

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



**Estudio Fitoquímico de las Hojas de la Planta
Croton malambo Karst**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Milagros Joselin Avila Ayala, para optar al título de Licenciada en Química.

Caracas, Abril 2014.

Yo Profesora Alírica Suárez, Investigadora Titular del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora María Lupe Márquez, Investigadora del Centro de Síntesis Macromolecular y Organometálica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado

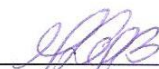
Estudio Fitoquímico de las Hojas de la Planta *Croton malambo* Karst

Que presenta la Br. Milagros Joselin Avila Ayala, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014, y con esta fecha autorizamos se presentación.

Caracas, Abril de 2014



Dra. Alírica Suárez



Dra. María Lupe Márquez

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “**Estudio Fitoquímico de las Hojas de la Planta *Croton malambo* Karst**”. Presentado por la Br. Milagros joselin Avila Ayala, 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. Alírica Suárez
(Tutora)



Dra. María Lupe Márquez
(Tutora)



Prof. Ivette Piña
(Jurado)



Prof. Beth Díaz
(Jurado)

Dedicatoria

A mi madre Judith Ayala

A mi tutora Dra. Alirica Suárez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy las gracias a Dios, al ser que si verlo me dio la inspiración, la fuerza de voluntad, la salud y la sabiduría en cada uno de mis pasos a cumplir.

A mi tutora Alirica Suárez por darme la oportunidad de continuar con un trabajo, que significa todo su esfuerzo, por el apoyo, las horas de dedicación en mi trabajo y por los consejos dados para el complemento de mis conocimientos. Todo mi respeto y admiración por su trabajo. A mi tutora María Lupe por ser su apoyo en la investigación.

A la Universidad Central de Venezuela, que nos da todas las herramientas del conocimiento, desarrollo tanto personal como académico y solo espera a cambio que nos convirtamos en profesionales que sigan dejando su nombre en alto. Gracias a la casa que vence la sombra, ya que por el hecho de haber estudiado en tus espacios, me hace sentir una persona de éxito y con futuro.

A mi mami Judith, ya que es lo mejor que tengo en la vida y ha sido capaz de sacrificar cada momento de su vida, para darme la mejor educación, solo recibiendo a cambio la satisfacción de mi superación ante la vida. Gracias a ti por tu valioso esfuerzo, que me ha permitido alcanzar cada meta propuesta en mi vida.

A mis compañeros a los largo de la carrera, que me han dado el apoyo en momentos de debilidad, por amigos, por compañeros. Y sobre todos a aquellos más cercanos con los que no solo tuve la oportunidad de compartir memorias de horas de estudios sino también memorias de vida, alegría y melancolía.

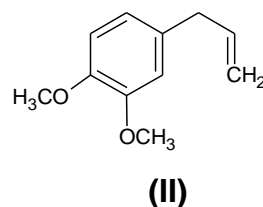
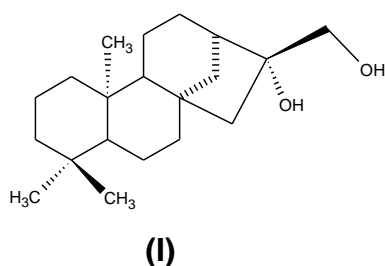
A mi familia que me ha apoyado, en esta carrera que para ellos es una locura, pero que en el fondo se siente orgullosos de ser parte de su familia. A mi esposo por los buenos momentos y la paciencia de esperar por mi hasta el momento indicado.

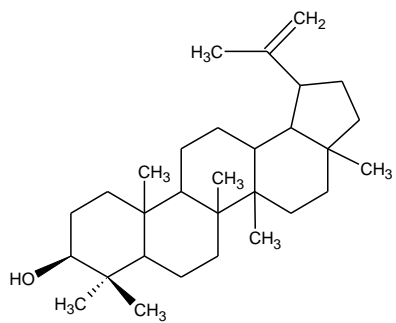
A mis profesores de la carrera, ya que me enseñaron lo que era estudiar de verdad, no solo con una lectura o un repaso, sino a investigar y siempre hacerme la pregunta que más me ayudo en el desarrollo de mi carrera. ¿Por qué ocurre? Sobre todo al profesor Gustavo Cabrera y Ervis Escalante que marcaron la diferencia.

RESUMEN

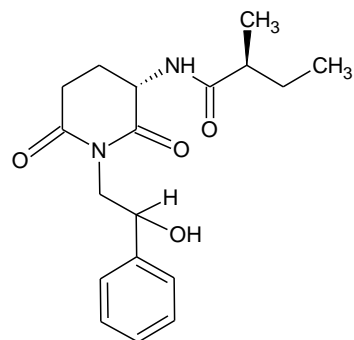
En este trabajo de investigación se presentan los resultados de un estudio fitoquímico de las hojas de la planta *Croton malambo* Karst (Euphorbiaceae) colectada en Venezuela, como complemento de un estudio previo realizado sobre la corteza de la planta. Se aislaron y caracterizaron 5 compuestos mediante técnicas cromatográficas y la caracterización se llevó a cabo usando técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , DEPT-135. Se identificaron: 16β , 17α -diolenkaurano (I), metileugenol (II), lupeol (III), julocrotol (IV) y julocrotona (V). Los compuestos IV y V se obtuvieron como una mezcla y han sido aislados por primera vez para esta especie.

Por otro lado el hecho de que el aislamiento del compuesto 16β , 17α -diolenkaurano haya tenido lugar a partir de las hojas de la planta es significativo, ya que en un estudio previo realizado al mismo compuesto, pero usando la corteza de esta especie, mostró tener buena actividad citotóxica en diferentes tipos de cáncer, siendo su mecanismo de acción vía apoptótica, aportando una ventaja ya que al ser aislado de las hojas se evita el daño que implica para la planta la tala de la corteza, lo que puede causar la muerte de la misma.

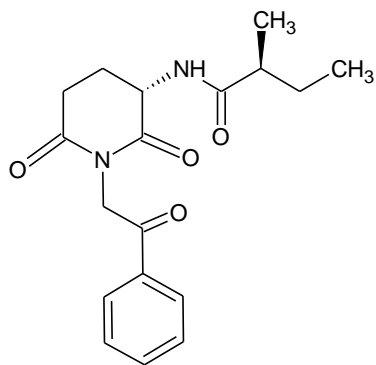




(III)



(IV)



(V)

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE ESQUEMAS	VI
INDICE DE ANEXOS	VII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes	3
1.1. Familia Euphorbiaceae.	3
1.2. Principales compuestos químicos aislados de Euphorbiaceae.....	4
1.2.1 Terpenoides.....	4
1.2.2 Ácidos Grasos.....	5
1.2.3 Sustancias fenólicas.	5
1.2.4 Alcaloides.	6
1.3. Genero <i>Croton</i>	6
1.3.1. <i>Croton nepetaefolius</i> Baill.	8
1.3.2. <i>Croton stipuliformis</i> bark	9
1.3.3. <i>Croton caudatus</i> Geisel. var. <i>tomentosus</i> Hook.....	10
1.3.4. <i>Croton kongensis</i> Gagnep.	12
1.3.5. <i>Croton gratissimus</i> Burch.....	13
1.3.6. <i>Croton adenocalyx</i> Baill	14
1.3.7. <i>Croton funckianus</i> Müll.	14
1.3.8. <i>Croton cascarilloides</i> Räuschel.....	16
1.3.9. <i>Croton macrobothrys</i> Baill.....	17
1.3.10. <i>Croton zehntneri</i> Pax and Hoffman.....	18
1.3.11. <i>Croton lechleri</i> Mull. Arg.....	19
1.3.12. <i>Croton tonkinensis</i> Gagnep.	22
1.3.13. <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart.....	22
1.3.14. <i>Croton oblongifolius</i> Roxburgh.....	23

1.3.15. <i>Croton urucurana</i> Baillon.	24
1.3.16. <i>Croton palanostigma</i> Klostzch.	25
1.3.17. <i>Croton argyroglossum</i> Baill.	26
1.3.18. <i>Croton sparsiflorus</i> Morong.	27
1.3.19. <i>Croton. matourensis</i> Aubl.	28
1.3.20. <i>Croton micans</i> Sw.	29
1.3.21. <i>Croton pungens</i> Jacq.	31
1.3.22. <i>Croton caracasana</i> Pittier.	32
1.3.23. <i>Croton gossypiifolius</i> Vahl.	33
1.3.24. <i>Croton malambo</i> Karst.	35
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo general:	39
3.2. Objetivos específicos:	39
4. PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1. Equipos	40
4.2. Materiales.	40
4.2.1 Solventes.	40
4.2.2. Solventes para el análisis de RMN.	40
4.2.3. Materiales para Cromatografía.	41
4.2.4 Reveladores.	41
4.3. Procedimiento experimental.	41
4.3.1. Colecta del material vegetal.	41
4.3.2. Extracción.	42
4.3.3. Separación de la fracción de hexano.	44
4.3.4 Separación de la fracción de cloroformo.	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	50
5.1. Estudios Fitoquímicos	50
5.1.1. Compuesto I: 16 β ,17 α -diolentkaurano.	50
5.1.2. Compuesto II: Metileugenol.	56
5.1.3. Compuesto III: Lupeol.	59

5.1.4. Compuesto IV y V: Julocrotol y Julocrotona	64
5.1.5 Aspectos físicos y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de las hojas de <i>Croton malambo</i> Karst.....	71
6. CONCLUSIONES	73
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. ANEXOS.....	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución a nivel mundial del género <i>Croton</i>	7
Figura 2. Estructura del compuesto I.....	51
Figura 3. Espectro de RMN ¹ H del compuesto I.....	51
Figura 4. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto I.....	52
Figura 5. Espectro DEPT-135 del compuesto I.	53
Figura 6. Estructura del compuesto II.....	56
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H del compuesto II.....	57
Figura 8. Espectro de ¹³ C y DEPT-135 del compuesto II.	58
Figura 9. Estructura del compuesto III.....	59
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H del compuesto III.....	61
Figura 11. Espectro RMN ¹³ C del compuesto III.	62
Figura 12. Espectro DEPT-135 del compuesto III.	62
Figura 13. Estructuras de los compuestos IV y V.....	65
Figura 14. Espectro RMN ¹³ C de los compuestos IV y V.	66
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H de los compuesto IV y V.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de RMN de ^1H para $16\beta,17\alpha$ -diolentkaurano	54
Tabla 2. Datos de RMN de ^{13}C para $16\beta,17\alpha$ -diolentkaurano	55
Tabla 3. Datos de RMN de ^1H para Metileugenol.....	58
Tabla 4. Datos de RMN de ^{13}C para Metileugenol	59
Tabla 5. Datos de RMN de ^1H para Lupeol	63
Tabla 6. Datos de RMN de ^{13}C para Lupeol.....	64
Tabla 7. Datos de RMN de ^1H para Julocrotol.....	68
Tabla 8. Datos de RMN de ^{13}C para Julocrotol	69
Tabla 9. Datos de RMN de ^1H para Julocrotona	70
Tabla 10. Datos de RMN de ^{13}C para Julocrotona	71

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de extracción de los metabolitos secundarios de las hojas de <i>Croton malambo</i> Karst.	43
Esquema 2. Proceso de separación de la fracción de hexano del extracto metanólico de las hojas de <i>Croton malambo</i> Karst.	46
Esquema 3. Proceso de separación de la fracción de cloroformo del extracto metanólico de las hojas de <i>Croton malambo</i> Karst.	49

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro RMN ^1H del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz)	80
Anexo 2. Espectro DEPT-135 del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz).....	81
Anexo 3. Espectro RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz)	82
Anexo 4. Espectro RMN ^{13}C del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz)	83
Anexo 5. Ampliación espectro RMN ^{13}C del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz).....	84
Anexo 6. Espectro RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).....	85
Anexo 7. Ampliación espectro RMN ^{13}C del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz)	86
Anexo 8. Ampliación a campo alto del espectro RMN ^{13}C del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).....	87
Anexo 9. Ampliación a campo bajo del espectro RMN ^{13}C del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).....	88
Anexo 10. Ampliación a campo alto del espectro RMN ^1H de los compuestos IV y V (CDCl_3 , 270 MHz)	89
Anexo 11. Ampliación a campo bajo del espectro RMN ^1H de los compuestos IV y V (CDCl_3 , 270 MHz).....	90
Anexo 12. Ampliación del espectro RMN ^{13}C a campo alto de los compuestos IV y V (CDCl_3 , 270 MHz).....	91
Anexo 13. Ampliación del espectro RMN ^{13}C a campo bajo de los compuestos IV y V (CDCl_3 , 270 MHz).....	92

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
br s	Banda ancha
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CPP	Cromatografía de placa preparativa
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
EtOH	Etanol
g	Gramo (s).
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramo (s)
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro
p.a	Para análisis
R _f	Factor de retención
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protones
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
s	Singlete
t	Triplete
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas de los seres humanos.¹ El uso de las plantas con fines medicinales es una tradición muy antigua, que ha estado siempre presente en las culturas de los diversos pueblos. Siendo este un recurso alternativo con gran aceptación, sobre todo en pequeñas comunidades rurales. Las plantas son una fuente natural de una gran cantidad de compuestos químicos, que son biosintetizados con muchos fines, entre ellos, como protección contra los depredadores o para atraer a los polinizadores.²

La tradición de usar las plantas con fines medicinales, se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, gracias a los ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos que permiten explicar de forma racional el uso terapéutico de una planta. Hoy en día su estudio se ha convertido en un hecho científico universal que trasciende no sólo en beneficio de la salud, sino también en el sistema productivo y económico de un país.¹

Actualmente en muchos países el desarrollo de nuevas medicinas, depende entre 60% y el 80% del uso de plantas, de los cuales una parte importante corresponde a los extractos de la planta o de sus principios activos.³

Por lo tanto, el aislamiento y determinación estructural de sustancias orgánicas producidas por metabolismo secundario provenientes de las plantas, representan un importante fundamento para el desarrollo científico de la química de los productos naturales, así como la contribución a los avances en otras actividades

científicas y tecnológicas en el país. La diversidad estructural de sustancias orgánicas naturales aisladas de las plantas, ha recibido especial atención por parte de muchos investigadores⁴.

Se ha estimado que sólo el 5-15% de 250.000 especies se han investigado, dejando por fuera numerosos organismos de fuente natural, que contienen un significativo número de nuevas sustancias y son una fuente potencial para la obtención de productos naturales bioactivos, incluyendo, fuentes de materias primas para el desarrollo de nuevos medicamentos.⁴

Por todo lo expuesto, en la presente investigación se plantea, realizar el estudio fitoquímico de las hojas de *Croton malambo* Karst colectadas en Venezuela, para aislar de esta manera los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en ellas. Esto como parte de un estudio complementario de la especie, en contribución a la búsqueda de metabolitos bioactivos, ya que en estudios anteriores, de los extractos de la corteza de *C malambo*, se obtuvo resultados significativos al evaluar su actividad, antiinflamatoria y analgésica⁵. Sin embargo, si la corteza se corta en grandes áreas, el daño puede evitar que los nutrientes y el agua lleguen hasta arriba, provocando la muerte del árbol. Por lo tanto si del estudio fitoquímico de las hojas de *C. malambo*, se obtienen los mismos metabolitos, se puede evitar la muerte de la planta, ya que las hojas pueden ser restituidas, por la misma.

1. Antecedentes.

1.1. Familia Euphorbiaceae.

La familia Euphorbiaceae es la sexta familia de plantas con flores más diversas, conformada por aproximadamente 8000 especies agrupadas en 317 géneros; distribuidas sobre todo en las regiones tropical y subtropical del planeta. Las especies de esta familia se caracterizan por sus variaciones morfológicas, que van desde árboles, hasta arbustos, hierbas y lianas⁶.

La clasificación de la familia Euphorbiaceae, se ha hecho difícil debido a la variabilidad en la morfología, la genética y el gran tamaño de la familia. Según Webster (1975), ha habido varias clasificaciones de la familia, considerando que la clasificación de Müller de 1866 fue un hito en la clasificación de Euphorbiaceae⁷, debido a que fue el primero en utilizar las características filogenéticas coherentes que persistieron durante un largo período de tiempo. Usando la clasificación de Müller como base, Webster empleo estructuras filogenéticas como morfología del polen y la anatomía para crear una clasificación. Dividió la familia en cinco subfamilias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Phyllanthoideae y Oldfieldoideae. De acuerdo con esta clasificación, las primeras tres subfamilias se caracterizan por poseer un óvulo, mientras que las dos últimas subfamilias tienen dos óvulos⁸.

Entre las características más comunes de las Euphorbiaceae tenemos: hojas compuestas, palmeadas o simples; las flores unisexuales, están reunidas en espigas, racimos o ciatos; granos de polen con 2-3 núcleos y con distintos dibujos en la capa de exina; gineceo con 3-6 carpelos unidos, con estilos no divididos a

multífidos; óvulos solitarios o por pares en cada carpelo, anátropos y epítropos, crasinucelados con dos tegumentos; frutos generalmente capsulares y carpelos que se separan de una columnilla central en la dehiscencia; en cada carpelo una o dos semillas con tegumento externo, con o sin endospermo y a menudo carunculadas; embrión grande con amplios cotiledones⁹.

Muchas plantas de la familia Euphorbiaceae son bien conocidos en diferentes partes del mundo como tóxicas y / o medicinales¹⁰. Desde el punto de vista bioquímico es una familia muy diversa, que contiene alcaloides, glicósidos cianogénicos, ácidos grasos, glucosinolatos y terpenoides entre otros. Además algunas de sus especies contienen un látex de color lechoso. Actualmente, sus usos más frecuentes son en alimentación (tapioca) y en la producción de medicinas, venenos, aceites y grasas, ceras, gomas, caucho y componentes para pinturas, barnices y otros productos industriales⁹.

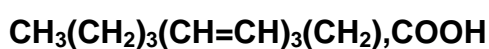
1.2. Principales compuestos químicos aislados de Euphorbiaceae.

1.2.1 Terpenoides.

En las 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 esteres (acetatos) o glicósidos. El látex de *Euphorbia* contiene mayormente triterpenos y sus esteres⁹.

1.2.2 Ácidos Grasos.

El aceite de las semillas de esta familia contiene ácidos grasos saturados e insaturados por ejemplo las semillas de *Trewia nudiflora* L. contienen ácido alfa-eleosteárico:



Ácido alfa-eleosteárico

El látex de *Euphorbia pulcherrima* Klotzsch contiene un ácido graso conjugado, el ácido deca-2, 4-dienoico, junto con sus cuatro isómeros⁹.

1.2.3 Sustancias fenólicas.

La familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles en forma de glicósidos y metilésteres. Algunos de los compuestos fenólicos detectados en diversas especies de esta familia son: a) cumarinas en *Euphorbia lathyris* y *Ricinus communis*, b) taninos hidrolizables en *Euphorbia macuiata* L., *Gleditsia japónica* Miq. c) fenantrenos y quinonas en *Euphorbia pulcherrima* y *Hevea brasiliensis* y d) ácidos fenólicos en *Ricinus communis*⁹.

1.2.4 Alcaloides.

Se han detectado diversas clases de alcaloides, que se encuentran principalmente en los géneros *Croton*, *Phyllanthus* y *Securinega*. 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*⁹.

1.3. Genero *Croton*.

El género *Croton*, es el segundo más grande y diverso de la familia Euphorbiaceae, y se compone de alrededor de 1.300 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales, con una importante concentración en América y África (figura 1). Muchas especies de *Croton* se desarrollan, hasta en lugares como, carreteras, ríos y los claros del bosque. Estas y otras características ecológicas, como la producción en masa de flores y frutos durante la mayor parte del año, hacen de este género candidatos ideales para la restauración de bosques degradados¹¹.

El género *Croton* incluye desde hierbas a árboles, con variadas formas de hojas, exudado generalmente coloreado, indumento de pelos estrellados o lepidotas en toda la planta, generalmente con glándulas en la base de la lámina y/o sobre el pecíolo, flores femeninas generalmente con pétalos reducidos o ausentes, ovario generalmente tri carpelar, con un óvulo por lóculo¹².

Muchas especies de este género se han utilizado en América del Sur como medicina popular para el tratamiento de heridas, inflamación, cáncer, para el tratamiento del dolor y para trastornos del sistema digestivo¹³. Los estudios

realizados en especies de *Croton* han reportado la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides y triterpenoides, saponinas y taninos.¹⁴



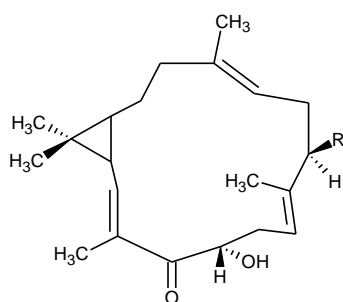
Figura 1. Mapa de distribución a nivel mundial del género *Croton*¹⁴

Dentro de estos estudios un amplio proyecto que involucra el estudio farmacológico y fitoquímico de especies de este género presentes en Venezuela, se ha desarrollado en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de nuestra Universidad bajo la dirección de la Profesora Suárez. Dado que en trabajos anteriores de este grupo de investigación se han detallado ampliamente los estudios del género,¹⁵⁻¹⁶ concretamos nuestros antecedentes a las investigaciones reportadas a partir del año 2008.

A continuación una revisión de los metabolitos secundarios aislados en estudios fitoquímicos realizados desde el 2008 en varias especies del género *Croton* a nivel mundial.

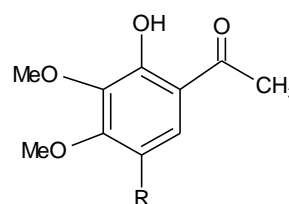
1.3.1. *Croton nepetaefolius* Baill.

Es una planta aromática endémica del noreste de Brasil. Esta especie es ampliamente utilizada en la medicina popular como estomáquico, carminativo y en el tratamiento del cólico intestinal. Del estudio fitoquímico del extracto etanólico de los tallos de esta planta, se aislaron los diterpenos 1,4-dihidroxi-2E, 6E, 12E-trien-5-ona casbena (**1**) y 4-hidroxi-2E, 6E, 12E-trien-5-ona-casbena (**2**). También se aislaron la 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona (**3**), 2-hidroxi-3, 4, 6-trimetoxiacetofenona (**4**) y los esteroides 3-O-β-D-gluco-piranosilsitosterol (**5**), β-sitosterol (**6**) y el estigmasterol (**7**).²



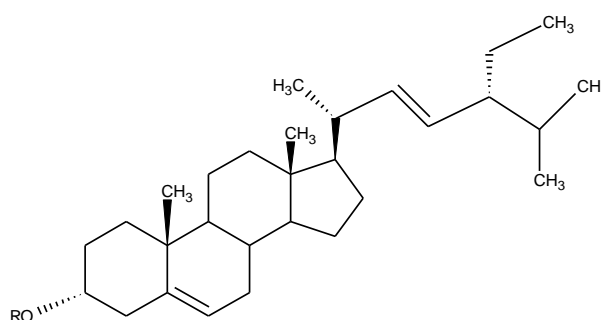
(1) R = OH

(2) R = H



(3) R = H

(4) R = OMe



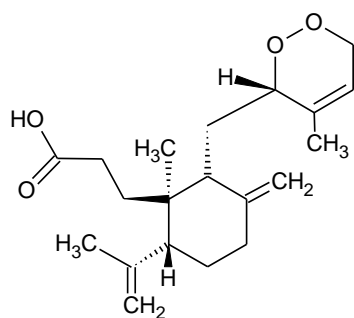
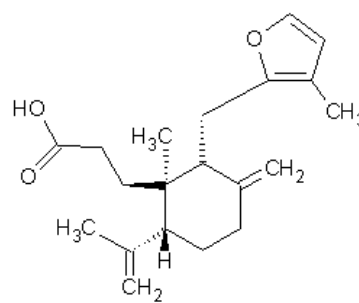
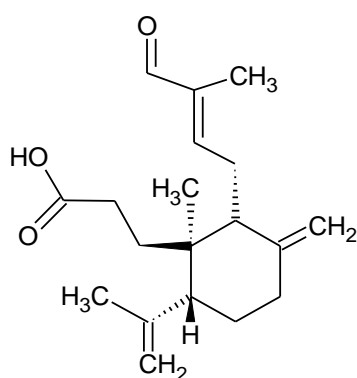
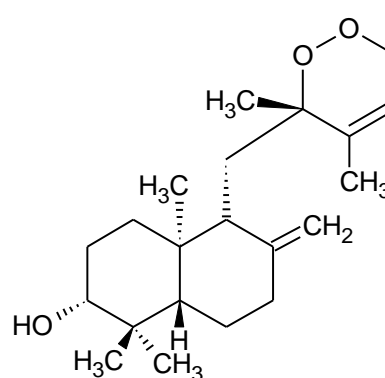
(5) R = 3-O-β-D-Glicopiranosil

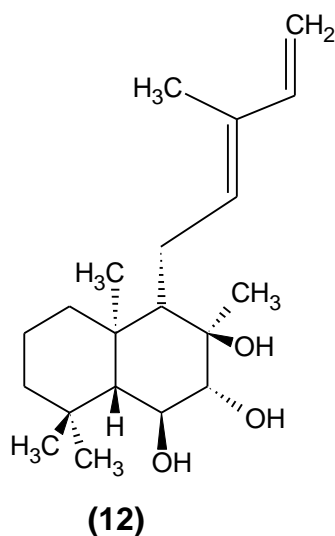
(6) R = H, 22 23- dihidro

(7) R = H, Δ²²⁻²³

1.3.2. *Croton stipuliformis* bark

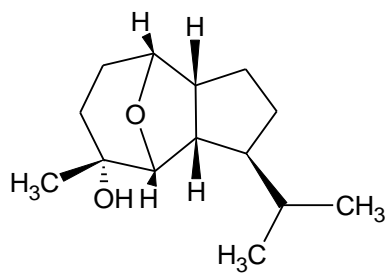
Es una especie nativa de Colombia conocida como "guacamayo", es un árbol de 10-20 m de altura que crece en altitudes desde 1300-1800 m en Los Andes colombianos. En esa región, esta planta es reconocida por la producción de segregados que se utilizan para curar úlceras de estómago. A partir de un extracto metanólico de las hojas- de *Croton stipuliformis*, se aislaron tres diterpenos del tipo ent-3,4-seco-labdano (**8-10**), junto con ent-labdano (**11**), 6-hidroxinidorelol (**12**), y sitosterol (**6**).¹⁷

**(8)****(9)****(10)****(11)**

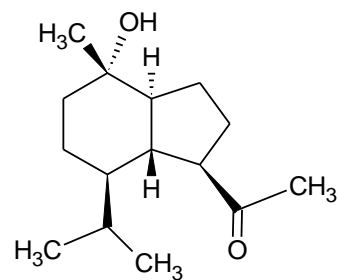


1.3.3. *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook.

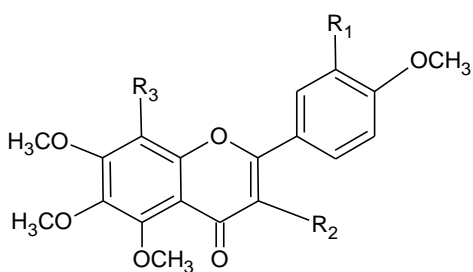
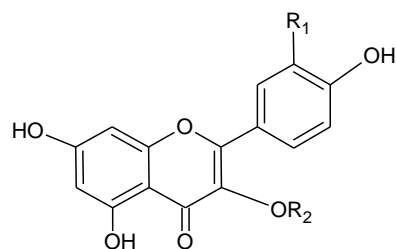
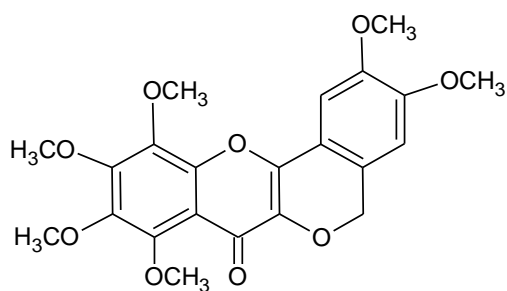
Es un arbusto trepado que se encuentra en matorrales. El tallo de esta planta se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la artritis, la malaria, es utilizado en China para aliviar el dolor y para el tratamiento de enfermedades del estómago. A partir del estudio fitoquímico de los tallos de la planta *Croton caudatus* Geisel, se aisló por primera vez el sesquiterpeno crocaudatol (**13**), junto con la oplopanona (**14**).¹³ En otro trabajo de los tallos de la planta a partir del extracto etanólico, también se aislaron los compuestos conocidos: 3,5,6,7,8,3', 4'-heptametoxiflavona (**15**), tangeretina (**16**), nobiletina (**17**), 5,6,7,4' - tetrametoxiflavona (**18**), sinensetina (**19**), kaempferol (**20**), tilirosido (**21**), kaempferol-3 O-rutinosido (**22**), la rutina (**23**) y una flavona, llamada crotoncaudatin (**24**).¹⁸



(13)



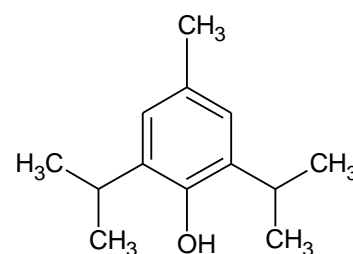
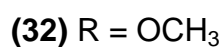
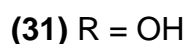
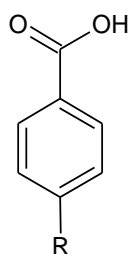
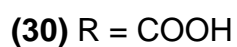
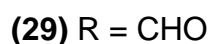
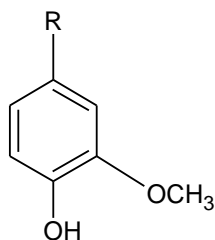
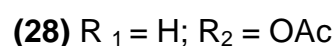
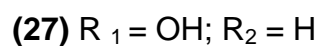
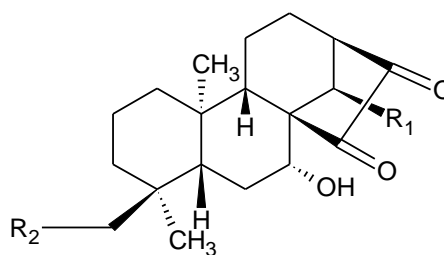
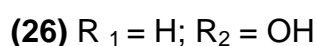
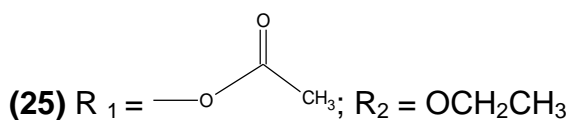
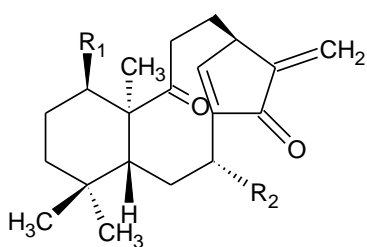
(14)

(15) = $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$ (16) = $R_1 = R_2 = \text{H}; R_3 = \text{OCH}_3$ (17) = $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{H}$ (18) = $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ (19) = $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = R_3 = \text{H}$ (20) = $R_1 = R_2 = \text{H}$ (21) = $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{Glu-6-O-E-Coumaroil}$ (22) = $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{Rutinosyl}$ (23) = $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{Rutinosyl}$ 

(24)

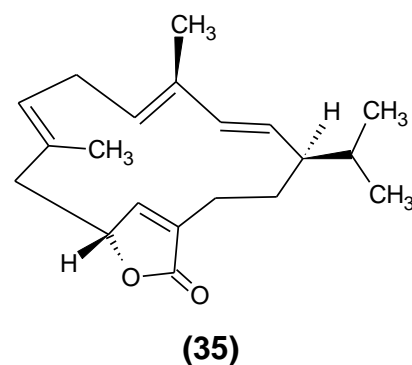
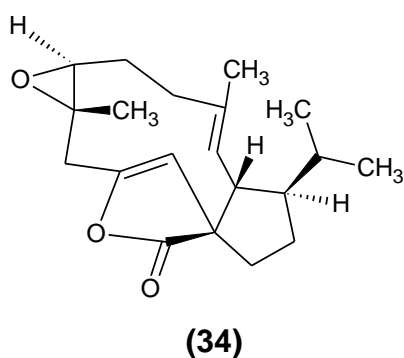
1.3.4. *Croton kongensis* Gagnep.

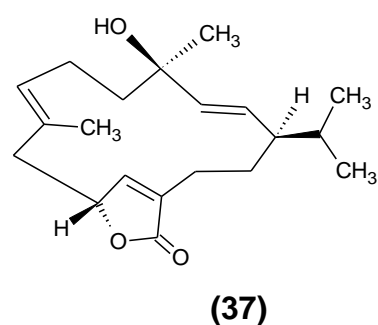
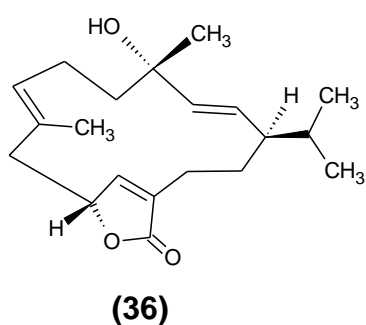
Es una planta, de China conocida como “Ba-duo”, que es utilizada con frecuencia en la medicina popular para tratar la dismenorrea. Del extracto etanólico de las hojas secas de la planta se aisló un diterpeno, el ent-8,9-secokaurano (**25**), junto con los compuestos rabdumbrosanin (**26**), ent-(7 α , 14 β)-7,14-dihidroxi-ent-kaur-16-en-15-ona (**27**), ent-7 β -hidroxi-15-oxokaur-16-en-18-il-acetato (**28**), vainillina (**29**), ácido vanílico (**30**), el ácido 4-hidroxi-benzoico (**31**), ácido 4-metoxi-benzoico (**32**), 2, 6-di terc-butil-4-metil-fenol (**33**).¹⁹



1.3.5. *Croton gratissimus* Burch.

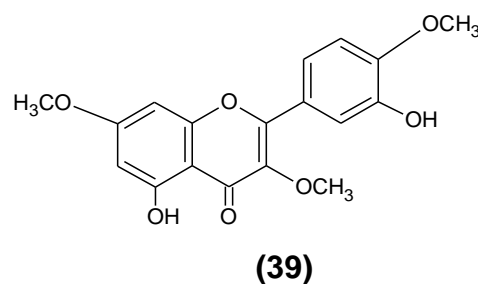
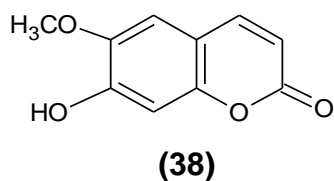
Es un árbol de hoja semi caduca y está muy extendido en el África, se produce en mayor parte en las laderas pedregosas o rocosas de las regiones más cálidas y secas, del noreste de Sudáfrica. Las hojas producen un agradable aroma de lavanda. Las tribus zulúes usan infusiones de la leche de la corteza como purgante y para trastornos estomacales e intestinales, a pesar de ser tóxico. Mientras los zimbabuenses usan el humo de las hojas para tratar la tos, y toman infusiones de la raíz para los dolores abdominales y como afrodisíaco. A partir de la corteza del tallo de *Croton gratissimus* Burch, de los extractos de hexano y diclorometano se aislaron los compuestos: (+)-[1R*, 2S*, 7S*, 8S*, 12R*] - 7,8-epoxi - 2,12-ciclocembra-3E,10Z-dien-20,10-olida (**34**); (+)-[1R*, 10R*]-4-cembra- 2E, 4E, 7E, 11Z-tetraen-20, 10-olide (**35**); (+)-[1R*, 4S*, 10R*] -4-hidroxicembra-2E, 7E, 11Z-trien- 20, 10-olide (**36**); (-)-[1R*, 4R*, 10R*] -4-hidroxicembra-2E, 7E ,11- Z-trien-20, 10-olide (**37**)²⁰





1.3.6. *Croton adenocalyx* Baill

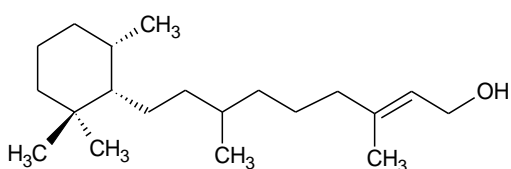
Es una planta representativa de Brasil. La purificación de la fracción de hexano, obtenido a partir del extracto etanólico de la corteza del tronco de *Croton adenocalyx* Baill, dio como resultado el aislamiento de la 6-metoxi-7-hidroxicumarina (38) y el flavonoide 3',5-dihidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona (39)¹⁰



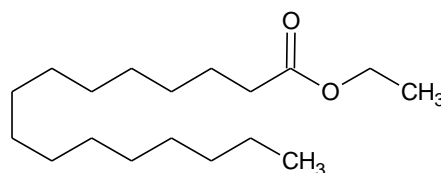
1.3.7. *Croton funcianus* Müll.

Es un árbol de 3-5 m de altura, muy ramificado que se encuentra distribuido en Venezuela y Colombia. A partir del estudio fitoquímico del extracto etanólico de hojas senescentes frescas se aislaron e identificaron los compuestos: cassipourol

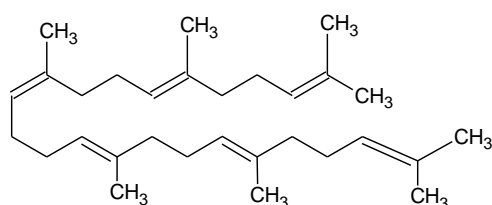
(40), el hexadecanoato de etilo (41), el 2, 6,10,14,18,22-tetracosahexaeno (42), el d- α -tocoferol (43), la quercetina (44) y la quercitrina (45).¹⁴



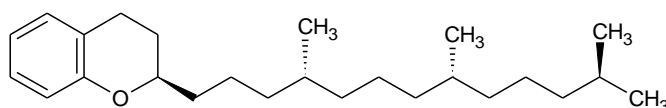
(40)



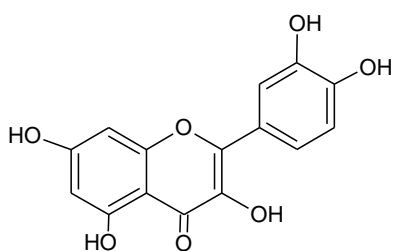
(41)



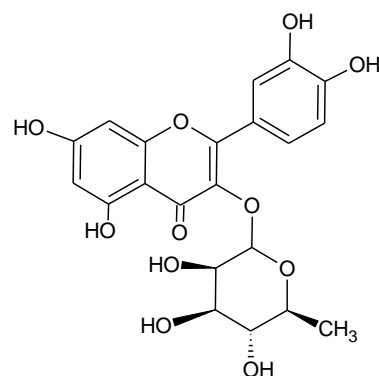
(42)



(43)

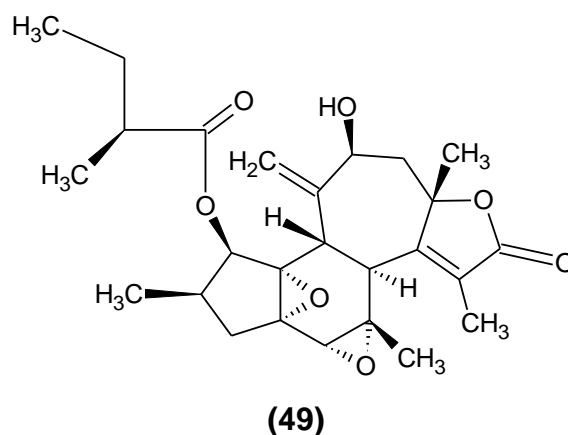


(44)



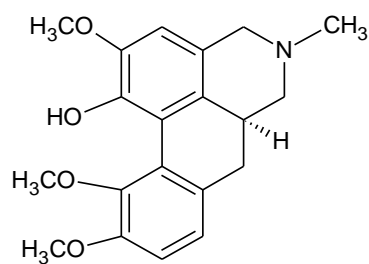
(45)

Otro trabajo, condujo al aislamiento de un diterpenoide tipo crotofolano (**49**).²³

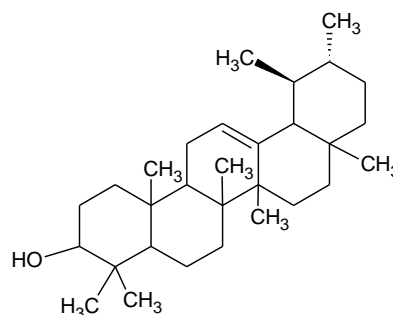


1.3.9. *Croton macrobothrys* Baill.

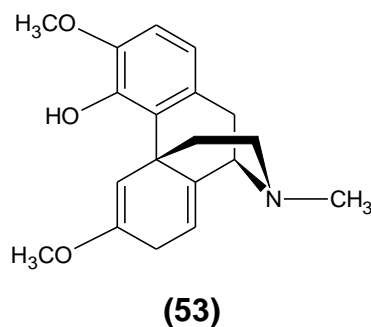
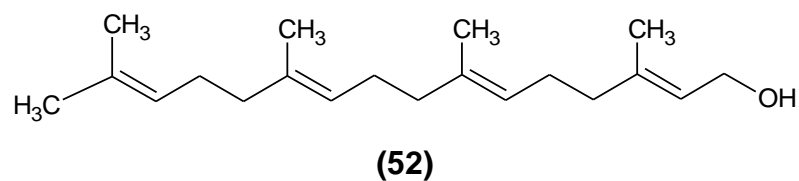
Es un árbol que se encuentra en Brasil, conocido popularmente como la “sangre de dragón”, “pau-sangue” y “sangue de drago”. A partir del estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de la especie, se aisló e identificó el alcaloide coridina (**50**), el esteroide β -sitosterol (**6**), el triterpeno β -amirina (**51**), así como el geranilgeraniol (**52**) y la salutaridina (**53**). Compuestos que ya eran conocidos para el género *Croton*.²⁴



(50)

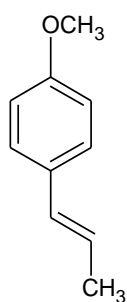


(51)

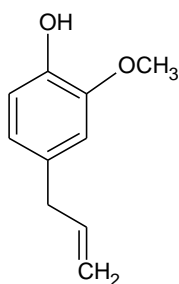


1.3.10. *Croton zehntneri* Pax and Hoffman.

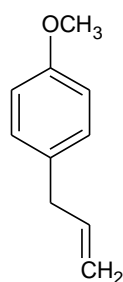
Es una planta aromática nativa de la región nororiental de Brasil, y es popularmente conocido como “canela de cunha”. Esta especie es utilizada en la medicina tradicional como sedante, estimulante del apetito, antianoréxico y para el alivio de trastornos gastrointestinales. De los aceites esenciales de las hojas, tallos y raíces se han aislado los compuestos mayoritarios: E-anetol (**54**), eugenol (**55**), estragol (**56**), Z-metil isoeugenol (**57**) y el E-metil isoeugenol (**58**).²⁵ Por otro lado, en otra investigación a la misma especie, específicamente de las raíces de la planta de *Croton Zehntneri*, se aisló el compuesto crototropona (3-hidroxi-5,6-dimetoxi-2-metilciclohepta-2, 4,6-trienona) (**59**).²⁶



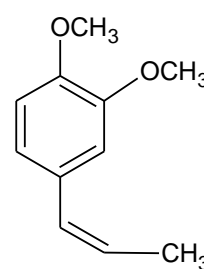
(54)



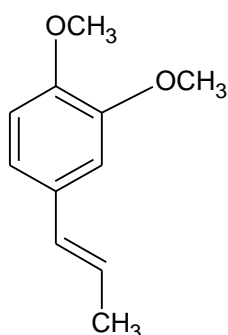
(55)



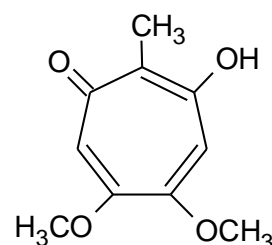
(56)



(57)



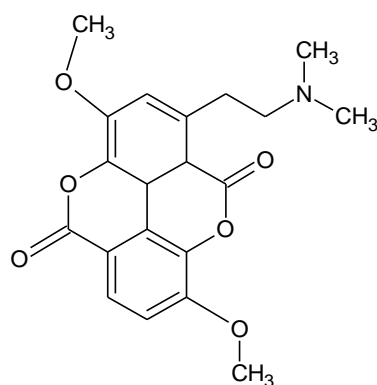
(58)



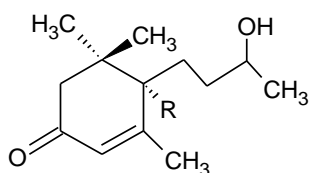
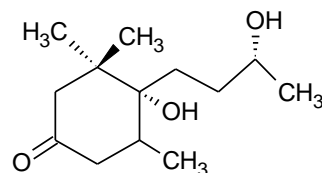
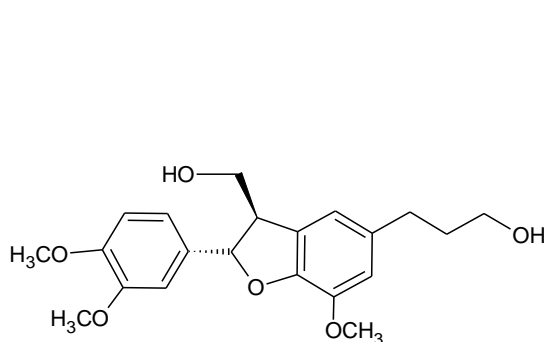
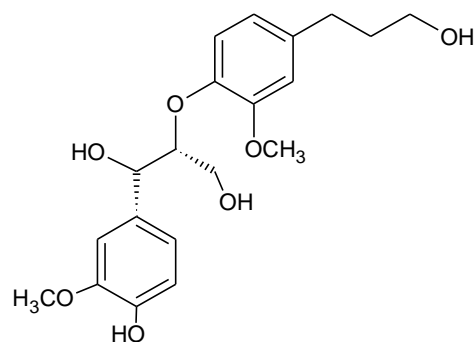
(59)

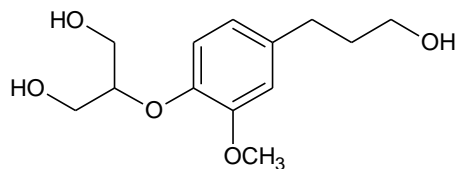
1.3.11. *Croton lechleri* Mull. Arg.

Es una planta medicinal que produce una savia roja, esta especie es conocida tradicionalmente como “Sangre de Drago”. La savia se obtiene al tallar la corteza de las plantas que tienen dos, tres o más años de vida. Nativos amazónicos utilizan esta savia para tratar varias enfermedades como la cicatrización de heridas, enfermedades gastrointestinales y también el cáncer. 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 es la taspina (60) un alcaloide que se encuentra en la savia de los árboles maduros, el cual presenta buenas propiedades de curación de heridas.²⁷

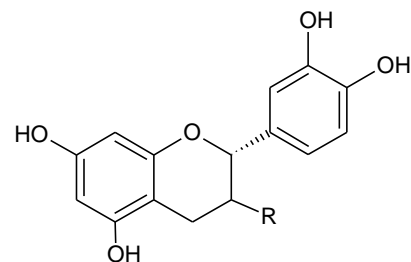
**(60)**

En otra investigación de la savia de *Croton lechleri* Mull. Arg fueron aislados e identificados tres megastimanos (**61-63**), tres lignanos (**64-66**), cuatro 3-flavonoles (**67-70**), tres fenilpropanoides (**71-73**) y un clerodano (**74**).²⁸

**(61)** R = OH**(62)** R = H**(63)** R = 4,5 dihidroxiblumenol**(64)** 3', 4-O-dimetilcedrusin**(65)** (±)-Eritro-guaiacil-glicerol-
-O-4'-dihidroconiferil éter

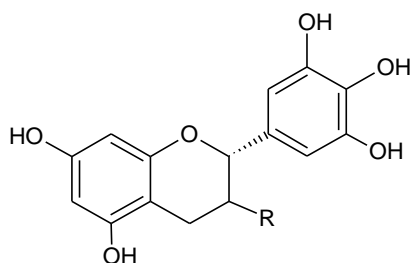


(66) 2-[4-(3-hidroxiampil)-2-metoxifenoxi]-
propano-1,3- diol



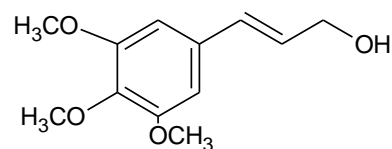
(67) R =OH

(68) R = OH

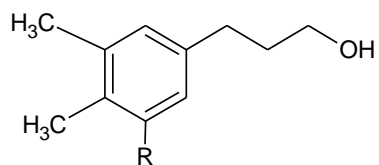


(69) R =OH

(70) R = OH

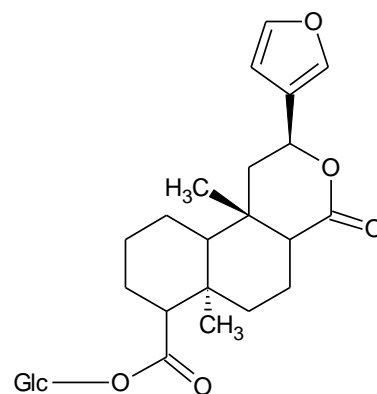


(71) alcohol trans-3,4,5-
trimetoxi-cinamico.



(72) R = H

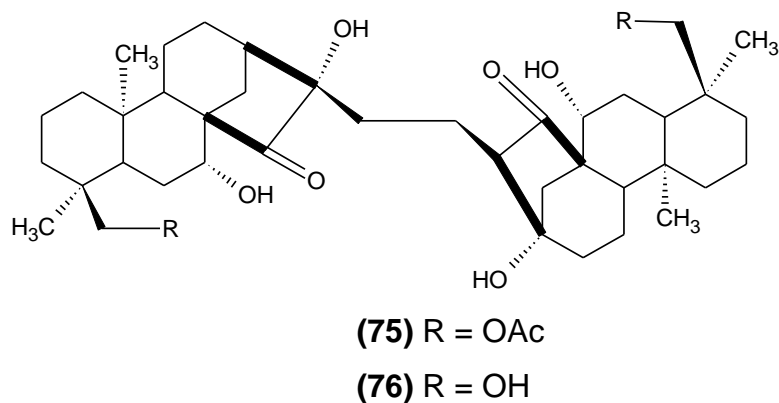
(73) R = OCH₃



(74) glucósido del ácido
floribundico

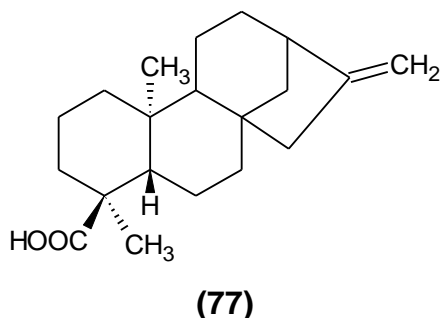
1.3.12. *Croton tonkinensis* Gagnep.

Es un arbusto nativo del norte de Vietnam, es utilizado tradicionalmente para tratar quemaduras, dolor abdominal, y úlceras gástricas. A partir de las hojas de la planta *Croton tonkinensis*, se aislaron por primera vez, dímeros de diterpenos del tipo ent-kaurano, **(75-76)**²⁹



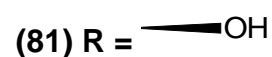
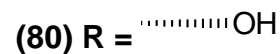
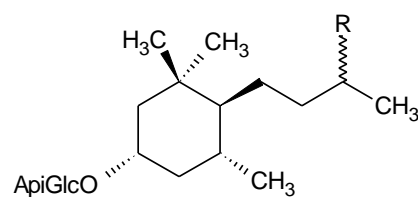
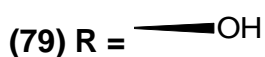
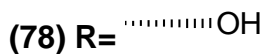
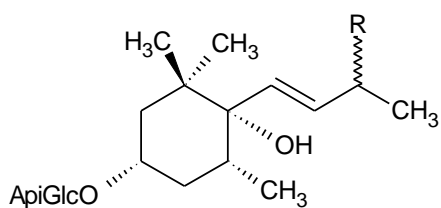
1.3.13. *Croton antisiphiliticus* Mart.

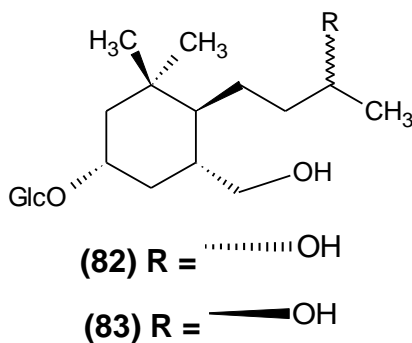
Se utiliza tradicionalmente por las poblaciones que habitan en el Cerrado brasileño para tratar la sífilis, inflamación, infecciones genitales. El fraccionamiento del extracto de cloroformo de la raíz de *Croton antisiphiliticus* dio como resultado el aislamiento de un compuesto, que se identificó como ácido ent-kaur-16-en-18-oico **(77)**.³⁰



I.3.14. *Croton oblongifolius* Roxburgh

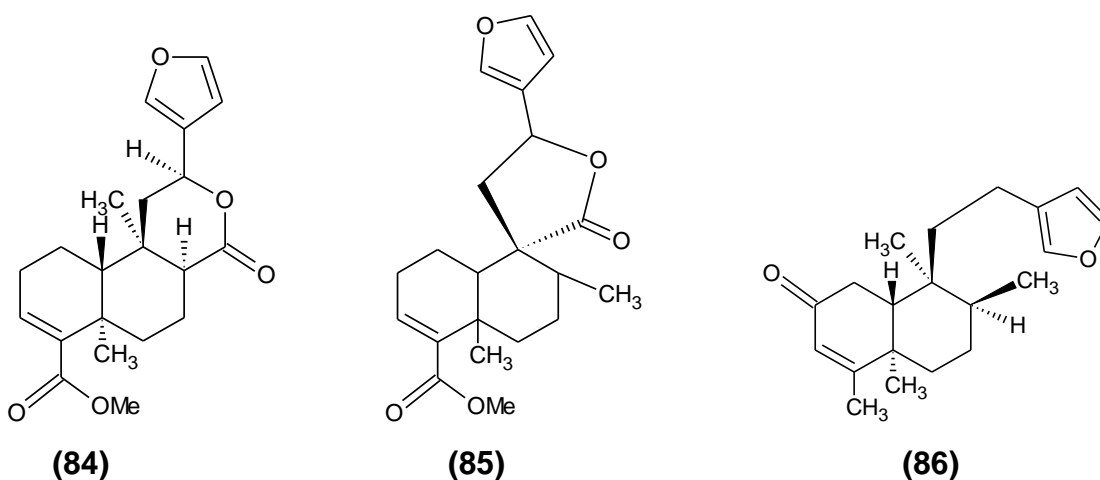
Es un árbol de unos 8 m de altura que crece en forma silvestre en las zonas pantropical asiáticas, como Tailandia, Myanmar e Indonesia. Las flores de esta especie se usan como antihelmíntico, su fruto, macerado con 28 a 40% de alcohol, como oxitocina para el post-parto, y su corteza o las hojas como un antidiarreico. .A partir del extracto metanólico de las hojas de *Croton oblongifolius* Roxburgh, que se recogió en Chiang Mai, en Tailandia, se aislaron seis glucósidos megastigmano, llamados oblongionosides (**78-83**).³¹

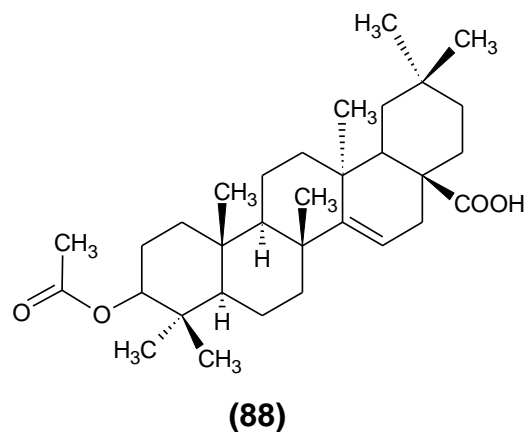
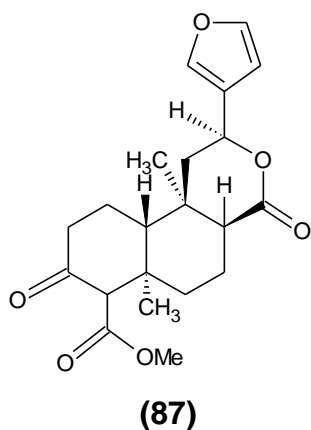




I.3.15. *Croton urucurana* Baillon.

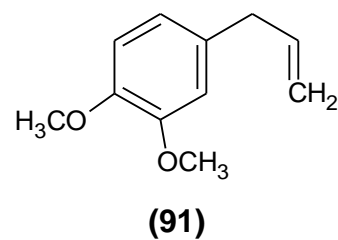
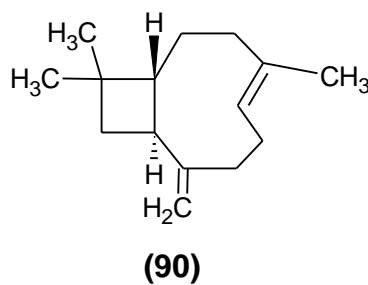
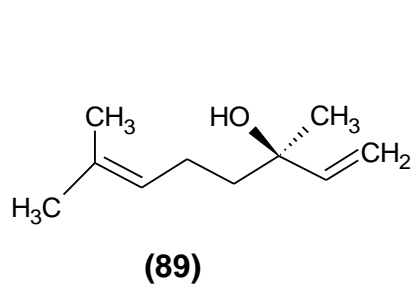
Es un árbol que se encuentra comúnmente en la región de Ciudad Dourados, de Brasil. Es ampliamente utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de heridas con infección y para acelerar la cicatrización. En estudios fitoquímicos de la corteza de *Croton urucurana*, se aislaron tres diterpenos clerodano y se identificaron como: metil 12-epibarbascoata (**84**), sonderianin (**85**) y 15,16-epoxiclerodan-3,13,14-trien-2-ona (**86**), junto con los compuestos metil 3-oxo-12-epibarbascoate (**87**), ácido acetil aleuritólico (**88**), stigmasterol (**7**), β -sitosterol (**6**) y β -sitosterol-3-O-glucoside.³²

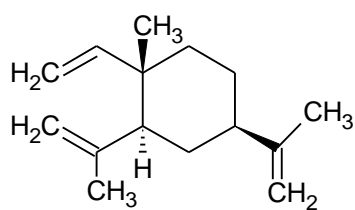




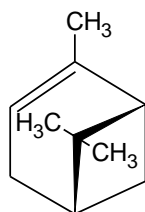
I.3.16. *Croton palanostigma* Klotzsch.

Es un árbol de tamaño mediano, nativo de la región amazónica, conocida como “Marmeleiro” y sangre de drago. A partir de los aceites esenciales de hojas, ramas, corteza del tronco y frutos de esta especie se aislaron los compuestos linalol (89), E-cariofileno (90), metileugenol (91), β -elemeno (92), α -pineno (93), limoneno (94), sabineno (95), β -pineno (96) y E-metilisoegenol(97).³³

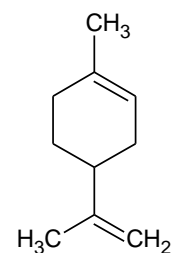




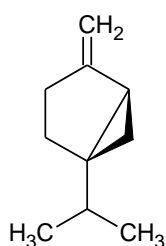
(92)



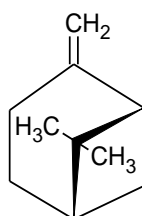
(93)



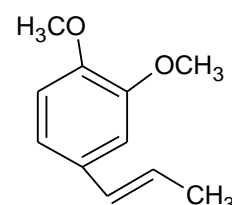
(94)



(95)



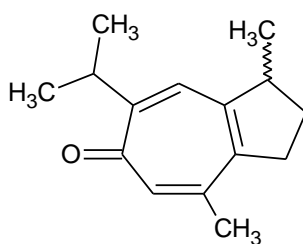
(96)



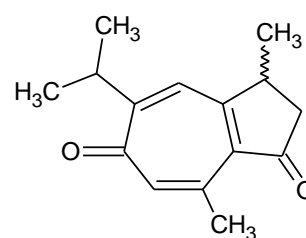
(97)

I.3.17. *Croton argyroglossum* Baill.

Comúnmente conocido como “Sacatinga”, es un arbusto que crece en el noreste de Brasil. De la corteza del tallo se aislaron dos derivados de tropeno. El primero de ellos, fue identificado como orobanona. **(98)**, y el segundo derivado se identificó como pernambucona **(99)**.³⁴



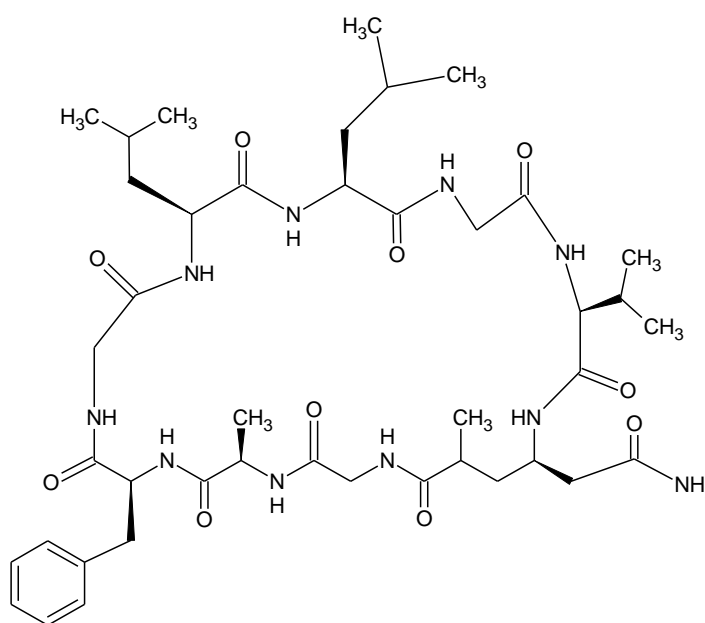
(98)



(99)

I.3.18. *Croton sparsiflorus* Morong.

Es un arbusto que crece en suelo arcilloso en Asia y América del Sur. A partir de la fracción de n-butanol de *Croton sparsiflorus*, se aisló un polipéptido cíclico llamado crotosparsamida (**100**), junto con el compuesto *p*-hidroxi- metilcinamato.³⁵

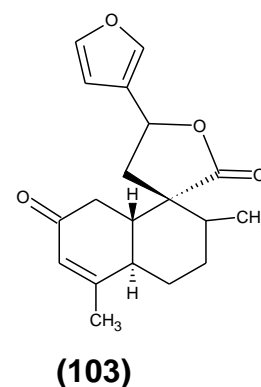
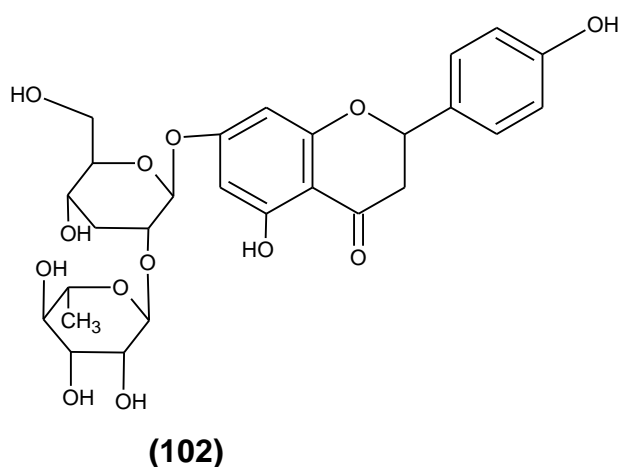
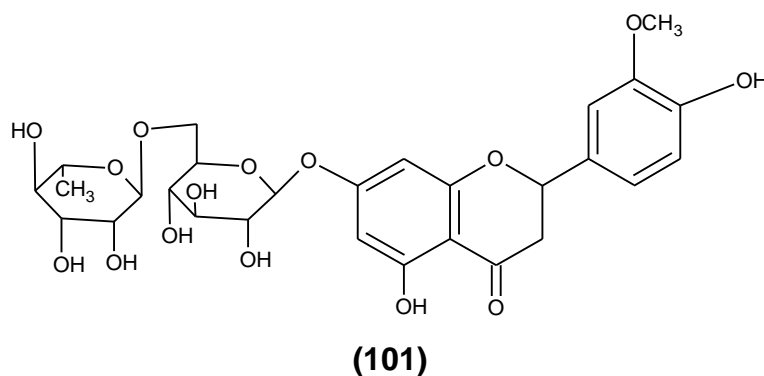


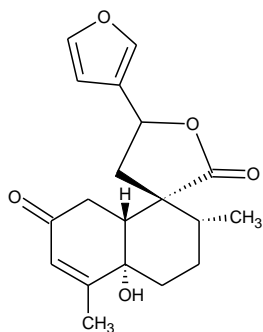
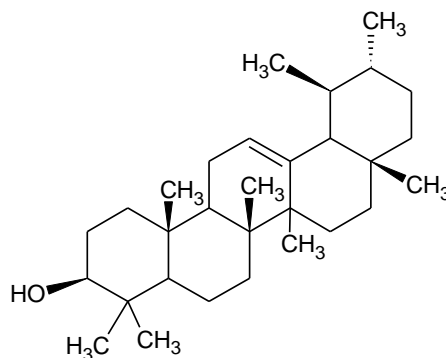
(100)

Como fue mencionado anteriormente, desde hace varios años se ha desarrollado en la Facultad de Farmacia un proyecto que incluye el estudio químico-farmacológico de varios géneros de la familia Euforbiaceae y más ampliamente se ha enfocado en el género *Croton*. Entre las especies estudiadas se encuentran: *C. cuneatus*; *C. huberi*; *C. matourensis*; *C. micans*; *C. gossypifolius*; *C. rodolens*; *C. pungens*; *C. hircinus*; *C. sucrensis*; *C. rhamnifolius*, *C. caracasana* y *C. malambo*. Mencionaremos a continuación los resultados más recientes obtenidos en nuestro grupo de investigación.

1.3.19. *Croton. matourensis* Aubl.

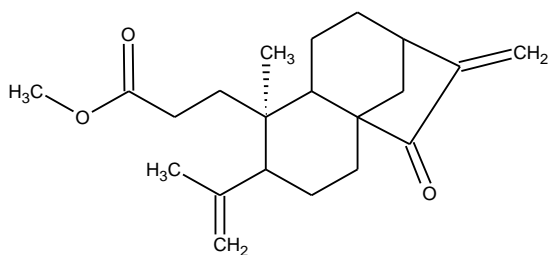
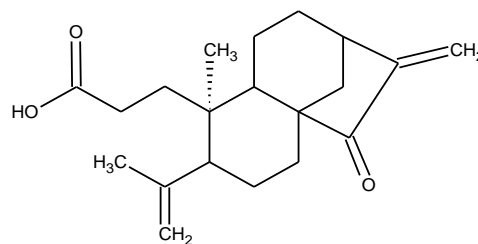
Es un árbol pequeño o mediano, se encuentra en Brasil, Guayana y Venezuela. En la investigación química de los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *Croton matourensis*, se aislaron e identificaron dos flavononas glucosiladas, hesperidina (**101**), naringina (**102**), dos diterpenos de tipo neoclerodano, trans-dehidrocrotonina (**103**) y 5 α -hidroxi-trans-dehidrocrotonina (**104**), el monoterpeno vainillina (**29**) y el triterpeno α -amirina (**105**)³⁶.

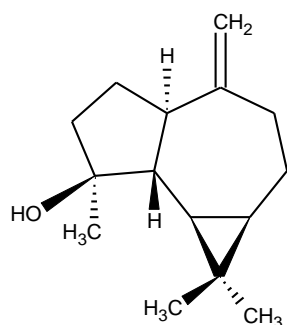
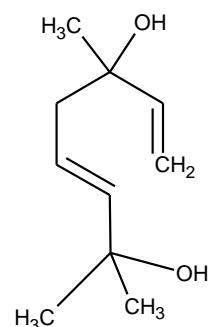


**(104)****(105)**

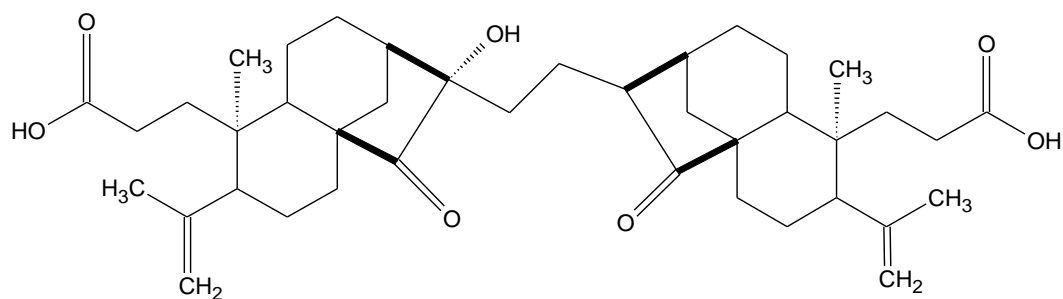
1.3.20. *Croton micans* Sw.

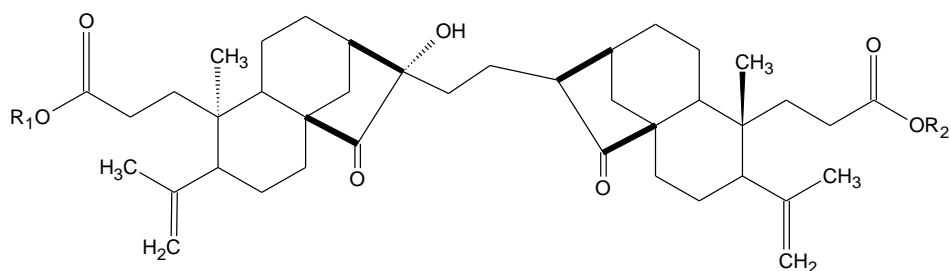
Es un arbusto que crece en la zona norte-costera de Venezuela. A partir del estudio fitoquímico de las flores de la especie, se aislaron e identificaron los compuestos: caracasina (**106**), ácido de caracasina (**107**), espatulenol (**108**), 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol (**109**), estigmasterol (**7**), β -sitosterol (**6**), tilirosido (**21**).¹⁶

**(106)****(107)**

**(108)****(109)**

En otra investigación a partir de los tallos de *Croton micans*, se aislaron e identificaron 5 dímeros del tipo 3,4-seco-ent-kaurene: el ácido micansinoico (**110**), ácido isomicansinoico (**111**) y el dimetil (**112**), el monometil (**113**) y el monoetil éster (**114**) del ácido micansinoico.³⁷

**(110)**



(111) $R_1 = R_2 = H$

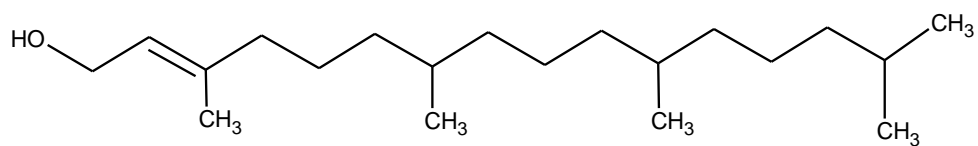
(112) $R_1 = R_2 = CH_3$

(113) $R_1 = H, R_2 = CH_3$

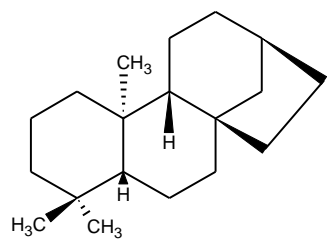
(114) $R_1 = H, R_2 = Et$

1.3.21. *Croton pungens* Jacq.

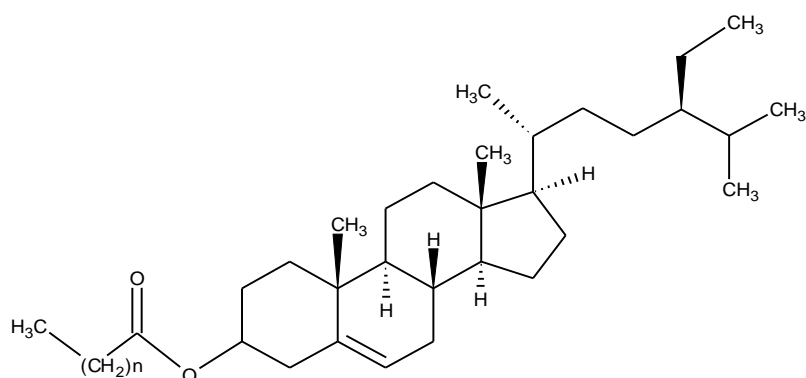
Esta planta es nativa de Venezuela y a partir del estudio fitoquímico de los extractos apolares de esta especie se aisló el fitol (115), nor-kaurano (116), β -sitosterol (6) y un ester de β -sitosterol (117).³⁸



(115)



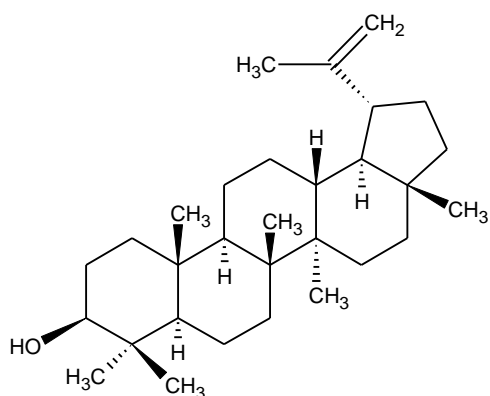
(116)



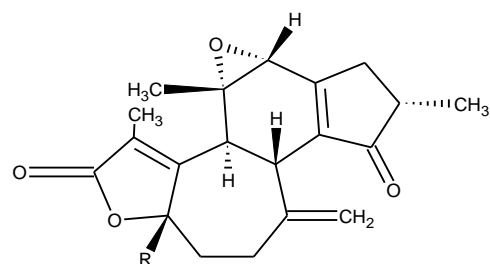
(117)

1.3.22. *Croton caracasana* Pittier.

Es un arbusto que crece en el norte de Venezuela. Del estudio fitoquímico de los tallos y de las hojas de *Croton caracasana* Pittier se aislaron los compuestos lupeol (118), crotofolin (119), crotocarasin A, B, C, D (120-123), y 5-hidroxi-3, 7, 8, 3', 4'-pentametoxiflavona (124).¹⁵

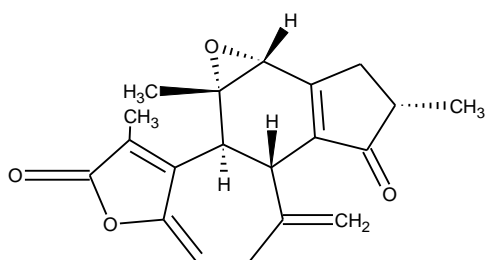


(118)

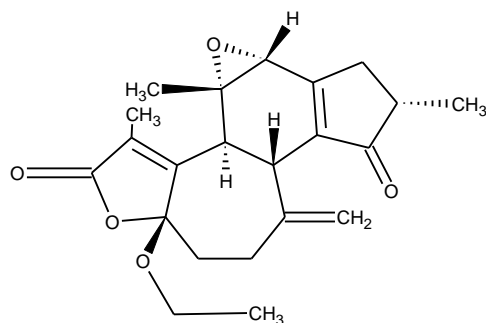


(119) R = H

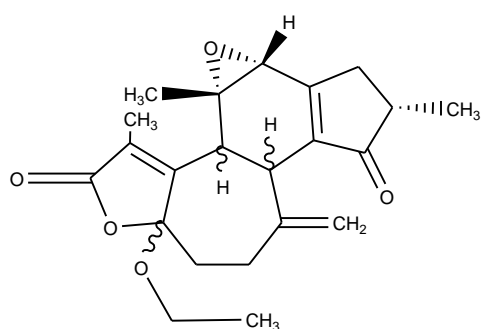
(120) R = OH



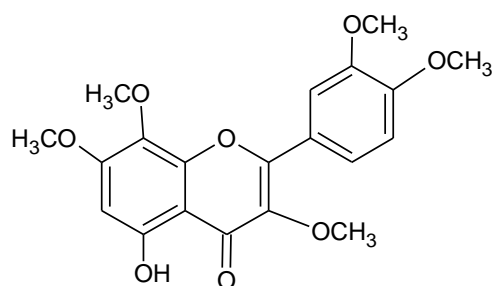
(121)



(122)



(123)

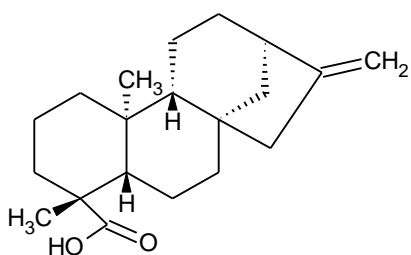
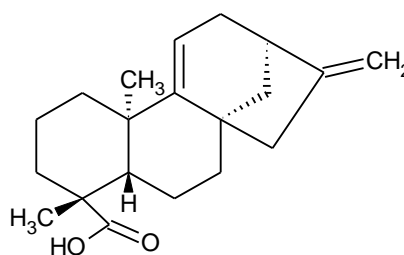
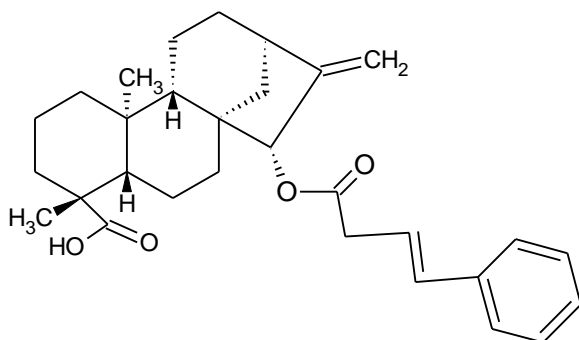
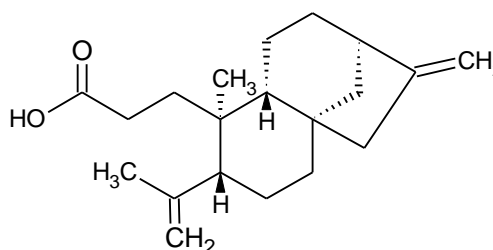


(124)

1.3.23. *Croton gossypifolius* Vahl.

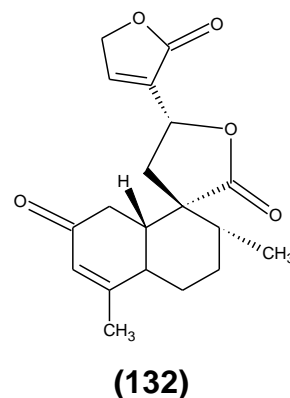
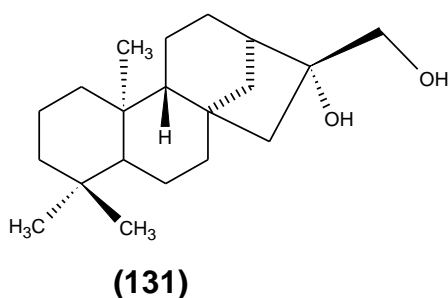
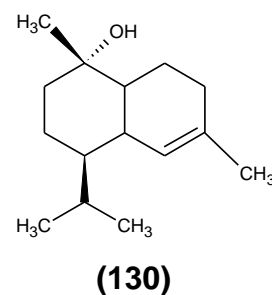
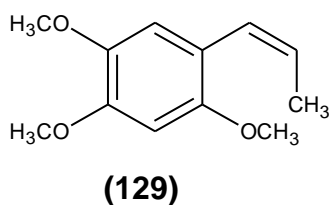
Es un árbol que crece en el norte de Venezuela, y es utilizada en la medicina popular para la curación de heridas y en el tratamiento de la sífilis. En el aceite esencial de las hojas de *Croton gossypifolius* Vahl, se identificaron 51 compuestos, entre los mayoritarios se tienen: óxido de α -cedreno (18,6%), spatulenol (16,3%), valenceno (5,8%), geranilo-pentanoato de etilo (5,3%), α -cadinol (4,0%), germacreno D (3,5%) y longifoleno (3,3%).³⁹

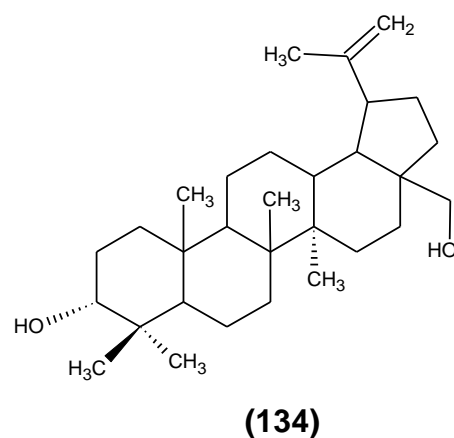
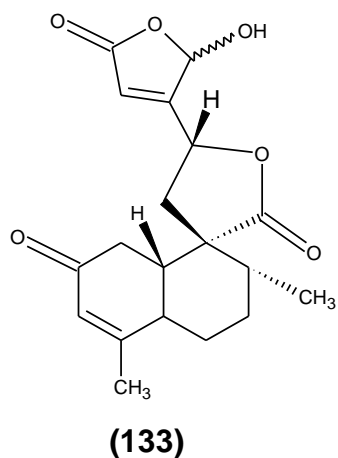
En un estudio fitoquímico realizado en la corteza de *Croton gossypiifolius* Vahl, fueron aislados tres diterpenos de tipo ent-kaurano: ácido ent-kaurenoico (**125**), ácido grandiflorénico (**126**), ácido ent-15 β -E-cinamoil-kaurenoico (**127**), un 3,4-seco-ent-kaureno conocido como 7-desoxo-geayina (**128**), el flavonoide quercitrina (**45**) y ácidos grasos donde el palmítico resultó ser el mayoritario⁴⁰.

**(125)****(126)****(127)****(128)**

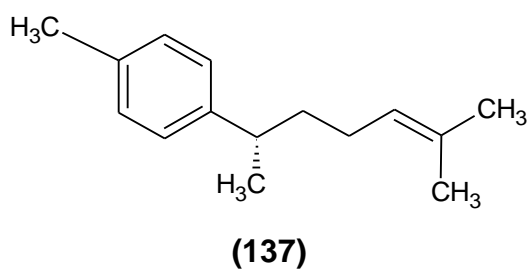
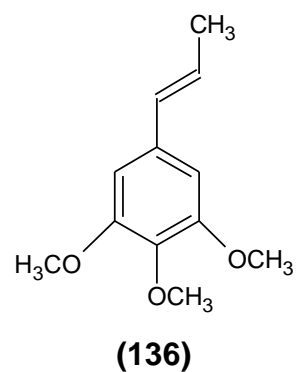
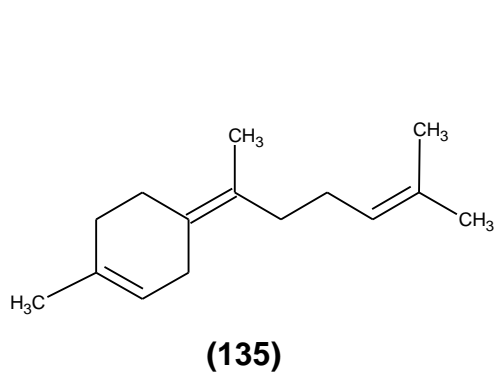
1.3.24. *Croton malambo* Karst.

Es un pequeño árbol que crece en la región oeste de Venezuela y en la parte norte de Colombia, que se conoce como “palomatías”, “torco” y “cáscara de lombrices”. Una infusión de la corteza de palomatías es utilizada ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades tales como: la diabetes, diarreas, reumatismo, úlceras gástricas, y como un agente antiinflamatorio y analgésico⁵. En estudios fitoquímicos realizados a la corteza de *Croton malambo* se aislaron un total de 10 compuestos de tipo terpénico, metil-eugenol (**91**), isoelimicina (**129**), δ -cadinol (**130**), $16\beta,17\alpha$ -diolentkaurano (**131**), T-dehidrocrotonina (**103**), cajucarinolido (**132**), isocajucarinolido (**133**), lupeol (**118**), betulin (**134**), estigmasterol (**7**), de este estudio se demostró que el extracto acuoso tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios significativos.⁴¹





En otro estudio realizado, se determinó la composición del aceite esencial de esta planta por medio de un análisis GC-MS, caracterizando como compuestos mayoritarios al metil-eugenol (**91**), γ -bisaboleno (**135**), isoelemicina (**136**), γ -curcumeno (**137**), junto con otros constituyentes minoritarios que fueron identificados. El aceite presenta importante actividad antibacteriana.⁴²



Un compuesto aislado de la corteza de *Croton malambo*, con interesante actividad farmacológica es el 16 β ,17 α -diolentkaurano (**131**), el cual es un compuesto de tipo diterpeno que se encuentran comúnmente en las especies de plantas, especialmente de la familia Euphorbiaceae. Muchos compuestos kaurenos han demostrado tener una amplia gama de propiedades biológicas, incluyendo la citotoxicidad contra diferentes tipos de cáncer. En una investigación realizada al ent-16 β -17 α -diolkaurano, se determinó que es un compuesto con muy buena actividad citotóxica, cuyo mecanismo de acción es vía apoptótica⁴³.

2. JUSTIFICACIÓN

Dados los interesantes resultados obtenidos en el estudio químico y farmacológico de la corteza de *Croton malambo*, se ha propuesto caracterizar los compuestos químicos presentes en sus hojas, ya que ellas representan el material que la planta puede rápidamente reproducir sin causar el daño que implica la tala de su corteza. De encontrarse los mismos resultados, esta planta pudiera ser considerada como una planta con potencialidad para ser administrada de manera segura con propósitos terapéuticos en humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

- Extraer, caracterizar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de la planta *Croton malambo* Karst.

3.2. Objetivos específicos:

- Obtener el extracto metanólico a partir del macerado de las hojas de la planta *Croton malambo* Karst.
- Separar el extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo*, en fracciones de hexano, cloroformo, acetato de etilo y el extracto acuoso para su estudio fitoquímico.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones de hexano, cloroformo, acetato de etilo y acuoso del extracto metanólico de las hojas de la planta de *Crotón malambo*
- Caracterizar e identificar los compuestos mayoritarios aislados del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo* mediante las técnicas espectroscópicas de RMN¹H, RMN¹³C y espectrometría de masas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Equipos

- Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Facultad de Farmacia UCV).
- Rotaevaporador BUCHI B-480
- Rotaevaporador Cole-Parmer.
- Lámpara de UV multibanda 254/365 modelo UVGL-25.
- Balanza analítica METTLER PC 2000.
- Balanza analítica OHAUS.
- Estufa Memmert.

4.2. Materiales.

4.2.1 Solventes.

- Metanol (MeOH) grado p.a Aldrich
- n-hexano grado p.a Aldrich
- Diclorometano (CH₂Cl₂) grado p.a Aldrich.
- Acetato de etilo (AcOEt) grado técnico, destilado.
- Cloroformo (CHCl₃) grado p.a Aldrich.
- Ciclohexano grado p.a Analar.
- Heptano grado p.a Burdick & Jackson.

4.2.2. Solventes para el análisis de RMN.

- Cloroformo deuterado (CDCl₃). Grado p.a Aldrich.

4.2.3. Materiales para Cromatografía.

- Silica gel G60 para cromatografía en columna (CC) 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- Placas de silica gel 60 para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagal ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20x20 cm, 0,20 mm de espesor.
- Placas Preparativas de silica gel 60. F₂₅₄, 20x20 cm, 0,2mm de espesor. MERK.
- TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄. Cromatografía de capa fina fase reversa. Hojas de aluminio 20x20 cm.

4.2.4 Reveladores.

- p-anisaldehído, se preparó mezclando 5mL de p-anisaldehído con 90 mL de etanol (EtOH), 5mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y 1 mL de ácido acético (CH₃COOH).

4.3. Procedimiento experimental.

4.3.1. Colecta del material vegetal.

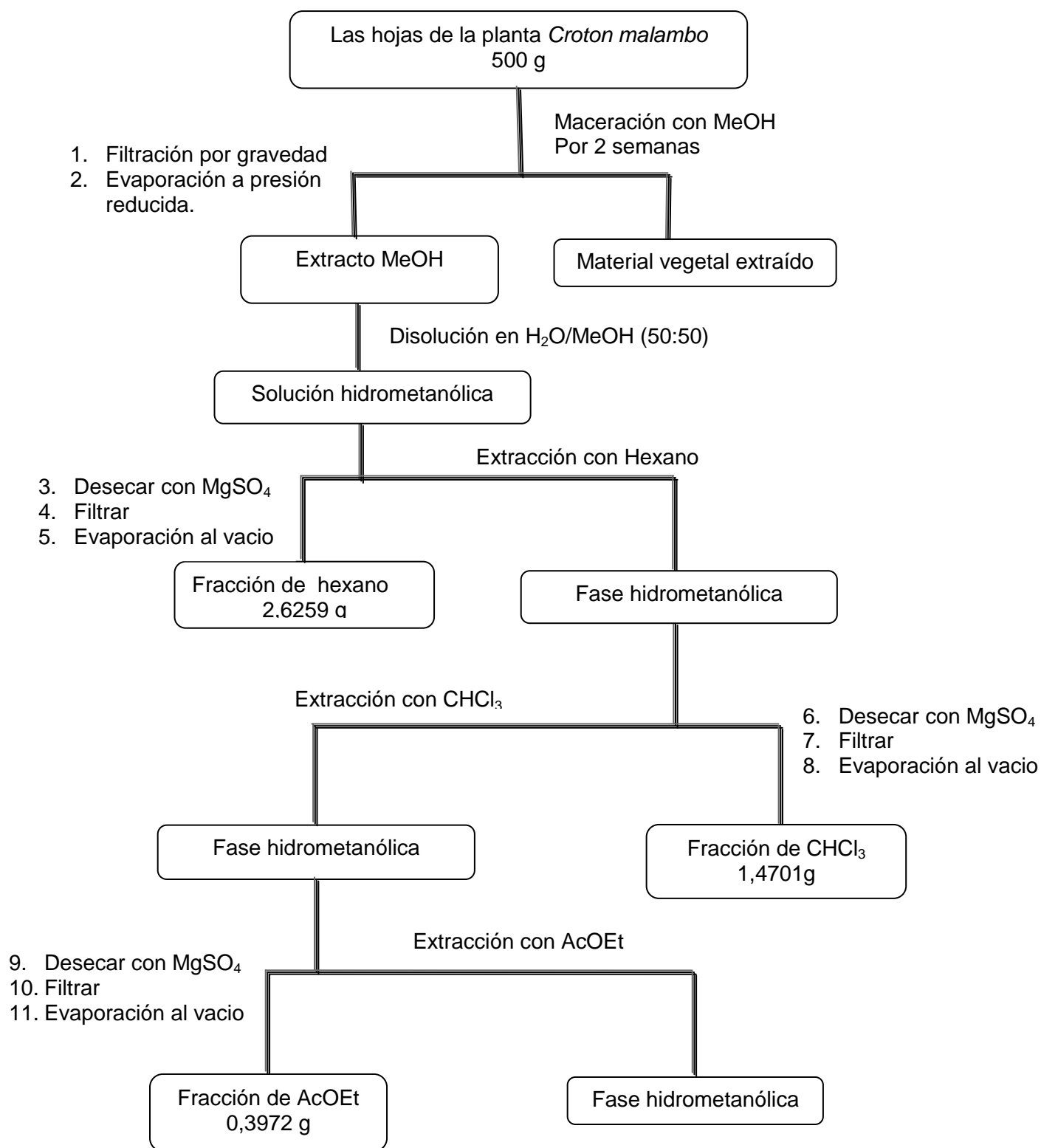
La especie *Croton malambo* fue recolectada en Diciembre del 2012 en Santa Barbara del Zulia, Venezuela, y la planta fue identificada por el Dr. Stephen Tillett. Un ejemplar de la muestra, representativo de la colección e identificado con el código (MYF 17824), ha sido depositado en el Herbario "Dr. Víctor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

4.3.2. Extracción.

Una vez recolectada la muestra de las hojas de la planta, se dejó secar a temperatura ambiente, una vez secas se molieron. Las hojas secas de la planta *Croton malambo* se colocaron en maceración con metanol, luego se filtró el extracto de metanol obtenido y se sometió a evaporación a presión reducida mediante un rotaevaporador, para así obtener el crudo.

El crudo obtenido de las hojas 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 cloroformo y finalmente con acetato de etilo. Las fracciones apolares obtenidas fueron tratadas con sulfato de magnesio anhidro, filtrados por gravedad y concentrados al vacío hasta sequedad (esquema 1).

Luego las fracciones orgánicas fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (CCF), visualizando las placas en una lámpara UV, seguida de inmersión en solución de p-anisaldehído como agente revelador y posterior calentamiento, para así visualizar los compuestos que no absorben la luz ultravioleta.



Esquema 1. Proceso de extracción de los metabolitos secundarios de las hojas de *Croton malambo* Karst.

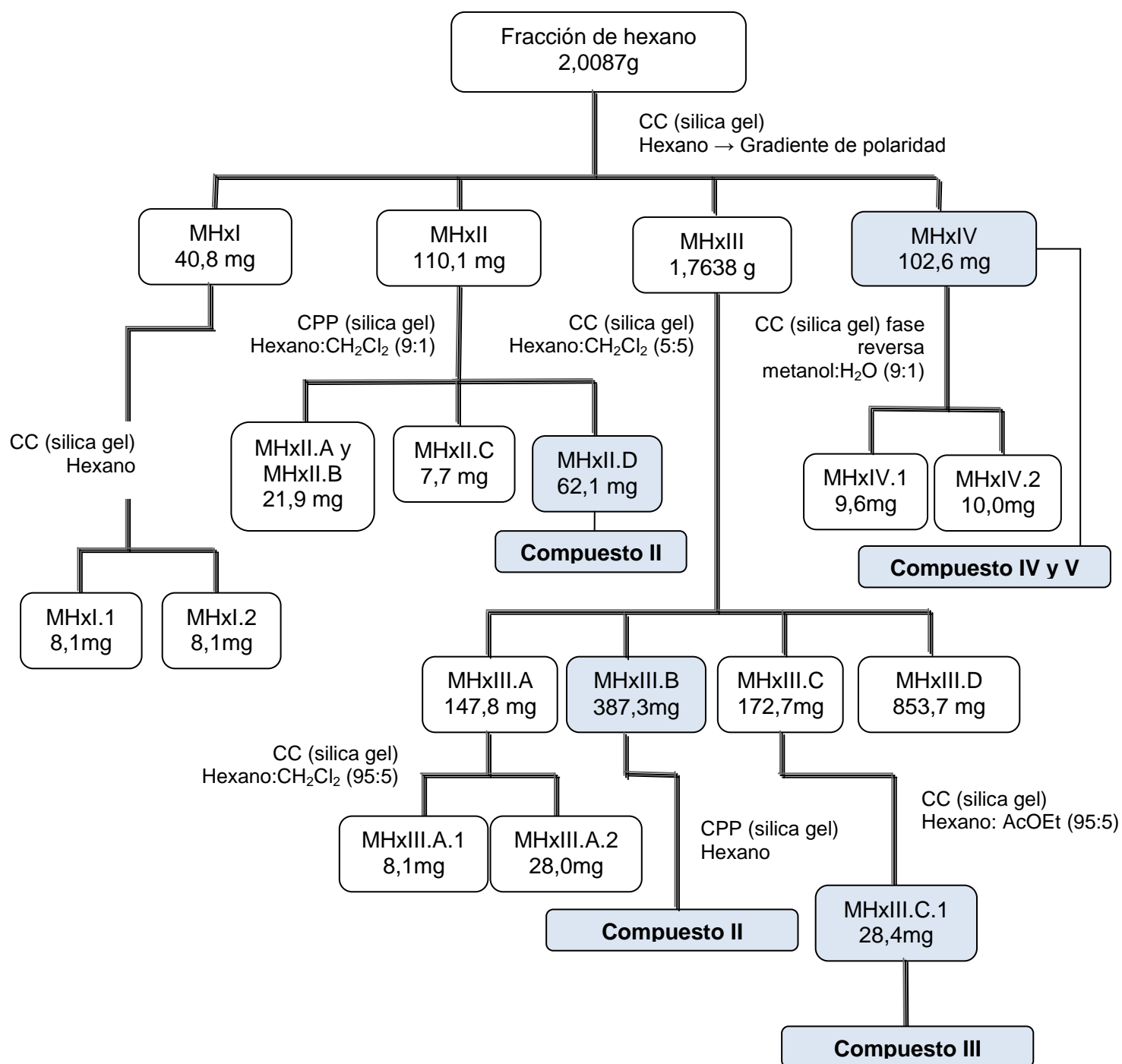
4.3.3. Separación de la fracción de hexano.

La separación de esta fracción se llevó a cabo en una cromatografía en columna (CC) de fase normal, empleando como soporte sílica gel en una proporción 50:1 de sílica con respecto a la muestra y hexano como fase móvil inicial, para luego ir aumentando la polaridad. Se colocó 2,0087g de la fracción de hexano en la columna cromatográfica, obteniendo 88 fracciones, que se reagruparon en 4 subfracciones: MHxI(16-32), MHxII(37-47), MHxIII(49-73), MHxIV(1-15), de acuerdo a los R_f de las manchas en CCF y su coloración mostradas al ser revelados con p-anisaldehído. De la fracción MHxIV se obtuvo los **compuesto IV y V**.

Las fracciones intermedias que no se siguieron analizando, contenían una mezcla de varios compuestos y las cantidades eran muy pequeñas para lograr una separación. Mientras que las últimas fracciones eran principalmente clorofila, el cual es un metabolito que es de poco interés para esta investigación, la misma fue identificada por una mancha de color verde en el monitoreo con CCF, el cual al ser visualizada en una lámpara UV, la mancha se torna de color rojo.

La fracción MHxII fue separada mediante CPP empleando como eluyente una mezcla de hexano: diclorometano (9:1). Al colocar la placa en una lámpara UV se pudo observar 4 manchas: MHxII.A, MHxII.B, MHxII.C, MHxII.D. Estos compuestos fueron colocados en agitación por 30 minutos, con 5 mL de la misma mezcla de solvente, filtrados por gravedad, para eliminar la sílica gel y finalmente se evaporó el solvente a presión reducida. De la fracción MHxII.D se obtuvo el **compuesto II**. En una comparación de las CCF para las fracciones MHxII.A y MHxII.B, se observó el mismo perfil cromatográfico por lo que se unieron. Del resto de las fracciones se obtuvo poca cantidad de muestra, para ser purificadas o medidas.

La fracción MHxIII fue separada mediante CC de fase normal empleando como eluyente una mezcla hexano: diclorometano (5:5), obteniéndose un total de 40 fracciones, que fueron reagrupadas en 4 subfracciones: MHxIII.A(0-9), MHxIII.B(11-24), MHxIII.C(26-32), MHxIII.D(33-40). Posteriormente la fracción MHxIII.A se separó mediante CPP debido a que cuando fue monitoreada con CCF, se observó la presencia de dos manchas. Mientras que las fracciones MHxIII.B y MHxIII.C fueron purificadas, mediante CPP usando como eluyente hexano para la primera fracción y CC de fase normal usando como eluyente una mezcla de Hexano: AcOEt (9:1) para la segunda fracción. A partir de la purificación de la fracción MHxIII.B se obtuvo el nuevamente el **compuesto II** y de la purificación de la fracción MHxIII.C se obtuvo el **compuesto III**. La fracción MHxIII.D no se continuó analizando debido a que era una mezcla de varios compuestos y en el análisis en CCF de fase normal no se encontró una buena separación, por lo que no se observaban manchas definidas (esquema 2).



Esquema 2. Proceso de separación de la fracción de hexano del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo* Karst.

4.3.4 Separación de la fracción de cloroformo.

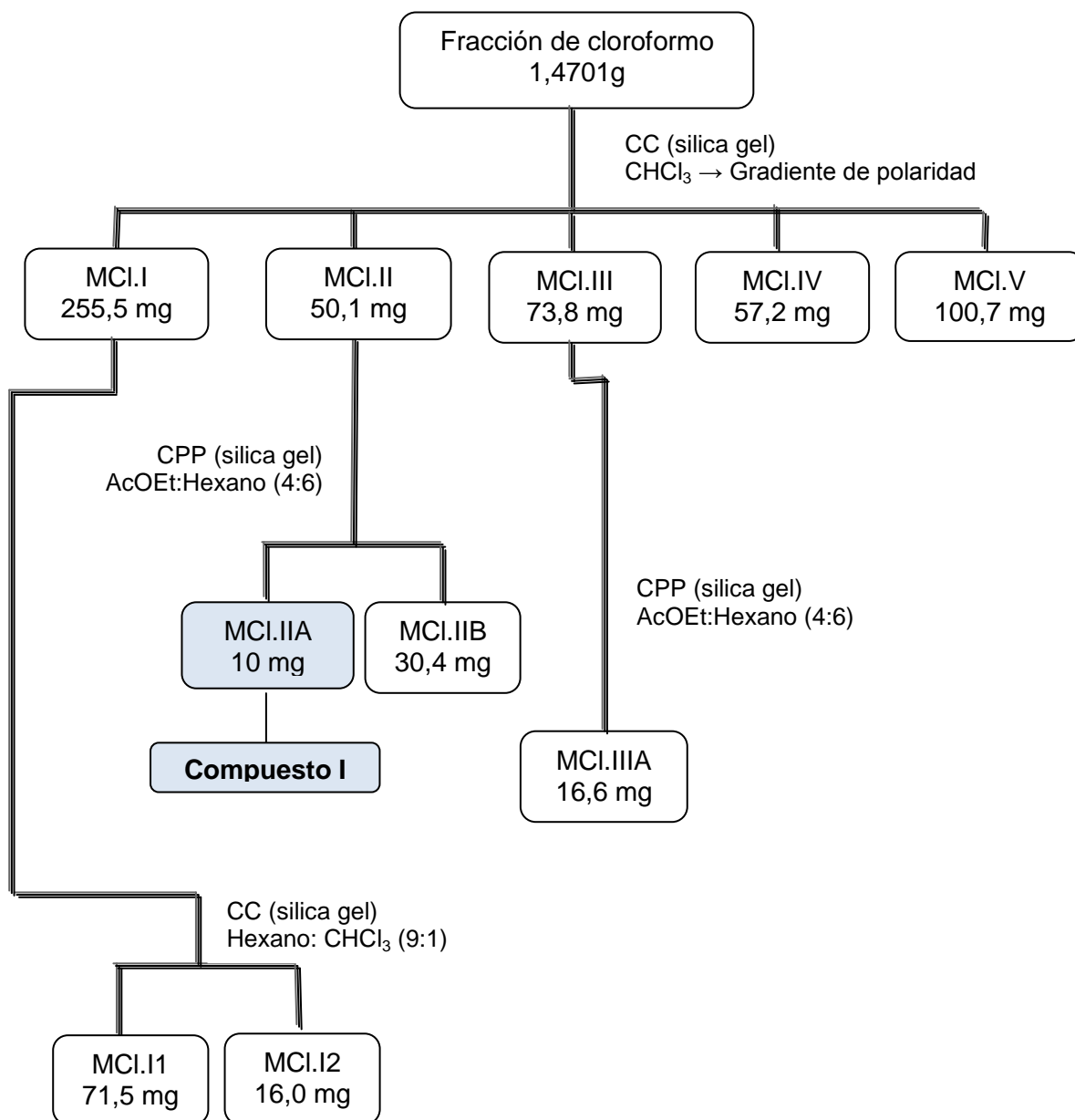
La separación de esta fracción se llevó a cabo en una cromatografía en columna (CC) de fase normal, empleando como soporte silica gel en una proporción 50:1 de silica con respecto a la muestra. Se utilizó cloroformo como fase móvil inicial, luego una mezcla CHCl_3 : AcOEt (9:1), se fue aumentando el gradiente de polaridad, hasta finalmente utilizar AcOEt. Se colocó 1,4701g de la fracción de CHCl_3 en la columna cromatográfica, obteniéndose un total de 36 fracciones, que se reagruparon en cinco subfracciones: MCI.I(4-6), MCI.II(8-11), MCI.III(14-25), MCI.IV(28-33), MCI.V(34), de acuerdo a los R_f de las manchas en CCF y su coloración mostradas al ser revelados con p-anisaldehído. El resto de las fracciones no se siguieron estudiando, debido a que eran mezclas de varios compuestos y no se encontraron las condiciones adecuadas de separación para las técnicas utilizadas en esta investigación.

La fracción MCI.I se separó mediante CC de fase normal, utilizando como eluyente una mezcla de hexano: CHCl_3 (9:1), para luego ir aumentando la polaridad gradualmente, en todas las mezcla se agregó 1mL de metanol, para obtener una mejor separación. Se obtuvieron 18 fracciones, que se reagruparon en dos subfracciones: MCI.I1(1-9), MCI.I2(12-15), de acuerdo a los perfiles cromatográficos de CCF.

Las fracciones MCI.II se separaron mediante CPP utilizando como eluyente una mezcla AcOEt:hexano(4:6), ya que de acuerdo a CCF se observa dos manchas: MCI.IIA y MCI.IIB, al colocar la placa preparativa en una lámpara UV. Estos compuestos fueron colocados en agitación por 30 minutos con 5 mL de la misma mezcla de solvente, filtrados por gravedad y finalmente sometidos a evaporación a

presión reducida. A partir de la fracción MCI.IIA se obtuvo el **compuesto I**. La fracción MCI.III se purificó mediante CPP.

Las fracciones MCI.IV y MCI.V no se siguieron trabajando debido a que en el estudio en CCF no se encontró condiciones adecuadas para una buena separación y por lo tanto no se observaban manchas definidas que indicaran la presencia de un metabolito secundario mayoritario (**esquema 3**). Las fracciones de acetato de etilo y acuosa no se trabajaron, debido a que no se encontraron las condiciones adecuadas de separación.



Esquema 3. Proceso de separación de la fracción de cloroformo del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo* Karst.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Estudios Fitoquímicos

Por medio de la utilización de diferentes técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono- 13 (^1H y ^{13}C), DEPT 135, se realizó la identificación y caracterización de los compuestos aislados del extracto metanólico de las hojas de la planta *Croton malambo*. Se muestran las comparaciones respectivas con los datos espectroscópicos reportados en la literatura y los espectros de cada compuesto aislado en el presente trabajo.

5.1.1. Compuesto I: 16 β ,17 α -diolentkaurano

Este compuesto fue aislado en la fracción de cloroformo del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo* como un sólido amarillo, fue aislado de la fracción II, luego de ser purificado en una placa preparativa, en una cantidad de 10 mg, lo que representa el 0,7 % del extracto de cloroformo colocado en la columna cromatográfica. En CCF, se mostró como una mancha, que se tornó de color Rosado al ser revelado con p-anisaldehído, y presentó un factor de retención de $R_f = 0,4$ al ser eluida con una mezcla de solventes 4:6 v/v de acetato de etilo- hexano.

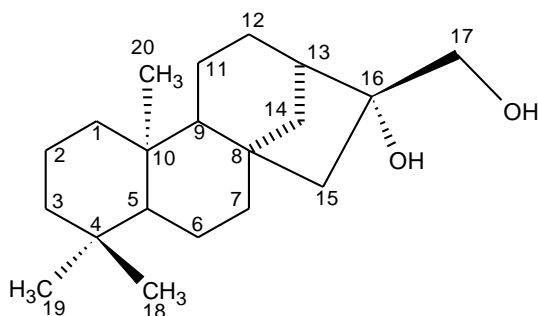


Figura 2. Estructura del compuesto I.

El análisis de los datos aportados por el espectro de RMN de ^1H (Figura 3 y anexo 1) indicó la presencia de 3 grupos metilo δppm : 0,98; 0,81; 0,77 que integran para 3 protones cada señal y la presencia de una señal de un metileno hidroxilado, según la señal 3,7-3,6 ppm.

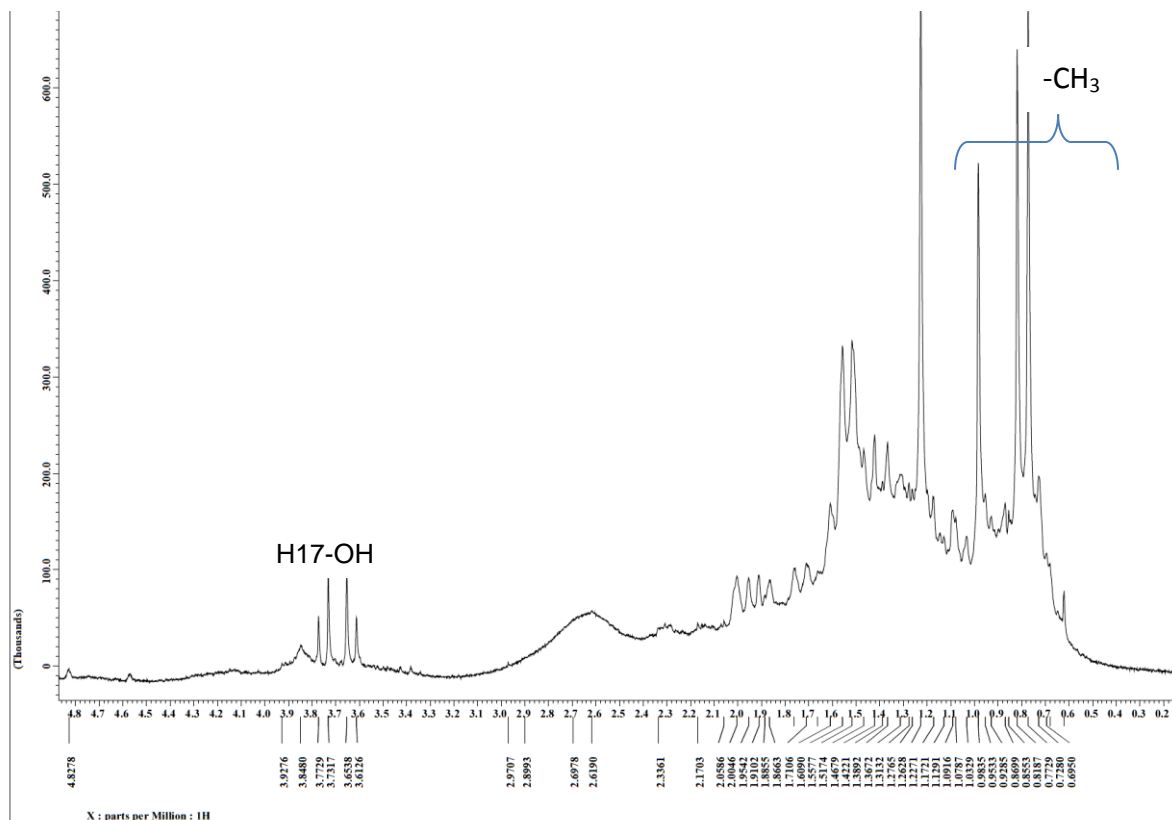


Figura 3. Espectro de RMN ^1H del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz)

De la misma manera el espectro RMN de ^{13}C (**Figura 4**), presento señales para 20 carbonos, aportando información de que no existían dobles enlaces en la estructura, grupos carbonilos, ni insaturaciones de naturaleza aromática. Estos datos junto a un espectro de un experimento DEPT-135 (**Figura 5**), que confirmó la presencia de tres grupos metilos a desplazamientos químicos de δppm : 17,81; 21,59; 33,60; nueve carbonos metilénicos, cuatro carbonos cuaternarios δppm : 81,98; 44,81; 39,26; 33,29 y tres carbonos metínicos δppm : 59,78; 56,01; y 45,42. Señales que sugirieron la estructura de un diterpeno de tipo kaurano. También se pudo confirmar la presencia de dos grupos hidroxilo, uno sobre un carbono metilénico a un desplazamiento de 66,40 ppm y otro sobre un carbono cuaternario a 81,90 ppm. Una comparación de los datos obtenidos con los datos reportados en la literatura, señalaron que el compuesto I, es el $16\beta,17\alpha$ -diolentkaurano (**127**), el cual ha sido reportado en el estudio fitoquímico de la corteza de *Croton malambo*⁴¹. (**Tablas 1 y 2**)

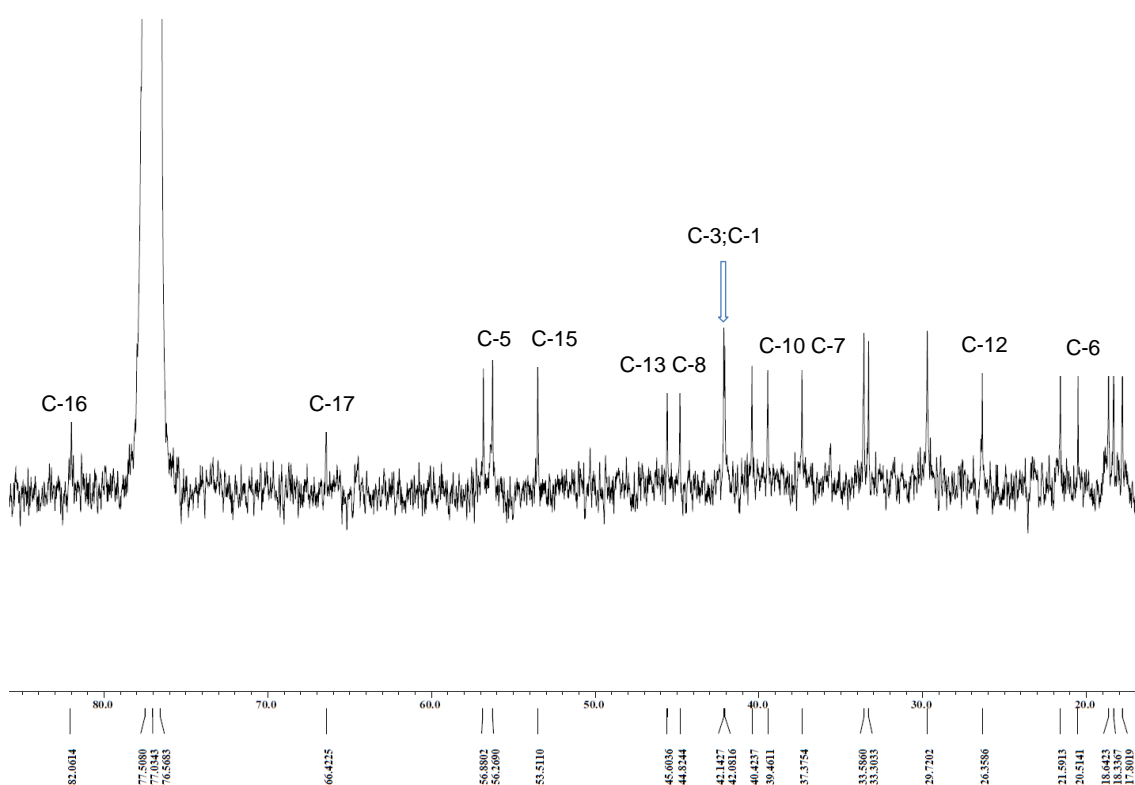


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz).

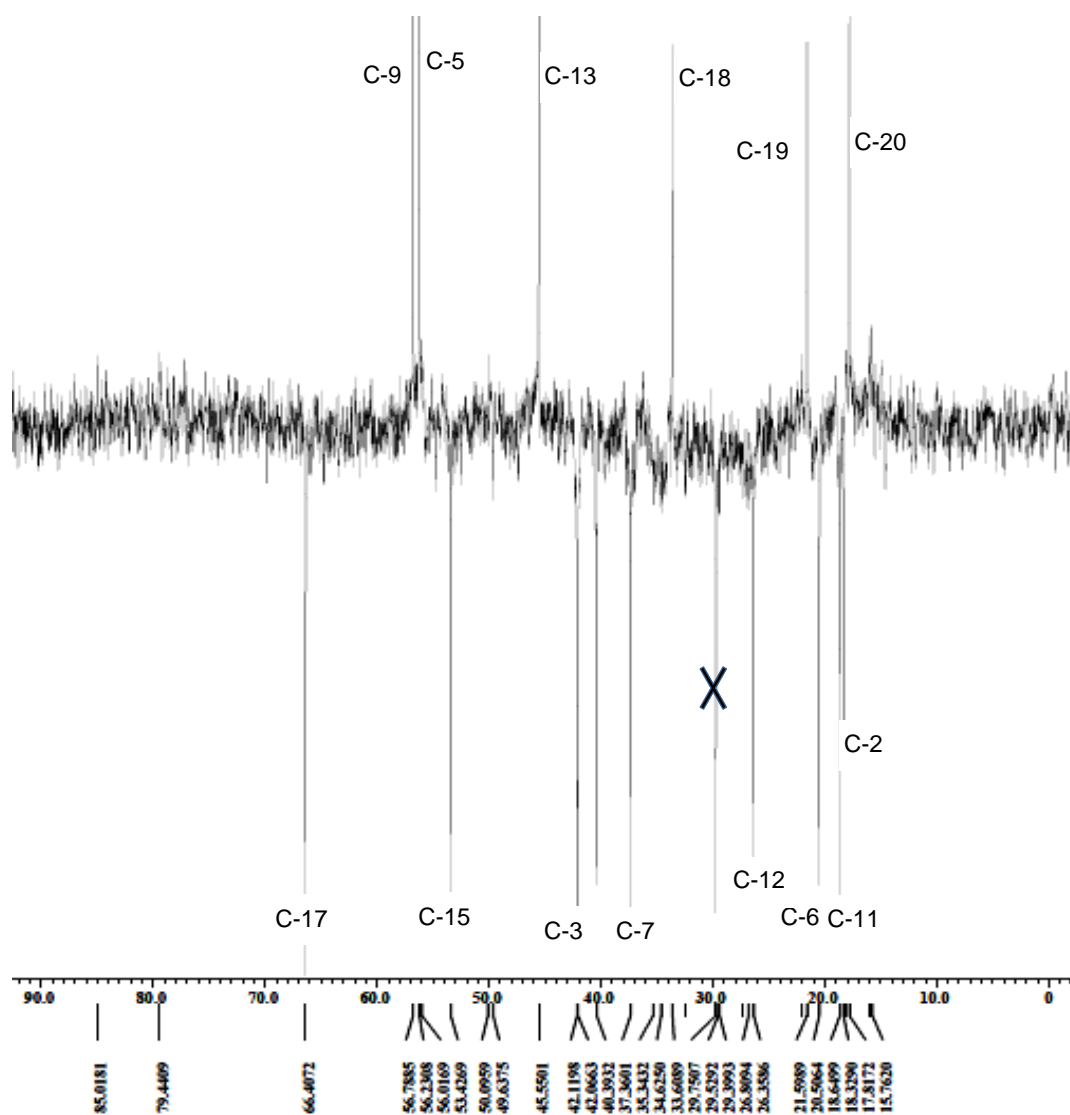


Figura 5. Espectro DEPT-135 del compuesto I (CDCl₃, 270 MHz).

Tabla 1. Datos de RMN de ^1H para $16\beta,17\alpha$ -diolentkaurano (**131**)

Nº Carbono	(δ ppm, m, JHz) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{41,b}
3	1,55-1,5; (m)	1,57; 1,53
5	3,92 br s	3,92
6	1,55; (m)	1,55
7	2,00	1,95
9	0,95; (s)	0,95
12	1,55	1,55
13	2,05 (m)	2,0
14	1,6; (m)	1,75; 0,75
15	1,46; (m)	1,47; 1,5
17	3,61-3,77, (dd), 11,12Hz	3,70; 3,64
18-19	0,77-0,81 (s)	0,86-0,78
20	0,98; (s)	1,0

a: CDCl_3 ; 270 MHzb: CDCl_3

Tabla 2. Datos de RMN de ^{13}C para 16 β ,17 α -diolentkaurano (**131**)

Nº Carbono	(δ ppm) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{44,b}
1	42,0	42,0
2	18,3	18,2
3	42,1	42,0
4	33,3	33,4
5	56,2	56,1
6	20,5	20,5
7	37,3	37,2
8	44,8	44,6
9	56,8	56,7
10	39,4	39,4
11	18,6	18,3
12	26,3	26,3
13	45,6	45,5
14	40,3	40,4
15	53,5	53,4
16	81,9	81,6
17	66,4	66,2
18	33,5	33,4
19	21,6	21,5
20	17,8	17,7

a: CDCl_3 ; 270 MHzb: CDCl_3

5.1.2. Compuesto II: Metileugenol.

Este compuesto se aisló a partir de la fracción de hexano del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo*, de las fracciones II y III como un aceite amarillo. Se obtuvo en una cantidad de 449,40 mg, lo que representa el 22,37% del extracto de hexano colocado en la columna cromatográfica. En CCF en ambas fracciones se presentó como una mancha que se tornó de color rosado al ser revelado con p-anisaldehído y un $R_f = 0,7$ al ser eluida con hexano.

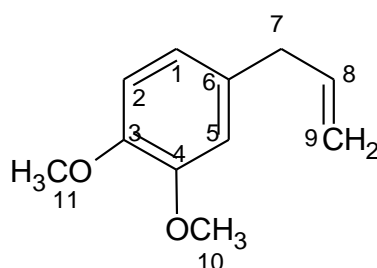


Figura 6. Estructura del compuesto II (91)

Con base en el análisis y caracterización de los espectros de protones, carbono-13 y DEPT 135, se pudo realizar la elucidación de la estructura del compuesto. El espectro RMN de ^1H (**Figura 7**), mostro señales en la zona aromática con un multiplete que integra para tres protones a 6,78 ppm, en la zona olefínica con un multiplete que integra para un protón a 5,96 ppm y un multiplete que integra para dos protones a 5,07 ppm, al igual que las señales de los grupos metoxi el cual es un singlete que integra para 6 protones a 3,85 ppm.

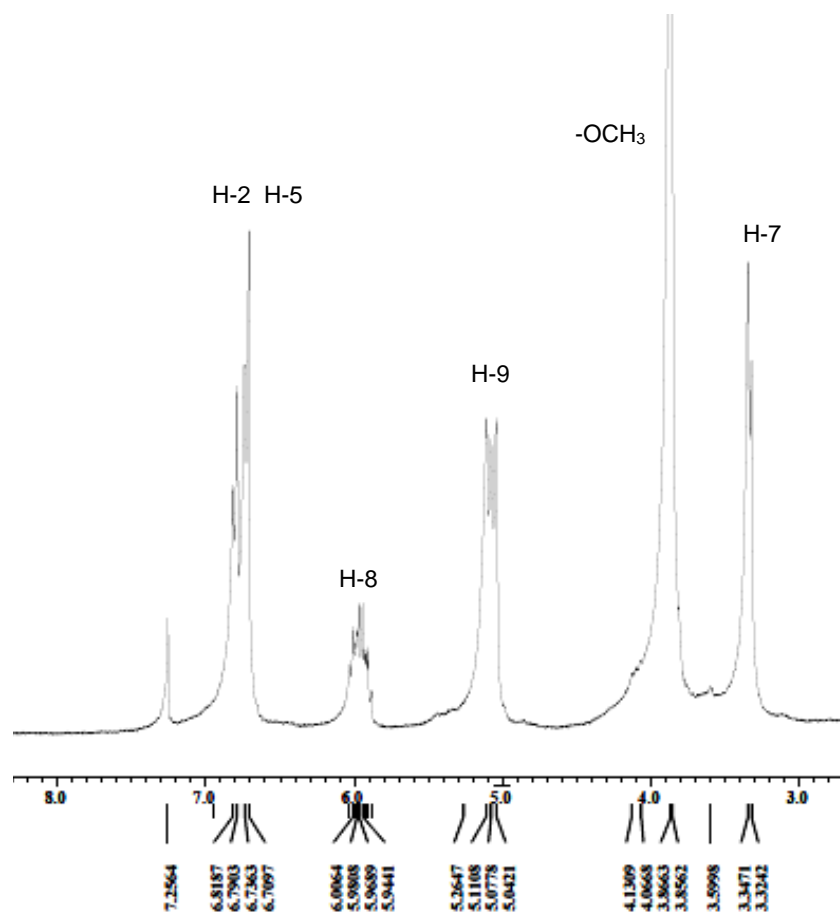


Figura 7. Espectro de RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz).

Estas señales en conjunto con la información del espectro de RMN de ^{13}C que mostró señales para 11 átomos de carbonos, los cuales con ayuda de un espectro DEPT 135 (**Figura 8**), permitió su identificación en: tres átomos de carbono cuaternarios δppm : 132,7; 137,7; 148,9; cuatro átomos de carbono metínicos δppm : 112,0; 115,6; 120,5; 147,4; un carbono olefínico δppm : 115,6; un carbono alifático δppm : 39,8. Además de dos señales correspondientes a los grupos metoxi δppm : 55,8; 56,0, permitió proponer una estructura con un anillo aromático trisustituido, con dos grupos metoxi y un sustituyente con enlaces olefínico terminal. La comparación de los datos obtenidos con los reportados en la literatura (**tablas 3 y 4**), proporcionó la identificación del compuesto como el monoterpene Metileugenol (**91**), el cual ya ha sido reportado como metabolito secundario aislado de esta planta⁴¹.

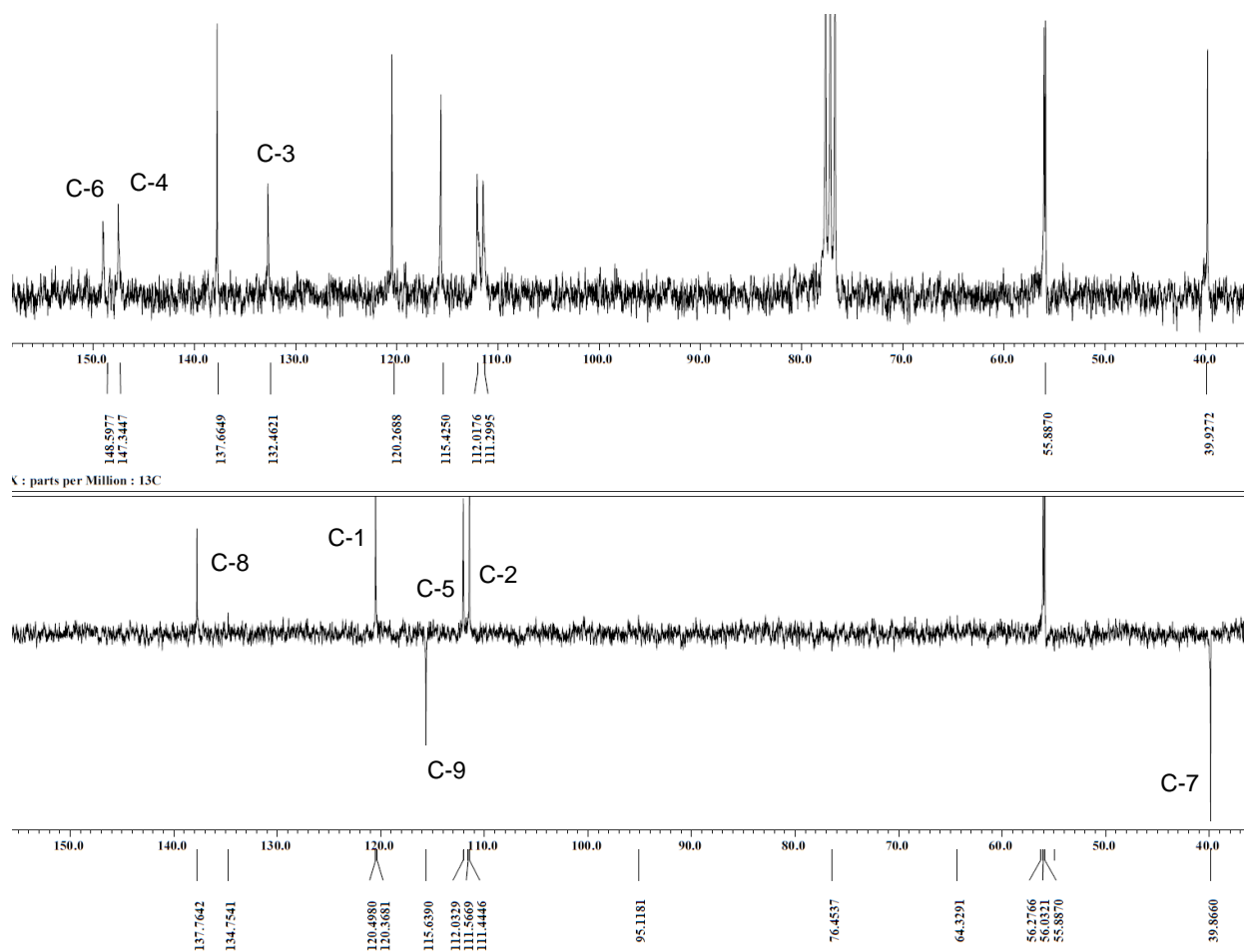


Figura 8. Espectro de ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz).

Tabla 3. Datos de RMN de ^1H para Metileugenol (91)

Nº Carbono	(δ ppm, m, JHz) Experimentales ^a	(δ ppm) Reportados ⁴⁵
2	6,77; m	6,81; d; 7,5 Hz
5	6,69; m	6,62; d; 7,5 Hz
7	3,32; d; 6,66Hz	3,30; d; 6,51Hz
8	5,96; m	5,94; m
9	5,07; m	4,96; m
10,11	3,85; s	3,85; s

a: CDCl_3 ; 270 MH.

Tabla 4. Datos de RMN de ^{13}C para Metileugenol (**91**)

Nº Carbono	(δ ppm) Experimentales ^a	(δ ppm) Reportados ⁴⁵
1	120,3	120,3
2	111,3	111,3
3	132,5	132,7
4	147,3	147,4
5	112,0	111,9
6	148,6	148,9
7	39,9	39,7
8	137,7	137,8
9	115,6	115,7
10	55,9	55,7
11	56,1	55,9

a: CDCl_3 ; 270 MHz

5.1.3. Compuesto III: Lupeol.

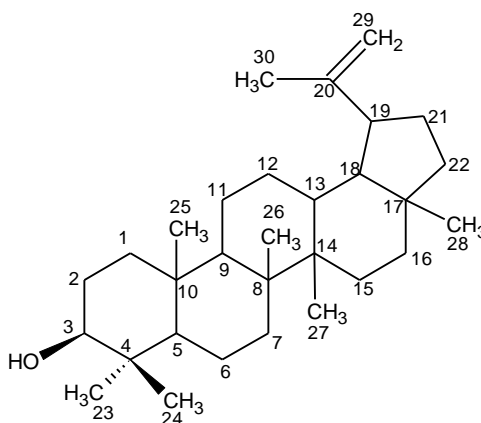


Figura 9. Estructura del compuesto III

Este compuesto se aisló a partir de la fracción III de hexano, como un sólido blanco. Se obtuvo en una cantidad de 28,4 mg, lo que representa un 5,7% del extracto de hexano colocado en la columna cromatográfica.

A partir del estudio de los espectros de RMN ^1H (**Figura 10**) se pudo observar dos señales singlete a desplazamientos de 4,53 y 4,65 ppm indicando la presencia de una olefina terminal. También se observa una señal multiplete a un desplazamiento químico de 3,15 ppm, característica a un protón de grupo hidroxilo. Además de las múltiples señales en la zona olefínica.

Con ayuda de un espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 11**) y un experimento DEPT-135 (**Figura 12**) se distinguieron las señales de 11 carbonos metilénicos. A campo bajo se observaron señales a desplazamientos de 109,34 y 150,86 ppm de dos carbonos olefínicos terminales, los que se correlaciona con las señales de protones antes descritas e indicando la presencia de un grupo funcional isopropenil. A campo medio se presencia una señal de un carbono a un desplazamiento químico de 79,09 ppm, lo que es característico de un carbono unido a un grupo hidroxilo y a campo alto, se distinguen señales correspondientes a siete grupos metilos δppm : 28,04; 19,37; 18,58; 16,04; 15,45; 14,61. Al igual que de 6 carbonos cuaternarios δppm : 38,89; 40,98; 37,25; 42,91; 43,04; 150,86. La comparación de los datos espectroscópicos con los reportados en la literatura confirmó que el compuesto III tenía una estructura característica de un triterpeno esteroidal con un grupo hidroxilo en el carbono 3 llamado lupeol⁴⁶, el cual ha sido reportado en el estudio fitoquímico de la corteza de esta especie⁴¹ (**Tablas 5 y 6**).

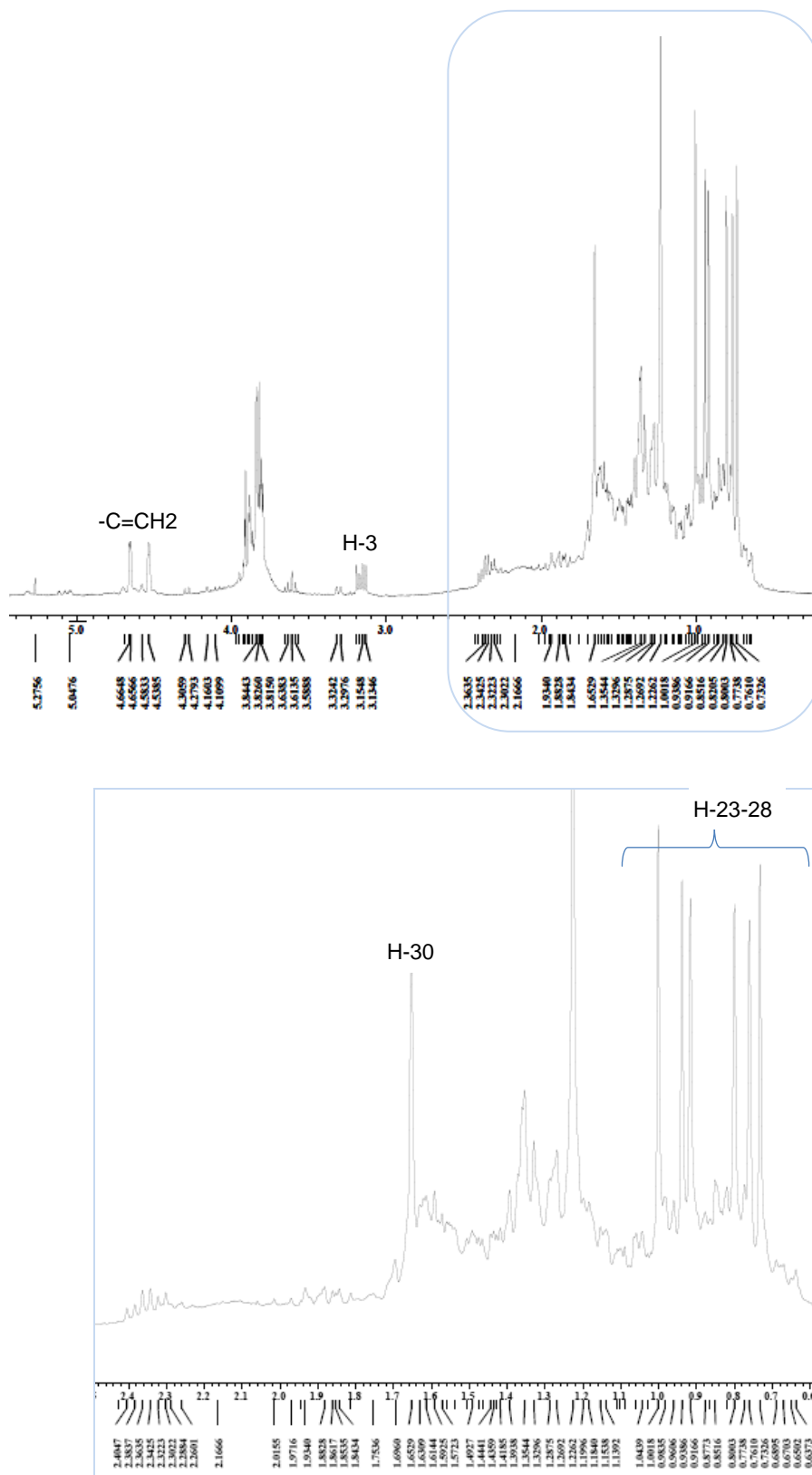


Figura 10. Espectro de RMN ^1H del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).

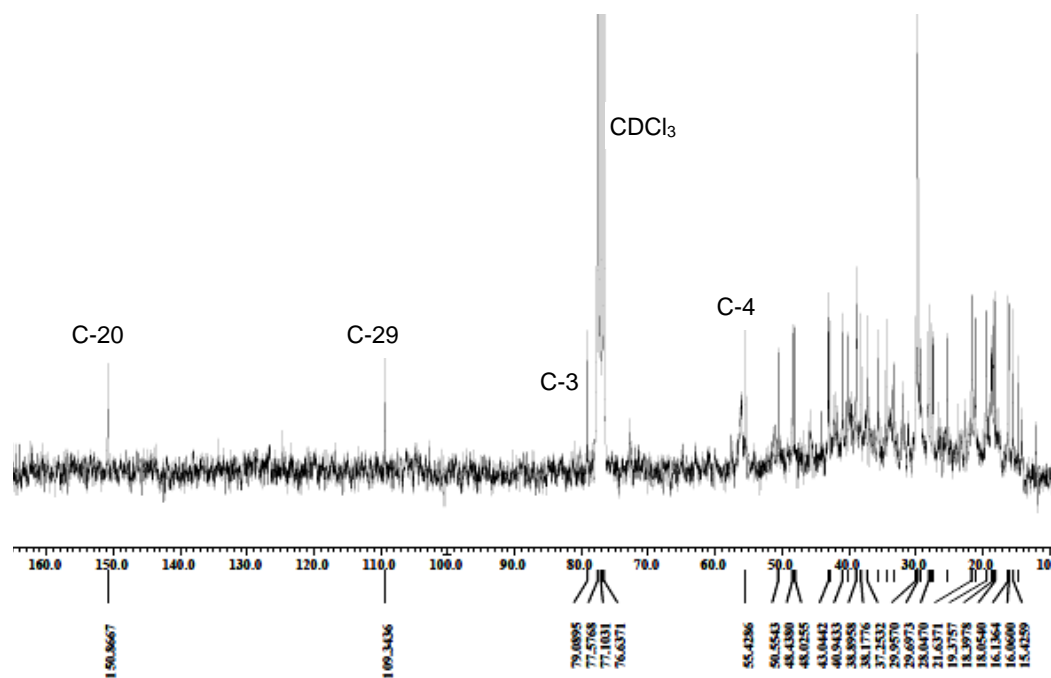


Figura 11. Espectro RMN ^{13}C del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).

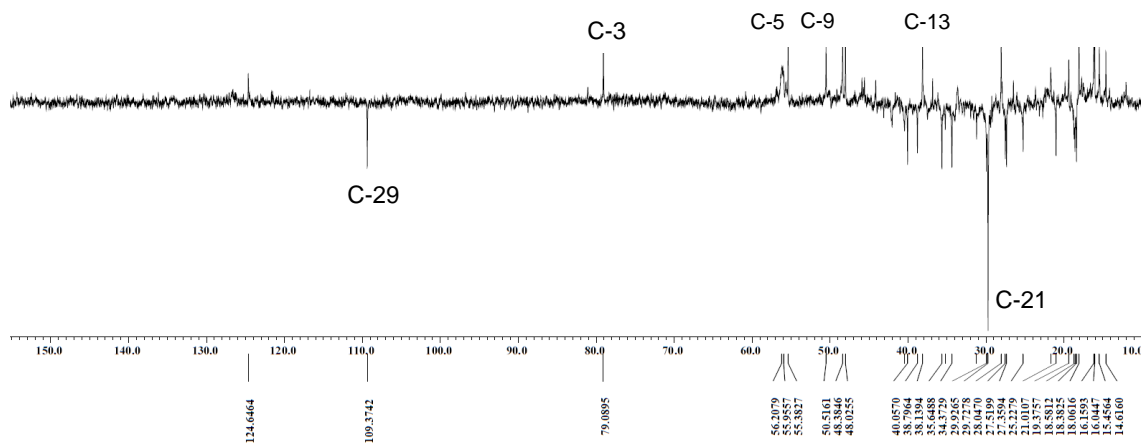


Figura 12. Espectro DEPT-135 del compuesto III (CDCl_3 , 270 MHz).

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H para Lupeol (**118**)

Nº Carbono	(δ ppm) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{46,b}
1	1,69; m	0,91(t), 1,68 (d)
2	1,61, m	1,54 (q), 1.61 (d)
3	3,15; m	3,18 (dd)
5	0,73; s	0,69 (d)
6	1,39, m	1,39 (q)
7	1,41; m	1,41 (m)
9	1,28 ; m	1,28 (d)
11	1,41; m	1,25 (q); 1,42 (d)
12	1,69; m	1,07 (q); 1,68 (d)
13	1,69; m	1,67 (t)
15	1,65; m	1,01 (d); 1,71 (t)
16	1,49; m	1,38 (t); 1,49 (d)
18	1,39; m	1,37; (t)
19	2,36; m	2,39 (m)
21	1,32; m	1,33 (m); 1,93(m)
22	1,41; m	1,20(m); 1,42(m)
23	0,98; s	0,98 (s)
24	0,77; s	0,77 (s)
25	0,85; m	0,84 (s)
26	1,04; m	1,04 (s)
27	0,98; s	0,97 (s)
28	0,80; s	0,79 (s)
29	4,53; m; 4,66;m	4,56 (m); 4,69 (m)
30	1,65; s	1,69 (s)

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 100,56 MHz

Tabla 6. Datos de RMN de ¹³C para Lupeol (**118**)

Nº Carbono	(δ ppm) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{46, b}
1	38,8	38,7
2	27,4	27,4
3	79,0	78,9
4	38,8	38,8
5	55,4	55,3
6	18,3	18,3
7	34,4	34,2
8	40,9	40,8
9	50,5	50,4
10	37,2	37,1
11	21,0	20,1
12	25,2	25,1
13	38,1	38,0
14	42,9	42,8
15	27,5	27,4
16	35,6	35,5
17	43,0	43,0
18	48,4	48,2
19	48,0	47,9
20	150,8	150,9
21	29,9	29,8
22	40,0	40,0
23	28,0	28,0
24	15,4	15,4
25	16,1	16,1
26	16,0	15,9
27	14,6	14,5
28	18,0	18,0
29	109,3	109,3
30	19,3	19,3

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 100,56 MHz

5.1.4. Compuesto IV y V: Julocrotol y Julocrotona

La separación cromatográfica de la fracción de hexano del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo*, condujo al aislamiento de una mezcla de dos compuestos, los cuales se caracterizaron mediante sus datos espectroscópicos y por comparación con datos reportados en la literatura. Esta mezcla de compuestos fue aislada del extracto de hexano, a partir de la fracción IV como un aceite amarillo, donde se obtuvo en una cantidad de 102,6 mg lo que representa el 5,11 % del extracto de hexano colocado en la columna cromatográfica.

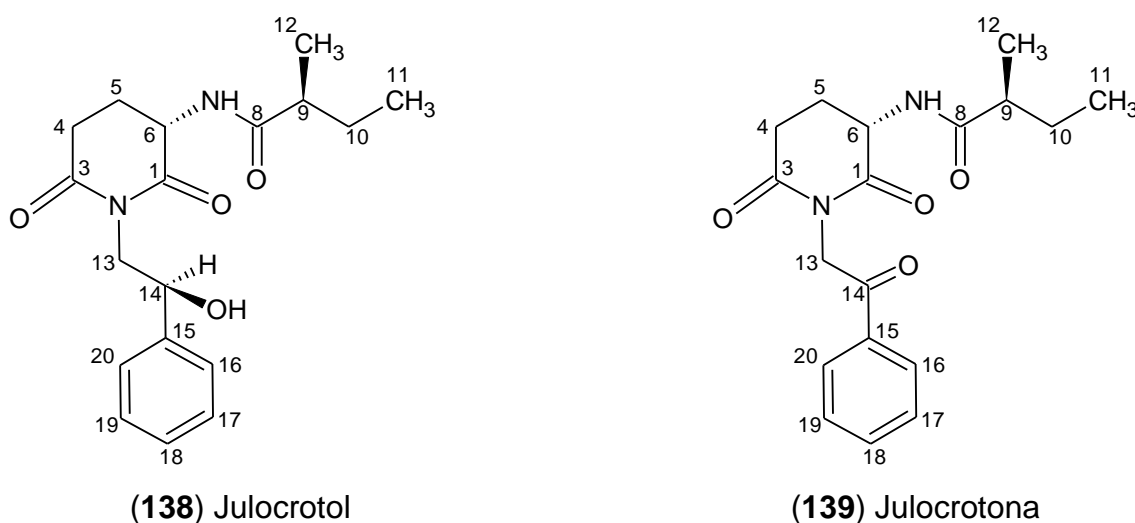


Figura 13. Estructuras de los compuestos IV y V.

Debido a que no se pudo diferenciar la cantidad de carbonos presentes en las estructura, se procedió a realizar una comparación de los datos experimentales, teniendo en cuenta los tipos de señales obtenidas, lo que conllevó a proponer que se trataba de una mezcla de dos compuestos. Un análisis de los espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 14**) permitió distinguir una señal a un desplazamiento químico de 72,84ppm, señal característica para un carbono metínico unido a un grupo hidroxilo. Mientras que a un desplazamiento químico de 191,76 ppm, presento una señal

característica de carbonos carbonílicos de tipo cetona. También se observó señales de seis carbonos carbonílicos a 171,2 ppm; 171,3 ppm; 171,7 ppm; 171,9 ppm; 176,9 ppm y 177,0 ppm. De carbonos aromáticos entre 128,6 ppm y 134,0 ppm y carbonos en la zona alifática con señales entre 11,73 y 51,46 ppm. Estas señales obtenidas comparadas con las reportadas en la literatura, indicaron la presencia de compuestos con estructuras similares, que solo diferían en la presencia de un grupo hidroxilo (**compuesto IV**), mientras la otra estructura presentaba un carbono carbonílico (**compuesto V**) en el lugar de un grupo hidroxilo.

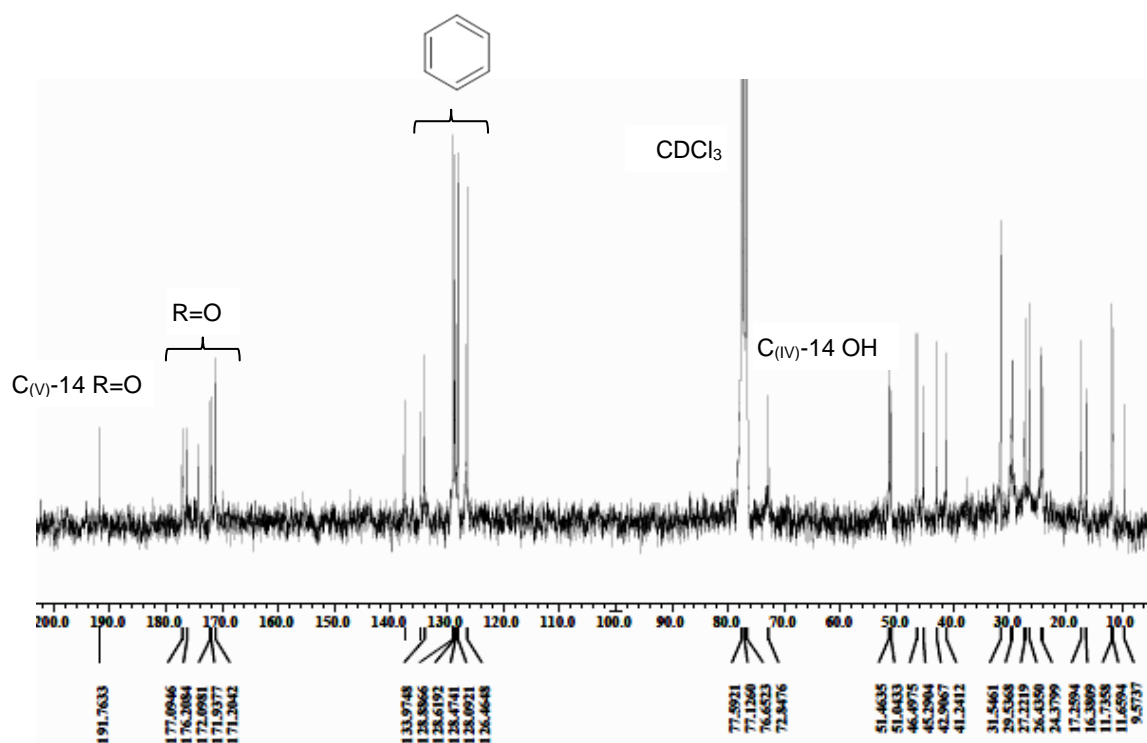


Figura 14. Espectro RMN ^{13}C de los compuestos IV y V (CDCl_3 , 270 MHz).

Por otra parte un análisis de los datos en el espectro RMN de ^1H permitió distinguir una señal a 5,97 ppm, que es una señal característica de un protón metínico hidroxilado, además de las señales, (**Figura 15**) en la zona aromática entre 7,29-7,44 ppm, lo cual indicó que el anillo bencénico estaba monosustituido y en la

zona alifática aparecieron señales entre 0,81-2,8 ppm. El resto de las señales se asignaron según la comparación de los datos reportados con los experimentales (tabla 3 y 4). Estos datos obtenidos señalaron que las estructuras se trataban de los compuestos Julocrotol (**138**) y Julocrotona (**139**), dichos compuestos ya han sido reportados en el estudio fitoquímico de las hojas y tallos de *Croton cuneatus*.

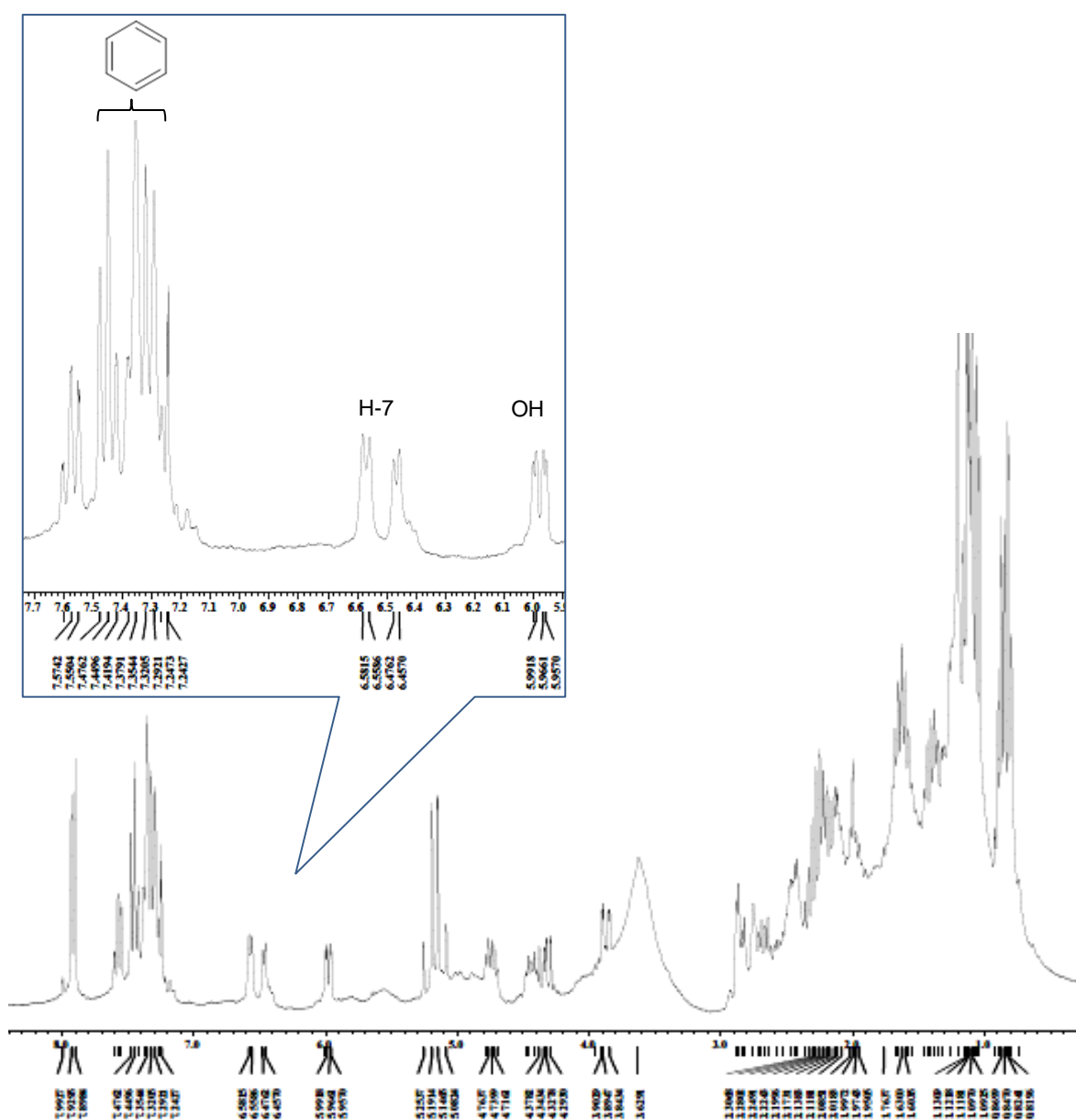


Figura 15. Espectro de RMN ^1H de los compuesto IV y V (CDCl_3 , 270 MHz).

Tabla 7. Datos de RMN de ^1H para Julocrotol (**138**)

Nº Carbono	(δ ppm, m, JHz) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{47,b}
4	2,75; m	2,74; m
5	1,63; m	1,64; m
6	4,37; m	4,36 ; m
7	6,51; br s	6,43; br s
9	2,24; m	2,45; m
10	1,63; m	1,39; m
11	0,81; m	0,81; t; 7,43Hz
12	1,13; m	1,13; d; 7,43Hz
13	3,89; dd; 13,82Hz;	3,90; dd; 13,7Hz
14	5,97; dd; 9,4Hz	6,00; dd 9,50Hz
16-20	7,29-7,44; m	7,30-7,40; m

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 270 MHz

Tabla 8. Datos de RMN de ¹³C para Julocrotol (**138**)

Nº Carbono	(δ ppm) Experimentales ^a	(δ ppm) Reportados ^{47,b}
1	171,2	171,3
3	171,9	171,7
4	31,5	31,6
5	26,4	26,4
6	51,0	51,2
8	177,0	176,9
9	42,9	42,9
10	27,2	27,2
11	11,7	11,7
12	16,4	16,4
13	45,2	45,3
14	72,8	72,8
15	---	137,6
16,20	128,6	128,6
17,19	126,4	126,4
18	128,4	128,5

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 270 MHz

Tabla 9. Datos de RMN de ¹H para Julocrotona (**139**)

Nº Carbono	(δ ppm, m, JHz) Experimentales^a	(δ ppm) Reportados^{47,b}
4	2,8; m	2,90; m
5	1,99; m	1,99; m
6	4,73; m	4,73 ; m
7	6,55; br s	----
9	2,19; m	2,23;m
10	1,60; m	1,42; m
11	0,86; m	0,89; t; 7,39
12	1,13; m	1,13; dd; 3,21Hz
13	5,19; dd; 12,1Hz	5,17; dd; 10,8Hz
16, 20	7,92; d; 8,9Hz	7,92; t; 7,18Hz
17,19	7,4; m	7,50; t; 7,4Hz
18	7,47; m	7,57; t; 7,4Hz

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 270 MHz

Tabla 10. Datos de RMN de ¹³C para Julocrotona (139)

Nº	(δ ppm)	(δ ppm)
-----------	----------------------------------	----------------------------------

Carbono	Experimentales ^a	Reportados ^{47,b}
1	171,9	171,9
3	171,2	171,2
4	29,7	29,8
5	24,0	24,1
6	51,4	51,5
8	177,0	176,9
9	41,2	41,2
10	27,2	27,3
11	11,7	11,9
12	17,2	16,5
13	45,2	45,3
14	191,7	191,6
15	134,0	134,6
16,20	128,8	128,6
17,19	134,0	134,0
18	134,0	134,0

a: CDCl₃; 270 MHz

b: CDCl₃; 270 MHz

5.1.5 Aspectos físicos y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de las hojas de *Croton malambo* Karst.

16 β ,17 α -diolentkaurano (I): sólido amarillo (10mg, 0,7%) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,55 (m, H-3), 3,92 (br s, H-5), 1,55 (m, H-6), 0,95 (s, H-9), 1,55 (H-12), 2,0 (m, H-13), 1,55 (m, H-14), 1,46 (m, H-15), 3,61-3,77 (s, H-17), 0,77-0,86 (s, 3H, H-18, H-19), 0,98 (s, 3H, H-20). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 42,0 (C-1), 18,3 (C-2), 42,1 (C-3), 33,3 (C-4), 56,2 (C-5), 20,5 (C-6), 37,3 (C-7), 44,8 (C-8), 56,8 (C-9), 39,4 (C-10), 18,6 (C-11), 26,3 (C-12), 45,6 (C13), 4,30 (C-14), 53,5 (C-15), 81,9 (C-16), 66,4 (C-17), 33,5 (C-18), 21,6 (C-19), 17,8 (C-20).

Metileugenol (II): aceite amarillo (449,4 mg , 22,37%) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3,32 (d, $J= 6,66$ Hz, 2H, H-7), 3,85 (s, 6H, H-10, H-11), 5,07 (m, 2H, H-9), 5,95 (m, 1H, H-8), 6,69 (m, 1H, H-5), 6,67 (m, 1H, H-2). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 120,3 (C-1), 111,3 (C-2), 132,5 (C-3), 147,3 (C-4), 112,0 (C-5), 148,6 (C-6), 39,9 (C-7), 137,7 (C-8), 115,6 (C-9), 55,9 (C-10), 56,1 (C-11).

Lupeol (III): Sólido blanco (28,4 mg, 5,7%) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 16,9 (m, H-1), 16,1 (m, H-2), 3,15 (m, H-3), 0,73 (s, H-5), 1,39 (m, H-6), 1,41 (m, H-7), 1,28 (m, H-9), 1,41 (m, H-11), 1,69 (m, H-12), 1,69 (m, H-13), 1,65 (m, H-15), 1,49 (m, H-16), 1,39 (m, H-18), 2,36 (m, H-19), 1,32 (m, H-21), 1,41 (m, H-22), 0,98 (s, H-23), 0,77 (s, H-24), 8,85 (m, H-25), 1,04 (m, H-26), 0,98 (s, H-27), 0,8 (s, H-28) 4,53 (m, H-29), 1,65 (m, H-30). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 38,8 (C-1), 27,4 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,4 (C-5), 18,3 (C-6), 33,2 (C-7), 40,9 (C-8), 50,5 (C-9), 37,2 (C-10), 21,0 (C-11), 25,2 (C-12), 38,1 (C-13), 42,9 (C-14), 27,5 (C-15), 35,6 (C-16), 43,0 (C-17), 48,4 (C-18), 48,0 (C-19), 150,8 (C-20), 29,9 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 15,4 (C-24), 16,1 (C-25), 16,0 (C-26), 14,6 (C-27), 18,0 (C-28), 109,3 (C-29), 19,3 (C-30).

Julocrotol (IV): aceite amarillo. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2,75 (m, H-4), 1,63 (m, H-5), 4,37 (m, H-6), 6,51 (br s, H-7), 2,24 (m, H-9), 1,63 (m, H-10), 0,81 (m,

H-11), 1,13 (m, H-12), 3,89 (dd, $J = 13,82$ Hz, H-13), 5,97 (dd, $J = 9,4$, H-14), 7,29 (m, H-16-20). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 171,2 (C-1), 171,9 (C-3), 31,5 (C-4), 26,4 (C-5), 51,0 (C-6), 177,0 (C-8), 42,9 (C-9), 27,2 (C-10), 11,7 (C-11), 16,4 (C-12), 45,2 (C-13), 72,8 (C-14), 128,6 (C-16, C-20), 126,4 (C-17, C-19), 128,4 (C-18).

Julocrotona (V): aceite amarillo. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2,8 (m, H-4), 1,99 (m, H-5), 4,73 (m, H-6), 6,55 (br s, H-7), 2,19 (m, H-9), 1,60 (m, H-10), 0,86 (m, H-11), 1,13 (m, H-12), 5,19 (dd, $J = 12,1$, H-13), 7,92 (d, $J = 8,9$, H-16, H-20), 7,40 (m, H-17, H-19), 7,47 (m, H-18). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 171,9 (C-1), 171,2 (C-3), 29,7 (C-4), 24,0 (C-5), 51,4 (C-6), 177,0 (C-8), 41,2 (C-9), 27,2 (C-10), 11,7 (C-11), 17,2 (C-12), 45,2 (C-13), 191,7 (C-14), 134,0 (C-15), 128,8 (C-16, C-20), 134,0 (C-17, C-18, C-19).

- En el estudio fitoquímico, de las fracciones de hexano y cloroformo del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo*, se logró el aislamiento de un 0,12% del material vegetal, siendo el compuesto mayoritario el metileugenol.
- Del estudio fitoquímico de las fracciones de hexano y cloroformo del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo* Karst se aislaron mediante técnicas cromatográficas, tres compuestos puros: 16 β ,17 α -diolentkaurano (I), metileugenol (II), lupeol (III), y una mezcla de dos compuestos: julocrotol (IV), julocrotona (V).
- De los compuestos aislados, tres de ellos: 16 β ,17 α -diolentkaurano (I), metileugenol (II), lupeol (III), han sido reportados del estudio fitoquímico de la corteza de esta especie, mientras que los compuestos julocrotol (IV) y julocrotona (V), aun cuando han sido reportados en el estudio fitoquímico de los tallos y hojas de la especie *Croton cuneatus*, en el presente trabajo, se aislaron por primera vez de la planta *Croton malambo*.
- Los compuestos aislados fueron caracterizados e identificados, mediante las técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , y finalmente sus identidades fueron corroboradas por comparación de datos reportados en la literatura para los compuestos aislados.
- En el presente trabajo se logró aislar del extracto metanólico de las hojas de *Croton malambo*, el 16 β ,17 α -diolentkaurano, compuesto que se obtuvo en un estudio previo realizado en la misma especie, pero, en la corteza y que presentó tener una buena actividad citotóxica contra diferentes tipos de cáncer, lo que implica una ventaja, ya que se puede extraer

de las hojas sin causar el daño que pudiera provocar la tala de la corteza de la planta *Croton malambo*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz O, Motes M., Wilkomirsky T., Plantas Medicinales de Uso en Chile. 2^{da}ed. Chile. Editorial Universitaria. 1999.
2. Santos H, Rodrigues. F, Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (euphorbiaceae). Quim. Nova. 2008. 31, (3), 601-604.
3. Salatino A, Faria. ML, Negri. G, Braz. J. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Chem. Soc. 2007, 18, (1), 11-33.
4. Braz R, Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Quim. Nova. 2010. 33, (1), 229-239.
5. Suárez A, Compagnone R, Salazar M, Tillett S, Delle F, Di Giulio C, Bruges G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2003. 88. 11-14.
6. Pabón L, Hernández-Rodríguez P. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17, (2). 194-209.
7. Webster G. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. Taxon. 1975, 24, (5/6). 593-601.
8. Mwine J, Van Damme P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. J. Med. Plant. Res. 2011, 5, (5). 652-662.
9. Pascual M, Correal E. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. 1992, 43, (1). 39-44.
10. De Lima S, L.Citóa A, Lopesa J, Netoa J, Chavesa M, Silveirab E. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill – Euphorbiaceae. Rev. Latinoamer. Quím. 2010, 38, (3). 133-144.

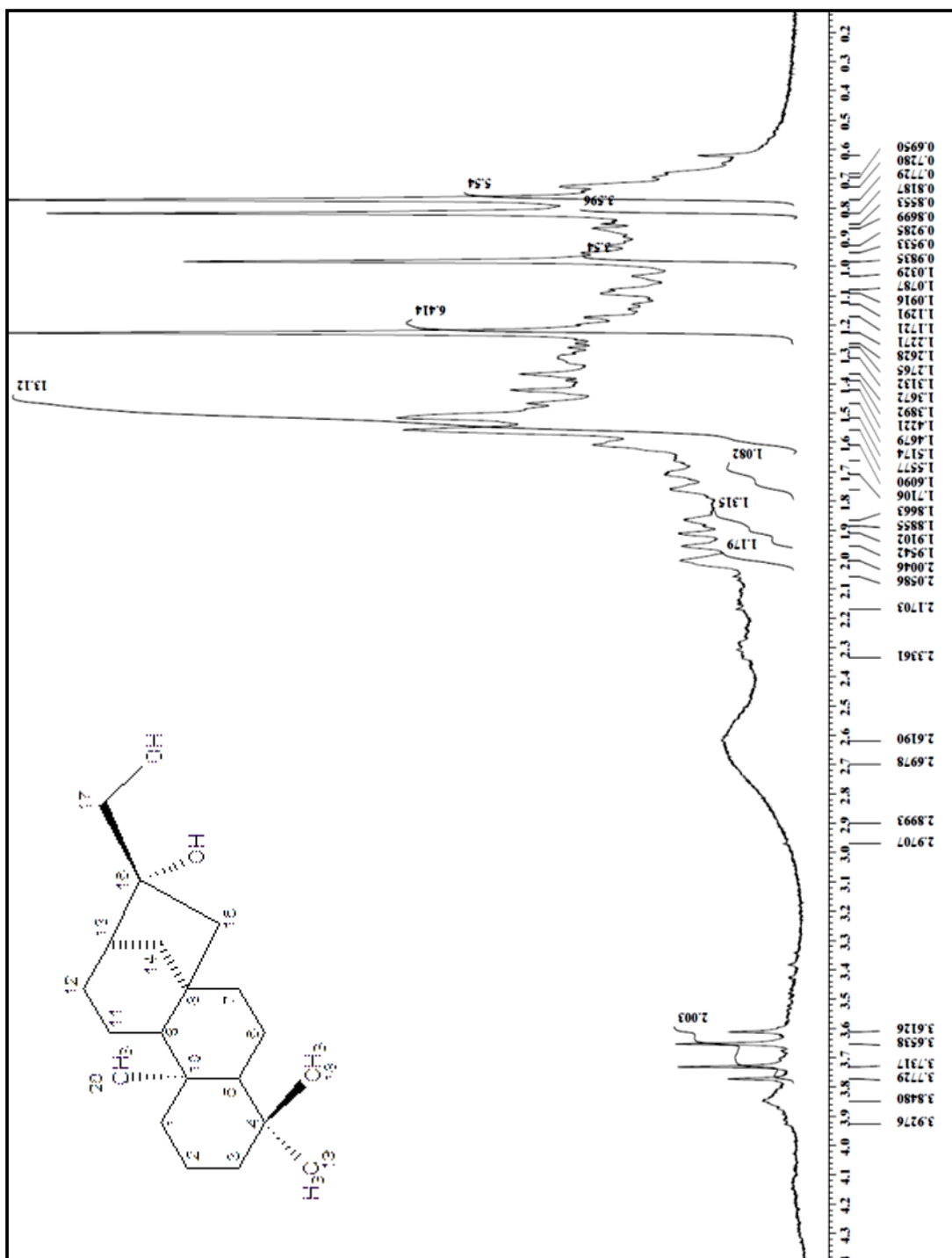
11. López E, Neto M, Rocha E, Loiola OD. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton Pedicellatus* kunth. *Quim. Nova*, 2012, 35, (11), 2169-2172.
12. Murillo J. Composición y distribución del género crotón (euphorbiaceae) en Colombia, con cuatro especies nuevas. *Caldasia*. 1999. 21, (2). 141-166.
13. Wang Y, Zou Z. Sesquiterpenes from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Chin. J Nat. Med.* 2008, 6, (5). 339–341.
14. Vegas S. Estudio químico de los compuestos bioactivos de hojas senescentes de *Croton funckianus* (Euphorbiaceae). [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogota. 2010.
15. Chavez K. Fitoquímica y evaluación citotóxica de *Croton caracasana* Pittier y modificaciones estructurales de ácido de caracasina. [Tesis Doctoral]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Caracas. 2013.
16. Mateu E, Chavez, Riina R, Compagnonec RS, Monached F, Suárez A. New 3, 4-Seco-ent-kaurene Dimers from *Croton micans*. *Nat Prod Commun.* 2012. 7, (1), 5-8.
17. 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). *Phytochemistry.* 2008, 69. 2406–2410.
18. Zou G, Su Z, Zhang H, Wang Y, Yang J, Zou Z. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules.* 2010, 15. 1097-1102.
19. Yang X, Chen W, Zhao J, Yang L, Zhang H, Li L. Ent-kaurane diterpenes and phenolic compounds from *Croton kongensis* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 2009, 37. 237–240.
20. Mulholland DA, Langat MK, Crouch NR, Coley HM, Mutambi EM, Nuzillard MJ. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry.* 2010. 71. 1381–1386.
21. Kawakami S, Matsunami K, Otsuka H, Shinzato T, Takeda Y. Crotonionosides A–G: Megastigmane glycosides from leaves of *Croton cascarilloides* Rauschel. *Phytochemistry* 201, 72. 147–153.

22. Kawakami S, Toyoda H, Harinantenaina L, Matsunami M, Yamaguchi K. Eight New Diterpenoids and Two New Nor-Diterpenoids from the Stems of *Croton cascarilloides*. Chem. Pharm. Bull. 2013. 10. 1248.
23. Kawakami S, Matsunami K, Otsuka H, Shinzato T, Takeda Y, Kawahata M, Yamaguchi K. A crotofolane-type diterpenoid and a rearranged nor-crotofolane-type diterpenoid with a new skeleton from the stems of *Croton cascarilloides*. Tetrahedron Letters. 2010. 5. 14320–4322.
24. Motta LB, Furlan CM, Santos D, Salatino Maria L, Duarte JM, Negri G, Carvalho J, Ruiz AL, Cordeiro I, Salatino A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. Brazilian J. Pharm. Sci. 2011. 2, (6). 972-977.
25. Santos H, Furtado E, Bertini L, Bandeira P, Ribeiro B, Alencar J, Trevisan MT, Lemos T. Chemical Composition And Cholinesterase Inhibition of Essential Oils of Three Chemotypes from *Croton Zehntneri* K. Rev. Latinoamer. Quím. 2010, 38, (1), 45-51.
26. Bracher F, Randau K, Lerche H. Croto tropone, a new tropone derivative from *Croton zehntneri*. Fitoterapia. 2008, 79. 236–237.
27. Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Foldi G. *Croton lechleri* sap. and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. J. Ethnopharmacol. 2012, 144, 747–753.
28. 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. Molecules. 2008, 13, 1219-1229.
29. Thuong P, Pham T, Le T, Dao T, Dang T, Nguyen Q, Oh W. Symmetric dimers of ent-kaurane diterpenoids with cytotoxic activity from *Croton tonkinensis*. Bioorg Med Chem Lett. 2012, 22, 1122–1124.
30. Pereira S, Contini S, Coppede J, Pereira P, Bertoni B, França S, Pereira AM. An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. Molecules. 2012, 17. 8851-8858.

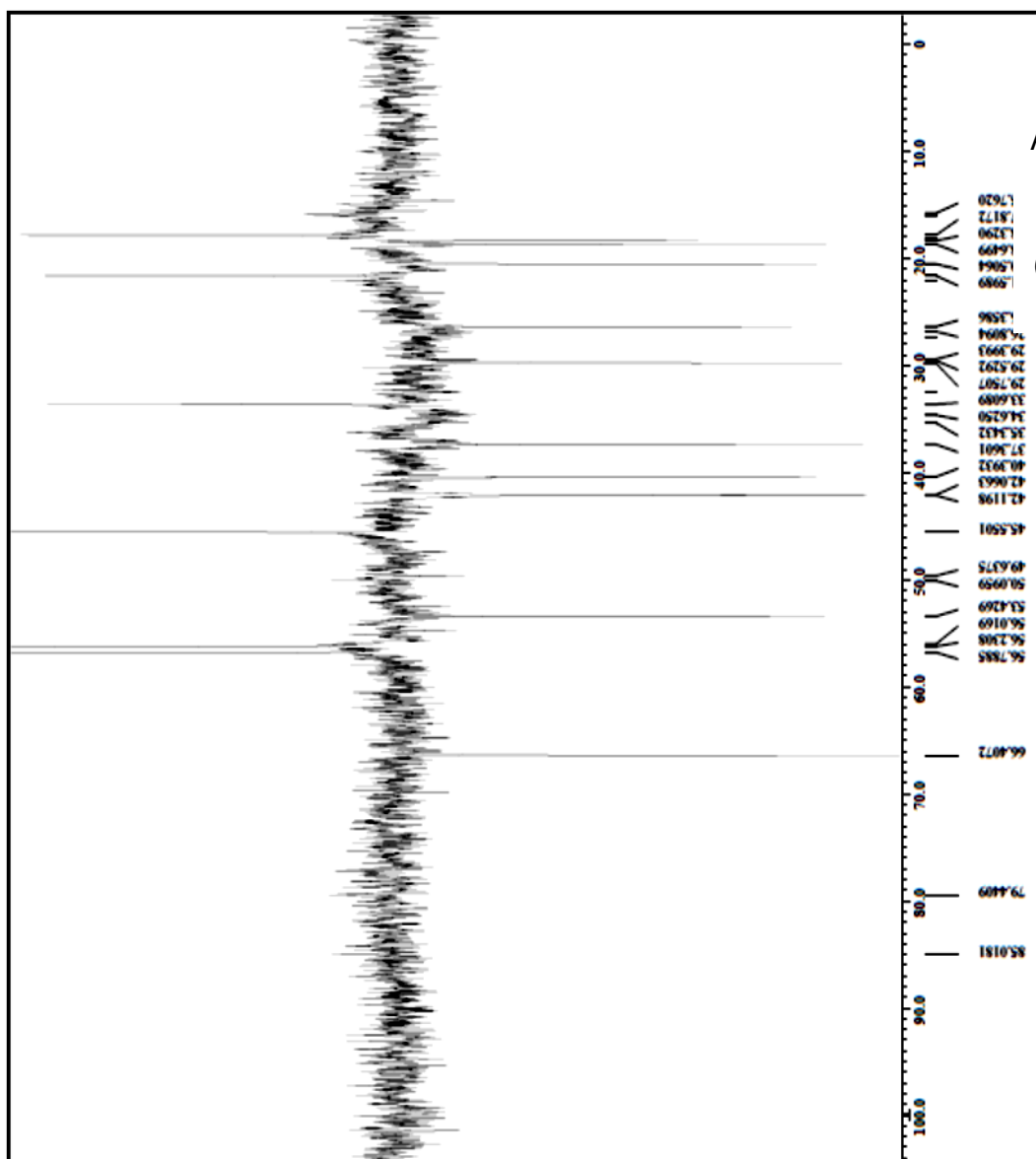
31. Takeshige Y, Kawakami S, Matsunami K, Otsuka H, Lhieochaiphant D, Lhieochaiphant S. Oblongionosides A–F, megastigmane glycosides from the leaves of *Croton oblongifolius* Roxburgh. *Phytochemistry*. 2012, 80. 132–136.
32. Pizzolatti M, Bortoluzzi A, Brighente I, Zuchinalli A, Carvalho F, Candido A, Peresand M. Clerodane Diterpenes from Bark of *Croton urucurana* Baillon. *J. Braz. Chem. Soc.* 2013, 24, (4), 609-614.
33. Socorro D, Henrique A, Guilhon GM, Nahum A, Andrade EH, Silva J, Maia JG. Essential Oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, (6). 1188-1192.
34. Randau KP, Sproll S, Lerche H, Bracher F. Pernambucone, a new tropone derivative from *Croton argyroglossum*. 2009.
35. Mehmood R, Malik A. Isolation and Characterization of Crotosparsamide, a new cyclic nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, (12). 1885-1888.
36. Suárez A, Rivas D, Compagnone R, Castillo A, Blanco Z. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensis*. *Revista Facultad de Farmacia*. 2009, 72, (2). 11-17.
37. Suárez A, Mateu E, Chavez K, Compagnone R, Orsini G, Tillett S, Riina R, Alcazar W, Salazar M, Arveledo F, Israel A. Perfil fitoquímico y Farmacológico de *Croton micans* Sw. *Revista Facultad de Farmacia*. 2012, 75, (2). 2-11.
38. Marquéz G. Estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos apolares de *Croton pungens*. [Tesis Licenciatura]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2011.
39. Suárez A, Oropeza M, Vásquez L, Tillett S, Compagnone R. Chemical Composition of the Essential Oil of *Croton gossypifolius* from Venezuela. 2010. 6, (1). 97-99.
40. Suárez A, Chavez K, Blanco Z, Compagnone R, Tillett S, Torrico F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Revista Latinoamericana de Química*. 2013. 3, 163-170.

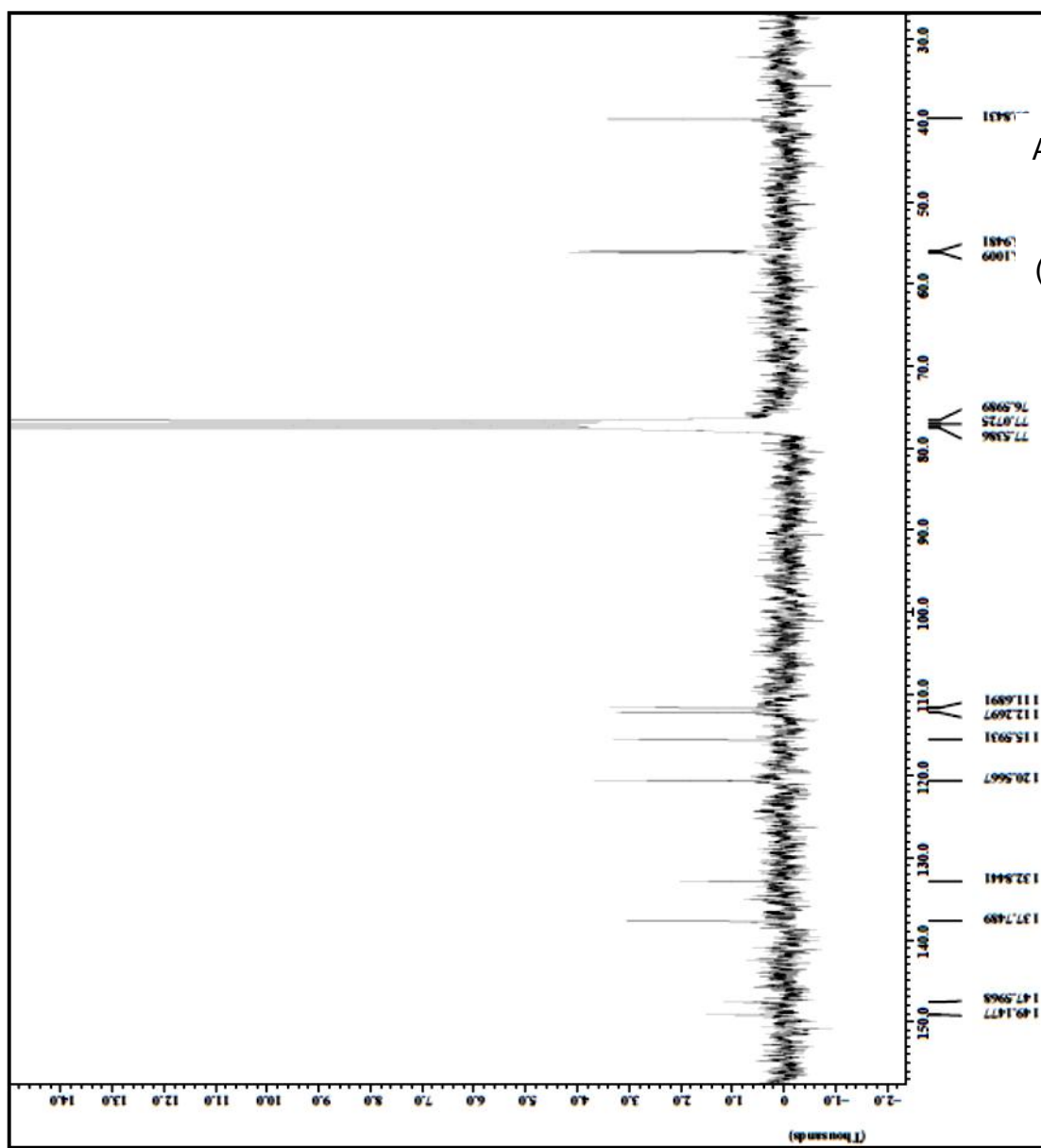
41. Suárez A. Estudio químico y Farmacológico de la corteza de *Croton malambo*. [Trabajo de Ascenso]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. 2000.
42. Suárez A, Vásquez L, Taddei A, Arvelo F, Compagnone RS. Antibacterial cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. J Essent Oil-Bear. Plants. 2008, 1, (2). 208-2013.
43. Morales A, Alvarez A, Arvelo F, Suárez A, Compagnone R, Galindo I. The natural diterpene ent-16b-17a-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2a/Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. Apoptosis. 2011, 16. 1245–1252.
44. Kitajima J, Komori T, Kawasaki T. Phytochemistry. 1982, 30, 3912-3921.
45. Wenkert B, Buckwalter I. J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 4367.
46. Reynolds W, McLean S, Poplawski J, Enriquez R, Escobar LI, Leon I. Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. Tetrahedron. 1986, 42, (13). 3419-3428.
47. Suárez A, Blanco Z, Delle F, Compagnone R, Arvelo F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. Nat. Prod. Res. 2004. 18. (5). 421-42.

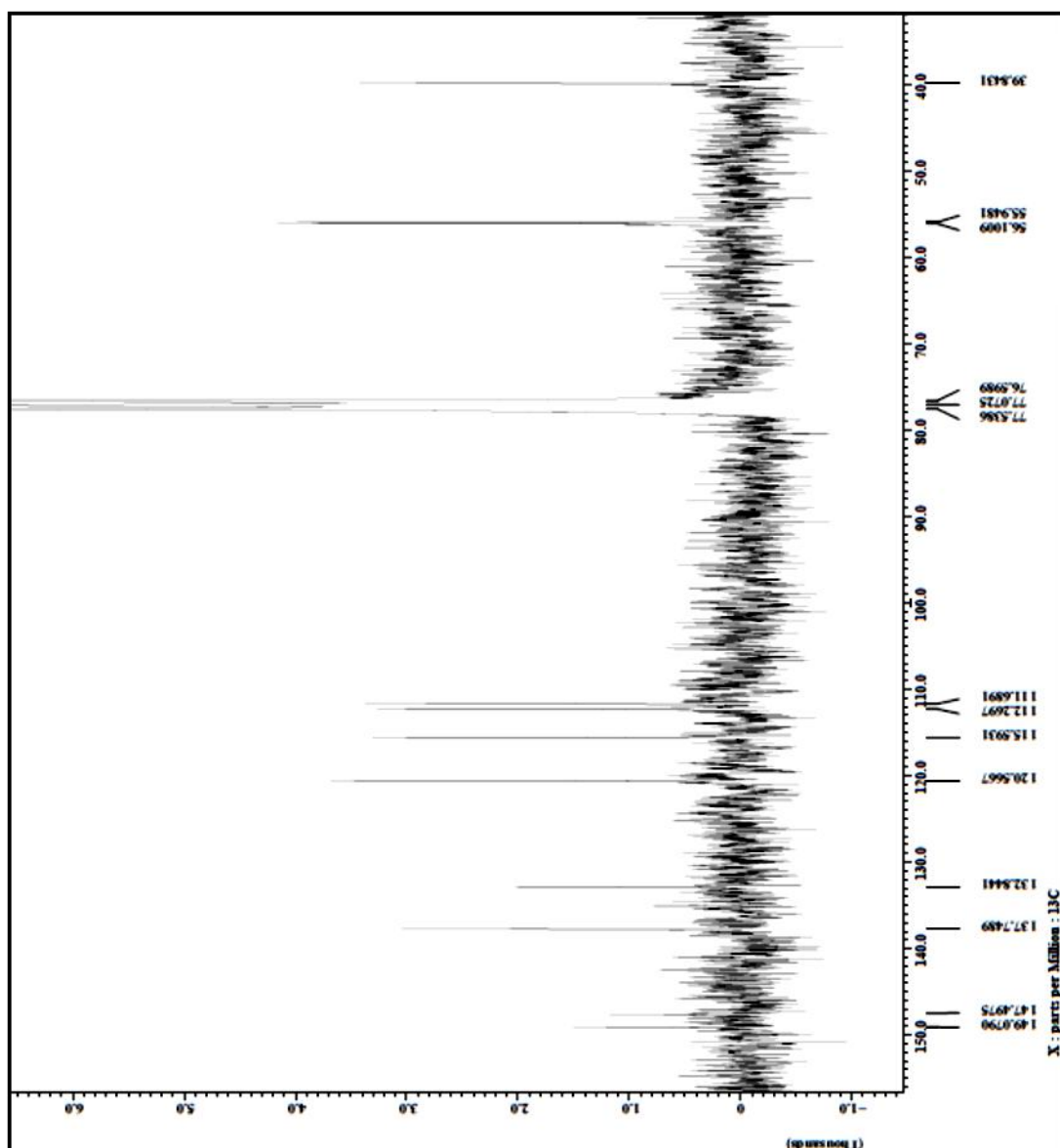
8. ANEXOS



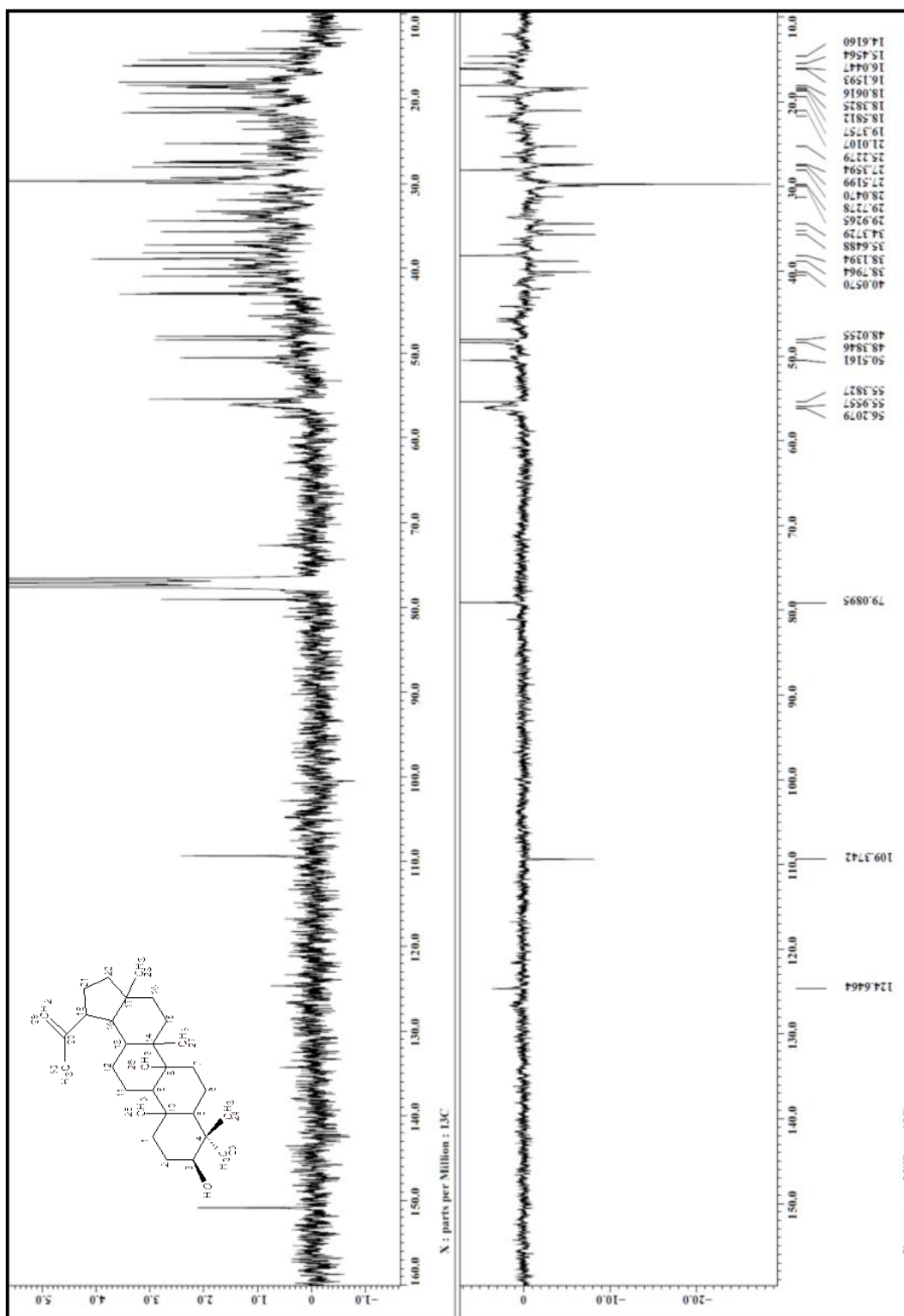
Anexo 1. Espectro
RMN ^1H del
compuesto I
(CDCl₃, 270 MHz)



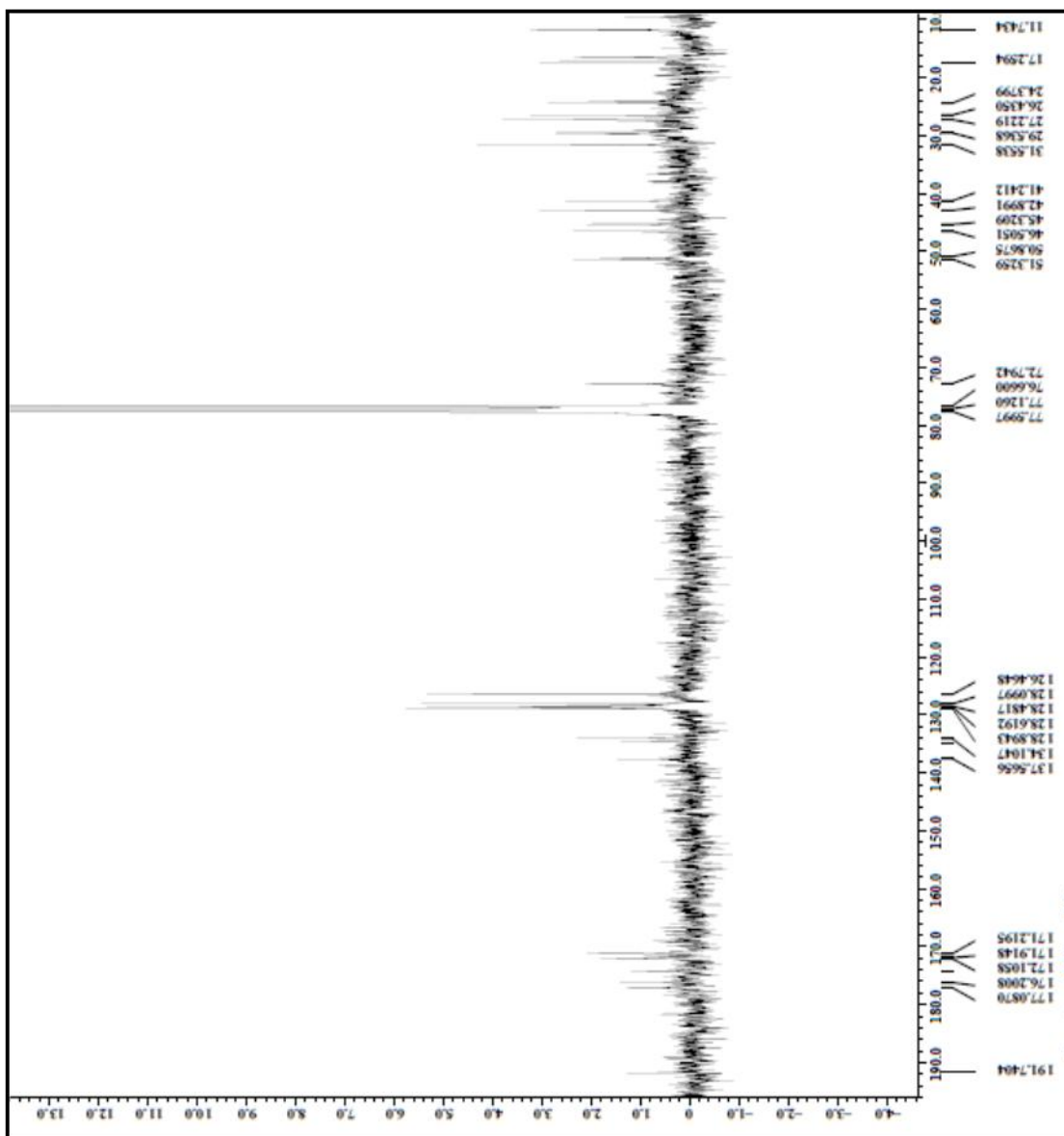




Anexo 5.
Ampliación
espectro RMN ^{13}C
del compuesto I
(CDCl_3 , 270 MHz)

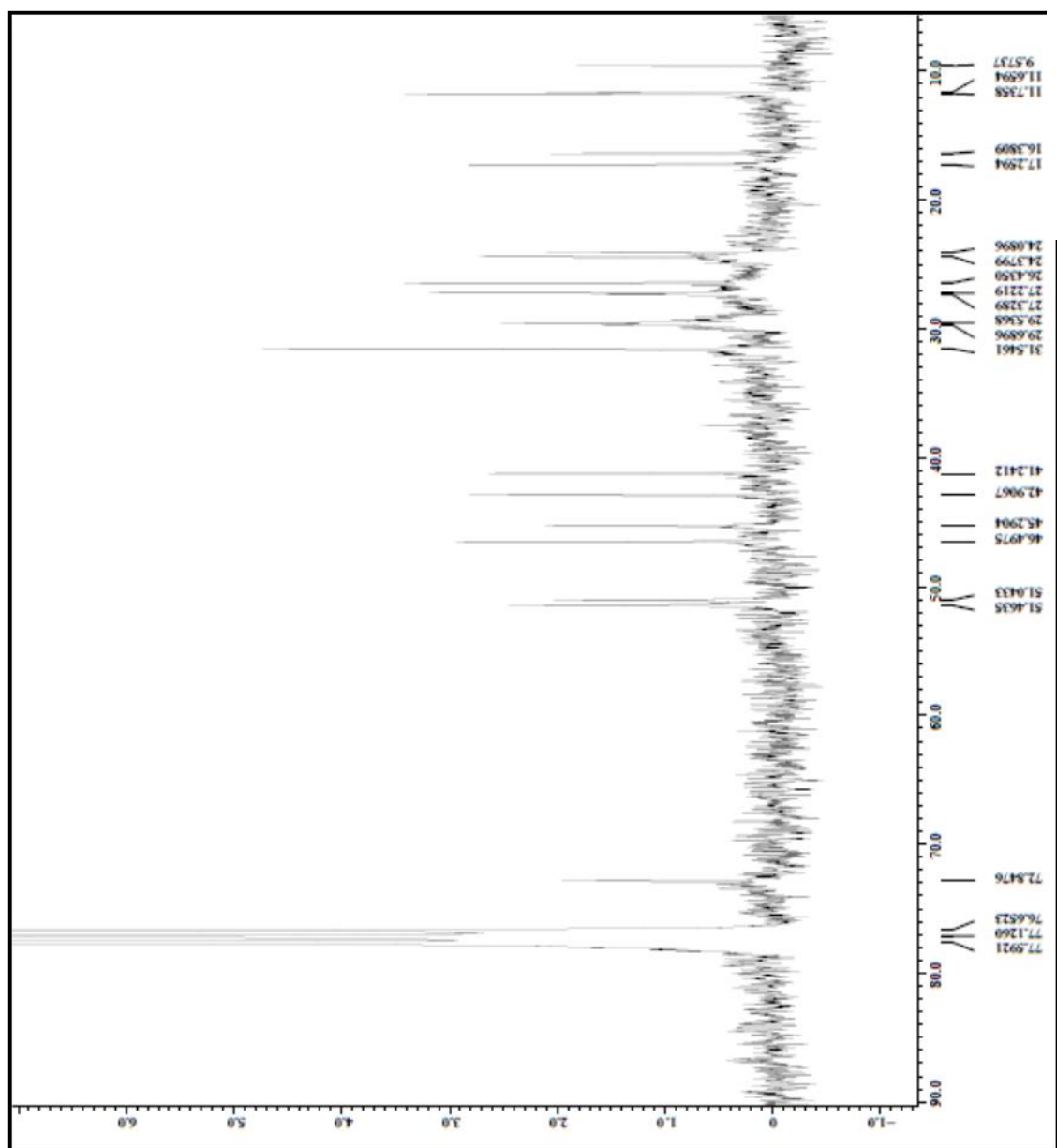


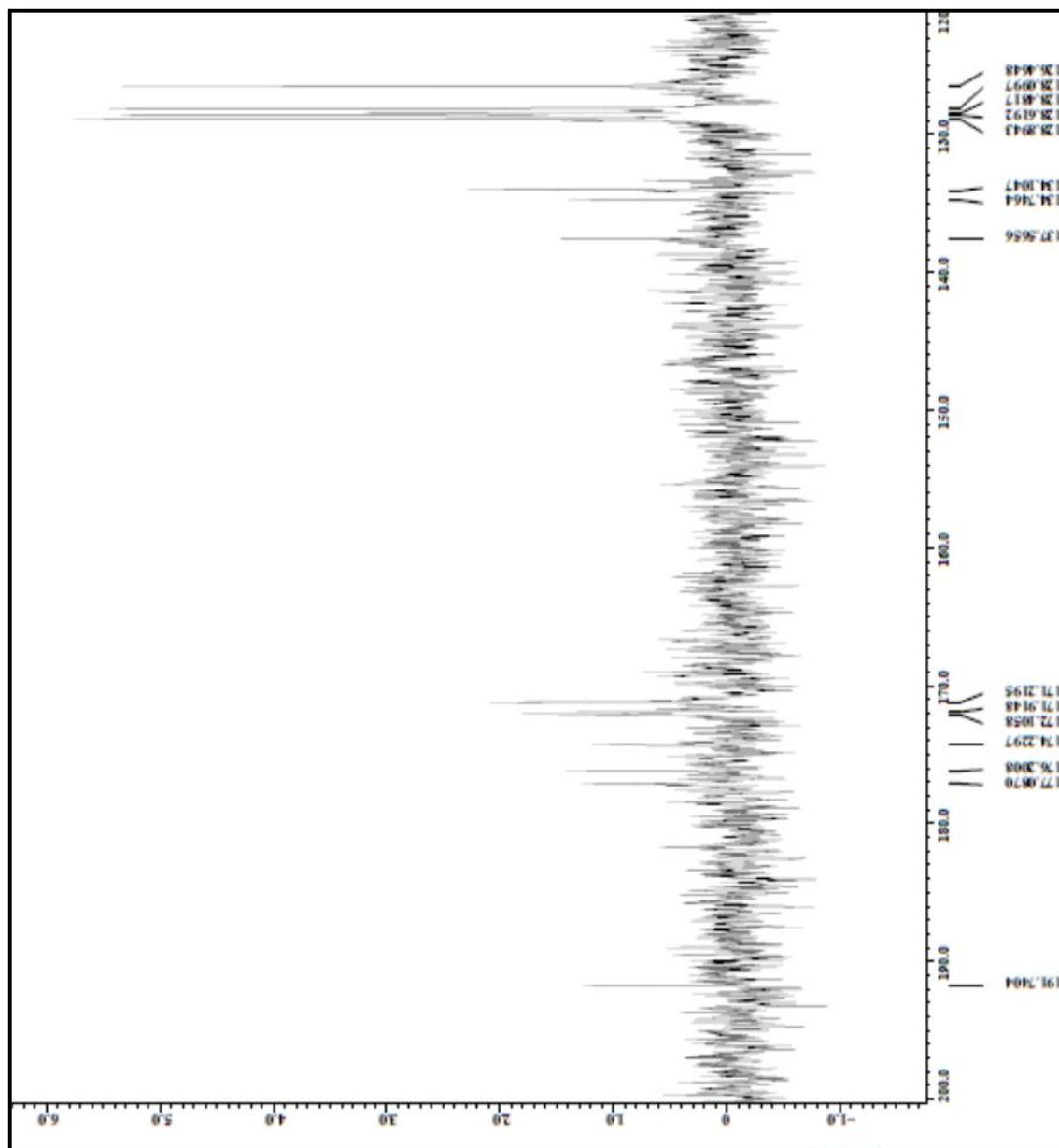
Anexo 6. Espectro
RMN ¹³C y DEPT-
135 del compuesto
III (CDCl₃, 270
MHz)



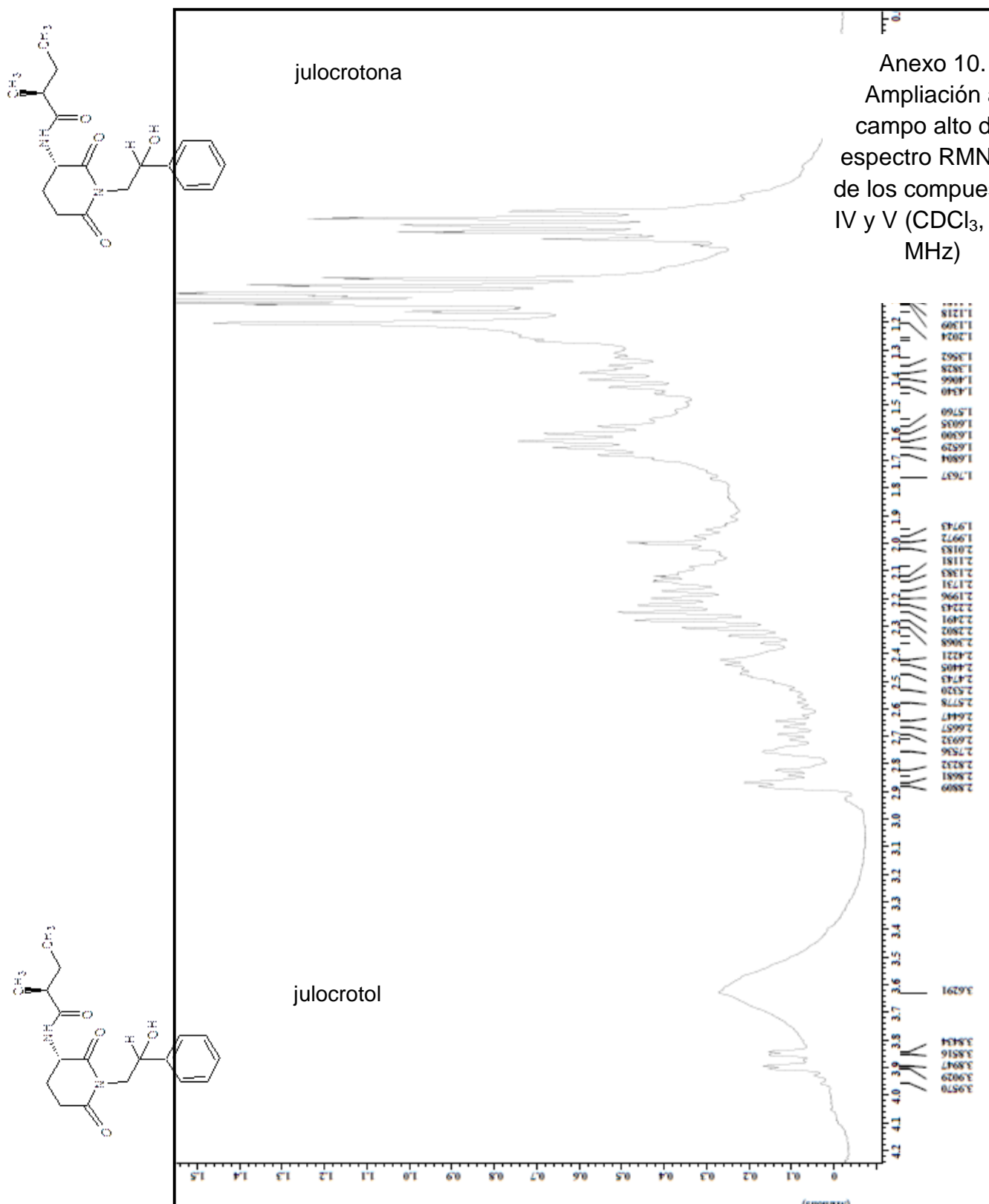
Anexo 7.
Ampliación
espectro RMN
del compuesto
(CDCl₃, 270 M

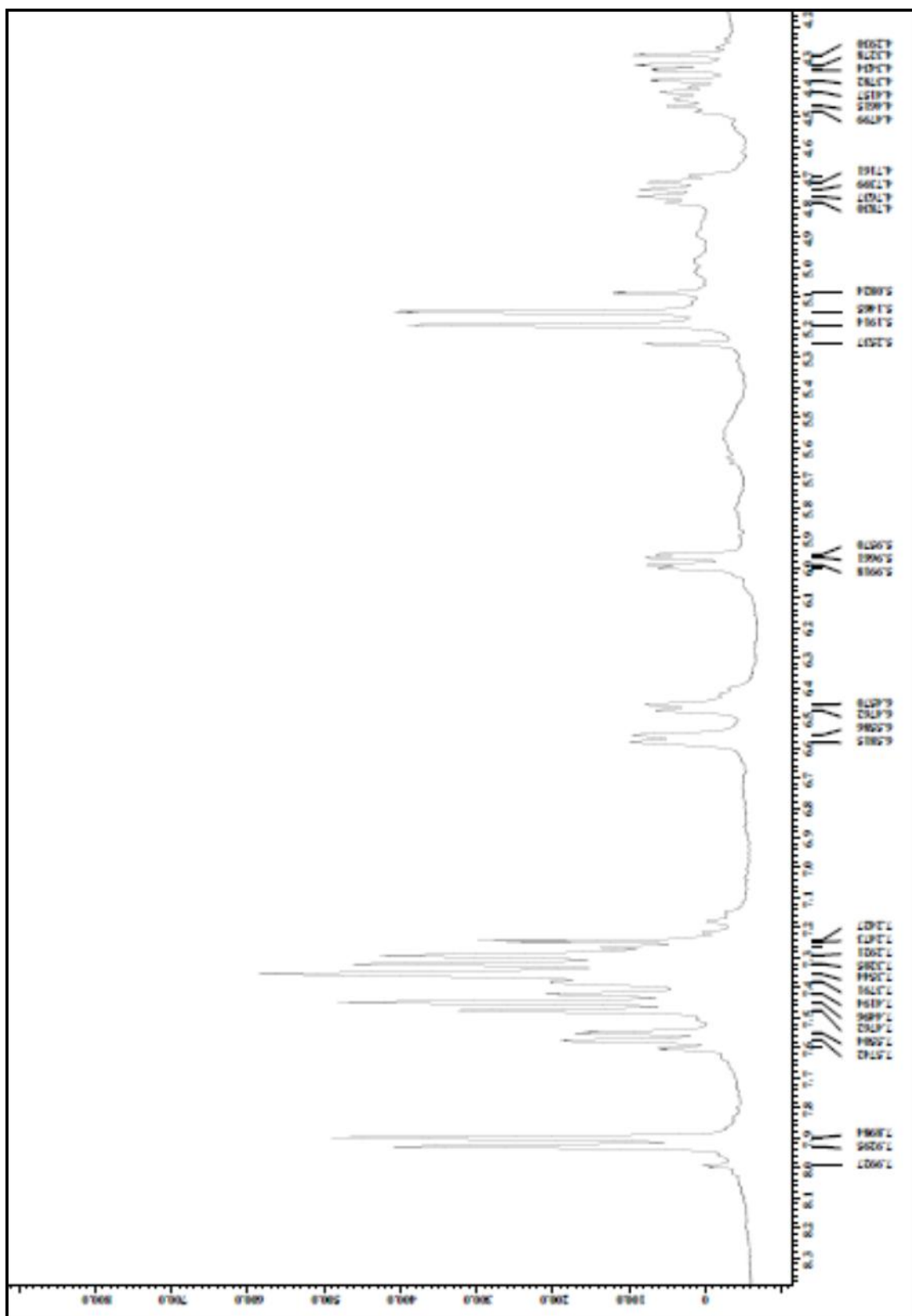
Anexo 8.
Ampliación
campo alto
espectro RMN
del compues
(CDCl₃, 270 M



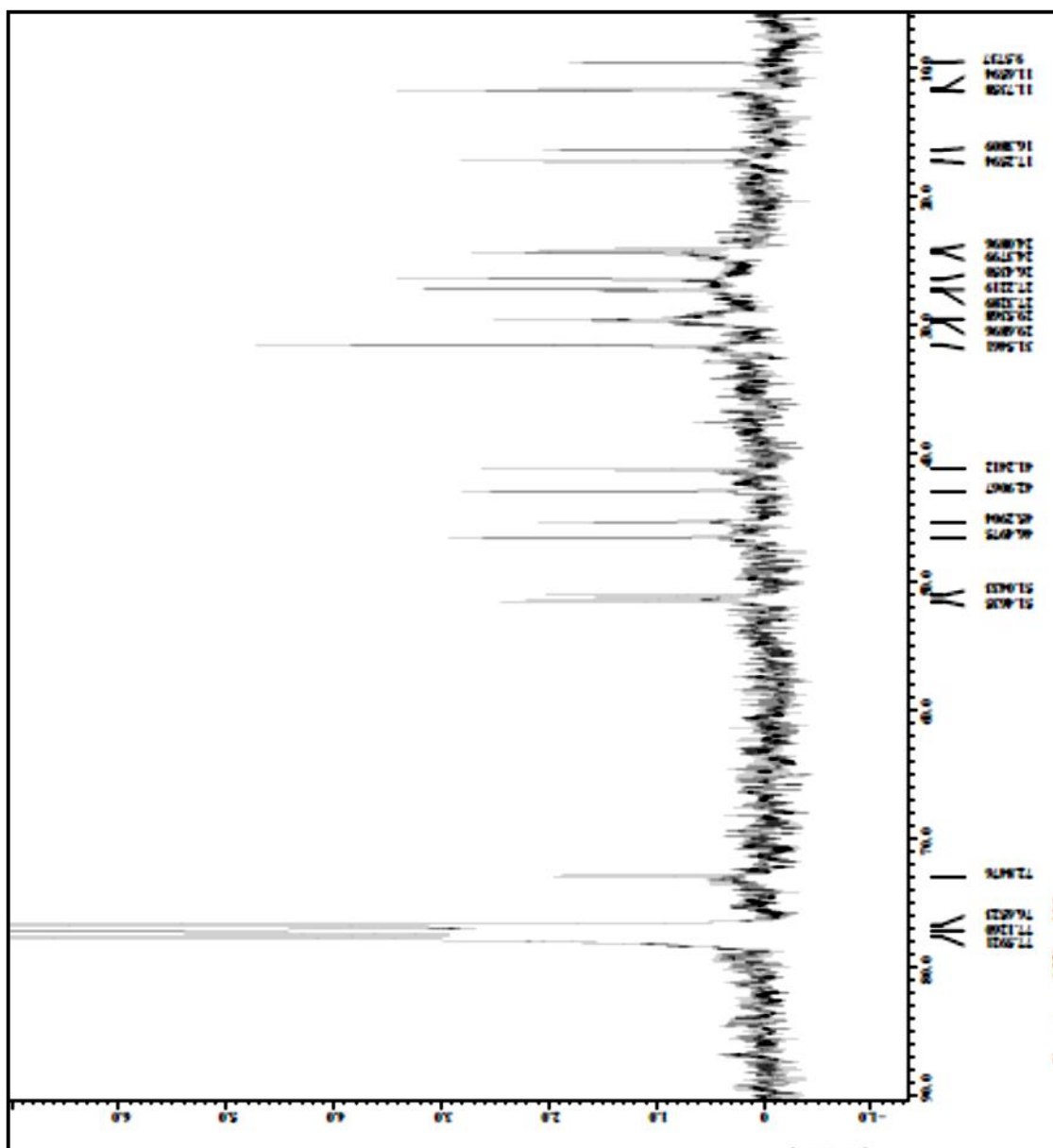


Anexo 9
Ampliació
campo baj
espectro RM
del compues
(CDCl_3 , 270





Anexo 12.
Ampliación de
espectro RMN
a campo alto
los compuestos
y V (CDCl₃, 2
MHz)



Anexo 13.
Ampliación de
espectro RMN ^{13}C
a campo bajo de
los compuestos
y V (CDCl_3 , 27
MHz)

