



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Croton abutiloides* de la familia Euphorbiaceae en la provincia de Loja**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Quituisaca Carrillo, Andrea del Cisne

DIRECTOR: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, Ph. D.

LOJA – ECUADOR

2015

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph. D.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Croton abutiloides* de la familia Euphorbiaceae en la Provincia de Loja” realizado por Quituisaca Carrillo Andrea del Cisne; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, mayo de 2015.

f) \_\_\_\_\_

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

CI: 110326907-0

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Andrea del Cisne Quituisaca Carrillo declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación “Extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Croton abutiloides* de la familia Euphorbiaceae en la Provincia de Loja”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Ph. D. Segundo Vladimir Morocho Zaragocín director del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f) \_\_\_\_\_

**Autora:** Andrea del Cisne Quituisaca Carrillo

**CI:** 1105041394

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de llegar con éxito a esta etapa de mi vida, por ser el pilar fundamental en mi vida y por todas las lecciones que me ha permitido aprender durante todo este tiempo y que me han convertido en mejor persona.

Con todo el cariño para mi madrecita Melida Flores que siempre ha estado a mi lado apoyándome y por compartir mis alegrías y fracasos, también a mi padre Giovanni Quituisaca, porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de entrega y esfuerzo, y a mi madre Rosa Carrillo, que me ha mostrado que para alcanzar nuestras metas se necesita de fortaleza para aceptar las derrotas y coraje para derribar miedos; por todo lo que han hecho por mí, por darme una educación de excelencia y por ser un ejemplo de vida.

A mi familia y a mis amigas que se han mantenido junto a mí durante todo este proceso y han estado alentándome siempre para no darme por vencido.

Andrea del Cisne Quituisaca Carrillo

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a toda mi familia por brindarme apoyo y aliento cuando lo he necesitado, por ayudarme a superar obstáculos y así poder alcanzar mis metas.

Especial agradecimiento a mi tutor de tesis Ph. D. Vladimir Morocho por todos sus valiosos conocimientos impartidos, su esfuerzo y dedicación, quién con su experiencia, su paciencia y su motivación, que ayudan a formarte como persona e investigador, ha logrado que pueda terminar este proceso con éxito.

De igual forma agradecer al M.Sc Luis Cartuche, Ing. James Calva, e Ing. Mónica Vega que de una u otra forma formaron parte de este proyecto.

Finalmente expreso mi gratitud al Departamento de Química Aplicada y a la Universidad Técnica Particular de Loja, que me han sabido formar como profesional y como persona, cultivando valores y conocimientos esenciales para la vida.

Andrea del Cisne Quituisaca Carrillo

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	6
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO 1.....	15
GENERALIDADES .....	15
1.1 Plantas Medicinales.....	16
1.2 Familia Euphorbiaceae .....	17
1.3 Género <i>Croton</i> .....	18
1.4 <i>Croton abutiloides</i> .....	19
1.4.1 Taxonomía.....	19
1.5 Metabolitos de interés de <i>Croton abutiloides</i> .....	20
1.5.1 Terpenos. ....	20
1.5.1.1 Triterpenos. ....	20
1.5.1.2 Ruta Biosintética de los terpenos.....	21
1.5.2 Ácidos Grasos.....	22
1.5.2.1 Fitoesteroles. ....	23
1.5.2.2 Biosíntesis de los Ácidos Grasos.....	23
1.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	24
1.7 Espectrometría de Masas (CG-EM) .....	25
1.8 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	26
1.9 Microdilución en Caldo.....	26
1.10 Enfermedades Infecciosas.....	26
1.10.1 Bacterias Gram Positivas.....	27
1.10.2 Bacterias Gram Negativas. ....	28
1.11 Dermatofitosis.....	30
CAPITULO 2.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1 Esquema de metodología utilizada .....	33
2.2 Recolección del Material Vegetal.....	34

2.3	Selección del Material Vegetal.....	34
2.4	Obtención de Extractos.....	34
2.5	Desclorofilación del extracto de Acetato de Etilo.....	34
2.6	Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo .....	35
2.7	Cromatografía de capa fina.....	35
2.8	Purificación de la fracción AQ002/21 .....	35
2.8.1	Elucidación química de las sustancias aisladas.....	36
2.9	Fraccionamiento del extracto de Hexano .....	36
2.10	Cromatografía de Capa Fina.....	36
2.11	Purificación de la fracción AQ053/41 .....	37
2.11.1	Elucidación química de las sustancias aisladas.....	37
2.12	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) .....	37
2.13	Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI) .....	38
2.14	Microorganismos de prueba.....	38
2.15	Preparación de las muestras .....	39
2.16	Preparación del cultivo overnight .....	39
2.17	Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias.....	40
2.18	Preparación de la suspensión del inóculo para hongos .....	40
2.19	Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana .....	40
2.20	CMI antifúngico.....	41
CAPITULO 3.....		42
RESULTADOS Y ANÁLISIS .....		42
3.1	Extractos obtenidos de la especie <i>Croton abutiloides</i> .....	43
3.2	Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo .....	43
3.2.1	Fracción AQ002/21.....	44
3.2.1.1	<i>Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de AQ001/27.....</i>	44
3.3	Fraccionamiento del extracto de Hexano .....	46
3.3.1	Fracción AQ053/41.....	47
3.3.1.1	<i>Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de AQ123/55.....</i>	48
3.4	Actividad Antimicrobiana de los extractos de <i>Croton abutiloides</i> .....	51
3.5	Actividad Antifúngica de los extractos de <i>Croton abutiloides</i> .....	52
CONCLUSIONES .....		54
RECOMENDACIONES .....		55
BIBLIOGRAFÍA.....		56
ANEXOS.....		63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Características de la Columna Capilar.....	37
<b>Tabla 2:</b> Método de análisis de la columna DB-5MS para AQ001/27 y AQ123/55.....	37
<b>Tabla 3:</b> Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	39
<b>Tabla 4:</b> Medios de cultivos para hongos.....	40
<b>Tabla 5:</b> Rendimiento de extractos obtenidos de Croton abutiloides.....	43
<b>Tabla 6:</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Acetato de Etilo. ....	43
<b>Tabla 7:</b> Espectro <sup>13</sup> CNMR Escualeno .....	45
<b>Tabla 8:</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Hexano.....	47
<b>Tabla 9:</b> Espectro <sup>13</sup> C NMR de β-Sitosterol.....	49
<b>Tabla 10:</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de Croton abutiloides frente a bacterias Gram positivas y negativas. ....	51
<b>Tabla 11:</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de Croton abutiloides frente a Hongos Dermatofitos. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Croton abutiloides .....	19
<b>Figura 2:</b> Estructura del isopreno .....	20
<b>Figura 3:</b> Ruta Biosintética de los Terpenos .....	22
<b>Figura 4:</b> Staphylococcus aureus .....	27
<b>Figura 5:</b> Enterococcus faecalis .....	28
<b>Figura 6:</b> Escherichia coli .....	28
<b>Figura 7:</b> Proteus vulgaris .....	29
<b>Figura 8:</b> Pseudomona aeruginosa .....	29
<b>Figura 9:</b> Salmonella typhimurium .....	30
<b>Figura 10:</b> Colonias de Klebsiella pneumoniae.....	30
<b>Figura 11:</b> Trychophyton rubrum .....	31
<b>Figura 12:</b> Trychophyton mentagrophytes .....	31
<b>Figura 13:</b> Esquema del desarrollo de la investigación.....	33
<b>Figura 14:</b> Columna cromatográfica. ....	35
<b>Figura 15:</b> Columna comatográfica. ....	36
<b>Figura 16:</b> Esquema de microdilución en caldo de bacterias y hongos. (Kp= Klebsiella pneumoniae, Pa= Pseudomonas aeruginosa, Sa= Salmonella tiphymurium, Ec= Escherichia coli, Pv= Proteus vulgaris, Ef= Enterococcus faecalis, Sa= Saphylococcus aureus, Tm= Trichophyton mentagrophytes, Tr= Trichophyton rubrum).....	41
<b>Figura 17:</b> TLC 9:1 Hexano-Acetato de Etilo; a) Luz UV 254 nm; b) Luz UV 365 nm; c) TLC revelada .....	44
<b>Figura 18:</b> Escualeno .....	46
<b>Figura 19:</b> TLC revelada .....	48
<b>Figura 20:</b> $\beta$ -sitosterol .....	50

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1a:</b> Espectro de <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCL <sub>3</sub> ) de Escualeno.....	64
<b>Anexo 1b:</b> Espectro de <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, CDCL <sub>3</sub> ) de Escualeno.....	65
<b>Anexo 1c:</b> Espectro de CG-EM de Escualeno.....	66
<b>Anexo 2a:</b> Espectro de <sup>1</sup> H NMR (400 MHz, CDCL <sub>3</sub> ) de β-sitosterol.....	68
<b>Anexo 2b:</b> Espectro de <sup>13</sup> C NMR (101 MHz, CDCL <sub>3</sub> ) de β-sitosterol.....	69
<b>Anexo 2c:</b> Espectro de CG-EM de β-sitosterol.....	70

## RESUMEN

En el presente estudio a partir de *Croton abutiloides* utilizando diferentes técnicas espectroscópicas ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  y CG-EM), se aislaron e identificaron dos compuestos: uno de origen terpénico conocido como Escualeno con fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$  y un peso molecular de 410,7 g/mol del extracto de Acetato de Etilo; y un ácido graso conocido como  $\beta$ -sitosterol con fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  y un peso molecular de 414 g/mol del extracto de Hexano.

La actividad antimicrobiana de los extractos totales y los extractos desclorofilados fue evaluada contra siete cepas de bacterias gram positivas y gram negativas y dos cepas de hongos usando el método de microdilución en caldo, donde no se encontró ninguna actividad antimicrobiana ni antifúngica.

**Palabras claves:** *Croton abutiloides*, Euphorbiaceae, escualeno,  $\beta$ -sitosterol.

## ABSTRACT

In the present study of *Croton abutiloides* using different spectroscopic techniques ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and GC-MS), two compounds were isolated and identified: one of terpene origin known as squalene with molecular formula  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$  and a molecular weight of 410.7 g/mol from the ethyl acetate extract; also isolated was a fatty acid known as  $\beta$ -sitosterol with molecular formula  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  and a molecular weight of 414 g/mol from the Hexane extract.

The antimicrobial activity both the total extracts and non-chlorophyllous extracts was evaluated against seven strains of gram positive and gram negative bacteria and two fungal strains using the broth microdilution method where antimicrobial or antifungal activity were not found.

**Key Words:** *Croton abutiloides*, Euphorbiaceae, squalene,  $\beta$ -sitosterol.

## INTRODUCCIÓN

El doble papel que juegan hoy las plantas medicinales, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes, colectores y manufactureros de medicinas basadas en plantas, contribuye de una manera importante al proceso del desarrollo. No obstante, la materia prima requerida no siempre está a disposición; en algunos casos, especies con valor medicinal se encuentran en poca cantidad y esto plantea una amenaza tanto para el bienestar humano como para las especies silvestres (Mulliken, 1998).

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido utilizados durante siglos en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosas como materia prima en la preparación de medicamentos modernos para la industria farmacéutica y herbal (fitofármacos), cuyo mercado, presenta un aumento significativo (Buitrón, 1999).

El género *Croton* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, comprenden más de 1500 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Tradicionalmente estas especies son utilizadas para el tratamiento de numerosas enfermedades. Gran número de poblaciones indígenas, especialmente de Sudamérica han utilizado el látex o infusiones de las hojas o corteza de diferentes especies de *Croton* para el tratamiento de heridas, dolores estomacales, inflamaciones, hipertensión y cáncer; habiéndose identificado ciertos flavonoides como posibles responsables de algunas de estas actividades. El género *Croton* es una especie rica en compuestos de naturaleza diterpénica. (Puebla, et al, 2004)

Los metabolitos secundarios presentes en el género *Croton* son considerablemente diversos, los más predominantes en el género son los terpenoides, principalmente diterpenoides, a los que pueden pertenecer el cembranoid, clerodano, neoclerodane, halimane, isopimarane, kaurane, secokaurane, labdano, forbol y trachylobane de tipo esqueléticos. Triterpenoides, ya sea pentacíclicos o esteroides, con frecuencia se han reportado. Los aceites volátiles que contienen mono y sesquiterpenoides y compuestos a veces también derivados del shikimato no son raros en el género. Varias especies han sido reportadas como fuentes de diferentes clases de alcaloides, un hecho que mejora considerablemente la importancia del género desde el punto de vista medicinal. Sustancias fenólicas se han observado con frecuencia, entre los cuales los flavonoides, lignoides y proantocianidinas predominan. (Nath, et al, 2013)

Las especies de *Croton* también contienen varios tipos de alcaloides, isoquinolinas (aporfinas como sparsoflorina; proaporfinas como crotsparinina), morfinandienonas (crotonosina), quinolinas (vasicina), alcaloide pirrolidina (ácido 4-hidroxihiagrínico) y otros (taspina, alcaloide de estructura inusual) (Salamanca, 2002).

## **CAPITULO 1**

### **GENERALIDADES**

## 1.1 Plantas Medicinales

El uso medicinal de las plantas tiene su inicio desde que el ser humano estuvo en íntimo contacto con la naturaleza. Durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Núñez, 1982).

La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta. Esta situación ha originado una preocupación creciente por la biodiversidad y por el estado natural de las plantas y árboles con propiedades curativas (Quezada, 2008).

Las plantas han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país. Se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, para la atención primaria de la salud y bienestar (Buitrón, 1999). En las ciudades el uso de plantas medicinales es menor y principalmente relegado a personas que viven en zonas urbano-marginales y de condición socioeconómica baja. No obstante, el uso y comercio de plantas medicinales se mantiene como una práctica activa en los mercados de las ciudades ecuatorianas y particularmente en las urbes del callejón interandino, en donde se expenden por lo menos 273 especies de hierbas medicinales, mismas que se emplean para tratar más de 70 dolencias (Cerón, 2006).

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido milenariamente utilizados en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos (occidentales) para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo. Se estima que el mercado mundial de fármacos de origen vegetal es de aproximadamente 35 mil millones de dólares anuales (Buitrón, 1999).

Los metabolitos secundarios se refieren a las sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis y que intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos, y protección a los rayos UV, entre otros (Vivanco et al, 2005). La mezcla de metabolitos secundarios son únicos para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia

geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Avello & Cisternas, 2010).

## 1.2 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae comprende árboles, arbustos, lianas y hierbas; esta familia se caracteriza por presentar látex o exudado coloreado y estípulas de diversas formas; las hojas son simples, espiraladamente dispuestas y sólo en algunas especies de *Euphorbia* son opuestas; generalmente presentan glándulas de diversas formas en la lámina y a veces sobre el pecíolo. Las flores son unisexuales y generalmente apétalas; el ovario es súpero, sincárpico y en la mayoría de géneros formado por tres carpelos, que contienen uno o dos óvulos. El fruto es una cápsula esquizocárpica con dehiscencia explosiva; que deja una columela central. La semilla tiene un rafe muy notorio y generalmente presenta carúncula o arilo (Murillo, 2004).

La familia Euphorbiaceae es la sexta familia más diversa entre las Angiospermas, después de las Orchidaceae, Compositae, Leguminosae, Gramineae y Rubiaceae (Vera, 2012).

Presenta cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros (Webster, 1994) y cerca de 8100 especies (Mabberley, 1998) distribuidas en todo el mundo, con excepción de las zonas polares, estando mejor representadas en las regiones tropicales y subtropicales.

Esta se compone de 5 subfamilias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae y Euphorbioideae, las dos primeras con dos óvulos por lóculo (condición plesiomórfica) mientras que las tres últimas sólo tienen un óvulo (condición apomórfica) (Martínez et al, 2002).

La subfamilia Crotonoideae presenta 12 tribus, 67 géneros y 1436 especies con dos centros de diversificación importantes: uno en Asia con 34.32 % de los géneros y otro en América que tiene el 32.8 % de los mismos. Entre los géneros más diversos se encuentran *Croton* con 800 especies, y *Jatropha* con 175, ambos distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Webster, 1994).

Con respecto a la familia Euphorbiaceae, se han identificado muchos compuestos biológicamente activos que poseen la capacidad de modular la función inmune. La actividad biológica de extractos y compuestos de algunas especies de esta familia contrasta su toxicidad con sus propiedades terapéuticas. Por un lado, algunos extractos son tóxicos, como el extracto de las hojas de *Euphorbia lathyris* que puede producir envenenamiento al

ser ingerido y otros son irritantes como el látex de *Euphorbia tirucalli*, que puede ocasionar conjuntivitis aguda. Por otro lado, existen otros extractos o compuestos que tienen actividad antitumoral (Llanes, 2009).

Entre los compuestos con actividad biológica aislados de la familia Euphorbiaceae, se encuentran los terpenoides, flavonoides, taninos, lignanos, y compuestos polifenólicos, cumarinas, lectinas y péptidos; se han identificado más de 55 terpenos, presentes principalmente en el látex de las plantas. Los terpenos, que son biosintéticamente derivados de unidades de isopreno, son utilizados por las plantas para protección contra herbívoros y patógenos (Llanes, 2009).

Con respecto al efecto inmunomodulador de estos metabolitos, se ha encontrado que la pepluanona, un terpeno aislado de *Euphorbia peplus* que atenúa la producción de óxido nítrico, prostaglandina E2 y TNF- $\alpha$  en macrófagos murinos estimulados con lipopolisacáridos, un efecto debido a una inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B. También se han encontrado algunos diterpenos con actividad sobre la proliferación celular (Llanes, 2009).

### **1.3 Género *Croton***

*Croton* incluye desde hierbas a árboles, con muy 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 tricarpelar, con un óvulo por lóculo. Estas características sumadas a la disposición de las flores femeninas en la inflorescencia, al número de partes del cáliz, la división de los estilos y el grado de desarrollo de los sépalos femeninos han servido para diferenciar las especies del género. Otros caracteres como las estípulas, el tipo de venación, la forma de las hojas y las glándulas no han sido considerados y representan elementos importantes en la diferenciación de las especies (Murillo, 1999).

Los compuestos presentes en *Croton* podrían ser la base de importantes datos de carácter sistemático que ayudarían a resolver las relaciones filogenéticas del grupo. Además, la amplia gama de alcaloides, terpenos y otros compuestos químicos (Farnsworth et al, 1969) poseen propiedades medicinales, industriales, tóxicas y carcinógenas (Schultes, 1987), que las convierten en entidades con un alto potencial económico (Murillo, 1999).

#### 1.4 *Croton abutiloides*

*Croton abutiloides* es un arbusto, tomentoso; sus hojas son alternas, pecioladas, de borde entero, tomentosas en el envés y casi glabras en el haz, base cordada, ápice acuminado, 20-30 cm de largo, 8-13 cm de ancho. Inflorescencia en racimos terminales con flores blancas y frutos de 6-8 mm de diámetro. (Santa Cruz, 2011)

Tiene un uso apícola ya que las abejas visitan las flores de esta especie, uso medicinal debido a que el látex de esta especie se utiliza para tratar el dolor de muslos y uso medioambiental ya que la planta se usa como cerca viva. (De la Torre et al, 2008).



**Figura 1:** *Croton abutiloides*

**Fuente:** La autora, 2014.

##### 1.4.1 Taxonomía.

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Malpighiales
<b>Familia</b>	Euphorbiaceae
<b>Género:</b>	<i>Croton</i>
<b>Nombre Científico:</b>	<i>Croton abutiloides</i>

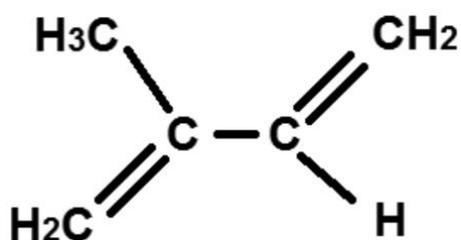
## 1.5 Metabolitos de interés de *Croton abutiloides*

### 1.5.1 Terpenos.

Los terpenos son hidrocarburos que pertenecen a las familias de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas; constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes) (Ormeño & Fernández, 2012).

Según Rosellón (2005) Ruzicka racionalizó la biogénesis de este grupo de compuestos, siendo el “padre” de la regla biogénica del isopreno. Atendiendo a esta regla, los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno que formen parte de su estructura: monoterpenos (C10, 2 unidades), sesquiterpenos (C15, 3 unidades), diterpenos (C20, 4 unidades), sesterterpenos (C25, 5 unidades), triterpenos (C30, 6 unidades) y tetraterpenos (C40, 8 unidades).

Estos compuestos tienen un origen biosintético común, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Lopez et al, 2012).



**Figura 2:** Estructura del isopreno

**Fuente:** Lopez et al, 2012.

#### 1.5.1.1 Triterpenos.

Se trata de moléculas constituidas por 30 carbonos agrupados en ciclos de cinco o seis carbonos con diferentes sustituyentes (Fernández, 2014).

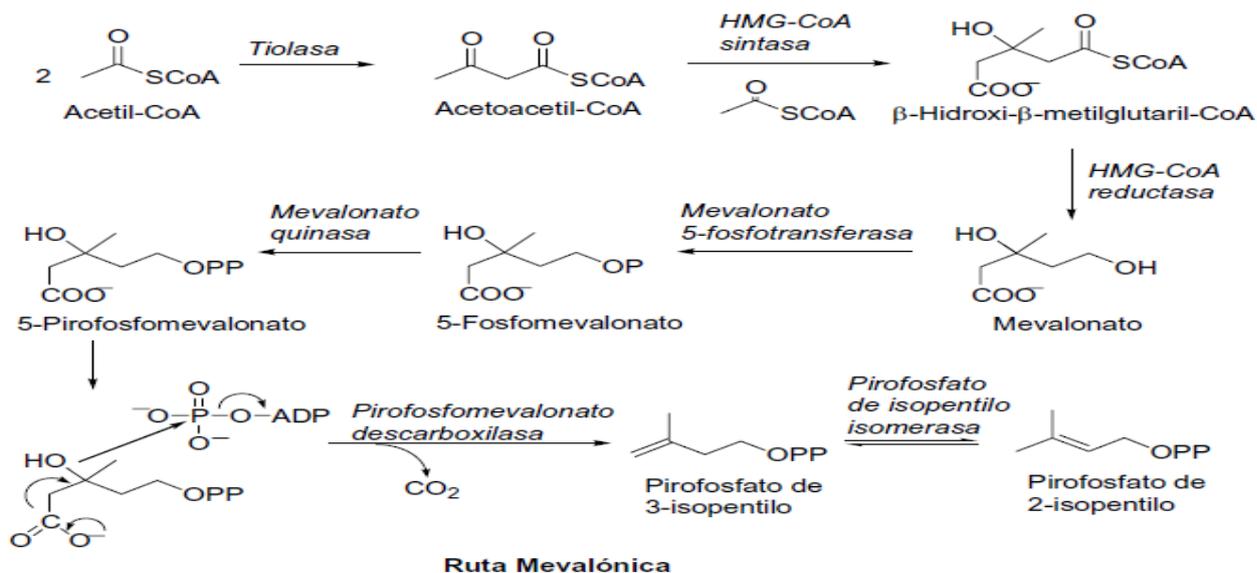
Los triterpenos se sintetizan a través de la vía citoplasmática de acetato/mevalonato a partir del acetyl-CoA, el cual se transforma en unidades de isopreno activo. La condensación de seis moléculas de isopreno activo y un precursor común, (3S)-2,3-oxidosqualeno (OS), da lugar a los triterpenos (Peragón et al, 2013).

Los triterpenos se han convertido en el punto de mira de numerosas investigaciones ya que son unos compuestos con un gran potencial farmacéutico gracias a sus propiedades biológicas y terapéuticas. Años atrás se han utilizado como remedios caseros frente a diversas enfermedades pero estudios recientes corroboran estos efectos sobre la salud (Fernández, 2014).

#### **1.5.1.2 Ruta Biosintética de los terpenos**

La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas y esteroides (Ávalos & Pérez, 2009).

La biogénesis de terpenos se inicia a partir de ácido mevalónico (ácido (*R*)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), que se forma por condensación de tres unidades de acetil-CoA (Figura 3). Posteriormente la fosforilación del hidroxilo en C-5 y descarboxilación conducen a pirofosfato de 3-isopentenilo. Éste puede isomerizarse a pirofosfato de  $\gamma,\gamma$ -dimetilalilo (pirofosfato de 2-isopentenilo), que presenta una gran reactividad en reacciones de sustitución nucleofílica. Ésta constituye la ruta mevalónica, que fue considerada como la fuente universal de isopreno. Sin embargo hace relativamente poco tiempo los grupos de Rohmer y Arigoni plantearon, como consecuencia de estudios de incorporación de isótopos estables en diversas plantas y eubacterias, una segunda ruta a partir de piruvato y triosa fosfato (Rosellón, 2005).



**Figura 3:** Ruta Biosintética de los Terpenos

**Fuente:** Rosellón, 2005.

El doble enlace nucleófilo del 3-isopentenilo, sufre la adición electrofílica una vez eliminado el grupo pirofosfato de 2-isopentenilo, dando lugar tras la pérdida de un protón por parte del intermedio de reacción carbocatiónico, al monoterpeno acíclico, denominado geranil pirofosfato. Este precursor acíclico es susceptible de transformación en los más diversos esqueletos de monoterpenos, dependiendo de las enzimas que intervengan. Si el geranil pirofosfato condensa con una nueva unidad isoprénica en forma de pirofosfato de 3-isopentenilo por la acción de la enzima geranil transferasa, se obtiene pirofosfato de farnesilo que es el origen de todos los compuestos sesquiterpénicos. La prenilación de farnesil pirofosfato con pirofosfato de 3-isopentenilo, da lugar a geranil-geraniol pirofosfato, intermedio de los compuestos diterpénicos; por otro lado el acoplamiento cabeza-cabeza de dos unidades de pirofosfato de farnesilo conduce a escualeno, con la intervención de la escualeno sintetasa. Éste es el precursor de los triterpenos (Rosellón, 2005).

### 1.5.2 Ácidos Grasos.

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22. Sin embargo, también existen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par. Los ácidos grasos presentes en el organismo se encuentran en su forma saturada, principalmente como ácido palmítico, o en la forma insaturada debido a la presencia de dobles ligaduras. Los ácidos grasos insaturados pueden ser monoinsaturados y poliinsaturados (Rodríguez et al, 2005).

### **1.5.2.1 Fitoesteroles.**

Son esteroides vegetales (compuestos con 28 o 29 átomos de carbono), de estructura similar al colesterol (27 carbonos). Derivan del ciclohexano perhidrofenantreno, diferenciándose en la cadena hidrocarbonada lateral. En el colesterol, esta cadena se forma por ocho carbonos saturados. En cambio, los fitosteroides presentan 9 o 10 carbonos ( $\beta$ -sitosterol y campesterol) (Muñoz et al, 2011).

Se ha demostrado que los fitosteroides son beneficiosos para la salud, al atribuírsele propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas. Sin embargo, el efecto mayormente estudiado ha sido su acción hipocolesterolémica, al disminuir la absorción del colesterol digerido (Moreno, 2010).

### **1.5.2.2 Biosíntesis de los Ácidos Grasos.**

Según Richter, 1972; el primer paso en la biosíntesis de los ácidos grasos es la adición de  $\text{CO}_2$  a la acetil-CoA, mediante consumo de ATP, formándose entonces la malonil-CoA. Esta reacción está catalizada por la enzima acetilCoA carboxilasa (ACC) cuyo cofactor es la biotina.

La síntesis de una molécula de ácido graso de cadena larga, tiene lugar mediante un ciclo de reacciones en el cual participan en total siete enzimas, unidas entre sí para formar una unidad estructural funcional denominado complejo multienzimático.

La secuencia de reacciones para la síntesis de una nueva molécula de ácido graso, comienza con la unión de un resto acetilo al grupo -SH periférico. Luego reacciona la malonil-CoA con el grupo SH central del complejo enzimático. En la acetil-malonil-enzima que se formó, están los dos fragmentos  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_3$ , debido a sus uniones a los dos grupos funcionales, listos para la "condensación". El grupo acetilo reacciona con el ácido malónico con formación de  $\text{CO}_2$  y de acetoacetil-enzima. Luego ocurre una reducción del cetoácido fijado, mediante el  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , o sea, por medio del metabolito de transporte de hidrogeno activo en procesos sintéticos. El producto de la reacción, el ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, es luego sometido a una eliminación de agua, lo que produce el compuesto  $\text{C}_4$  no saturado del ácido crotonico. Este sirve de sustrato para la segunda reducción en la cual, otra vez el  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  proporciona el hidrogeno. Sin embargo el H no es adicionado directamente al etileno, sino mediante el flavinmononucleótido como coenzima específica. El ácido saturado es ahora transferido al grupo -SH periférico, mientras que el grupo -SH

central es cargado de nuevo con un resto de malonilo, que proviene de la malonil-CoA. Con la butiril-maloni-enzima como compuesto inicial se repite el ciclo de reacciones descritas; al final se obtiene el resto del ácido carboxílico saturado, alargado por dos átomos de carbono. El ciclo se recorre tantas veces hasta que finalmente, debido al alargamiento sucesivo de la cadena, se haya originado un ácido carboxílico C<sub>16</sub> o C<sub>18</sub>. Solamente entonces ocurre la liberación del producto de la reacción de su unión al complejo de la sintetasa

## 1.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, las propiedades del núcleo de hidrógeno. La RMN es un método relativamente moderno (en comparación a otras espectroscopias) pues data de 1946, año en el que Purcell, Bloch y Packard obtuvieron los primeros resultados y elaboraron la teoría, el primer espectro con señales separadas para una molécula orgánica (Elguero et al, 2011).

La espectroscopía de RMN es posiblemente el método analítico más importante en la actualidad. Las razones son múltiples: se aplica a los químicos, gases físicos, líquidos, cristales líquidos y sólidos (incluidos los polímeros) (Terence & Burkhard, 2007).

Una señal RMN se caracteriza por cuatro propiedades: posición, multiplicidad, intensidad y anchura a media altura (Elguero, et al, 2011).

La frecuencia a la que aparece una señal de RMN depende principalmente de la intensidad del campo magnético. Dependiendo de la naturaleza de la muestra encontramos dos tipos de espectro RMN, cuyas formas vendrán determinadas por las interacciones magnéticas dominantes actuando sobre la muestra. Según Larraona & Manjavacas (2008) las principales interacciones son:

1. **El desplazamiento químico:** interacción entre los espines nucleares y su entorno dentro de la muestra.
2. **El acoplamiento J:** interacción dipolar indirecta entre los espines de dos núcleos vecinos a través de sus electrones.
3. **La interacción dipolo-dipolo:** interacción directa entre los momentos magnéticos de espín de dos núcleos vecinos. Tiene sentido para moléculas bien localizadas como en el caso de los sólidos.

A continuación se describe algunos de los experimentos utilizados:

**<sup>1</sup>H:** este experimento nos permite determinar el número de protones, desplazamientos químicos y acoplamientos H-H (Fina, 2009).

**<sup>13</sup>C:** Nos permite determinar el número de carbonos no equivalentes (Fina, 2009).

**COSY:** Es un experimento en 2D a partir del cual se obtiene información de la estructura secundaria y terciaria de una proteína teniendo en cuenta solo los acoplamientos escalares spin-spin. Este experimento está diseñado para correlacionar las transiciones de espines acoplados por transferencia de magnetización transversal desde una transición a otra en el curso de procesos de mezclado especialmente diseñados (Fina, 2009).

**DEPT:** permite la diferenciación de los CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, así como la identificación de los carbonos cuaternarios. El experimento DEPT tiene una sensibilidad superior (x 4) que el experimento básico de C, debido a que implica transferencia de magnetización de H—C (Fina, 2009).

**HMBC:** es un experimento de correlación de largo alcance que proporciona información acerca de carbonos unidos a protones que están a 2-3 enlaces de distancia. HMBC tiene aplicaciones en todos los campos para la identificación y la caracterización de la estructura del compuesto (Vasavi et al, 2011).

**HSQC:** es un experimento 2D que correlaciona el desplazamiento químico del protón con el desplazamiento químico del carbono unido directamente. Este experimento utiliza el acoplamiento de un enlace entre el carbono y el protón (Samuel et al, 2011).

## 1.7 Espectrometría de Masas (CG-EM)

La espectrometría de masas está basada en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente (Romero et al, 2007).

Un equipo de espectrometría de masas consta de cinco módulos fundamentales: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, analizador de masas, detector y procesador de datos.

Como sistema de introducción de muestra existen dos métodos cromatográficos distintos: el de líquido de alta resolución (HPLC) y el de gases (GC).

El primer paso (y posiblemente el más importante) en la interpretación de un espectro de masas es la identificación del ión molecular que es la forma ionizada del compuesto neutral. (Fernandez et al, 2009).

## **1.8 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La Concentración Mínima Inhibitoria, se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (Horna et al, 2005).

Para determinar la CMI de un antibiótico para una bacteria por técnica de dilución se prepara una serie de tubos con una cantidad determinada de caldo de cultivo en cada uno, se les incorpora una cantidad de antibiótico creciente de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas; se siembra las bacterias en los tubos, se incuban y a las 18 – 24 horas se observa el crecimiento. Esta técnica también puede realizarse en medios sólidos (Prats, 2008).

## **1.9 Microdilución en Caldo**

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de las CIM, es una técnica de dilución en un medio líquido realizada en placas con micropocillos. Los pocillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de un antibiótico en forma de suspensión liofilizada o desecada, por lo que solo debe añadirse el medio de cultivo líquido en el que se ha realizado la suspensión de la bacteria de interés (aproximadamente 200  $\mu$ L), tras la incubación se determina la CIM (Prats, 2008).

## **1.10 Enfermedades Infecciosas**

La enfermedad infecciosa es un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano y la respuesta inmune del mismo fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente (Raimondo et al, 2005).

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos patógenos y los mecanismos de defensa antiinfecciosas del hombre. Las defensas antiinfecciosas se estructuran a 3 niveles. El primero es la barrera constituida por la piel y las mucosas, que impiden la penetración de los microbios. El segundo, la fagocitosis, que es el proceso por el que los leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos y los macrófagos endocitan y destruyen a los microorganismos que han logrado atravesar la barrera cutáneo-mucosa. El tercero lo constituye la respuesta inmunitaria a través de la respuesta humoral,

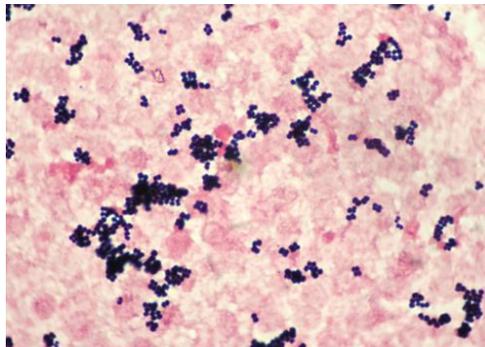
activación de macrófagos y la destrucción de células infectadas por virus y otros microorganismos (Prats, 2008).

### 1.10.1 Bacterias Gram Positivas.

Las células pueden ser esféricas, o en forma de bacilos o filamentos; los bacilos y filamentos pueden no ramificarse o mostrar una ramificación verdadera. Algunas bacterias de este grupo producen esporas como formas de reposo. (Brooks et al, 2008).

**Staphylococcus:** Son células esféricas de casi 1  $\mu\text{m}$  de diámetro dispuestas en grupos irregulares. Las especies más importantes son:

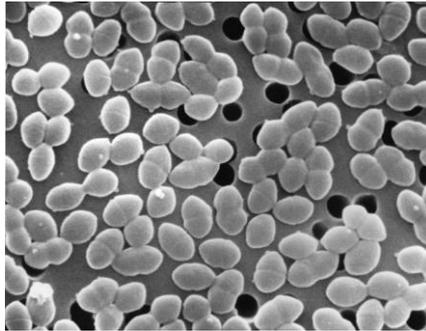
- ***Staphylococcus aureus*:** es un agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto génitourinario (Gil, 2000). *Staphylococcus aureus* es la especie más patógena y virulenta para el hombre, pero también puede encontrarse colonizando la piel y las mucosas (Borraz, 2006).



**Figura 4:** *Staphylococcus aureus*

**Fuente:** Pahissa, 2009

- ***Enterococcus faecalis*:** es un microorganismo que se aísla fundamentalmente en ambiente extrahospitalario, asociado en la mayoría de las ocasiones a infecciones del tracto urinario (Causse et al, 2006).



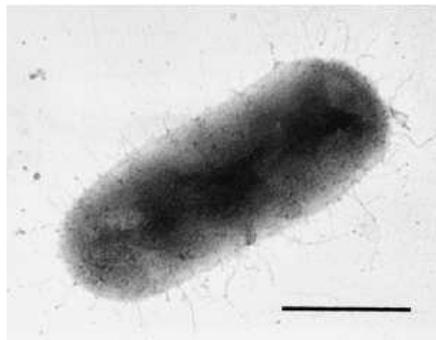
**Figura 5:** *Enterococcus faecalis*

**Fuente:** Causse et al, 2006.

### 1.10.2 Bacterias Gram Negativas.

Este es un grupo de bacterias que tienen una envoltura celular compleja constituida por una membrana externa, una capa delgada e interna de peptidoglucano y una membrana citoplasmática. La forma celular puede ser esférica, oval, como bacilos rectos o curvos, helicoidal o filamentosa; algunas de estas formas pueden estar envueltas en vainas o encapsulas (Brooks et al, 2008).

***Escherichia coli*:** cilíndricas con  $1,1 - 1,5 \mu\text{m}$  de diámetro por  $2,0 - 6,0 \mu\text{m}$  de largo que se disponen aisladas o en parejas. Forma parte de la flora normal del intestino del hombre constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización, sin embargo esta bacteria puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, uretritis, meningitis, entre otras (Margall et al, 1997).



**Figura 6:** *Escherichia coli*

**Fuente:** Faleiro, 2009

***Proteus vulgaris*:** es un importante patógeno nosocomial, produce infección en humanos solo cuando la bacteria abandona el intestino. Se las encuentra en infecciones del aparato

urinario y producen bacteriemia, neumonía e infecciones focales en pacientes debilitados. La rápida motilidad de esta bacteria puede contribuir a su capacidad para invadir el aparato urinario (Brooks et al, 2008).



**Figura 7:** *Proteus vulgaris*

**Fuente:** Prats, 2008

***Pseudomona aeruginosa:*** es un bacilo dotado de motilidad que mide 0,6 x 2 um. Se lo encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Esta bacteria solo es patógena cuando se introduce en regiones desprovistas de defensas normales como la piel y mucosas. Puede ocasionar infección en heridas y quemaduras, meningitism infección del aparato urinario, infección del aparato respiratorio y septicemia mortal (Brooks et al, 2008).



**Figura 8:** *Pseudomona aeruginosa*

**Fuente:** Prats, 2008

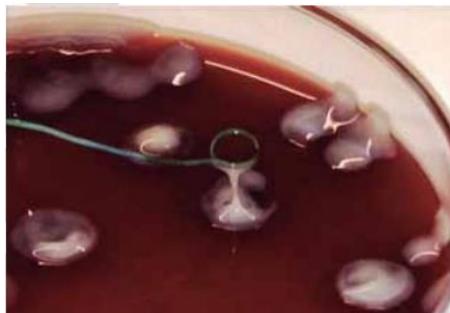
***Salmonella typhimurium:*** son bacilos dotados de motilidad. Aunque la infección intestinal, que se transmite al hombre a través de alimentos contaminados, es la forma clínica más importante, también puede causar otros procesos tales como bacteriemias, artritis, meningitis y abscesos de órganos y tejidos, entre otros (Tirado et al, 2009).



**Figura 9:** *Salmonella typhimurium*

**Fuente:** Winn et al, 2006.

***Klebsiella pneumoniae*:** es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias (Andrade et al, 2004). Son inmóviles y usualmente desarrolla una cápsula; causa infección del tracto urinario, neumonía, meningitis entre otras (López & Echeverri, 2009). La característica morfológica de las colonias de *Klebsiella pneumoniae* hipermucoviscosa es la filancia producida por el moco, que es positiva cuando se manipula con un asa de alambre y llega a ser mayor de 5 mm (Carrillo et al, 2013).



**Figura 10:** Colonias de *Klebsiella pneumoniae* con su filancia característica.

**Fuente:** Romero, 2007.

### 1.11 Dermatofitosis

La dermatofitosis es una micosis superficial de gran importancia y puede afectar a piel, cabellos y uñas. Estos hongos son patógenos primarios que poseen queratinasas lo que les permite utilizar la queratina de esas estructuras como fuente de nitrógeno (Nistal & Del Pozo, 2005).

***Trychophyton rubrum***: Hongo filamentososo con microconidios piriformes (de 3-5,5 x 2-3,5  $\mu\text{m}$ ), sésiles sobre las hifas formando racimos; macroconidios muy escasos. Agente más común de dermatofitosis que provoca lesiones, tanto endothrix como ectothrix, en el pelo (Sandoval et al, 2012).



**Figura 11:** *Trychophyton rubrum*

**Fuente:** Sandoval et al, 2012.

***Trychophytum mentagrophytes***: Microconidios redondos a ovales, formando frecuentemente grupos, algunas hifas en forma de espiral, escasos macroconidios de pared lisa y delgada, clavados, multi-septados (Sandoval et al, 2012).



**Figura 12:** *Trychophytum mentagrophytes*

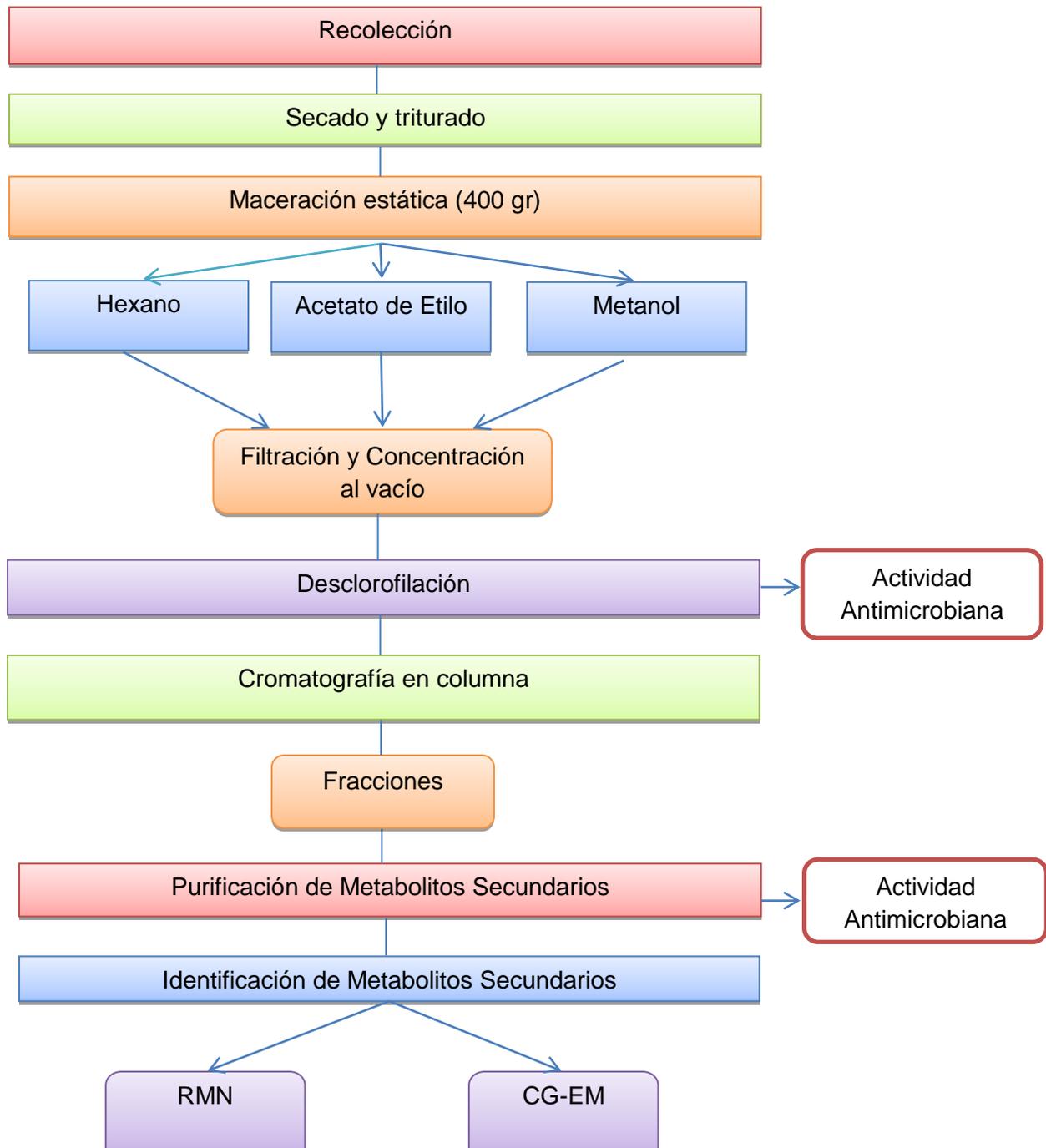
**Fuente:** Sandoval et al, 2012.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Esquema de metodología utilizada

El esquema de la metodología utilizada se detalla a continuación:



**Figura 13:** Esquema del desarrollo de la investigación

**Fuente:** La Autora, 2015.

## **2.2 Recolección del Material Vegetal**

Se recolectaron las partes aéreas de *Croton abutiloides* en estado de fructificación en el sector del Villonaco, ubicado a 4 Km de la ciudad de Loja, con coordenadas 3°59'44"S, 79°18'28"O. La muestra fue identificada por el Ingeniero Nixon Cumbicus, una muestra con código NC2073 está depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL).

## **2.3 Selección del Material Vegetal**

Una vez recolectado fue transportado al laboratorio de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química para continuar con el manejo post cosecha, donde se seleccionaron las hojas para su posterior maceración y se eliminó impurezas, partes deterioradas y tallos, con la finalidad de evitar la mezcla con otras especies y variaciones en su composición química.

## **2.4 Obtención de Extractos**

La planta fue secada a una temperatura de 35 °C, durante cuatro días. A partir de 400 g de muestra seca se procedió a realizar una maceración estática con disolventes de polaridad creciente Hexano, Acetato de Etilo y Metanol, durante un tiempo total de 6 horas con cada uno de ellos a temperatura ambiente y renovando el disolvente cada 2 horas.

Transcurridas las 6 horas se filtró al vacío cada extracción y mediante rotaevaporación a presión reducida 50 mbar y a 30 °C se obtuvieron los extractos totales.

Una vez obtenidos los extractos en Hexano, AcOEt y MeOH, se realizó TLC de cada uno de ellos a distintas polaridades usando placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, con la finalidad de determinar cuál de los tres extractos presenta mayor riqueza y mejor separación de los compuestos.

## **2.5 Desclorofilación del extracto de Acetato de Etilo**

El extracto total en AcOEt (1 g) fue sometido a desclorofilación empleando una columna fase inversa marca SPE Discovery-18 60 mL de 10 g. Se utilizó disolventes en polaridad creciente 8:2 Metanol – H<sub>2</sub>O, 9:1 Metanol – H<sub>2</sub>O y 100% Metanol (v/v), obteniendo tres extractos desclorofilados:

- **Extracto desclorofilado Metanol – H<sub>2</sub>O 8:2** : 107,5 mg
- **Extracto desclorofilado Metanol – H<sub>2</sub>O 9:1**: 537 mg
- **Extracto desclorofilado 100% Metanol**: 230,3 mg

## 2.6 Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo

El extracto total de Acetato de Etilo (2 g) fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna (CC), con 100 g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en proporción 1:50. Se eluyó con disolventes de polaridad creciente iniciando con una mezcla de Hexano – Acetato de Etilo en relación 98:02 hasta 100% Acetato de Etilo y se continuó con Acetato de Etilo – Metanol 9:1 hasta 100% Metanol; y se obtuvieron 12 fracciones (AQ001 – AQ012).

## 2.7 Cromatografía de capa fina

Se realizaron ensayos en cromatografía de capa fina (TLC) de todas las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica, para ello se utilizó placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex-AcOEt en relación 9:1; 8:2 y 7:3 (v/v), con el fin de que se produzca una separación de los compuestos, que puede ser visualizada mediante una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365 nm y reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Posteriormente se unieron las fracciones con igual R<sub>f</sub>.

## 2.8 Purificación de la fracción AQ002/21

Para purificar la fracción número 2 (AQ002) de 179,1 mg, se realizó una columna cromatográfica, con Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) 17 g en relación 1:100; usando diferentes proporciones de disolvente, iniciando con 100% Hexano hasta 100% Acetato de Etilo.



**Figura 14:** Columna cromatográfica.

**Fuente:** La autora, 2014.

### 2.8.1 Elucidación química de las sustancias aisladas.

La elucidación química de las sustancias aisladas se realizó mediante análisis de NMR en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando como disolvente Cloroformo Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y CG-EM.

### 2.9 Fraccionamiento del extracto de Hexano

El extracto total de Hexano (2 g) fue sometido a fraccionamiento en cromatografía en columna (CC), con Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:50. Se eluyó en disolventes de polaridad creciente iniciando con 100% Hexano hasta 100% Acetato de Etilo. Se colectaron fracciones de 5 mL. Se obtuvieron 16 fracciones (AQ046 – AQ061).



**Figura 15: Columna comatográfica.**

Fuente: La autora, 2014.

### 2.10 Cromatografía de Capa Fina

Las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica se analizaron mediante cromatografía de capa fina (TLC), para ello se utilizó placas de Sílica gel 60  $F_{254}$  (fase directa). Los disolventes utilizados para la fase móvil fueron Hex-AcOEt en relación 95:05; 9:1; 8:2; 7:3 y 1:1 (v/v). Las TLC fueron visualizadas mediante una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365 nm y reveladas con ácido sulfúrico al 5% y vainillina. Posteriormente se unieron las fracciones con igual  $R_f$ .

## 2.11 Purificación de la fracción AQ053/41

Para purificar la fracción AQ053/41, partir de 319,5 mg se procedió a realizar una columna cromatográfica con 23 g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:75; usando diferentes proporciones de disolvente, iniciando con Hexano – Acetato de Etilo 9:1 hasta 100% Acetato de Etilo. Se obtuvieron 11 fracciones (AQ108 – AQ118).

### 2.11.1 Elucidación química de las sustancias aisladas.

La elucidación química de las sustancias aisladas se realizó mediante análisis de NMR en un equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando como disolvente Cloroformo Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y CG-EM.

## 2.12 Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM)

Para obtener el peso molecular de los compuestos aislados AQ001/27 y AQ123/55 se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de operación de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, biblioteca Wiley 7n.1. Las características de la columna capilar utilizada se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Características de la Columna Capilar

Fracciones	Columna	Temperatura (C°)	Película ( $\mu\text{m}$ )	Diametro interno (mm)	Longitud (m)
AQ001/27	DB – 5MS	300	0,25	0,25	30
AQ123/55	DB – 5MS	300	0,25	0,25	30

Fuente: La autora, 2015.

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras para su posterior análisis mediante CG-EM se detallan a continuación:

**Tabla 2:** Método de análisis de la columna DB-5MS para AQ001/27 y AQ123/55

	AQ001/27	AQ123/55
COLUMNA	Columna capilar DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm; 30 m; 0,25 $\mu\text{m}$ .	Columna capilar DB 5MS Modelo Agilent 122-5532 0,25 mm; 30 m; 0,25 $\mu\text{m}$

	<b>Temperatura máxima:</b> 350 °C	<b>Temperatura máxima:</b> 350 °C
	<b>Flujo:</b> Constante	<b>Flujo:</b> Constante
	<b>Flujo Inicial:</b> 0.9 mL/min	<b>Flujo Inicial:</b> 1.0 ml/min
	<b>Presión Inicial:</b> 48.3 KPa	<b>Presión Inicial:</b> 52,7 KPa
	<b>Velocidad Promedio:</b> 35 cm/s	<b>Velocidad Promedio:</b> 36 cm/s
<b>INYECTOR</b>	<b>Modo:</b> split	<b>Modo:</b> split
	<b>Radio de Partición:</b> 25:1	<b>Radio de Partición:</b> 50:1
	<b>Temperatura Inicial:</b> 250 °C	<b>Temperatura Inicial:</b> 250 °C
	<b>Gas de Arrastre:</b> Helio	<b>Gas de Arrastre:</b> Helio
<b>DETECTOR</b>	Espectrómetro de masas	Espectrómetro de masas
	<b>Temperatura de la fuente:</b> 280 °C	<b>Temperatura de la fuente:</b> 280 °C
	<b>Temperatura de Cuadrupolo:</b> 200 °C	<b>Temperatura de Cuadrupolo:</b> 200 °C
<b>HORNO</b>	<b>Temperatura Inicial:</b> 60 °C	<b>Temperatura Inicial:</b> 50 °C
	<b>Temperatura Final:</b> 270 °C	<b>Temperatura Final:</b> 270 °C
	<b>Gradiente de Temperatura:</b> 10 °C/min.	<b>Gradiente de Temperatura:</b> 10 °C/min.

Fuente: La autora, 2015.

### 2.13 Determinación de la actividad antimicrobiana (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo.

### 2.14 Microorganismos de prueba

Se emplearon 9 microorganismos:

7 cepas bacterianas; 5 Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (LT 2), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); 2 cepas Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Mientras que para la evaluación antifúngica se utilizaron 2 organismos: *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188).

## 2.15 Preparación de las muestras

Se realizó una dilución de 20 mg de los extractos de Hexano, AcOEt y MeOH en 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la utilizó tanto para CMI antibacteriano como antifúngico.

Así mismo para los extractos desclorofilados de AcOEt 8:2; 9:1 y 100% MeOH se realizó una dilución de 20 mg en 500 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), esta dilución se la utilizó tanto para CMI antibacteriano como antifúngico.

## 2.16 Preparación del cultivo overnight

Los microorganismos utilizados se encuentran en reserva criogénica a -80°C. Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo se detallan en la tabla 2 a continuación.

**Tabla 3:** Medios de cultivo y condiciones de incubación

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>CONDICIONES DE INCUBACIÓN</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 horas
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	37°C por 14-16 horas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	37°C por 14-16 horas

Fuente: La autora, 2015.

Una vez preparados los medios se los esterilizó y se procedió a realizar el inóculo de cada bacteria.

## 2.17 Preparación de la suspensión del inóculo para bacterias

Del cultivo overnight con la bacteria respectiva se toman 10 µl y se colocan en 10 ml de caldo Mueller Hinton, de esta dilución se tomaron 100 µL los cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200 µL).

## 2.18 Preparación de la suspensión del inóculo para hongos

Se preparó la suspensión de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C, tomando de ésta suspensión 14 µL en 7 mL de Caldo Sabouraud; posteriormente se tomaron 100 µL de ésta dilución los cuales se utilizaron para completar el volumen final de la placa de cultivo (200 µL), ajustando a la población fúngica a  $5 \times 10^5$  esporas/mL.

**Tabla 4:** Medios de cultivos para hongos

HONGOS	MEDIO DE CULTIVO
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud
<i>Trichophyton rubrum</i>	

Fuente: La autora, 2015.

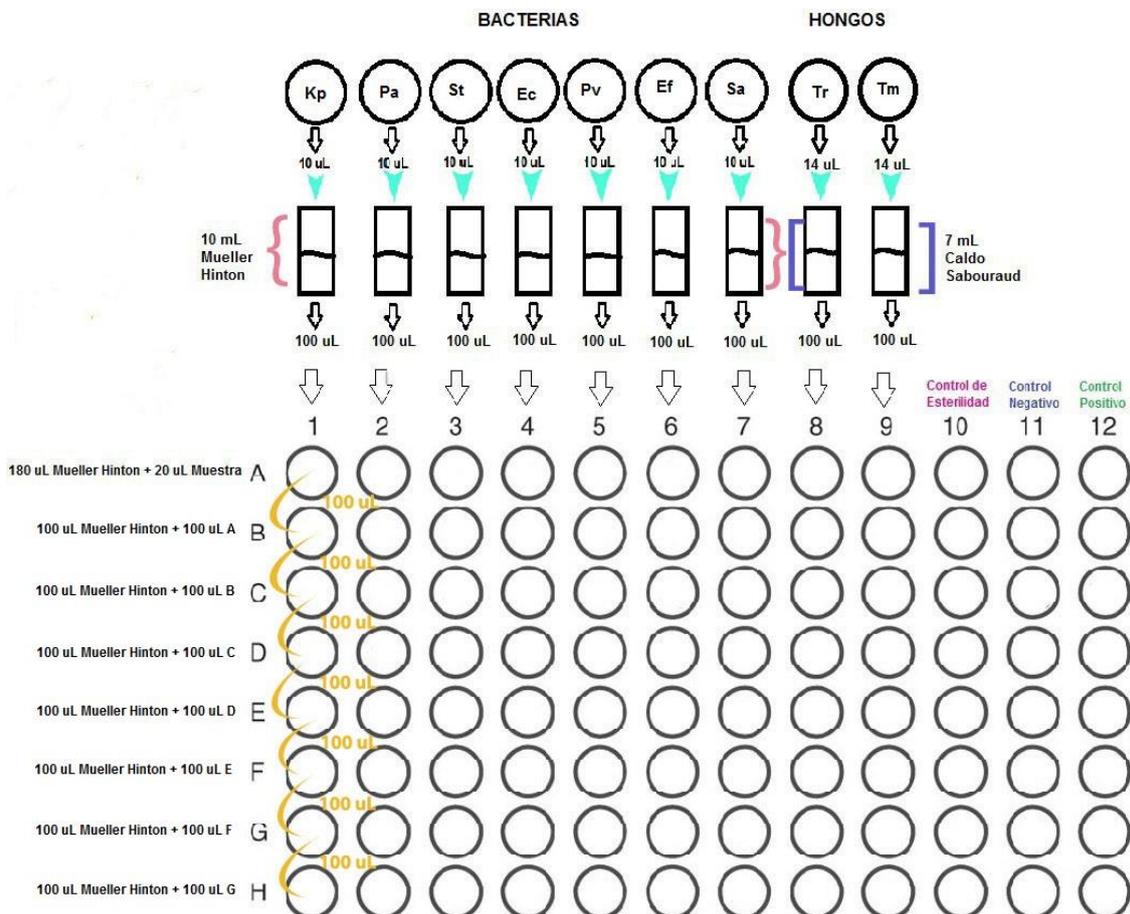
## 2.19 Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana

Para las pruebas se utilizaron placas estériles de 96 pocillos, colocando la dilución de 180 µL de caldo Mueller Hinton en la primera fila de pocillos, excepto en la columna 10; y 100 µL a los pocillos restantes; posteriormente se adiciona 20 µL del extracto diluido (20 mg/ml disuelto en 500 ml de DMSO) en estudio, en los pocillos de la fila A y se mezcla. Seguidamente realizamos diluciones seriadas tomando 100 µL de los pocillos de la fila A y diluimos en los pocillos de la fila B, continuando con ésta dilución hasta llegar a los pocillos de la fila H y desecharos los 100 µL sobrantes.

Se realiza las mismas diluciones en los pocillos de control de esterilidad (columna 10) con 200 ul de caldo Mueller Hinton, control negativo (columna 11) 180 µL de caldo + 20 µL de DMSO y control positivo (columna 12) 180 µL de caldo + 20 µL de Gentamicina para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphymurium* y *Enterococcus faecalis* a 1000 ppm.

Preparadas las placas se inoculan con 100 µL de la suspensión del inóculo completando a su volumen final de 200 µL, ajustando así a la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL, y la concentración final del extracto de 2000 a 15,625 µg/mL.

Finalmente se sellan las placas y se incuban a 37 °C por un periodo de tiempo 18-24 horas.



**Figura 16:** Esquema de microdilución en caldo de bacterias y hongos. (Kp= *Klebsiella pneumoniae*, Pa= *Pseudomonas aeruginosa*, Sa= *Salmonella tiphymurium*, Ec= *Escherichia coli*, Pv= *Proteus vulgaris*, Ef= *Enterococcus faecalis*, Sa= *Saphylococcus aureus*, Tm= *Trichophyton mentagrophytes*, Tr= *Trichophyton rubrum*)

**Fuente:** La autora, 2015.

## 2.20 CMI antifúngico

Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas que la CMI antibacteriana, modificando algunos parámetros tales como: el medio de cultivo que fue Caldo Sabouraud, la concentración final del inóculo es de  $5 \times 10^5$  esporas/mL, el control positivo donde se empleó Itraconazol de 10 mg/mL. Se incuban las placas a 30°C por 72-96 horas (Figura 16).

## **CAPITULO 3**

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### 3.1 Extractos obtenidos de la especie *Croton abutiloides*

En la Tabla 4 se describe el peso y rendimiento de los extractos de Hexano, AcOEt y MeOH, a partir de 400g de muestra vegetal seca.

**Tabla 5:** Rendimiento de extractos obtenidos de *Croton abutiloides*

EXTRACTO	Peso Inicial de Planta seca (g)	Peso Final (g)	Rendimiento %
Hexano	400	10,3	2,58
Acetato de Etilo		5,5	1,39
Metanol		28,8	7,21

Fuente: La autora, 2015.

### 3.2 Fraccionamiento del extracto de Acetato de Etilo

Del fraccionamiento del extracto de AcOEt se obtuvieron 109 muestras y se unieron de acuerdo a las características presentadas mediante cromatografía de capa fina y Rf en 12 fracciones (AQ001 – AQ012) (Tabla 6).

**Tabla 6:** Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Acetato de Etilo.

Fracciones	Muestras	Proporción	Mezcla de Disolventes	Peso (mg)
AQ001	1-2	98:02	Hex-AcOEt	20,2
AQ002	3-12	9:1	Hex-AcOEt	179,1
AQ003	13-15	8:2	Hex-AcOEt	90
AQ004	16-20	7:3	Hex-AcOEt	270
AQ005	21-25	6:4	Hex-AcOEt	80
AQ006	26-38	1:1	Hex-AcOEt	290
AQ007	39-45	100	AcOEt	128,9
AQ008	46-49	9:1	AcOEt-Metanol	40
AQ009	50-60	8:2	AcOEt-Metanol	170
AQ010	61-64	6:4	AcOEt-Metanol	50
AQ011	65-70	4:6	AcOEt-Metanol	40
AQ012	71-109	100	Metanol	580

Fuente: La autora, 2015.

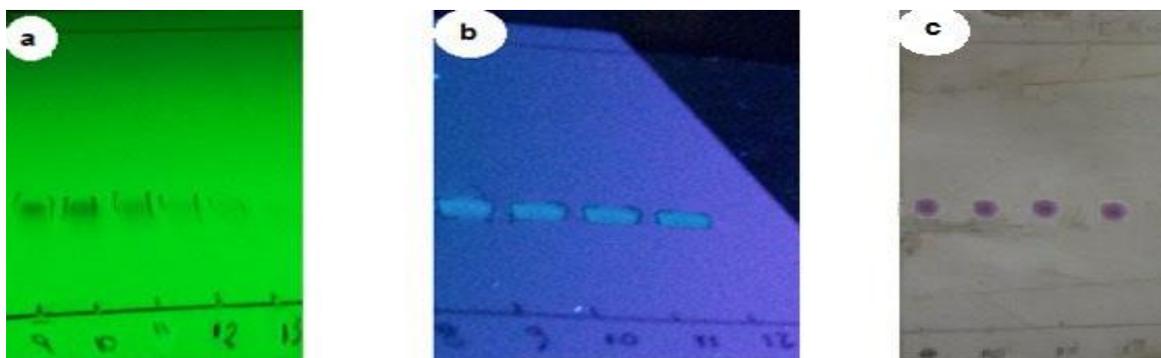
De estas se tomó la fracción AQ002/21 y se procedió a purificarla en una columna cromatográfica.

### 3.2.1 Fracción AQ002/21.

A partir de 179,1 mg (AQ002/21) se procedió a realizar una columna cromatográfica con 17 g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:100; usando disolventes de polaridad creciente, iniciando con 100% Hexano hasta 100% Acetato de Etilo. De la cual se obtuvieron 14 fracciones (AQ001 – AQ014).

Posterior a la purificación se visualizó como sustancia pura la fracción AQ001/27 con un peso de 4 mg. Se realizó cromatografía de capa fina, utilizando disolventes en polaridad creciente 100% Hexano y 9:1 Hexano-Acetato v/v y una placa de Sílica gel de 5 cm de longitud.

El compuesto fue visible en luz UV de 254 y 365 nm, en donde se observó una mancha oscura y una mancha brillante respectivamente. Al ser revelada con ácido sulfúrico al 5% y vainillina se observó una mancha de color morado (Figura 16), presentando un Rf de 0,425.



**Figura 17:** TLC 9:1 Hexano-Acetato de Etilo; a) Luz UV 254 nm; b) Luz UV 365 nm; c) TLC revelada

**Fuente:** La autora, 2014.

#### 3.2.1.1 Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de AQ001/27.

El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas, en donde se observó las siguientes señales corroborados con la literatura:

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ: 1.68 (s), 1.60 (bs), 5.10 (m), 2.07 (m), 5.12 (m), 1.56 (bs), 5.10 (m), 2.02 (m), 2.01 (m), 1.58 (bs), 5.15 (m), 1.99 (m). (Anexo 1a).

**<sup>13</sup>CNMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** Las señales del espectro de la fracción AQ001/27 de *C. abutiloides* mostró 15 carbonos ya que el compuesto se encuentra en forma dimérica y al compararla con la bibliografía se confirmó la estructura del escualeno (Anexo 1b).

**Tabla 7:** Espectro <sup>13</sup>CNMR Escualeno

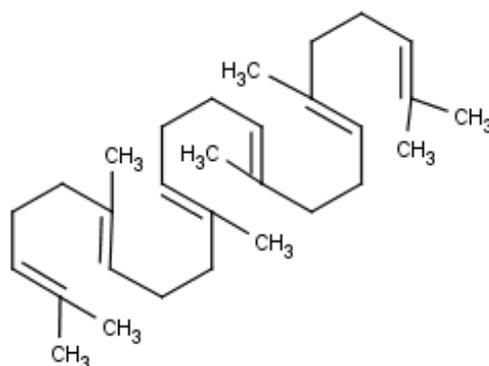
Señal	Rangos δ (ppm)	Rangos δ (ppm) Mandal & Chakraborty, 2013	Asignación
1	135,259	134,99	C
2	135,058	134,79	C
3	131,411	131,09	C
4	124,558	124,42	CH
5	124,457	124,32	CH
6	124,426	124,28	CH
7	39,906	39,75	CH <sub>2</sub>
8	39,883	39,74	CH <sub>2</sub>
9	28,430	28,27	CH <sub>2</sub>
10	26,920	26,77	CH <sub>2</sub>
11	26,820	26,65	CH <sub>2</sub>
12	25,844	25,65	CH <sub>3</sub>
13	17,830	17,62	CH <sub>3</sub>
14	16,196	15,99	CH <sub>3</sub>
15	16,149	15,95	CH <sub>3</sub>

Fuente: La autora, 2015.

Por lo tanto el compuesto aislado fue identificado como un triterpeno acíclico denominado escualeno de fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>, con una masa molecular de 410 g/mol obtenida mediante análisis de CG-EM (Anexo 1c), respaldada y comparada con la literatura (Mandal & Chakraborty, 2013; Khurshid et al, 2002; Pogliani et al, 1994).

El escualeno ha sido reportado en el género *Croton* anteriormente (Motta et al, 2011; Catalán et al, 2003) así como en la familia Euphorbiaceae (Tchinda et al, 2006). Los estudios experimentales han demostrado que el escualeno puede inhibir eficazmente la tumorigénesis inducida de piel, colon y de pulmón en roedores. El efecto protector se

observa cuando se administra escualeno antes y/o durante el tratamiento carcinógeno (Huang et al, 2009).



**Figura 18:** Escualeno

**Fuente:** La autora, 2015.

Según Mandal & Chakraborty, 2013 el escualeno ha reportado buena actividad antimicrobiana. Los efectos del escualeno se detectaron mediante la prueba de zona de inhibición en varias bacterias Gram positivas y Gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* y *Staphylococcus aureus*. En la prueba de zona de inhibición, *E. coli*, *S. aureus* y *S. lutea* revelaron efecto diferencial a diferentes concentraciones de escualeno. *E. coli* y *S. lutea* presentaron un diámetro de inhibición mayor por el escualeno, mientras que *S. aureus* no se vio afectado.

La actividad antifúngica del escualeno reportada así mismo por Mandal & Chakraborty, 2013, se realizó mediante la prueba de zona de inhibición, en tres especies de hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus tamaritii* (organismos casuales de la enfermedad de la aspergilosis), estos mostraron efectos diferenciales a diferentes concentraciones de escualeno. *A. fumigatus* mostraron máximos efectos inhibidores en 1500 ppm y 2000 ppm. En el caso de *A. niger* los máximos efectos inhibitorios se mostraron sólo a 500 ppm. *A. tamaritii* exhibió actividad inhibidora máxima a 1000 ppm y 2000 ppm. Por lo tanto, escualeno también puede ser utilizado como un remedio contra la aspergilosis.

### 3.3 Fraccionamiento del extracto de Hexano

Del fraccionamiento del extracto de Hexano se obtuvieron 104 muestras y se unieron de acuerdo a las características presentadas de mediante cromatografía de capa fina y Rf en 16 fracciones (AQ046 – AQ061) (Tabla 8).

**Tabla 8:** Fraccionamiento cromatográfico del extracto total de Hexano.

<b>Fracciones</b>	<b>Muestras</b>	<b>Proporción</b>	<b>Mezcla de Disolventes</b>	<b>Peso (mg)</b>
AQ046	<b>1</b>	100	Hexano	20
AQ047	<b>2-4</b>	100	Hexano	22,3
AQ048	<b>5-7</b>	9:1	Hex-AcOEt	4,2
AQ049	<b>8</b>	9:1	Hex-AcOEt	0,7
AQ050	<b>9-15</b>	8:2	Hex-AcOEt	973,9
AQ051	<b>16-18</b>	7:3	Hex-AcOEt	103,5
AQ052	<b>19-20</b>	7:3	Hex-AcOEt	57,8
AQ053	<b>21-31</b>	6:4	Hex-AcOEt	319,5
AQ054	<b>32-37</b>	6:4	Hex-AcOEt	84,1
AQ055	<b>38-46</b>	1:1	Hex-AcOEt	91,8
AQ056	<b>47-52</b>	1:1	Hex-AcOEt	28,5
AQ057	<b>53-62</b>	4:6	Hex-AcOEt	20,8
AQ058	<b>63</b>	4:6	Hex-AcOEt	8,4
AQ059	<b>64-79</b>	3:7	Hex-AcOEt	13,9
AQ060	<b>80-103</b>	100	AcOEt	10,4
AQ061	<b>104</b>	100	AcOEt	15,4

Fuente: La autora, 2015.

De estas se tomó la fracción AQ053/41 y se procedió a purificarla por medio de cromatografía en columna.

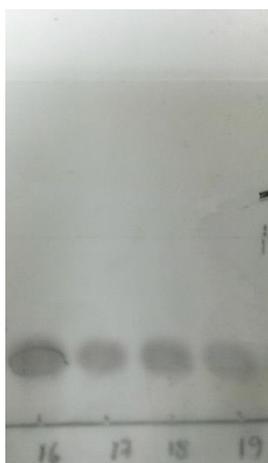
### 3.3.1 Fracción AQ053/41.

A partir de 319,5 mg (AQ053/41) se procedió a realizar una columna cromatográfica con 23 g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:75; usando diferentes proporciones de disolvente, iniciando con Hexano – Acetato de Etilo 9:1 hasta 100% Acetato de Etilo. De la cual se obtuvieron 11 fracciones (AQ108 – AQ118) y se tomó la fracción AQ114/54 para purificarla.

A partir de 18,6 mg (AQ114/54) se realizó una columna cromatográfica con 9 g de Sílica Gel 60 (Merck 0.0015-0040 mm) en relación 1:500; usando diferentes proporciones de disolvente, iniciando con 8:2 Hexano – Acetato de Etilo hasta 100% Acetato de Etilo y se obtuvieron 6 fracciones (AQ119 – AQ124).

Posterior a la purificación se visualizó la fracción AQ123/55 como sustancia pura, con un peso de 7,3 mg. Se realizó cromatografía de capa fina, utilizando disolventes en polaridad creciente 8:2 y 7:3 Hexano-Acetato v/v y una placa de Sílica gel de 5 cm de longitud.

El compuesto no se pudo apreciar claramente en la luz UV de 254 nm, en la luz UV de 365 nm ligeramente se apreció una mancha brillante, sin embargo al ser revelada la TLC con ácido sulfúrico al 5% y vainillina se observó una mancha de color morado claro (Figura 18), presentando un Rf de 0,55.



**Figura 19:** TLC revelada

**Fuente:** La autora, 2014.

### **3.3.1.1 Interpretación de resultados de Resonancia Magnética Nuclear de AQ123/55.**

El compuesto fue identificado mediante técnicas espectroscópicas, en donde se observó las siguientes señales:

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  5.39 (m), 3.51 (m), 1.01 (s), 0.93 (d), 0.86 (t), 0.91 (d), 0.84 (d), 0.68 (s) (Anexo 2a).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):** las señales del espectro de la fracción AQ123/55 de *C. abutiloides* indico 29 carbonos y al compararlos con la literatura se confirmó la estructura del  $\beta$ -sitosterol (Anexo 2b).

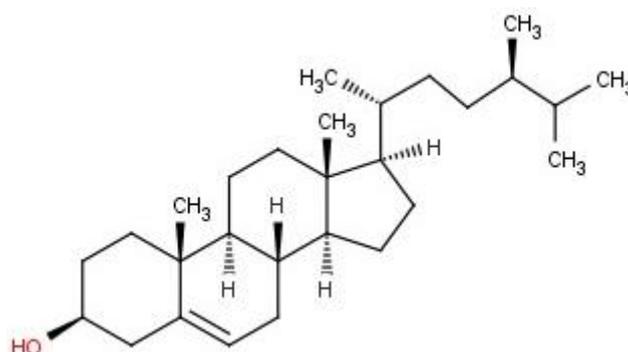
**Tabla 9:** Espectro  $^{13}\text{C}$  NMR de  $\beta$ -Sitosterol

Señal	Rangos $\delta$ (ppm)	Rangos $\delta$ (ppm) Venkata, 2012	Asignación
1	140,892	140,9	C
2	121,862	121,9	CH
3	71,960	72,0	CH
4	56,914	56,9	CH
5	56,196	56,3	CH
6	50,276	50,3	CH
7	45,983	46,1	CH
8	42,452	42,5	CH <sub>2</sub>
9	42,623	42,6	C
10	39,921	39,9	CH <sub>2</sub>
11	37,399	37,5	CH <sub>2</sub>
12	36,654	36,7	C
13	36,296	36,3	CH
14	34,091	34,2	CH <sub>2</sub>
15	32,057	32,1	CH <sub>2</sub>
16	32,1	32,1	CH <sub>2</sub>
17	31,815	31,9	CH
18	29,297	29,4	CH
19	28,399	28,5	CH <sub>2</sub>
20	26,216	26,3	CH <sub>3</sub>
21	24,452	26,3	CH <sub>2</sub>
22	23,213	23,3	CH <sub>2</sub>
23	21,233	21,3	CH <sub>2</sub>
24	19,969	20,1	CH <sub>3</sub>
25	19,550	19,6	CH <sub>3</sub>
26	19,179	19,2	CH <sub>3</sub>
27	18,930	19,0	CH <sub>3</sub>
28	12,132	12,2	CH <sub>3</sub>
29	12,009	12,0	CH <sub>3</sub>

Fuente: La autora, 2015.

Por lo tanto el compuesto fue identificado como un fitoesterol denominado  $\beta$ -sitosterol de formula molecular  $C_{29}H_{50}O$ , con una masa molecular de 414 g/mol obtenida mediante análisis de CG-EM (Anexo 2c), respaldada y comparada con la literatura (Patra et al, 2010; Venkata, 2012; Sen et al, 2012; Kamboj et al, 2011).

Este compuesto ya ha sido identificado anteriormente en algunas especies del género *Croton* (Bayor et al, 2009) así como también en otros géneros de la familia Euphorbiaceae (Verdezoto, 2012; De Souza et al, 2003; Cheng et al 2005; Motta et al, 2011).



**Figura 20:**  $\beta$ -sitosterol

**Fuente:** La autora, 2015.

$\beta$ -sitosterol es utilizado como un antioxidante y un agente antidiabético (Karan et al., 2012). Según Sen et al, 2012 también se ha comprobado que es altamente eficaz en el tratamiento de agrandamiento de la próstata, para aumentar la función de las células T y como cebador del sistema inmune para funcionar y operar de manera más eficiente.

Varios estudios (Bhaskar et al, 2010; Awad et al, 2007) han demostrado que el  $\beta$ -sitosterol es quimiopreventivo en la línea celular de cáncer de colon y cáncer de mama mediante la inhibición de la proliferación de células cancerosas a través de la disminución de la expresión de  $\beta$ -catenina y PCNA o la activación de la señalización de Fas.

Bayor et al, 2009 evaluó la actividad antimicrobiana del  $\beta$ -Sitosterol aislado de la especie *C. membranaceus*, contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de difusión en disco, en donde no se reportó ninguna actividad antimicrobiana significativa.

Lo que es consistente con estudios previos que reportan una nula actividad antimicrobiana asociada con  $\beta$ -Sitosterol, obtenido a partir de varias fuentes vegetales (Chandramu et al,

2003; Hess et al, 1995; Cota et al, 2003) incluyendo *C. urucurana* Baillon (Peres et al., 1997).

Sin embargo también hay numerosos informes de  $\beta$ -Sitosterol, que se ha aislado en algunas plantas, cuyos extractos han mostrado actividad antimicrobiana significativa (Ramesh et al., 2004; Venkatesan et al., 2005), incluyendo algunas especies de *Croton* (Abo et al., 1999). También hay informes de mejora de los resultados con el uso de  $\beta$ -Sitosterol como adyuvante en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar (Donald et al., 1997).

Por otra parte, en la especie *Croton membranaceus*, Bayor et al, 2009 reporto estudios antifúngicos para  $\beta$ -Sitosterol contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, mediante la técnica de difusión en disco, donde no se encontró actividad antifúngica importante para este compuesto.

Estos resultados son consistentes con estudios antifúngicos del  $\beta$ -Sitosterol en *Euphorbia fusiformis* (Devendar et al, 2014) donde también se utilizaron microorganismos como *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. La actividad antifúngica se evaluó mediante la medición de zonas de inhibición del crecimiento fúngico en diferentes concentraciones, pero no se encontró actividad antifúngica importante.

### 3.4 Actividad Antimicrobiana de los extractos de *Croton abutiloides*

Del análisis realizado se puede determinar que los extractos de Hex, AcOEt y MeOH y los extractos desclorofilados 8:2, 9:1 y 100% Metanol, de la especie *C. abutiloides* no presentaron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram + y Gram - que fueron evaluadas.

**Tabla 10:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Croton abutiloides* frente a bacterias Gram positivas y negativas.

Bacterias	Hex	AcOEt	MeOH	Desclorofilados		
				8:2	9:1	100% Metanol
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL
<i>Pseudomonas</i>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

<b><i>aeruginosa</i></b>	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL
<b><i>Salmonella</i></b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<b><i>tiphymurium</i></b>	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL
<b><i>Escherichia coli</i></b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL
<b><i>Proteus vulgaris</i></b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL
<b><i>Enterococcus</i></b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<b><i>faecalis</i></b>	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL
<b><i>Staphylococcus</i></b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
<b><i>aureus</i></b>	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL	ug/mL

Fuente: La autora, 2015.

Esto contrasta con estudios previos realizados a otras especies de *Croton*. Así por ejemplo, Jeeshna et al, 2011 evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de éter de petróleo, cloroformo, acetona y metanol de *Croton bonplandianum* frente a *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella typhi* (bacterias gram negativas) y *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (bacterias gram positivas) mediante el método de difusión en disco a dos concentraciones diferentes 50 y 100 mg/100 ml; en donde los extractos fueron activos contra estas bacterias. La inhibición más alta (diámetro de la zona de inhibición,  $17 \pm 1,15$  mm) se observó en el extracto de metanol a 100 mg/100 ml contra la bacteria *Salmonella typhi*.

Del mismo modo, Bayor et al, 2009; estudio la actividad antimicrobiana del extracto de Metanol de *Croton membranaceus* mediante la técnica estándar de dilución en 96 micro pocillos y el método de difusión en disco, frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en donde el extracto mostró significativa actividad antibacteriana con CMI de: *S. aureus* (0,53 mg/ml), *B. subtilis* (1,31 mg/ml), *E. coli* (0.68 mg/ml), *P. aeruginosa* (1,43 mg/ml).

### 3.5 Actividad Antifúngica de los extractos de *Croton abutiloides*

Los análisis de los extractos Hex, AcOEt y MeOH y los extractos desclorofilados 8:2, 9:1 y 100% Metanol, de la especie *Croton abutiloides* presentan baja o ninguna actividad antifúngica con las cepas utilizadas.

**Tabla 11:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Croton abutiloides* frente a Hongos Dermatofitos.

Hongos Dermatofitos	Hex	AcOEt	MeOH	Descolorificados		
				8:2	9:1	100% Metanol
<i>Trichophyton rubrum</i>	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	>2000 ug/mL	2000 ug/mL Positivo A	>2000 ug/mL	2000 ug/mL Positivo A	>2000 ug/mL	>2000 ug/mL

Fuente: La autora, 2015.

Sin embargo, algunos investigadores han reportado actividad antifúngica de otras especies de *Croton*. Como ejemplo se puede citar a Singh et al, 2011 quien evaluó los extractos acuoso, metanol y éter de petróleo de *Croton bonplandianum* contra *Aspergillus niger*, utilizando el método de difusión en agar en concentraciones decrecientes de 125 a 25 mg/ml; en donde se reportó una mediana actividad antifúngica solamente en el extracto acuoso.

Por otro lado, Jeeshna et al, 2011 evaluó la actividad antifúngica de los extractos de éter de petróleo, cloroformo, acetona y metanol de *Croton bonplandianum* frente a *Mucor* sp., *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* sp. y *Pencillium* sp. mediante el método de difusión en disco a dos concentraciones diferentes 50 y 100 mg/100 ml; donde se halló que la más alta actividad antifúngica (diámetro de la zona de inhibición, 17,33 ± 1,15 mm) era del extracto de metanol 100 mg/100 ml, contra el hongo *Rhizopus* sp. La actividad inhibitoria del extracto de metanol fue considerablemente mayor contra los otros hongos ensayados en comparación con los otros extractos.

## CONCLUSIONES

- De los extractos de Hexano y Acetato de Etilo de *Croton abutiloides*, se aislaron e identificaron dos compuestos: uno de origen terpénico conocido como escualeno con formula molecular  $C_{30}H_{50}$  y una masa de 410 g/mol y un ácido graso conocido como  $\beta$ -Sitosterol con formula molecular  $C_{29}H_{50}O$  y una masa de 414 g/mol.
- Los extractos totales y desclorofilados obtenidos de *Croton abutiloides* no presentaron actividad antimicrobiana ni antifúngica.
- El extracto de mayor rendimiento fue el de Metanol 7,21% seguido del extracto de Hexano 2,58% y finalmente el extracto de Acetato de Etilo 1,39%.

## RECOMENDACIONES

Realizar trabajos similares con diferentes especies para obtener un registro de metabolitos secundarios de la familia Euphorbiaceae en el Ecuador ya que la diversidad de las plantas medicinales varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello se debe conservar el ambiente que las sustenta; la sobreexplotación, el comercio ilegal, la destrucción de hábitats y el empleo de sistemas de recolección inapropiados, son las principales causas de utilización insostenible, amenaza y extinción de algunas especies, antes de que sean, siquiera, identificadas o estudiadas (Buitrón, 1999).

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrade V., Silva J. (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Rev salud pública de México / vol.46, no.6, noviembre-diciembre.
- Ávalos. A., Pérez. E. (2009). Metabolismo Secundario de las Plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009.
- Avello. M., Cisternas. I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile 2010; 138: 1288-1293.
- Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG (2007)  $\beta$ -sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. Phytomedicine 14:747-754.
- Baskar A., Ignacimuthu S., Paulraj G., Al-Numair K. (2010). Chemopreventive potential of  $\beta$ -sitosterol in experimental colon cancer model- an in vitro and in vivo study. BMC Complement Altern Med 10 (24): 1472-6882.
- Bayor M., Gbedema S., Annan K. (2009). The antimicrobial activity of *Croton membranaceus*, a species used in formulations for measles in Ghana. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy Vol. 1(4) pp. 047-051, October, 2009.
- Borraz C. (2006). Epidemiología de la resistencia a metilicina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en Hospitales españoles. Tesis Doctoral.
- Buitrón. X. (1999). Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación. Traffic International.
- Carrillo R., Diaz M., Peña C. (2013). Síndrome de absceso hepático secundario a *Klebsiella pneumoniae* hiper mucoviscosa. Una entidad emergente. Medicina Interna de México Volumen 29, núm. 5, septiembre-octubre, 2013.
- Catalán C., De Heluani C., Kotowicz C., Gedris T., Herz W. (2002). A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. Rev. Phytochemistry 64(2003) 625–629.

- Causse M., Álvarez F., García A., Rodríguez F., Casal M. (2006). Sensibilidad a los antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España). *Rev Esp Quimioterap*, Junio 2006; Vol. 19 (Nº 2): 140-143.
- Cerón. C. (2006). *Plantas Medicinales de los Andes Ecuatorianos*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 285-293.
- Chaturvedula V., Prakash I. (2012). Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 2012, 1(9): 239-242.
- Cheng G, C K L, Taufiq Y, Go R. (2005). Ferulic acid ester from *Jatropha podagrica* (Euphorbiaceae). *Malaysian Journal of Chemistry*, 2005, Vol. 7, No. 1, 045 – 048.
- De la Torre L., Navarrete H., Muriel P., Macía M., Balslev H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- De Souza L, Massae R, Samara A, Sarragiotto M, Prado B, Vataru C, De Carvalho J, Foglio M. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 6, 825-827, 2003.
- Devendar P., Srinivas S., Kumar K., Kumar S., Bhagel S., Sastry K. (2014). Phytochemical Investigation, Antioxidant and Antifungal Activities of Rhizomes of *Euphorbia fusiformis*. *Phcog J* | July–Aug 2014 | Vol 6 | Issue 4.
- Dufoour B. (1984). The effectiveness of beta-sitosterol from an extract of African pygeum, on the functional symptoms of prostatic adenoma. *J Ann Urol* 18: 193-5.
- Fariña N., Sanabria R., Figueredo L., Ramos L., Samudio M. (2005). *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, Vol. 3 (1), 2005.
- Gerothanassis I., Troganis A., Exarchou V., Barbarossou K. Nuclear magnetic resonance (nmr) spectroscopy: basic principles and phenomena, and their applications to

- chemistry, biology and medicine. *Chemistry education: research and practice in Europe* 2002, Vol. 3, No. 2, pp. 229-252.
- Gil M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect*; 17 (2): 145-152.
- Günther H. (1995). *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, Wiley. 2ª Ed.
- Horna G., et al. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered* 16 (1), 2005 39.
- Huang Z., Lin Y., Fang J. (2009). Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules* 2009, 14, 540-554; doi:10.3390/molecules14010540.
- Jeeshna M., Paulsamy S., Mallikadevi T. (2011). Phytochemical Constituents and Antimicrobial Studies of the Exotic Plant Species, *Croton bonplandianum* Baill. *J Life Sci*, 3(1): 23-27 (2011).
- Kamboj A., Kumar A. (2011). Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (asteraceae). *Int j pharm pharm sci*, vol 3, issue1, 94-96.
- Karan SK., Mishra SK., Pal DK., Mondal A. (2012). Isolation of  $\beta$ -sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan induced diabetic mice with reference to in-vitro antioxidant activity. *J Med. Plant Res.*, 6(7): 1219-1223.
- Khurshid A., Harun R., Abdur R., Abdullahil B., Golam S. (2002). Chemical constituents of *Hemigraphis hirta* T. anders (Acanthaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5 (11):1264-1266, 2002.
- López J., Echeverri L. (2009). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Rev IATREIA / VOL 23/No. 2/ JUNIO/ 2010*.
- Mabberley J. (1998). *The plant-book*, segunda edición. Cambridge University Press, Cambridge. 858 p.

- Mandal S., Chakraborty N. (2013). Shedded *Artocarpus* leaves – Good plant sources of natural squalene with potent antioxidant and antimicrobial activity – Alternative to marine animals. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, Volume 4, Issue 1, January-June, 2013.
- Marco A. Química de los Productos Naturales. Aspectos fundamentales del metabolismo secundario. España. Editorial Sintesis.
- Margall N., Domínguez A., Prats G., Salleras Ll. (1997). *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública* 1997; 71: 437-443.
- Martínez M., Jiménez J., Cruz R., Juárez E., García R., Cervantes A., Mejía R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73(2): 155-281. 2002.
- Moreno A. (2010). *Sechium edule* (jacq.) Swartz y los fitoesteroles como agentes antihiperlipidémicos y antihipertensivos. *Rev Waxapa* 3 Julio - Diciembre 2010.
- Motta L., Furlan C., Santos A., Salatino M., Duarte J., Negri G., Carvalho J., Ruiz A., Cordeiro I., Salatino A. (2011). Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(6): 972-977, Nov./Dec. 2011.
- Muñoz A., Alvarado C., Encina C. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Revista Horizonte Médico Volumen* 11(2), Julio - Diciembre 2011.
- Murillo J. (2004). Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana*, vol. 5, núm. 2, diciembre, 2004, pp. 183-199, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". Colombia.
- Murillo J. (1999). Composición y distribución del género *Croton* (euphorbiaceae) en Colombia, con cuatro especies nuevas. *Caldasia* Vol. 21, No. 2, 1999.
- Nath R., Roy. S., De. B., Choudhury. D. (2013). Anticancer and antioxidant activity of *Croton*: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Nistal B., Del Pozo J. (2005). Dermatofitosis o tiñas. *Guías Clínicas* 2005; 5(35).

- Núñez E. (1975). Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Llanes. D. (2009). Actividad Inmunomoduladora de Extractos de 10 plantas de la familia Euphorbiaceae. Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Magíster en Ciencias – Biotecnología.
- Lopéz. N. et al. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Nutr. clin. diet. hosp. 2012; 32(3):81-91.
- Parvin S., Kader A., Muhit A., Haque E., Mosaddik A., Wahed I. (2011). Triterpenoids and phytosteroids from stem bark of *Crataeva nurvala* buch ham. Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (09); 2011: 47-50.
- Patra A., Jha S., Murthy P., Manik, Sharone A. (2010). Isolation and characterization of stigmast- 5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR) Vol.1 (2), 2010, 95-100.
- Prats. G. (2008). Microbiología Clínica. Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- Pogliani L., Ceruti M., Ricchiardi G., Viterbo D. (1994). An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. Rev. Chemistry and Physics of Lipids 70 (1994) 21-34.
- Puelles. M., et al. (2010). Las Plantas Medicinales del Perú. Etnobotánica y viabilidad comercial. Editorial Los Libros de la Catarata.
- Puebla. P., Guerrero. M., Correa. S. (2004). Flavonoides del género *Croton*. Rev. Col. Quím. Farm. Vol. 33.
- Quezada. A. (2008). Las Plantas Medicinales. Revista Biocenosis / Vol. 21 (1-2).
- Rodríguez M., Tovar A., Del Prado M., Torres N. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Revista de Investigación Clínica / Vol. 57, Núm. 3 / Mayo-Junio, 2005 / pp 457-472.

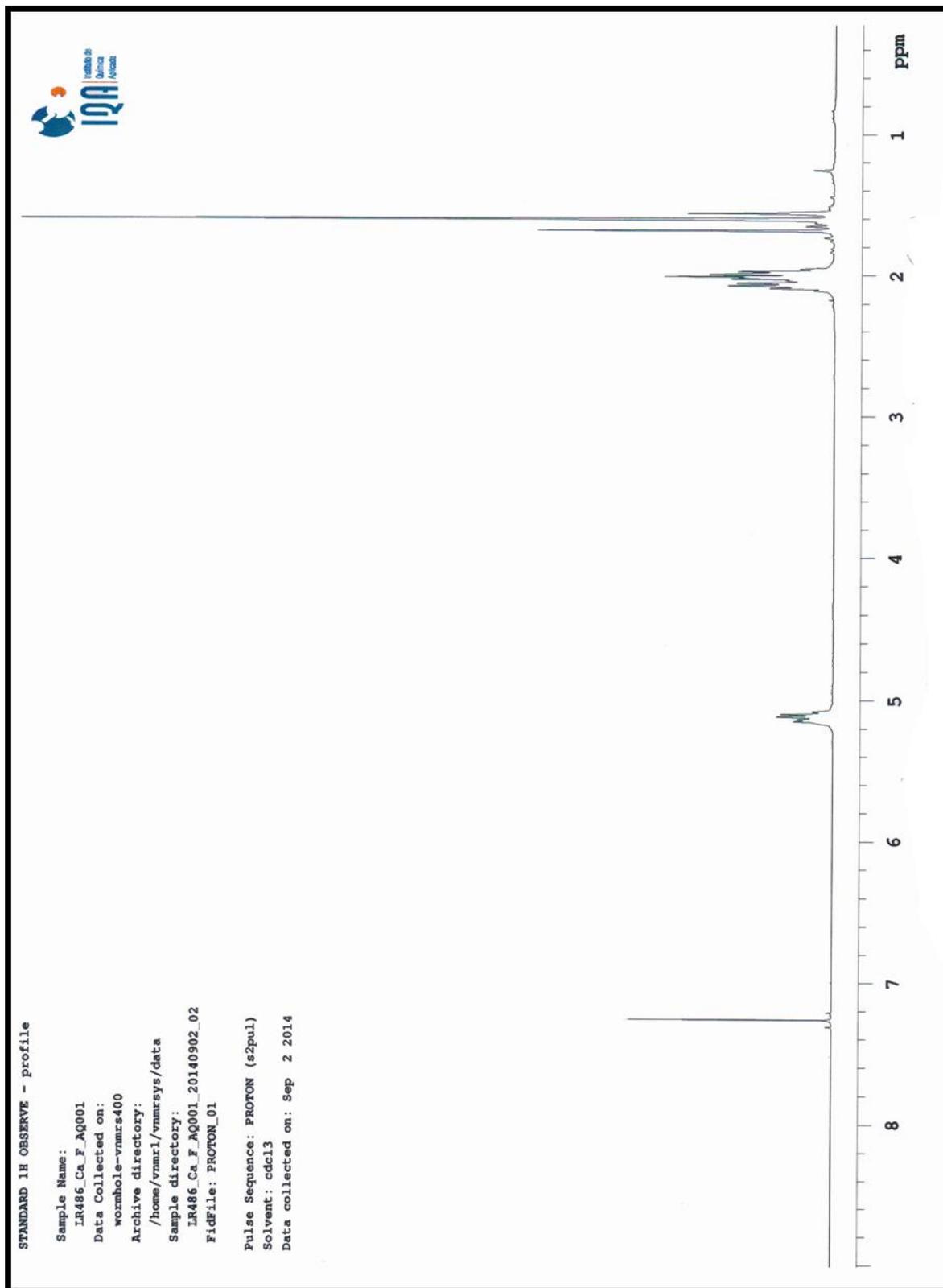
- Richter G. (1972). Fisiología del Metabolismo de las Plantas. Primera Edición. Primera Edición. Editorial Continental S.A.
- Rosellón. A. (2005). Nuevas estrategias sintéticas hacia triterpenos irregulares y cromano derivados. Tesis Doctoral. Editorial de la Universidad de Granada.
- Salamanca. G. (2002). La Familia Euforbiaceae como condición promisoras para la obtención de metabolitos secundarios. Facultad de Ciencias - Departamento de Química Universidad del Tolima. A.A.546 Ibagué Tolima Colombia.
- Santa Cruz. L. (2011). Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz-Cajamarca. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Botánica Tropical con mención en Taxonomía y Sistemática Evolutiva.
- Sandoval N., et al. (2012). Diagnóstico y tratamiento de dermatofitosis y pitiriasis versicolor. Rev Med Hondur, Vol. 80, No. 2.
- Sen A., Dhavan P., Shukla K., Singh S., Tejavathi G. (2012). Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of  $\beta$ -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. Science Secure Journal of Biotechnology (SSJBt) Volume 1 Issue 1 Page: 9-13.
- Singh B., Dtt N., Kumar D., Singh S., Mahajan R. (2011). Taxonomy, Ethnobotany and Antimicrobial Activity of *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta* and *Phyllanthus fraternus*. Journal of Advances in Developmental Research 2 (1) 2011 : 21-29.
- Suparna M, Chakraborty N. (2013). Shedded *Artocarpus* leaves – Good plant sources of natural squalene with potent antioxidant and antimicrobial activity - Alternative to marine animals. Journal of Natural Pharmaceuticals, Volume 4, Issue 1, January-June, 2013.
- Terence M., Burkhard C. (2007). NMR – From Spectra to Structures. Editorial Springer.
- Tesso H. (2005). Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants. In Fulfillment of the Requirements for the Doctorate Degree at the Institute of Organic Chemistry University of Hamburg.

- Tchinda A., Teshome A., Dagne E., Arnold N., Wessjohann L. (2006). Squalene and amentoflavone from *Antidesma laciniatum*. Rev. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2006, 20(2), 325-328.
- Tirado M., Moreno R., Celades M., Bellido J., Pardo F. (2009). Evolución de los serotipos, fagotipos y resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* sp en el departamento de salud 02 de la provincia de Castellón, España (2000-2006). Rev Chil Infect 2009; 26 (6): 520-527.
- Valencia C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. México. Editorial Trillas.
- Vera A. (2012). Determinación del efecto inhibitorio del látex de *Croton draco* Schltdl & Cham var. *draco* en cepas de bacterias y hongos fitopatógenos cultivados in vitro. Tesis para obtener el título de licenciado en Biología. Córdoba – México.
- Verdezoto J. (2013). Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae). Química Central (2013) Vol. 3, No. 01: 37-42.
- Webster L. (1994). Classification of the Euphorbiaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 81:3-32.

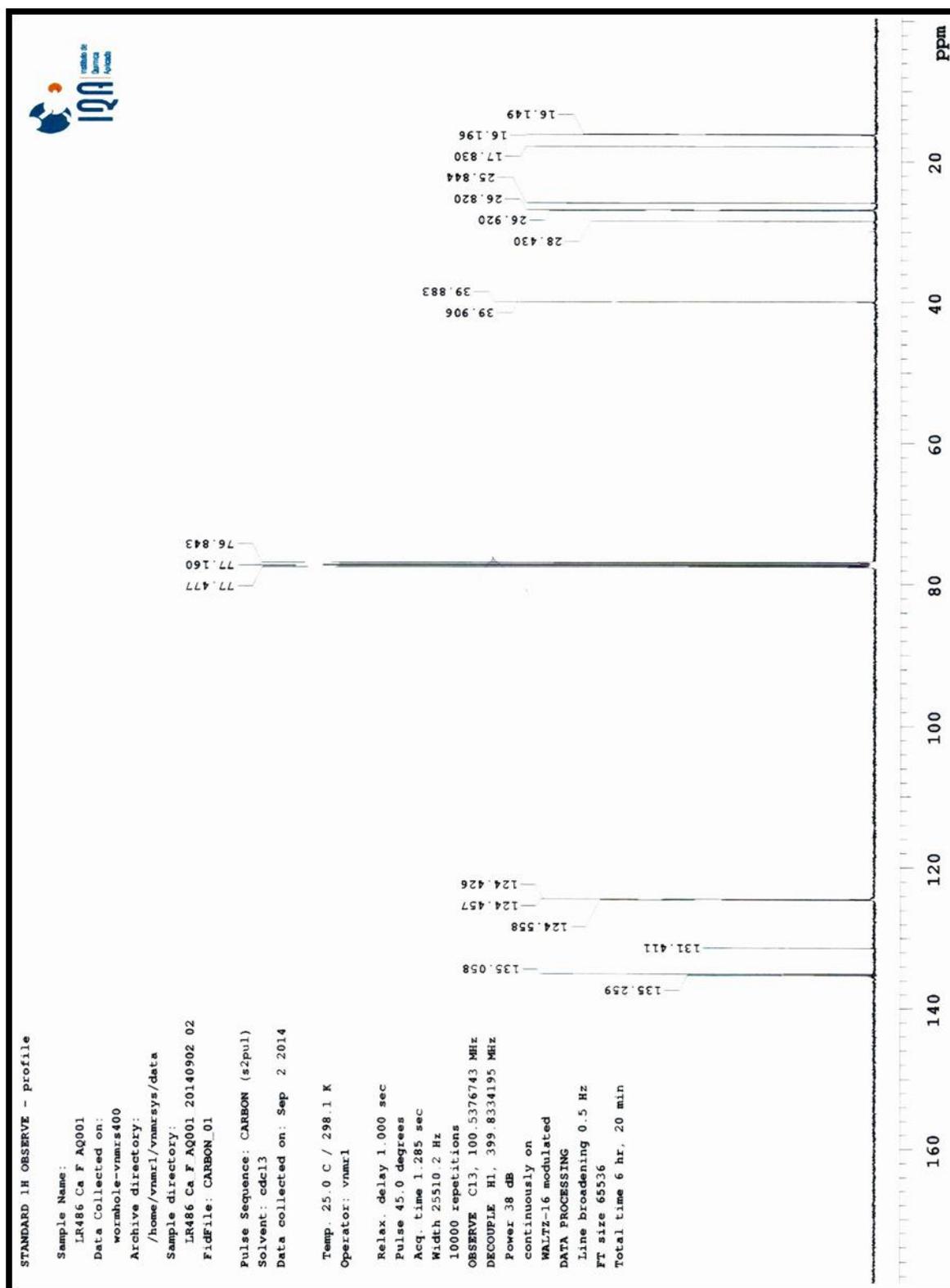
## **ANEXOS**

## Espectros de Resonancia Magnética Nuclear y CG-EM de Escualeno

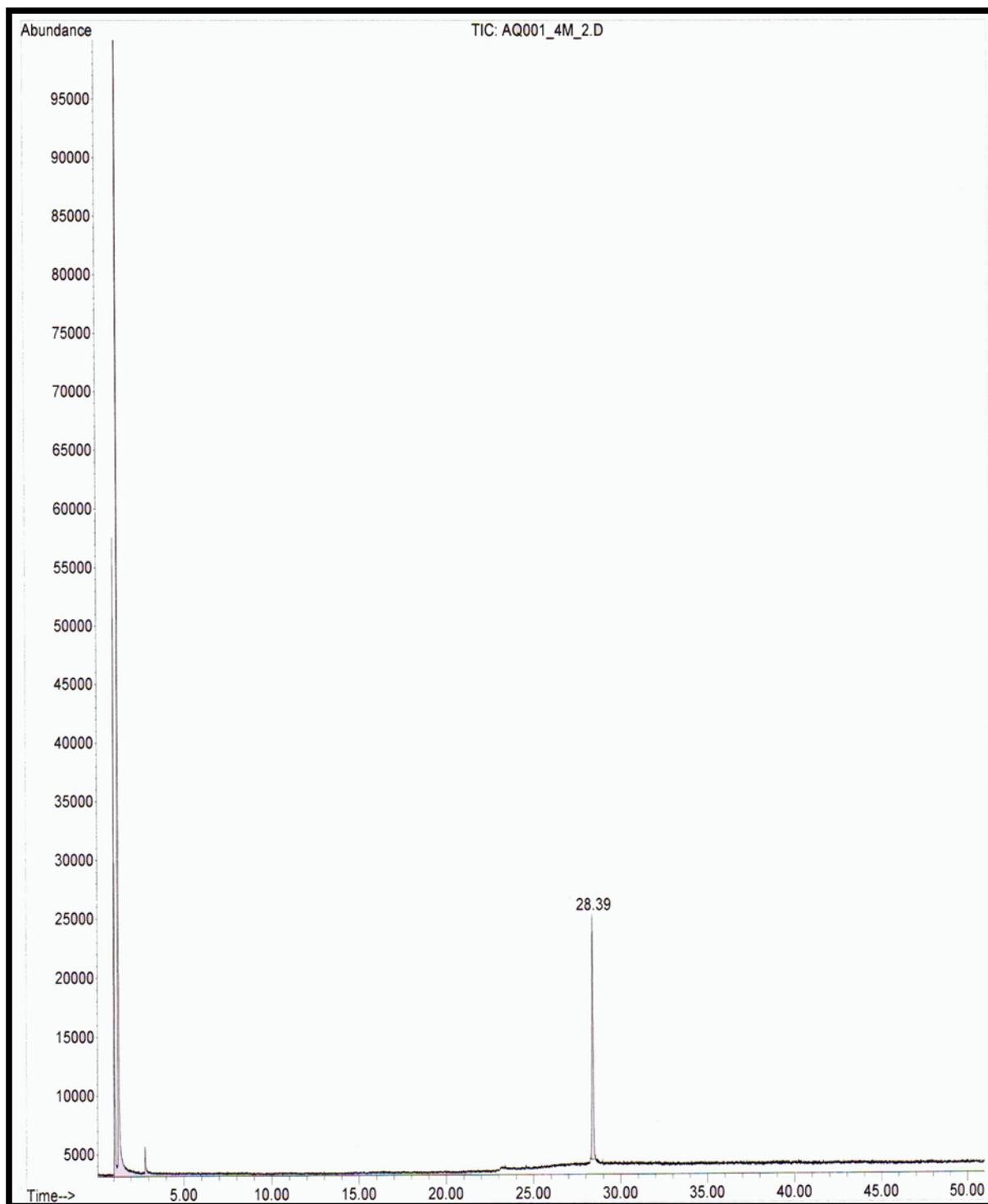
### Anexo 1a: Espectro de $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



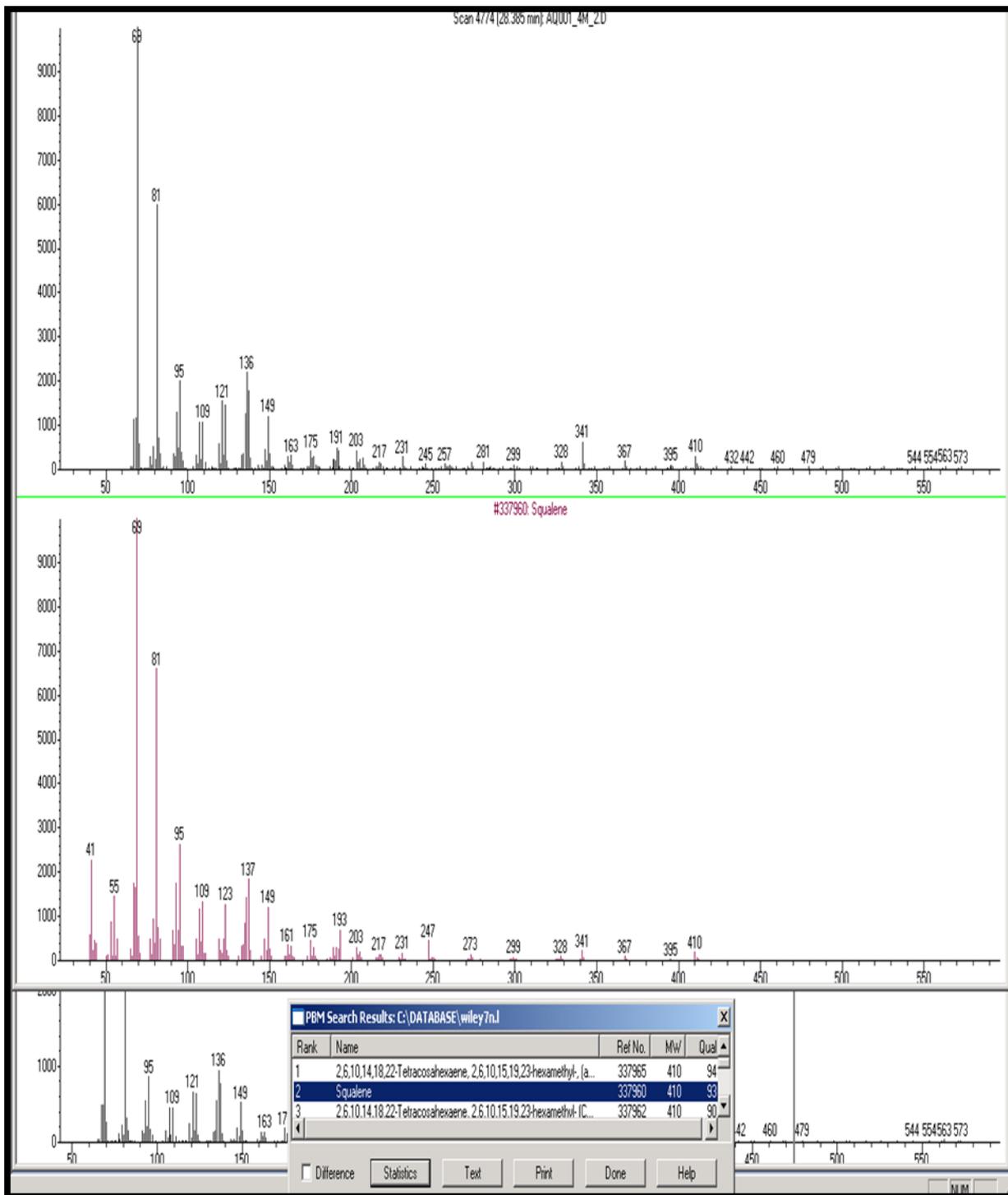
Anexo 1b: Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo 1c:** Espectro de CG-EM.

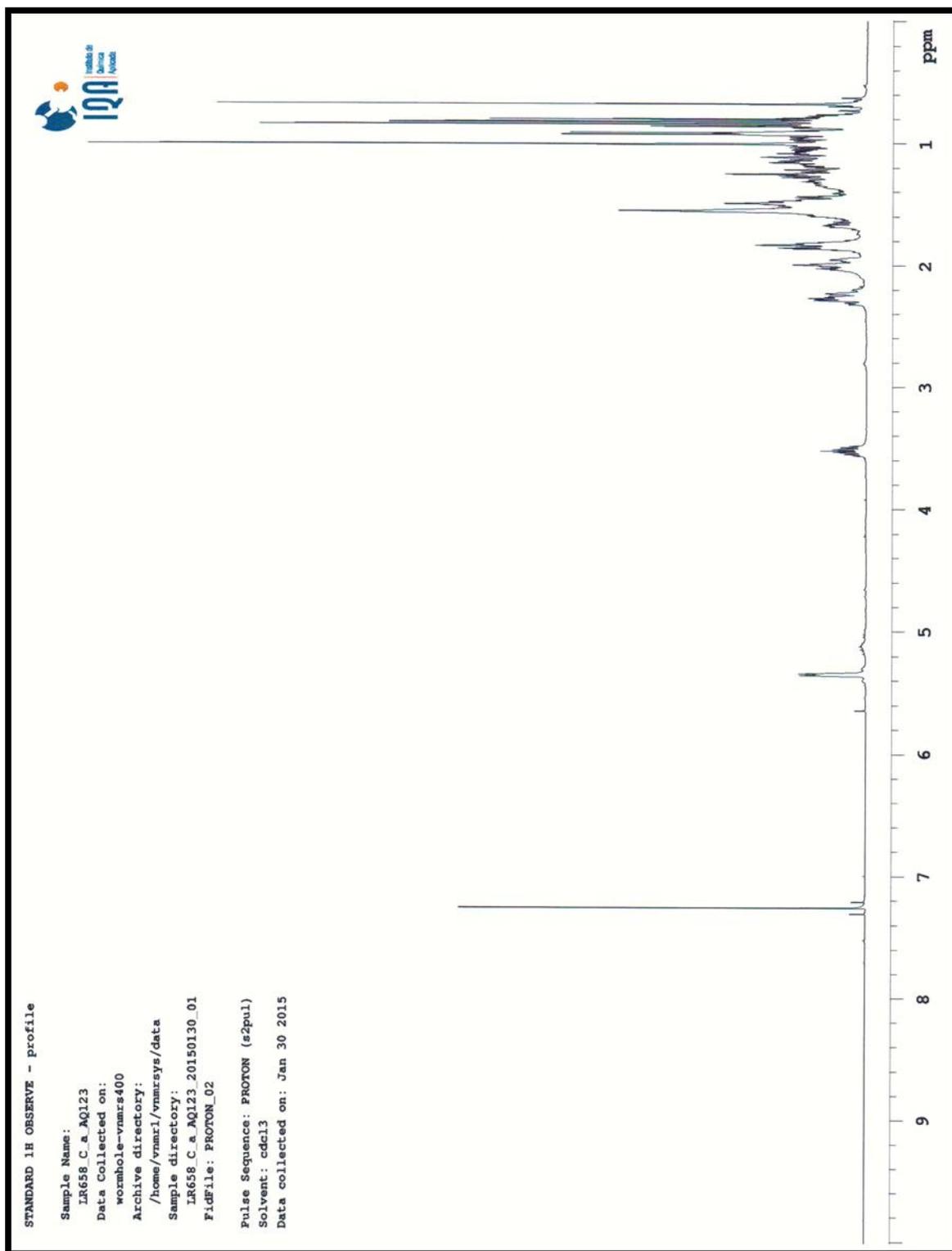


Anexo 1c: Espectro de CG-EM.

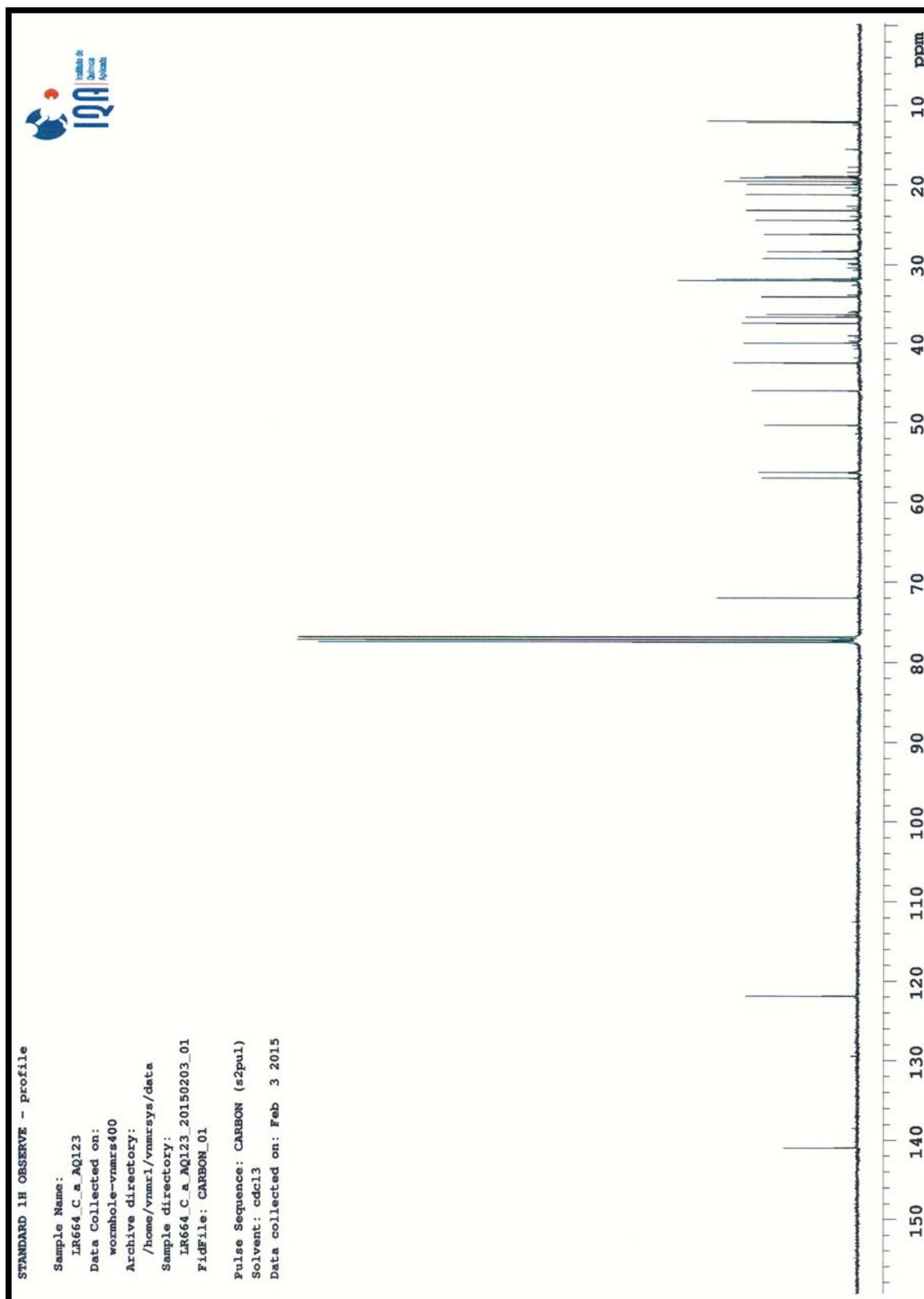


## Espectros de Resonancia Magnética Nuclear y CG-EM de $\beta$ -sitosterol

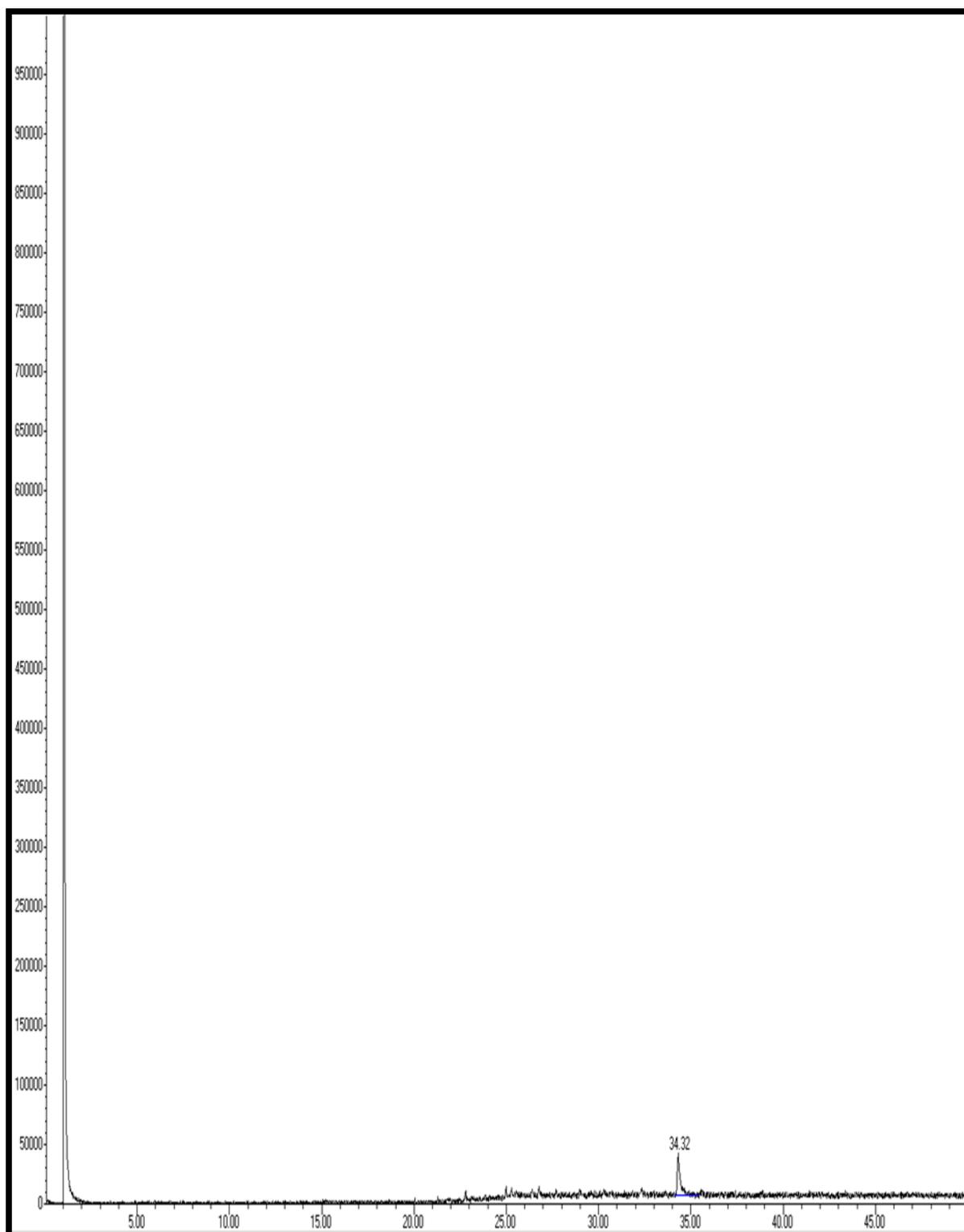
Anexo 2a: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Anexo 2b: Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Anexo 2c:** Espectro de CG-EM.



## Anexo 2c: Espectro de CG-EM

