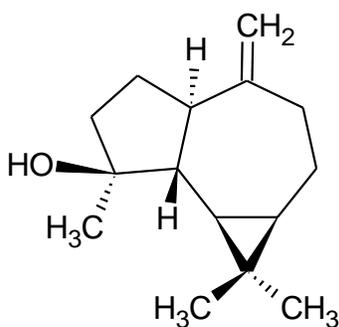
Es un arbusto que se encuentra en el norte de Venezuela, en otras partes de sur América y en algunos países del Caribe. No se conoce un nombre común documentado para esta planta. En el estudio fitoquímico y farmacológico realizado a las flores de la especie *Croton micans* Sw. se pudieron aislar los compuestos: ácido de caracasina (**129**), espatulenol (**130**), 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol (**131**), estigmasterol (**69**), β -sitosterol (**68**), ácido caracasina (**132**)^[61]



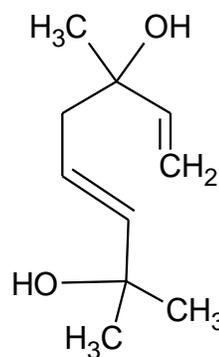
(129)



(132)



(130)

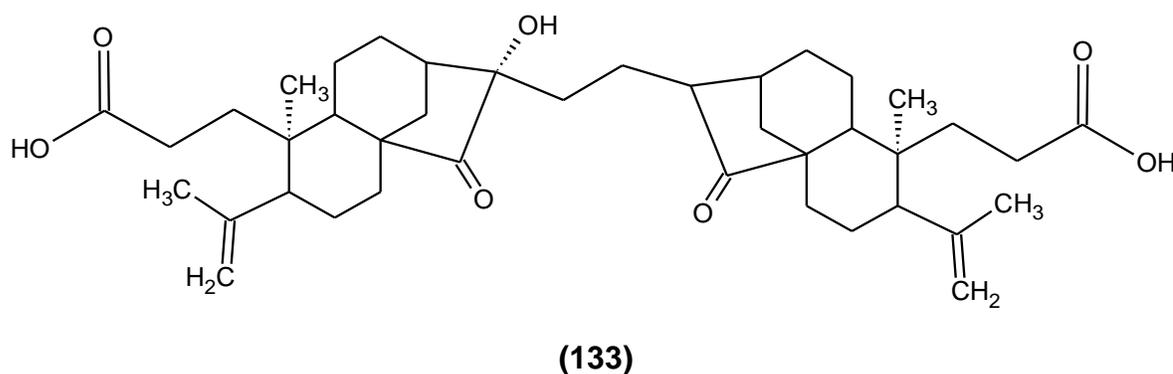


(131)

Se evaluó la actividad citotóxica de caracasine y el ácido de caracasine sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano. Ambos compuestos indujeron citotoxicidad en el

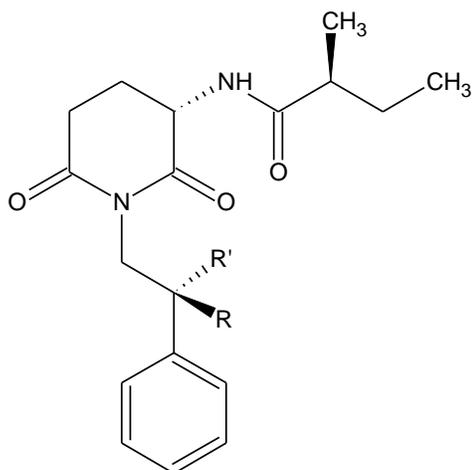
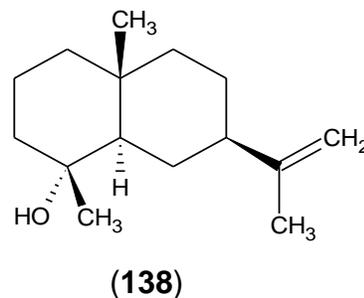
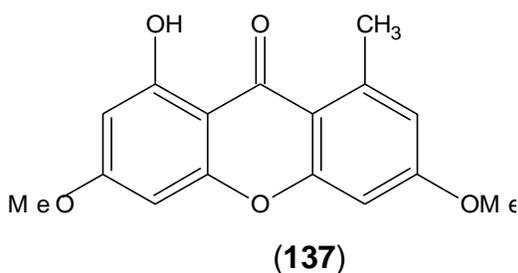
rango de 2 a 25 μM para caracasine (CI_{50} 2.7-24.3 $\mu\text{g/mL}$) y 0.8 a 12 μM para el ácido (CI_{50} 1.4-10.9 $\mu\text{g/mL}$).

En otra investigación a partir de los tallos de *Croton micans* Sw., se aislaron e identificaron los 5 dímeros del tipo *ent*-3,4-*seco*-kaurano: ácido micansinoico (**133**), ácido isomicansinoico (**134**), dimetil (**135**) y monometil (**136**) del ácido micansinoico. ^[61]



2.3.2.19 *Croton cuneatus* Klotz.

Este es un árbol pequeño que crece en la región amazónica de Venezuela, y es comúnmente conocido como arapurina, caferana y manteco de agua. Esta planta medicinal es usada por los nativos del Amazonas para tratar inflamaciones, alteraciones gastrointestinales y como un agente analgésico. El análisis fitoquímico del extracto de diclorometano de las partes aéreas de esta planta, indicó la presencia de lichexantona (**137**), selin-11-en-4 α -ol (**138**) y los alcaloides glutarimídicos: julocrotonina (**139**), julocrotol (**140**), isojulocrotol (**141**) y julocrotona (**142**).^[62]



(139): R = R' = H

(140): R = H, R' = OH

(141): R = OH, R' = H

(142): R = R' = O

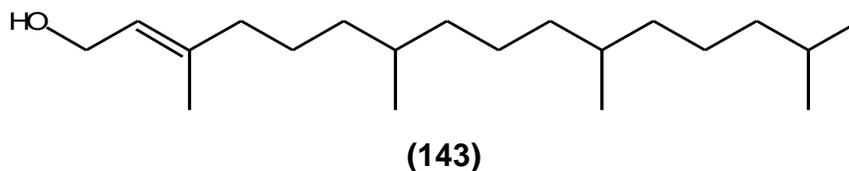
Se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos por medio del método MTT contra los siguientes tipos de líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), X-17 (carcinoma de colon), Hep-G2 (hepatoma), Skhep-1 (tumor de hígado) y LoVo (carcinoma de colon). Se encontró que todos los compuestos resultaron citotóxicos sobre las líneas MCF-7 y Hep-G2, siendo el julocrotol, el más citotóxico y selectivo sobre la línea MCF-7 con un valor de $CI_{50} = 21.0 \mu\text{g/mL}$.⁶³ En otro estudio realizado, los compuestos julocrotonina, julocrotol, isojulocrotol y julocrotona presentaron excelente actividad antiinflamatoria.^[63]

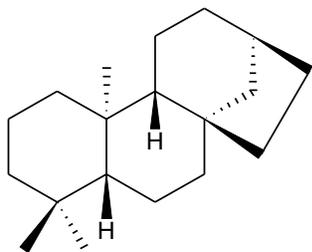
La composición del aceite esencial de *C. cuneatus* Klotz fue determinada mediante un análisis GC-MS, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides y alcoholes sesquiterpénicos.^[64]

En estudios posteriores, se determinó que el extracto acuoso de *Croton cuneatus* presenta actividad antiinflamatoria^[65] así como actividad antidiabética.^[66]

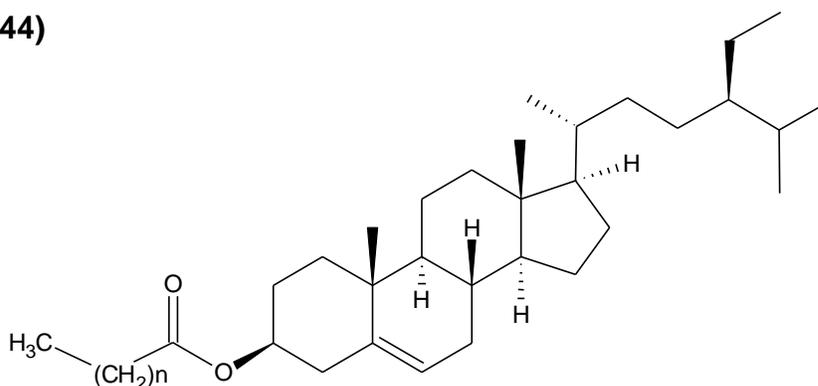
2.3.2.20 *Croton pungens* Jacq.

Esta planta es nativa de Venezuela y el estudio fitoquímico de los extractos apolares de esta especie llevó al aislamiento de fitol (**143**), nor-kaurano (**144**), β -sitosterol (**68**) y un éster de β -sitosterol (**145**).^[67]





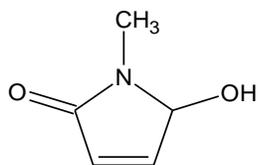
(144)



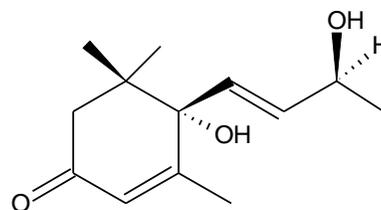
(145)

2.3.2.21 *Croton huberi* Steyerm.

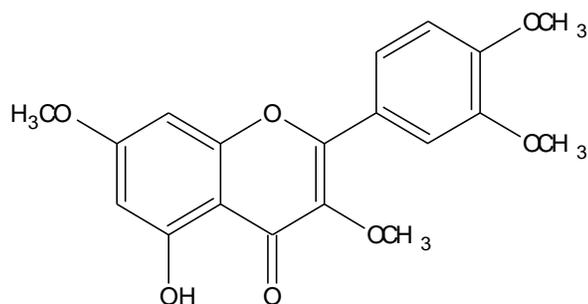
Este es un árbol mediano que crece en la cordillera norte de Venezuela. El estudio fitoquímico de las hojas de esta planta permitió el aislamiento e identificación de retusina (**146**) y N-metil-5-hidroxi- Δ^3 -pirrolin-2-ona (**147**), aislados del extracto de diclorometano, quercitrina (**148**), aislados del extracto de acetato de etilo y del extracto de hexano se aisló blumenol A (**149**), óxido de cariofileno (**150**) y fitol (**143**).^[68]



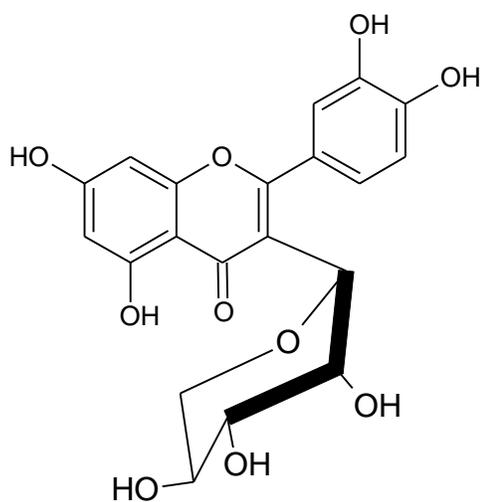
(147)



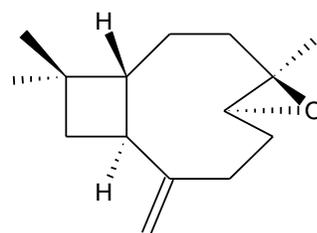
(149)



(146)



(148)



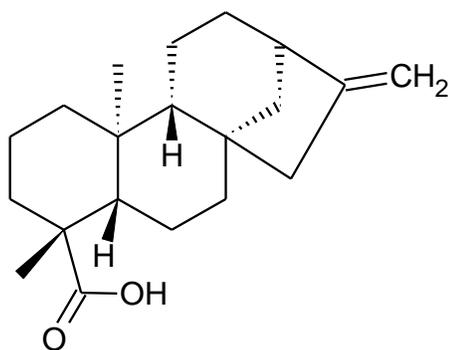
(150)

En otro estudio realizado, se determinó la composición del aceite esencial de las hojas de esta especie, que se caracterizó por poseer un alto contenido de sesquiterpenos (62,5%) siendo el γ -eudesmol el principal constituyente (18.7%), seguido por germacreno-D (11.7%), β -eudesmol (7,6%), óxido de cariofileno (6,9%), kauranos (5,3%), humuleno (4,3%), cedrol (4.6 %) e isoelemicina (3.0%).^[69]

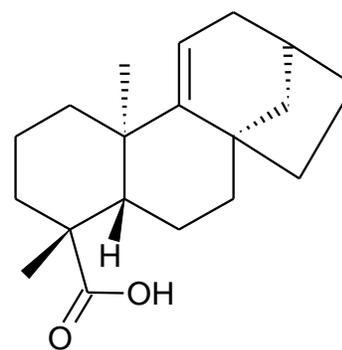
2.3.2.22 *Croton gossypiifolius* Vahl.

Es un árbol que crece en el norte de Venezuela y es utilizado en la medicina popular para la curación de heridas y en el tratamiento de la sífilis. Esta especie objeto de este proyecto de investigación ya ha sido previamente estudiada en nuestro grupo, sin embargo, solo se ha investigado la composición de sus aceites esenciales y se realizó el estudio fitoquímico de su corteza, encontrándose resultados interesantes que nos incentivan a continuar el estudio de esta especie.

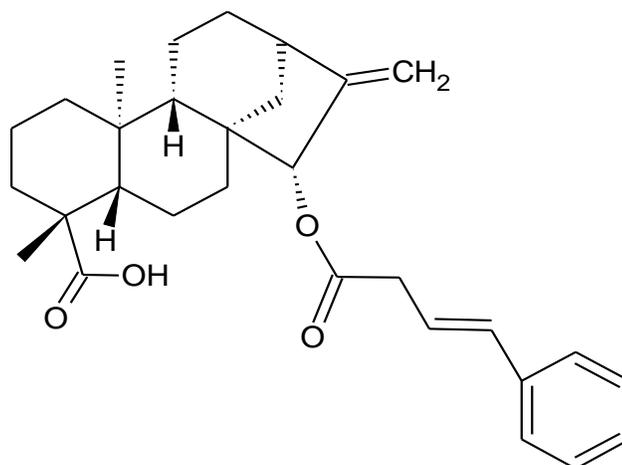
En un estudio fitoquímico realizado en la corteza de esta planta, fueron aislados tres diterpenos del tipo *ent*-kaurano, los cuales son: ácido *ent*-kaurenoico (**151**), ácido grandiflorénico (**152**), ácido *ent*-15 β -E-cinamil-kaurenoico (**153**), un *ent*-3,4-*seco*-kaureno conocido como 7-deoxo-geayina (**154**), el flavonoide quercitrina (**148**) y ácidos grasos donde el ácido palmítico resultó ser el mayoritario. Estos compuestos se identificaron por RMN en 1D y 2D y por espectrometría de masas, y son reportados por primera vez en esta especie. De especies de esta planta, se han aislado péptidos cíclicos, alcaloides, lignanos y flavonoides^[71]



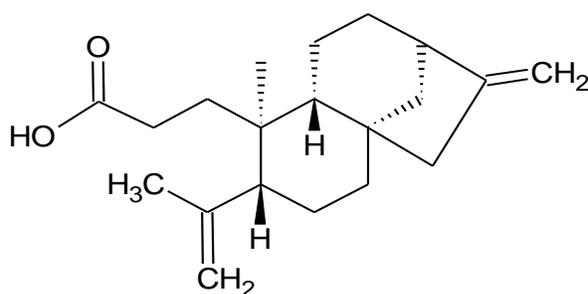
(151)



(152)

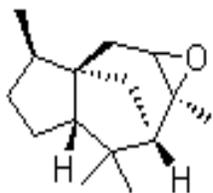


(153)

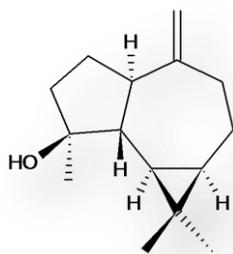


(154)

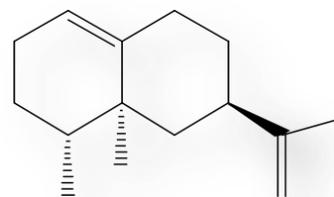
En el análisis de los aceites esenciales, se identificaron 51 compuestos, entre los mayoritarios se tienen: óxido de α -cedreno **(155)** (18,6%), espatulenol **(156)** (16,3%), valenceno **(157)** (5,8%), geranilo-pentaonato de etilo **(158)** (5,3%), α -cadinol **(159)** (4,0%), germacreno D **(160)** (3,5%) y longifoleno **(161)** (3,3%).^[70]



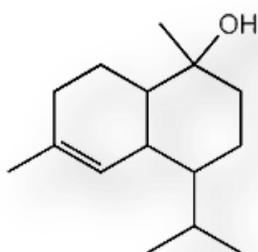
(155)



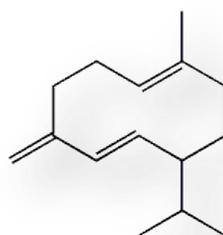
(156)



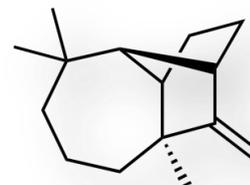
(157)



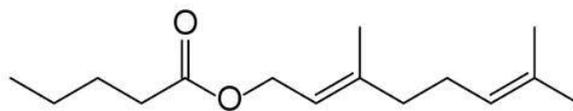
(159)



(160)



(161)



(158)

3 JUSTIFICACIÓN

Croton gossypiifolius Vahl es una especie nativa de nuestro país de la cual no se conocen otros antecedentes en la literatura además de los reportados por nuestro grupo de investigación, en el cuál se realizó el estudio fitoquímico de los tallos de la especie y se determinó la composición del aceite esencial. Con el objetivo de continuar el estudio de esta planta y en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos aislados del género *Croton*, se propuso llevar a cabo el estudio fitoquímico de las hojas de esta especie.

Basados en los antecedentes del género y en los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico de la corteza de esta especie, es muy probable que compuestos del tipo terpénicos y flavonoides sean aislados. Este tipo de estructuras son ampliamente conocidas por presentar una amplia gama de actividades biológicas sobre todo contra líneas celulares de cáncer humano. Por tal motivo, se considera que, la continuación del estudio de esta especie puede representar un aporte al campo de los productos naturales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- 1) Aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de la planta *Croton gossypiifolius* Vahl y evaluar su posible actividad citotóxica y antibacteriana.

4.2 Objetivos Específicos:

- 1) Preparar el extracto metanólico de las hojas de la planta *Croton gossypiifolius* Vahl mediante la técnica de maceración.
- 2) Realizar particiones del extracto metanólico de las hojas de *Croton gossypiifolius* Vahl con solventes de distinta polaridad para obtener las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo.
- 3) Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo de las hojas de la planta *Croton gossypiifolius* Vahl.
- 4) Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas de RMN¹H, RMN¹³C y espectrometría de masas.

- 5) Evaluar la posible actividad citotóxica de los compuestos aislados y caracterizados sobre diversas líneas celulares de cáncer humano a través del método de MTT.

- 6) Evaluar la posible actividad antibacteriana de los compuestos aislados y caracterizados a través del método de difusión sobre placas de agar.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Instrumentos.

- ✓ Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Laboratorio de RMN, Facultad de Farmacia. U.C.V.).
- ✓ Rotavapor BÜCHI modelo B-480.
- ✓ Lámpara de UV en una longitud de onda (λ 254 nm) UVP modelo UL3101.
- ✓ Balanza analítica OHAUS.

5.2 Materiales

5.2.1 Solventes.

- ✓ Acetato de etilo (AcOEt). p.a.
- ✓ Diclorometano (CH_2Cl_2). p.a.
- ✓ Metanol (MeOH). p.a.
- ✓ *n*-Hexano. p.a.
- ✓ Cloroformo (CHCl_3). p.a.

5.2.2 Solventes para análisis de RMN.

- ✓ Cloroformo deuterado (CDCl_3).
- ✓ Metanol deuterado (MeOD).

5.3 Material para cromatografía

- ✓ Sílica gel G60 para cromatografía de columna (CC), 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- ✓ Placas de sílica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20x20 cm. 0,20 mm de espesor.
- ✓ Placas preparativas de sílica gel 60. F₂₅₄, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor. MERK.

5.3.1 Reveladores.

- ✓ *p*-anisaldehído: 5 mL de *p*-anisaldehído con 90 mL de EtOH, 5 mL de H₂SO₄ y 1 mL de CH₃COOH glacial.

5.4 Metodología experimental.

El estudio fitoquímico de la planta *Croton gossypifolius* Vahl se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, U.C.V.

5.5 Colecta del material vegetal.

La planta de *Croton gossypifolius* Vahl fue colectada en La Cortada del Guayabo, Estado Miranda, Venezuela, e identificada por el Dr. Stephen Tillett. Un ejemplar representativo de la muestra identificado con el código MYF26723, ha sido depositado en el Herbario "Dr. Víctor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

5.6 Extracción.

Una vez colectada la planta, se dejó secar a temperatura ambiente por varios días y luego se separaron las hojas, las cuales se molieron y posteriormente se colocaron en maceración con metanol por una semana. Seguidamente se filtró el extracto metanólico y se evaporó el solvente a presión reducida mediante el uso de un rotaevaporador, obteniendo así el extracto crudo.

El crudo obtenido se disolvió en 100 mL de una mezcla metanol/agua (50:50) y se realizaron sucesivas particiones con solventes en orden creciente de polaridad, primero con hexano, seguido de diclorometano y finalmente con acetato de etilo. Cada una de estas fracciones fueron desecadas con sulfato de magnesio anhidro, filtradas por gravedad y concentradas al vacío hasta sequedad (esquema #1).

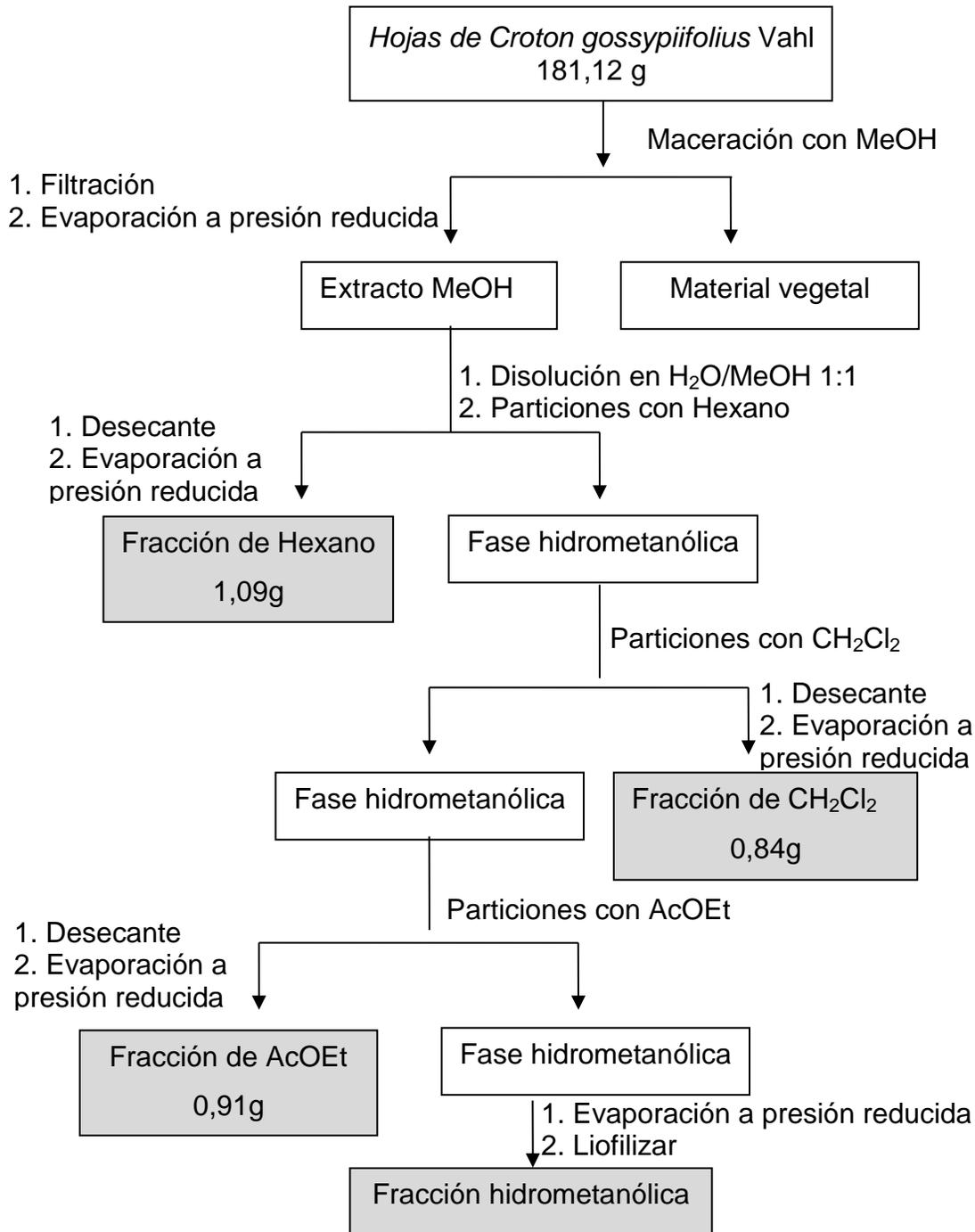
Seguidamente las fracciones orgánicas fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (CCF), visualizando las placas en una lámpara UV, seguida de la inmersión en una solución de *p*-anisaldehído como agente revelador y posterior calentamiento.

Las fracciones orgánicas fueron purificadas mediante cromatografía en columna de fase normal sobre sílica gel o sephadex, utilizando como eluyente diferentes solventes o mezclas de solventes orgánicos dependiendo del caso. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por medio de CCF y se unieron según criterios de R_f y coloración.

La evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones y los compuestos aislados de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl, se llevó a cabo en el Instituto de Biología Experimental (IBE) bajo la dirección del Dr. Francisco Arvelo y la evaluación de la

actividad antibacteriana fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia por la Especialista Alessandra Garcés.

5.7 Esquema de separación.



Esquema #1: Proceso de extracción de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl.

5.8 Fraccionamiento

5.8.1 Separación de la Fracción de hexano.

La separación de esta fracción se realizó mediante cromatografía en columna (CC) de fase normal, empleando como soporte sílica gel en una proporción 1:40 (peso de muestra a peso de sílica) y como fase móvil inicial una mezcla de diclorometano/hexano (60:40) con gradiente de polaridad.

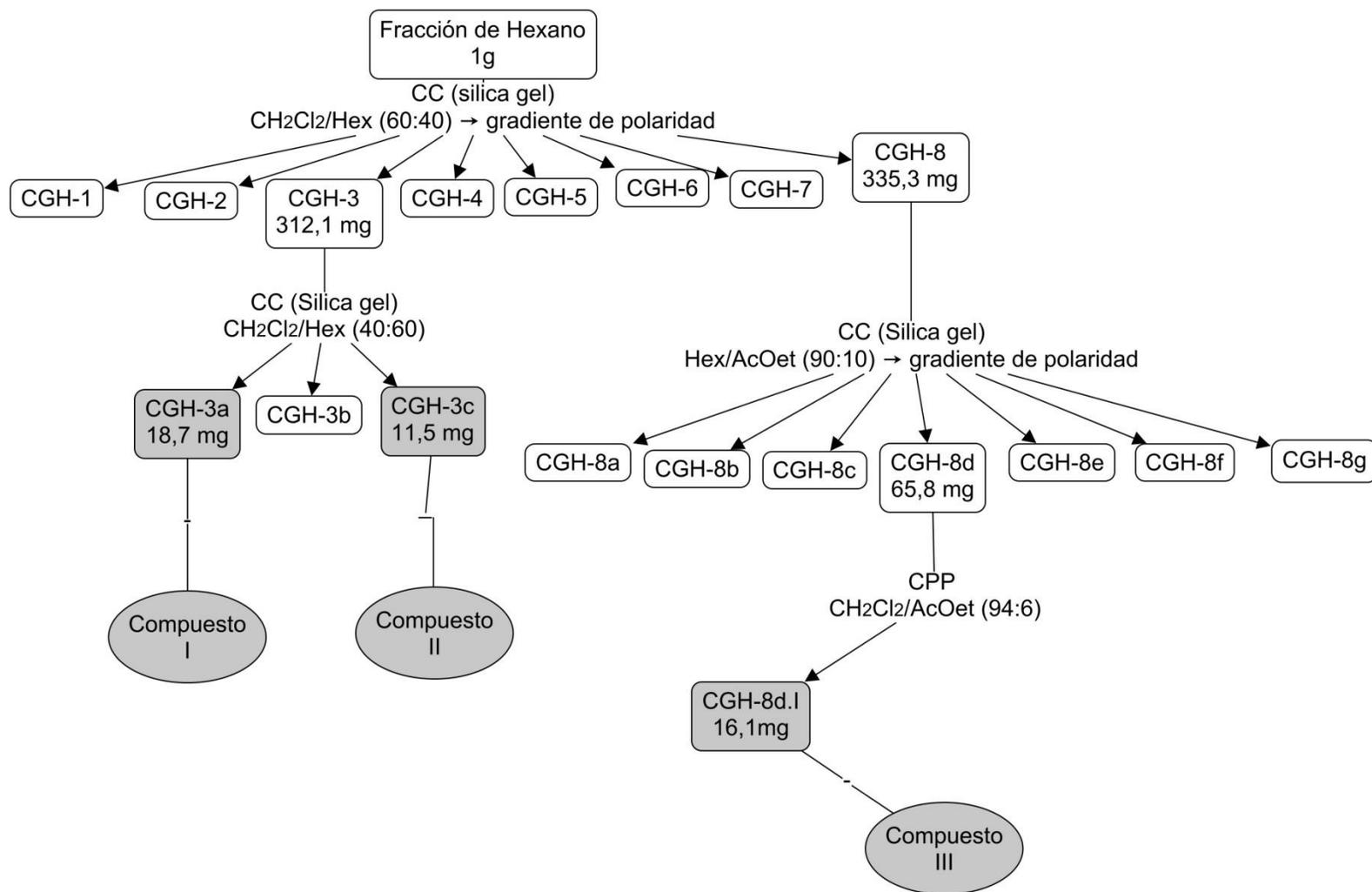
Se sembró aproximadamente 1 g de la fracción de hexano en la columna cromatográfica, de la cual se obtuvieron 28 fracciones, que se reagruparon en 8 subfracciones: CGH-1; CGH-2; CGH-3; CGH-4; CGH-5; CGH-6; CGH-7 y CGH-8 de acuerdo al factor de retención (RF) de las manchas en CCF y su coloración al ser revelado con *p*-anisaldehído (esquema #2).

La subfracción CGH-3 la cual tenía un peso de 312,1mg fue separada mediante CC de fase normal, usando como eluyente una mezcla de diclorometano/hexano (40:60) y luego gradiente de polaridad. Obteniéndose 31 fracciones, que se reagruparon en 3 subfracciones. Encontrándose a partir de la subfracción CGH-3a el **compuesto I** y de la subfracción CGH-3c el **compuesto II** (esquema #2).

La subfracción CGH-8 con un peso de 335,3mg fue separada mediante CC de fase normal, utilizando hexano/acetato de etilo (90:10) como fase móvil inicial y luego gradiente de polaridad, obteniéndose 102 fracciones, que se reagruparon en 7 subfracciones: CGH-8a; CGH-8b; CGH-8c; CGH-8d; CGH-8e; CGH-8f y CGH-8g (esquema #2).

La subfracción CGH-8d con un peso de 65,8mg fue separada mediante cromatografía de placa preparativa (CPP) empleando como fase móvil una mezcla de diclorometano/acetato de etilo (94:6) y al observar la placa en la lámpara UV se pudieron apreciar varias bandas, encontrándose una de ellas como mayoritaria correspondiendo al **compuesto III** (esquema #2).

Las subfracciones que no se siguieron analizando, fue porque contenían una mezcla de muchos compuestos y poca cantidad de muestra. En algunos casos se observó que las subfracciones contenían principalmente clorofila y/u otros pigmentos.



Esquema #2: Proceso de separación de la fracción de hexano del extracto metanólico de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl.

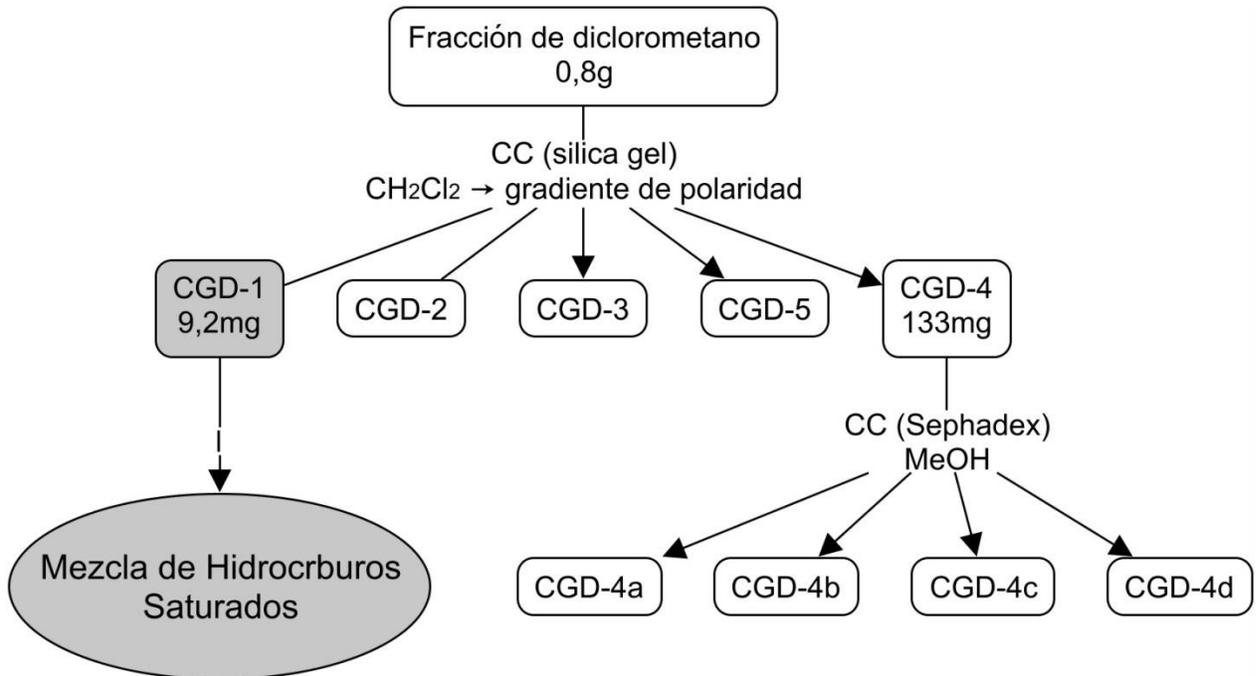
5.8.2 Separación de la fracción de diclorometano.

El proceso de separación para esta fracción, se realizó mediante CC de fase normal, empleando como soporte sílica gel en una proporción 1:40 y se utilizó diclorometano como fase móvil inicial luego aumento de la polaridad empleando MeOH.

Para dicha separación se sembró en la columna cromatográfica aproximadamente 0.8g de la fracción de diclorometano, donde se lograron obtener 52 fracciones, las cuales fueron reagrupadas en 5 subfracciones: CGD-1; CGD-2; CGD-3; CGD-4 y CGD-5 de acuerdo al RF de las manchas en CCF y su coloración al ser reveladas con *p*-anisaldehído. La subfracción CGD-1, corresponde a una mezcla de hidrocarburos saturados (esquema #3).

Se separó la subfracción CGD-4 que contenía 133mg, por medio de una cromatografía en columna de exclusión por tamaño, donde se utilizó sephadex como fase estacionaria y MeOH como fase móvil. Se lograron obtener 21 fracciones las cuales fueron reagrupadas en 4 subfracciones: CGD-4a; CGD-4b; CGD-4c y CGD-4d (esquema #3).

Las subfracciones que no se siguieron analizando contenían una mezcla de compuestos y poca cantidad de muestra. En algunos casos se observó que las subfracciones contenían principalmente clorofila y/u otros pigmentos.



Esquema #3: Proceso de separación de la fracción de diclorometano del extracto metanólico de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl.

5.8.3 Separación de la fracción de acetato de etilo.

Para esta separación se empleó CC de fase normal, utilizando como soporte sílica gel y se utilizó como fase móvil una mezcla de diclorometano/metanol (80:20) y luego gradiente de polaridad.

La cantidad de muestra utilizada para esta separación fue de aproximadamente 0.9g, lográndose obtener 15 fracciones, las cuales fueron reagrupadas en 4 subfracciones: CGA-1; CGA-2; CGA-3 y CGA-4 (esquema #4) según la comparación del RF de las manchas en CCF y su coloración al ser revelado con *p*-anisaldehído.

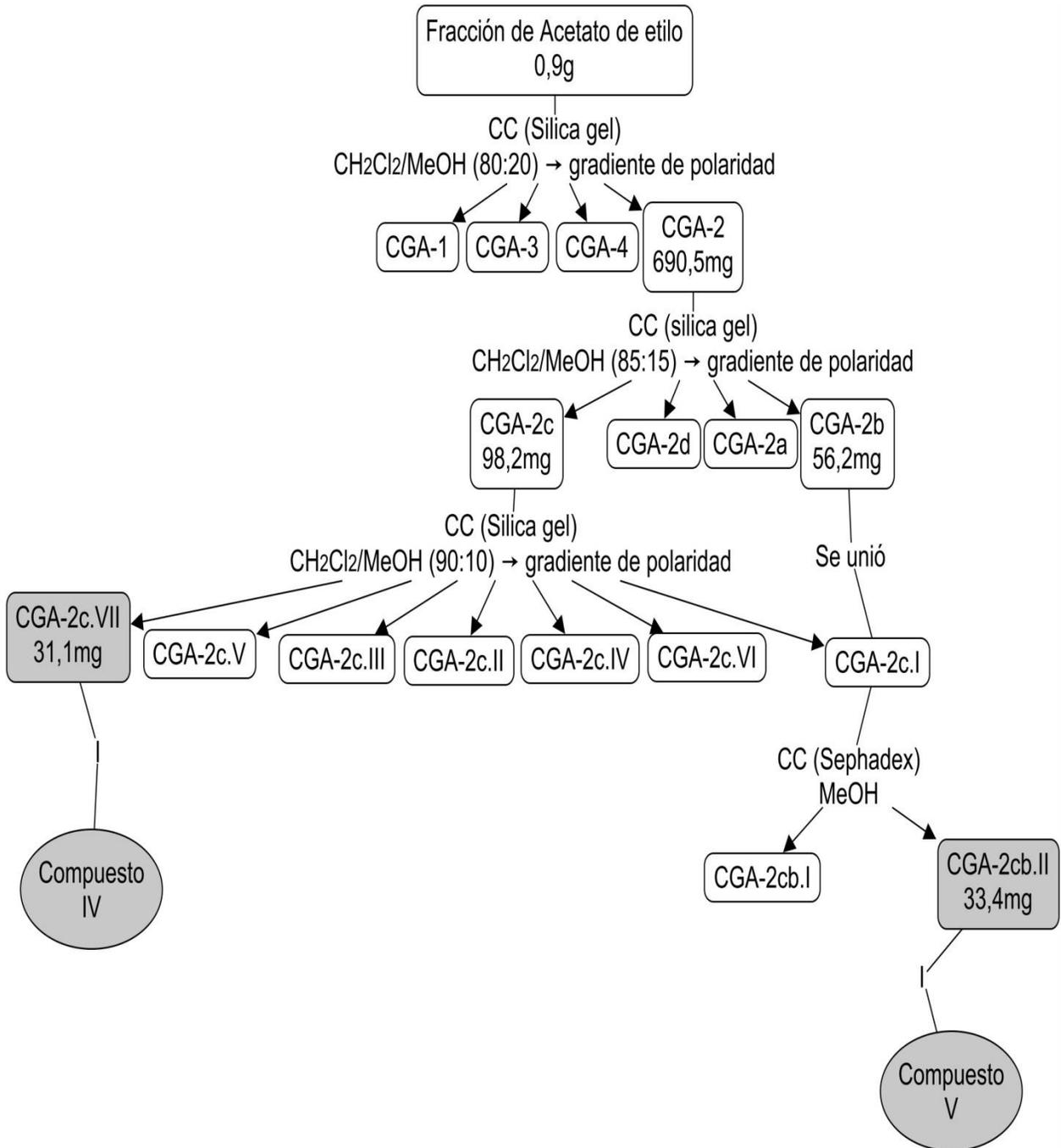
Se separó la subfracción CGA-2I a cual contenía un peso de 690,5mg por CC de fase normal, utilizando como fase móvil una mezcla de diclorometano/metanol (85:15) con gradiente de polaridad. A partir de esto, se obtuvieron 30 fracciones, las cuales fueron reagrupadas en 4 subfracciones: CGA-2a; CGA-2b; CGA-2c y CGA-2d (esquema #4).

La subfracción CGA-2c con un peso de 98,2mg se separó mediante CC de fase normal, empleando como fase móvil una mezcla de diclorometano/metanol (90:10) y luego gradiente de polaridad, lográndose obtener 92 fracciones, que fueron reagrupadas en 7 subfracciones: CGA-2c.I; CGA-2c.II; CGA-2c.II; CGA-2c.III; CGA-2c.IV; CGA-2c.V; CGA-2c.VI y CGA-2c.VII. La subfracción CGA-2c.VII corresponde al **compuesto IV** (esquema #4).

Por comparación de los RF y la coloración al ser revelados mediante una CCF, se unió la subfracción CGA-2c.I con la subfracción CGA-2b, ya que se observó el mismo perfil cromatográfico. Esta nueva unión, la cual contenía 60mg se separó por medio de cromatografía en columna de exclusión por tamaño, donde se utilizó sephadex como

fase estacionaria. Se lograron obtener 45 fracciones que fueron reagrupadas en 2 subfracciones, encontrándose en la subfracción CGA-2cb.II con un peso de 33,4mg el **compuesto V** (esquema #4). La estructura de este compuesto corresponde a un flavonoide glicosilado que está en proceso de elucidación, aún así fue evaluado en los ensayos de citotoxicidad y los resultados se presentan más adelante.

Las subfracciones que no se siguieron analizando contenían una mezcla de compuestos y poca cantidad de muestra.



Esquema #4: Proceso de separación de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl.

5.9 Actividad Citotóxica

5.9.1 Cultivo celular.

Las líneas celulares de carcinoma mamario MCF-7 y SKBR3 se cultivaron en un medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bobino y 1% de antibiótico conformado por penicilina y estreptomycin, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de humedad.

5.9.2 Ensayo de citotoxicidad de los compuestos y extractos.

La determinación de la citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 de crecimiento adherente en monocapa se realizó evaluando los extractos y los compuestos aislados a partir de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl, a diferentes concentraciones mediante el ensayo MTT para determinar la concentración inhibitoria (CI₅₀) de cada uno de ellos.

Las células fueron inoculadas a una densidad de 5×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos con su respectivo medio de cultivo para cada línea celular. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de humedad para permitir la adherencia de las células. Transcurrido este período de incubación, se descartó el medio y se preparó una solución stock de cada compuesto y de los extractos a una concentración de 10mg/mL disueltos en DMSO garantizando que la concentración del disolvente no sea superior al 1%, porque de lo contrario sería tóxico para los cultivos *in vitro*. Seguidamente se prepararon diluciones seriadas a partir de la solución stock (medio + compuesto), para obtener así las concentraciones a evaluar de cada compuesto y de los extractos. Consecutivamente, las células se

incubaron a 37°C y 5% CO₂ con las diversas concentraciones de cada uno de los metabolitos secundarios aislados y de los extractos durante 72 horas, para evaluar posteriormente la viabilidad de las mismas mediante el método de MTT.

El método de MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenasas presentes en mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de formazan de color azul-violeta oscuro, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular, basándose en la cantidad de células metabólicamente activas, lo cual es proporcional a la cantidad de formazan presente ^[73]. Este método nos permite cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después de la aplicación del compuesto, lo que indica que a mayor cantidad de células vivas mayor densidad óptica y menor citotoxicidad.

Transcurrido el tiempo de incubación de las células con los metabolitos secundarios, se descartó el medio y consecutivamente se añadió 50µL de MTT (0.4 mg/mL); para luego incubar las placas por 3 horas bajo las mismas condiciones, permitiendo la formación de los cristales de formazan. Al cabo de este tiempo, se descartó el sobrenadante y finalmente se agregó 50µL de DMSO para disolver los cristales de formazan y detener la reacción colorimétrica, generando una coloración azul-violeta. Se leyó la absorbancia de cada pozo a $\lambda=570$ nm en un espectrofotómetro de ELISA-TECAN *sunrise*.

La CI₅₀ fue calculada con un intervalo de confianza del 95% mediante una regresión no lineal, usando para ello el software GraphPadPrism 4 (Institute Software for Science, San Diego, California, EUA).

5.10 Actividad Antibacteriana.

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de difusión sobre placas de agar. Se analizaron las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo, las cuales fueron solubilizadas en etanol para obtener una concentración de 200mg/mL. (Solución madre). A partir de cada una de las soluciones madres se prepararon discos de papel absorbente de 6 mm de diámetro con una cantidad de 12mg.

La actividad antibacteriana se evaluó contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Bacillus cereus* (ATCC 6633), y los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), y la levadura *Candida albicans*. Las bacterias fueron incubadas a 37 °C, mientras que la levadura fue incubada a 30 °C.

Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: Eritromicina (15 µg) y Polimixina B (300 U) de la marca BBL; como control negativo se empleó el solvente utilizado para solubilizar las fracciones (etanol).

Los cultivos bacterianos fueron obtenidos en caldo Mueller-Hinton (marca BBL, lote: 6192368) así como el cultivo de la levadura fue realizado en caldo Saboraud dextrosa (marca Merck, lote: 928), todos con aproximadamente 18 horas de crecimiento y ajustados a la concentración correspondiente al Standard N° 0,5 de la escala McFarland, fueron sembrados sobre la superficie de un agar Mueller-Hinton (marca Oxoid, lote: 838705). Posteriormente sobre el césped microbiano se colocaron los discos de papel de filtro con las diferentes muestras y los controles respectivos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Sección fitoquímica.

La caracterización de los compuestos aislados de las hojas de la planta *Croton gossypifolius* Vahl se llevó a cabo por medio de la utilización de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT-135, HETCOR, FLOCK y espectrometría de masas. Para el caso de los compuestos conocidos se realizaron las comparaciones respectivas con los datos espectroscópicos reportados en la literatura.

6.1.1 Compuesto I:

Este compuesto (**Fig.5**) se aisló de la fracción de hexano de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl como un líquido viscoso de color amarillo claro. Se obtuvo en una cantidad de 18,7mg lo que representa el 1,7% de la fracción de hexano. En el análisis realizado por CCF se mostró como una mancha de color violeta oscuro al ser revelado con *p*-anisaldehído, y presentó un $\text{RF}=0.51$ al ser desarrollada con una mezcla de diclorometano/hexano (50:50).

El espectro de masas (**Fig.6**) mostró un ión molecular de 271.19 m/z [M+1] el cual corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$. También se observa la pérdida de 15 una (255.88 m/z) asociada a la pérdida de un grupo metilo.

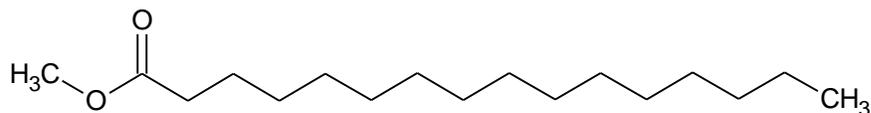


Fig. 5: Estructura del compuesto I: Hexadecanoato de metilo.

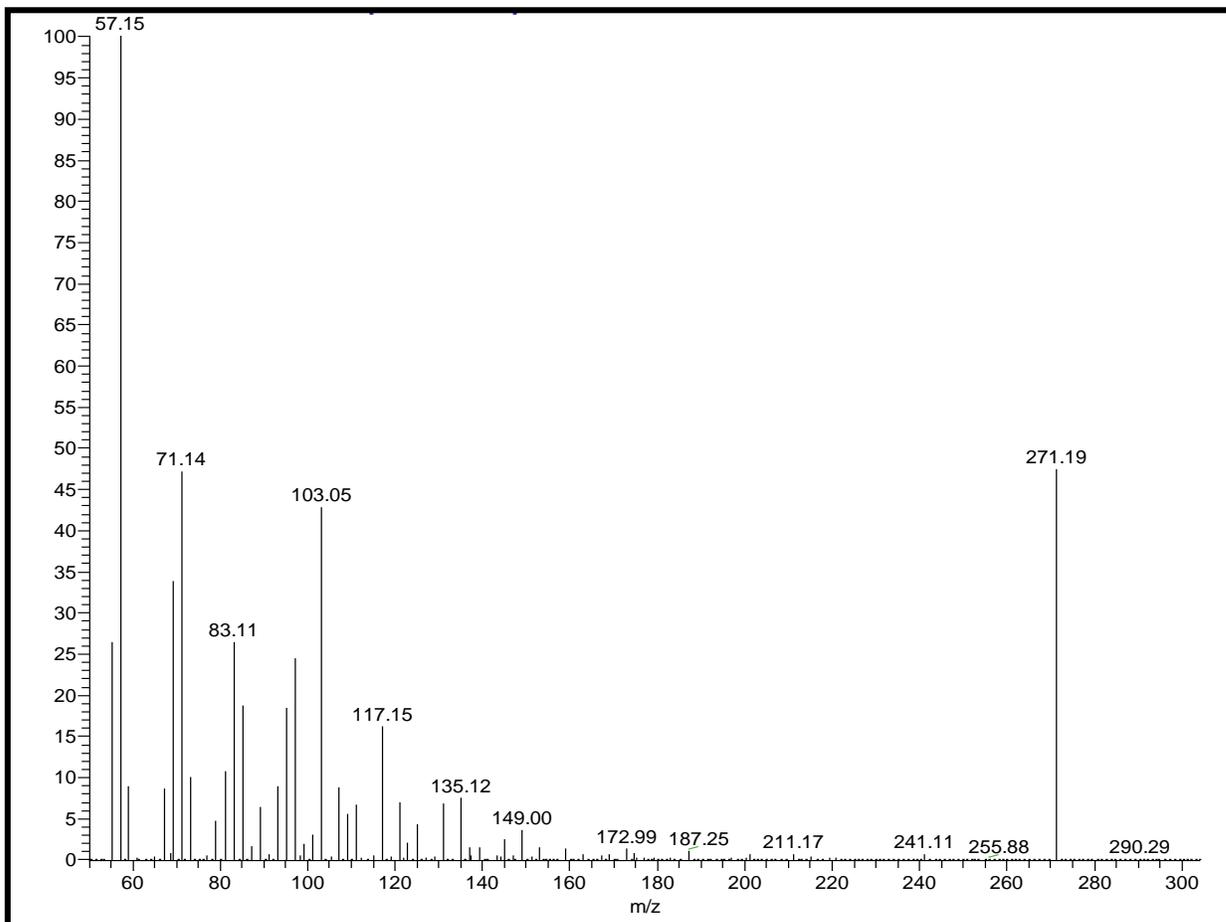


Fig. 6: Espectro de masas del compuesto I.

En los espectros de RMN se observa que el compuesto no está puro, sin embargo, estas señales pudieron ser descartadas. En el espectro de RMN ^1H (**Fig. 7**) se observa una señal singlete a 3.69 ppm que integra para tres protones indicando la presencia de un grupo metoxi en la estructura. A 2.33 ppm se aprecia un triplete que integra para dos protones y sugiere la presencia de un metileno adyacente a un grupo acilo y a otro metileno. A campo alto, se observa un singlete ancho a 0.90 ppm característico de un grupo metilo.

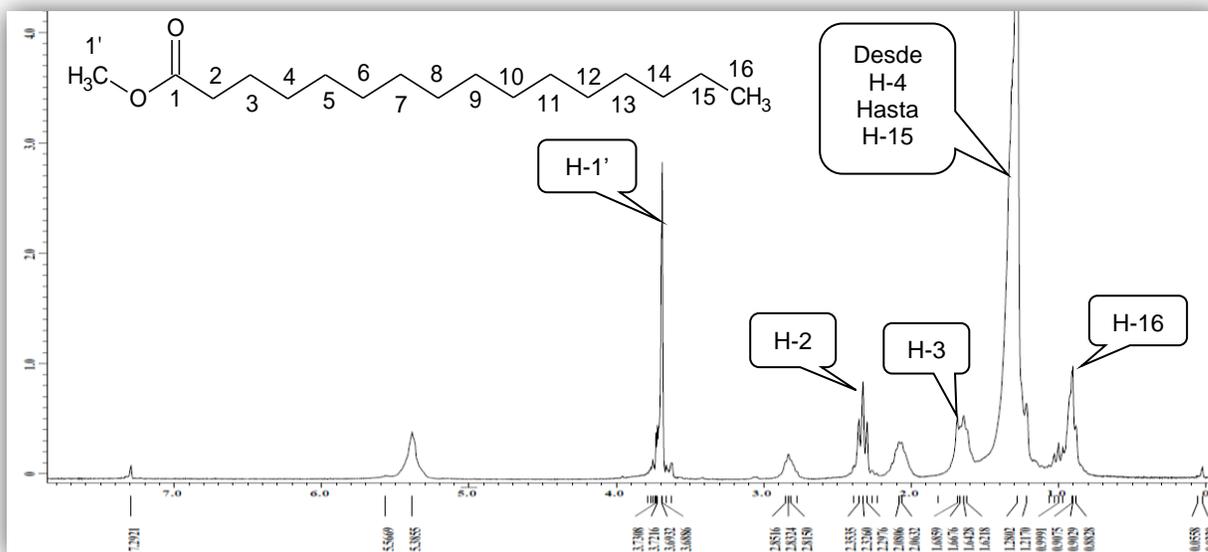


Fig. 7: Espectro de RMN ¹H del compuesto I (CDCl₃, 270 MHz).

En el espectro de RMN ¹³C (Fig. 8) se observan 12 señales, de las cuales una se atribuye a la presencia de un grupo acilo de un éster en la estructura por la señal a 174.3 ppm y se confirma la presencia de un grupo metoxi por la señal a 51.4 ppm.

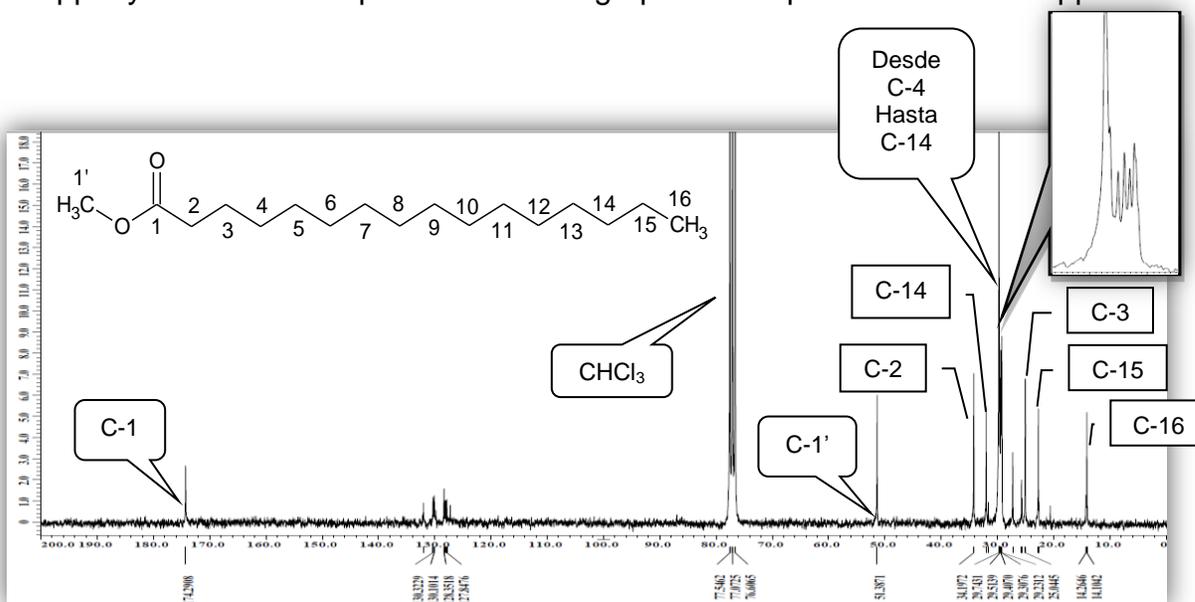


Fig. 8: Espectro de RMN ¹³C del compuesto I (CDCl₃, 67.5 MHz).

Los datos presentados junto con un experimento DEPT-135 (**Fig. 9**) confirmaron la presencia de dos grupo metilos y un carbono cuaternario, así como 14 carbonos metilénicos.

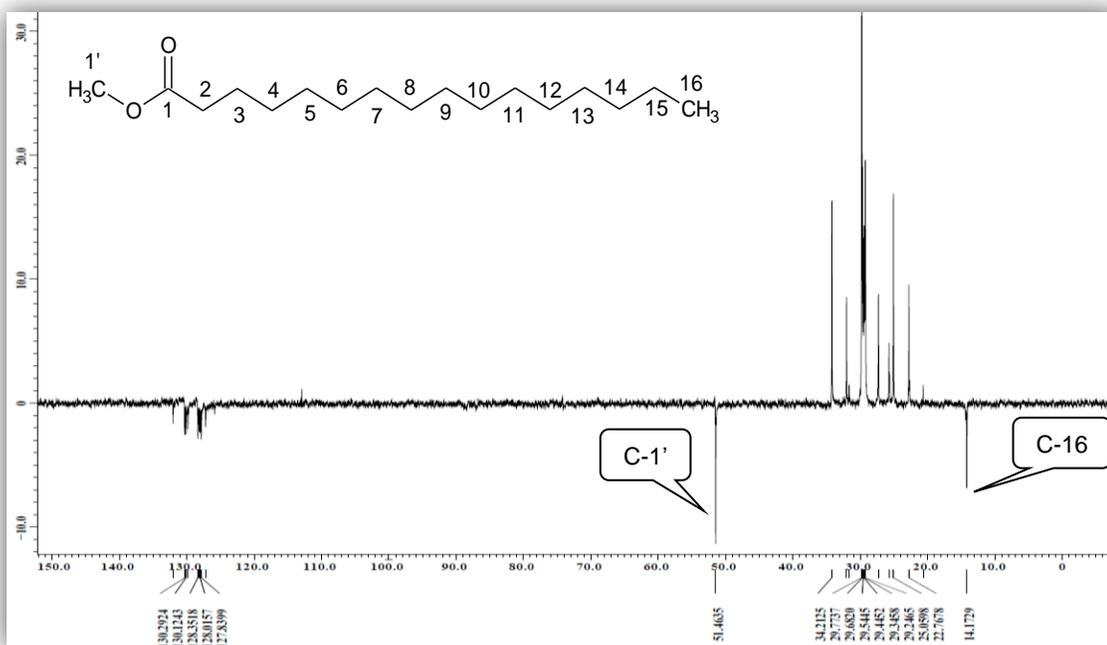
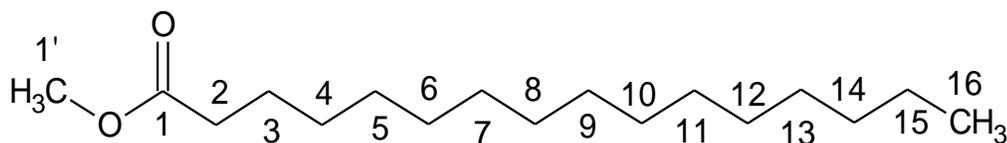


Fig. 9: Espectro DEPT-135 del compuesto **I** (CDCl_3 , 67.5 MHz).

A través de los espectros en dos dimensiones HETCOR (Anexo# 1 y 2) y FLOCK (Anexo # 3 y 4), se establecieron las correlaciones entre carbonos y protones directamente enlazados y las correlaciones de carbonos y protones a dos y tres enlaces, respectivamente. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura para el hexadecanoato de metilo conocido también como éster metílico del ácido palmítico (Tabla1), concluyeron con la elucidación del compuesto **I**. Este compuesto se aisló en su forma ácida de la corteza de la misma especie^[70].

Tabla 1: Comparación de los datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **I** con los datos reportados en la literatura.

H/C	Experimental tomado en CDCl_3 ; 270 MHz			Reportado en CDCl_3 a 250MHz ^[74]		
	δ_{H} (ppm) (mult, J (Hz), Integral)	δ_{C} (ppm)	DEPT	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	DEPT
1'	3.69 (s, 3H)	51.4	CH_3	3.64 (s, 3H)	51.7	CH_3
1	-	174.3	C	-	174.6	C
2	2,33 (t, 7.7, 2H)	34.2	CH_2	-	33.9	CH_2
3	1.69 (m, 3H)	25.0	CH_2	1.24 (m, 2H)	29.2	CH_2
4	1.28 (sa)	29.3	CH_2	-	29.3	CH_2
5 - 6	1.28 (sa)	29.2	CH_2	-	29.3	CH_2
7 - 10	1.28 (sa)	29.7	CH_2	-	29.5	CH_2
11 - 12	1.28 (sa)	29.4	CH_2	-	29.6	CH_2
13	1.28 (sa)	29.5	CH_2	-	29.7	CH_2
14	1.28 (sa)	31.9	CH_2	2.27 (m)	31.8	CH_2
15	1.28 (sa)	22.7	CH_2	1.64 (m)	22.5	CH_2
16	0.9 (sa, 3H)	14.3	CH_3	0.9 (t, 3H)	14.0	CH_3



6.1.2 Compuesto II:

Este compuesto se logró aislar como un caramelo de color amarillo oscuro con un peso de 11,5mg, representado el 1,1% de la fracción de hexano. En el análisis realizado por CCF se tornó como una mancha de color rosada al ser revelado con *p*-anisaldehído, y presentó un $RF=0.47$ al ser desarrollada con diclorometano.

Al observar los datos aportados por los espectros de RMN (**Fig. 10, 11 y 12**) de este compuesto, se pudo apreciar una gran similitud con los espectros de RMN del compuesto **I (Fig. 7, 8 y 9)** indicando que estábamos en presencia de un éster metílico de un ácido graso.

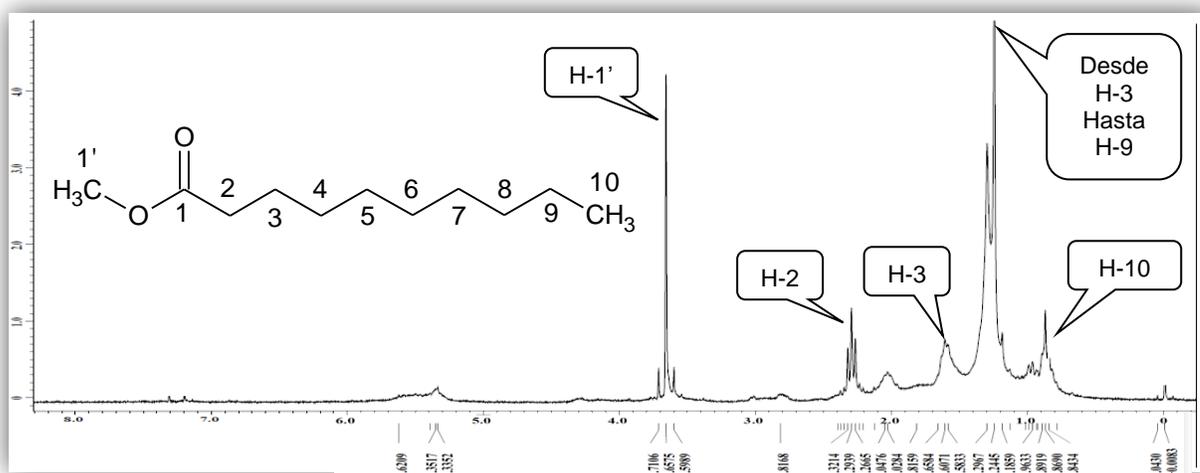


Fig. 10: Espectro de RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz).

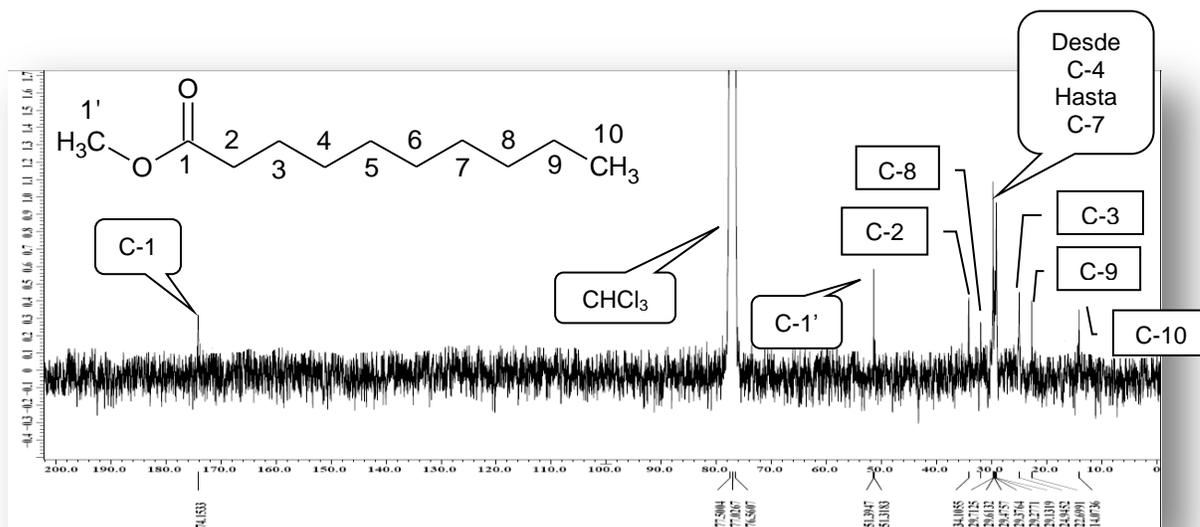


Fig. 11: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz).

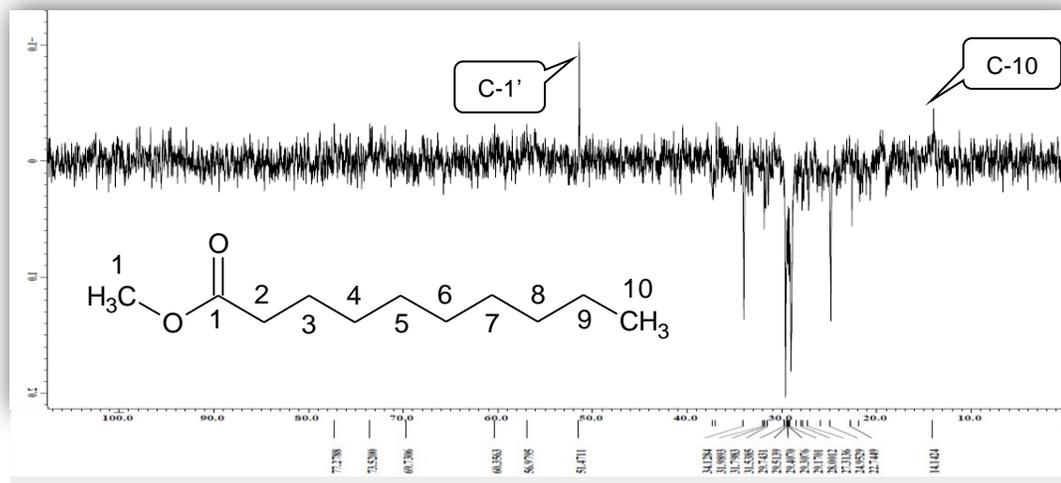


Fig. 12: Espectro DEPT-135 del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz).

Para determinar el número de grupos metilenos presentes en la cadena alifática del éster, se realizó un espectro de masas (**Fig. 13**) el cuál mostró un ion molecular $[\text{M}+1]$ a 185.17 m/z asociado a la fórmula condensada $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$.

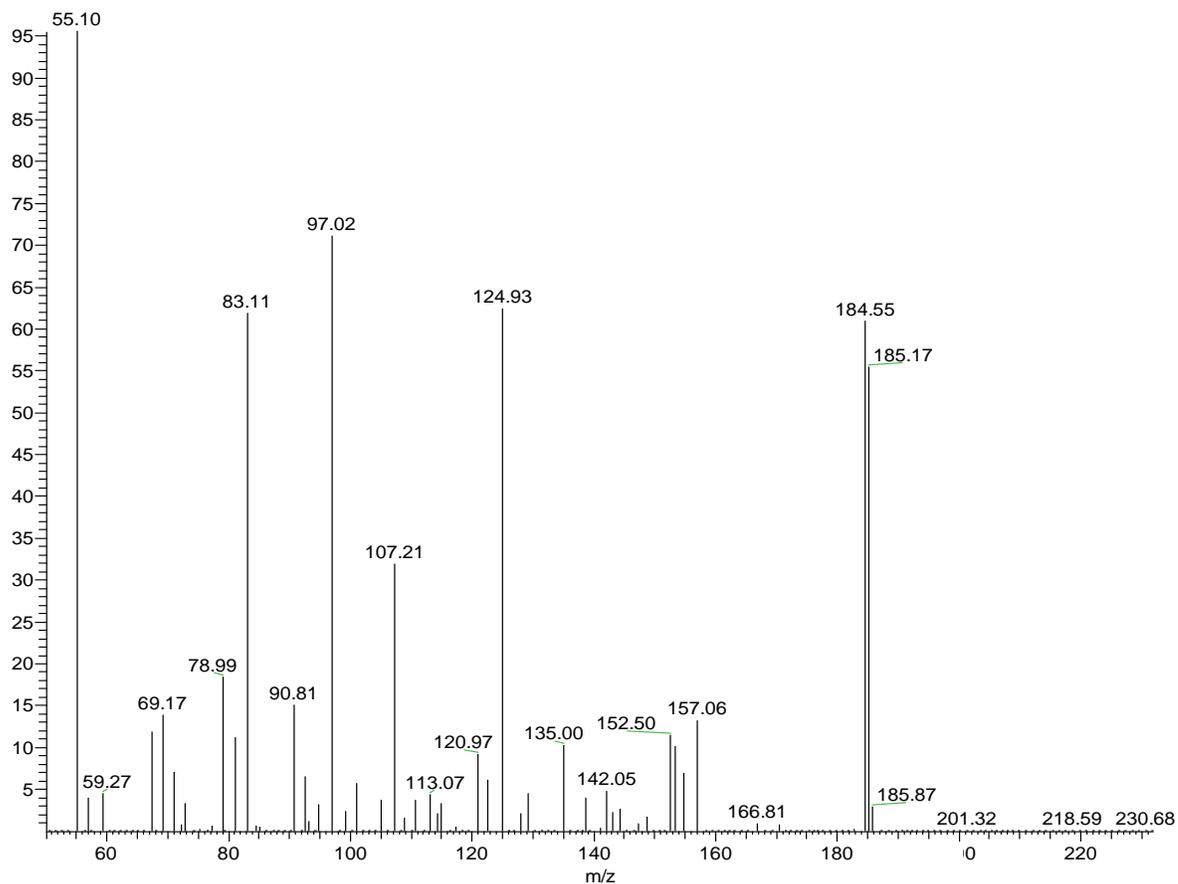


Fig. 13: Espectro de masas del compuesto II.

Finalmente, se identificó el compuesto II como el decanoato de metilo, también conocido como éster metílico del ácido cáprico y es aislado por primera vez para la especie *Croton gossypifolius* Vahl.

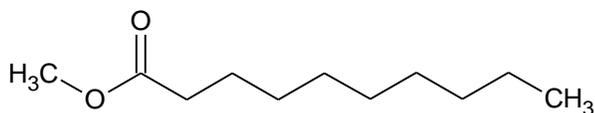


Fig. 14: Estructura del compuesto II.

6.1.3 Compuesto III:

Este compuesto se aisló como un sólido blanco con un peso de 16.1mg representando el 1.47% de la fracción de hexano. Al ser desarrollado en CCF con el sistema de solventes CH₂Cl₂/AcOEt (94:6), presentó un R_f=0,47. Este compuesto se observó en la placa cromatográfica después de rociarlo con el agente revelador *p*-anisaldehído, como una mancha violeta oscuro en el visible, característica de los núcleos terpenoidales.

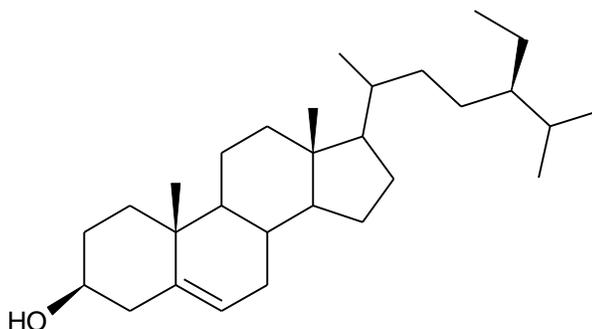


Fig. 15: Estructura del compuesto III.

Al observar los espectros de RMN del compuesto, se evidencio que el compuesto no se encontraba totalmente puro, aún así se identificaron señales típicas de un núcleo triterpénico, cuyos datos espectroscópicos fueron comparados con los reportados en la literatura para diversos esqueletos esteroidales, encontrándose que la estructura en estudio correspondía a la del compuesto β -sitosterol.

En el espectro de RMN ¹H (**Fig. 16**) a 5,33 ppm se observa un singlete ancho característico de un protón olefínico (H-6), además, se aprecia un multiplete a un desplazamiento químico entre 3.45 y 3.54ppm (H-3) indicativo de la configuración beta del grupo hidroxilo presente en la estructura.

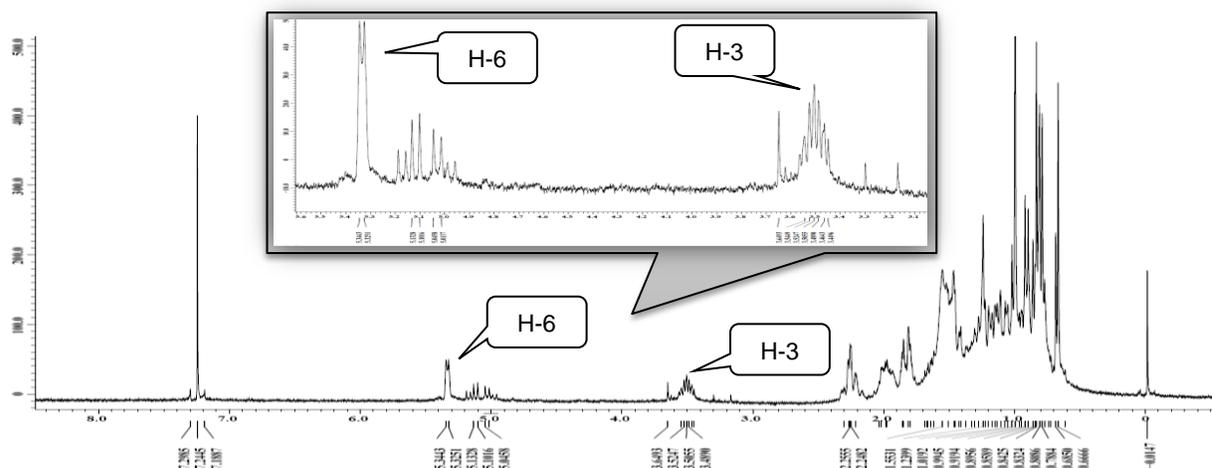


Fig. 16 Espectro de RMN ^1H del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).

A campo alto (**Fig. 17**), se observaron dos singletes a un desplazamiento químico de 0.99 (H-18) y 0.67 (H-19) ppm; un doblete a 0.91 ppm (H-21) y un multiplete centrado en 0.81 ppm generado por el solapamiento de lo que debería ser una señal doblete para H-26 y H-27 y un triplete (H-29).

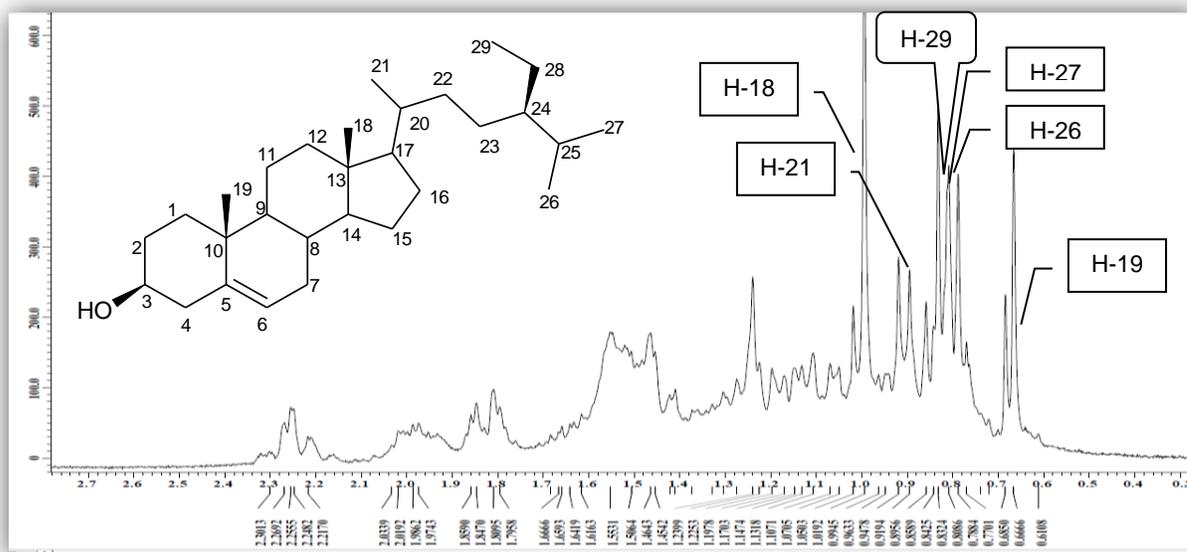


Fig. 17 Espectro de RMN ^1H a campo alto del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).

En el espectro de RMN ^{13}C (**Fig. 18**), a campo bajo se observan las señales correspondientes a los carbonos olefínicos uno cuaternario y el otro de naturaleza metínica a un desplazamiento de 140.9 (C-5) y 121.7 (C-6) ppm, respectivamente. También se puede observar a un δppm : 71.9 la señal típica de un metino oxigenado (C-3).

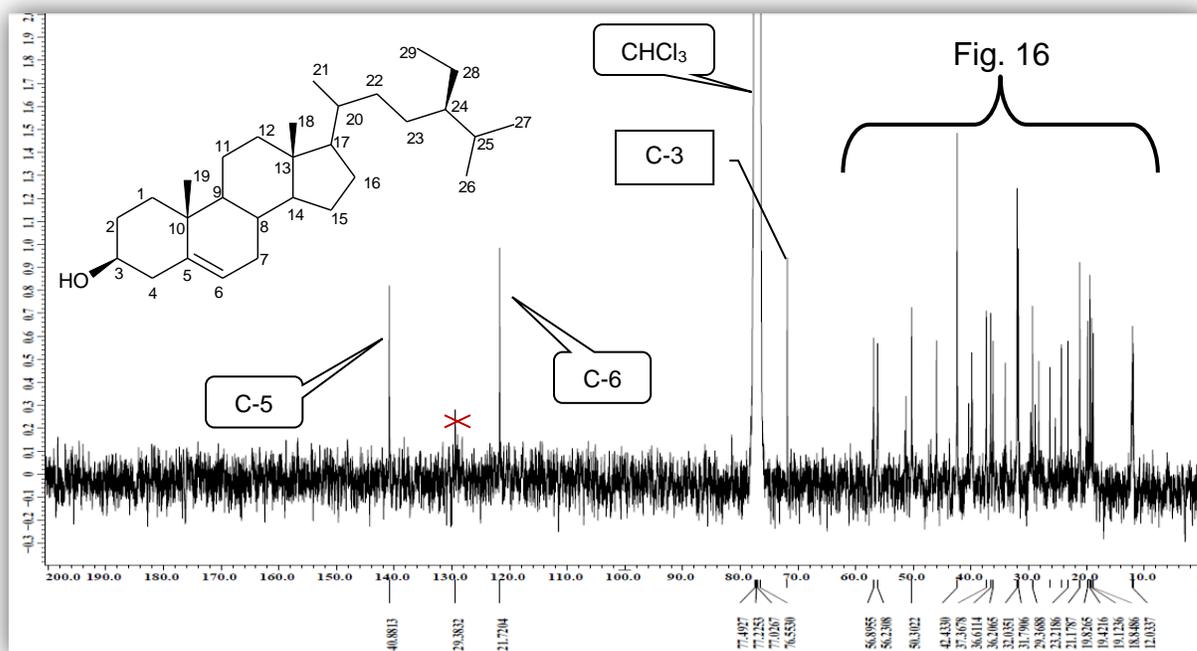


Fig. 18 Espectro de RMN ^{13}C a campo alto del compuesto **III** (CDCl_3 , 67.5 MHz).

A campo alto (**Fig. 19**) y con ayuda del experimento DEPT-135 (**Fig. 20**), se asignaron las señales correspondientes a los seis grupos metilos presentes en la estructura en δppm : 11.9(C-18), 18.8 (C-19), 19.1(C-21), 19.4(C-26), 19.8 (C-27) y 12.0(C-29). El resto de las señales fueron discriminadas en 3 carbonos cuaternarios, 11 carbonos metilénicos y 9 carbonos metínicos.

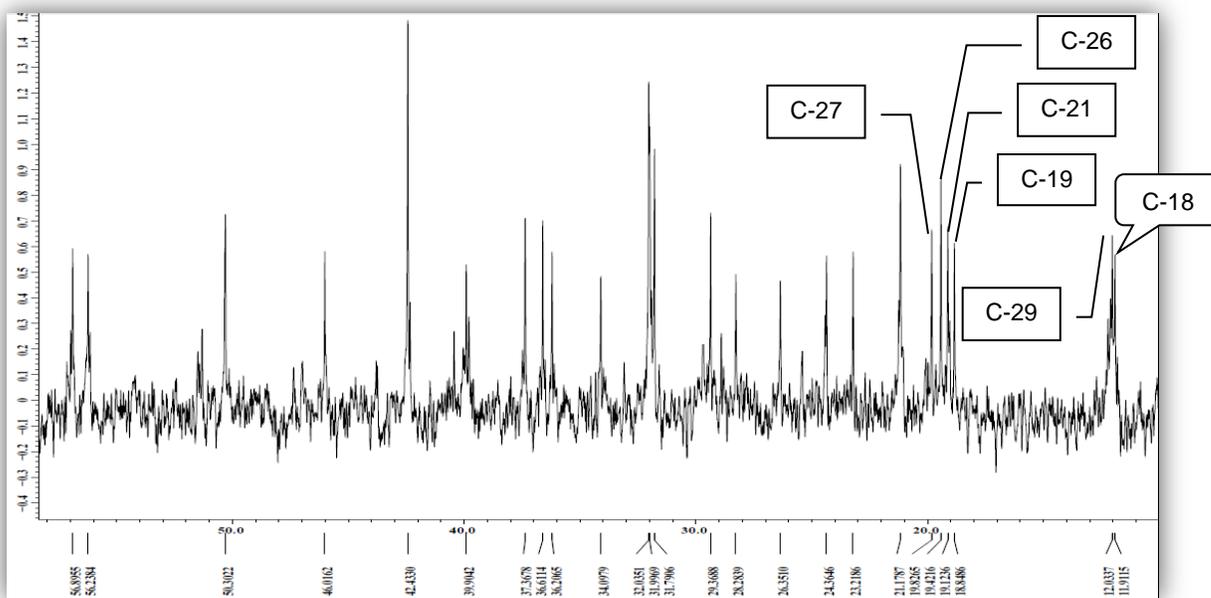


Fig. 19 Espectro de RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto III (CDCl_3 , 67.5 MHz).

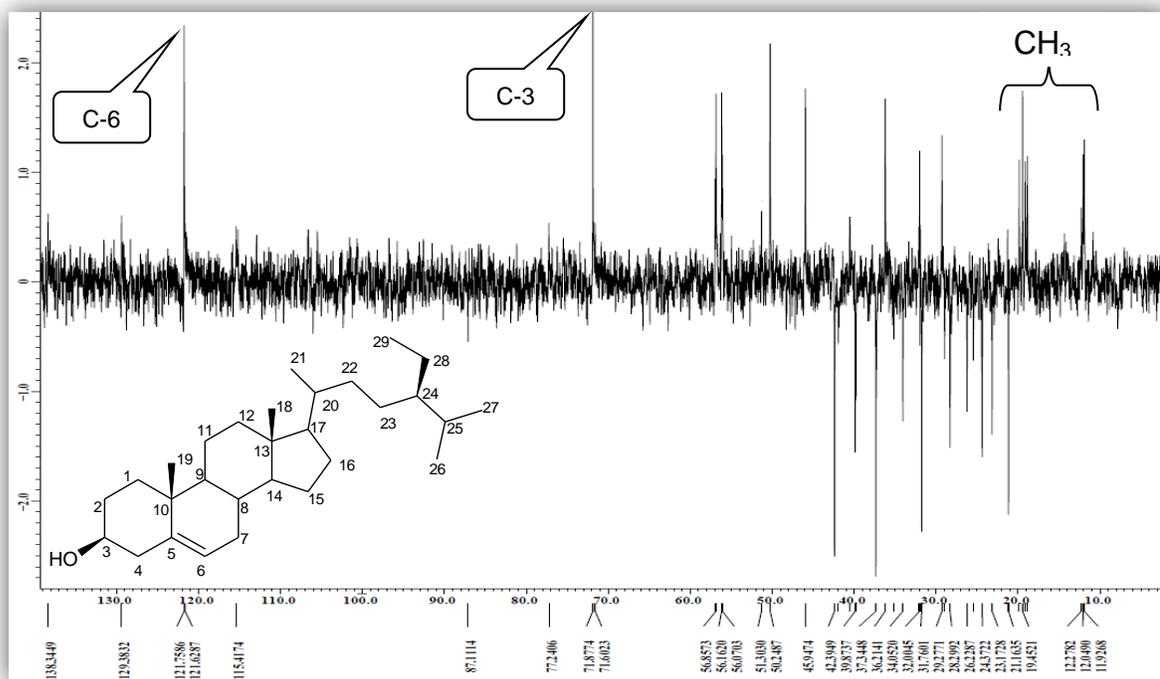


Fig. 20 Espectro DEPT-135 del compuesto III (CDCl_3 , 67.5 MHz).

Mediante un espectro de masas (**Fig. 21**) se terminó de confirmar la identidad de este metabolito secundario, observándose un pico base a 397 m/z correspondiente a la pérdida del grupo hidroxilo como agua en el carbono C-3. También se puede apreciar la fragmentación en el carbono C-17 por la pérdida de la cadena lateral del β -sitosterol a 255 m/z [$397 - C_{10}H_{21}$]⁺.

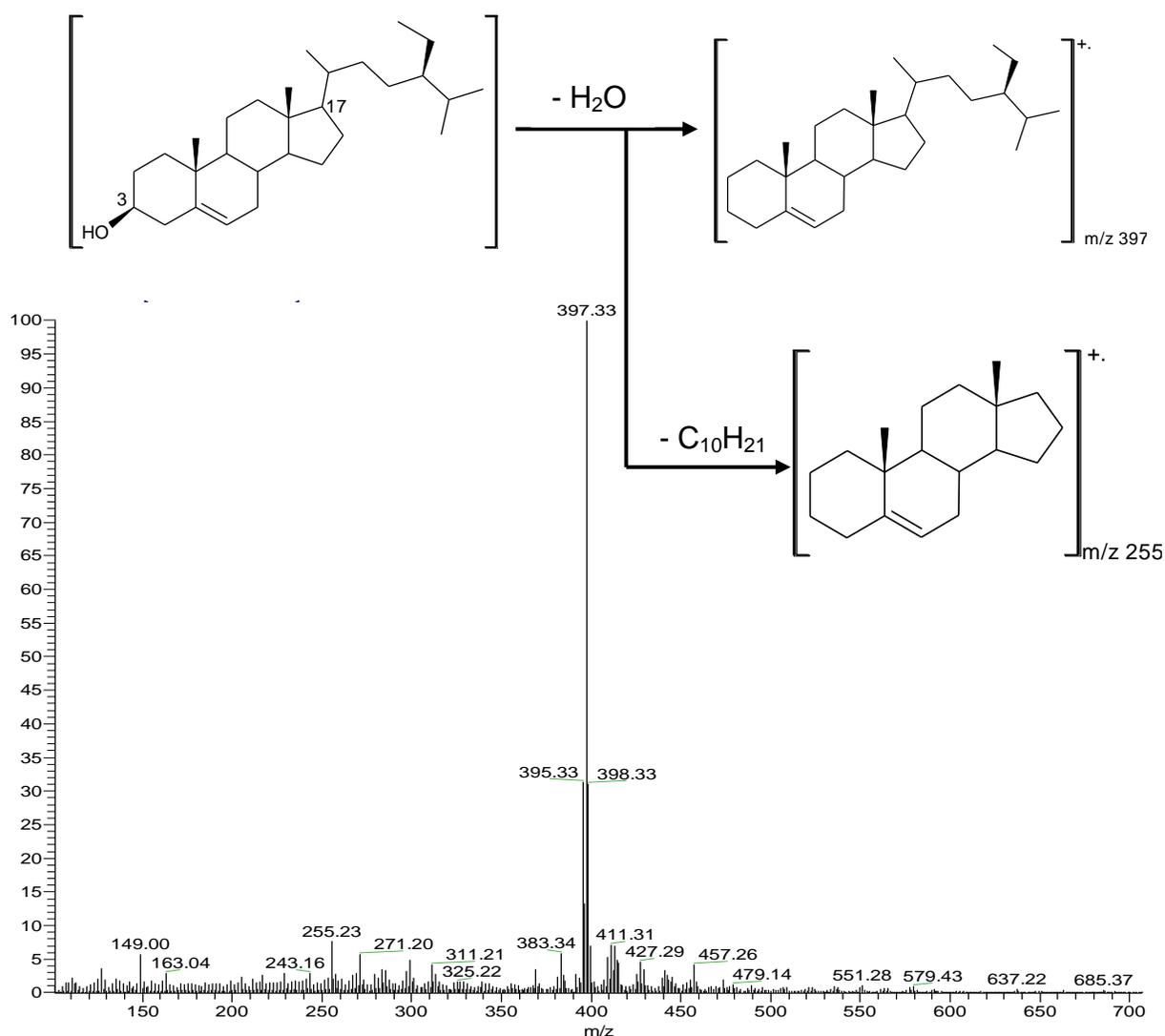


Fig. 21 Espectro de masas del compuesto III.

Este compuesto ha sido aislado de muchas especies vegetales y particularmente dentro de las especies pertenecientes al género *Croton* estudiadas por nuestro grupo de investigación, se aisló de las especies *C. pungens* Jacq ^[67] y de las flores de *C. micans* Sw. ^[61]. El triterpeno β -sitosterol es aislado por primera vez para la especie *Croton gossypiifolius* Vahl.

La comparación de la data espectroscópica correspondiente al compuesto **III** con los reportados en la literatura se encuentra en las tablas 3 y 4.

Tabla 2: Comparación de los datos de RMN ¹H para el compuesto **III** con los datos reportados en la literatura.

N° Hidrógeno	Experimental tomado en CDCl ₃ ; 270 MHz	Reportado tomado en CDCl ₃ ; 600 MHz ^[75]
	δ_H (ppm) (mult, <i>J</i> (Hz), Integral)	δ_H (ppm) (mult, <i>J</i> (Hz), Integral)
3	3.52 (m)	3.53 (t, 1H)
6	5.33 (d, 5.2)	5.36 (t, 6.4, 1H)
18	0.99 (s)	1.01 (s, 3H)
19	0.67 (s)	0.68 (s, 3H)
21	0.91(d, 6.4)	0.93 (d, 6.5, 3H)
26	0.81(m)	0.81 (d, 3H)
27	0.81(m)	0.83 (d, 3H)
29	0.81(m)	0.84 (t, 6.5, 3H)

Tabla 3: Comparación de los datos de RMN ^{13}C para el compuesto **III** con los datos reportados en la literatura.

N° Carbono	Experimental tomado en CDCl_3 ; 67.5 MHz		Reportado tomado en CDCl_3 ; 150 MHz ^[75]	
	δ_c (ppm)	DEPT	δ_c (ppm)	DEPT
1	37.4	CH ₂	37.5	CH ₂
2	31.8	CH ₂	31.9	CH ₂
3	71.9	CH	72.0	CH
4	42.4	CH ₂	42.5	CH ₂
5	140.9	C	140.9	C
6	121.7	CH	121.0	CH
7	31.9	CH ₂	32.1	CH ₂
8	32.0	CH	32.1	CH
9	50.3	CH	50.3	CH
10	36.6	C	36.7	C
11	21.2	CH ₂	21.3	CH ₂
12	39.9	CH ₂	39.9	CH ₂
13	42.4	C	42.6	C
14	56.9	CH	56.9	CH
15	24.4	CH ₂	26.3	CH ₂
16	28.3	CH ₂	28.5	CH ₂
17	56.2	CH	56.3	CH
18	11.9	CH ₃	12.0	CH ₃
19	18.8	CH ₃	19.0	CH ₃
20	36.2	CH	36.3	CH
21	19.1	CH ₃	19.5	CH ₃
22	34.1	CH ₂	34.2	CH ₂
23	26.4	CH ₂	26.3	CH ₂
24	46.0	CH	46.1	CH
25	29.4	CH	29.4	CH
26	19.4	CH ₃	19.6	CH ₃
27	19.8	CH ₃	20.1	CH ₃
28	23.2	CH ₂	23.3	CH ₂
29	12.0	CH ₃	12.2	CH ₃

6.1.4 Compuesto IV:

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo de color amarillo oscuro con un peso de 31,1mg representando el 3,4% de la fracción de acetato de etilo. En el análisis realizado por CCF se tornó como una mancha de color amarilla al ser revelado con *p*-anisaldehído y presentó un $R_F = 0,44$ al ser desarrollada con una mezcla de CH_2Cl_2/Hex (82:18).

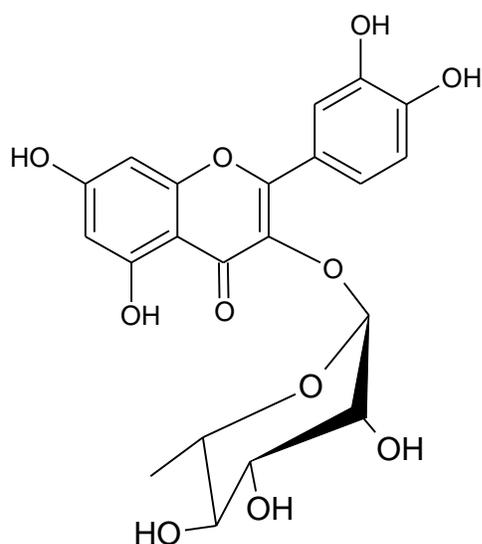


Fig. 22 Estructura del compuesto **IV**.

A través del espectro de RMN 1H (**Fig. 23**) se pueden observar las resonancias de cinco protones aromáticos. Dos de ellos aparecen como singletes a un desplazamiento químico de δ ppm: 6,20 (H-6) y 6,36 (H-8) y los tres protones restantes se encuentran formando un sistema de espín ABX, en el cuál una de las señales aparece como un doblete a 6.91 ppm (H-5') por el acoplamiento con un protón cuya señal doblete centrada en 7.31 ppm (H-6') se solapa con un singlete a δ ppm:7,33 (H-2') y juntas integran para dos protones.

También fue posible definir la resonancia de un protón anomérico que se observa como un singlete a un desplazamiento químico de 5,34 ppm (H-1''), señalando la presencia de un sacárido, el cuál fue identificado como la ramnosa por el grupo metilo observado a δ ppm: 0,94 (H-6''). El resto de las señales que conforman al sacárido se identificaron claramente a δ ppm: 3.36 (H-5''); 3.77 (H-2''); 3.41 (H-3'') y 4.22 (H-4'').

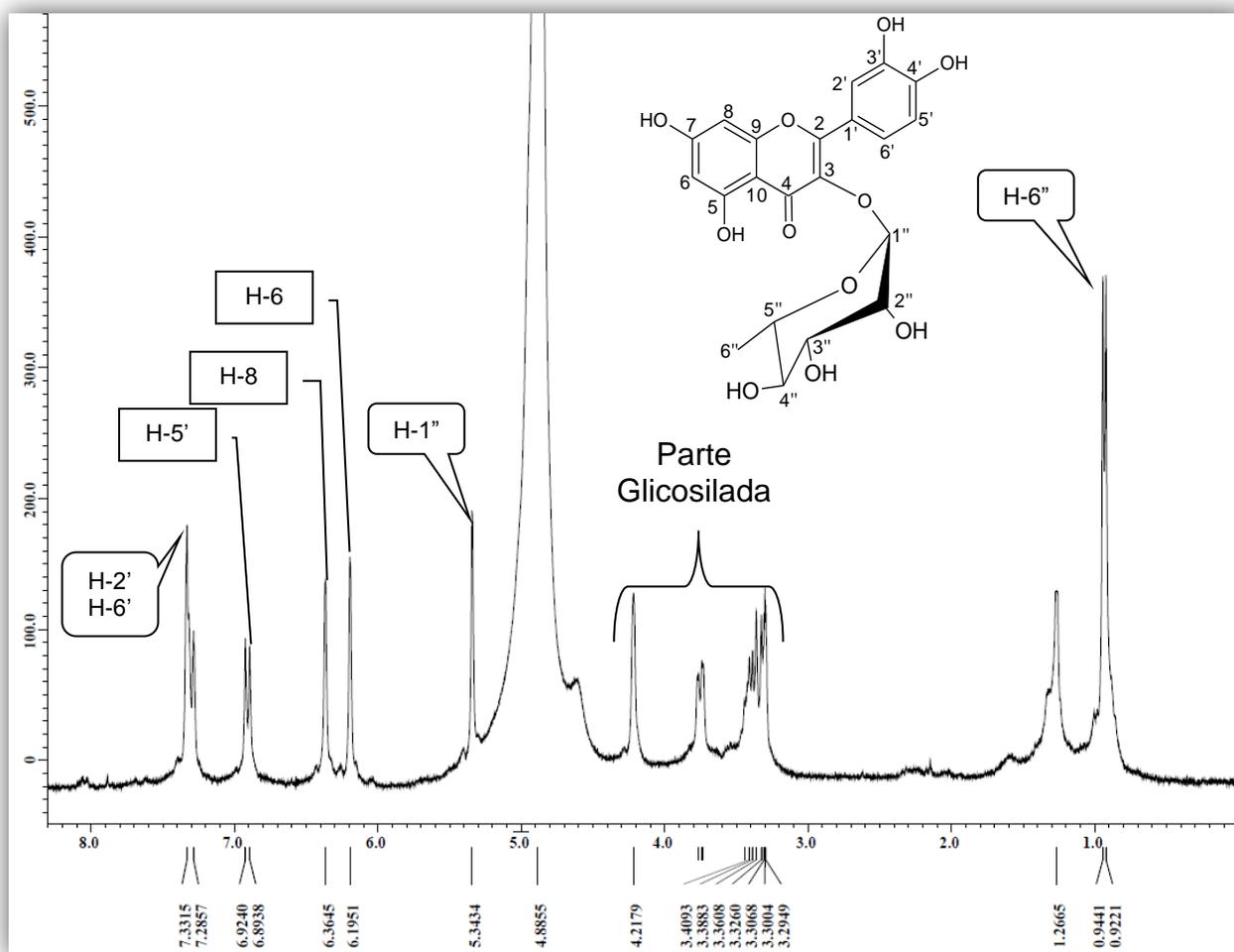


Fig. 23 Espectro de RMN ^1H del compuesto **IV** (MeOD, 270 MHz).

El espectro de RMN de ^{13}C (**Fig. 24**) mostró la resonancia de 21 átomos de carbonos, los cuales fueron discriminados con un experimento DEPT-135 (**Fig. 25**) en diez

carbonos cuaternarios a δ ppm: 178.36; 164.54; 161.88; 158.01; 157.23; 148.45; 145.08; 134.96; 121.78 y 104.64, cinco metinos δ ppm: 93.48; 98.59; 115.76; 121.60 y 115.14. Estas señales en conjunto con los datos del RMN ^1H indicaron que la estructura correspondía a un esqueleto de tipo flavonoide, específicamente una flavona hidroxilada en las posiciones C-5, C-7, C-3' y C-4'.

Adicionalmente, se asignaron las señales de los cuatro metinos oxigenados de la ramnosa a δ ppm: 72.06; 70.92; 70.70 y 70.62, el grupo metilo se observó a δ ppm: 16.32 y el carbono anomérico a δ ppm: 102.22.

La completa asignación de las señales de RMN para este compuesto se realizó a través de los datos del espectro en dos dimensiones HETCOR (Anexo X y X) y con la comparación de los datos obtenidos con los reportados en la literatura (Tabla 5 y 6), se pudo concluir que este metabolito secundario corresponde a la 3-O-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, conocida con el nombre común de quercitrina, aislada de muchas especies vegetales y particularmente dentro del género *Croton* se ha logrado aislar de las especies *C. campestris* ^[76], de las hojas de *C. huberi* ^[68] y de la corteza de *Croton gossypifolius* Vahl ^[71].

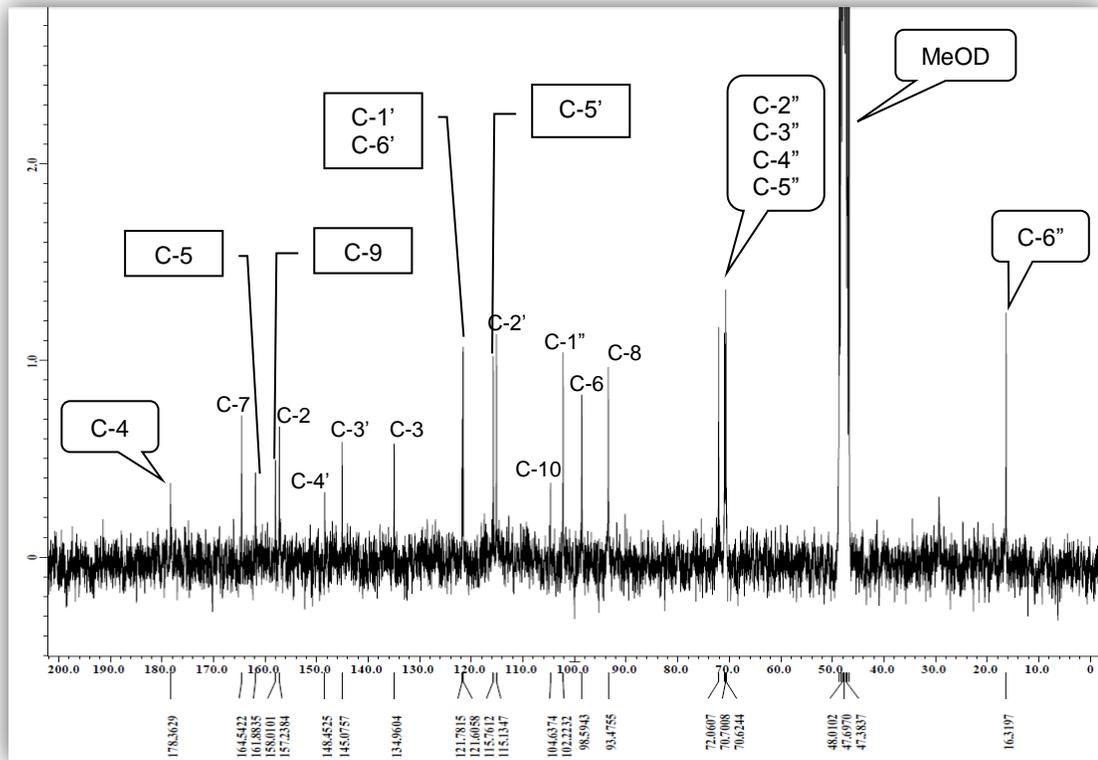


Fig. 24 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **IV** (MeOD, 67.5 MHz).

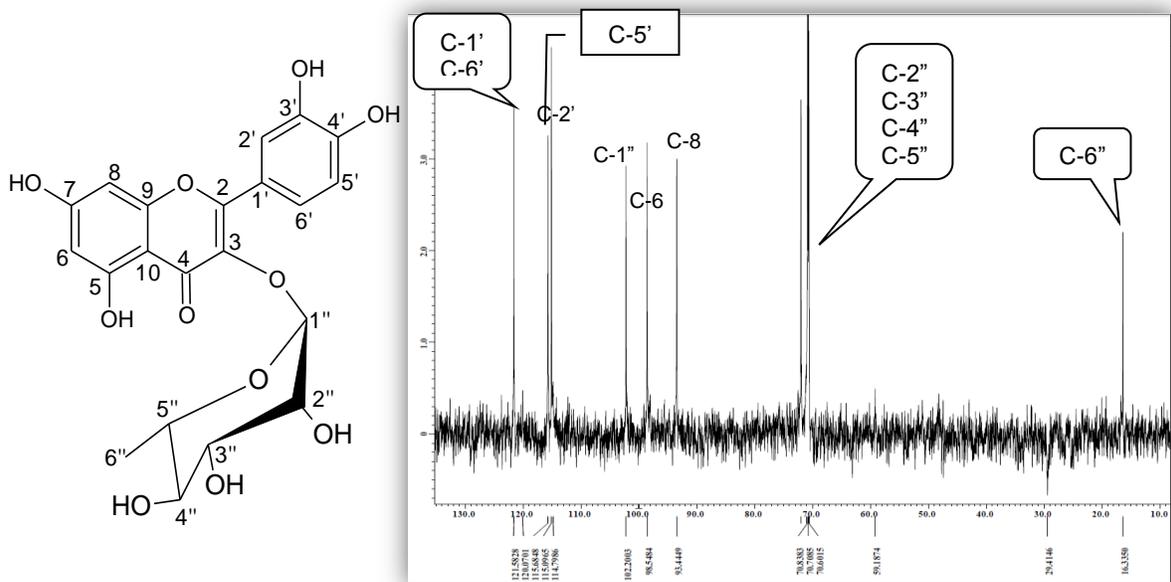


Fig. 25 Espectro DEPT-135 del compuesto **IV** (MeOD, 67.5 MHz).

Tabla 4: Comparación de los datos de RMN 1H para el compuesto **IV** con los datos reportados en la literatura.

N° Hidrógeno	Experimental tomado en MeOD; 270 MHz	Reportado (DMSO-d ₆ ; 400 MHz) ^[71]
	δ_H (ppm) (mult, <i>J</i> (Hz), Integral)	δ_H (ppm) (mult, <i>J</i> (Hz), Integral)
6	6.20 (s, 1H)	6.20 (d, <i>J</i> = 2.2)
8	6.36 (s, 1H)	6.38 (d, <i>J</i> = 2.2)
2'	7.33 (s, 1H)	7.29 (d, <i>J</i> = 2.2)
5'	6.91 (d, <i>J</i> = 8.15, 1H)	6.88 (d, <i>J</i> = 8.0)
6'	7.31 (d, <i>J</i> = 12.37, 1H)	7.25 (dd, 2.2:8.8)
1''	5.35 (s, 1H)	5.28 (d, <i>J</i> = 1.4)
2''	3.77 (dd, <i>J</i> = 2.97, 1H)*	3.98 m
3''	3.41 (m, 1H)*	3.75 m
4''	4.22 (s, 1H)*	3.21 m
5''	3.36 (m, 1H)*	3.50 m
6''	0.94 (d, <i>J</i> = 5.94, 3H)	0.80 s

*Datos intercambiables

Tabla 5: Comparación de los datos de RMN 13C para el compuesto **IV** con los datos reportados en la literatura.

N° Carbono	Experimental tomado en MeOD; 67.5 MHz		Reportado (DMSO-d ₆ ; 400 MHz) ^[71]	
	δ_c (ppm)	DEPT	δ_c (ppm)	DEPT
1	-	-	-	-
2	157.23	C	156.84	C
3	134.96	C	134.72	C
4	178.36	C	178.24	C
5	161.88	C	161.81	C
6	98.59	CH	99.30	CH
7	164.54	C	164.94	C
8	93.48	CH	94.23	CH
9	158.01	C	157.01	C
10	104.64	C	104.54	C
1'	121.78	C	121.25	C
2'	115.76	CH	116.16	CH
3'	145.08	C	145.74	C
4'	148.45	C	149.00	C
5'	115.14	CH	116.00	CH
6'	121.60	CH	121.66	CH
1''	102.22	CH	102.35	CH
2''	70.92*	CH	70.59	CH
3''	70.70*	CH	71.71	CH
4''	70.62*	CH	71.12	CH
5''	72.06*	CH	70.88	CH
6''	16.32	CH ₃	18.02	CH ₃

*Datos intercambiables

La estructura del compuesto **IV** se corroboró con el espectro de masas (**Fig.26**) en donde se observó un ión molecular a 447 m/z [M+1] correspondiente a la fórmula condensada $C_{21}H_{20}O_{11}$ y un pico a 300.86 m/z indicando la pérdida de 147 uma asociada al clivaje de la ramnosa entre el oxígeno del carbono anomérico y el carbono metínico oxigenado C-1" del sacárido.

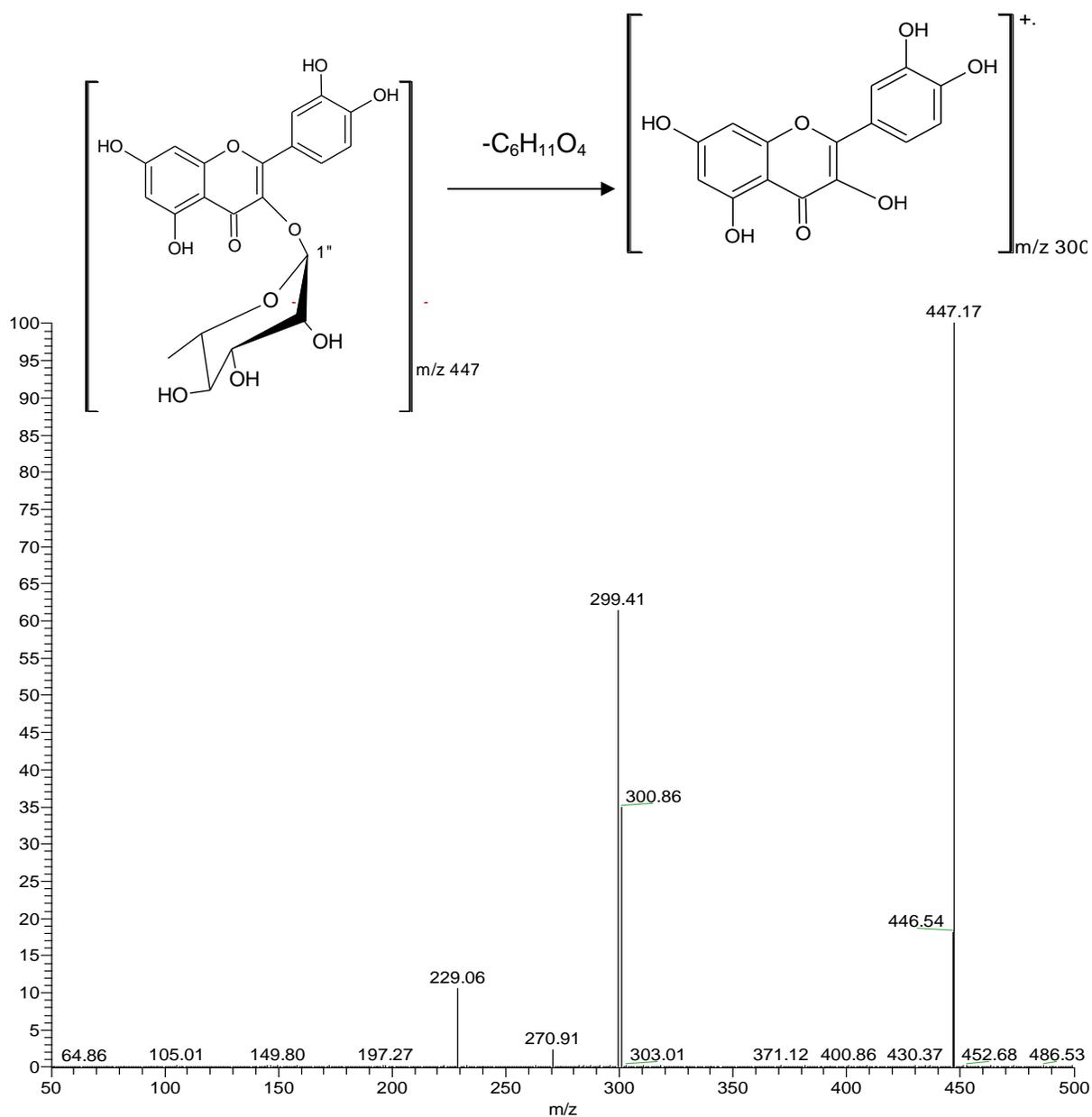


Fig. 26 Espectro de masas del compuesto **IV**.

Además de los compuestos ya presentados, de la fracción de CH_2Cl_2 se aisló lo que en principio se pensó que era un compuesto puro, por su perfil cromatográfico en CCF en diferentes mezclas de solventes, por ello se envió para que le realizaran las pruebas biológicas mientras estaba en proceso de elucidación. Después de realizar los espectros de RMN, IR y Masas se determinó que la muestra era una mezcla de hidrocarburos saturados. Al realizar los ensayos de citotóxicidad, esta muestra fue la más potente e interesante para continuar su estudio de evaluación biológica y por ello los resultados obtenidos hasta el momento serán presentados en la sección correspondiente.

De igual forma de la fracción de AcOEt, se aisló otro compuesto (**V**) que aún está en proceso de elucidación, pero se sabe hasta ahora que su estructura corresponde a un flavonoide glicosilado y hasta el momento en los ensayos citotóxicos realizados a resultado interesante.

6.1.5 Aspectos físicos y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de las hojas de *Croton gossypiifolius* Vahl.

Compuesto I: Líquido viscoso de color amarillo claro(18,7mg).RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.69 (s, 3H, H-1); 2.33 (t, $J=7.7$, 2H, H-3); 1.69 (m, $J=4.9$, 2H, H-4); 1.28 (sa, 30H, H-5); 1.28 (sa, 31H, H-6); 1.28 (sa, 31H, H-7), 0.9 (sa, 3H, H-8). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 51.4 (C-1); 174.3 (C-2); 34.2 (C-3); 25.0 (C-4); 31.9 (C-6); 22.7 (C-7); 14.3 (C-8).

Compuesto II: Caramelo de color amarillo oscuro (11.5mg). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.66 (t, $J= 15.8$; 3H, H-1); 2.29 (t, $J=7.4$, 2H, H-3); 1.61 (m,2H, H-4); 1.24 (m, 20H, H-5); 1.28 (sa, 31H, H-6); 1.28 (sa, 31H, H-7), 0.9 (sa, 3H, H-8).RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 51.4 (C-1); 174.3 (C-2); 34.1 (C-3); 24.9 (C-4); 32.1 (C-6); 22.7 (C-7); 14.0 (C-8).

Compuesto III: Sólido blanco (11.5 mg). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.52 (m, H-3); 5.33 (sa, H-6); 0.99 (s, H-18); 0.67 (s, H-19); 0.91 (d, $J=6.4$, H-21); 0.81 (m, H-26); 0.81 (m, H-27); 0.81 (m, H-29). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 37.4 (C-1); 31.8 (C-2); 71.9 (C-3); 42.4 (C-4); 140.9 (C-5); 121.7 (C-6); 31.9 (C-7); 32.0 (C-8); 50.3 (C-9); 36.6 (C-10); 21.2 (C-11); 39.9 (C-12); 42.4 (C-13); 56.9 (C-14); 24.4 (C-15); 28.3 (C-16); 26.2 (C-17); 11.9 (C-18); 18.8 (C-19); 36.2 (C-20); 19.1 (C-21); 34.1 (C-22); 26.4 (C-23); 46.0 (C-24); 29.4 (C-25); 19.4 (C-26); 19.8 (C-27); 23.2 (C-28); 12.0 (C-29).

Compuesto IV: Sólido amorfo de color amarillo oscuro (31.1mg). RMN ^1H (270 MHz, MeOD) δ ppm: 6.20 (s, 1H, H-6); 6.36 (s, 1H, H-8); 7.33 (s, 2H, H-2'); 6.91 (d, $J= 8.15$ Hz, 1H, H-5'); 7.31 (s, 2H, H-6'), 5.35 (s, 1H, H-1''); 3.77 (dd, $J= 2.97$, 1H, H-2''); 3.41 (M, $J= 5.67$, 3H, H-3''); 4.22 (s, 1H, H-4''); 3.36 (m, $J= 9.39$ Hz, 3H, H-5''); 0.94 (d, $J= 5.94$ Hz, 3H, H-6''). RMN ^{13}C (67.5 MHz, MeOD) δ ppm: 157.23 (C-2); 134.96 (C-3); 178.36 (C-4); 161.88 (C-5); 98.59 (C-6); 164.54 (C-7); 93.48 (C-8); 158.01 (C-9); 104.64 (C-10); 121.78 (C-1'); 115.76 (C-2'); 145.08 (C-3'); 148.45 (C-4'); 115.14 (C-5'); 121.60 (C-6'); 102.22 (C-1''); 70.92 (C-2''); 70.70 (C-3''); 70.62 (C-4''); 72.06 (C-5''); 16.32 (C-6'').

6.2 Sección biológica.

6.2.1 Evaluación citotóxica de las fracciones.

La determinación de la citotoxicidad *in vitro* sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, ambas correspondientes a carcinoma de mama, de las fracciones de Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl provenientes de una maceración con MeOH, arrojó que las tres fracciones presentan actividad citotóxica sobre las dos líneas celulares antes mencionadas. La concentración capaz de causar el 50% de la muerte de la población celular (CI₅₀) se encuentra en la Tabla 7:

Tabla 6: Valores de de CI₅₀ (μM) ± DE de las fracciones de Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3.

Fracción	CI ₅₀ ± DE (μM)* MCF-7	CI ₅₀ ± DE (μM)* SKBR3
Hex	2.55 ± 1.16	2.36 ± 1.11
CH ₂ Cl ₂	0.22 ± 1.27	1.93 ± 1.03
AcOEt	1.28 ± 1.10	50.89 ± 1.28

La fracción de CH₂Cl₂ resultó ser la más potente en ambas líneas celulares con los valores de CI₅₀ presentados en la tabla. Por otro lado, la fracción de Hex presentó actividad contra la línea SKBR3 a una concentración mucho menor al compararla con la fracción de AcOEt, sin embargo, esta última fue activa contra MCF-7 a una menor concentración que la fracción de Hex. La gran diferencia de concentraciones en el caso de la fracción de AcOEt, nos indica que existe selectividad en la acción de esta fracción sobre MCF-7 en comparación con SKBR3.

6.2.2 Evaluación citotóxica de los compuestos aislados.

Se evaluó el efecto citotóxico de los metabolitos secundarios aislados de las hojas de *Croton gossypiifolius* Vahl e identificados como compuestos **I**, **II**, **III**, **IV**, así como de la mezcla de hidrocarburos saturados y del compuesto **V** (en proceso de elucidación) sobre la viabilidad celular utilizando el método MTT. La Tabla 8 muestra los valores de CI_{50} de cada compuesto sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, ambas correspondientes a carcinoma de mama.

Tabla 7: Valores de CI_{50} (μM) \pm DE de los compuestos I, II, III, IV, V y de la mezcla de hidrocarburos saturados sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3.

Compuesto	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* MCF-7	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* SKBR3
I	7.84 \pm 1.05	26.80 \pm 1.07
II	22.37 \pm 1.04	37.24 \pm 1.21
III	7.84 \pm 1.05	10.33 \pm 1.03
IV	2.72 \pm 1.16	0.37 \pm 1.07
V	11.09 \pm 1.09	0.0034 \pm 1.39
Mezcla	0.0001 - 1	0.00069 \pm 4.63

Las seis muestras resultaron activas contra ambas líneas celulares. Los compuestos **I** y **II** con estructura similar presentan una CI_{50} menor para la línea celular MCF-7 la cual es menos agresiva que SKBR3. El compuesto **I** resultó ser activo a menor concentración para ambas líneas celulares que el compuesto **II**. Es posible que este hecho se atribuya a la mayor cantidad de átomos de carbono que posee la estructura del compuesto **I** en su cadena alifática.

De las muestras evaluadas, la mezcla de hidrocarburos saturados resultó ser la más potente con un valor de $CI_{50} 0.00069 \pm 4.63 \mu M$ para la línea celular SKBR3 que es más agresiva que la línea celular MCF-7. En estos momentos se están evaluando las muestras contra los fibroblastos (células sanas) con la finalidad de observar el efecto citotóxico sobre esta línea celular y determinar el índice de selectividad.

6.2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones de hexano, diclorometano y acetato de etilo a través del método de difusión sobre placas de agar ^[77, 78] contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), y los microorganismos Gram- negativos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Se evaluó la actividad antimicótica utilizando la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9 y se expresan como diámetros del halo de inhibición reportados en milímetros.

Tabla 8: Actividad antimicrobiana de las fracciones de Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).

Microorganismos	Fracciones			Controles positivos		Control negativo
	Hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Eritromicina	Polimixina B	etanol
Bacterias Gram-positivas						
<i>S. aureus</i>	9	8	11	28	N/R	--
<i>B. subtilis</i>	10	9	9	N/R	11	--
Bacterias Gram-negativas						
<i>E. coli</i>	--	--	--	N/R	11	--
<i>S. typhimurium</i>	--	--	--	N/R	12	--
<i>Ps. aeruginosa</i>	--	--	--	N/R	10	--
Levadura						
<i>C. albicans</i>	--	--	--	N/R	N/R	--

Leyenda:

ATCC: American Type Culture Collection.

--: No hubo formación de halos de inhibición.

N/R: no realizado.

En primer lugar podemos afirmar que el ensayo es válido debido a que los controles realizados arrojaron resultados satisfactorios. El solvente empleado (etanol) para solubilizar los extractos no presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos (control negativo). Los antibióticos empleados como controles positivos formaron halos de inhibición que se encuentran dentro de los límites reportados en las tablas del método de Kirby Bauer.

Los fracciones evaluadas mostraron tener actividad biológica contra las bacterias Gram-positivas empleadas, generando diámetros de inhibición similares a los de Polimixina B empleado como control positivo contra la bacteria *Bacillus subtilis*.

No se presentó actividad inhibitoria contra las bacterias Gram-negativas ni contra la levadura empleada.

Los compuestos aislados están aún bajo estudio para determinar su actividad antibacteriana.

7 CONCLUSIONES

- Del estudio fitoquímico realizado a las hojas de la especie *Croton gossypifolius* Vahl se aislaron 4 compuestos identificados como: hexadecanoato de metilo (I), decanoato de metilo (II), β -sitosterol (III), 3-O-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (IV) mejor conocido como quercitrina y además se logró aislar una mezcla de hidrocarburos saturados.
- Los compuestos (I), (II) y (III) se reportan aquí por primera vez para esta especie.
- Las fracciones de HEX, CH₂Cl₂ y AcOEt mostraron actividad citotóxica sobre las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y SKBR3, siendo la fracción de CH₂Cl₂ la más potente de todas. La fracción de AcOEt fue mucho más potente para la línea celular MCF-7 que para SKBR3.
- Los compuestos (I), (II), (III) y (IV) presentaron actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7 y SKBR3.
- La mezcla de hidrocarburos saturados resultó ser más potente sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 que las fracciones y los compuestos aislados.
- En la evaluación de la actividad antibacteriana las fracciones mostraron actividad contra las bacterias Gram-positivas y fueron inactivas frente a las Gram-negativas empleadas.

8 RECOMENDACIONES

- Estudiar la fracción hidrometanólica no trabajada en esta investigación.
- Realizar el estudio fitoquímico de las flores de la especie *Croton gossypiifolius* Vahl para continuar con el estudio de esta planta.
- Evaluar el efecto citotóxico de los compuestos sobre fibroblastos (línea celular normal) para poder determinar el índice de selectividad de los mismos y ensayar su actividad sobre otras líneas celulares tumorales.
- Evaluar el efecto antibacteriano de los compuestos aislados.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez A. R., Braun A. E., Relevancia de los Productos Naturales En El Descubrimiento De Nuevos Fármacos En El S. XXI. (2009) Real Academia de Ciencias 103(2): 409-419.
2. Kaufman T. S., Vila A. J., Nueva Simbiosis entre la química orgánica y la química biológica. (2011) CIENCIA HOY, 21(124):21-26.
3. Romero G. B. y Torres R. M., Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. (2012) Terapéutica en APS, FMC. 19(3):149-60.
4. Deanna Marcano y Masahisa Hasegawa. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Caracas, 2002.
5. Suárez A. I., Chávez K., Blanco Z., Compagnone R. S., Tillett S., Torrico F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. (2013) Revista latinoamericana de Química, 41(3):161-170.
6. Keller H. A., Stampella P. C., Delucchi G. y Hurrell J. A., Vernicia fordii y Aleurites moluccanus (Euphorbiaceae) en la Argentina. (2013) Naturalización y etnobotánica, Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 48:3-4.
7. Secco R., Cordeiro I., Senna-Vale L., De Sales M. F., De Lima L. R., Medeiros D., De Sá Haiad B., De Oliveira A. S., Rossi M. B., Carneiro-Torres D., Bigio N. C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiacea s.l in Brazil. (2012) Rodriguésia 63 (1):227-242.

8. Mwine J. T. y Van Damme P., Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. (2011) Journal of Medicinal Plants Research 5(5):652-662.
9. Neira L. F., Stashenko E., Escobar P., Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Ephorbiaceae. (2014) Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud, 46(1):15-2.
10. De Oliveira T. L., Mattar A. C., Lemes B. M., Minozzo B. R., Nepel A., Barison A., Fávero G. M., Campagnoli E. B., Beltrame F. L., Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. (2013) Journal of Ethnopharmacology. 150(1):263-269.
11. Bittner M., Alarcón J., Aqueveque P., Becerra J., Hernández V., Hoeneisen M., y Silva M., Estudio Químico de Especies de la Familia Euphorbiaceae en Chile. (2001) Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 46(4):419-431.
12. Hill A., Dominicis M., Mayor J., Oquendo M. y Sarduy R., Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. (2001) Revista Cubana de Farmacia, 35(3):203-206.
13. Pascual Villalobos M. J. y Correal Castellanos E. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. (1992) 43(1):39-49.
14. Rebouças S., Da Silva J., Groff A. A., Nunes E. A., Lanistcki M., Ferraz A., The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. (2012) Revista Brasileira de Farmacognosia, 22(2):389-396.

15. Queiroz M. F., Queiroz E.F., Zeraik M.L., Marti G., Favre-Godal Q., Simões-Pires C., Marcourt L., Carrupt P.A., Cuendet M., Paulo M.Q., Bolzani V.S., Wolfender J.L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. (2014) *Phytochemistry Letters*, 10: lxxxviii–xciii.
16. Hui-Hong L., Feng-Ming Q., Le-Le D., Gai-Xia F., Jing-Min C., Ding-Ding G., Zhan-Xin Z., Dong-Qing F. Cytotoxic and antibacterial pyran-2-one derivatives from *Croton crassifolius* (2014). *Phytochemistry Letters*, 8(10):1-5.
17. Barreto M. B., Clêrton L., De Freitas G., Das Chagas F., Silveira E. R., Gramosa N. V., Carneiro D. S. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae) (2013). *Química Nova*, 36(5):675-679.
18. Chávez K. Aislamiento y caracterización de metabolitos presentes en las flores de *Croton caracasana* con posible actividad citotóxica. [Tesis Licenciatura] (2007). Caracas: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
19. Salatino A., Faria M. L., Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae) (2007). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1):11-33.
20. Quiliano A. C. y Domínguez G. Evaluación de la producción de látex de sangre de grado (*Croton lechleri*) en función al diámetro y cuatro periodos de precipitación en poblaciones naturales de Ucayali, Perú (2010). *Ecología Aplicada*, 9 (2):61-69.

21. Franco M. S., Cordero C. P., Morantes S. J., Aristizabal F., Osorio C. Cytotoxic Labdane Diterpenoids Isolated From The Hexane Fraction Of The *Croton stipuliformis* Stem Bark (2011). *Vitae*, 18(2):173-182.
22. Xiao-Dong Y., Chen W., Zhao J. F., Yang L.J., Zhang H. B., Liang L.. Ent-kaurane diterpenes and phenolic compounds from *Croton kongensis* (Euphorbiaceae) (2009). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 237–240.
23. Thongtan J., Kittakoop P., Ruangrunsi N., Saenboonrueng J., Thebtaranonth Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-seco-kaurane diterpenes from *Croton kongensis* (2003). *J Nat Prod*, 66(6):868-70.
24. Takeshige Y., Kawakami S., Matsunami K., Otsuka H., Lhieochaiphant D., Lhieochaiphant S. Oblongionosides A–F, megastigmane glycosides from the leaves of *Croton oblongifolius* Roxburgh (2012). *Phytochemistry*, 80:132–136.
25. Khanitha P., Damrong S. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius* (2011). *Phytochemistry Letters*, 4:147–150.
26. Roengsumran S., Petson A., Kuptiyanuwat N., Vilaivan T., Ngamrojnavanich N., Chaichantipyuth C., Phuthong S. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius* (2001). *Phytochemistry*, 56:103-107.
27. Mulholland D. A., Langat M. K., Crouch N. R., Coley H. M., Mutambi E. M., Nuzillard J. M. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) (2010). *Phytochemistry*, 71:1381–1386.

28. Thuong P. T., Minh T. H., Thu Le V. T., Dao T. T., Dang T. T., Nguyen Q. T., Keun W. Symmetric dimers of ent-kaurane diterpenoids with cytotoxic activity from *Croton tonkinensis* (2012). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22:1122–1124.
29. Somaditya D., Mukherjee D., Chakraborty S., Dutta A., Swapana N., Maiti S., Ghorai N y Brajakishor S. Protective effect of *Croton caudatus* Geisel leaf extract against experimental visceral leishmaniasis induces proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo* (2015). *Experimental parasitology*, (151-152):84-95.
30. Zou G., Su Z., Zhang H., Wang Y., Yang J., Zou Z. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. Var. *tomentosus* Hook (2010). *Molecules*, 15:1097-1102.
31. Kawakami S., Matsunami K., Otsuka H., Shinzato T., Takeda Y. Crotonionosides A–G: Megastigmane glycosides from leaves of *Croton cascarilloides* Rauschel (2011). *Phytochemistry*, 72:147–153.
32. Kawakami S., Toyoda H., Harinantenaina L., Matsunami M., Yamaguchi K. Eight New Diterpenoids and two New Nor-Diterpenoids from the Stems of *Croton cascarilloides* (2013). *Chemical and pharmaceutical Bulletin*, 61(4):411-418.
33. Rodriguez G., Marcolin E., Bona S., Porawski M., Lehmann M., Marroni N. P. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats (2010). *Arquivos de Gastroenterologia*, 47(3):301-305.

34. Claudia B. De Paula, Gracioso J. S., Toma W., Hiruma-Lima C. A., Carneiro E. M., Alba R.M. Souza Brito. The antiulcer effect of *Croton cajucara* Benth in normoproteic and malnourished rats (2008). *Phytomedicine*, 15:815–825.
35. Nardi G. M., DalBo S., Monache F. D., Pizzolatti M. G., Ribeiro-do-Valle R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae) (2006). *Journal of Ethnopharmacology*, 107:73-78.
36. Hort M. A., Stralioatto M. R., Duz M. S., Netto P. M., Souza C. B., Schulz T., Horst H., Pizzolatti M. G., Fabro de Bem A., Ribeiro-do-Valle R. M. Cardioprotective effects of a proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill: Focus on atherosclerosis (2012). *Food and Chemical Toxicology*, 50:3769-3775.
37. Campagnuolo C., Fattorusso E., Petrucci F., Taglialatela-Scafati O., Appendino G., Marquez N., Muñoz E. A prenylbisabolane with NF- κ B inhibiting properties from Cascarilla (*Croton eluteria*) (2005). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13:4238-4242.
38. Abdon A. P., Leal-Cardoso J. H., Coelho-de-Souza A. N., Morais S. M., Santos C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice (2002). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(10):1215-1219.
39. Brasil D. S., Müller A. H., Gisele M. S., Alves C. N., Peris G., Llusar R., Moliner V. Isolation X-ray crystal structure and theoretical calculations of the new compound 8-Eepicordatin and identification of others terpenes and steroids from the bark and leaves of *Croton palanostigma* Klotzsch (2010). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(4):731-739.

40. Socorro D., Henrique A., Guilhon G. M., Nahum A., Andrade E. H., Silva J., Maia J. G. Essential Oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil (2009). Journal of Brazilian Chemical Society, 6:1188-1192.
41. Chaves M., Ibáñez P. P., Pabón M. G. Vasodilatación inducida por *Croton schiedeanus* Schlecht vinculada con la ruta metabólica de guanilato ciclasa. (2012). Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas 41(1):36-49.
42. Pizzo M., Bortoluzzi A., Brighente I., Zuchinalli A., Carvalho F., Candido A., Peresand M. Clerodane Diterpenes from Bark of *Croton Urucurana* Baillon (2013). Brazil chemistry society, 4:609-614.
43. Medeiros C. S., Silveira S. S., Barbosa M. F. Estaquia de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. com diferentes concentrações de ácido indol butírico (2012). Ciencia Rural 42(4):621-626.
44. Bezerra P. H., Campos R. M., Fonteles M. C., Santos C. F., José Henrique Leal J. H., Falcão N. R. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its major components, anethole and estragole, on the rat corpora cavernosa (2014). Life Sciences, 112:74-81.
45. Ramos F., Takaishi Y., Kashiwada Y., Osorio C., Duque C., Acuña R., Fujimoto Y. Ent-3,4-seco-labdane and ent-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae) (2008). Phytochemistry, 69:2406-2410.
46. De lima S., Citóia A., Lopesa J., Netoa J., Chavesa M., Silveirab E. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill Euphorbiaceae (2010). Revista Latinoamericana de Química, 3:133-144.

47. Motta L. B., Furlan C. M., Santos D., Salatino M., Duarte J. M., Negri G., Carvalho J. E., Ruiz A. L., Cordeiro I., Salatino A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton Macrobothrys* (2011). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6):972-977.
48. Motta L. B., Furlan C. M., Santos D., Salatino M., Duarte J. M., Negri G., Carvalho J., Ruiz A. L., Cordeiro I., Salatino A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys* (2011). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6:972-977.
49. Rossi D., Guerrini A., Paganetto G., Bernacchia G., Conforti F., Statti G., Maietti S., Poppi I., Tacchini M., Sacchetti G. *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food (2013). *Food Chemistry*, 139:439-447.
50. Montopoli M., Bertin R., Chen Z., Bolcato J., Caparrotta L., Frolidi G. *Croton lechleri* sap. And isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. (2012). *Journal of Ethnopharmacology*, 144:747-753.
51. Marino S., Gala F., Zollo F., Vitalini S., Fico G., Visioli F., Iorizzi M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity (2008). *Molecules*, 13:1219-1229.
52. Gonçalves T., Souza P. S., Waléria B. B., França S. C., Soares A. M. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart (2011). *Ciencia Rural*, 41(10):1712-1718.

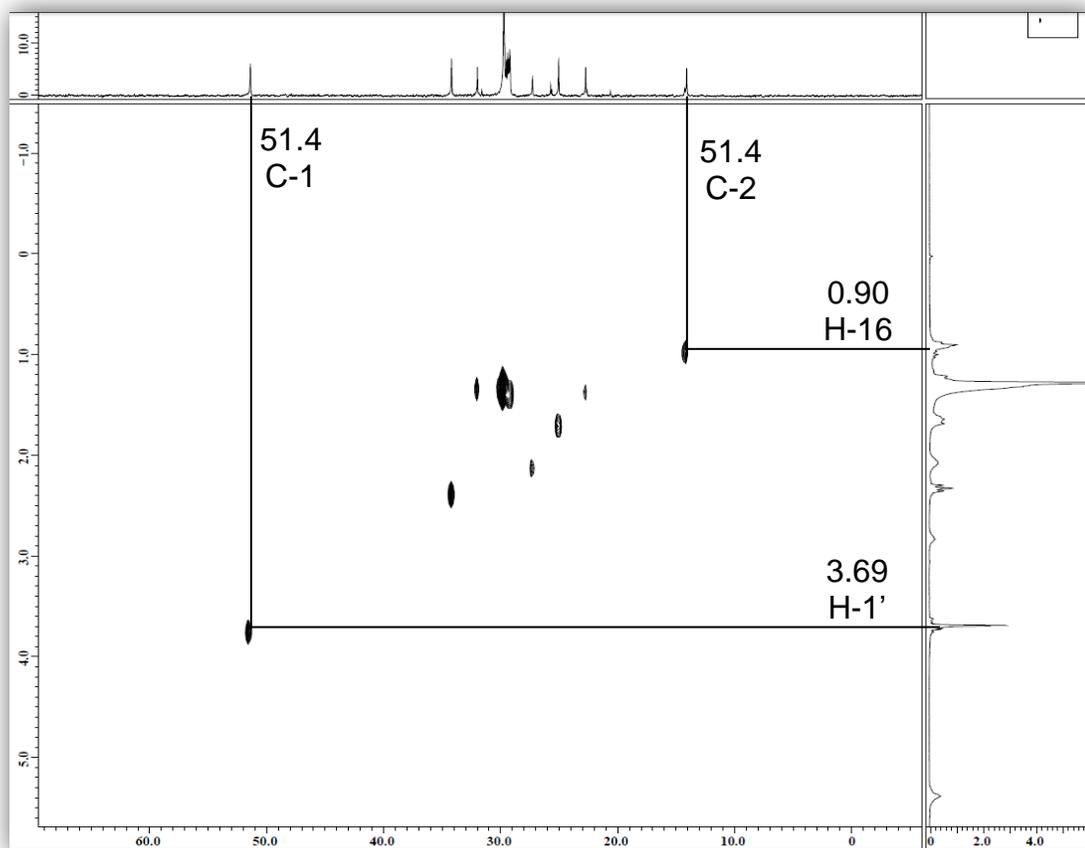
53. Pereira S., Contini S., Coppede J., Pereira P., Bertoni B., Franca S., Pereira A. M. An ent-kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart (2012). *Molecules*, 17:8851-8858.
54. Van B. W. The contribution of Johann Friedrich Klotzsch to the taxonomy of *Croton* (Euphorbiaceae) and associated genera (2011). *Willdenowia - Annals of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem*, 41(1):19:15-33.
55. Ramos M. J., Santos C. A., Santana D. G., Santos D. A., Alves P. B., Thomazzi S. M. Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (2013). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 4:644-650.
56. Randau K. P., Sproll S., Lerche H., Bracher F. Pernambucone, a new tropone derivative from *Croton argyroglossum* (2009). *Pharmazie*, 64(5):350-351.
57. Lavor K. L., Matias E. F., Alves E. F., Santos B. S., Figueredo F. G., Lima L. F., Leit N. F., Sobral-Souza C. E., Andrade J. C., Alencar L. B., Brito D. I., Albuquerque R. S., Coutinho H. D. Association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae) (2014). *European Journal of Integrative Medicine*, 6(3):301-306.
58. Jaramillo B. E., Duarte E., Muñoz K., Stashenko E. Composición química volátil del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante (2010). *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 15(3):133-142.

59. Suárez A. I., Compagnone R. S., Morale A., Pérez P., Mendoza R., Arvelo F., Ramírez J., Galindo I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters* (2005), 218:109-116.
60. Suárez A., Rivas D., Compagnone R., Castillo A., Blanco Z. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensis* (2009). *Revista Facultad de Farmacia*, 72(2):11-17.
61. Mateu E., Chavez K., Riina R., Compagnone R. S., Monached F., Suárez A. New 3,4-seco-ent-kaurane Dimers from *Croton micans* (2012). *Natural Products Communications*, 7(1):5-8.
62. Suárez A. I., Vásquez L. J., Taddei A., Arvelo F., Compagnone R. S. Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. (2008). *Journal of Essential Oil Bear Plants*, 1(2):208-213.
63. Mijares M., Martínez G., Chirinos P., Suárez A., Compagnone R., Blanco. Z., De Sanctis J. Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato (2012). *Revista Facultad de Farmacia*, 75(1):28-34.
64. Suárez A. I., Vasquez L. J., Manzano M. A., Compagnone R. S. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela (2005). *Flavour Fragrance Journal*, 20(6):611-614.
65. Suárez A. I., Blanco Z., Compagnone R., Salazar M., Zapata V., Alvarado C. Antiinflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract (2006). *J Ethnopharmacology*, 105:99-101.

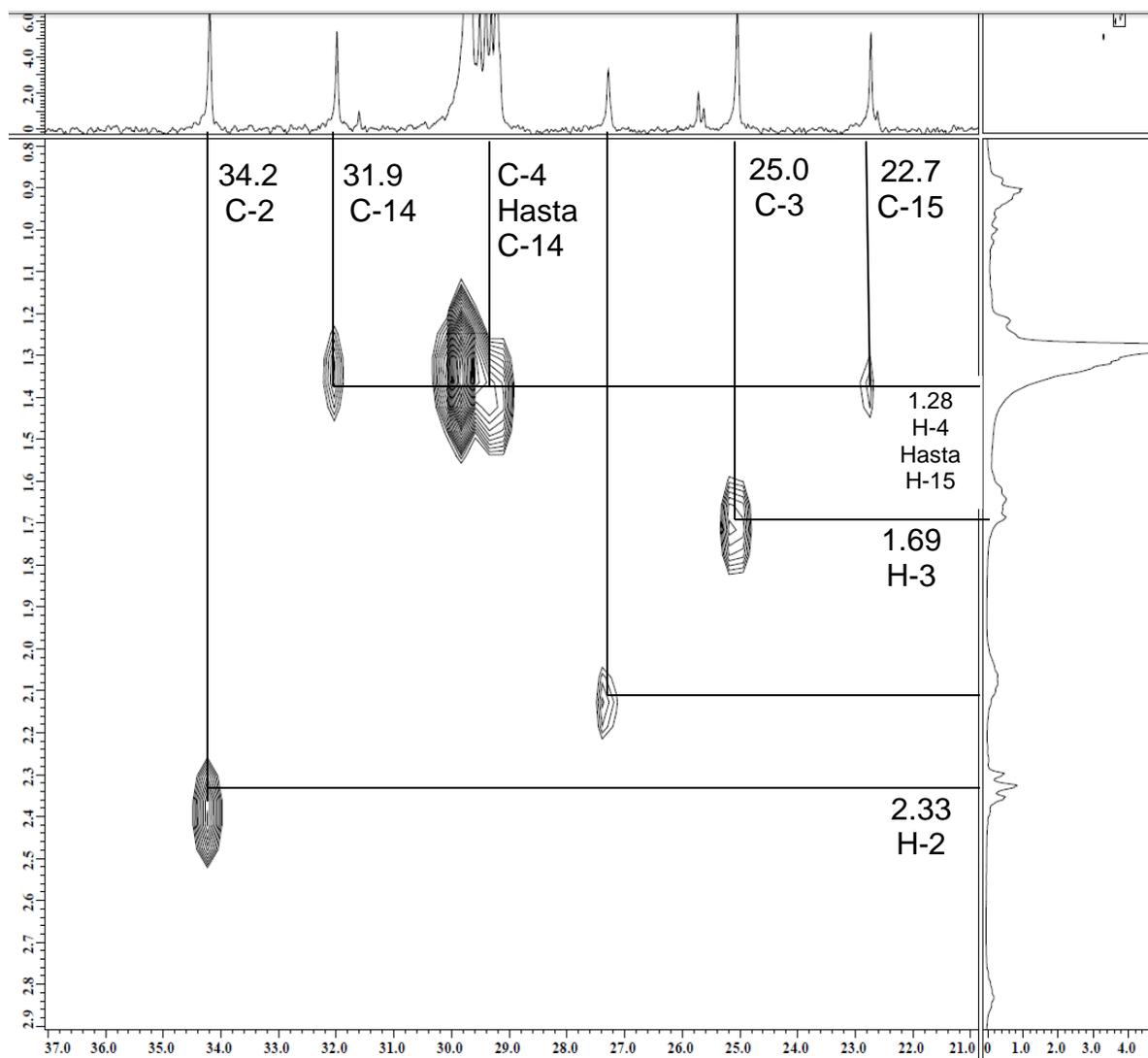
66. Torrico F., Cepeda M., Guerrero G., Meléndez F., Blanco Z., Canelón D. J., Díaz B., Compagnone R. S., Suárez A. I. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats (2007). *Brazilian Journal of Pharmacology*, 17(2):166-169.
67. Márquez G. Estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos apolares de *Croton pungens*. [Tesis]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Química; 2011.
68. Suárez A. I., Tapias E., Compagnone R. S., Tillett S., Díaz B., Canelon D., Blanco Z. Chemical constituents from *Croton huberi* (2006). *Revista Facultad de Farmacia*, 68(1-2):14-18.
69. Suárez A. I., Compagnone R. S., Tomassi A., Vasquez L. J. Essential oil composition of *Croton huberi* from Venezuela (2006). *Journal of Essential Oil Bear Plants*, 9(1):75-80.
70. Suárez A., Oropeza M., Vásquez L., Tillet S., Compagnone R. Chemical Composition of the Essential Oil of *Croton gossypiifolius* from Venezuela (2010). *Natural Products Communications*, 6(1): 97-99.
71. Suárez A., Chavez K., Blanco Z., Compagnone R., Tillet S., Torrico F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypiifolius* colectada en Venezuela (2013). *Revista Latinoamericana de Química*, 3:163-170.
72. Moyano d., Murcia I., Parra d., Burgos a., Bristizabal f. Evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana del compuesto [ag(phen)2]salh) (2012). *Revista Colombiana de Química*, 41(1):47-59.

- 73.** Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays (1983). *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- 74.** Ajoku G., Okwute S y Okogun J. Isolation of Hexadecanoic Acid Methyl Ester and 1,12-Ethanedicarboxylic, Acid-1-Hydroxy-1, 1-Dimethyl Ester from the calyx of Green Hibiscus Sabdariffa (Linn) (2015). *Natural Products Chemistry & Research*, 3(2):1-5.
- 75.** Prakash V. y Prakash I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus* (2012). *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9):239-242.
- 76.** Dos Santos P., Schripsema J., Kuster R. Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae) (2005). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15(4):321-325.
- 77.** Hewitt, W. *Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis a Rational Approach*. Florida: Interpharm/CRC press LLC; 2004.
- 78.** Clavell, L; Pedrique, M. *Microbiología manual de métodos generales*. 2da edición. Facultad de farmacia -UCV; 1992.

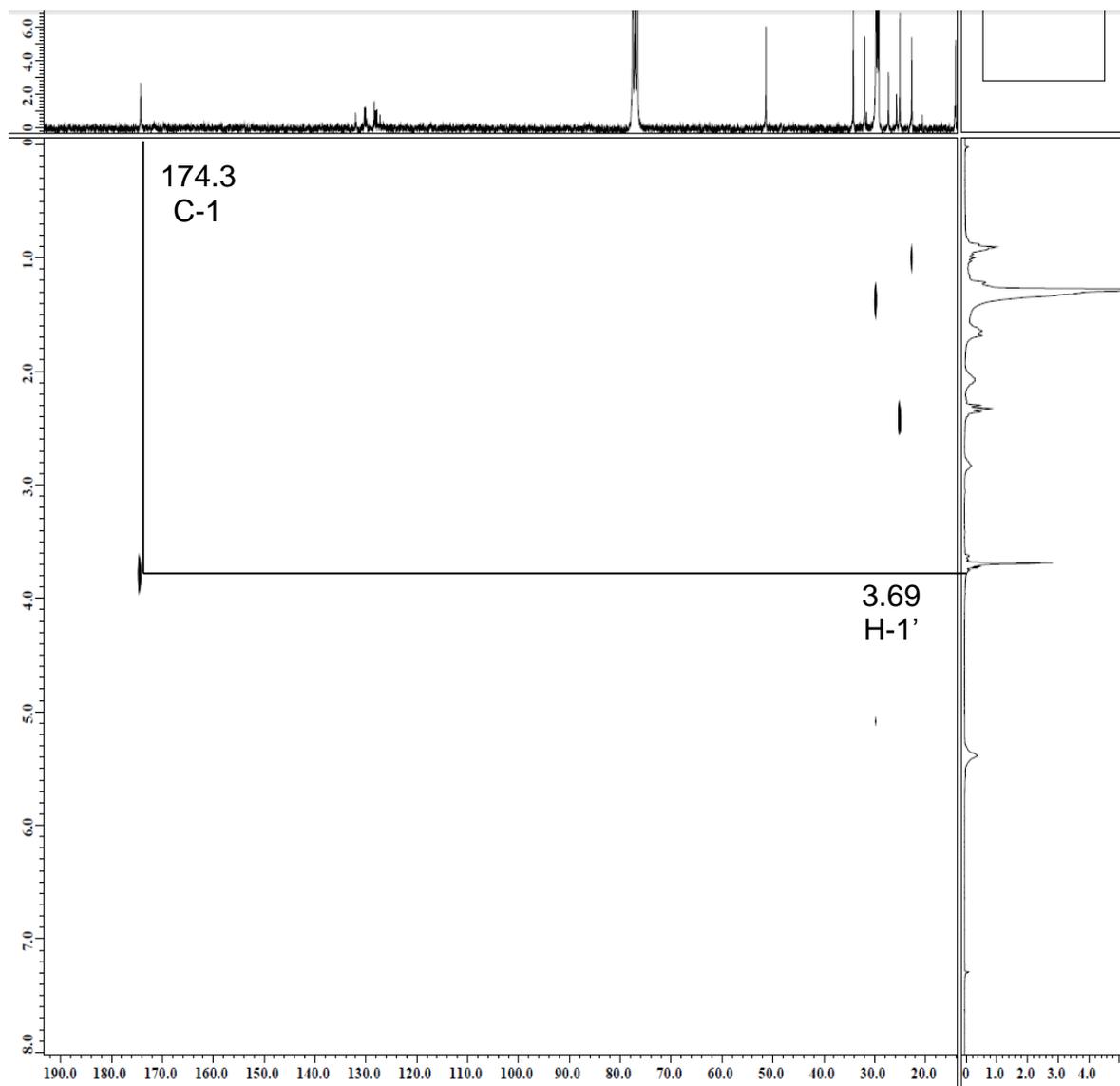
10 ANEXOS



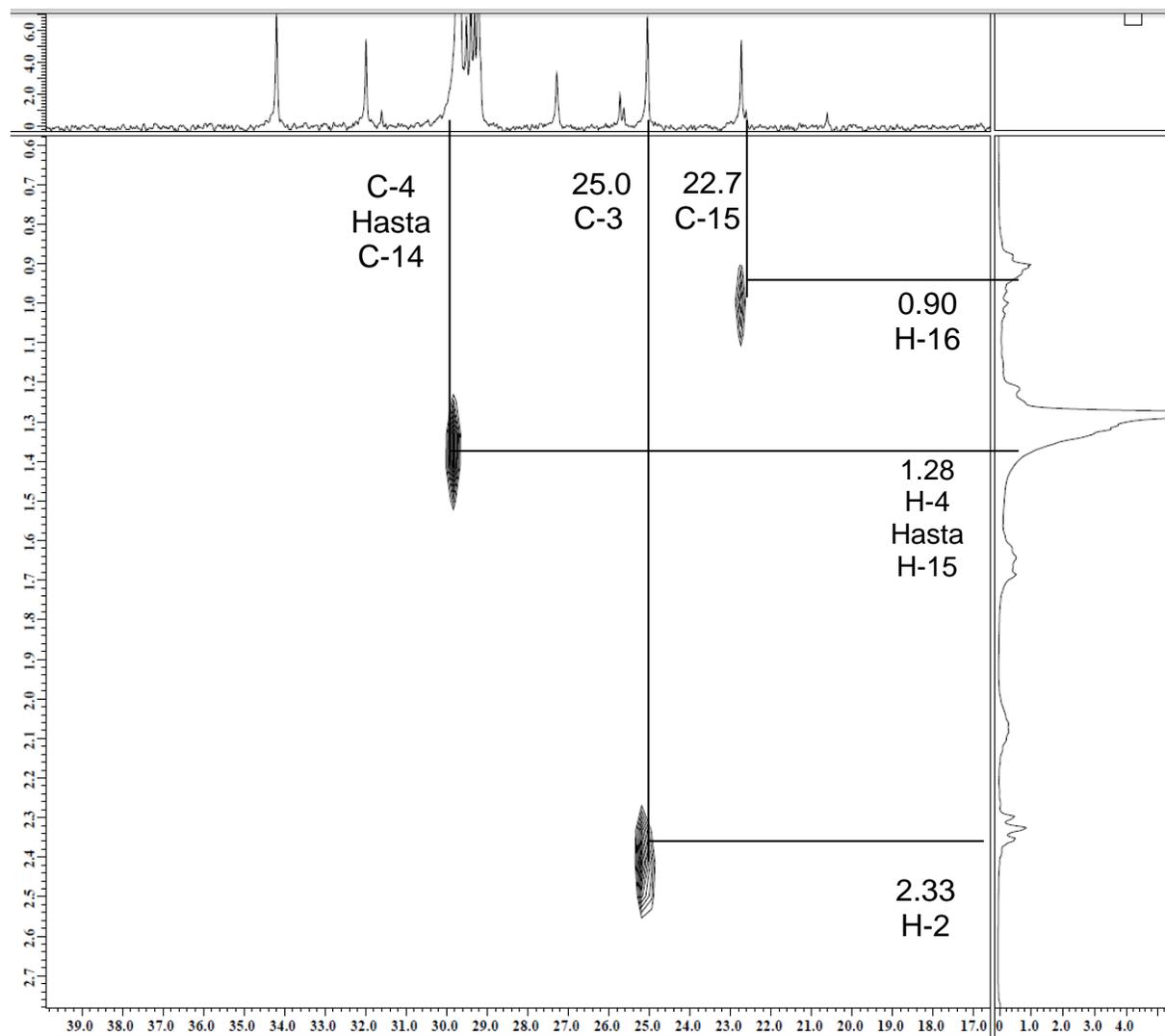
Anexo 1: Espectro HETCOR del compuesto I, tomado en CDCl_3 .



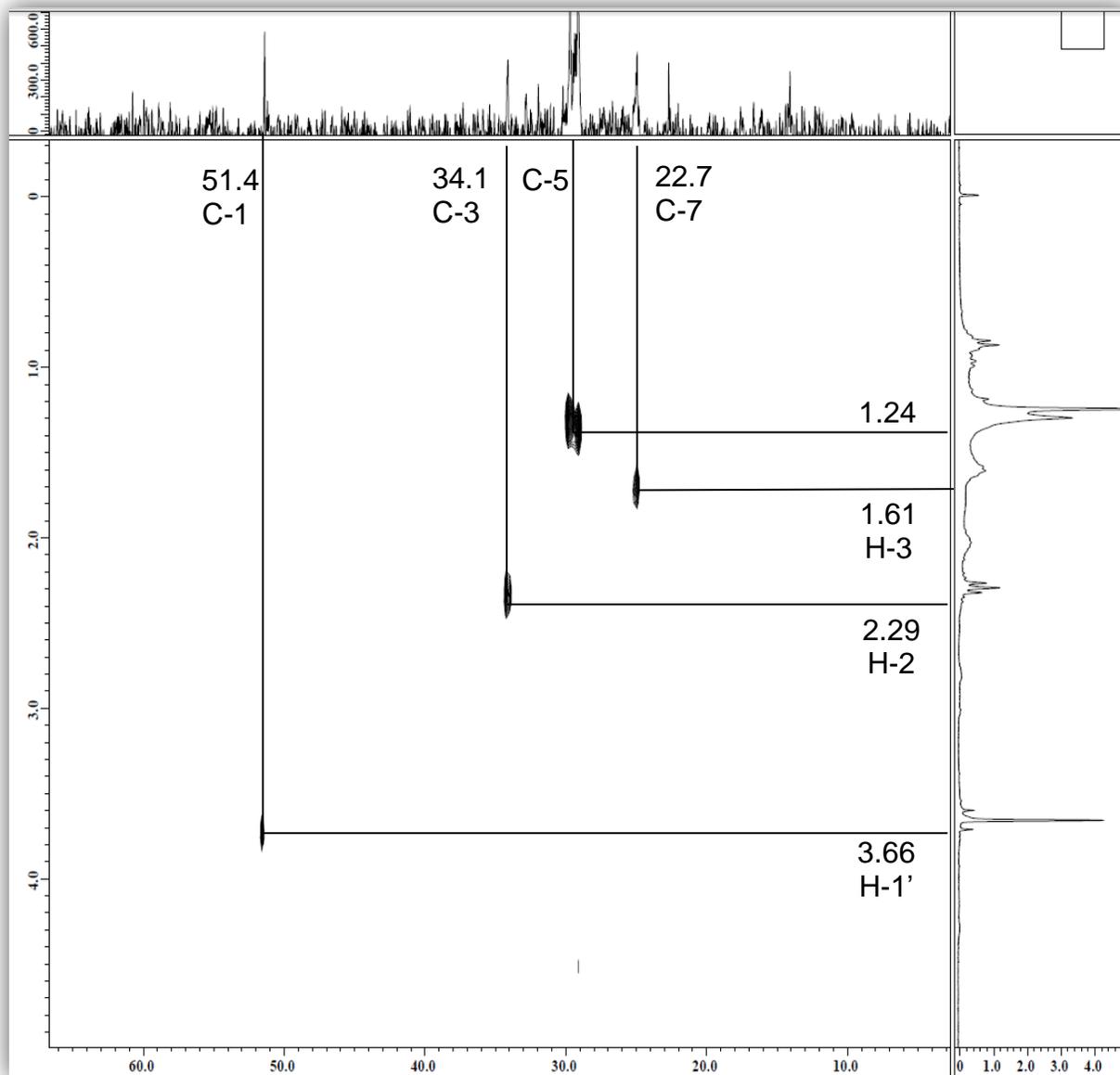
Anexo 2: Ampliación del espectro HETCOR del compuesto I, tomado en CDCl_3 .



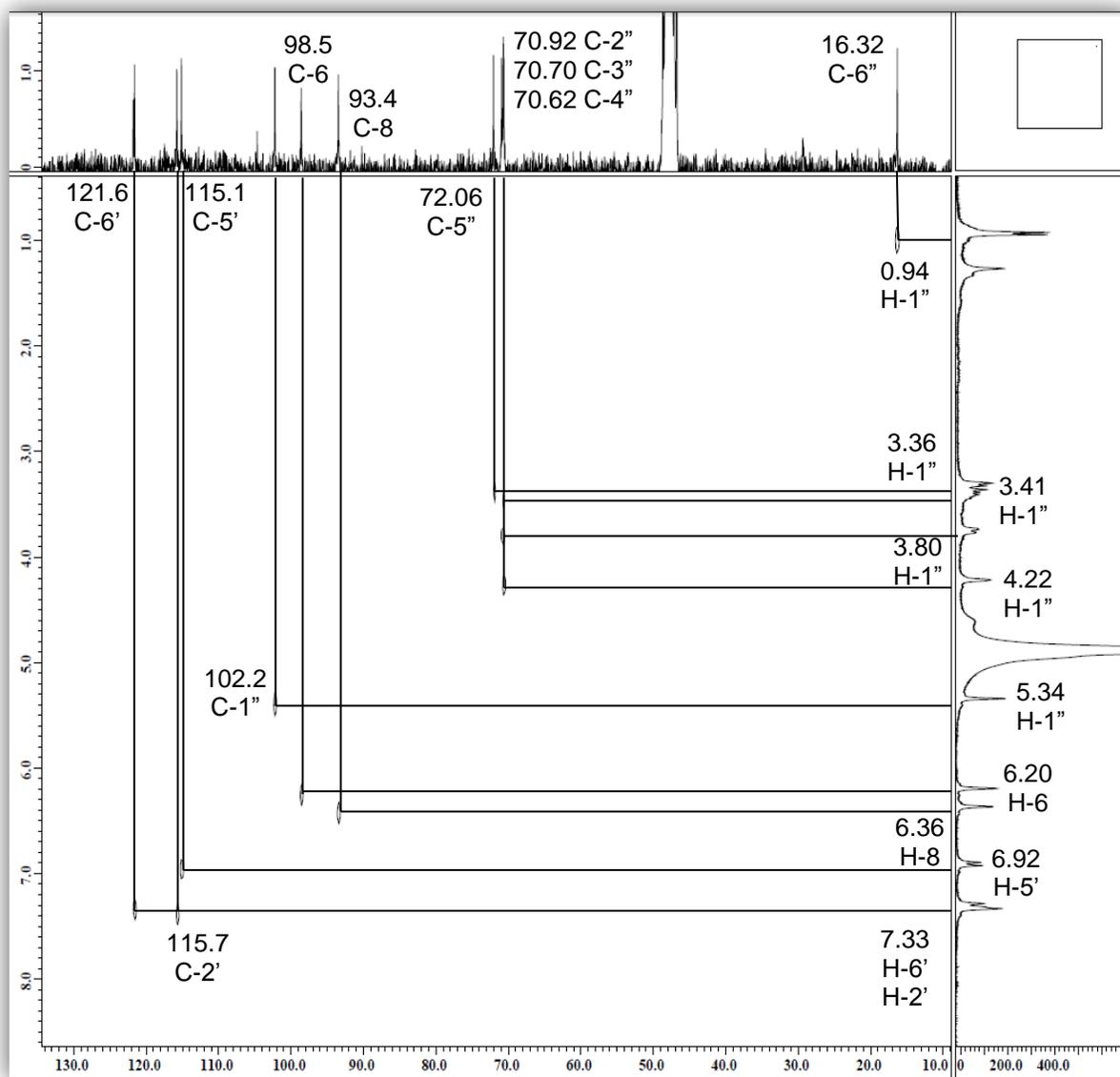
Anexo 3: Espectro FLOCK del compuesto I, tomado en CDCl₃.



Anexo 4: Ampliación del espectro FLOCK del compuesto I, tomado en CDCl₃.



Anexo 5: Espectro HETCOR del compuesto II, tomado en CDCl_3 .



Anexo 6: Espectro HETCOR del compuesto IV, tomado en MeOD.