



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULO BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Determinación de metabolitos secundarios del látex de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Arévalo Ojeda, Carlos Alberto

DIRECTOR: Armijos Riofrío, Chabaco Patricio, Ph. D.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D

Chabaco Patricio Armijos Riofrío.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Determinación de metabolitos secundarios del látex de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf.**”, realizado por Carlos Alberto Arévalo Ojeda, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, tanto en el aspecto de forma y contenido, por cuanto se aprueba su presentación del mismo.

Loja, marzo de 2016

f).....

Ph. D Chabaco Patricio Armijos Riofrío.

C.I. 1102430509

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Arévalo Ojeda Carlos Alberto, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Determinación de metabolitos secundarios del látex de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., de la Titulación Bioquímico Farmacéutico, siendo el Ph. D Chabaco Armijos 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 de 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Arévalo Ojeda Carlos Alberto

C.I. 1900384163

DEDICATORIA

Dedico de manera especial a mi esposa Victoria pues ella fue el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación.

Gracias Dios por concederme la mejor compañía para mi vida.

A mi Padre, a mi Madre y a mi hermana que son personas que me han ofrecido el amor y la calidez de la familia a la cual amo.

AGRADECIMIENTOS

Familia, amigos y personas especiales en mi vida, no son nada más y nada menos que un solo conjunto de seres queridos, importantes en mis circunstancias de humano. No podría sentirme más ameno con la confianza puesta sobre mi persona, especialmente cuando he contado con su mejor apoyo.

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes, personas de bien, seres que ofrecen amor, bienestar, y los fines deleites de la vida.

Muchas gracias a aquellos seres queridos que siempre guardo en mi alma.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	
CERTIFICACION	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	10
ABSTRACT AND KEYWORDS	11
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I	
1. Fin, propósito y componentes del Proyecto.	14
CAPÍTULO II	
Medicina Tradicional	16
Plantas Medicinales	16
Definición	16
Importancia	16
Productos Naturales	17
Metabolitos secundarios	18
Características botánicas, taxonómicas y fitoquímica de la especie <i>Euphorbia weberbaueri</i> Mansf.	21
CAPITULO III	23
Materiales y métodos	24
Metodología	24
Desarrollo	24
Recolección de materia vegetal	24
Tratamiento de la muestra vegetal	25
Aislamiento y purificación	26
Cromatografía en columna	26
Cromatografía en capa fina	26
Microcolumnas	26
Identificación y Caracterización de compuestos	27
Punto de fusión	27
Resonancia Magnética Nuclear	27
Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas	27
CAPITULO IV	28
Resultados y discusiones	29
Elución mediante cromatografía en columna	29
Identificación de metabolitos secundarios	31
Compuesto 1	31
Compuesto 2	33
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origen de algunos metabolitos secundarios: alcaloides, fenilpropanoides y terpenos.	19
Figura 2. Ruta biosintética de los terpenos.	20
Figura 3. Taxonomía de <i>Euphorbia weberbaueri</i> Mansf.	21
Figura 4. Esquema de la metodología desarrollada	24
Figura 5. Especie <i>Euphorbia weberbaueri</i> Mansf.	25
Figura 6. Mapa de la zona de recolección de la especie <i>E. weberbaueri</i> Mansf.	25
Figura 7. Compuesto (1) (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol	30
Figura 8. Unión de fracciones (23 – 34)	31
Figura 9. Unión de fracciones (135 - 142)	32
Figura 10. Compuesto (2) lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en columna	29
Tabla 2. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en microcolumna del compuesto 1.	30
Tabla 3. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en microcolumna del compuesto 2.	32

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
p.f.	Punto de fusión
UV	Ultravioleta
RMN	Resonancia Nuclear Magnética
RMN ^1H	Resonancia Nuclear Magnética de protón
RMN ^{13}C	Resonancia Nuclear Magnética de carbono
EM	Espectrometría de masas
CDCl_3	Cloroformo
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desplazamiento químico
ppm	Partes por millón
J	Constante de acoplamiento
Hz	Hertz

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir del látex de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., debido a los reportes bibliográficos de otras especies pertenecientes al género en los que se señalan sus múltiples usos y aplicaciones en la medicina tradicional. La especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., fue recolectada en el cantón Catamayo provincia de Loja; de la cual se obtuvieron dos compuestos terpenoides identificados como (3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (Cicloartenol) y lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3 β)-, los compuestos aislados fueron identificados mediante RMN ^1H , ^{13}C , CG/EM y por comparación de los datos espectroscópicos con los reportados en literatura y bases de datos.

Palabras claves: *Euphorbia weberbaueri* Mansf., Terpenoides.

ABSTRACT

In the present study was realize the isolation and identification of secondary metabolites from the latex of *Euphorbia weberbaueri* Mansf. Due that many bibliographic report and identify different uses and applications in traditional medicine in other species of the same genus. The *Euphorbia weberbaueri* Mansf. plant, was collected on Catamayo, (Loja province).

In the latex of this specie were obtain and identify two compounds terpenoid (3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (Cycloartenol) and lanosta-8,24-dien-3-ol,acetate, (3 β)-. This compounds were identify by RMN ^1H , ^{13}C , GC / MS and by comparison of the spectroscopic with reported in literature and databases.

Keywords: *Euphorbia weberbaueri* Mansf., terpenoids

INTRODUCCION

La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo. Como su nombre indica, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplean prácticas que se han transmitido de una generación a otra desde centenares de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la actualidad, 2/3 de la población de los países con economías en desarrollo recurren a la medicina tradicional, siendo un sistema complementario a la medicina alopática o científica. La utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención primaria de la salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente entre el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos.

Estos principios activos también llamados metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, son, en principio, no esenciales para la vida pero contribuyen definitivamente a la adaptación de las especies y su supervivencia.

CAPITULO I

1. Fin, Propósito y Componentes del proyecto

Fin

Esta investigación tiene como objetivo aportar con un estudio fitoquímico de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., mediante el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios por métodos cromatográficos y espectrométricos.

Propósito

El propósito del proyecto es aislar e identificar metabolitos secundarios de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., que nos permitan descubrir y aportar a nuevos conocimientos para el avance de estudios posteriores.

Componentes del Proyecto

- Fraccionar metabolitos secundarios de *Euphorbia weberbaueri* Mansf., mediante técnicas cromatográficas: cromatografía en columna y cromatografía en capa fina.
- Purificar los compuestos obtenidos mediante técnicas de cristalización y purificación (par de disolventes).
- Identificar los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece ^{13}C ; Resonancia Magnética Nuclear de protón ^1H ; Espectroscopia de Masas.

CAPITULO II

Medicina Tradicional

El amplio uso de la medicina tradicional se atribuye a su accesibilidad y asequibilidad, siendo muchas veces la única fuente para la atención sanitaria de los pacientes de menores recursos (OMS, 2002-2005),(Morón & Jardines, 1997).

Los productos naturales empleados con el objetivo de mejorar los males que aquejaban al hombre han estado presentes por siglos. Ya desde la Edad Antigua la utilización de las plantas y algunos de sus derivados eran empleados en China, Babilonia y Egipto. El primer texto escrito en relación con la medicina sobre la base de plantas se reporta en la arcilla, en la cual se agrupaban una serie de tabletas grabadas con caracteres cuneiformes sobre las plantas y los autores de estas notas, redactadas 3.000 años a.c. Desde los sabios del Alto Egipto hasta los druidas místicos de los bosques galos, desde los médicos chinos de hace 5.000 años hasta los grandes científicos del siglo XVIII, no se ha dejado nunca la búsqueda hacia el conocimiento de las plantas y sus virtudes terapéuticas (Oramas & Rodríguez, 1999).

Plantas Medicinales

Son plantas medicinales todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. Se calcula que de las 260000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, es decir se encuentran recogidas dentro de los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso. (Perez Cosme Irais, 2008)

Importancia

La utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención primaria de la salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente entre el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos.

En algunas comunidades, donde grupos étnicos utilizan la fitoterapia popular entre sus terapéuticas ancestrales, las plantas medicinales forman parte de su acervo cultural, asimismo, en aquellos contextos culturales, donde la población de escasos recursos económicos, tiene dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, también se recurre a la medicina tradicional (Carrillo, Moreno, & Moreno, 2007).

Los usos de las plantas medicinales datan desde los orígenes del hombre, esta tradición ha sido transmitida de generación en generación a lo largo de la historia, prevaleciendo a través de los diferentes contextos sociales. La transmisión de información como fenómeno comunicacional, está profundamente arraigado en el comportamiento humano y social a tal punto que es difícil pensar en situaciones sociales o de comportamiento humano en el que la comunicación no esté presente. A lo largo de la historia la transmisión oral de los saberes populares ha sido una herramienta indispensable para la formación de la idiosincrasia cultural de los pueblos (Iribernagaray, 2011).

Productos Naturales

Recordemos que el laboratorio natural más pequeño y completo que existe en el mundo es la célula vegetal, allí se realizan una serie de reacciones químicas, procesos metabólicos por los que la planta nos brinda alimentos (almidones, azúcares, proteínas, lípidos, etc.) y la materia prima de nuestra ropa, vivienda y otros (celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina, caucho entre otros). Además producen sustancias consideradas como metabolitos secundarios, los mismos que son considerados como principios activos, que son sustancias químicas que ocasionan efectos terapéuticos en el hombre y en los animales. Algunos de estos principios aún no han sido estudiados y otros ya han sido aislados y purificados; entre estos compuestos encontramos a los alcaloides, glucósidos, aceites esenciales, gomas, resinas, aceites grasos y sustancias antibióticas.

Las plantas también son fuentes de vitaminas y oligoelementos como el Magnesio, Calcio, Fosforo, Hierro, Silicio, Cobre, Sodio entre otros, que nuestro organismo necesita para mantener su equilibrio energético (Chumacero Aida, 1996).

Metabolitos secundarios

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora (García, 2004).

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, son, en principio, no esenciales para la vida pero contribuyen definitivamente a la adaptación de las especies y su supervivencia. Son más característicos para un grupo biológico particular, tal como una familia o un género, y aparentemente, la maquinaria sintética puesta en juego aquí está relacionada con la evolución de las especies (Naivy & Jiménez, 2011).

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis de metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por insectos y vertebrados herbívoros. Así mismo, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por las plagas (Sepúlveda Jiménez, Ducoing, & Rocha Sosa, 2003).

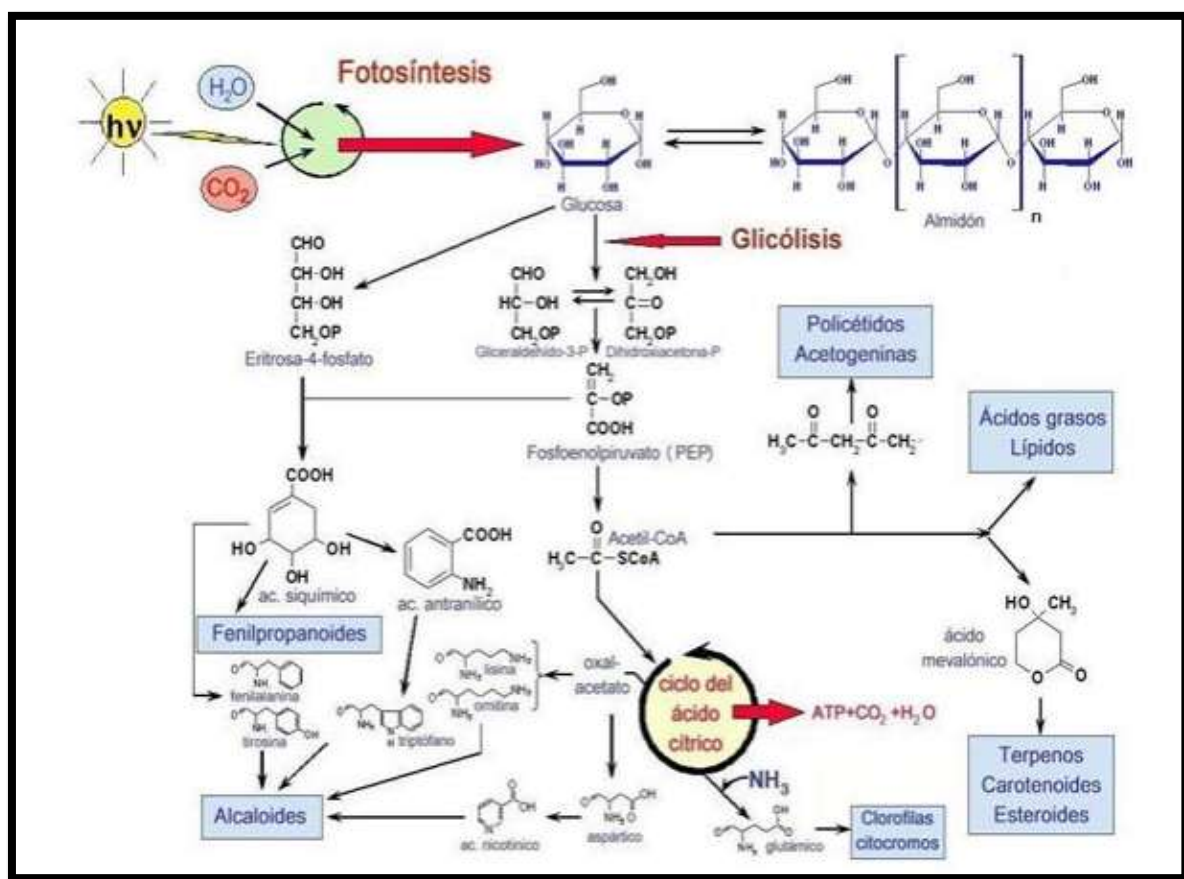


Figura 1. Origen de algunos metabolitos secundarios: alcaloides, fenilpropanoides y terpenos.

Fuente Ávalos, 2009.

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios más de 40.000 moléculas diferentes. 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 (Ávalos & Carril Urria, 2009).

Los terpenos, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C_5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman, pueden clasificarse como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) según las unidades de isopreno (Lock de Ugaz, 2015). En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva al cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta DXP, la cual es independiente de la del

mevalonato y que se realiza en los plástidos. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Sepúlveda Jiménez et al., 2003)

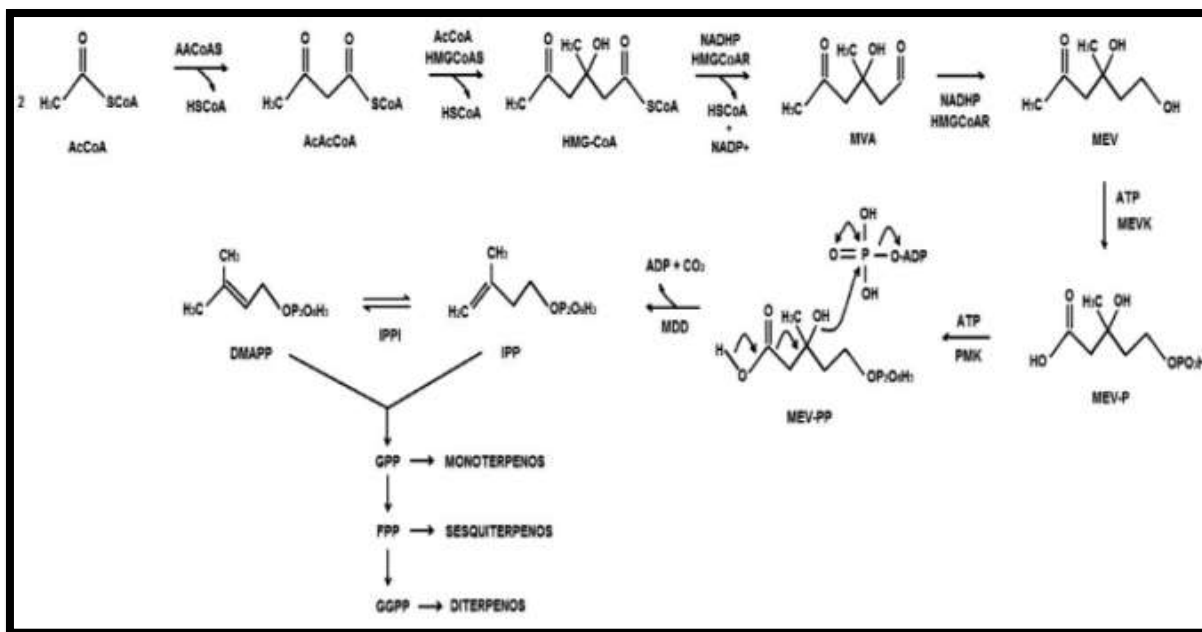


Figura 2. Ruta biosintética de los terpenos.

Fuente López, 2012.

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas, pigmentos carotenoides, esteroides, derivados de los esteroides, látex y aceites esenciales. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. Muchos terpenos son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas, entre otras. (Ávalos & Carril Urria, 2009).

Entre algunos de los terpenoides tenemos los monoterpenos tales como el mentol, que es un antimicrobiano, el citronelal, que es un repelente de insectos y las piretrinas que funcionan como venenos del sistema nervioso de los insectos, son componentes químicos con actividad biológica potencial durante la respuesta de defensa de las plantas que los producen. Los sesquiterpenos tales como la risitina y lubimina son compuestos con actividad antimicrobiana (López Carreras & Aleixandre, 2012).

Características botánicas, taxonómicas y fitoquímicas de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf.

	Reino: Plantae Subreino: Tracheobionta División: Magnoliophyta Clase: Liliopsida Orden: Malpighiales Familia: Euphorbiaceae Tribu: Euphorbieae Género: <i>Euphorbia</i> Especie: <i>E. weberbaueri</i> Mansf.
---	---

Figura 3. Taxonomía de *Euphorbia weberbaueri* Mansf.

Fuente Cabrera, 2012

La familia Euphorbiaceae es una gran familia de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas entre las que existen hierbas, arbustos, árboles, cactus y lianas. Es una de las familias de angiospermas con mayor número de especies en el mundo. Las plantas que pertenecen a esta familia se caracterizan por presentar en todos sus órganos tubos laticíferos por donde recorre abundante látex, generalmente de un color blanco o amarillento (García H, 1975), ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional y varios de sus compuestos han sido reportados por su actividad antiviral reguladora del ciclo celular y de las funciones celulares; una de estas moléculas, Prostratin tiene efecto sobre formas latentes del virus HIV.(Tabares et al., 2007)

El género *Euphorbia* consta de alrededor de 2.000 especies en regiones templadas y cálidas del planeta; son plantas generalmente monoicas, con látex, anuales, bienales o perennes, hierbas, sufrútices o árboles, a veces suculentas o espinosas. En Ecuador, el género cuenta con 19 especies, 12 nativas, 6 introducidas y una endémica de la costa del Pacífico y de las Islas Galápagos. De las especies referidas anteriormente, 10 son hierbas y 9 son arbustos o pequeños árboles (Cabrera & Prina, 2013).

Euphorbia weberbaueri Mansf., es un arbusto succulento, cactiforme, no espinoso, con látex, de 1,5-2 m, con ramas laxas, articuladas, erectas o sub erectas, costadas de 2-2,5 cm de diámetro, las basales algo lignificadas. Hojas rudimentarias, escamosas, de 1,5 mm x ca. 1 mm, anchamente ovado-triangulares. Cimas breves, insertas en los pulvinos axilares laterales, generalmente con 3-4 ciatios subsésiles; brácteas basales 2, opuestas, obovadas, con lóbulos laciniados; nectarios 4, elípticos, semilunados, cóncavos, cortamente estipitados. Cápsulas tricocas glabras, de 4 mm de diámetro, con los cocos dorsalmente carinados. Semillas marrón oscuras, algo verrucosas a lisas (Cabrera & Prina, 2013), (Pino Infante, 2006).

En los estudios realizados en las especies del género *Euphorbia* se han podido aislar y caracterizar una amplia variedad de metabolitos secundarios con importante actividad biológica tales como terpenoides, flavonoides, taninos, lignanos y otros compuestos polifenólicos, cumarinas, lectinas y péptidos, los mismos que han mostrado tener actividad antiviral, citotóxica, inmunomoduladora, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, cicatrizante, entre otras (Coronel Llanes, 2009) (Tabares et al., 2007).

La pepluanona, un terpeno aislado de *Euphorbia peplus* atenúa la producción de óxido nítrico, prostaglandina E_2 y $TNF-\alpha$ en macrófagos murinos estimulados con LPS, un efecto debido a una inhibición de la activación del NF- κ B. También se han encontrado algunos diterpenos con actividad sobre la proliferación celular (Corea G. et al, 2005). El yuexiandajisu, un diterpeno aislado de la raíz de *Euphorbia ebracteolata*, induce una inhibición de la proliferación de linfocitos B y adicionalmente posee actividad antitumoral contra la línea celular de leucemia de ratón P-388 (Xu ZH. et al, 2000). En la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., no se han encontrado reportes de metabolitos secundarios aislados, pero si en otras especies del mismo género como *Euphorbia tirucalli* de la misma que se ha podido aislar el tirucallol, molécula a la que se le atribuyen actividades biológicas de importancia (Tabares et al., 2007), el éster 4-dexiforbol aislado del látex de esta planta induce una regulación negativa de esta proteína, bloqueando así la actividad citotóxica de los linfocitos T (Coronel Llanes, 2009).

CAPITULO III

3. Materiales y Métodos

3. 1. Metodología

Esquema del diseño experimental desarrollado para el presente estudio.



Figura 4. Esquema de la metodología desarrollada
Fuente: Arévalo C., 2015

3. 2. Desarrollo

Este proyecto de investigación se lo desarrollo en el Departamento de Química, Laboratorio de Fitoquímica como aporte de la sección de química básica y aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja.

3. 3. Recolección de Materia Vegetal

La especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., objeto de este estudio fue recolectado en la Provincia de Loja, en el cantón Catamayo, con coordenadas geográficas 79° 26' 52'' W- 3° 38' S, y una altitud de 1980 m.s.n.m. Dos muestras fueron depositadas en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja. Con números de voucher: 087, HUTPL y 060, HUTPL.



Figura 5. *Euphorbia weberbaueri* Mansf.

Fuente Arévalo C., 2015

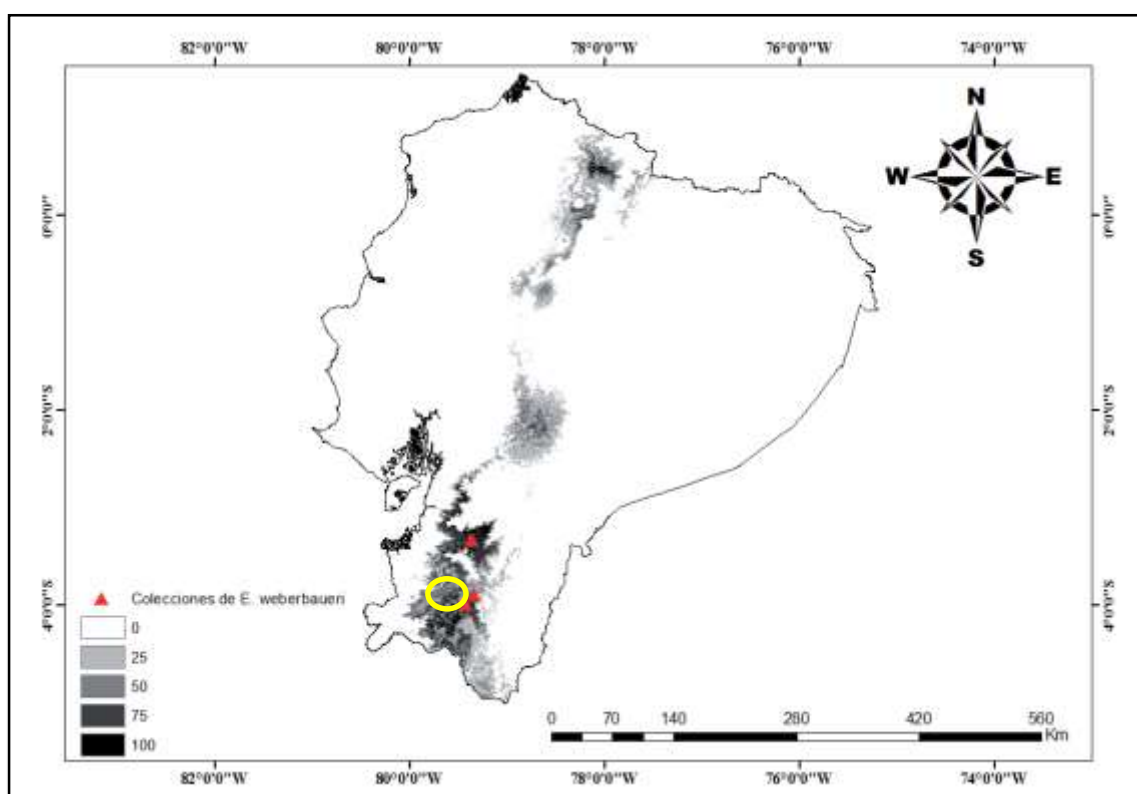


Figura 6. Mapa de la zona de recolección de la especie *E. weberbaueri* Mansf.

Fuente: Cabrera, 2012

3. 4. Tratamiento de la muestra vegetal

Se recolectó la muestra vegetal y se eliminaron las impurezas y partes degradadas, se recortó un poco la corteza vegetal para que del mismo desprenda el látex blanquecino que es la muestra a tratar, aproximadamente 7.5 g se obtuvieron. El proceso se completó limpiando el látex en el rota- evaporador con disolvente metanol – diclorometano y así eliminar restos de agua e impurezas.

Para la siembra de la muestra se basa en la mejor separación de los compuestos observados en las placas de CCF.

Aislamiento y Purificación

Cromatografía en columna (CC)

La columna se empacó en húmedo con sílica gel Merck 0.015-0040 nm, en columnas de vidrio de 55 mm de diámetro por 60 cm de altura mediante compactación por presión. La muestra se mezcla con una pequeña cantidad de sílica gel y disuelta con CH₂Cl₂ para formar una matriz homogénea.

Se utilizó 6 g. de látex en una proporción sílica gel: muestra (60:1). El proceso de aislamiento se realizó mediante columna con una gradiente de la siguiente manera: Hexano (100), Hexano – Acetato de Etilo (98:1), Hexano – Acetato de Etilo (96:1), Hexano – Acetato de Etilo (95:1), Hexano – Acetato de Etilo (90:1), Hexano – Acetato de Etilo (80:1), Hexano – Acetato de Etilo (60:1), Hexano – Acetato de Etilo (30:1), Hexano – Acetato de Etilo (20:1) y Acetato de Etilo (100)

Para la elución en la columna cromatográfica del extracto se tomó un volumen de 500 ml de cada una de las polaridades utilizadas, seguido se eliminó el solvente por rotaevaporación y finalmente placas de Cromatografía en Capa Fina para determinar la riqueza fitoquímica de cada una de las fracciones obtenidas.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizó placas pre-recubiertas (20 x 20 cm) en gel de sílice Merck 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm. La determinación de los metabolitos en las placas se realizó por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y 360 nm. Como eluyentes se utilizó Hex – AcOEt y como revelador: ácido sulfúrico 5% / vainillina 1%.

Microcolumnas

El control por CCF evidenció fracciones con similar composición por tanto se unieron y se realizó el fraccionamiento por microcolumna como método para purificar compuestos.

De la columna se unieron las fracciones 208 – 210 con un peso de 276 mg. Las fracciones unidas se sometieron a fraccionamiento en microcolumna con una relación de sílica gel: muestra (100:1). El fraccionamiento se lo realizó en sílice fase inversa con el siguiente gradiente: Metanol – Agua (90:10), Metanol – Agua (95:5), Metanol (100). Se utilizó un volumen de 1000 ml por cada polaridad.

Las microcolumnas utilizadas tienen un diámetro de 10 mm por 30 cm de altura.

Identificación y Caracterización de compuestos

Punto de fusión

Para la determinación del punto de fusión se utilizó un equipo de fusión capilar Fisher Jones Melting Point Apparatus, serial 40-22. Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el lente de la unidad. Se registra la temperatura a la cual la muestra pasa de estado sólido a líquido.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se registraron en el equipo Varian Unity con serie No. 21953, que opera a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz ^{13}C , a una temperatura de 25°C. Los compuestos se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3). Como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). El valor de los desplazamientos químicos (δ) se expresan ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas (GC/EM)

Los espectros de masas se registraron en una equipo Aligent 6890N GC-MS, con una columna capilar de cuarzo (30 m x 250 μm) modelo Agilent 122-5532. Las condiciones de operación fueron: Temperatura de horno, 50 °C (2 min) hasta 270 °C (15 min) a una velocidad promedio de 40 cm/seg; gas portador, nitrógeno; temperatura del detector 250 °C, energía de ionización 70 eV.

CAPITULO IV

4. Resultados y Discusiones

4.1. Elución mediante cromatografía en Columna

En la tabla 1 se muestran el número de fracciones que fueron obtenidas mediante cromatografía en columna y los disolventes químicos utilizados.

Tabla 1. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en columna

Disolventes	Proporción	Fracciones
Hex	100	1-16
Hex - AcOEt	98:1	17-38
	96:1	39-56
	95:1	57-79
	90:1	80-115
	80:1	116-140
	60:1	141-175
	30:1	176-194
	20:1	195-207
Hex	100	208-210
AcOEt - MeOH	9,5:0,5	211-214
MeOH	100	215-219

Fuente: Arevalo C., 2016

4.1.1. Fracción (208-210)

La fracción fue obtenida en hexano puro, presentándose un precipitado blanquecino con un peso de 276 mg. A continuación se purificó mediante cromatografía en columna utilizando silica gel RP18 fase inversa en relación 1:100 (compuesto: silica), eluyendo con una mezcla isocrática MeOH:Agua 90:10, MeOH:Agua 95:5, MeOH Puro, obteniéndose 202 fracciones (Tabla 2). De las cuales la reunión de las fracciones 23 a 34 mostró un grado de pureza elevado en CCF y se describen a continuación:

Tabla 2. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en microcolumna del compuesto 1.

Disolventes	Proporción	Fracciones
MeOH – Agua	90:10	1-68
MeOH – Agua	95:5	69-136
MeOH	100	137-202

Fuente: Arevalo C., 2016

4.1.2. Fracción: 23-34

La fracción 23-34 fue obtenida en proporción 90:10 v/v metanol-agua presentando un precipitado blanquecino grasoso, con un peso de 7 mg a la misma que se le realizó lavados consecutivos escogiendo disolventes mediante pruebas de solubilidad. Este precipitado presenta las siguientes características: color blanquecino, soluble en diclorometano y cloroformo, con un punto de fusión de 163 a 164 °C. Del análisis realizado se obtuvo una masa molecular de 427 g/mol con fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$; y se pudo identificar la molécula como (3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (ver anexos 1) (figura 7). Este compuesto también ha sido reportado en la especie *Euphorbia canarias*, (Gonzalez, Breton, Martin, & Fraga, 1971), (Breton, Castañeda, Fraga, & Gonzalez, 1970).

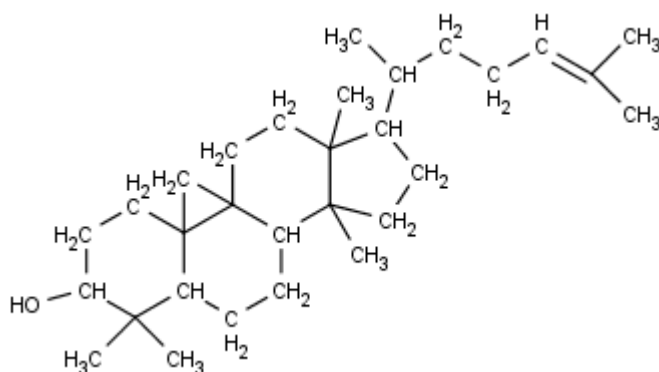


Figura 7. Compuesto (1) (3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol

Se realizó una cromatografía en capa fina fase inversa, utilizando metanol- agua en proporción 9:1 v/v en una placa de 5 cm de longitud.

El compuesto fue visible al ser revelado con ácido sulfúrico y vainillina al 5% se observó una mancha de color morado (figura 8), posteriormente se calculó el factor de retención que es 0,3.

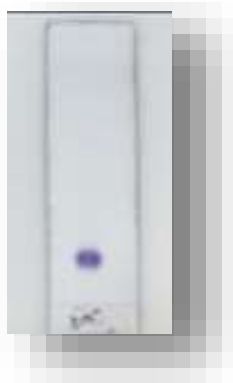


Figura 8. Unión de fracciones 23-34

Autor: Arévalo C., 2016

4.1.3. Identificación y Caracterización de metabolitos secundarios:

Compuesto 1: ((3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol) obtenido por C.C del látex de *E. weberbaueri* Mansf.

El compuesto fue confirmado mediante los estudios de resonancia de protón, en donde destacan las siguientes señales:

Cuyos datos espectroscópicos son: ^1H : (500 MHz, CDCl_3) δ 0.33 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 0.55 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 0.81 (3H, s), 0.88 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 0.89 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.97 (3H, s), 1.61 (3H, s), 1.69 (3H, s), 3.24-3.32 (1H, m), 5.10 (1H, t, $J = 7.2$ Hz). ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 14.0, 17.6, 18.0, 18.2, 19.3, 20.0, 21.1, 24.9, 25.4, 25.7, 26.0, 26.1, 26.5, 28.1, 29.9, 30.4, 32.0, 32.9, 35.6, 35.9, 36.4, 40.5, 45.3, 47.1, 48.0, 48.9, 52.3, 78.9, 125.3, 130.9.

La identificación se la realizó mediante comparación de espectros reportados en literatura, (Emilia & Accame, 2008), (Mannina, Fontanazza, Patumi, Ansanelli, & Annalaura., 2001), (Barreto, Carvalho, Nery, Kaplan, & Coelho., 1998), ver espectros 1 y 2. (Anexos)

Diversos estudios científicos señalan que compuestos como él (3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (Cicloartenol) son activos eficaces para reducir la absorción intestinal del colesterol tanto a fitosteroles como a tocoferoles. Su consumo en ratas alimentadas con una dieta proaterogénica origina un incremento en la eliminación por heces de colesterol y ácidos biliares. Entre los fitosteroles los más activos son β -sistosterol y otros 4-desmetilesteroles y no los 4,4'-desmetilesteroles como cicloartenol o 24-desmetilen cicloartenol. Se ha comprobado que la administración en humanos de 2,1 g de esteroides procedentes del insaponificable de arroz, es capaz de reducir hasta un 5 % el colesterol total y un 9 % el LDL-colesterol en voluntarios sanos normolipídicos. (Emilia & Accame, 2008).

4.2. Fraccionamiento en Metanol

De la unión de las fracciones 137 a 202 (tabla 2) obtenidas en metanol con un peso de 170 mg, se purificó en silica gel fase inversa en relación 1:100 (muestra:silica) eluido en polaridad 90:10 v/v AcOEt – MeOH, 100 MeOH, 95:5 v/v MeOH – Agua.

Obteniendo 180 fracciones de las cuales se unieron las fracciones 135 a 142, según sus características y factor de retención presentes en la cromatografía de capa fina (Tabla 3), y dicha unión se obtiene 1 nuevo compuesto por CC como se indica a continuación:

Tabla 3. Número de fracciones eluidas mediante cromatografía en microcolumna del compuesto 2.

Disolventes	Proporcion	Fracciones
AcOEt – MeOH	90:10	1-60
MeOH	100	61-122
MeOH - Agua	95:5	123-180

Fuente: Arevalo C., 2016

4.2.1. Fracción (135-142)

La fracción fue obtenida con MeOH – Agua, en proporción 95:5 v/v, como resultado de la cromatografía se observó un precipitado un color blanquecino, con un peso de 23,4. Siendo soluble en cloroformo y acetona.

Se realizó una cromatografía en capa fina, fase inversa, utilizando MeOH – Agua en proporción 9:1 v/v en una placa de 5 cm de longitud.

El compuesto fue visible al ser revelado con ácido sulfúrico y vainillina al 5% y se observó una mancha color morado (figura 9); posteriormente se calculó el factor de retención que fue de 0,3.



Figura 9. Unión de fracciones 135 – 142

Fuente: Arévalo C., 2016

4.2.2. Cromatografía de gases acoplados a masas.

Compuesto 2: lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-, del látex de *E. weberbaueri* Mansf.

La identificación se la realizó mediante comparación de espectros de cromatografía de gases acoplados a masas, reportados en literatura, (Manorenjita, M.S. A.K. Norita, S. Norhisham, M.Z. Asmawi, 2013), (C & GUPTA, 1984) , (NIST, 2104). Los espectros bibliográficos y del compuesto se visualizan en los Anexos (2 y 3).

El compuesto se identificó como; lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)- , ver figura N **10**, de fórmula molecular, $C_{32}H_{52}O_2$ con peso de 468,75 g/mol, con punto de fusión de 135 °C.

Este compuesto no se ha reportado para ninguna especie del género.

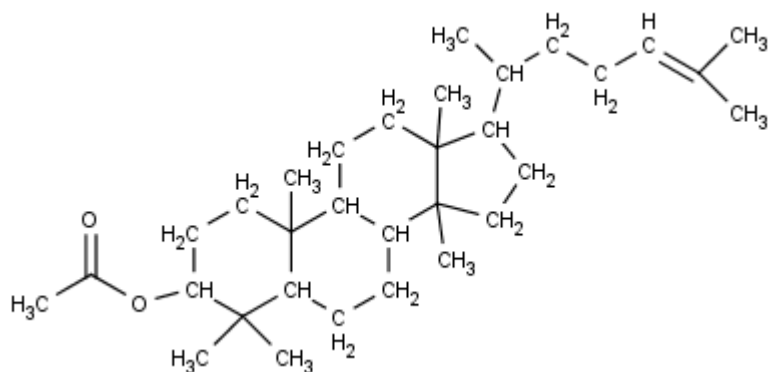


Figura 10. Compuesto (2) lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-

Conclusiones

- Las técnicas espectroscópicas y cromatograficas empleadas permitieron el aislamiento e identificación del terpeno, (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol a partir del látex de la planta, de igual forma se pudo identificar un segundo compuesto como el lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-, estructuras cuyos datos espectroscópicos fueron comparados y validados en reportes bibliográficos.
- De los compuestos identificados, (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol y lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta), no han sido reportados dentro de la riqueza fitoquímica de la especie en estudio, ni en otras especies pertenecientes al género *Euphorbia*.
- Debido a el látex fue extraído en una sola recolección en época de verano y en estadio de madures de la planta, no se puede determinar si estos metabolitos puedan presentarse en otras condiciones climáticas y en otros estadios de la planta.

Recomendaciones

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Euphorbia weberbaueri* Mansf., sobre todo por el alto conocimiento ancestral que les antecede, los múltiples usos y aplicaciones que se les da a nivel etnomedicinal a las especies pertenecientes al mismo género.
- Realizar estudios de bioactividad de los metabolitos aislados de la especie en el presente estudio, con la finalidad de validar su potencial efecto farmacológico.
- Se pueden considerar las condiciones climáticas y de estado de crecimiento de la planta para comprobar la existencia de los metabolitos.

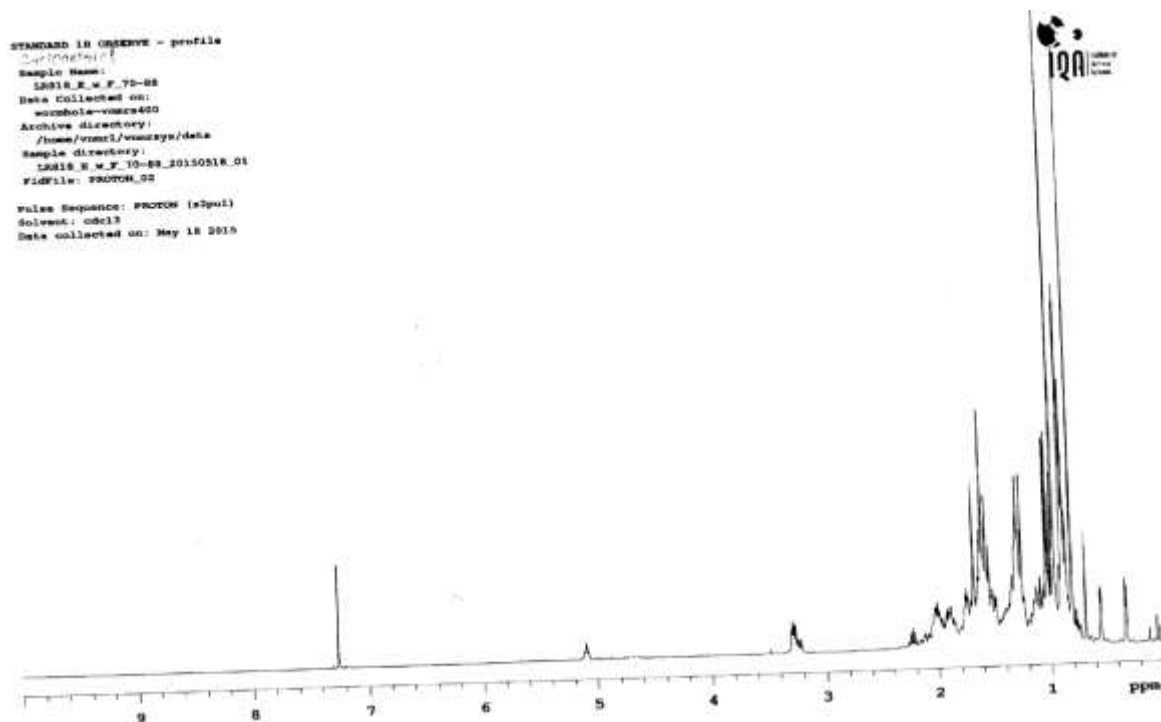
Bibliografía

- Ávalos, G. A., & Carril Urria, E. P. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119–145.
- Barreto, A. De S., Carvalho, M. G. De, Nery, I. De A., Kaplan, L. G., & Coelho, M. A. (1998). Chemical Constituents from *Himatanthus articulata*, 9(5), 430–434.
- Breton, L., Castañeda, P., Fraga, M., & Gonzalez, A. G. (1970). Latex de *Euphorbia canarias* XXI, Triterpenos de la E. *Segetalis* L.
- C, A., & GUPTA, J. And S. K. (1984). Isolation of lanosta-8 , 25-dien-3 / l-ol from the fungus. *Phytochemistry*, 23(10), 2392–2394.
- Cabrera, O., & Prina, A. O. (2013). *Euphorbia weberbaueri* (Euphorbiaceae), nuevo registro para Ecuador. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 48(1), 137–141.
- Carrillo, T., Moreno, R., & Moreno, G. (2007). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela., 48(2), 21–28.
- Chumacero Aida. (1996). Importancia de las plantas en la salud. Bióloga UNMSM Dpto. Botánica.
- Coronel Llanes, D. S. (2009). Actividad inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia Euphorbiaceae.
- Emilia, M., & Accame, C. (2008). Aceites vegetales VI : Insaponificables y compuestos relacionados.
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(1), 1–12.
- Gonzalez, J., Breton, L., Martin, M., & Fraga, B. M. (1971). Latex de *Euphorbia canarias* XXII , Triterpenos de la E. *Regis-Jubae* W.B.
- Iribernagaray, G. T. (2011). Plantas medicinales Transmisión de saberes populares. Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE-CSIC).

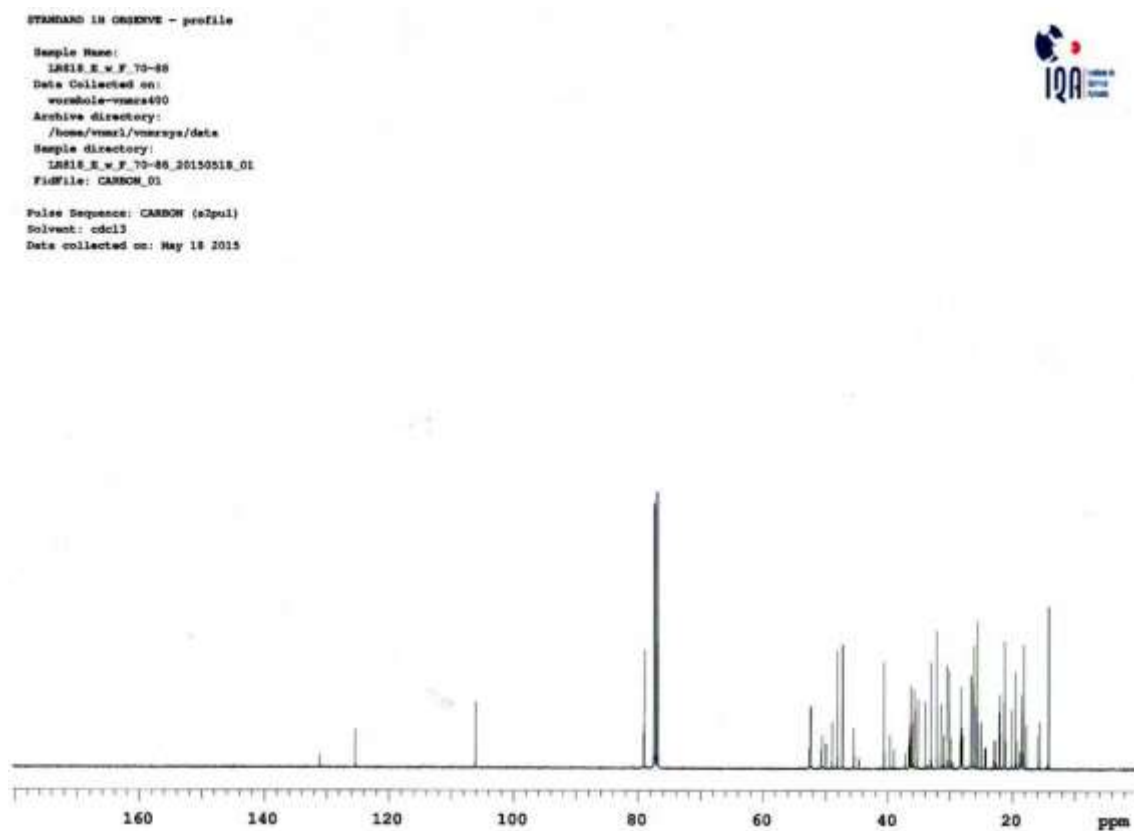
- Lock de Ugaz, OI. (2015). Analisis fitoquimico y metabolitos secundarios.
- López Carreras, N., & Aleixandre, M. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes. *Nutricion clínica y dietetica hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Mannina, L., Fontanazza, G., Patumi, M., Ansanelli, G., & Annalaura., S. (2001). Italian and Argentine olive oils: a NMR and gas chromatographic study.
- Manorenjita, M.S. A.K. Norita, S. Norhisham, M.Z. Asmawi. (2013). analysis of bioactive components of ficus religiosa (linn .) stem, 4(2), 99–103.
- Martínez, A. M. (2002). Esteroles. Facultad de Química Farmacéutica.
- Morón, F. J., & Jardines, J. B. (1997). La medicina tradicional en las universidades médicas, 2(1), 35–41.
- Naivy, P. A., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- NIST National Institute of standards and Technology;(2014) marzo 2016; Recuperado de la web: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C2671683&Mask=200#Mass-Spec>
- Oramas, J., & Rodríguez, I. (1999). Artículo La información científica y la medicina tradicional y natural, 12(1), 39–46.
- Perez Cosme Irais. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 23–26.
- Pino Infante, G. (2006). Estado actual de las Suculentas en el Perú. *Zona Aridas*, 1(Vi), 155–173.
- Sepúlveda Jiménez, G., Ducoing, P. H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Tabares, P., Avila, L., Torres, F., Cardona, D., Quiñones, W., Forero, J., ... Echeverri, F. (2007). Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia euphorbiaceae. *Scientia et Technica*, (33), 107–110.

ANEXOS

Anexos 1



Espectro N° 1. Espectro de RMN ^1H del compuesto (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, del látex de la especie *E. weberbaueri* Mansf.

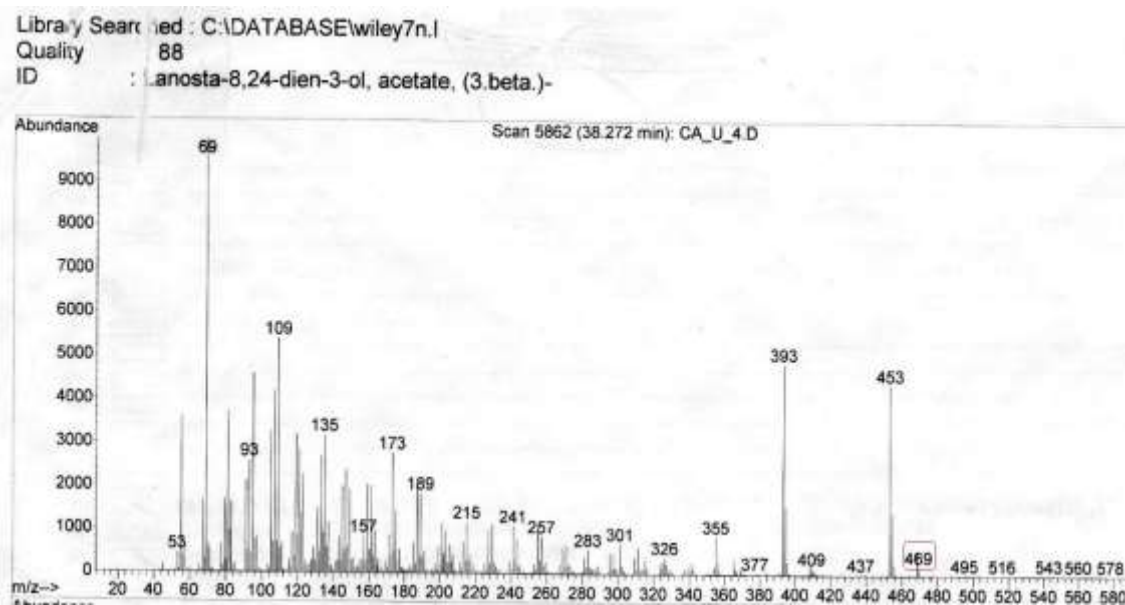


Espectro N° 2. Espectro de RMN ^{13}C del (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, del látex de la especie *E. weberbaueri* Mansf.

Anexos 2

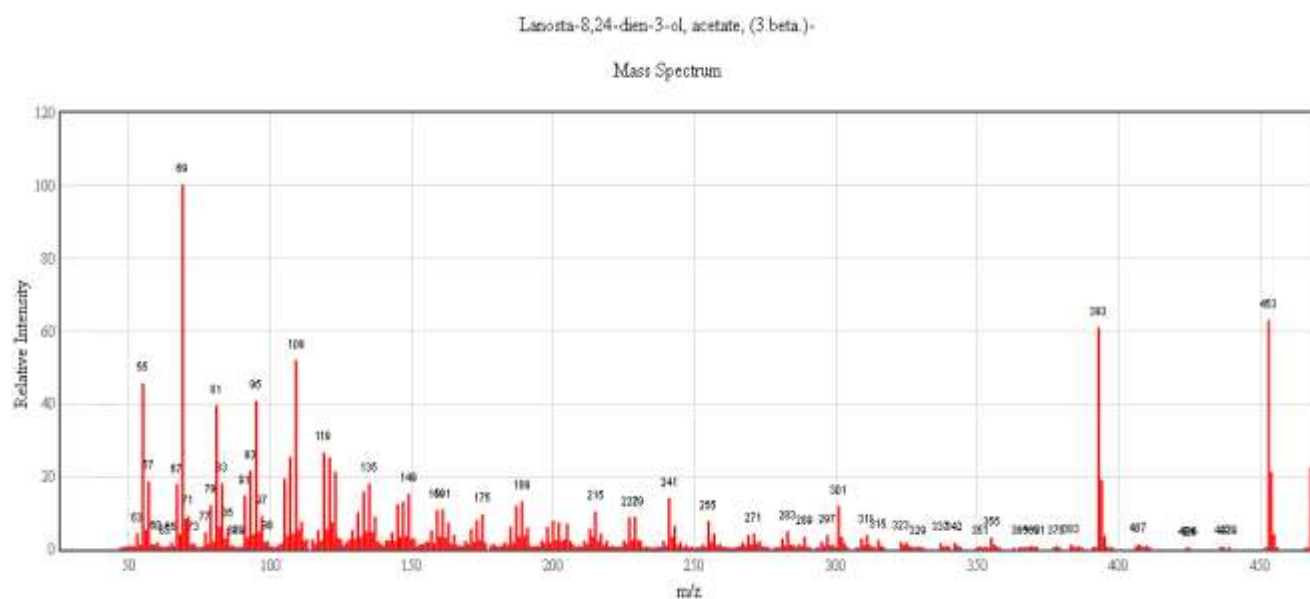


Espectro N° 3. Espectro de CG/EM del compuesto lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta), del látex de la especie *E. weberbaueri* Mansf.



Espectro N° 4. Espectro de EM del compuesto lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-, del látex de la especie *E. weberbaueri* Mansf.

Anexos 3



Espectro N° 5. Espectro bibliográfico de EM del compuesto lanosta-8,24-dien-3-ol, acetate, (3.beta)-. (NIST, 2104).