



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Estudio fitoquímico de los extractos apolares de la especie ecuatoriana
Croton rivinifolius Kunth**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Luna Romero, Russbelt Vladimir

DIRECTORA: Suárez Hernández Alírica I., Dra.

LOJA- ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora

Alírica Isabel Suárez Hernández

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico de los extractos apolares de la especie ecuatoriana *Croton rivinifolius* Kunth realizado por Luna Romero Russbelt Vladimir ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Luna Romero Russbelt Vladimir declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Estudio fitoquímico de los extractos apolares de la especie ecuatoriana *Croton rivinifolius* Kunth, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Alírica Isabel Suárez Hernández directora 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).....

Autor: Luna Romero Russbelt Vladimir

Cédula: 1105029498

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios, quien me dio la fortaleza, voluntad y sabiduría, para no desvanecer ante las diversas dificultades que presenta la vida, y de este modo seguir adelante, culminando con gran éxito este sueño hecho realidad.

Muy especialmente a mis padres Carlos Luna e Inés Romero, quienes fueron mi mayor inspiración y verdaderos protagonista de toda esta meta cumplida, ya que sin ellos nunca lo habría podido lograr, porque fueron ellos el pilar fundamental en mi vida para ser lo que soy, ya que con su esfuerzo y dedicación, logre lo que me propuse hasta ahora en la vida.

A mis hermanos Lupe, Carla y Diego Luna, quienes me brindaron su apoyo incondicional, sus palabras de aliento para seguir adelante y no darme por vencido en este largo y duro camino y sobre todo por sus valiosos consejos que siempre he acogido con mucho cariño y respeto.

A mis hermosas sobrinas, que también fueron la fuente de mi inspiración para seguir adelante y culminar con este sueño y ser así un ejemplo para ellas.

Finalmente, se la dedico a toda mi familia y amigos que estuvieron en las buenas y en las malas, acompañándome y apoyándome en todo momento durante toda esta etapa universitaria, además por brindarme su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por haberme acompañado y nunca haberme dejado solo en los momentos más duros de mi vida universitaria, por ser mi fortaleza y guía para ser una persona de bien, principalmente por bendecirme, cuidarme y ayudarme siempre en todo momento, y por haberme dado una familia maravillosa y amigos que siempre estuvieron ahí conmigo.

Eternamente agradecido con mis amados padres y hermanos, que siempre y en todo momento me brindaron su amor, cariño y apoyo incondicional, haciendo saber que siempre puedo contar con ellos, a pesar de las dificultades de la vida. Agradezco por sus valiosos consejos de nunca darme por vencido y siempre mirar hacia adelante, por su ejemplo de dedicación y superación, y por haberme inculcado grandes valores en mí como la responsabilidad, humildad, amor y dedicación en lo que me proponga, y gracias esto he culminado con una meta más de muchas en mi vida.

Muy agradecido a la Dra. Alírica Suárez quien, con su experiencia, esfuerzo, paciencia y motivación, me supo impartir su apreciado y valioso conocimiento, que me sirvió de gran ayuda y me permitió alcanzar mi meta propuesta con éxito. Estaré toda la vida agradecido por todas las enseñanzas brindadas y además quiero mencionar que para mí fue un orgullo y privilegio haber sido su aprendiz y estudiante durante todo este trabajo de investigación.

Además, agradezco a todos mis profesores que me impartieron sus conocimientos y enseñanzas durante toda mi carrera universitaria, muy especialmente al PhD. Vladimir Morocho, por sus consejos, enseñanzas, asesoramiento y por su tiempo brindado, pero más que todo por su gran amistad.

Agradezco a toda mi familia y amigos quienes fueron de gran ayuda y formaron parte de mi vida y de esta etapa universitaria, además que de una u otra manera estuvieron siempre conmigo apoyándome y brindándome su amistad.

Finalmente quiero agradecer al Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL, por la oportunidad de poder realizar mi tesis, y a quienes lo conforman por haber compartido y brindado el asesoramiento y conocimiento para poder realizar este proyecto de investigación.

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXO	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. CAPÍTULO I FIN, PROPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	6
1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto	7
1.1.1. Fin del proyecto	7
1.1.2. Propósito del proyecto	7
1.1.3. Componentes del proyecto	7
2. CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Antecedentes	9
2.2. Biodiversidad en el Ecuador	10
2.3. Euphorbiaceae	10
2.4. Género <i>Croton</i>	11
2.5. <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	12
2.6. Descripción Botánica de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	12
2.7. Metabolitos Secundarios	13
2.7.1. Clasificación de Metabolitos Secundarios.....	14
2.7.1.1. Terpenos.....	14
2.7.1.2. Compuestos Fenólicos.....	15

2.7.1.3. Flavonoides.....	15
2.7.1.4. Alcaloides.....	16
2.8. Técnicas de separación, purificación, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios.....	16
2.8.1. Extracción o Maceración.....	16
2.8.2. Concentración.....	17
2.8.3. Cromatografía.....	17
2.8.3.1. Cromatografía en columna (CC).....	18
2.8.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF).....	18
2.8.3.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).	19
2.8.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	20
3. CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Esquema metodológico	23
3.2. Recolección de la muestra	23
3.3. Obtención de extracto metanólico de las hojas.....	24
3.4. Particiones líquido – líquido (VLCR)	24
3.5. Cromatografía de Capa Fina	25
3.6. Fraccionamiento de la fracción de partición diclorometano (VLCRD)	25
3.7. Fraccionamiento de la fracción de partición hexano (VLCRH).....	26
3.8. Fraccionamiento de la fracción de partición acetato de etilo (VLCRA).....	27
3.8.1. Purificación de la fracción VLCRAF1.	29
3.8.1.1. Purificación de la fracción VLCRAF5.	29
3.8.2. Purificación de la fracción VLCRAF4.	30
3.8.2.1. Purificación de la fracción VLCRAF7.....	31
3.8.2.1.1. Purificación de la fracción VLCRAF7.1.....	32
3.9. Obtención del extracto metanólico de los tallos.....	33
3.10. Fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos (VLCRMT)	33
3.10.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.....	34
3.10.1.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.2.	35

3.10.1.1.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3.....	37
3.11. Identificación de los compuestos.....	38
3.11.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	38
3.11.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	38
4. CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Fracciones de partición obtenidas de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	40
4.2. Compuestos aislados de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	40
4.3. Fraccionamiento de la fracción de partición hexano.....	41
4.3.1. Compuesto 1.....	41
4.4. Fraccionamiento de la fracción de partición acetato de etilo.....	41
4.4.1. Compuesto 2.....	41
4.4.2. Compuesto 3.....	45
4.5. Fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos.....	47
4.5.1. Compuesto 4.....	47
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	12
Figura 2. Maceración	17
Figura 3. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas	19
Figura 4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	21
Figura 5. Esquema del desarrollo de la investigación.....	23
Figura 6. Obtención del Extracto metanólico total: Filtración, Concentración y Extracto.....	24
Figura 7. Fracciones de partición de: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua.....	25
Figura 8. Columna Cromatográfica de la fracción de partición acetato.....	28
Figura 9. CCF de las fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo en luz UV 254 nm.....	28
Figura 10. CCF de las fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo revelada.....	29
Figura 11. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF5 (8A:2M): Luz UV 254 nm, Luz UV 365 nm y revelada	30
Figura 12. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF4 (8A:2M): Luz UV 254 nm y revelada.....	31
Figura 13. CCF revelada de la purificación de la fracción VLCRAF7 (8A:2M)	32
Figura 14. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF7.1 (8A:2M): Luz UV 254 nm y revelada.....	32
Figura 15. CCF revelada del extracto metanólico de los tallos.	34
Figura 16. CCF revelada de la fracción VLCRMTF5.2 (9A:1M).....	35
Figura 17. CCF en fase inversa de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2 revelada	36
Figura 18. CCF en fase inversa de las uniones de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2 revelada.	36
Figura 19. CCF en fase inversa de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3 revelada .	37
Figura 20. CCF revelada con Dragendorff de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3	37
Figura 21. Estructura química del Escualeno (1)	41
Figura 22. Estructura química del Tilirosido (2)	42
Figura 23. Estructura química del Swerosido (3)	45
Figura 24. Estructura química del Isocorydine (4)	49
Figura 25. Diferencia estructural entre el Corydine e Isocorydine.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	13
Tabla 2. Clasificación de los Terpenos	14
Tabla 3. Fracciones obtenidas de la fracción de partición diclorometano	26
Tabla 4. Fracciones obtenidas de la fracción de partición hexano	27
Tabla 5. Fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo.....	28
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF1	29
Tabla 7. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF4	30
Tabla 8. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF7	31
Tabla 9. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de los tallos.....	33
Tabla 10. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRMTF5.....	35
Tabla 11. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2.....	36
Tabla 12. Peso y rendimiento de las fracciones de partición obtenidas	40
Tabla 13. Compuestos aislados, purificados y caracterizados de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth..	40
Tabla 14. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ¹ H y ¹³ C RMN del Tilirosido en CD ₃ OD (400 MHz y 100 MHz)	43
Tabla 15. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ¹ H y ¹³ C RMN del Swerosido en CD ₃ OD (400 MHz y 100 MHz).....	46
Tabla 16. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ¹ H y ¹³ C RMN del Isocorydine en CDCl ₃ (400 MHz y 100 MHz)	50

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Espectro de masas de CG-EM del Escualeno.....	60
Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del Tilirosido	61
Anexo 3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del Swerosido	66
Anexo 4. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del Isocorydine	74

RESUMEN

En el presente estudio fitoquímico se logró obtener el extracto metanólico total de las hojas de la especie ecuatoriana *Croton rivinifolius* Kunth, del cual se obtuvieron fracciones de partición de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua. De la fracción de partición de hexano se aisló e identificó mediante CG-EM una mezcla en la cual predominaba el Escualeno (**1**) como compuesto mayoritario. Por otro lado, de la fracción de partición de acetato de etilo se logró aislar por cromatografía de columna y caracterizar mediante la técnica espectroscópica RMN dos compuestos, uno de origen flavonoide conocido como Tilirosido (**2**), y otro de origen iridoide glicosilado de nombre Swerosido (**3**), el mismo que es reportado por primera vez en nuestro caso para el género *Croton*. Igualmente se obtuvo el extracto metanólico de los tallos de donde se consiguió aislar y caracterizar un compuesto de naturaleza alcaloide conocido como Isocorydine (**4**). Todos los compuestos que se identificaron son de suma importancia, debido a que presentan una gran variedad de actividad biológica.

Palabras claves: *Croton rivinifolius* Kunth, Escualeno, Tilirosido, Swerosido, RMN, CG-EM

ABSTRACT

In the present phytochemical study it was possible to obtain the total methanolic extract of the leaves of the Ecuadorian species *Croton rivinifolius* Kunth, from which fractions of partition of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol / water were formed. In which, from the fraction of hexane partition, a mixture in which Squalene (1) predominated as a major compound was isolated and identified by GC-MS. On the other hand, the ethyl acetate partition fraction was isolated by column chromatography and characterized by the NMR spectroscopic technique two compounds, one of flavonoid origin known as Tiliroside (2), and another of glycosylated iridoid origin called Swerosido (3), the same one that is reported for the first time in our case for the Croton genus. Finally, the methanolic extract of the stems was obtained from which it was possible to isolate and characterize a compound of alkaloid origin known as Isocorydine (4). All the compounds that were identified are of great importance, because they present a great variety of biological activity.

Key words: *Croton rivinifolius* Kunth, Squalene, Tiliroside, Swerosido, Isocorydine, NMR, CG-EM

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años atrás el hombre ha tratado de atenuar sus dolencias y prolongar su vida, es por ello que para sanar sus enfermedades o bien para reducir los síntomas y trastornos que algunas provocan, se da el uso de drogas vegetales, las cuales cuentan con extraordinarias propiedades metabólicas, siendo un auténtico depósito químico, del mismo que se conoce y ha sido estudiado con éxito una parte del total en el mundo, incluyendo la gran diversidad de especies encontradas, así como también de las que no se ha explorado (Avello & Cisternas, 2010). La utilización de plantas medicinales ha sido difundida ampliamente a través de los años alrededor del mundo y presente en las diversas culturas que lo conforman, en consecuencia no es un hecho que hace poco se ha formado, sino que viene de hace mucho tiempo atrás (Vicente-Herrero et al., 2013).

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas medicinales son especies que presentan metabolitos secundarios o compuestos que pueden ser usados en el ámbito terapéutico, siendo los precursores para la formación de nuevos medicamentos (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010). Así como también la OMS estima que alrededor del 80% de la población en el mundo satisface sus necesidades dentro del ámbito médico y de la salud mediante la utilización de plantas (Ocegueda, Moreno, & Koleff, 2005).

Uno de los países que se establece como una potencia mundial en lo respecta a la medicina tradicional es el Ecuador, gracias a su gran diversidad biológica y cultural, motivo por el cual es de suma importancia dar a conocer los beneficios médicos y el cuidado a la salud que ofrece la medicina tradicional en las diversas comunidades del país, de igual forma enseñar las maneras de uso de estas plantas, y lo más importante implantar aspectos de valorización y conservación de las mismas (Zambrano, Buenaño, Mancera, & Jiménez, 2015). Para el cuidado de la salud y bienestar de la población ecuatoriana, se estima que el uso de la medicina tradicional es alrededor del 80% (Buitron, 1999).

Euphorbiaceae cuenta con más de 300 géneros y 5000 especies, encontrándose la mayor parte de estas en el continente Americano, motivo por el cual esta familia es reconocida como una de las más extensas y diversas en términos morfológicos (Bittner et al., 2001). La presencia del látex o savia coloreada, de igual manera las diferentes formas de estipulas, son motivos por lo que se reconoce a la familia Euphorbiaceae (Murillo, 2004). Se debe mencionar que esta familia no ha tenido muchos estudios fitoquímicos a diferencia de otras familias botánicas, sin embargo, se ha publicado varios estudios referentes a su taxonomía y clasificación. De ella se han aislados terpenoides, alcaloides, glucosinolatos, glicósidos

cianogénicos y ácidos grasos, etc., debido a esto es considerada una familia muy variada desde el punto de vista bioquímico (Pascual & Correal, 1992).

Desde el pasado a las especies de la diversa familia Euphorbiaceae se han concedido propiedades de curación, se han utilizado para el tratamiento de cáncer, tumores, y otras enfermedades. Gracias a sus diversos efectos en la medicina tradicional, varias de las especies son usadas abundantemente. El manejo de estas especies de plantas medicinales debería tener un absoluto y completo conocimiento acerca de los metabolitos secundarios que ostentan tener. Por esto y mucho más ha sido la principal motivación para que tanto químicos como bioquímicos hayan puesto el gran interés en conocer la estructura y composición química de las plantas y de este modo estudiar y verificar si su uso posee alguna base en el amplio campo de la ciencia (Bittner et al., 2001).

Croton es un género de gran importancia de la familia Euphorbiaceae, que comprende alrededor de 1.300 especies de árboles, arbustos y hierbas distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. El género es rico en componentes con actividades biológicas, principalmente diterpenos tales como ésteres de forbol, clerodano, labdano, kaurano, cleistantano, crotofalano, trachylobano, pimarano, entre otros. Asimismo, varias especies del género son aromáticas, lo que indica la presencia de constituyentes de aceites volátiles (Salatino, Faria, & Negri, 2007).

La química del género *Croton* ha sido muy explorada; se ha registrado el aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas (Suárez et al., 2013). Ciertas especies de este género producen una savia roja y de consistencia viscosa conocida como sangre de drago la misma que en medicina popular de Sudamérica es usada principal y considerablemente para el tratamiento de heridas, infecciones, cáncer, inflamaciones y diarreas (Suárez et al., 2013). Se le confiere a este género una gran diversidad de propiedades medicinales que incluye el tratamiento de cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, inflamación, gusanos intestinales, malaria, dolor, úlceras y pérdida de peso (Salatino et al., 2007).

Debido a la gran importancia de las propiedades medicinales de este género, se realizó la presente investigación, la misma que propuso como objetivo aislar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos apolares de la especie *Croton rivinifolius* Kunth, la cual no cuenta con información relevante y validada sobre los posibles compuestos que esta especie tendría.

Además, esta investigación pretende contribuir a la caracterización fitoquímica de especies nativas del Ecuador especialmente *Croton rivinifolius* Kunth, perteneciente a un género que muestra muchos metabolitos con interesantes actividades biológicas.

1. CAPÍTULO I
FIN, PROPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin, propósito y componentes del proyecto

1.1.1. Fin del proyecto

Contribuir a la caracterización fitoquímica de especies nativas del Ecuador especialmente *Croton rivinifolius* Kunth, *perteneciente al género Croton* el cual es uno de los géneros que muestra mayor cantidad de actividad biológica.

1.1.2. Propósito del proyecto

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos apolares de la especie *Croton rivinifolius* Kunth.

1.1.3. Componentes del proyecto

- ✚ Preparar un extracto metanólico de las hojas de *Croton rivinifolius* Kunth.
- ✚ Realizar particiones del extracto metanólico con solventes de baja y mediana polaridad, hexano, diclorometano, y acetato de etilo.
- ✚ Separar por técnicas cromatográficas, los compuestos mayoritarios presentes en los extractos apolares.
- ✚ Purificar cada compuesto aislado y caracterizarlo con el uso de RMN y GC/MS.

2. CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Cuando la salud o bienestar del hombre se ve afectada por alguna enfermedad o dolencia, provoca una intranquilidad por su sanación y pronta recuperación. Debido a esto, desde hace mucho tiempo atrás han existido indicios de ciertos conocimientos rudimentarios para tratar los padecimientos del hombre primitivo, mediante el uso de plantas medicinales (Fariñas, Cutiño, Pichin, Malberti, & León, 2014). Pero durante todo este tiempo que ha transcurrido, hasta la actualidad, se han llevado experimentos con errores y aciertos que fueron forjando los conocimientos fitoterapéuticos que hoy en día se conoce (Chifa, 2010).

Desde hace muchos años atrás y mucho antes del crecimiento de la medicina de hoy en día, se ha encontrado presente en todo el mundo la medicina tradicional formando parte del patrimonio cultural de cada nación e impartiendo los conocimientos que se transmiten de generación en generación (Morón & Jardines, 1997).

A la medicina tradicional se la considera una parte muy importante en el diario vivir y en el bienestar de las personas, razón por la que tanto en Latinoamérica, Asia y África, la usan para satisfacer sus necesidades en lo que respecta a la salud, y por lo que son factibles y accesibles económicamente (Organización Mundial de la Salud, 2002).

Gracias a la gran importancia de los compuestos con actividad biológica, en la actualidad se está prestando un mayor enfoque al uso de la información etnobotánica para la selección de plantas en la investigación de estos compuestos. No obstante, el conocimiento tradicional que se ha transmitido de una generación a otra, acerca del uso de las plantas medicinales y de otras plantas de gran ayuda para el ser humano, se está perdiendo y cada vez disminuyendo más, en gran parte de los países en desarrollo (Oliveira, Velázquez, & Bermúdez, 2005).

Además, dentro del ámbito científico, no hay suficientes estudios de información acerca de la gran cantidad, distribución y clasificación de las plantas medicinales a nivel mundial, y también sobre los efectos de la extracción en la vegetación. Por eso y mucho más, conlleva una gran responsabilidad resguardar este patrimonio cultural que nos ha sido heredado por nuestros ancestros, de tal manera que se evite la disminución terminante del conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales, y de este modo contribuir a la protección de nuestra biodiversidad, ofreciendo un sin número de beneficios a la comunidad por medio de investigaciones sobre especies de plantas que servirían para el desarrollo contundente de nuevos fármacos (Oliveira et al., 2005).

2.2. Biodiversidad en el Ecuador

El Ecuador cuenta con una gran biodiversidad biológica y cultural especialmente a lo que respecta a la flora, motivo por el cual, se ha establecido como uno de los países con un gran potencial en lo referente a la medicina tradicional (Zambrano et al., 2015). La flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde la antigüedad. Hoy en día se han encontrado 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, a partir de 16216 registros de uso. Por tanto, el 60% de las especies de plantas útiles registradas en Ecuador, tiene usos medicinales. El 75% de las especies medicinales son plantas nativas y el 5% de ellas son endémicas, mientras que el 11% son introducidas en el Ecuador (Balslev, Navarrete, De la Torre, & Macía, 2008).

En nuestro país las plantas han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas. 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 (Buitron, 1999). La mayoría de las personas de la zona rural todavía dependen directa o indirectamente de las plantas para cubrir sus necesidades de alimento, medicina y vivienda. No obstante, el uso y comercio de plantas medicinales se mantiene como una práctica activa, donde se expenden por lo menos 273 especies de hierbas medicinales, mismas que se emplean para tratar más de 70 dolencias (Cerón, 2006). Si tomamos conciencia que nuestras culturas andinas, son poseedoras de un enorme conocimiento sobre el uso de las plantas, la cantidad de plantas usadas y las prácticas medicinales tradicionales podría ser más numerosas de las que hasta ahora se han registrado y publicado; por lo tanto es fundamental continuar con estudios etnobotánicos y fitoquímicos que permitan sistematizar y difundir estos valiosos conocimientos que podrían ser de gran beneficio para toda la población ecuatoriana (Ansaloni et al., 2010).

2.3. Euphorbiaceae

En la actualidad una de las familias reconocida como una de las más diversas, por su morfología y hábitat son las pertenecientes a la familia de las Euphorbiaceae (Barrera, Gómez, & Castiblanco, 2016). Estas comprenden desde altos árboles forestales hasta lianas, incluyendo arbustos, hierbas anuales y perennes, suculentas geófitas y plantas acuáticas flotadoras. Sin embargo, debido a la distribución principalmente tropical de la familia y a sus diminutas flores, las Euphorbiaceae han sido mucho menos estudiadas que otras familias botánicas (Pascual & Correal, 1992); la mayoría de sus especies son componentes del bosque poco perturbado, pero también las hay de zonas altamente intervenidas (Barrera et al., 2016).

Esta familia contiene alrededor de 8000 especies en 300 géneros. Incluye especies predominantemente tropicales, pero también ampliamente distribuidas en zonas templadas. Los géneros más importantes de la Euphorbiaceae son: *Euphorbia* (1000 especies), *Croton* (1300 especies) y *Phyllanthus* (400 especies) (Pascual & Correal, 1992).

Euphorbiaceae se caracteriza por presentar un exudado coloreado y estípulas de diversas formas; sus hojas tienen una colocación en forma alternada con respecto al tallo; generalmente presentan glándulas de diversas formas en la lámina y a veces sobre el pecíolo. Las flores generalmente están arregladas en inflorescencias muy variadas (Murillo, 2004). Según investigaciones se conoce la composición química de más de 120 especies. Sus principales compuestos químicos son triterpenoides (tetra y pentacíclicos), flavonoides (flavonas y flavonoles en forma de glicósidos y metilésteres) y alcaloides, pero también contienen cumarinas, glucósidos cianogénicos y taninos. Conjuntamente, en géneros como *Áleurites*, *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Sapium*, se encuentran ciertas sustancias tóxicas como ésteres de alcoholes diterpénicos, forbol, resiniferonol e ingenol que son irritantes de la piel (Pascual & Correal, 1992).

2.4. Género *Croton*

Croton es un gran género de la familia Euphorbiaceae, que posee una gran diversidad, gracias a que comprende alrededor de 1.300 especies de árboles, arbustos y hierbas distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Algunas de estas especies han sido identificadas y utilizadas en la medicina tradicional para muchas aplicaciones, incluyendo el cáncer (Salatino et al., 2007).

Muchas especies del género presentan diversas propiedades en el ámbito terapéutico como: hipoglucemiante, antiinflamatoria, antineoplásica, antinociceptiva y para el tratamiento de complicaciones gastrointestinales, razón por la cual son muy usadas en América, Asia y África. Aparte otras especies son de gran ayuda para tratar otras anomalías de la salud por los beneficios que tienen sus aceites esenciales (Suárez, Taddei, Sojo, & Arvelo, 2014).

Los estudios fitoquímicos elaborados sobre un grupo considerable de plantas del género *Croton*, han conducido a la identificación de flavonoides, cumarinas, alcaloides, esteroides y una enorme diversidad de diterpenos con estructura carbonada de tipo crotofalano, kaurano, labdano, cleistantano así como clerodano, siendo este último el más abundante. También se ha demostrado que muchas especies son ricas en mono y sesquiterpenos (Suárez et al., 2012). Todos estos compuestos mencionados se destacan por tener una significativa cantidad

de actividad biológica, esto origina un gran interés por desarrollar estudios a nuevos componentes bioactivos que presenten algún beneficio terapéutico en el adelanto de nuevos medicamentos y avances farmacológicos (Barrera et al., 2016). *Croton* igualmente es rico en alcaloides activos y varias especies de este género son aromáticas, lo que indica la presencia de constituyentes volátiles de aceite (Salatino et al., 2007). Como la mayoría de las Euphorbiaceae, las especies de *Croton* pueden contener látex, que como se mencionó anteriormente se la conoce como sangre de drago, la cual presenta varias propiedades terapéuticas (Suárez et al., 2014).

2.5. *Croton rivinifolius* Kunth

Hasta la actualidad no se ha realizado estudios fitoquímicos, ni bioquímicos de la especie *Croton rivinifolius* Kunth, es por esto que no existe información relevante y validada sobre esta planta, en lo que respecta a sus metabolitos secundarios y actividad biológica. Por tal circunstancia es que el presente proyecto se ha interesado por la investigación de la especie *Croton rivinifolius* Kunth, ya que como antes mencionamos este es uno de los géneros que muestra mayor cantidad de actividad biológica en el reino vegetal.

2.6. Descripción Botánica de la especie *Croton rivinifolius* Kunth



Figura 1. *Croton rivinifolius* Kunth

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Tabla 1. Clasificación botánica de la especie *Croton rivinifolius* Kunth

Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Genero	<i>Croton</i>
Especie	<i>Croton rivinifolius</i> Kunth

Fuente: (Svenson & Knute, 1946)

Elaboración: (Svenson & Knute, 1946)

2.7. Metabolitos Secundarios

Dentro del mundo vegetal hay una sorprendente diversidad de metabolitos extraños, a los cuales a la mayoría no se les ha podido definir ninguna participación evidente en los procesos metabólicos primarios de la planta (fotosíntesis, respiración, etc.). Estos compuestos se los conoce como metabolitos secundarios y por este antecedente, las investigaciones fitoquímicas se han convertido en uno de los temas más relevantes en la actualidad, pero otro punto de gran interés es el de encontrar los diferentes tipos de mecanismos de cómo se producen y para que los utiliza la planta (Dirzo, 1985).

Las plantas originan una enorme variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios, los cuales los utiliza como medio de defensa contra insectos, microorganismos y los diferentes cambios del ambiente (temperatura, humedad, luz, sequia, etc.). Se entiende por bioactivo, a todos los compuestos que tiene la capacidad de provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y animales, es por esto que se los ha utilizado durante muchos años en la fabricación de medicamentos y preservación de alimentos, etc. (Vélez-Terranova, Campos, & Sánchez-Guerrero, 2014).

Aproximadamente se han identificado alrededor de 100 mil metabolitos secundarios y se considera que la cantidad aumenta alrededor de 4 mil cada año. Se agrupan en tres clases principales: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides. Los metabolitos secundarios son los responsables de las propiedades organolépticas tales como el sabor, el color, el olor y la consistencia de las plantas alimentarias y ornamentales (De la Cruz & González, 2009). Además, a estos también se los conoce como productos naturales, debido a sus varias aplicaciones y usos tanto como medicamentos, insecticidas, perfumes, entre otros. Se dividen

entre grupos taxonómicos, lo más relevante de los metabolitos secundarios es que presentan propiedades biológicas y funciones ecológicas (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

2.7.1. Clasificación de Metabolitos Secundarios.

2.7.1.1. Terpenos.

Los terpenos o conocidos como terpenoides, conforman el conjunto más numeroso de metabolitos secundarios, contando con más de 40.000 moléculas diferentes. La ruta biosintética de los terpenos genera tanto a metabolitos primarios como secundarios que son de suma importancia para el crecimiento y persistencia de las plantas (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

Estos compuestos se forman por la polimerización de unidades isoprénicas también conocido como isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP), estas moléculas son de cinco átomos de carbono que se originan de la ruta del ácido mevalónico (Castillo & Martínez, 2015).

Según Ávalos & Peérez-Urria (2009), mencionan que los terpenos se forman de la unión de unidades de isopreno (cinco átomos de carbono), y que su clasificación se da por el número de estas unidades, y algo que vale destacar es que los terpenos frecuentan ser insolubles en agua. En la Tabla 2 se puede observar su clasificación.

Tabla 2. Clasificación de los Terpenos

GRUPO	CARACTERISTICAS
Monoterpenos	10 C y 2 unidades de isopreno C5
Sesquiterpenos	15 C y 3 unidades de isopreno C5
Diterpenos	20 C y 4 unidades de isopreno C5
Triterpenos	30 C y 6 unidades de isopreno C5
Tetraterpenos	40 C y 8 unidades de isopreno C5
Politerpenos	Más de 8 unidades de isopreno.

Fuente: (Ávalos & Peérez-Urria, 2009)

Elaboración: (Ávalos & Peérez-Urria, 2009)

En numerosos terpenos su interés comercial radica en el uso como aromas y fragancias, en alimentación y cosmética. Por otra parte tienen importancia por sus propiedades medicinales

como: anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

2.7.1.2. Compuestos Fenólicos.

Los compuestos fenólicos forman un extenso grupo de metabolitos secundarios de las plantas. Principalmente se caracterizan por presentar en su estructura un anillo aromático con, al menos un grupo hidroxilo (fenólico). Las rutas biosintéticas más frecuentes son las del ácido shikímico y la vía del acetato (Castillo & Martínez, 2015).

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en las funciones metabólicas de las plantas, tanto en el crecimiento y reproducción, así como en la protección contra patógenos externos, la radiación UV y los depredadores. Son los encargados del color y las propiedades sensoriales de las plantas (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014).

A partir de la estructura química, estos compuestos abarcan desde ácidos fenólicos que son moléculas sencillas hasta taninos y lignina los cuales son polímeros complejos. Dentro de este grupo se encuentra uno de los más importantes como lo son los flavonoides (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

2.7.1.3. Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo muy importante que pertenece a los compuestos fenólicos. La estructura de estos comprende 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos aromáticos, los mismos que se encuentran ligados por un puente de 3 átomos de carbono. En función del grado de oxidación de dicho puente, los flavonoides se clasifican en: antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus principales funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

Los flavonoides se encuentran presentes en ciertas plantas, y estos son los compuestos responsables del color de las flores y frutas. El término flavonoide proviene del latín "flavus", que significa amarillo, debido a esto muchos flavonoides purificados son de color amarillo (Peñarrieta et al., 2014).

La ruta de biosíntesis de los flavonoides consiste primeramente en la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA, la cual está catalizada por la chalcona sintasa que forma a naringerina chalcona, la misma que actúa como precursor de las antocianinas y flavonoles (Ávalos & Peérez-Urria, 2009).

2.7.1.4. Alcaloides.

Los alcaloides en la actualidad son más de 21.000 compuestos procedentes de plantas. Estos son sustancias nitrogenadas, básicas, de origen natural y con actividad farmacológica significativa. Habitualmente se originan a partir de un aminoácido lo cual hace que se clasifiquen en grupos según su precursor. Y están formados por carbono e hidrogeno (Castillo & Martínez, 2015).

En su forma base, los alcaloides, son compuestos poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, pero en forma de sal son hidrosolubles, solubles en alcoholes e insoluble en disolventes muy apolares (Castillo & Martínez, 2015). En dosis altas, la mayoría de los alcaloides son muy tóxicos (Ávalos & Peérez-Urria, 2009). Por tal razón, en los últimos años no es común usar plantas con contenido alto en alcaloides, solamente las sustancias aisladas, perfectamente dosificadas y controladas. Sin embargo, a dosis bajas suelen presentar actividad farmacológica muy intensa, como relajante muscular, tranquilizante y analgésico (Castillo & Martínez, 2015).

2.8. Técnicas de separación, purificación, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios

2.8.1. Extracción o Maceración.

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la droga y el solvente, durante varios días. Se conoce como un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente. Hay dos tipos de maceración: estática y dinámica. La maceración estática consiste en dejar la droga en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional, es sumamente lento. En cambio a la maceración dinámica se requiere mantener en movimiento constante a la droga y el solvente, para abreviar el tiempo de operación. Ambas se pueden elaborar a una temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas. Las desventajas del proceso de maceración son la lentitud de la operación y de no alcanzar la extracción completa de la droga. Para disminuir las pérdidas del extracto en el residuo de la extracción, el proceso de maceración puede repetirse dos o tres veces, después de haber escurrido el solvente de la extracción anterior (Valverde, 2000).

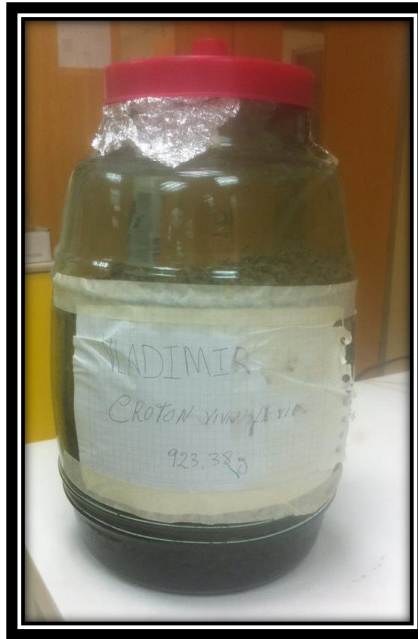


Figura 2. Maceración

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

2.8.2. Concentración.

El proceso de concentración trata de aumentar el contenido de sólidos en el extracto con la finalidad de conseguir un determinado contenido de residuo seco, fabricar extractos blandos y como etapa preliminar en la producción de extractos secos. En la elaboración de los productos fitoterapéuticos, la concentración es una etapa problemática, por la posibilidad de degradación de sustancias termolábiles. Las soluciones que contienen sustancias estables pueden ser concentradas a presión normal o al vacío, pero la mayoría de los extractos deben ser evaporados a temperaturas muy bajas de ser lo posible, así como, al vacío (Valverde, 2000).

2.8.3. Cromatografía.

La cromatografía es una técnica física que permite la separación de mezclas de sustancias en sus componentes individuales. Este método también consigue información cualitativa y cuantitativa sobre las sustancias que se encuentran en la mezcla. La cromatografía aumenta la eficacia en el análisis de productos fitoterapéuticos, razón por la cual estos son conocidos como fitocomplejos, ya que están constituidos por una gran cantidad de sustancias individuales y algunas de estas se encuentran asociadas entre sí, mientras que otras no (Machado, 2000).

El análisis cualitativo es conocido por definición como “la huella digital” de los componentes. Incluso si las sustancias activas no son conocidas, el cromatograma de la planta muestra una

especie de diseño único en el cual la proporción entre sus compuestos debe ser homogéneo o variar en proporciones suficientemente estrechas. Además, es válido para los extractos cuya composición química es desconocida o que aún no se han realizado ensayos farmacológicos. Por el contrario, si una sustancia activa es conocida se obtienen resultados cuantitativos solo si se dispone de un patrón puro de ella (Sharapin, 2000).

2.8.3.1. Cromatografía en columna (CC).

La cromatografía en columna es una técnica de separación y purificación de diversos metabolitos secundarios. Al igual que la mayoría de las demás cromatografías se divide en dos fases, una fase estacionaria (sílice gel), y una fase móvil (gas o líquido), donde la fase estacionaria está contenida dentro de un tubo de vidrio. Una de las características fundamentales de la cromatografía en columna es que el gradiente de presión para el desplazamiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria, está originado por gravedad. Una parte muy importante para que se dé una buena separación de los compuestos es utilizar el solvente adecuado (Willard, Merritt, Dean, & Settle, 1991).

2.8.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina (CCF) radica en la separación de los componentes de una mezcla a través del desplazamiento diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. Mediante esta técnica, la solución de la muestra que será analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte que puede ser sílice, alúmina, etc., que se encuentra distribuido de forma homogénea sobre la placa de aluminio (Machado, 2000).

En la cromatografía de capa fina la fase móvil se migra por la fase estacionaria por acción capilar, en ocasiones ayudada por la gravedad. Es rápida, tiene buena resolución y es muy sensible (Skoog, Holler, & Crouch, 2008). En esta técnica podemos encontrar las siguientes ventajas: se usa equipos simples y de bajo costo, su comprensión y ejecución es fácil, se usa una mínima cantidad de solvente y de la muestra analizar, tiene la capacidad de analizar diversas muestras en una sola placa cromatográfica. La cromatografía en capa fina es una técnica de suma importancia en todo el proceso fitoquímico, ya que permite proporcionar información sobre la homogeneidad de los componentes químicos de la especie y garantiza que las sustancias encargadas de la actividad farmacológica se encuentren en los niveles establecidos (Machado, 2000).

2.8.3.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es un método analítico que consiente en separar, identificar y cuantificar compuestos volátiles o semivolátiles de mezclas compuestas. Es por lo tanto, una asociación de dos técnicas, la cromatografía de gases (CG) y la espectrometría de masas (EM) las mismas que son de gran ayuda para la separación e identificación de combinaciones complejas de metabolitos secundarios, y la combinación de estas dos técnicas da como resultado a la CG-EM. Por un lado, la CG logra la separación de componentes de una mezcla, mientras que la EM puede identificar la estructura de casi cualquier sustancia pura (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Para la CG-EM se requiere de una mínima cantidad de muestra para su respectivo análisis, ya que trabajan en fase gaseosa y sobre todo que estas dos técnicas son muy similares y compatibles. Esto implica que el uso de la CG-EM necesita de sistemas especiales de conexión (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Se debe comprender claramente los alcances y las limitaciones de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, ya que las condiciones principales son evidentes por el tipo de muestra a analizar, ya sea por el peso molecular, la volatilidad, la termoestabilidad y la polaridad de los componentes. Adicionalmente podemos señalar que la identificación errónea de los compuestos y la coelución de los mismos en la comuna son algunos problemas que prevalecen en esta técnica (Stashenko & Martínez, 2010).



Figura 3. Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

2.8.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear es un procedimiento espectral que se fundamenta en las propiedades magnéticas que presentan ciertos núcleos, más comúnmente en las propiedades del núcleo de hidrogeno. Los electrones producen débiles modificaciones, pero observables, siendo esos efectos electrónicos quienes van a producir los desplazamientos químicos conjuntamente con las constantes de acoplamiento, y de esta forma permitir la caracterización de las moléculas o un estudio más detallado de la estructura electrónica de las mismas (Elguero, Alkorta, Pardo, Claramunt, & Santa María, 2008).

Es la técnica que mayor información estructural puede proporcionar de un compuesto. Esto es gracias a que se observan los núcleos de los átomos y también pueden conocer la influencia de cada ambiente molecular sobre cada uno de los átomos. Los átomos mayoritarios en los compuestos orgánicos son el H y C, a estos se los pueden observar fácilmente con cantidades no muy grandes de muestra, incluso se puede observar otros átomos si hay una gran cantidad suficiente de un isótopo magnéticamente activo, estos son: ^{15}N y ^{31}P , para los átomos más relevantes entre las biomoléculas. Del hidrógeno el isótopo más abundante y el que se observa es ^1H . Para el carbono, el isótopo observado es el ^{13}C , mientras que el más abundante es ^{12}C , pero magnéticamente inactivo (Medarde, Peláez, & Álvarez, 2015).

Un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) radica fundamentalmente en un imán, un emisor y un detector de radiofrecuencia (Elguero et al., 2008). La aplicación más importante de la espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) de protones es la identificación y la comprobación de la estructura de las moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas. De igual forma esta técnica establece en muchas ocasiones un procedimiento útil para la determinación cuantitativa de especies absorbentes. La resonancia magnética nuclear es una herramienta eficaz y muy indispensable para identificar compuestos puros (Skoog et al., 2008).

Algo muy propio y único del espectro de RMN es la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos causantes del apareamiento del pico. Otra de las aplicaciones del RMN es la determinación de grupos funcionales, por ejemplo los grupos hidroxilo en alcoholes y fenoles, aldehídos, etc. Se usa para el análisis de elementos que es posible efectuar determinaciones cuantitativas puntuales del hidrogeno total en mezclas orgánicas. Existen factores que se combinan para hacer del RMN de carbono unas 6000 veces menos sensible que el RMN de protones, esta baja intensidad de la señal se relaciona directamente con la poca abundancia natural del isótopo de un 1.1% y su pequeña relación giromagnética, que aproximadamente es la cuarta parte de la del protón (Skoog et al., 2008).



Figura 4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

**3. CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Esquema metodológico

La metodología que se empleó en la presente investigación es la siguiente, como muestra la Figura 5.

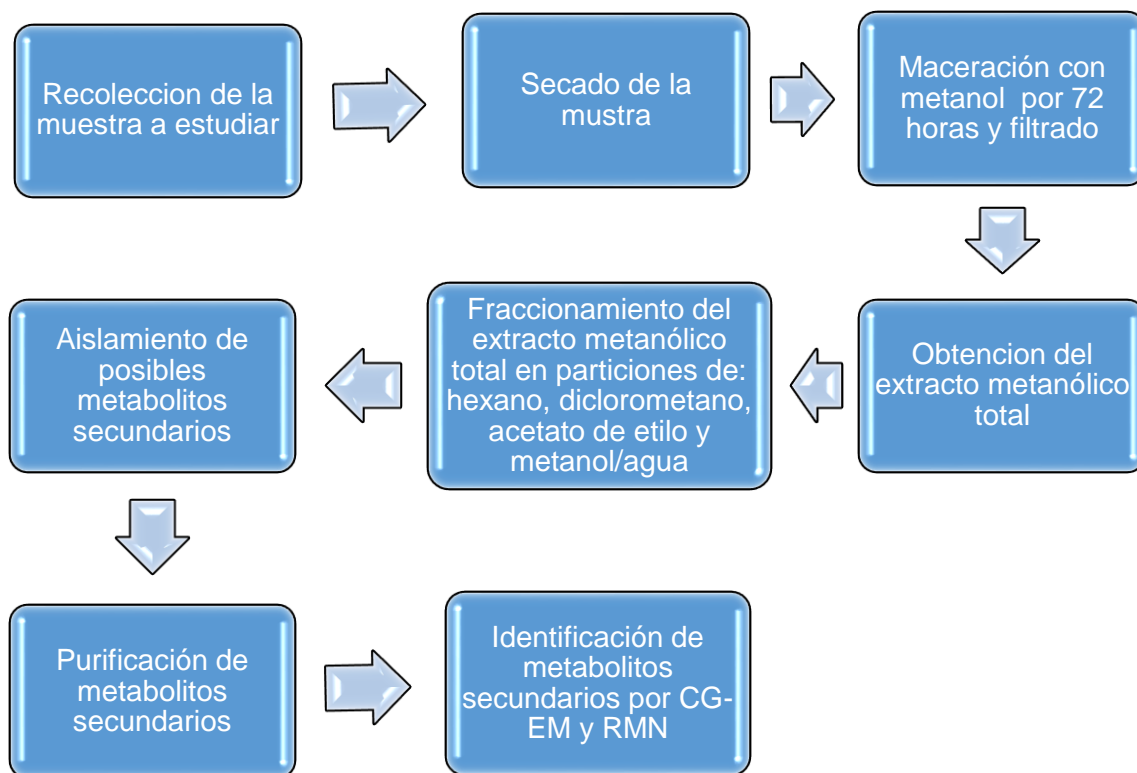


Figura 5. Esquema del desarrollo de la investigación

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.2. Recolección de la muestra

La recolección de las partes aéreas de la especie *Croton rivinifolius* Kunth, se realizó en la provincia de Loja, cantón Célica, Vía Célica-Cerro Guachanama, a una altitud de 2255 msnm, con las siguientes coordenadas geográficas 17615966 - 9547676. La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. Nixon Cumbicus Torres y una muestra fue depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con el código voucher de colecta HUTPL 8027.

Para la siguiente investigación se usó la parte aérea de la planta que corresponde a las hojas y tallos de la misma. Para el proceso de secado o deshidratación, se sometió en una cámara de secado tanto las hojas como los tallos a una temperatura de 32°C por aproximadamente 3 días.

3.3. Obtención de extracto metanólico de las hojas

La obtención del extracto metanólico, se realizó primeramente por un proceso de maceración estática a temperatura ambiente por 72 horas, usando como solvente de extracción el metanol al 100%, luego se procedió a filtrar al vacío, logrando separar los residuos vegetales y el líquido extractivo. Por último, se realizó la concentración del extracto, empleando el uso de un equipo rotavaporador a presión reducida Buchi modelo R-210, a una temperatura moderada de 20-35°C, hasta lograr obtener el extracto metanólico total (Figura 6).



Figura 6. Obtención del Extracto metanólico total: Filtración, Concentración y Extracto

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.4. Particiones líquido – líquido (VLCR)

Del extracto metanólico se utilizó 44.58g, el cual se diluyó en una solución MeOH/H₂O (1:1) de 300 ml, la misma que fue secuencialmente sometida a partición en hexano (6 veces x 100ml), diclorometano (5 veces x 100ml), y acetato de etilo (6 veces x 100ml).

Luego a cada fracción de partición se le añadió sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), con el fin de eliminar el agua que pueda estar presente en cada uno de estos, después se evaporó el solvente presente en las fracciones de partición a presión reducida, utilizando un rotavaporador Buchi modelo R-210. Finalmente se pudo lograr obtener 4 fracciones de partición (Figura 7).



Figura 7. Fracciones de partición de: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.5. Cromatografía de Capa Fina

Después de haber obtenido las diferentes fracciones de partición, estos fueron sometidos a cromatografía de capa fina (CCF) a distintas polaridades, con el fin de observar tanto la composición en metabolitos secundarios, así como la mejor opción de separación de esos compuestos presentes en cada fracción de partición, esto se llevó a cabo, usando placas de aluminio cubiertas con sílice gel 60 F₂₅₄ Merck (fase directa y reversa). Por último, se procedió a visualizar con luz UV a longitudes de onda de 254 y 360 nm, donde se pudo determinar la presencia de algunos posibles compuestos. Finalmente, estas placas fueron reveladas con ácido sulfúrico al 5%, vainillina y fuente de calor.

3.6. Fraccionamiento de la fracción de partición diclorometano (VLCRD)

Primeramente, se procedió con el fraccionamiento de la fracción de partición diclorometano, tomando el peso completo que se obtuvo de dicha fracción de partición (1.76g), el cual se lo sembró en una columna cromatográfica con 200g de sílice gel de fase directa, en una relación 1:100 extracto/sílice, la misma que se compactó con hexano 100%. Se eluyó con polaridad creciente iniciando con hexano 100%, hasta acetato/diclorometano en relación 7:3 respectivamente, obteniendo 125 fracciones. Posterior a esto se procedió a realizar cromatografía en capa fina (CCF) de todas las fracciones obtenidas, usando una placa de CCF como fase estacionaria y como fase móvil diclorometano/hexano en relación 9:1. Para su visualización se utilizó una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 y 365 nm. Se revelaron las placas agregando ácido sulfúrico al 5%, vainillina y fuente de calor. Por último se unieron las fracciones de acuerdo con la similitud de su R_f y color de las manchas, observadas en la CCF, obteniendo un total de 3 fracciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Fracciones obtenidas de la fracción de partición diclorometano

Fracción de partición diclorometano (VLCRD)

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRDF1	80 – 95	20
VLCRDF2	96 – 109	20
VLCRDF3	110 - 125	20

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

De este fraccionamiento no se pudo aislar, ni purificar ningún compuesto por lo que poseían mezclas muy unidas y difíciles de separar, además los valores de las cantidades de cada fracción son muy escasos.

3.7. Fraccionamiento de la fracción de partición hexano (VLCRH)

Para el fraccionamiento de la fracción de partición hexano se pesó 3g de muestra (VLCRH), y se procedió a cargar la columna cromatográfica con 220g de sílice gel de fase directa, la misma que fue compactada y eluida con hexano al 100%, y posteriormente se fue aumentando gradualmente la polaridad hasta diclorometano/acetato de etilo en relación 8:2 respectivamente, utilizando en cada polaridad 400ml. Se obtuvieron 91 fracciones, de lo cual se procedió a realizar cromatografía en capa fina (CCF) de todas las fracciones obtenidas, utilizando una placa de CCF como fase estacionaria y como fase móvil hexano/diclorometano en relación 1:1 (v/v). Para su visualización se utilizó una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 y 365 nm. Además, se revelaron con una solución de ácido sulfúrico al 5%, vainillina y fuente de calor. Finalmente se unieron las fracciones de acuerdo con la similitud de su R_f y color de las manchas, observadas en la CCF, obteniendo un total de 8 fracciones como se muestra en la Tabla 4.

Para las tres fracciones: VLCRHF1, VLCRHF2 y VLCRHF6, no se purificó, debido a que parecían no necesitar de dicho procedimiento, ya que se mostraban como una sola mancha en la CCF. Por tal motivo estas fracciones fueron enviadas para su identificación a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Donde la fracción VLCRHF1 fue la única que se logró indentificar como una mezcla en la cual predominaba el compuesto **1**.

Tabla 4. Fracciones obtenidas de la fracción de partición hexano

Fracción de partición de hexano (VLCRH)

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRHF1	29 – 33	30
VLCRHF2	47 – 59	140
VLCRHF3	60 – 73	40
VLCRHF4	74 – 81	20
VLCRHF5	82 – 88	20
VLCRHF6	1 – 8	243.2
VLCRHF7	9 – 27	16.7
VLCRHF8	36 – 46	5.7

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8. Fraccionamiento de la fracción de partición acetato de etilo (VLCRA)

En el fraccionamiento de la fracción de partición acetato primeramente se procedió a pesar 3g de muestra (VLCRA), y se sembró en una columna cromatográfica con 220g de sílice gel de fase directa, la cual fue compactada con acetato de etilo al 100%. Se eluyó con polaridad creciente comenzando con acetato/metanol en relación 99:1 respectivamente hasta metanol al 100% (Figura 8). De lo cual se obtuvieron 77 fracciones, posterior a esto se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de todas las fracciones obtenidas, utilizando una placa de CCF como fase estacionaria y como fase móvil acetato/metanol en relación 9:1 (v/v). Para la visualización se usó una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 y 365nm (Figura 9). Las placas se revelaron adicionando ácido sulfúrico al 5%, vainillina y fuente de calor (Figura 10). Finalmente se unieron las fracciones de acuerdo con la similitud de su Rf y color de las manchas, observadas en la CCF, obteniendo un total de 4 fracciones como muestra la Tabla 5.

Tabla 5. Fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo

**Fracción de partición de acetato de etilo
(VLCRA)**

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRAF1	30 – 52	50.1
VLCRAF2	53 – 63	16.8
VLCRAF3	64 - 71	16.5
VLCRAF4	72 - 77	773.2

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

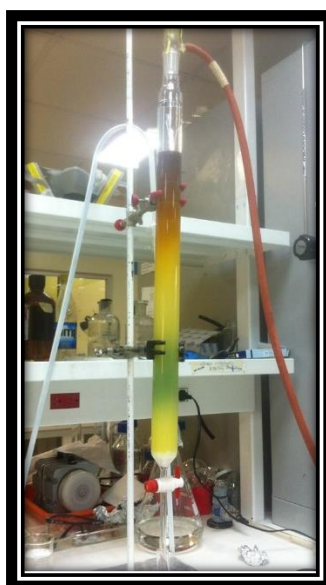


Figura 8. Columna Cromatográfica de la fracción de partición acetato

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

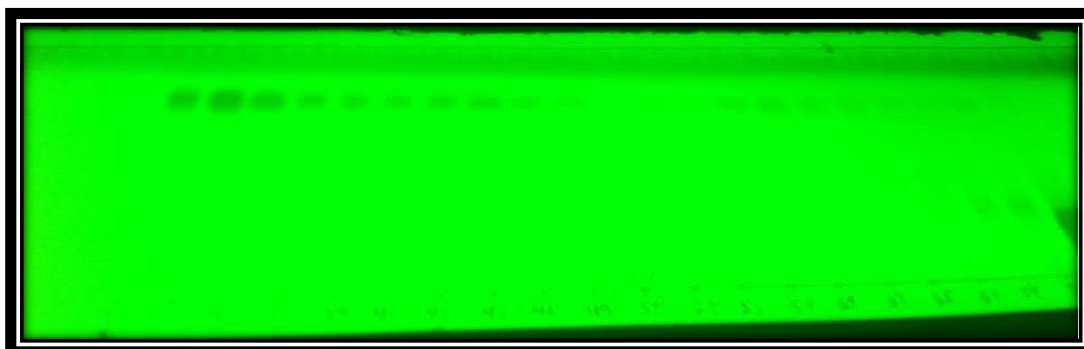


Figura 9. CCF de las fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo en luz UV 254 nm

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

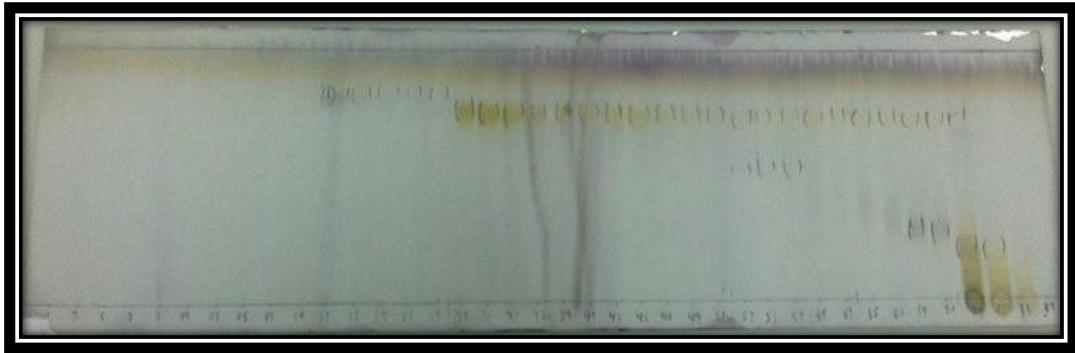


Figura 10. CCF de las fracciones obtenidas de la fracción de partición acetato de etilo revelada

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8.1. Purificación de la fracción VLCRAF1.

La fracción VLCRAF1 se la purificó mediante una microcolumna cromatográfica en fase directa, para de esta manera obtener la separación de los posibles compuestos. Se utilizó 50mg de muestra (VLCRAF1) en 3g de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase directa, para compactarla se usó acetato al 100%, y se utilizó como eluyente acetato/metanol en relación 99:1 respectivamente, el mismo que fue eluido de forma isocrática. De la cual se obtuvieron 2 fracciones como muestra la Tabla 6, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF).

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF1

Purificación de la fracción VLCRAF1

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRAF5	2 – 9	22.5
VLCRAF6	10 – 17	6.5

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8.1.1. Purificación de la fracción VLCRAF5.

La purificación de la fracción VLCRAF5 se la realizó mediante un procedimiento de lavados continuos, utilizando hexano y diclorometano, los cuales cumplían la función de retirar las contaminaciones presentes en la fracción y de esta manera purificar el compuesto. Posterior a esto se procedió analizar mediante cromatografía de capa fina (CCF), presentando una sola mancha tal como muestra la Figura 11, y de este modo aislando al compuesto **2** de la especie *Croton rivinifolius* Kunth.

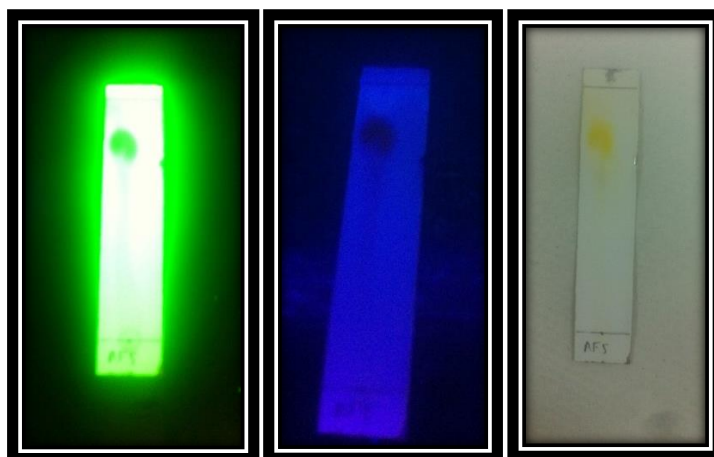


Figura 11. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF5 (8A:2M): Luz UV 254 nm, Luz UV 365 nm y revelada

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8.2. Purificación de la fracción VLCRAF4.

Para la purificación de la fracción VLCRAF4, se realizó una microcolumna cromatográfica en fase directa, para de esta manera obtener una mejor separación de los posibles compuestos. Se utilizó 350mg de muestra (VLCRAF4) en 20g de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase directa. Debido a que esta fracción es soluble en metanol, se optó por realizar un tapón de Sílice, para compactar la microcolumna cromatográfica se usó acetato al 100%. Se utilizó como eluyente acetato/metanol en relación 8:2, el mismo que fue eluido de forma isocrática y utilizando 500 ml de solventes. Se obtuvieron 3 fracciones como muestra la Tabla 7, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF), como muestra la Figura 12.

Tabla 7. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF4

Purificación de la fracción VLCRAF4

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRAF7	13 – 33	87
VLCRAF8	34 – 51	27.4
VLCRAF9	52 – 75	20.8

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

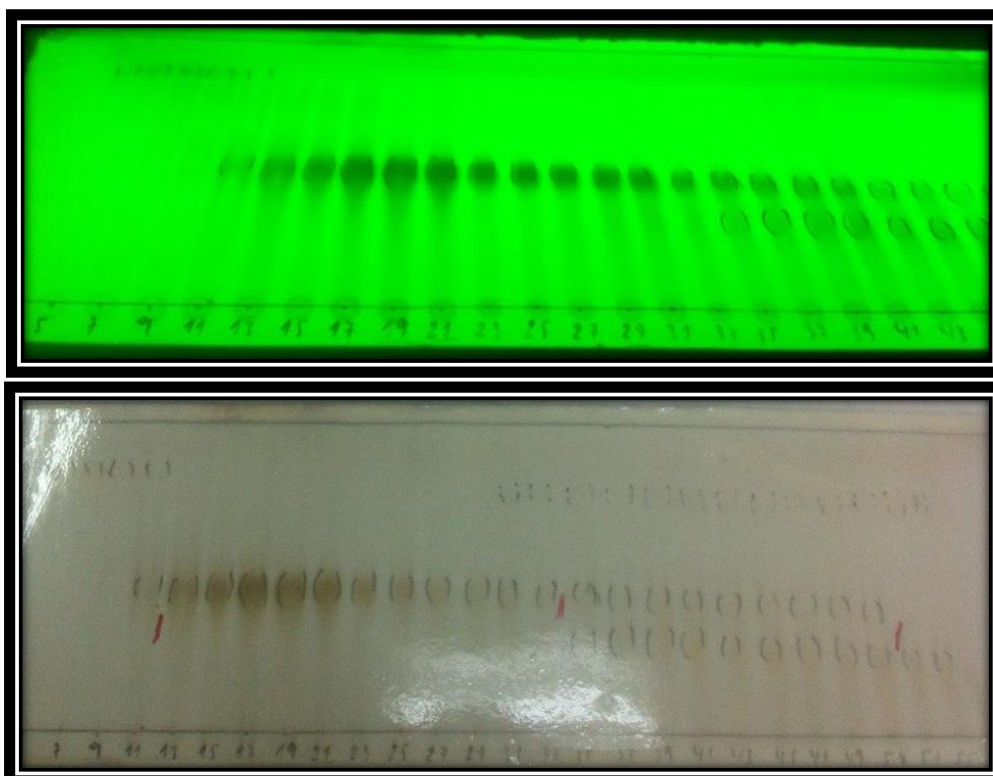


Figura 12. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF4 (8A:2M): Luz UV 254 nm y revelada

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8.2.1. Purificación de la fracción VLCRAF7.

A la fracción VLCRAF7 se la purificó mediante una microcolumna cromatográfica en fase directa, para así obtener una mayor separación de los posibles compuestos. Se utilizó 87mg de muestra (VLCRAF7) en 8g de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase directa, para compactarla se usó acetato al 100%. Se eluyó con polaridad creciente iniciando con acetato/metanol en relación 8:2 hasta metanol al 100%, utilizando 200 ml. Se obtuvieron 2 fracciones como muestra la Tabla 8, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF) (Figura 13).

Tabla 8. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRAF7

Purificación de la fracción VLCRAF7

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
VLCRAF7.1	8 – 26	72.2
VLCRAF7.2	27 – 49	10.6

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018



Figura 13. CCF revelada de la purificación de la fracción VLCRAF7 (8A:2M)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.8.2.1.1. Purificación de la fracción VLCRAF7.1.

Para la purificación de la fracción VLCRAF7.1, se la realizó mediante la elución de toda la muestra a través de una pipeta Pasteur con una pequeña cantidad de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase directa, a manera de lavado o filtración de la muestra para retener en la sílice las impurezas o contaminaciones y de esta manera obtener una mejor purificación del posible compuesto. Se utilizó como eluyente acetato/metanol en relación 8:2 respectivamente, el mismo que fue eluído de forma isocrática. Posterior a esto se procedió analizar mediante la cromatografía de capa fina (CCF), y de acuerdo a su resultado, se presentó una sola mancha en la CCF tal como muestra la Figura 14, dando lugar al compuesto **3** de la planta en estudio.



Figura 14. CCF de la purificación de la fracción VLCRAF7.1 (8A:2M): Luz UV 254 nm y revelada

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.9. Obtención del extracto metanólico de los tallos

La obtención del extracto metanólico de los tallos, se realizó de la misma forma de la que se obtuvo el extracto metanólico de las hojas, como se indicó anteriormente, y se logró conseguir un extracto metanólico total completamente seco de 46.30 g.

3.10. Fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos (VLCRMT)

Para el fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos se pesó 3g de muestra (VLCRMT), y se procedió a cargar la columna cromatográfica con 220g de sílice gel de fase directa, la misma que fue compactada con hexano/acetato (1:1). Se eluyó con polaridad creciente comenzando con hexano/acetato en relación 1:1 hasta acetato/metanol en relación 7:3 respectivamente. Se obtuvieron 97 fracciones, de lo cual se procedió a realizar cromatografía en capa fina (CCF) de todas las fracciones obtenidas, utilizando una placa de CCF como fase estacionaria y como fase móvil acetato/hexano en relación 9:1 y 7:3 (v/v). Para su visualización se utilizó una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 y 365 nm., la placa se reveló con ácido sulfúrico al 5%, vainillina y fuente de calor (ver Figura 15). Finalmente se unieron las fracciones de acuerdo con la similitud de su R_f y color de las manchas, observadas en la CCF, obteniendo un total de 10 fracciones como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de los tallos

Extracto metanólico de los tallos (VLCRMT)

Código de la Fracción	Tubos	Total (mg)
VLCRMTF1	11 – 19	20.2
VLCRMTF2	20 – 27	9.1
VLCRMTF3	28 – 33	7.1
VLCRMTF4	34 – 53	61.5
VLCRMTF5	LAVADO	2080.4
VLCRMTF6	71 – 75	16.3
VLCRMTF7	76 – 79	10.9
VLCRMTF8	80 – 85	29.8
VLCRMTF9	86 – 95	28.1
VLCRMTF9(2)	86 – 95	29.1

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018



Figura 15. CCF revelada del extracto metanólico de los tallos.

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.10.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.

La fracción VLCRMTF5 se la purificó mediante una columna cromatográfica en fase inversa, para de esta manera obtener la separación de los posibles compuestos. Se utilizó 2g de muestra (VLCRMTF5) en 180g de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase inversa, para compactar y eluir se usó metanol/agua en relación 6:4 respectivamente, la misma que fue eluída de forma isocrática. Se procedió a unir las fracciones de acuerdo con la similitud de su R_f y color de las manchas, observadas en la CCF, obteniendo 2 fracciones como muestra la Tabla 10, las mismas fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF) (ver Figura 16).

Tabla 10. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRMTF5

Purificación de la fracción VLCRMTF5

Código de la Fracción	Tubos	Total (mg)
VLCRMTF5.1	3 – 20	1611.5
VLCRMTF5.2	21 – 80	48.5

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018



Figura 16. CCF revelada de la fracción VLCRMTF5.2 (9A:1M)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.10.1.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.2.

La fracción VLCRMTF5.2 se la purificó mediante una microcolumna cromatográfica en fase inversa, para de esta manera obtener la separación de los posibles compuestos. Se utilizó 48.5mg de muestra (VLCRMTF5.2) en 15g de sílice gel (Merck 0.0015-00) de fase inversa, para compactarla se usó metanol al 100%, y se utilizó como eluyente metanol/agua en relación 7:3 respectivamente, el mismo que fue eluido de forma isocrática. Se obtuvieron 84 fracciones, de lo cual se procedió a realizar cromatografía en capa fina (CCF) de todas las fracciones obtenidas a una polaridade de metanol/agua 7:3 (ver Figura 17). Seguidamente se procedió a unir las fracciones de acuerdo con la similitud de su Rf y color de las manchas, observadas en la CCF, y se obtuvo 5 fracciones como muestra la Tabla 11, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (CCF) (ver Figura 18).

Tabla 11. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2

Purificación de la fracción VLCRMTF5.2

Código de la Fracción	Tubos	Total (mg)
VLCRMTF5.2.1	1 – 17	4.4
VLCRMTF5.2.2	24 – 35	7.3
VLCRMTF5.2.3	39 – 49	6
VLCRMTF5.2.4	51 – 84	4.8
VLCRMTF5.2.5	LAVADO	7.2

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018



Figura 17. CCF en fase inversa de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2 revelada

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018



Figura 18. CCF en fase inversa de las uniones de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2 revelada.

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

3.10.1.1.1. Purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3.

La purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3 se la realizó mediante un procedimiento de lavados continuos, utilizando hexano y diclorometano, los cuales cumplían la función de retirar las contaminaciones presentes en la fracción y de esta manera purificar el compuesto. Donde el diclorometano fue el solvente que separo la mayoría de las impurezas. Posterior a esto se procedió analizar mediante cromatografía de capa fina (CCF), presentando una sola mancha tal como muestra la Figura 19 en el lavado de diclorometano, finalmente se hizo una CCF revelada con Dragendorff para determinar si era o no un posible alcaloide, y tal como muestra la Figura 20 efectivamente se trataba de un alcaloide y de este modo se aisló al compuesto **4** de la especie *Croton rivinifolius* Kunth.



Figura 19. CCF en fase inversa de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3 revelada
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018



Figura 20. CCF revelada con Dragendorff de la purificación de la fracción VLCRMTF5.2.3
Fuente: Autor, 2018
Elaboración: Autor, 2018

3.11. Identificación de los compuestos

3.11.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los compuestos se identificaron mediante el análisis de espectros de RMN, a través de un equipo Varian N° de serie 21953, el mismo que opera a 400 MHz para ¹H-RMN y 100 MHz para ¹³C-RMN, utilizando como disolvente metanol (CD₃OD) y cloroformo (CDCl₃) deuterado. Cabe mencionar que los desplazamientos químicos (δ) de los espectros están expresados en partes por millón (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

3.11.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Para determinar los espectros de masas de los metabolitos secundarios aislados se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890N acoplado a un espectrómetro detector de masas modelo Agilent serie 5973 inert. El espectrómetro dispone de una base de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683.

Las condiciones de operación del equipo que se utilizó fueron: una columna capilar no polar, DB-5MS, Agilent 122-5032, 0.25mm x 30 m, espesor 0.25 μ m de película, a una temperatura máxima de 350°C con flujo constante y flujo inicial de 1mL/min a una velocidad promedio de 36 cm/seg. Las muestras se disolvieron en hexano y diclorometano. Como fase móvil se utilizó helio como gas de arrastre con un ratio de partición de 25:1 a una temperatura inicial de 250°C. El detector presentaba 2 temperaturas una de cuadruplo a 200°C y una de fuente a 280°C. La temperatura inicial del horno se ajustó a 40°C durante un tiempo de 3 min, posteriormente la temperatura fue aumentando a razón de 10°C/min hasta llegar a una temperatura final de 270°C.

**4. CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Fracciones de partición obtenidas de *Croton rivinifolius* Kunth

En la Tabla 12 se describe a detalle el peso y rendimiento de todas las fracciones de partición obtenidos a partir de 923.38g de muestra

Tabla 12. Peso y rendimiento de las fracciones de partición obtenidas

FRACCIÓN DE PARTICIÓN	PESO INICAL (g)	RENDIMIENTO (%)	PESO FINAL (g)	RENDIMIENTO (%)
Hexano	923.38 g	10.97%	9.98 g	1.08 %
Diclorometano			1.76 g	0.19 %
Acetato de etilo			7.54 g	0.82 %
Metanol + agua			21.36 g	2.31 %
Extracto metanólico de los tallos	46.2976 g	21.10%		

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

De todos los extractos obtenidos el que mayor rendimiento tuvo fue el de metanol/agua con 2.31%, mientras que el extracto con menor rendimiento fue el de diclorometano con 0.19%.

4.2. Compuestos aislados de *Croton rivinifolius* Kunth

En la Tabla 13 se muestra los compuestos que fueron aislados, purificados y caracterizados de las fracciones de partición hexano y acetato de etilo.

Tabla 13. Compuestos aislados, purificados y caracterizados de *Croton rivinifolius* Kunth

Fracciones de partición	Fracciones	Nombre del Compuesto	Polaridad	Peso (mg)
Hexano	Compuesto 1	Escualeno	1H:1D	30 mg
Acetato de etilo	Compuesto 2	Tiliosido	8A:2M	22.5 mg
	Compuesto 3	Swerosido	8A:2M	56,6 mg
Extracto metanólico de los tallos	Compuesto 4	Isocorydine	7M:3H ₂ O	6 mg

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

4.3. Fraccionamiento de la fracción de partición hexano

4.3.1. Compuesto 1.

El compuesto 1 se lo obtuvo como masa blanda de color amarillo, el cual mediante el análisis de CG-EM y comparado con la base de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, se identificó una mezcla en la cual el compuesto mayoritario era el Escualeno tal como lo muestra el espectro de masas (Anexo 1). Presentando un ion molecular de 410 m/z, en un tiempo de retención de 31.08 minutos. Con peso molecular de 410,718 g/mol, cuya fórmula molecular es C₃₀H₅₀. Su estructura química se puede observar en la Figura 21.

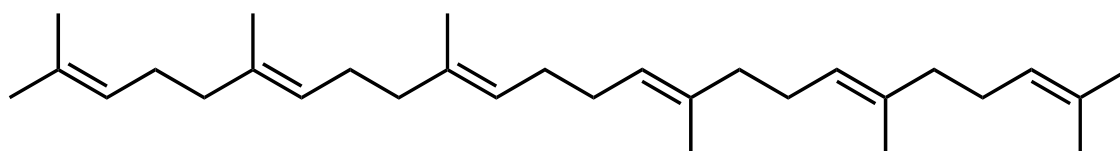


Figura 21. Estructura química del Escualeno (1)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

El Escualeno es el precursor común de todos los triterpenos (Marcano & Hasegawa, 2002). Es un triterpeno que se localiza de forma característica en el aceite de oliva. Posee actividad antioxidante y antitumoral. Pero entre las actividades más destacables de este compuesto, se menciona que en modelos experimentales murinos, inhibe la tumorigénesis de tumores inducidos química y específicamente de colon, pulmón y piel (Warleta, Ruiz-Mora, Campos-Segura, Serrano, & Gaforio, 2010).

4.4. Fraccionamiento de la fracción de partición acetato de etilo

4.4.1. Compuesto 2.

El compuesto 2, se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo claro, cuyo punto de fusión fue de 263 -265°C con descomposición. El cual para la toma de espectros de RMN, se disolvió en metanol deuterado (CD₃OD). El espectro de RMN de protones ¹H (Anexo 2), muestra señales en la zona espectral de campo medio y campo bajo, lográndose visualizar resonancias de protones aromáticos, olefínicos y oxigenados que parecían indicar la presencia en la estructura analizada de un carbohidrato. El análisis de la señales ampliadas del espectro (Anexo 2), nos indica un par de dobletes con constante de acoplamiento de 16Hz a los siguientes desplazamientos δ 6.07 (1H, d, J = 16 Hz) y 7.40 (1H, d, J = 16Hz), estas señales muestran la presencia de una olefina trans en la estructura. Otro par de señales

dobletes que integran cada uno para dos protones con constante de acoplamiento de protones orto, nos indican la presencia de un sistema aromático para sustituido: δ 7.30 (2H, d, $J= 8.4\text{Hz}$) y 7.97 (2H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$). Por ultimo un par de dobletes que integran cada uno para un protón y que exhiben acoplamiento meta, nos sugiere un posible anillo aromático 1, 2, 3, 5 tetrasustituido. Las señales mencionadas aparecen a δ 6.12 (1H, d, $J= 2.0 \text{ Hz}$) y δ 6.30 (1H, d, $J= 2.0 \text{ Hz}$). Estas y otras señales más complejas además de las correspondientes al carbohidrato se observaban en el espectro completo de ^1H . La señal doblete con $J = 7.6 \text{ Hz}$, nos indica el protón anómero de una β -D-glucosa.

La espectroscopía de RMN de ^{13}C y el experimento DEPT 135 como muestra el Anexo 2, nos permitieron obtener mayor información de la estructura del compuesto 2 que analizamos. En el espectro de carbono se observan 30 señales, de las cuales según el espectro DEPT 135, 12 son carbonos cuaternarios, entre ellos dos carbonilos (179.4 ppm, 168.8 ppm), un CH_2 y 17 son carbonos metínicos (CH), entre los cuales se incluyen los del azúcar presente, tal como muestra el Anexo 2. El compuesto 2 está constituido por un flavonoide tipo kamferol, un azúcar de tipo glucosa y adicional contiene un sistema aromático α, β - insaturado (168.8, 116.04 y 146.55 ppm), que fue identificado como éster del ácido p-coumarico. La comparación de los datos de RMN con flavonoides de la literatura, que tuviesen estas características, nos señaló que el compuesto era un flavonoide conocido como Tilirosido (**2**), de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ y peso molecular 594.525 g/mol, el cual en la Figura 22 se puede observar su estructura. Mientras que en la Tabla 14 se anexan los datos experimentales de ^1H y ^{13}C RMN con los reportados por Jung & Park (2007).

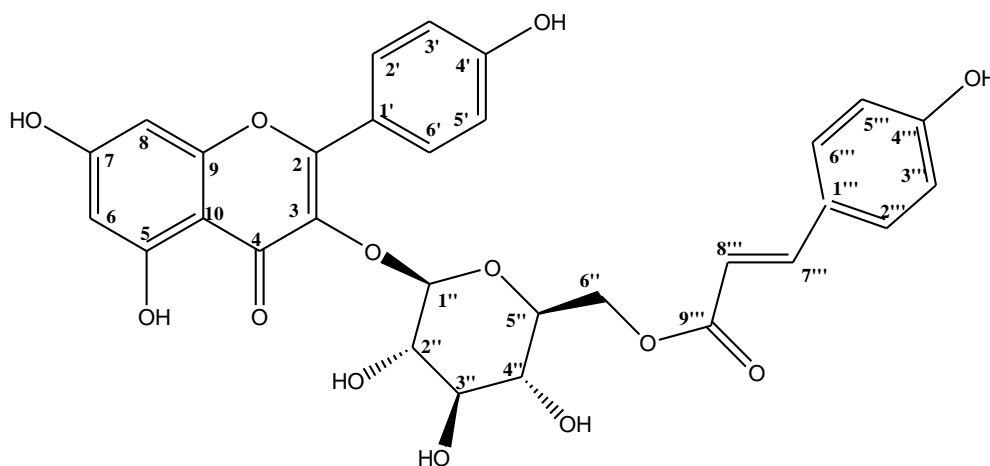


Figura 22. Estructura química del Tilirosido (**2**)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Tabla 14. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C RMN del Tiliroside en CD_3OD (400 MHz y 100 MHz)

Átomo de hidrogeno y carbono	(Jung & Park, 2007) ^1H RMN (400 MHz)	Datos Experimentales ^1H RMN (400 MHz)	(Jung & Park, 2007) ^{13}C RMN (100 MHz)	Datos Experimentales ^{13}C RMN (100 MHz)
2			158.01	158.40
3			133.93	135.17
4			178.09	179.43
5			161.63	162.96
6	6.02 (1H, d)	6.12 (1H, d, J= 2.0 Hz)	98.70	99.97
7			164.65	165.90
8	6.18 (1H, d)	6.30 (1H, d, J= 2.0 Hz)	93.57	94.80
9			157.07	159.35
10			104.30	105.60
1'			121.40	122.71
2'	7.86 (2H, d)	7.97 (2H, d, J= 8.8 Hz)	130.93	132.20
3'	6.71 (4H, t)	6.80 (4H,t, J= 18.4 Hz)	114.74	114.72
4'			160.21	161.51
5'	6.71 (4H, t)	6.80 (4H,t, J= 18.4 Hz)	114.74	114.72
6'	7.86 (2H, d)	7.97 (2H,d, J= 8.8 Hz)	130.93	132.20
1''	5.13 (1H, m)	5.24 (1H,m, J= 7.6 Hz)	102.72	103.92
2''	3.37 (1H, m)	3.63 (1H, d)	74.50	75.80
3''	3.21 (2H, m)	3.46 (3H, m)	74.44	75.70
4''	3.21 (2H, m)	3.46 (3H, m)	70.42	71.71
5''	3.38 (1H, m)	4.19 (1H, m)	76.71	77.90
6''	4.19 (2H, m)	4.30 (1H, dd)	63.06	64.29
1'''			125.78	127.08
2'''	7.20 (2H, d)	7.30 (2H, d, J= 8.4 Hz)	129.89	131.17
3'''	6.71 (4H, t)	6.80 (4H,t, J= 18.4 Hz)	115.48	116.78
4'''			159.87	161.17
5'''	6.71 (4H, t)	6.80 (4H,t, J= 18.4 Hz)	115.48	116.78
6'''	7.20 (2H, d)	7.30 (2H, d, J= 8.4 Hz)	129.89	131.17
7'''	7.32 (1H)	7.40 (1H, d, J= 16 Hz)	145.26	146.55
8'''	5.99 (1H, d)	6.07 (1H, d, J= 16 Hz)	113.44	116.04
9'''			167.53	168.80

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

El Tilirosido es un flavonoide glucosídico que se encuentra en varias plantas medicinales y dietéticas, como tilo, rosa mosqueta y fresa. Según varios estudios se ha demostrado que este compuesto exhibe varias propiedades farmacológicas, como antiinflamatoria, antimicrobiana, antihipertensiva, antirreumática, antidiabética, antihiperlipemica, antioxidante, antiviral y citotóxica (Luhata, Munkombwe, & Hatwiko, 2016). Asimismo es un compuesto novedoso natural para inhibir la neuroinflamación en trastornos neurodegenerativos. Esta actividad posiblemente se deba, en parte a la propiedad antioxidante de este compuesto (Velagapudi, Aderogba, & Olajide, 2014).

El Tilirosido se encuentra comúnmente en varias plantas medicinales, entre estas tenemos las familias de Rosaceae, Malvaceae, Tiliaceae, Platanaceae, Lamiaceae, Pteridaceae. Este ha sido utilizado para el tratamiento adicional de los resfriados comunes y los estados inflamatorios, así como en el aumento de la inmunidad de los organismos, además este compuesto mostró actividades farmacológicas muy interesantes, como, citotóxicas para líneas celulares leucémicas humanas y actividad anti-complemento muy potente en la vía clásica del sistema del complemento (Nowak, 2003). Otros estudios han establecido que el Tilirosido tiene un mayor efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer T47D en comparación con las líneas celulares de cáncer MCF7 (Da'i et al., 2016).

El género *Croton* es uno de los más estudiados por su alto contenido de actividad biológica y según investigaciones han demostrado que varias especies presentan en su estructura al Tilirosido como el *Croton lachnostachyus* que presenta un mayor contenido de Tilirosido, seguido de *C. serratifolius*, especie perteneciente a la sección de *Croton barhamia*. Este flavonoide se ha informado como mayoritario en *C. grandivelum*, *C. antisiphiliticus*, *C. hemiargyreus*, *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus* y *C. splendidus*. Se ha reconocido que posee actividades biológicas, como antioxidantes y antiinflamatorias, citotóxicas y ansiolíticas, entre otras, como las anteriormente mencionadas (Furlan et al., 2015).

El Tilirosido se ha identificado en otras especies de *Croton* como: *C. gnaphalii*, *C. kongensis* (como *C. tonkinensis*), *C. caudatus* Geisel, *C. gratissimus*, *C. zambesiscus*, y la estrechamente relacionada *Astraea lobata* (L.) Klotzsch. (Sinonimia de *C. lobatus*). Y en otras especies de *Croton*, como *C. gnaphalii* Baill, *C. sellowii* Baill, *C. dichrous* Mu'll. Arg., *C. erythroxyloides* Baill., *C. myrianthus* Mu'll. Arg., y *C. splendidus* (Furlan et al., 2015).

4.4.2. Compuesto 3.

Compuesto sólido de color amarillo, cuyo punto de fusión fue de 107-110°C y con un peso molecular de 358.343 g/mol, fue disuelto en metanol deuterado (CD₃OD) para adquirir sus espectros de RMN. En primer lugar, el espectro de RMN de protones ¹H (Anexo 3), muestra una serie de señales a campo medio sumamente complejas y un doblete muy desapantallado a un desplazamiento de 7.59 ppm (d, J = 2.4 Hz), es evidente que muchas de las señales son las de un carbohidrato presente en la estructura. Especialmente fue importante para la identificación de esta unidad estructural, el doblete a δ 4.68 (1H, d, J = 8 Hz), que muestra la presencia de la β-D-glucosa. Los desplazamientos de los otros protones de la estructura indican protones de tipo olefínicos y algunas señales alifáticas (Anexos 3). Se analizó el espectro de RMN de ¹³C conjuntamente con el espectro DEPT 135 como se presenta en el Anexo 3, el cual nos indica que el compuesto analizado contiene 16 carbonos; de ellos dos son cuaternarios δ (168.5 y 106.0), existen cuatro metilenos δ (25.92, 69.7, 62.6 y 120.8, dos de ellos oxigenados 69.7 y 62.6, y el último de 120.8 indica la presencia de una olefina terminal). El resto de los 10 carbonos restantes corresponden a metinos de diferente naturaleza: alifáticos oxigenados a δ (99.7, 97.9, 77.8, 74.7, 71.1), metinos olefínicos a δ (133.3 y 153.9) y tres metinos adicionales a δ (28.4, 43.8 y 78.6). La fórmula molecular según el análisis de ¹H y ¹³C es C₁₆H₂₂O₉, lo cual requiere de 6 insaturaciones en la molécula, entre ellas un grupo carbonilo posiblemente de éster, como muestra la Figura 23. Con el espectro de HMQC (Anexo 3), los protones y los carbonos fueron correlacionados. Finalmente, con todos estos datos y la revisión de la literatura nos indica que el compuesto analizado es un iridoide glicosilado de nombre Swerosido (3), como muestra la Figura 23. En la Tabla 15 se anexan los datos experimentales de ¹H y ¹³C RMN con los reportados por Joshi (2013).

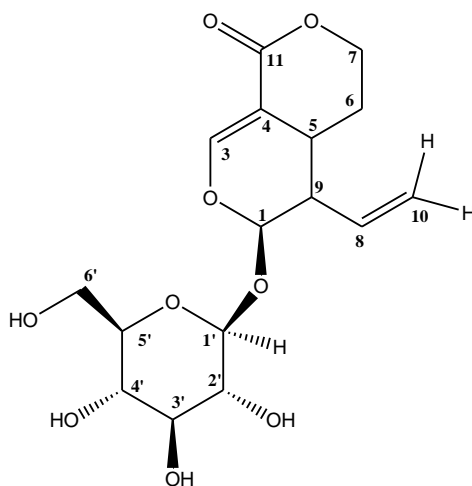


Figura 23. Estructura química del Swerosido (3)

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Tabla 15. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C RMN del Swerosido en CD_3OD (400 MHz y 100 MHz)

Átomo de hidrogeno y carbono	(Joshi, 2013)	Datos	(Joshi, 2013)	Datos
	^1H RMN (400 MHz)	Experimentales	^{13}C RMN (100 MHz)	Experimentales
		^1H RMN (400 MHz)		^{13}C RMN (100 MHz)
1	5.43 (1H,d,J=1.2 Hz)	5.55 (2H,d,J=1.6 Hz)	98.1	97.9
3	7.56 (1H,d,J=2.4 Hz)	7.59 (1H,d,J=2.4 Hz)	154.3	153.9
4			105.3	106.0
5	3.11 (1H, m)	3.14 (1H, m)	27.3	28.4
6	1.71 (2H, m)	1.71 (1H, d)	25.1	25.9
7	4.41 (2H, m)	4.39 (1H, d)	70.1	69.7
8	5.56 (1H, m)	5.55 (2H,d,J=1.6 Hz)	132.1	133.3
9	2.72 (1H, m)	2.72 (1H,d,J= 1.6 Hz)	42.6	43.8
10a	5.33 (1H,dd, J=2.0, 16.8 Hz)	5.32 (2H,d, J=2.0, 16.8 Hz)	121.2	120.8
10b	5.25 (1H,dd, J=2.0, 9.0 Hz)	5.26 (2H, d, J=2.2, 7.2 Hz)		
11			169.7	168.5
1'	4.63 (1H,d,J=8.0 Hz)	4.68 (1H,d,J=8 Hz)	99.4	99.7
2'	3.22 (1H,dd,J=8.0, 8.8 Hz)	3.20 (1H,J=8.0,8.8 Hz)	73.7	74.7
3'	3.71 (1H,t,J=8.8 Hz)	3.67 (2H,t,J=8.8 Hz)	76.2	77.8
4'	3.31 (1H, m)	3.31 (1H, m)	70.2	71.5
5'	3.44 (1H, m)	3.43 (1H)	78.0	78.6
6'a	3.65 (1H, dd, J=12.0, 6.0 Hz)	3.65 (2H, dd, J=10.0, 7.2 Hz)	61.0	62.6
6'b	4.02 (1H, dd, J=12.0, 6.4 Hz)	3.89 (1H, dd, J=10.0, 2 Hz)		

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

El Swerosido fue aislado en un gran número de especies de la familia Gentianaceae (Sánchez, 2011), en la cual predomina los géneros *Centaurium*, *Gentiana*, *Gentianella* y *Swertia* siendo el constituyente principal (Nadinic et al., 2002). De la especie *Chelonanthus alatus* (Gentianaceae) también se identificó al Swerosido (Sanchez, Moreno-Murillo, & Cuca, 2013). Se menciona que ha sido identificado de las hojas de *Tabernaemontana psorocarpa*. Sin embargo fue aislado por primera vez de *Swertia japonica* y desde aquel tiempo lo han aislado de varias otras especies (Van Beek, Lankhorst, Verpoorte, & Svendsen, 1982), tales como

Scabiosa columbaria L., en la cual mostró una actividad antimicrobiana moderada (Horn et al., 2001), así como también de los botones florales de *Lonicera japonica* THUNB (Luo, Chen, Cao, Wen, & Li, 2009). Pero lo más destacado es que ha sido reportado por primera vez en nuestro caso para el género *Croton*.

Debido a que los iridoides pertenecen a un grupo muy abundante de metabolitos secundarios, los mismos que han sido aislados e identificados en plantas y cuyo uso se han empleado en la medicina natural y para el tratamiento de enfermedades como: hipertensión, infección respiratoria, inflamación, dolor de cabeza, enfermedades epidérmicas, fiebre, entre otras. Los iridoides se muestran principalmente distribuidos en plantas que conciernen a las familias de: Acanthaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Caprifoliaceae, Cornaceae, Dipsacaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Loasaceae, Loganiaceae, Nyctanthaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Pedaliaceae, Rubiaceae, Scropulariaceae, Valerianaceae y Verbenaceae (Joshi, 2013; Rios, 2015).

El Swerosido es un compuesto importante de *Fructus corni*, y según investigaciones se han comprobado que es muy útil para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. Dentro de la farmacología moderna realiza varias actividades farmacológicas y biológicas, como antiinflamatorio, antialérgico, vasodilatación, antiproliferación, antihepatitis, y antiagregante (H. Sun et al., 2013).

Otros estudios realizados al Swerosido le asignan propiedades útiles en lo que respecta en el aumento de la secreción hepática de bilis, sobre todo ayuda al sistema digestivo facilitando las digestiones, además facilita la eliminación de la bilis contenida en la vesícula biliar y estimulando el apetito (López, Miguel, & Aleixandre, 2012). Incluso se ha demostrado actividad antitumoral contra la línea celular p388 (Rios, 2015).

Dentro de las propiedades biológicas de los compuestos iridoides, en el cual se encuentra el Swerosido, se ha reportado según bibliografía actividad antimicrobiana, hipotensiva, analgésica, antiflogística, hepatoprotectora, sedativa, laxante, antileucémica, anticolinérgica y antileishmaniásica (Nadinic et al., 2002).

4.5. Fraccionamiento del extracto metanólico de los tallos

4.5.1. Compuesto 4.

Este compuesto se aisló después de sucesivos “lavados” con hexano y diclorometano a una fracción sólida de color verde, obteniendo un sólido de color azul. El espectro de RMN de ¹H (Anexo 4) de este compuesto muestra señales en la zona alifática, en la zona de campo medio

presenta grupos metoxilos y señales aromáticas. Adicional a estas señales un protón bien desapantallado se encuentra a un desplazamiento de 9.0 ppm. Las señales de la zona alifática son bastante complejas con diversos acoplamientos que parecen sugerir protones de anillos alifáticos. Adicionalmente, es evidente que el compuesto está impuro, por lo cual existen señales que no pueden ser atribuidas a la estructura en estudio. Consideramos tomar los espectros de ^{13}C y un DEPT 135 (Anexo 4) para ver a cuál tipo de familia de compuestos pertenecía el que habíamos aislado. Un gran número de carbonos en la zona aromática se visualizan, de los cuales 9 de ellos son cuaternarios. Igualmente son evidentes los carbonos de varios grupos metoxi. Un metileno a un desplazamiento δ 52.9 ppm, sugiere que puede ser vecino de un nitrógeno, igualmente un grupo metilo a un desplazamiento de 44.1 ppm, sugiere un CH_3 sobre un nitrógeno. El espectro DEPT 135 (Anexo 4) no se veía bien resuelto, sin embargo, por las señales previamente indicadas consideramos la presencia de un alcaloide. El estudio detallado de las señales ^1H y ^{13}C nos llevó a proponer un alcaloide de tipo aporfínico, sustituido con tres grupos metoxi. La comparación con un considerable grupo de compuestos que contienen las características previamente detalladas en nuestro compuesto, nos permiten considerar dos estructuras como las más probables Corydine (**4**), e Isocorydine (**4**) (ver Figura 25), los cuales entre ellos solo se diferencian en la posición del hidroxilo fenólico. Finalmente, después de una meticulosa comparación con varias referencias de la literatura, nos atrevemos a proponer como más probable a Isocorydine (**4**) (ver Figura 24). En la Tabla 16 se anexan los datos experimentales de ^1H y ^{13}C RMN con los reportados por Sun et al. (2014). Un trabajo de posterior purificación y la colección de espectros de RMN en dos dimensiones, nos permitirá definir con exactitud su completa identidad. En el género *Croton*, son comunes los alcaloides de distinta naturaleza, entre ellos algunos aporfínicos, pero la revisión de la literatura no muestra la presencia de Isocorydine en ninguna especie previamente estudiada. Este compuesto se considera con interesantes propiedades anticancerígenas.

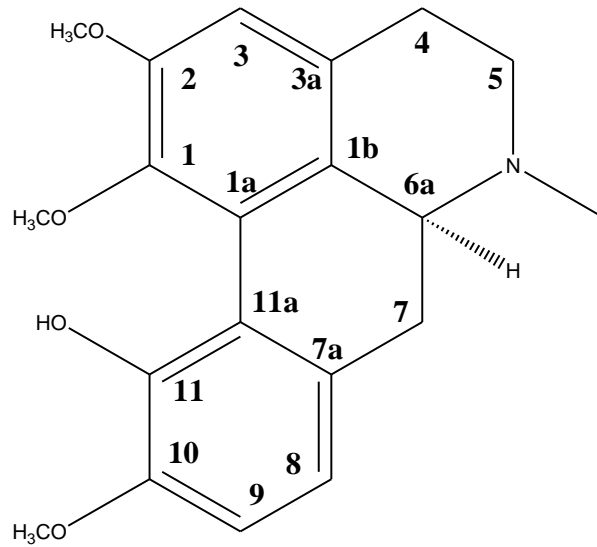


Figura 24. Estructura química del Isocorydine

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

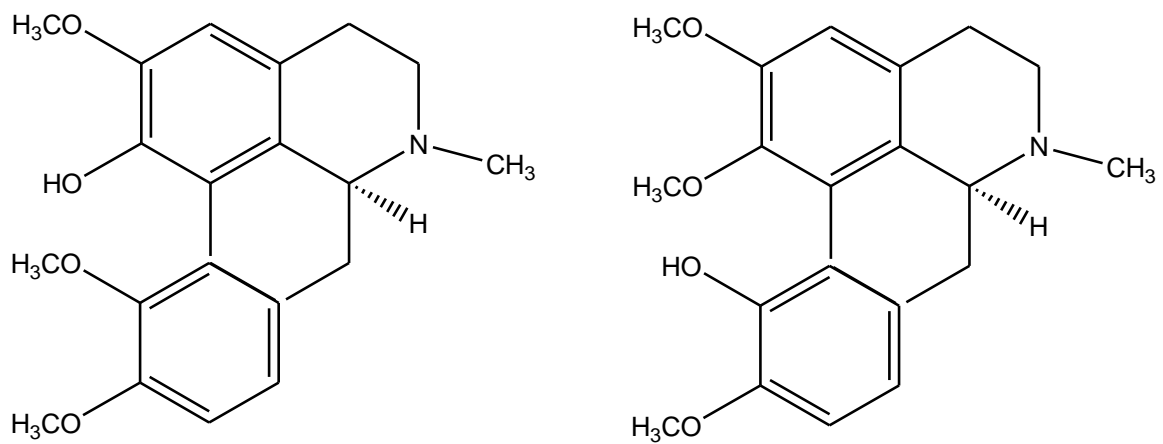


Figura 25. Diferencia estructural entre el Corydine e Isocorydine

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

Tabla 16. Comparación de los valores experimentales y bibliográficos de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C RMN del Isocorydine en CDCl_3 (400 MHz y 100 MHz)

Átomo de hidrogeno	(Sun et al., 2014)	Datos	Átomo de carbono	(Sun et al., 2014)	Datos
	^1H RMN (400 MHz)	Experimentales		^{13}C RMN (100 MHz)	Experimentales
		^1H RMN (400 MHz)			^{13}C RMN (100 MHz)
1-OCH ₃	3.72 (3H,s)	3.70 (s)	C-1	142.2	142.0
2-OCH ₃	3.94 (3H,s)	3.91 (s)	C-1a	126.0	125.9
3	6.73 (1H,s)	6.70 (s)	C-1b	120.1	120.2
4	3.20 (1H,m)	3.21 (sanch)	C-2	151.3	151.3
	2.72 (2H,d, J=17 Hz)	2.72 (2d,J=3.6 Hz)	C-3	111.1	111.3
5	3.02 (1H,m)	3.02 (2d,J=3.6 Hz)	C-3a	129.0	129.1
	2.49 (1H,t, J=12 Hz)	2.49 (m)	C-3b	130.0	130.5
6 ^a	2.89 (1H,d, J=12 Hz)	2.89 (d, J=12.8 Hz)	C-4	29.4	29.4
7	3.06 (1H,dd,J=13.5Hz)	3.03 (m)	C-5	52.8	52.9
	2.45 (1H,q,J=13.5 Hz)	2.45 (m)	C-6a	62.9	63.0
8	6.86 (1H,d,J=8.0 Hz)	6.82 (d, J= 8.0 Hz)	C-7	35.9	35.7
9	6.88 (1H,d,J=8.0 Hz)	6.90 (d, J= 8.0 Hz)	C-7a	130.0	130.5
10-OCH ₃	3.92 (3H,s)	3.91 (s)	C-8	119.0	120.2
11-OH	8.85 (1H,s)	9.0	C-9	111.0	111.4
NCH ₃	2.55 (3H,s)	2.54	C-10	149.5	146.4
			C-11	144.0	146.4
			N-CH ₃	43.9	44.0

Fuente: Autor, 2018

Elaboración: Autor, 2018

La característica que tiene en común los alcaloides de tipo aporfínico es su esqueleto tetracíclico, aunque con distintos sustituyentes. Estos alcaloides aporfínicos han demostrado según investigaciones un amplio arsenal de actividades biológicas como antioxidantes, citotóxicas, agente dopaminérgico y antiplaquetarias. En las últimas décadas este tipo de alcaloides han sido de gran interés en lo que respecta a las investigaciones farmacéuticas gracias a su actividad anticancerígena y se han desarrollado varios estudios centrados en la importancia de estos compuestos para la elaboración de medicamentos debido a las actividades biológicas antes mencionadas (Zhong et al., 2014).

El Isocorydine al inducir a la interrupción del ciclo celular G2/M y apoptosis, inhibe la propagación celular en líneas celulares de carcinoma hepatocelular in vivo e in vitro. Esto se

sabe por estudios que se han realizado recientemente, pero no es lo único que se ha demostrado, sino también induce a la apoptosis acoplada con PDCD4, dirigida a la población celular resistente a los fármacos o células madre cancerosas (Zhong et al., 2014).

Otras actividades biológicas reportadas para Isocorydine son: actividad antiarrítmica, analgésica, vasodilatadora, espasmolítica y antiplasmodial, y en cierto lugares es recetado para sanar dolores endógenos. Como se mencionó anteriormente el Isocorydine se lo podría utilizar para el tratamiento quimioterapéutico del carcinoma hepatocelular como un medicamento terapéutico. Pero muestran restricciones a su avance como quimioterapia moderna las cuales son: la eliminación rápida, la dosis baja y la vida media corta, sin embargo para perfeccionar la actividad anticancerígena se ha modificado la estructura de este compuesto (Chen et al., 2015).

Este alcaloide aporfínico se presenta en una gran variedad de plantas, pero principalmente en la especie *Dicranostigma leptopodum* (Maxim) Fedde (Chen et al., 2015), de igual forma se aislado de *Ocotea macrophylla* (Pabon & Cuca, 2010), y de las hojas de *Aristolochia lagesiana* var. *intermedia* (Ferreira, de Pascoli, Nascimento, Zukerman-Schpector, & Lopes, 2010).

CONCLUSIONES

Se obtuvo el extracto metanólico total, el mismo que se sometió a partición, obteniendo las fracciones de partición de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua. Habiendo sido el extracto de metanol/agua el que mayor rendimiento mostró, mientras que el extracto de diclorometano el que menor rendimiento presentó.

De la fracción de partición hexano se consiguió identificar mediante CG-EM una mezcla en la cual el compuesto que mayor predominaba fue uno de cadena larga conocido como Escualeno, con un peso de 30 mg.

De la fracción de partición acetato de etilo se logró aislar y caracterizar dos compuestos. Uno de origen flavonoide conocido como Tilirosido con un peso de 22.5 mg y de apariencia de polvo amarillento, y el otro de tipo iridoide glicosilado de nombre Swerosido con un peso de 56.6 mg, de apariencia blanda de color amarillo.

Del extracto metanólico de los tallos de la planta se aisló un alcaloide conocido como Isocorydine.

Todos los compuestos aislados han sido reportados de otras especies de plantas y presentan un amplio rango de actividades biológicas.

RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios fitoquímicos de aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de las diferentes fracciones de partición de la especie *Croton rivinifolius* Kunth, debido a que no hay estudios relevantes realizados en esta especie ecuatoriana.

Realizar diferentes técnicas que determinen la actividad biológica como: anticancerígena, antioxidante, antimicrobiano y antiviral, de los dos compuestos aislados e identificados de la especie *Croton rivinifolius* Kunth.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V., & De Witte, P. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay , Cañar y Loja , para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 89–97.
- Ávalos, A., & Peérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Avello, M., & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Medica de Chile*, 138(10), 1288–1293.
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macía, M. (2008). Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.*, 1, 1–3.
- Barrera, C., Gómez, D., & Castiblanco, F. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234–247.
- Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M., & Silva, M. (2001). Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 419–431.
- Buitron, X. (1999). *Ecuador: uso y comercio de plantas medicinales, situacion actual y aspectos importantes para su conservacion*. Cambridge: TRAFFIC International.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2015). *Manual de fitoterapia* (segunda). Barcelona: Elsevier Espana.
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293.
- Chen, Y., Yan, Q., Zhong, M., Zhao, Q., Liu, J., Di, D., & Liu, J. (2015). Study on pharmacokinetics and tissue distribution of the isocorydine derivative (AICD) in rats by HPLC-DAD method. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 5(3), 238–245.
- Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 9(4), 242–245.
- Da'i, M., Wikantyasning, E., Wahyuni, A., Kusumawati, I. T. D., Saifudin, A., & Suhendi, A. (2016). Antiproliferative properties of tiliroside from *Guazuma ulmifolia lamk* on T47D and MCF7 cancer cell lines. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 6(6), 627–633.

- De la Cruz, I., & González, A. (2009). Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios. *Revista Cincias UNICACH*, 3(2), 59–65.
- Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas. *Ciencia*.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., & Santa María, M. (2008). Resonancia Magnética Nuclear De Protón: Aplicaciones en Química Orgánica. *Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense*, (Madrid, España), 1–47.
- Fariñas, A., Cutiño, I., Pichin, M., Malberti, J., & León, E. (2014). Medicina tradicional y natural y la teoría de las complejidades. *Medisan*, 18(1), 105–114.
- Ferreira, M., de Pascoli, I., Nascimento, I., Zukerman-Schpector, J., & Lopes, L. (2010). Aporphine and bisaporphine alkaloids from *Aristolochia lagesiana* var. *intermedia*. *Phytochemistry*, 71(4), 469–478.
- Furlan, C., Santos, K., Sedano-Partida, M., Da Motta, L., Santos, D., Salatino, M., Salatino, A. (2015). Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botanica*, 38(4), 693–702.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil Y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41.
- Horn, M., Drewes, S., Brown, N., Munro, O., Meyer, M., & Mathekga, A. (2001). Transformation of naturally-occurring 1,9-trans-9,5-cis sweroside to all trans sweroside during acetylation of sweroside aglycone. *Elsevier*, 57(1), 51–56.
- Joshi, R. K. (2013). New Iridoid glycosides from *Wendlandia puberula*. *Journal of Appl Icabl E Chemistry*, 2(3), 567–572.
- Jung, M., & Park, M. (2007). Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*, 12(9), 2130–2139.
- López, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutricion Clinica Y Dietetica Hospitalaria*, 32(3), 81–91.
- Lorraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18–27.
- Luhata, L., Munkombwe, N., & Hatwiko, H. (2016). Isolation and 1H-NMR identification of a

- tiliroside from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1), 206–210.
- Luo, Y.-D., Chen, J., Cao, J., Wen, X.-D., & Li, P. (2009). Determination of Sweroside in Rat Plasma and Bile for Oral Bioavailability and Hepatobiliary Excretion. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57(1), 79–83.
- Machado, L. (2000). Control de calidad de productos fitoterapéuticos. In Roberto Pinzón (Ed.), *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Primera Ed, p. 247). Bogotá: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. (CDCH UCV, Ed.) (Segunda). Caracas.
- Medarde, M., Peláez, R., & Álvarez, R. (2015). Resonancia magnética nuclear RMN-1H y 13C, 1–16.
- Morón, F., & Jardines, J. (1997). La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 35–41.
- Murillo, J. (2004). Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana*, 5(2), 183–200.
- Nadinic, E., Penna, C., Saavedra, C., Coussio, J., Gutkind, G., & Debenedetti, S. (2002). Aislamiento de los Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). *Avta. Farmacéutica Bonaerense*, 21(2), 123–30.
- Nowak, R. (2003). Separation and quantification of tiliroside from plant extracts by SPE/RP-HPLC. *Pharmaceutical Biology*, 41(8), 627–630.
- Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*, 62, 12–15.
- Oliveira, M., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista de Ciencia Y Tecnología de América*, 30(8), 453–459.
- Organización Mundial de la Salud. (2002). Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial. *Perspectivas Políticas Sobre Medicamentos de La OMS*, (2), 1–6.
- Pabon, L., & Cuca, L. (2010). Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (LAURACEAE). *Quim. Nova*, 33(4), 875–879.

- Pascual, M., & Correal, E. (1992). La familia Euphorbiaceae como fuente de aceite vegetales para la industria tecnoquímica. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 43(1), 39–44.
- Peñarrieta, M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>
- Rios, M. Y. (2015). Química y Farmacología de Iridoides. *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*, (July), 95–133.
- Salatino, A., Faria, M., & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33.
- Sánchez, J. (2011). *Estudio de Hojas de Chelonanthus alatus (Genteanaceae)*. Universidad Nacional de Colombia Facultad.
- Sanchez, J., Moreno-Murillo, B., & Cuca, L. (2013). Two new secoiridoids from *Chelonanthus alatus* (Aubl.) Pulle (Gentianaceae)*. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 12(2), 186–195.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. (P. Roberto, Ed.). Bogotá: Convenio Andrés Bello.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. (Sergio Cervantes, Ed.) (Sexta edic). Mexico: Cengage Learning.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29–47.
- Suárez, A., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R., Tillett, S., & Torrico, F. (2013). Estudio fitoquímico de la corteza de *croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), 163.
- Suárez, A., Mateu, E., Chávez, K., Compagnone, R., Orsini, G., Tillett, S., ... Israel, A. (2012). Perfil Fitoquímico y Farmacológico de *Croton micans* Sw. Una Visión General. *Revista Facultad de Farmacia*, 75(2), 1–13.
- Suárez, A., Taddei, A., Sojo, F., & Arvelo, F. (2014). Diterpenos bioactivos de *Croton malambo* H. Karst. *Revista Facultad de Farmacia*, 77(1 y 2), 8–15.

- Sun, H., Li, L., Zhang, A., Zhang, N., Haitao, L., Sun, W., & Wang, X. (2013). Protective effects of sweroside on human MG-63 cells and rat osteoblasts. *Elsevier*, 84(1), 174–179.
- Sun, R., Jiang, H., Zhang, W., Yang, K., Wang, C., Fan, L., Geng, Z. (2014). Cytotoxicity of aporphine, protoberberine, and protopine alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–6.
- Svenson, & Knute, H. (1946). *Croton rivinifolius* Kunth var. *macraei* Svenson. Retrieved January 19, 2018, from <http://tropicos.org/Name/12806946>
- Valverde, E. (2000). Extracción de materias primas vegetales. In Roberto Pinzón S. (Ed.), *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (primera edición, p. 247). Bogotá: Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo.
- Van Beek, T., Lankhorst, P., Verpoorte, R., & Svendsen, B. (1982). Isolation of the secoiridoid-glucoside sweroside from *Tabernaemontana psorocarpa*. *Planta Medica*, 44(1), 30–1.
- Velagapudi, R., Aderogba, M., & Olajide, O. (2014). Tiliroside, a dietary glycosidic flavonoid, inhibits TRAF-6/NF- κ B/p38-mediated neuroinflammation in activated BV2 microglia. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(12), 3311–3319.
- Vélez-Terranova, M., Campos, R., & Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489–499.
- Vicente-Herrero, M. T., Terradillos, M. J., Ramírez, M. V., Capdevila, L., López-González, Á., & Riera, K. (2013). Especies , hierbas medicinales y plantas. Usos en medicina. *Medicina Balear*, 28(2), 35–42.
- Warleta, F., Ruiz-Mora, J., Campos-Segura, M., Serrano, M. J., & Gaforio, J. (2010). El Escualeno, componente minoritario del aceite de oliva, y su relación con el cáncer. *1er Congreso de Cultura del Olivo*, 765–782.
- Willard, H., Merritt, L., Dean, J., & Settle, F. (1991). Técnicas De Separación Cromatográfica. *Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V*, 1–26.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., & Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Revista Universida Y Salud*, 17(1), 97–111.
- Zhong, M., Liu, Y., Liu, J., Di, D., Xu, M., Yang, Y., Liu, J. (2014). Isocorydine derivatives and their anticancer activities. *Molecules*, 19(8), 12099–12115.

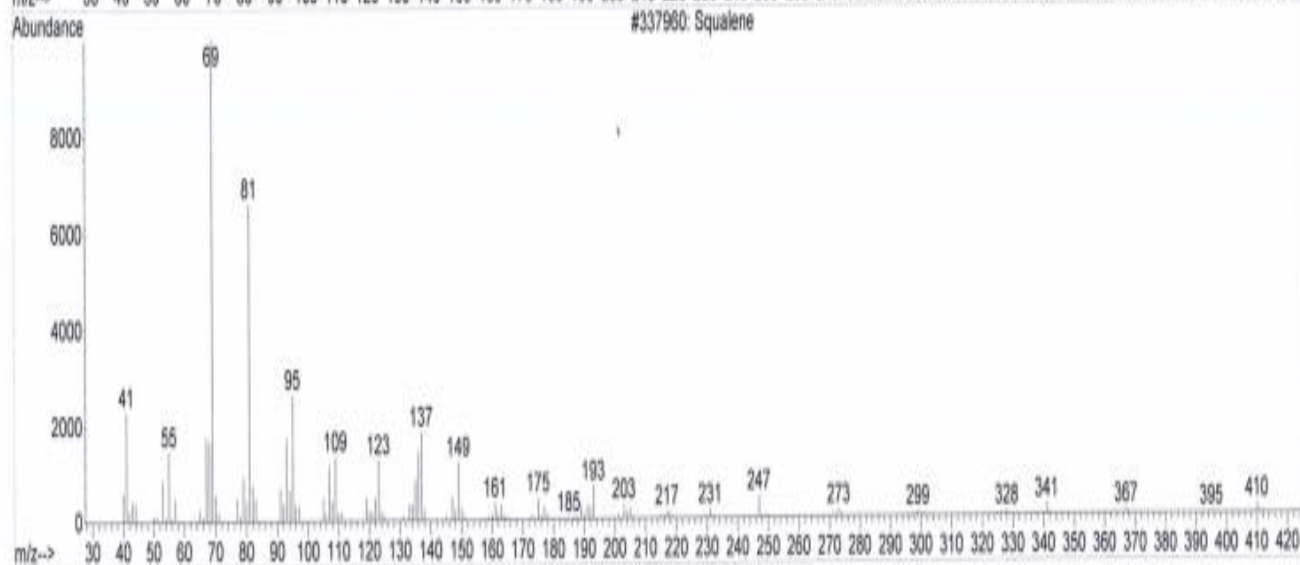
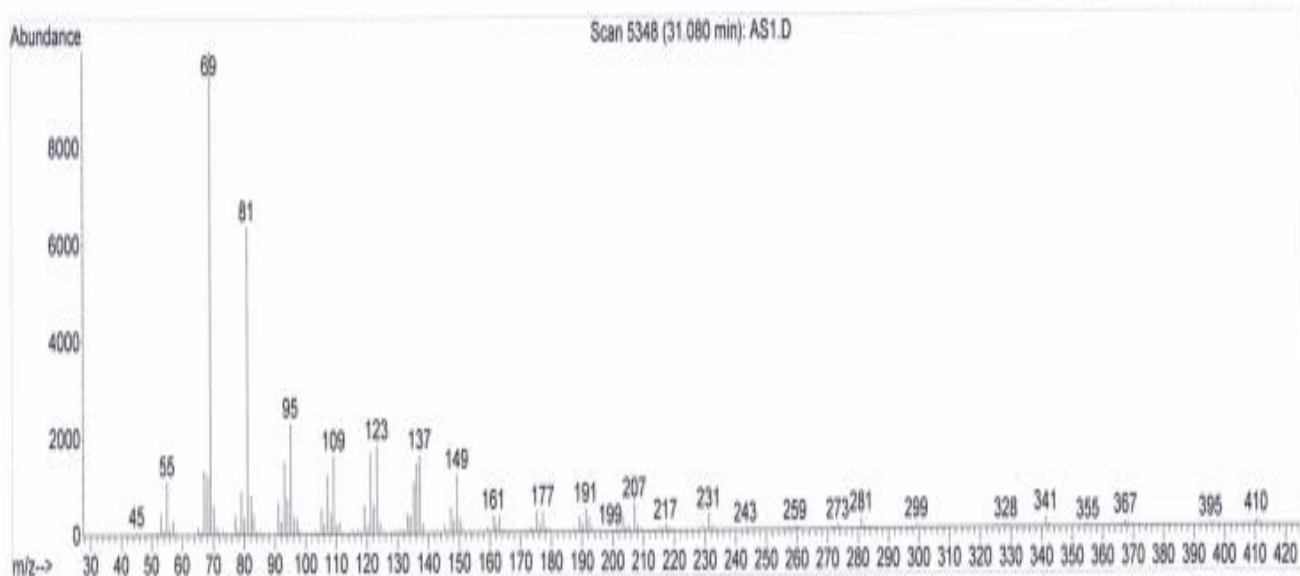
ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas de CG-EM del Escualeno

Library Searched : C:\DATABASE\wiley7n.l

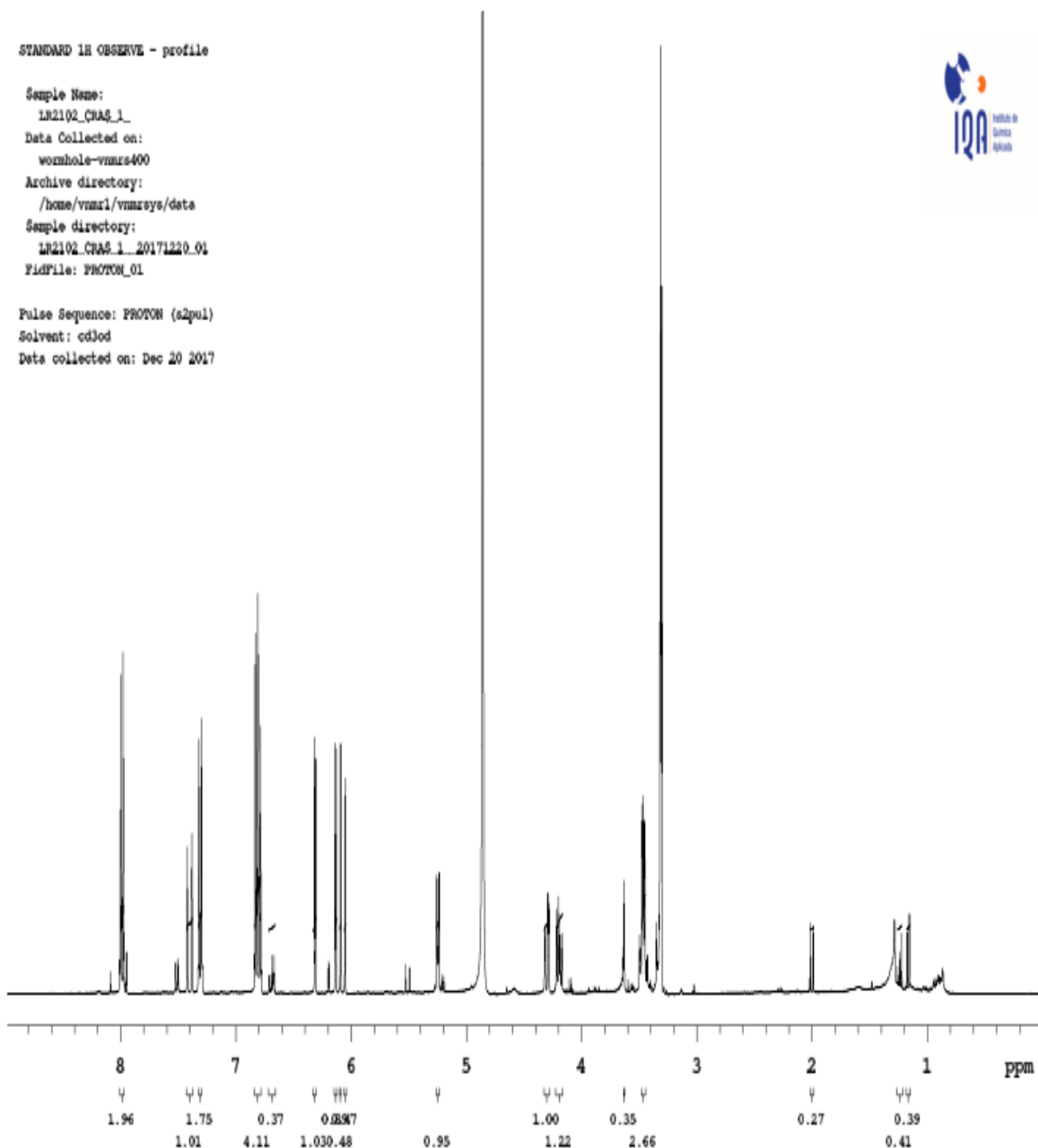
Quality : 96

ID : Squalene



Anexo 2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del Tilirosideo

1. Espectro de ¹H RMN (400MHz, CD₃OD) del Tilirosideo

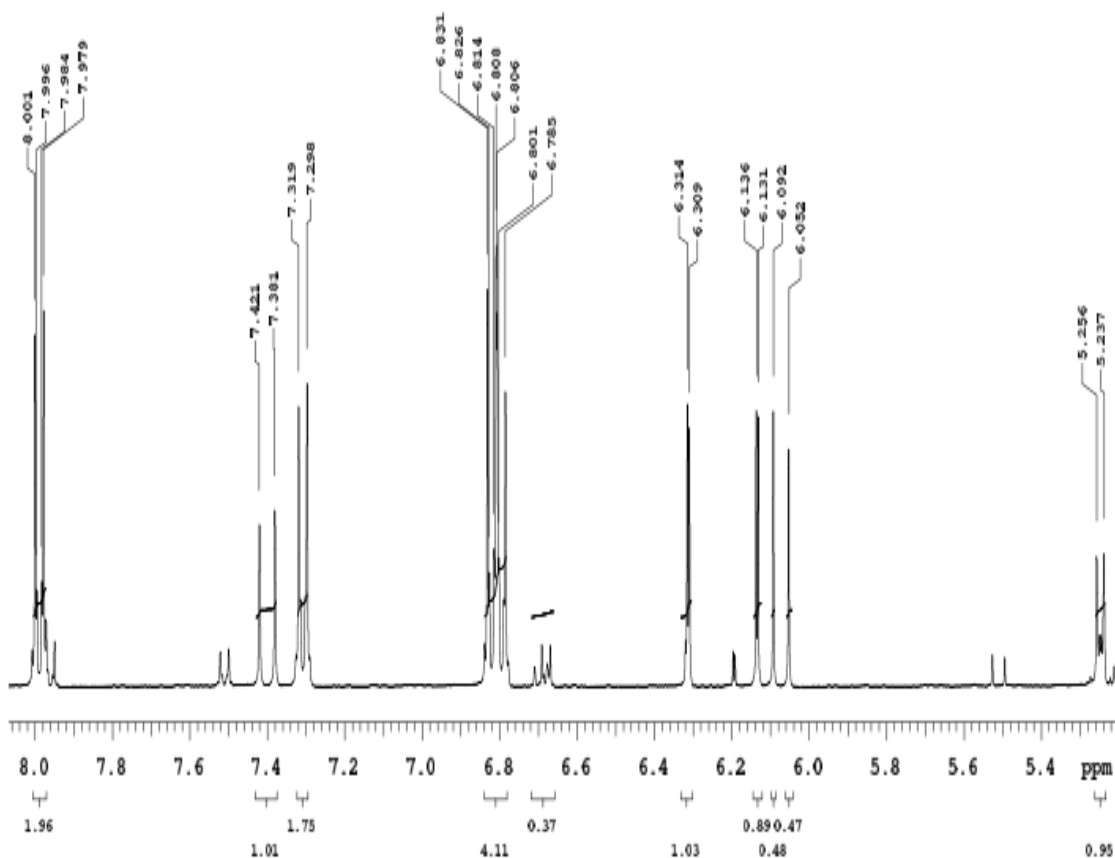


2. Espectro ampliado de ^1H RMN (400MHz, CD_3OD) del Tilirosido

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2102_CRA2_1
Data Collected on:
wormhole-vnmz400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR2102_CRA2_1_20171220_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 20 2017

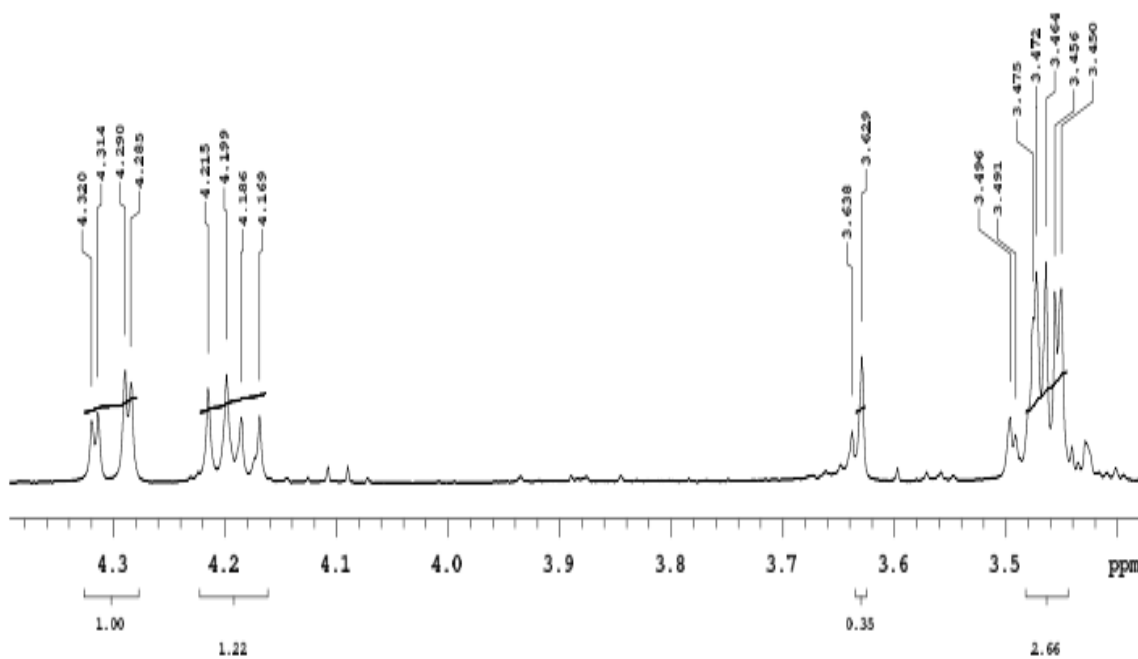


3. Espectro amplificado de ^1H RMN (400MHz, CD_3OD) del Tilirosido

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2102_CHA8_1_
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrkeys/data
Sample directory:
LR2102_CHA8_1_20171220_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 20 2017



4. Espectro de ^{13}C RMN (100MHz, CD_3OD) del Tiliroside

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:

LR2135_CMAS_1_

Data Collected on:

wormhole-vnmrs-400

Archive directory:

/home/vnmr1/vnmrsys/data

Sample directory:

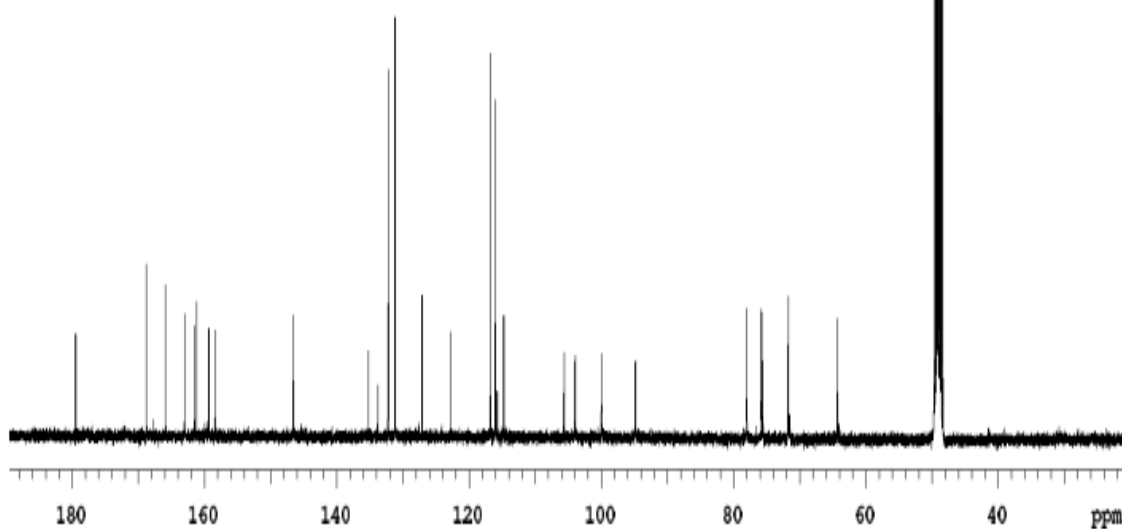
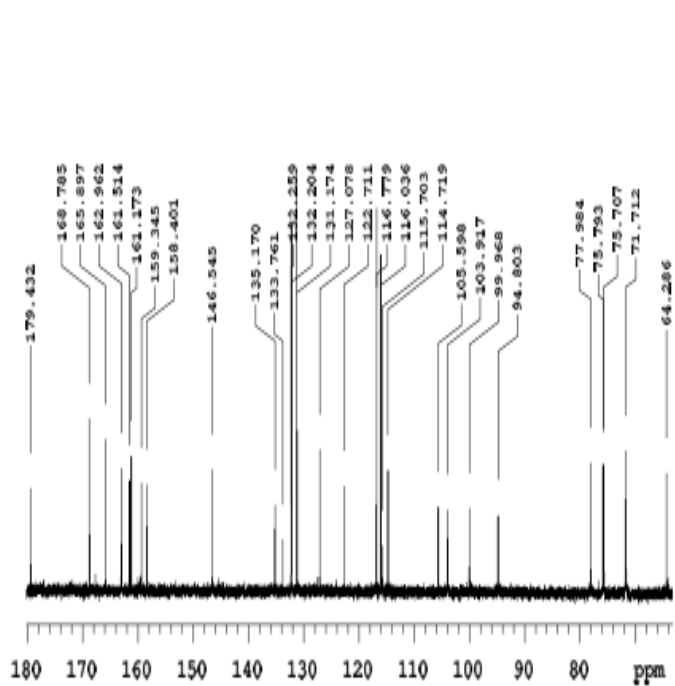
LR2135_CMAS_1_20190104.01

FidFile: CARBON_01

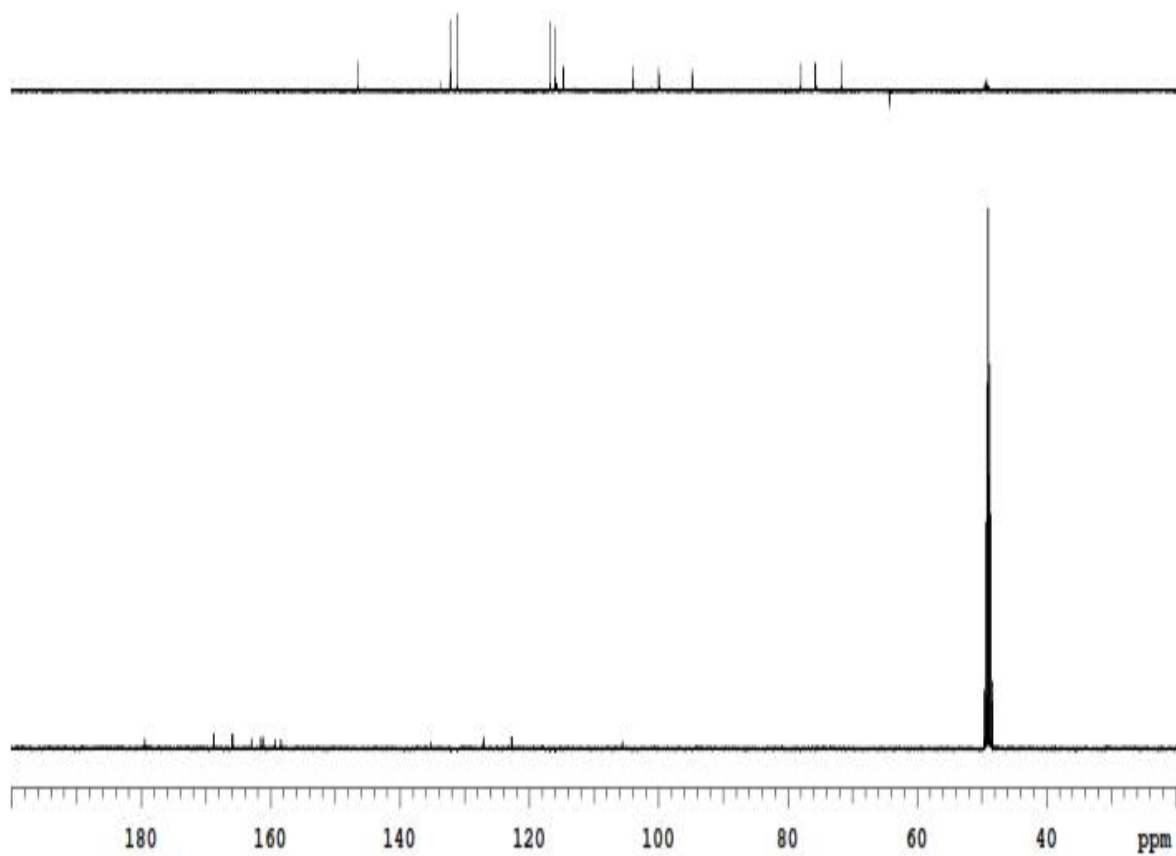
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)

Solvent: cd3od

Data collected on: Jan 4 2018

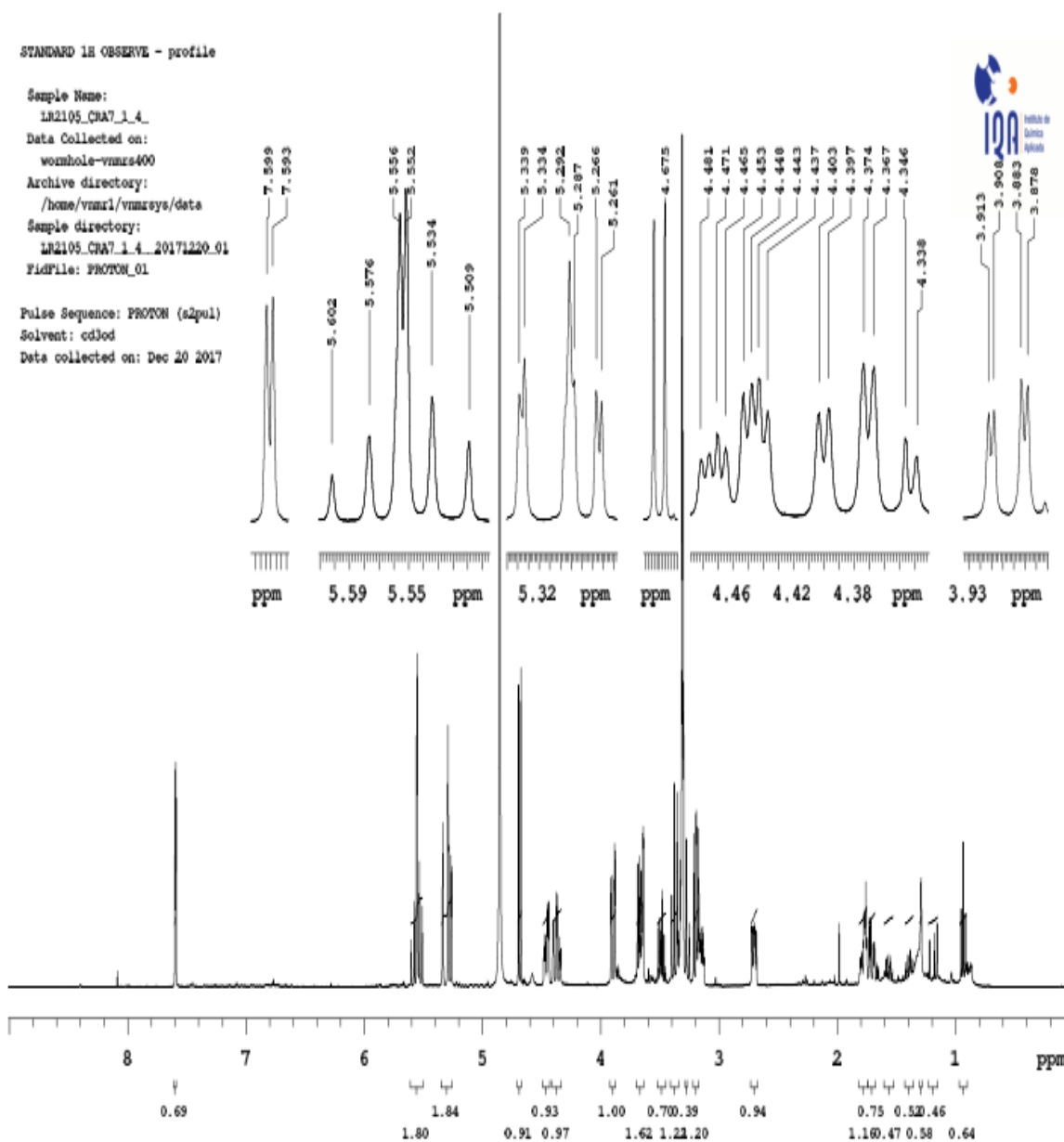


5. Espectro DEPT 135 (100MHz, CD₃OD) del Tilirosido



Anexo 3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del Swerosido

1. Espectro de ¹H RMN (400MHz, CD₃OD) del Swerosido

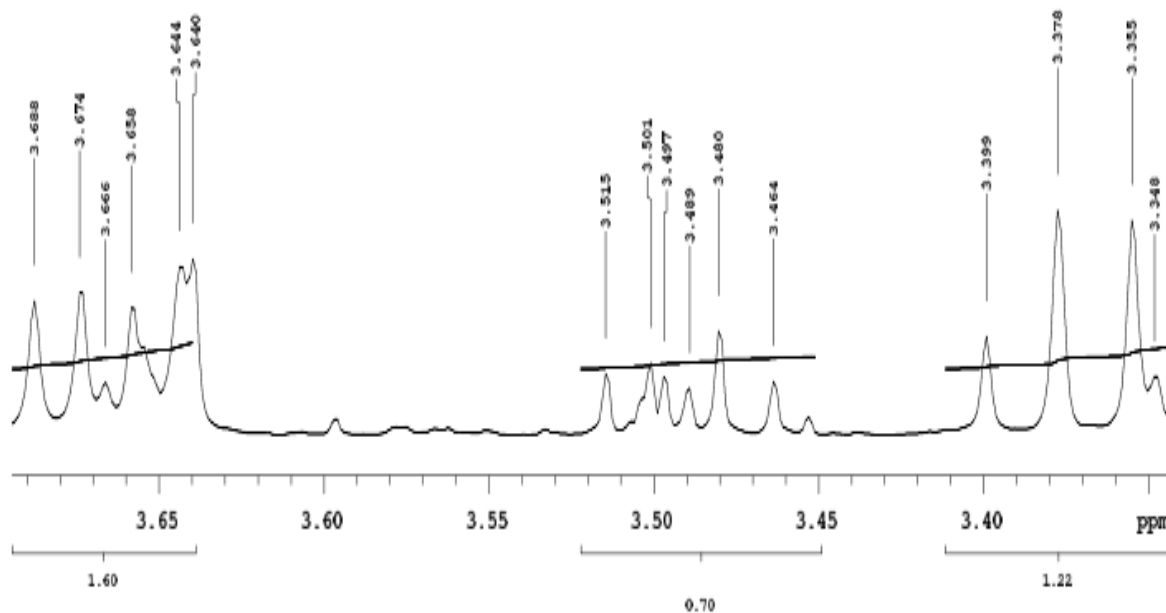


2. Espectro amplificado de ^1H RMN (400MHz, CD_3OD) del Swerosido

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2105_CPA7_1_4
Data Collected on:
wormhole-vmr400
Archive directory:
/home/vmr1/vmrays/data
Sample directory:
LR2105_CPA7_1_4_20171220_01
FidFile: PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 20 2017



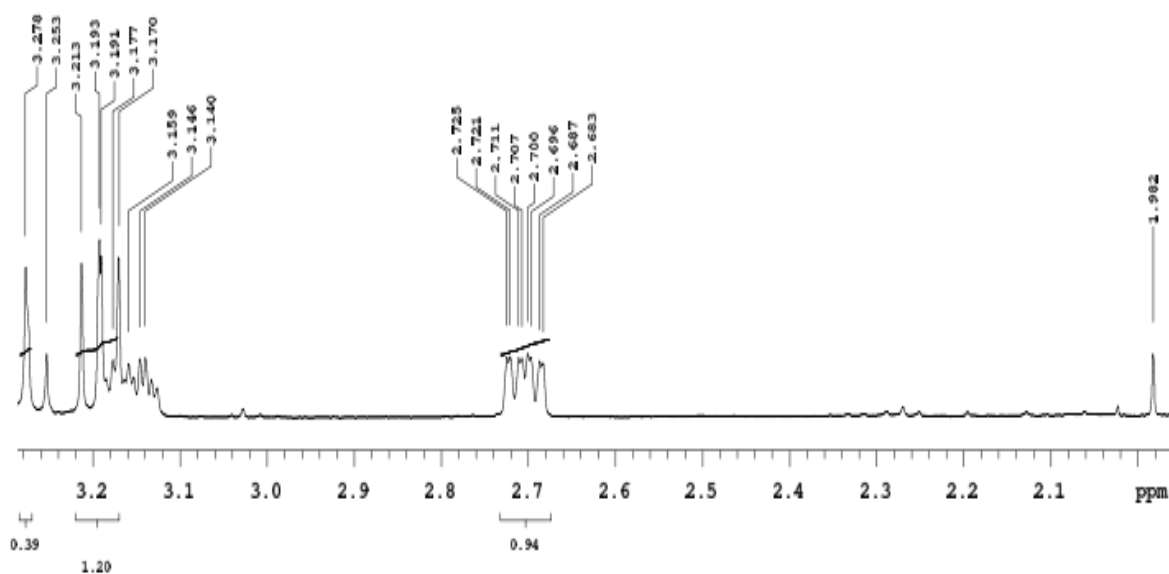
3. Espectro amplificado de ^1H RMN (400MHz, CD_3OD) del Swerosido

STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2105_CNA7_1_4_
Data Collected on:
wormhole-vmr400
Archive directory:
/home/vmr1/vmrays/data
Sample directory:
LR2105_CNA7_1_4_20171220_01
FidFile: PROTON_01



Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 20 2017

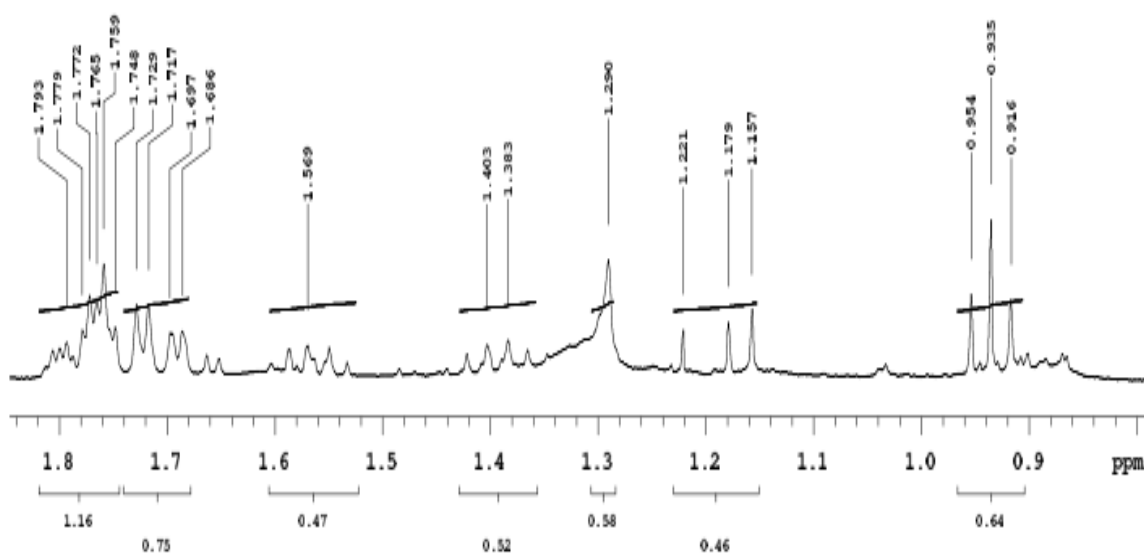


4. Espectro amplificado de ^1H RMN (400MHz, CD_3OD) del Swerosido

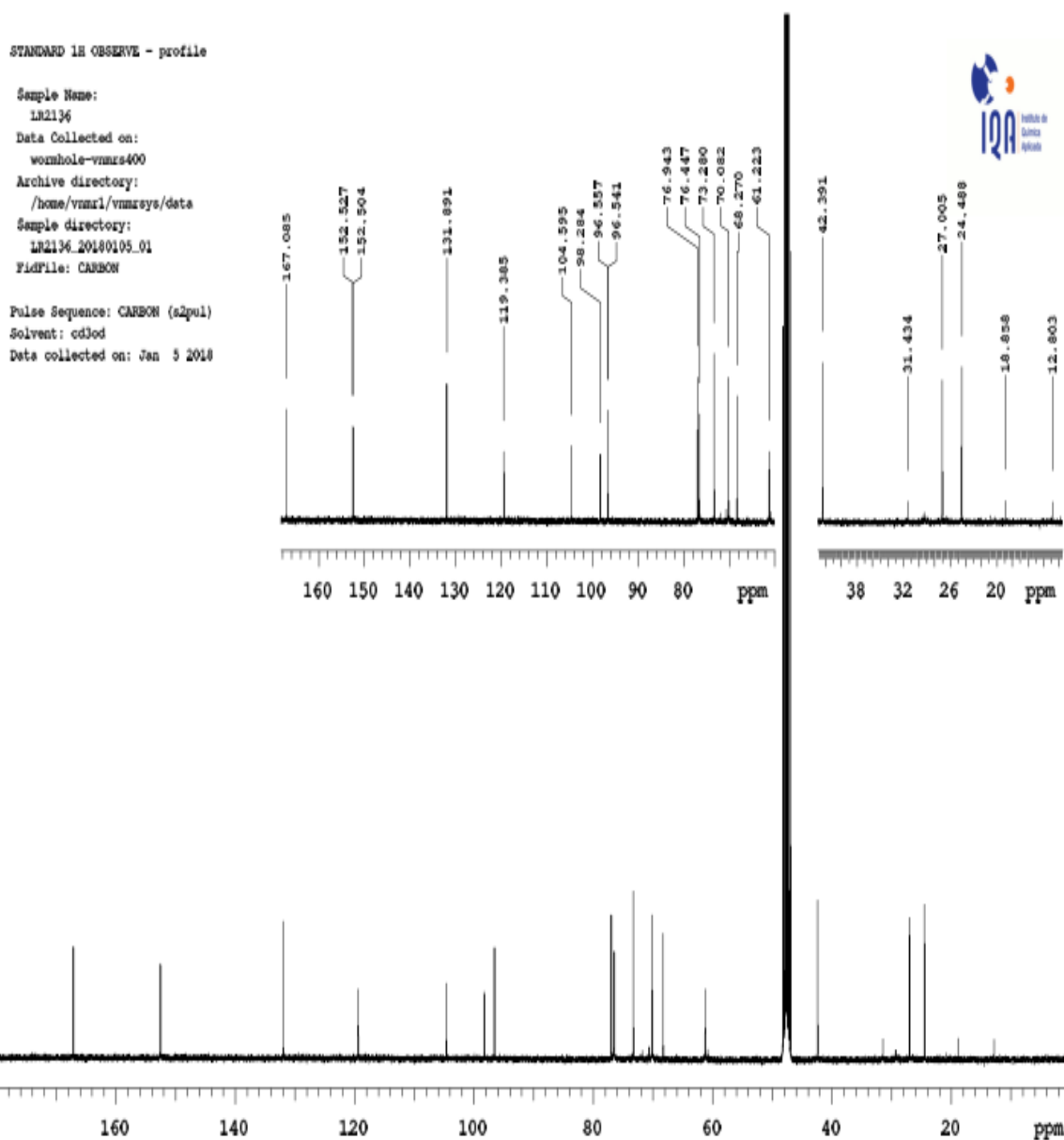
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2105_CRA7_1_4_
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR2105_CRA7_1_4_20171220_01
FidFile: PROTON_01

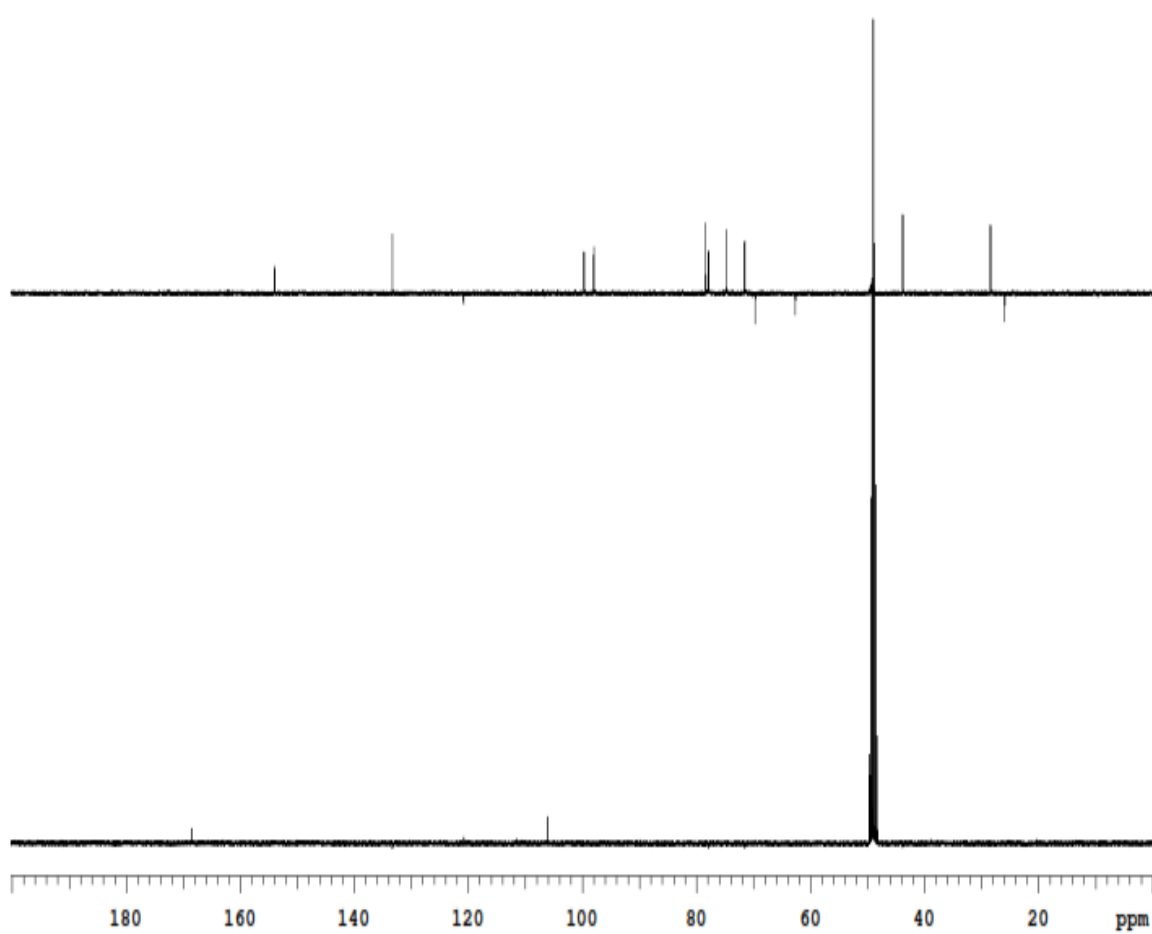
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cd3od
Data collected on: Dec 20 2017



5. Espectro de ^{13}C RMN (100MHz, CD_3OD) del Swerosido



6. Espectro DEPT 135 (100MHz, CD₃OD) del Swerosido



7. Espectro de HMQC del Swerosido

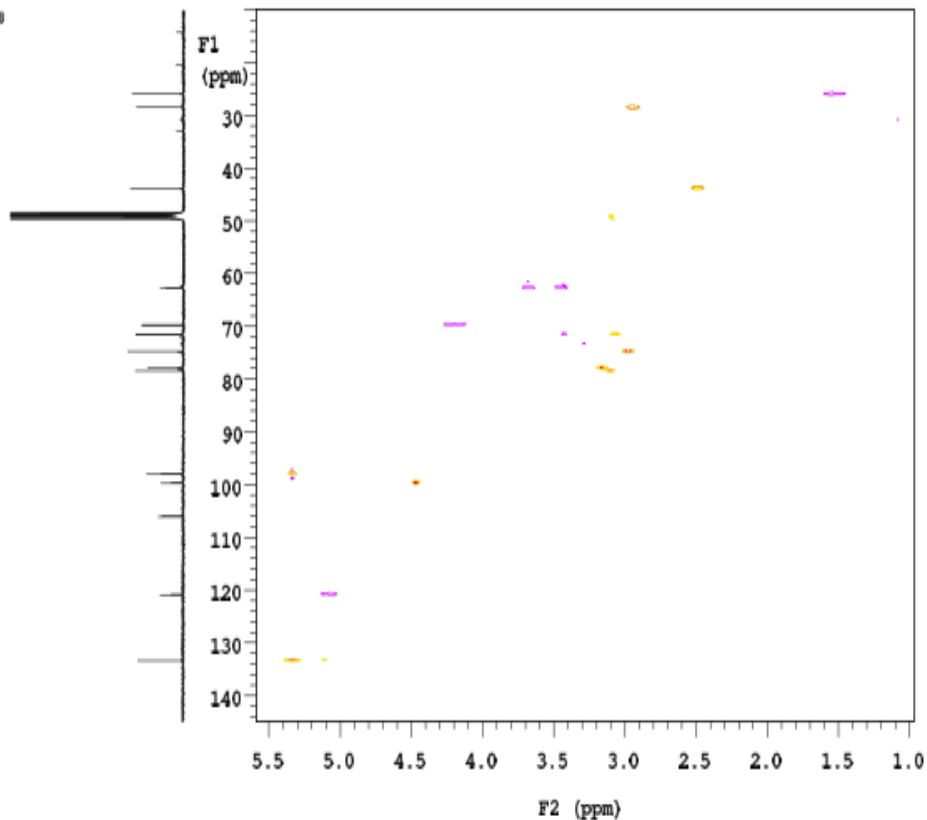
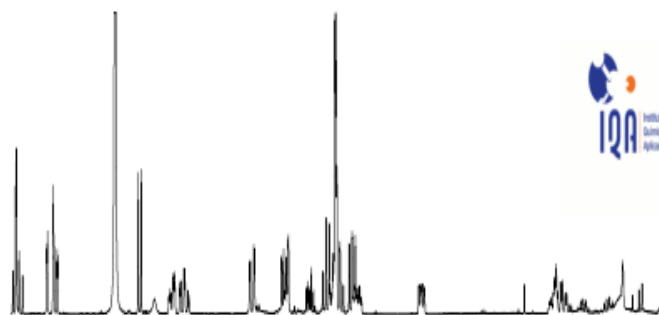
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LR2136
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR2136_20180105_01
FidFile: gHSQC_01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: cd3od
Data collected on: Jan 6 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6410.3 Hz
2D Width 17090.4 Hz
16 repetitions
2 x 512 increments
OBSERVE H1, 399.8278611 MHz
DECOUPLE C13, 100.5443165 MHz
Power 36 dB
on during acquisition
off during delay
W40_ONEPROBE modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.069 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.028 sec
F1 size 2048 x 4096
Total time 5 hr, 28 min



8. Espectro de HMBC del Swerosido

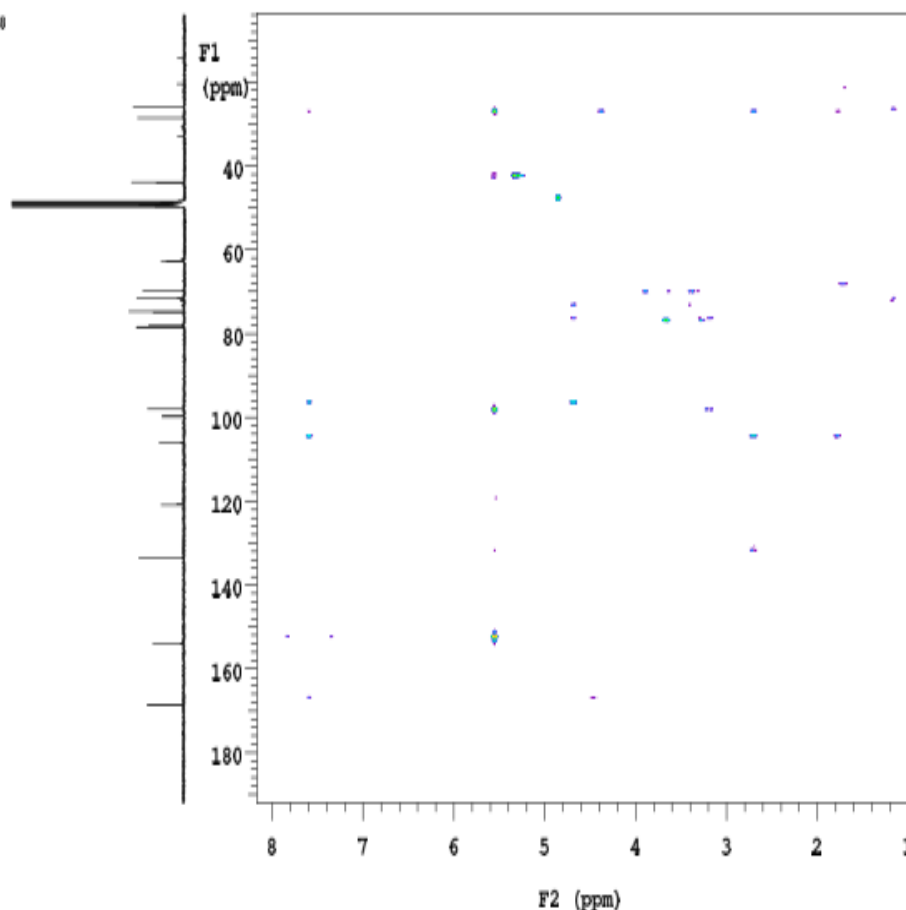
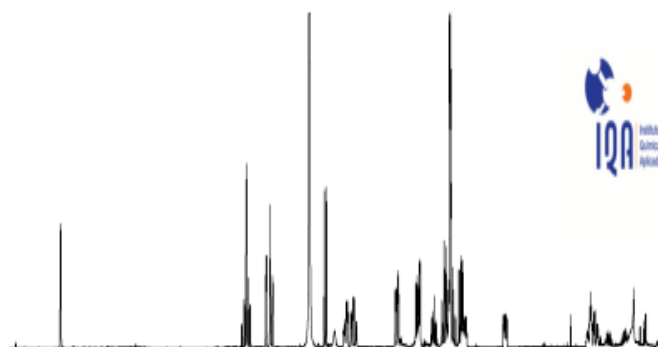
STANDARD 1H OBSERVE - profile

Sample Name:
LN2136
Data Collected on:
wormhole-vmrs400
Archive directory:
/home/vmri/vmrays/data
Sample directory:
LN2136_20180105_01
FidFile: gHMC_01

Pulse Sequence: gHMC
Solvent: cd3od
Data collected on: Jan 6 2018

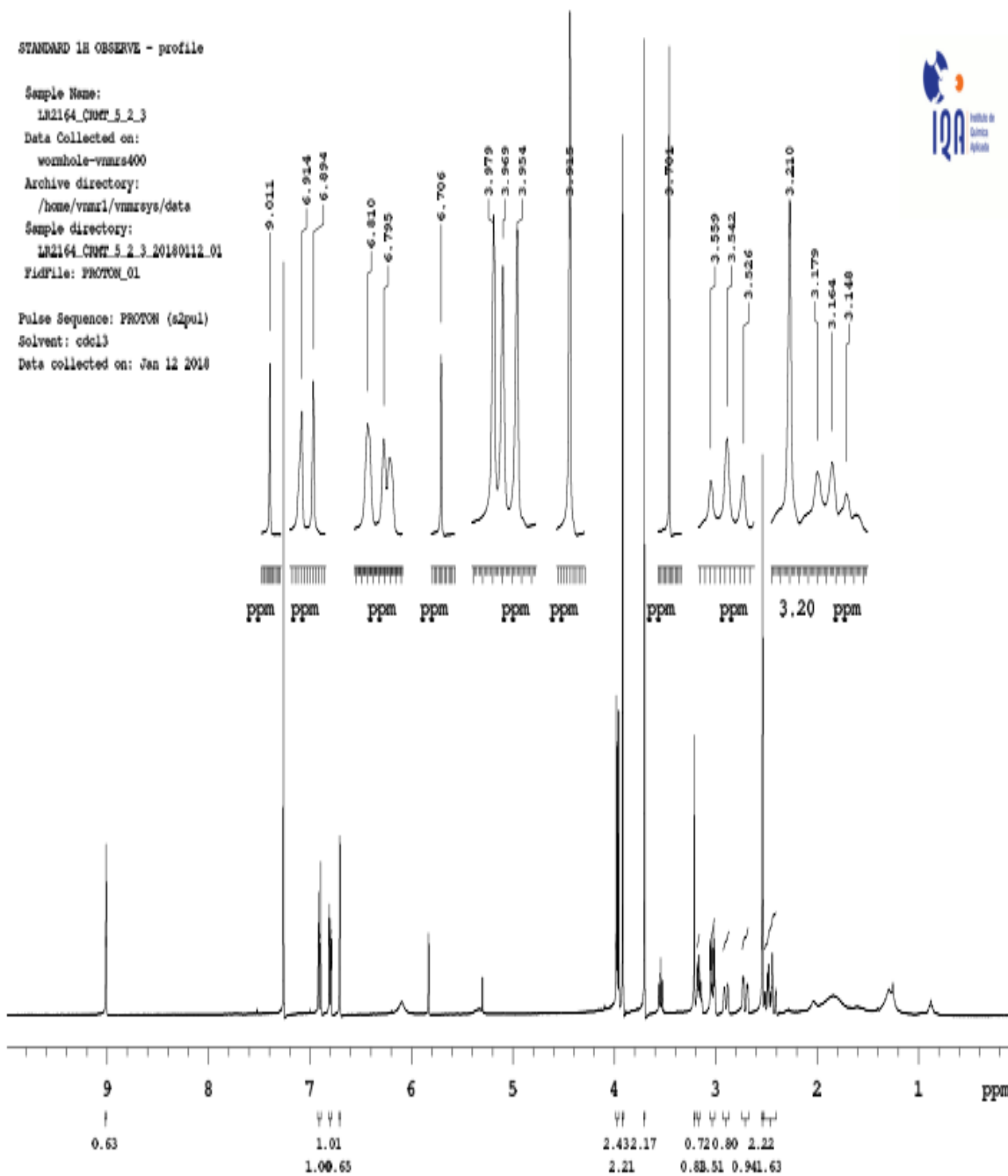
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vmri

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6410.3 Hz
2D Width 24125.5 Hz
16 repetitions
2 x 512 increments
OBSERVE H1, 399.827763 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.020 sec
FT size 2048 x 4096
Total time 5 hr, 39 min

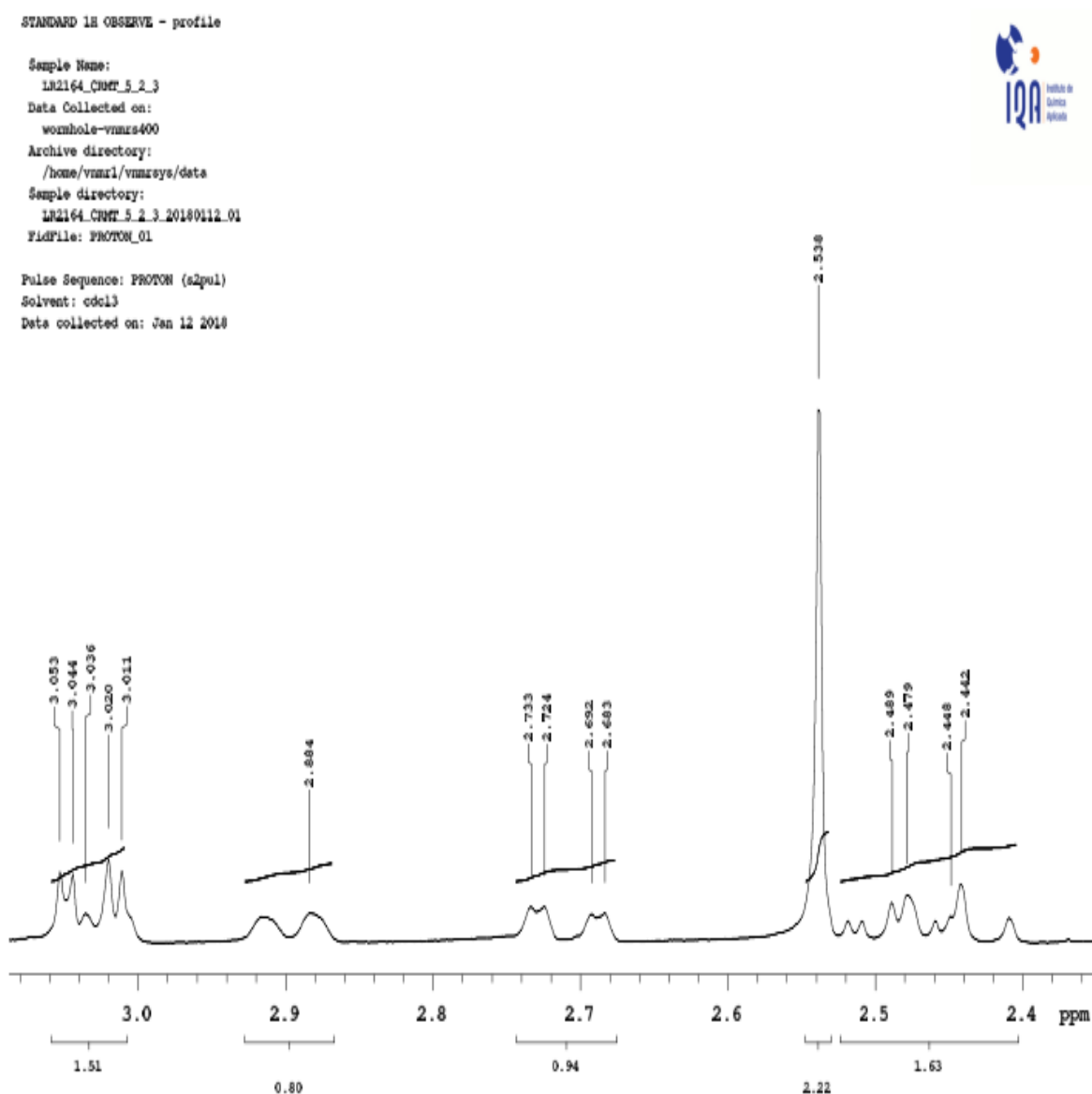


Anexo 4. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear del *Isocorydine*

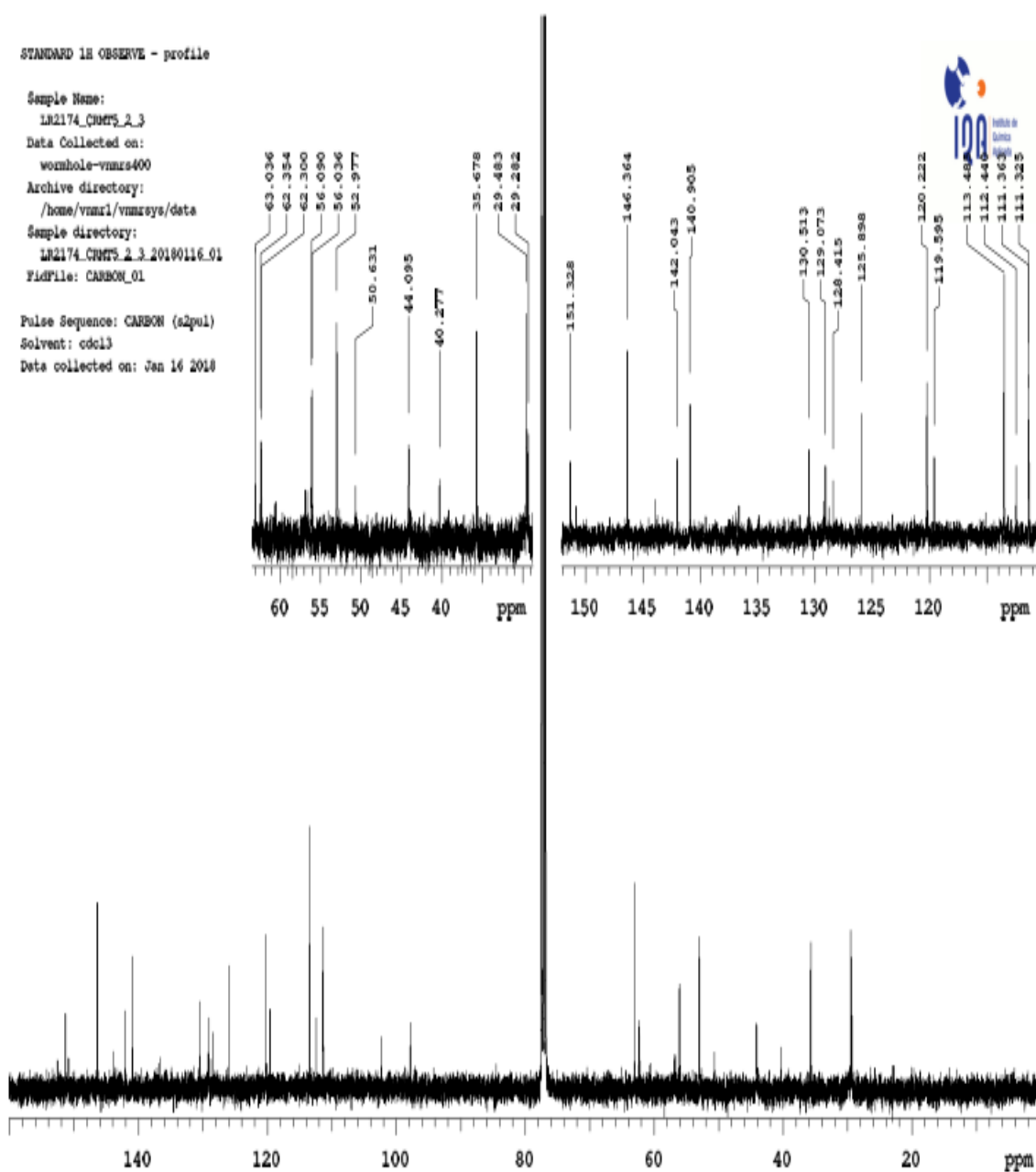
1. Espectro de ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) del *Isocorydine*



2. Espectro amplificado de ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) del Isocorydine



3. Espectro de ^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3) del Isocorydine



4. Espectro DEPT 135 (100MHz, CDCl3) del Isocorydine

