

I. INTRODUCCIÓN

Las sustancias químicas presentes en plantas han sido y son una fuente importante de medicamentos y de productos usados en la agricultura. Innumerables productos naturales están aún por ser descubiertos; entre ellos compuestos con estructuras moleculares que no pueden ser predichas a partir de los conocimientos actuales acerca de compuestos bioactivos, por ejemplo el *taxol* un conocido agente antitumoral extraído de un árbol del noroeste de los Estados Unidos, el tejo (*Taxus baccata*)^[1].

Hoy en día afortunadamente se conocen sustancias con propiedades medicinales por su fórmula química y también puede explicarse la mayor parte de sus acciones en el cuerpo humano. Son comúnmente llamados metabolitos secundarios, los cuales consisten en una gran variedad de compuestos químicamente diferentes que solo se producen en pequeñas cantidades en las plantas y suelen tener efectos farmacológicos sobre el hombre^[2].

Las plantas medicinales constituyen la terapia más antigua del mundo. Numerosos medicamentos modernos son obtenidos directamente de los extractos de plantas o de sus principios activos. A nivel mundial, más de 20.000 especies de plantas diferentes son plantas medicinales. El uso terapéutico de las hierbas data de una larga tradición de la medicina popular. La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor del 80% de la población mundial de los países en desarrollo basan sus medicamentos en plantas medicinales para las necesidades de atención primaria de salud^[3].

Un ejemplo importante de plantas medicinales son las especies de la familia Euphorbiaceae, a las que se les ha atribuido desde la antigüedad efectos curativos. Muchas son bien conocidas en diferentes partes del mundo como tóxicas y / o medicinales. La gran diversidad de aplicaciones es un reflejo de la alta diversidad química de esta familia ^[3].

I.1 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las familias más diversas entre las angiospermas. La constituyen 5 subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies, distribuidas en todo el mundo principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, aunque varios representantes se extienden a las zonas templadas de ambos hemisferios ^[4]. La familia es sumamente importante ya que muchos de sus plantas se cultivan para su uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental ^[5].

Las *Euphorbiaceae* forman una gran familia tropical con especies leñosas como árboles, arbustos, lianas, plantas suculentas, cactiformes, y especies herbáceas. El aspecto vegetativo de la familia es muy variable, con muchos canales laticíferos, presenta hojas helicoidales u opuestas. Las flores son siempre unisexuales, bastante reducidas y reunidas en una particular inflorescencia, el ciatio, que parece una única flor bisexual circundada por 2 brácteas basales. Los ciatios están además comprimidos en el interior de unas inflorescencias compuestas de tipo espiga, umbela o glomérulo. Las flores masculinas, sin perianto, están reducidas prácticamente a un único estambre; las flores femeninas están, en cambio, formadas por 3 carpelos que constituyen un ovario súpero trilocular, con estilos libres y profundamente bífidos (en total en número de 6) ^[6]. Contiene numerosas malezas, y también plantas medicinales y útiles; por

ejemplo, el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), el camote o cassava (*Manihot esculenta*), la sabrosa chaya (*Cnidoscolus chayamansa*), el ricino (*Ricinus communis*) y el croton (*Codiaeum variegatum*)^[7].

Las plantas de esta familia contienen un látex que segrega cuando son cortadas, el látex contiene sustancias de diversa naturaleza que pueden tener aplicación práctica y gránulos de almidón de forma característica que se presentan como bastoncillos alargados con los extremos inflados. El látex de las Euphorbiaceae contiene hasta un 30% de terpenos entre los cuales se han identificado más de 55 triterpenos e hidrocarburos de cadena larga^[8].



Figura 1. *Croton eleuteria*

I.1.1 Clasificación

La familia Euphorbiaceae es la sexta familia mas diversa entre las angiospermas después de las Orchidaceae, Compositae, Leguminosae, Gramineae, y Rubiaceae ^[4]. Presenta cinco subfamilias, las cuales son:

- Phyllanthoideae
- Oldfieldioideae
- Acalyphoideae
- Crotonoideae
- Euphorbioideae

Las dos primeras subfamilias presentan dos óvulos por lóculo (condición plesiomórfica) mientras que las tres ultimas solo tienen un ovulo (condición apomórfica) ^[4].

La subfamilia Phyllanthoideae presenta 10 tribus y 60 géneros, tiene 2110 especies que se distribuyen en las zonas tropicales, el mayor dentro de diversificación de los géneros se encuentra en África ya que el 55% de los mismos se encuentran en este continente. La subfamilia Oldfieldioideae es la mas pequeña con 4 tribus, 28 géneros y 100 especies, el centro de mayor diversificación se encuentra en Australia donde existe el 46,42% de los géneros. La subfamilia Acalyphoideae tiene 20 tribus, 116 géneros y 2584 especies, siendo la subfamilia más diversa, el centro con mayor diversidad se encuentra en Asia donde se localiza el 44.82% de las especies. La subfamilia considerada con mayor numero de caracteres apomorficos es la Euphorbioideae, la cual tiene 5 tribus, 46 géneros y 1810 especies, el mayor centro de diversificación se encuentran en el nuevo mundo donde están el 52.17% ^[4].

La subfamilia Crotonoideae presenta 12 tribus, 67 géneros y 1436 especies con dos centros de diversificación importantes: uno en Asia con 34.32% de los géneros y otro en América que tiene el 32.8% de los mismos. La región con menos representantes de esta familia es Madagascar. Entre los géneros más diversos se encuentra *croton* con 1300 especies y *jatropha* con 175 especies, ambos distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo ^[4].

Las principales sustancias que contienen los ejemplares de esta familia son los terpenos, seguidos de los flavonoides y alcaloides. Sin embargo, también se ha registrado la presencia de otros metabolitos como son las cumarinas, glicosidos, cianogénicos y taninos ^[8].

1.2 Genero *croton*.

Es un género que comprende alrededor de 1300 especies de árboles, arbustos y hierbas distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios ^[3]. Tiene dos centros de diversidad: uno en América tropical y el otro en África ^[4]. En Venezuela se encuentran alrededor de 75 especies ^[10].

El género es rico en componentes con actividad biológica, principalmente diterpenoides tales como ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, kauranos, trachylobano, pimarano, etc. También es rico en alcaloides activos. Varias especies del género son aromáticas, lo que indica la presencia de componentes volátiles del petróleo. Como la mayoría de las euforbiáceas, las especies de *croton* puede contener látex, que es de color rojo en algunas especies, una característica usualmente asociada con propiedades medicinales. Este género

esta formado por hierbas y arbustos, con una resina roja o anaranjada: Hojas alternas o subopuestas, simples, cordadas y lobadas, enteras o acerradas, de base palmatinervada. Indumento grisáceo-amarillento de pelos estrellados y de escamas. Espigas frecuentemente terminales, las flores masculinas en la parte superior ^[9].

II. ANTECEDENTES

Química y farmacología de las especies *croton*

La química del género *croton* es considerablemente diversa. Los terpenos son los metabolitos secundarios predominantes en el género, principalmente diterpenos, que pueden ser de esqueleto tipo cembranoide, clerodano, neoclerodano, isopiranos, labdano, kaurano, secokaurano, forbol y trachylobano. Los triterpenos, ya sea pentacíclicos o esteroides, con frecuencia han sido reportados en especies del género *croton*. Sus aceites volátiles contienen principalmente mono y sesquiterpenos. Varias especies han sido reportadas como fuentes de diferentes clases de alcaloides, lo que mejora considerablemente la importancia del género desde el punto de vista medicinal. Sustancias fenólicas con frecuencia se han reportado, entre los cuales predominan los flavonoides, proantocianidinas y lignanos ^[3].

A continuación se presenta una revisión a la literatura en relación a algunas especies del género.

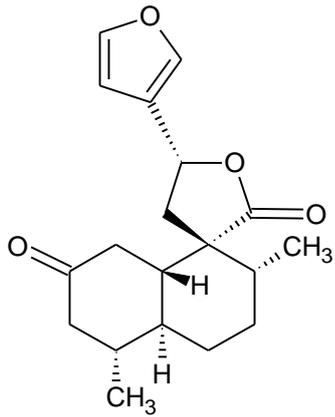
II.1 *Croton cajucara*

Conocida popularmente en Brasil como “sacaca”, es cultivada en la región amazónica de dicho país. Es una planta de la medicina tradicional, las hojas y la corteza de los tallos son usados en forma de te o píldoras para el tratamiento de diabetes, niveles altos de colesterol en la sangre y trastornos gastrointestinales, también para desordenes hepáticos y obesidad. De la corteza del árbol han sido aislados diterpenos tipo clerodanos como la trans- crotonina (1) ^[11], trans-dehidrocrototonina (2) ^[3,11], trans-cajucarín A (3) ^[11], cis-cajucarín B (4) ^[11], trans-cajucarín B (5) ^[11], cajucarínolido (6) ^[3,11], isocajurínolido (7) ^[11] y sacarín (8) ^[3,11], los dos primeros fueron obtenidos de las partes aéreas del árbol. El aceite de *C. cajucara* contiene sesquiterpenos y se conoce que es rico en el monoterpeno linalool ^[3].

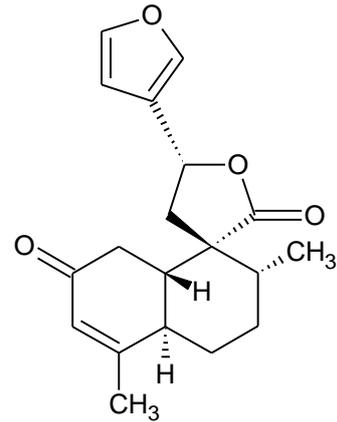
También ha sido reportado el ácido acetil aleuritólico (9) ^[3,11]. De acuerdo al uso de la planta en la medicina popular investigaciones fitoquímicas revelaron que el clerodano trans-dihidrocrotónina posee notables propiedades farmacológicas como, antiinflamatorias, antiestrogénico, antígenotóxico y acción gastroprotectora, también se registraron efectos hipoglucémicos, hipolipemiantes y antiaterogénico. El cajucarínolido posee actividad antiinflamatoria y la trans-crotonina mostró actividad antiinflamatoria, y gastroprotectora ^[11].

En adición los metabolitos N-metil tirosina (10), ácido vainillínico (11) y el ácido 4-hidroxidobenzoico (12) también han sido aislados ^[11]. Estos dos últimos ácidos han presentado remarcable actividad antioxidante en otras especies por lo que se le atribuye a la planta dicha propiedad, en apoyo a esta sugerencia los derivados del kaempferol han probado ser agentes antioxidantes y las hojas de la

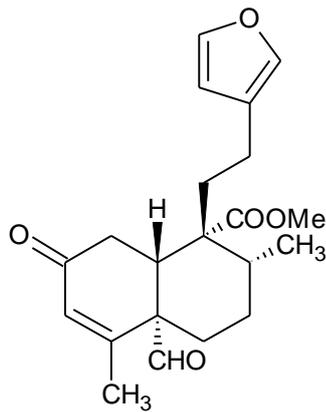
C. cajucara contiene dos de ellos, el kaempferol 3,4',7-trimetileter y el 3,7-dimetileter ^[3,11].



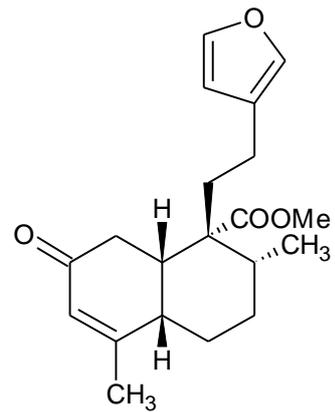
(1)



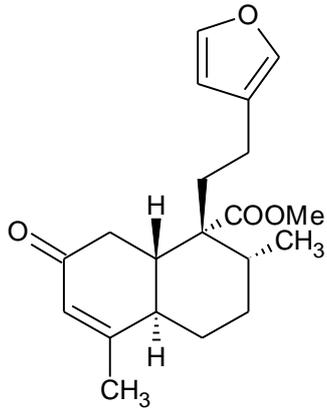
(2)



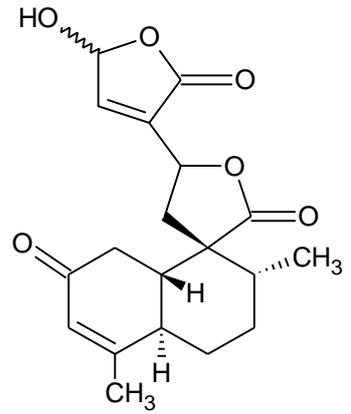
(3)



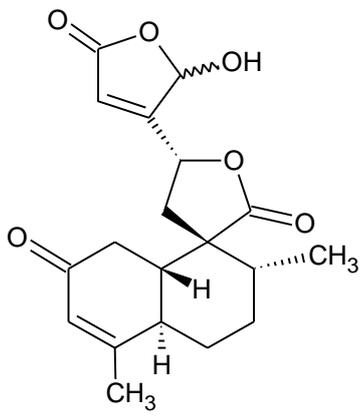
(4)



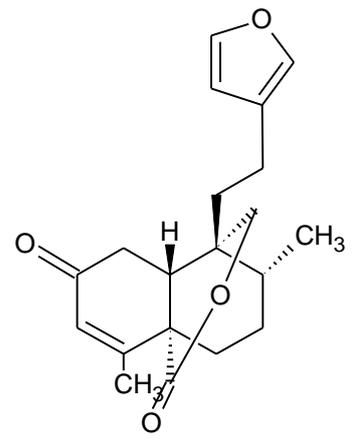
(5)



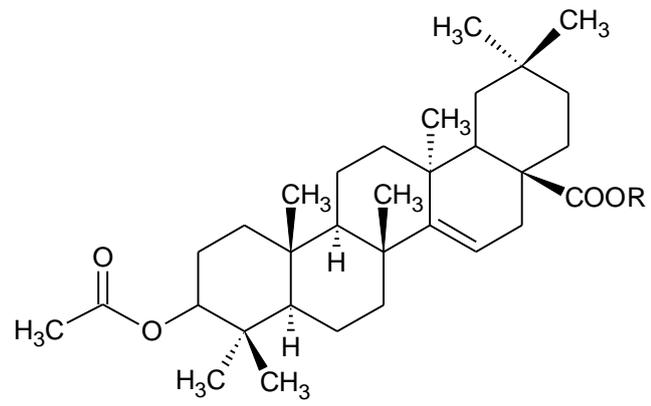
(6)



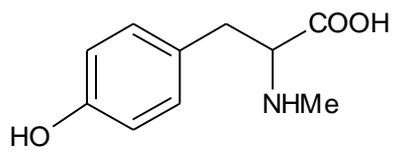
(7)



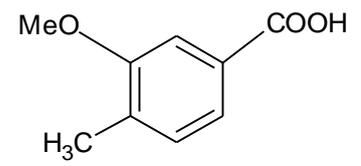
(8)



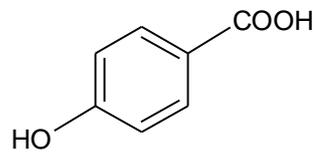
(9)



(10)



(11)

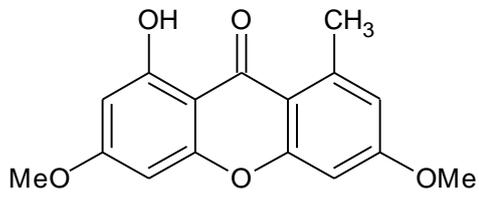


(12)

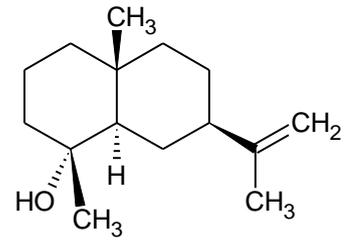
II.2 *Croton cuneatus*.

Conocida popularmente en Venezuela como “arapurina, caferana o manteco de agua”, es una planta medicinal usada por los nativos de la región amazónica para tratar inflamaciones, trastornos gastrointestinales y como analgésico ^[13], así como también para el reumatismo y la diabetes ^[13]. En el aceite esencial de las hojas de *C. cuneatus* se han identificado 43 compuestos, sus principales constituyentes son α -11-eudesmeno, metileugenol, metiliseugenol, 4- α -seleniol, cedril-propil eter, t-cadinol, elemicina, cubenol y α -cipereno ^[3,12,13]. El análisis fitoquímico de los extractos de las hojas y cortezas indicó la presencia de lichexantona (13), selin-11-en-4 α -ol (14), julocrotonina (15), julocrotol (16), isojulocrotol (17) y julocrotona (18) ^[3].

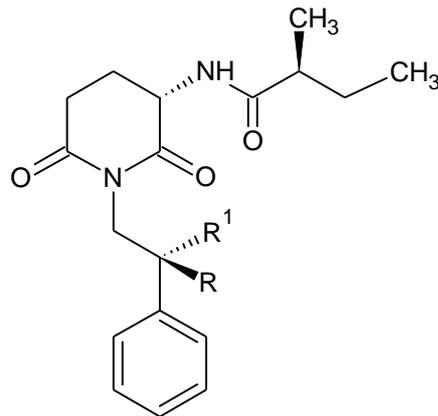
La actividad antiinflamatoria, fue estudiada con el extracto acuoso de las partes aéreas de esta planta ^[12]. Se estudiaron las propiedades hipoglicémicas y antidiabéticas de el extracto acuoso de la planta, demostrándose una significativa actividad anti-hiperglicémica en ratas cuya diabetes fue inducida con streptozotocina (STZ), en la que se exhibió la acción en tratamientos agudos y crónicos. La dosis baja del extracto utilizado 6,5 mg y la duración del tratamiento fueron suficientes para normalizar los niveles de glucosa en sangre en los animales diabéticos. La eficacia del extracto de *C. cuneatus* fue comparable con los resultados obtenidos con glibenclamida, que fue el medicamento que se uso como referencia en el estudio. Los resultados del estudio revelaron el potencial del extracto acuoso de *C.cuneatus*, en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino-dependiente ^[13].



(13)



(14)

(15) $R=R^1=H$ (16) $R=H, R^1=OH$ (17) $R=OH, R^1=H$ (18) $R=R^1=O$

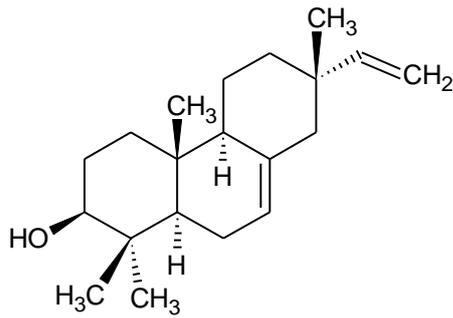
II.3 *Croton zambesicus*.

Es un árbol ornamental que crece en villas y pueblos en Nigeria. Es una especie Guineo-Congolese ampliamente extendida en África tropical. Las hojas se utilizan en Benin como anti-hipertensivo y antimicrobiano, y en algunas partes de Nigeria como remedio contra la diabetes y la malaria. Las raíces se utilizan contra el paludismo y como antidiabético en la región del delta de Nigeria, también en Sudán para el dolor menstrual y como laxante. Se ha estudiado la composición de los aceites esenciales de las hojas, tallos y raíces de *C. zambesicus* encontrándose tres tipos de aceites similares en su composición, los de las hojas y el tallo ricos en monoterpenos, mientras que los de la corteza de la raíz contiene sesquiterpenos. Los aceites de la raíz y de la corteza de los tallos son ricos en compuestos que contienen oxígeno, con espatulenol y linalool como principales componentes ^[14].

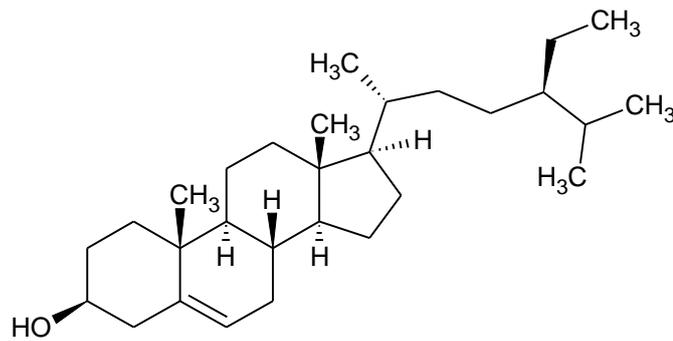
De esta planta se han aislado diterpenos que presentan actividad cytotoxica tales como, isopimara-7,15-dien-3 β -ol (19), transpitol, β -sitosterol (20), α -amirina (21) y stigmasterol (22), los cuales también han sido aislados de las hojas ^[14]. Su aceite esencial contiene sesquiterpenos (β -cariofileno, oxido de cariofileno y α -copaeno), monoterpenos (linalool y β -pineno) ^[3]. El labdano crotonadiol (23), fue aislado a partir de la corteza de los tallos, de la misma fuente fueron obtenidos los clerodanos crotoconylifurano y crotozambefurano A-C, junto al trachylobano (24), y los triterpenos, lupeol (25), β -sitosterol y su derivado 3- β -glucopiranosil ^[14].

Los estudios han reportado propiedades antimicrobianas en las hojas y tallos. Se ha encontrado que el extracto etanólico de las hojas posee actividad antiplasmodial, antidiabética, anti-inflamatoria, analgésica y antipirética. El extracto de la raíz de *C. zambesicus* posee actividad antimalárica que justifica su

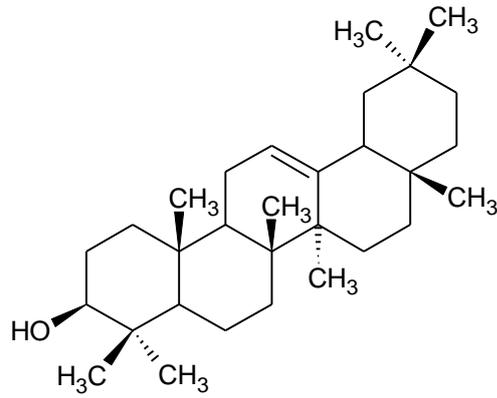
uso en la medicina tradicional [14]. Se ha demostrado la alta actividad como vasodilatador de algunos diterpenos trachylobanos presentes en la *C. zambesicus* [15].



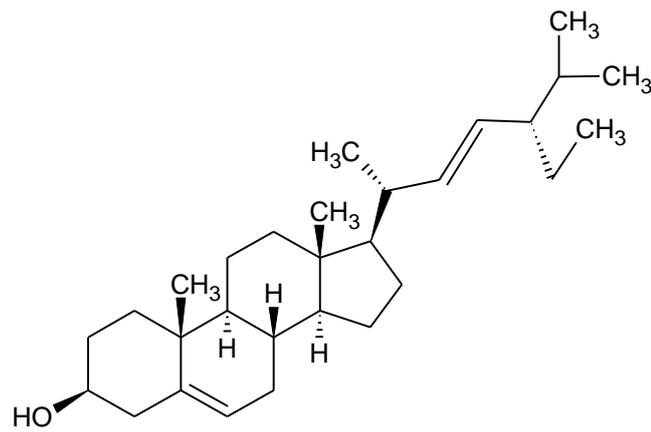
(19)



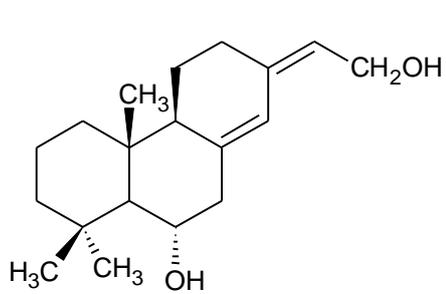
(20)



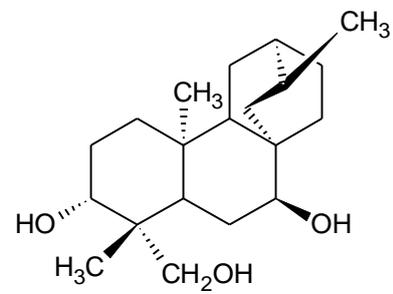
(21)



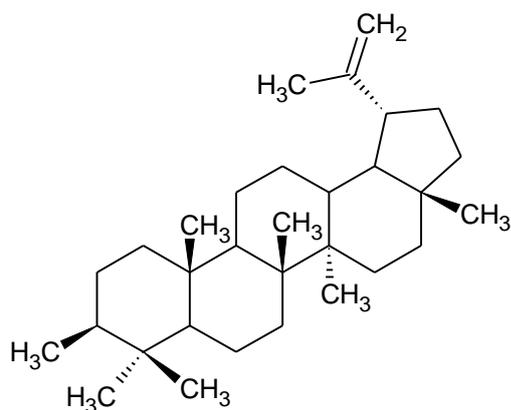
(22)



(23)



(24)



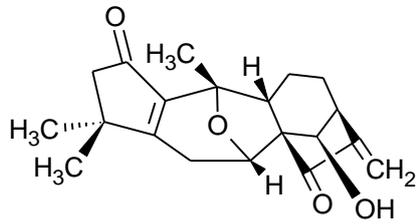
(25)

II.4 *Croton tonkinensis*.

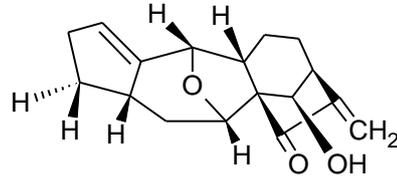
Es un arbusto nativo del norte de Vietnam, donde ha sido comúnmente utilizado para problemas del estómago, abscesos, impétigo, úlceras gástricas y duodenales, la malaria, la urticaria, la lepra, psoriasis y el prolapso de órganos genitales ^[16]. Es llamada popularmente “Kho sam Bac Bo” ^[3]. Los estudios han mostrado la presencia en las hojas de esta especie de esteroides y ent-kauranos ^[16]. Se conocen dos grayananos, los compuestos 26 y 27 ^[17], dos kauranos, los compuestos 28 y 29 ^[16]. Dentro de los ent-kauranos aislados se encuentran los compuestos 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39 ^[3,10]. Los compuestos 31 y 36 presentan la mayor actividad citotóxica contra las líneas de células tumorales estudiadas. Los diterpenos 30, 31, 33, 35, 36 y 38 tienen potencial para ser antiagregantes, anti-inflamatorios y para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ^[16].

También han sido aislados de las hojas de la planta fitoesteroles de cadena alquílica larga y flavonoides glicosilados, la vitexina (40) y la isovitexina (41) como

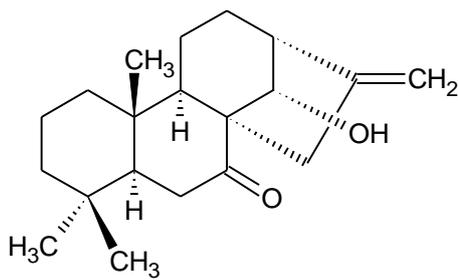
constituyentes del extracto de metanol, junto a ellos un constituyente en menor proporción el tilirosido (42), se reporto que contribuyen a las propiedades medicinales de la planta por sus actividades antioxidantes y antiinflamatorios, aunque en menor proporción que los ent-kauranos constituyentes de esta planta [18].



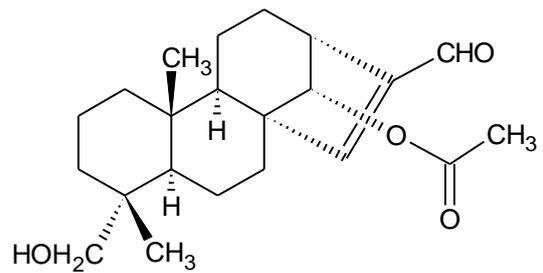
(26)



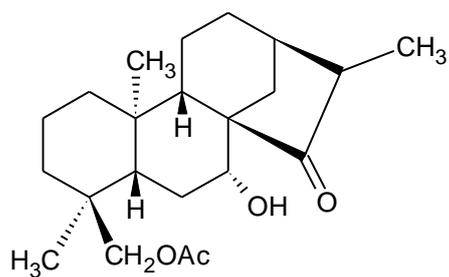
(27)



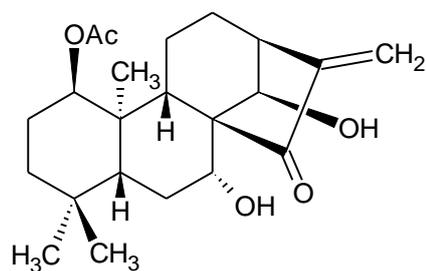
(28)



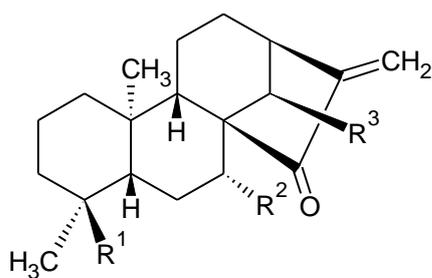
(29)



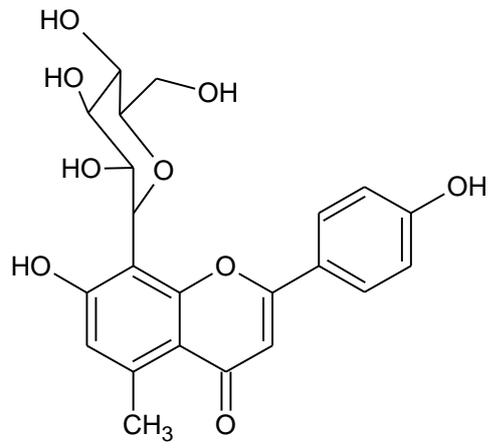
(32)



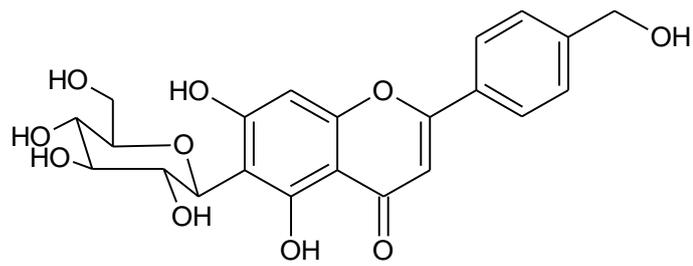
(35)



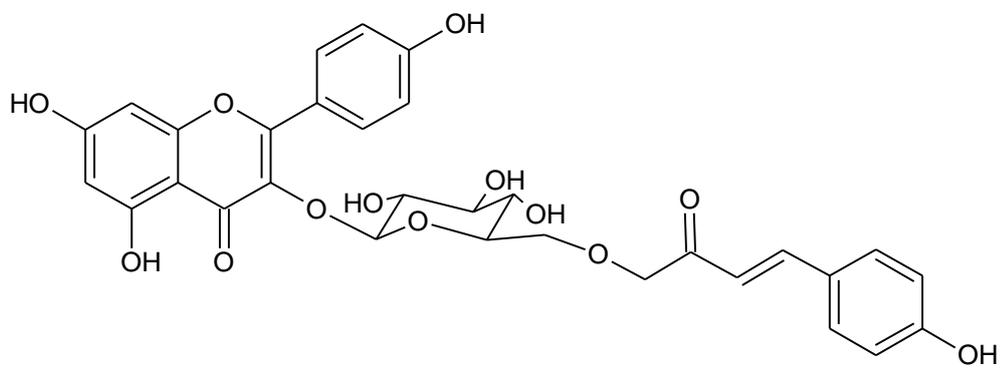
	R ¹	R ²	R ³ .
(30)	CH ₃	OH	H
(31)	CH ₂ OAc	OH	H
(33)	CO ₂ H	H	H
(34)	CH ₂ OAc	H	H
(36)	CH ₃	OH	OH
(37)	CH ₂ OH	H	H
(38)	CH ₂ OH	OH	H
(39)	CH ₂ OH	OH	OH



(40)



(41)



(42)

II.5 *Croton lechleri*.

Es un árbol que crece en las zonas bajas de las regiones montañosas andinas del Perú, así como en Colombia, Ecuador y Bolivia y es conocido por sus propiedades terapéuticas. La corteza, cuando se lo corta, segrega un látex de color rojizo o amarillento llamado sangre de drago, es un remedio casero común en Perú y en otros países de Latinoamérica donde las tribus indígenas lo utilizan tanto internamente como externamente para detener el sangrado, ayuda a curar heridas y a tratar las enfermedades intestinales ^[19].

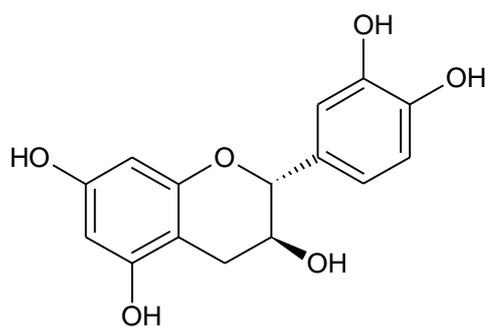
Los resultados de ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” apoyan el uso del látex, el cual exhibe actividad antioxidante, antiviral y antiinflamatoria, además de ser eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de diarrea, y el cólera. La administración oral de un compuesto, denominado SP-303, aislado del látex de la corteza, conduce a resultados positivos en el tratamiento de las diarreas del viajero y los episodios de diarrea en pacientes con SIDA. También se aplica la savia por vía tópica para reducir los síntomas de las picaduras de insectos con una reducción de la hinchazón y el enrojecimiento. La savia se ha utilizado en el tratamiento de varios tipos de tumores ^[19].

Los componentes químicos de varias especies del género *croton* han sido ampliamente investigados, los metabolitos secundarios característicos son las proantocianidinas, que representan hasta el 90% del peso seco y muchos componentes polifenólicos, como catequina (43), epicatequina (44), galocatequina (45), epigalocatequina (46) y procianidinas diméricas B-1 y B-4. Varios componentes menores se han identificado también: diterpenos tipo clerodano como korberin A y B, bicantriol, crolechinol y el dihidrobenzofuran lignano 3',4-o-dimetilcedrusin (47). Los trabajos con *C. lechleri* han conducido al

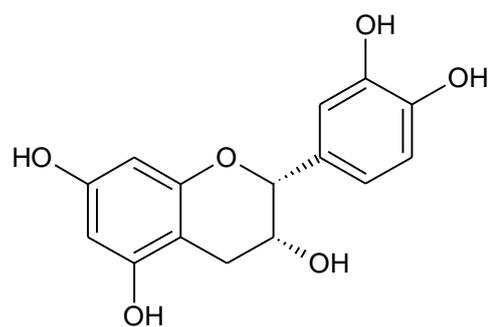
aislamiento del alcaloide taspina (48). La taspina y los lignanos 3',4-o-dimetilcedrusin se cree que son responsables de la acción cicatrizante en heridas por sangre de drago. En adición a estos compuestos también se han aislado e identificado en el latex el blumenol B (49), blumenol C (50), 4,5-dihidroblumenol A (51) y los compuestos 52, 53 y 54 ^[19].

Otros alcaloides han sido aislados de las hojas de la planta, probablemente se encuentran relacionados biogénicamente con la taspina, ellos son la glaucina (55), isoboldina, magnoflorina, norisoboldina, taliporfina y sinoacutina ^[3].

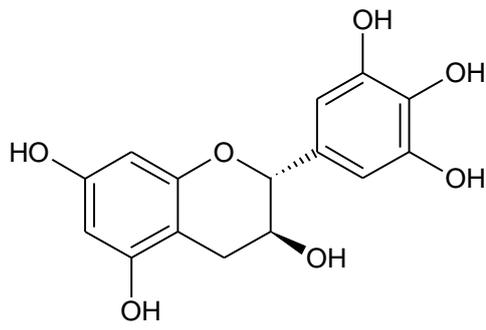
Resultados obtenidos con las pruebas realizadas al extracto de n-BuOH arrojaron que los 3-flavanoles, son los antioxidantes más potentes entre los fenoles del látex. La complejidad del perfil químico sugiere que la función de cada compuesto aislado en el látex es importante en la interpretación de los efectos farmacológicos exhibidos por sangre de drago ^[19].



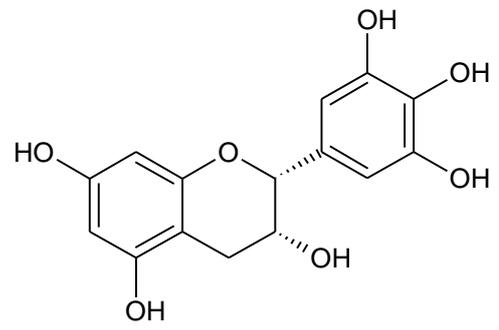
(43)



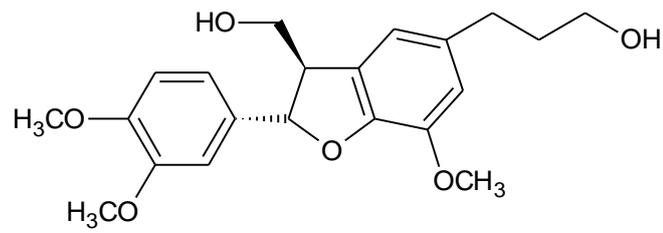
(44)



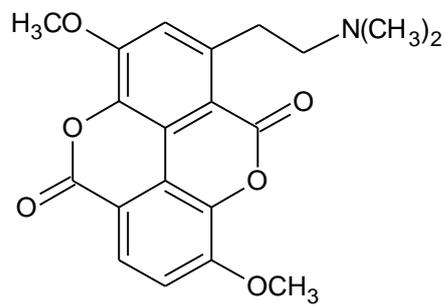
(45)



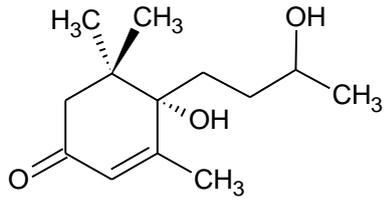
(46)



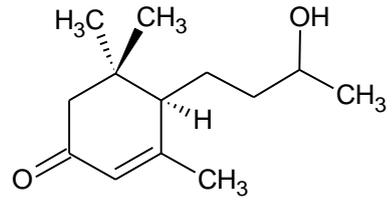
(47)



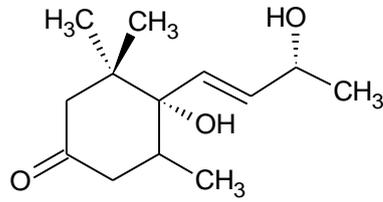
(48)



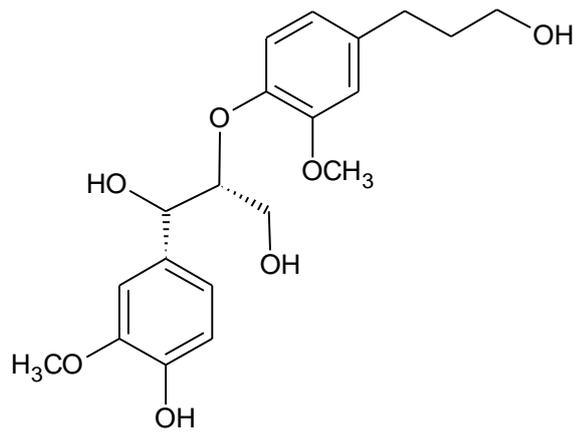
(49)



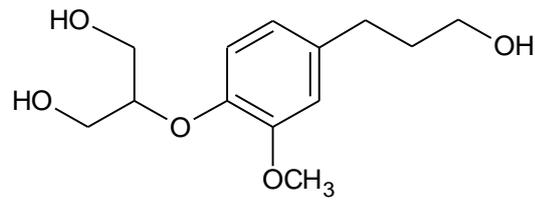
(50)



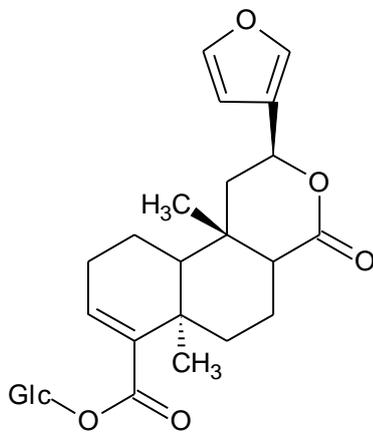
(51)



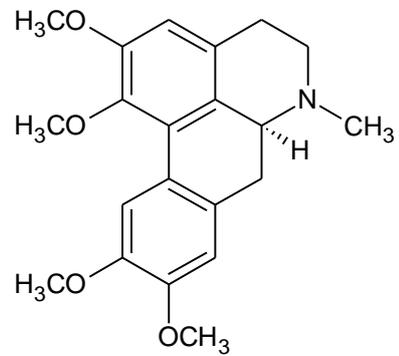
(52)



(53)



(54)



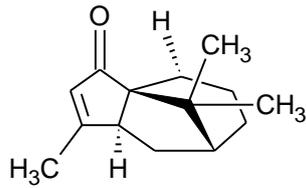
(55)

II.6 *Croton arboreus*

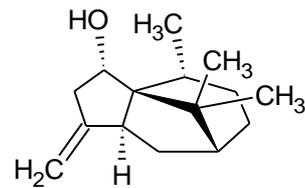
Es nativa de México, donde es conocida como “cascarillo”. En Tabasco y Chiapas se prepara una bebida con las partes aéreas de la planta y se utiliza como auxiliar antiinflamatorio en el tratamiento de enfermedades respiratorias ^[3].

A partir de las partes aéreas de la planta se han aislado tres sesquiterpenos; el 5 α ,7 α ,10 β H-3-patchoulen-2-ona (56), el 5 α ,7 α ,10 β H-4(14)-patchoulen-2 α -ol (57) y 9 α ,10 β -dihidroxi-2 β ,4 β -peroxi-1 α ,5 β ,7 α H-guaiane (58). Se evaluó la actividad

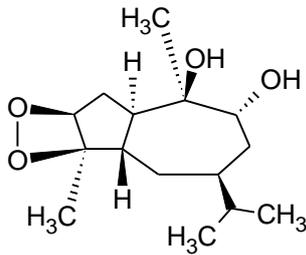
antiinflamatoria contra el edema producido en orejas de ratones producido por 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) encontrándose que los siguientes compuestos son activos; 5 α ,10 β -4(15)-eudesmen-1 β ,6 β -diol (59), espatulenol (60), 5 α ,10 β -3-eudesmen-1 β ,6 α -diol (61) y ácido junceico (62) [20].



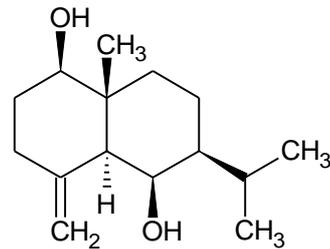
(56)



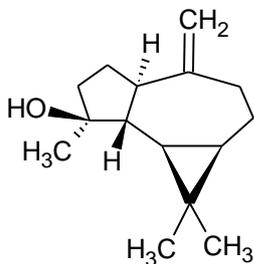
(57)



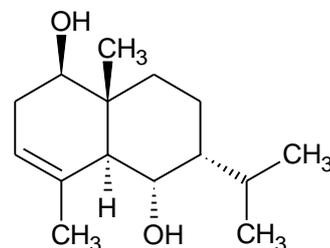
(58)



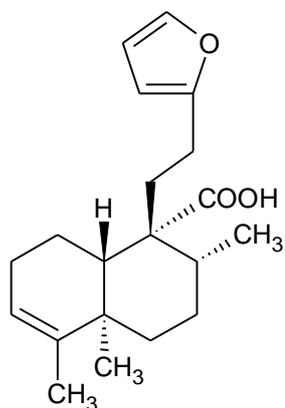
(59)



(60)



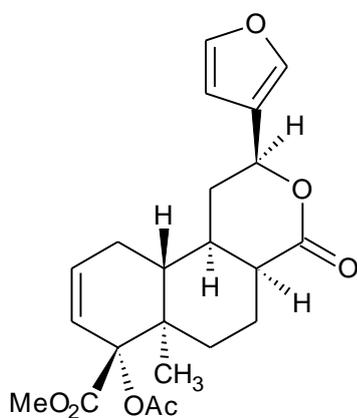
(61)



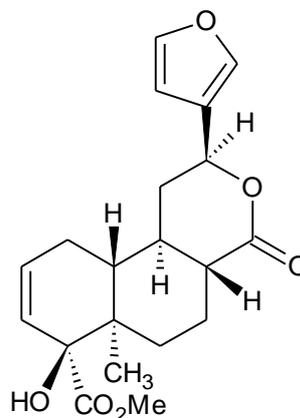
(62)

II.7 *Croton brasiliensis*

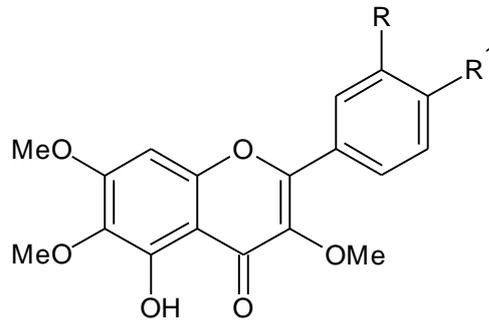
A partir de las hojas y los tallos han sido aislados dos clerodanos; crotobrasilina A (63) y crotobrasilina B (64), también fueron aislados cuatro 3-metoxiflavonas; casticina (65), penduletina (66), artemetina (67) y crisosplenol-D (68) ^[21].



(63)



(64)



(65) R= OH, R¹=OMe

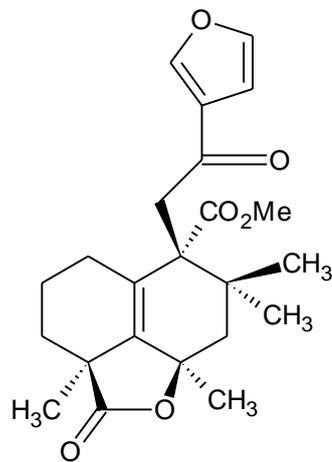
(66) R= H, R¹=OH

(67) R= R¹=OMe

(68) R= R¹=OH

II.8 *Croton mayumbensis*

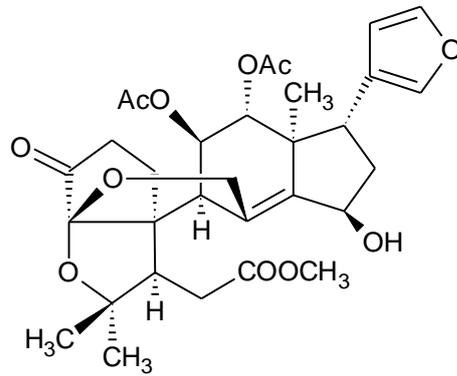
Es un árbol de hasta 34m de altura, crece en selva tropical de la República Centro Africana. Es una planta medicinal africana, sus hojas y corteza son usadas para tratar infecciones microbianas y enfermedades parasitarias en humanos. En una reciente investigación se ha aislado de la corteza del tallo de la planta un compuesto furoclerodano llamado Centrafricine I (69) ^[22].



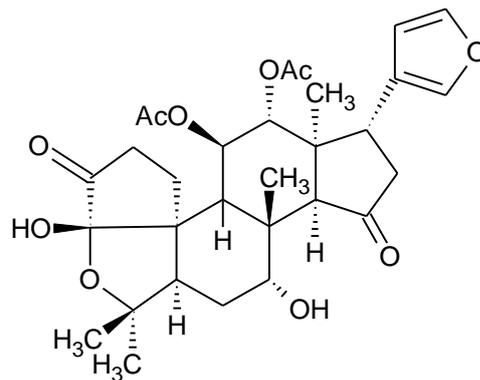
(69)

II.9 *Croton jatrophioides*

Es una planta que se ha utilizado en la medicina popular en el este de África, se identifica por poseer propiedades que la hacen resistente a las plagas. Siete limonoides como principales antialimentarios de insectos fueron aislados del extracto de metanol. Los limonoides son sustancias biológicamente activas, ya que poseen actividad anti-VIH, actividad contra la malaria y citotoxicidad contra las líneas celulares de cáncer, en adición a la actividad antialimentaria de insectos. Como resultado de la investigación de esta planta fueron aislados dos constituyentes activos, el musidunin (70) y musiduol (71) ^[23].



(70)

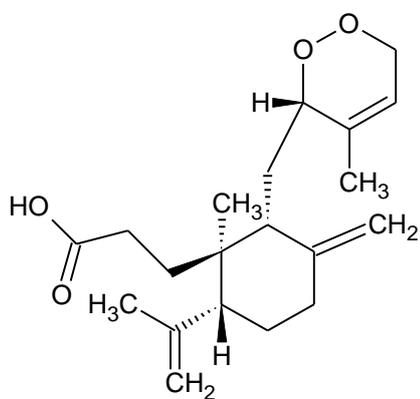


(71)

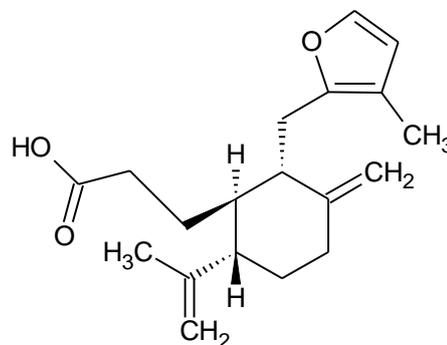
II.10 *Croton stipuliformis*

Es una especie nativa de Colombia conocida como “guacamayo” es un árbol de 10-20 m de altura que crece en elevaciones desde 1300 hasta 1800m en los Andes de Colombia. En esa región, esta planta es reconocida por la producción de exudados que se utilizan para curar las úlceras de estómago. A partir del extracto metanólico de las hojas de la planta se aislaron tres

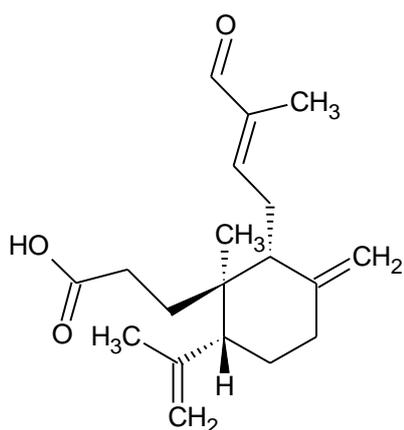
ent-3,4-seco-labdano; ácido ent-3,4-seco-12,15-dioxo-4,8,13-labdatrien-3-oico (72), ácido ent-3,4-seco-12,15-epoxi-4,8,12,14-labdatetraen-3-oico (73) y ácido 3,4-seco-15-nor-14-oxo-4,8,12(E)-labdatrien-3-oico (74). También fue aislado el ent-12,15-dioxo-8,13-labdadien-3 α -ol (75) junto con 6-hidroxinidorellool (76) [24].



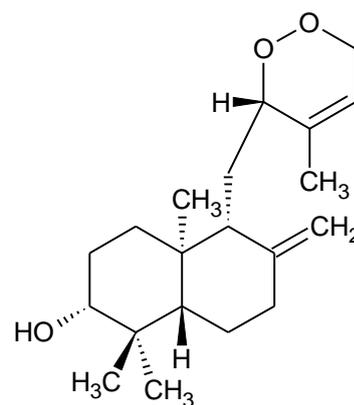
(72)



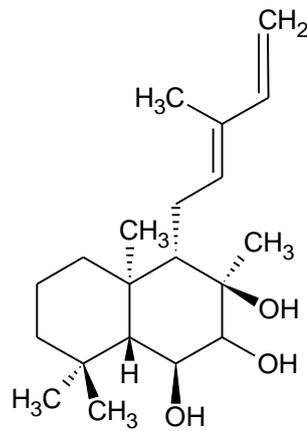
(73)



(74)



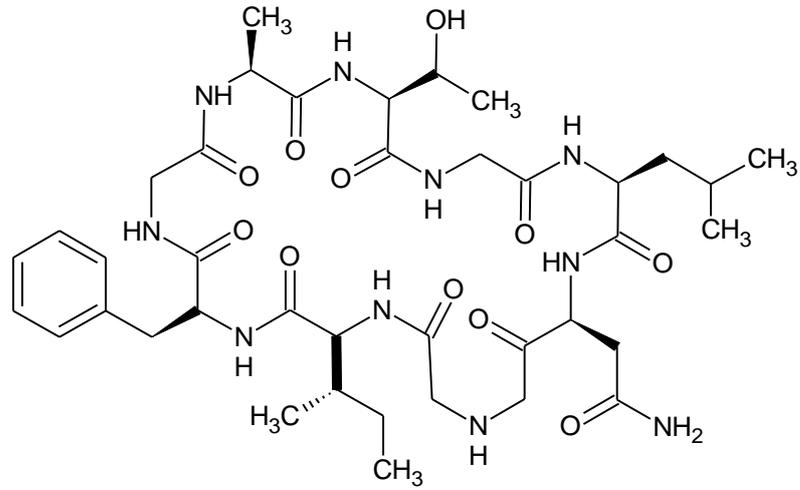
(75)



(76)

II.11 *Croton gossypifolius*

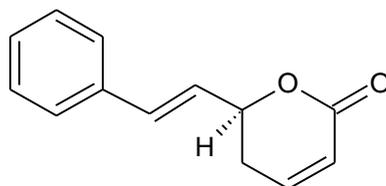
Se produce en Colombia, Martinica, México, Trinidad y Tobago y Venezuela. El árbol adulto puede crecer hasta 15m de altura y produce una savia roja cuando se corta. Se ha aislado un péptido cíclico, crotogossamide (77) y tres flavonoides; kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranoicido, quercitrin y myricitrin desde el látex de la planta ^[25].



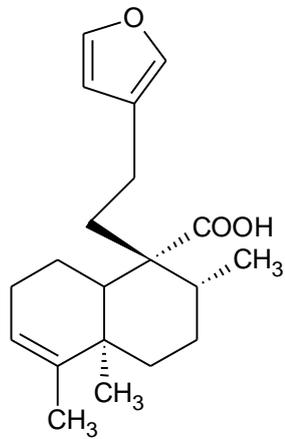
(77)

II.12 *Croton argyratus*

Es un árbol de unos 18 m de altura y 90 cm de circunferencia, que es común en toda Malasia, Birmania a Molucas y Bali, es conocido localmente como Cheret Budak. Las hojas y tallos de *C. argyratus* fueron utilizados por los lugareños para detener la diarrea. El estudio fitoquímico de las raíces de la planta ha llevado al aislamiento de styryldehidropirano, (+)-goniothalamín (78) y del (-)-ácido juneico (79) [26].



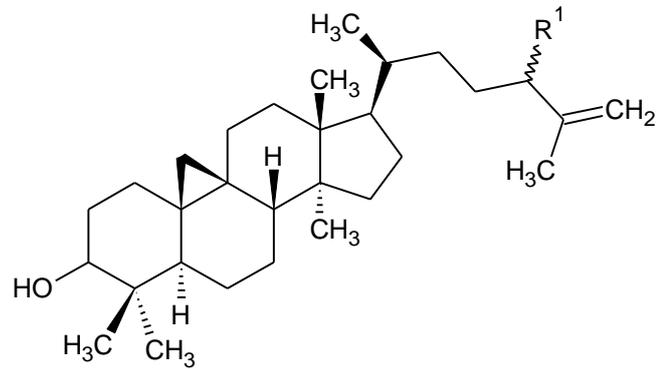
(78)



(79)

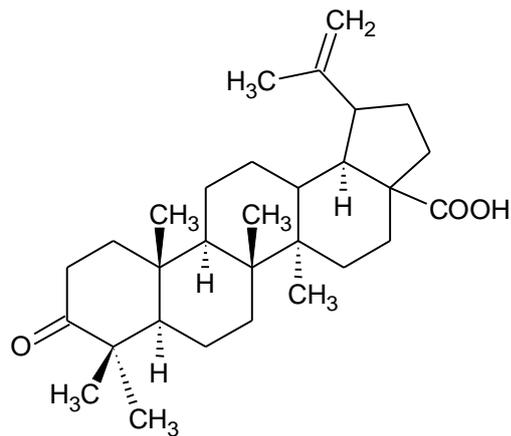
II.13 *Croton sellowii*

Es un arbusto, cuyas raíces han presentado actividad antibacteriana y como antibiótico, de las hojas de esta especie se han aislado fitoesteroides; sitosterol, stigmasterol, triterpenos; cycloart-25-ene-3 β ,24 β -diol (80), cycloart-25-ene-3 β ,24 α -diol (81) y ácido betulínico (82), flavonoides; artemetina, crysosplenetin, casticina, penduletina y tilirosido, y un fenilpropanoide; treo-7-etoxi-8-hidroxi-dihidroanol ^[27].



(80) R= β -OH

(81) R= α -OH

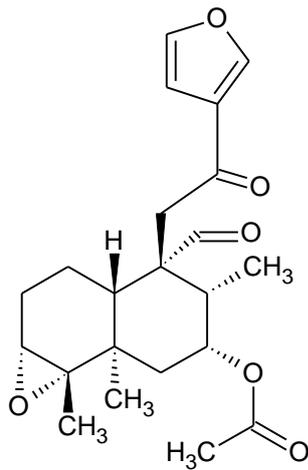


(82)

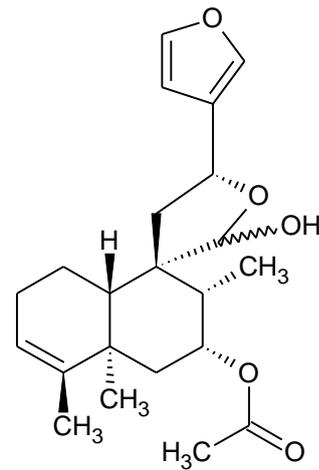
II.14 *Croton eluteria* Bennett

Comúnmente llamado “cascarilla” es un arbusto o árbol pequeño de las Antillas y del norte de América del sur. Su corteza amarga ha sido ampliamente empleada en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, ha sido reportado como balsámico, digestivo, narcótico y tónico, y usado para el

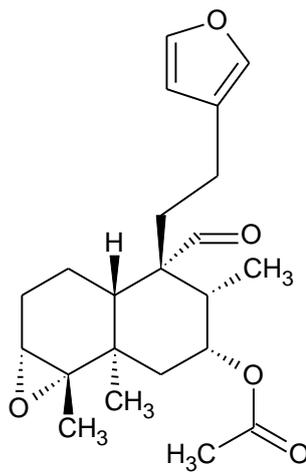
tratamiento de bronquitis, diarrea y disentería, también ha sido usado para la fiebre y la malaria. Tres clerodanos de tipo furanoides se aislaron de la corteza de este árbol; cascarillin B (82), cascarillin C (83) y cascarillin D (84) [3].



(82)



(83)



(84)

II.15 *Croton malambo*

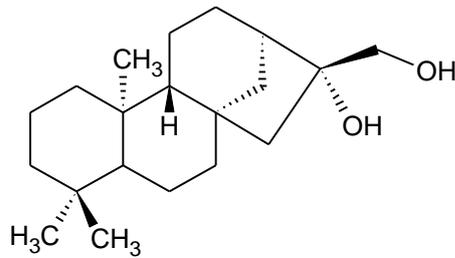
Es un árbol pequeño que crece en la región oeste de Venezuela y en la parte noreste de Colombia, es conocido como “palomatías, torco y cascara de lombrices”. Una infusión de la corteza de palomatías es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades como: diabetes, diarreas, reumatismo, úlceras gástricas y como agente antiinflamatorio y analgésico [28].

En investigaciones realizadas se encontró que el extracto acuoso de la corteza de esta planta tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios. Al estudiar la toxicidad aguda se determinó que la DT_{50} era 12,3 mg / Kg y no fue posible determinar la DL_{50} incluso en la dosis más alta ensayada, 4096 mg / Kg, dado que los efectos letales no fueron observados en ninguna de las dosis administradas [28].

El efecto analgésico observado fue mayor que con el ácido acetilsalicílico pero menor que el observado con la morfina. En relación a su efecto antiinflamatorio tuvo un efecto similar al producido por el ácido acetilsalicílico pero menor que el causado por el diclofenac sódico [28].

Del extracto de diclorometano se aisló el 16β - 17α -diol-entkaurano (85). Se estudio la actividad citotóxica y proapoptótica de este compuesto mediante el método colorimétrico de MTT sobre líneas celulares del tipo MCF-7 (carcinoma mamario humano). Cuando las células del carcinoma mamario fueron tratadas con concentraciones crecientes del ent-kaurano, su actividad citotóxica mostró un

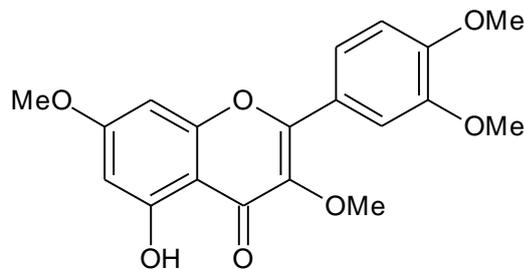
IC_{50} de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, dosis que es 2,66 veces menor que los correspondientes valores para células no malignas ^[29].



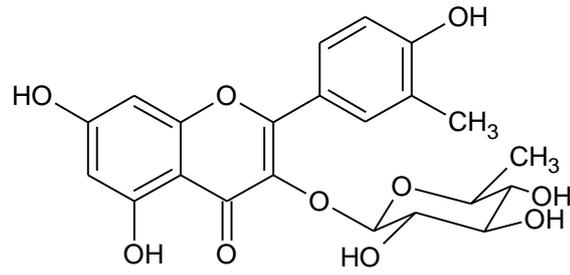
(85)

II.16 *Croton huberi*

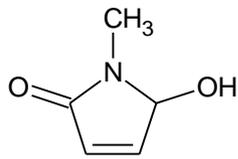
Es un árbol mediano que crece en la cordillera norte de Venezuela. El estudio fitoquímico de las hojas de esta planta permitió el aislamiento e identificación de la ritusina (86) y N-metil-5-hidroxi- Δ^3 -pirrolin-2-ona (87), aislados del extracto de diclorometano, tilirosido y quercitrina (88), aislados del extracto de acetato de etilo y del extracto de hexano se aislaron blumenol A (89), oxido de cariofileno (90) y fitol (91) ^[30].



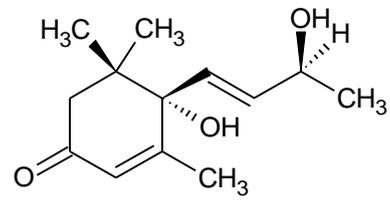
(86)



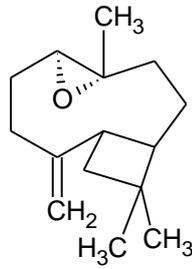
(88)



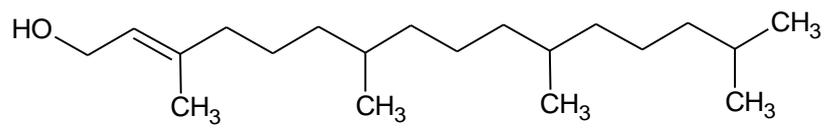
(87)



(89)



(90)

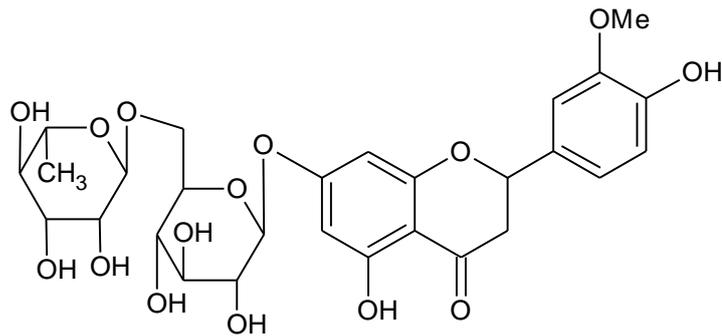


(91)

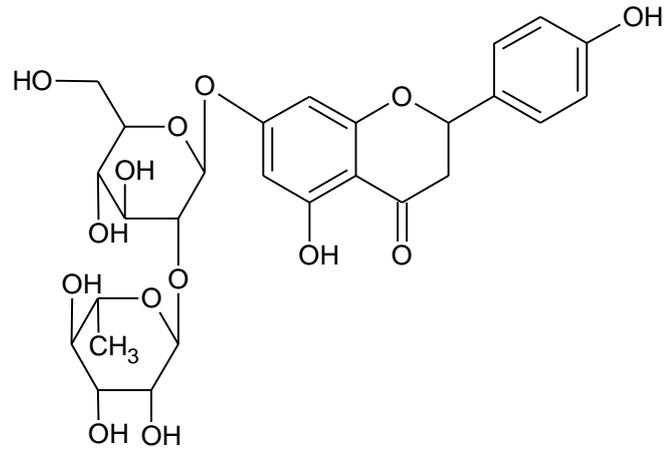
II. 17 *Croton matourensis*

Es un árbol pequeño o mediano, el cual se encuentra abundantemente en Brasil y Guayana. En Venezuela se ha observado principalmente en el estado Bolívar. La composición del aceite esencial ha sido reportado para la especie en Brasil y se reporta el aislamiento de el diterpeno ácido maravúico ^[31].

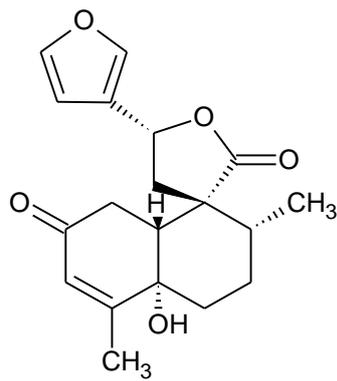
Una investigación fitoquímica y farmacológica de esta planta colectada en Venezuela señala una baja toxicidad y una interesante actividad citotóxica de los compuestos presentes en los extractos orgánicos. En el estudio de los extractos de diclorometano y acetato de etilo obtenidos de las hojas de dicha planta se aislaron seis compuestos, la hesperidina (92), naringina (93), T-dehidrocrotonina, 5- α -hidroxi-trans-dehidrocrotonina (94), vainillina (95) y 3 α -amirina ^[31].



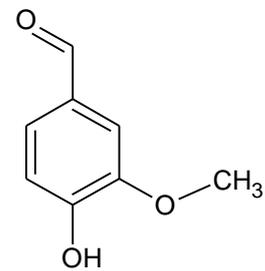
(92)



(93)



(94)



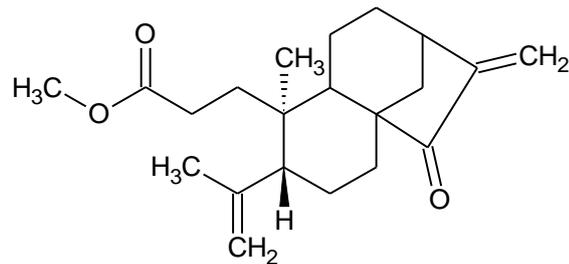
(95)

II.18 *Croton micans*

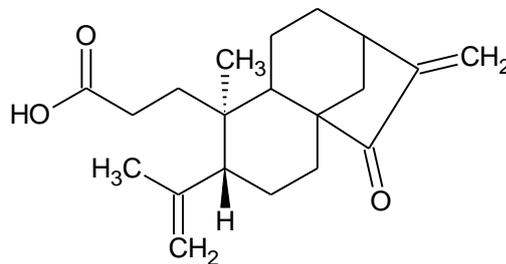
Es un arbusto que crece en la parte norte de Venezuela. De los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo de las flores de esta planta se aislaron e identificaron siete compuestos como el oxido de cariofileno, espatulenol, stigmasterol, stigmasterona, ácido hexadecanoico, 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-

diol, tilirosido, caracasine (96) y ácido de caracasine (97). Esta planta fue reportada como *Croton caracasana*, en los primeros reportes de nuestro grupo de investigación^[32].

Al estudiar el extracto crudo de las flores y las hojas de la *C. micans* se encontró significativa actividad antiinflamatoria y citotoxicidad contra líneas celulares tumorales humanas. Los compuestos caracasine y ácido caracasine también fueron estudiados, y se observó una excelente actividad citotóxica sobre varias líneas de células leucémicas humanas^[33].



(96)



(97)

III. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Los productos de origen natural constituyen una fuente para el hallazgo de estructuras químicas, las cuales pueden modificarse para encontrar análogos con igual o mayor actividad biológica que los originales. Generalmente, una vez que se logra aislar las sustancias de las plantas se procede a evaluar su toxicidad y efectividad en animales y luego se realizan los ensayos clínicos con voluntarios humanos ^[34].

El estudio científico de las plantas medicinales pretende reducir los riesgos de su utilización incontrolada, con la finalidad de conseguir el máximo efecto terapéutico sin efecto tóxico. El conocimiento de la utilidad medicinal que le da la población a ciertas plantas, la forma en que la consumen, cuanto utilizan de ellas y los efectos benéficos y/o adversos que se observan tras su utilización, entre otros, permite estimar una cierta garantía de seguridad. Sin embargo, no se puede descartar el hecho de que pueden aparecer efectos secundarios y posibles interacciones con tratamientos que se ingieren conjuntamente ^[35]. Ningún producto debe ser certificado como inocuo, pero si es posible estimar el riesgo inherente a la exposición del producto en condiciones específicas si se llevan a cabo pruebas adecuadas ^[36].

Dentro de la etapa preclínica, la sustancia a estudiar es sometida a pruebas “*in vivo*” (con animales de experimentación) e “*in vitro*” para confirmar sus efectos beneficiosos y la ausencia de riesgos tóxicos derivados de su utilización ^[37].

Estos ensayos farmacológicos se dividen en tres fases, en la primera se evalúa la toxicidad, en la segunda la eficacia y por último la eficacia relativa o el

coeficiente terapéutico (relación entre la dosis efectiva y la toxicidad de la droga)
[34].

Los efectos tóxicos son aquellos capaces de producir alteraciones del equilibrio fisiológico, y los mismos deben ser observados en función de la dosis y el tiempo. Los estudios toxicológicos se clasifican en: Intoxicaciones agudas, sub-agudas y crónicas [38, 39, 40, 41].

- **Intoxicaciones agudas.** Son aquellas en las cuales un agente produce una reacción adversa en el organismo casi inmediatamente a la administración de la dosis
- **Intoxicaciones subagudas.** Son aquellas en que tras administraciones repetidas del agente toxico durante un periodo corto que puede variar de un mes a tres meses, se evidencian los efectos tóxicos
- **Intoxicaciones crónicas.** Son aquellas que se presentan a consecuencia de la administración repetida del agente toxico en cantidades relativamente pequeñas. En este tipo de intoxicaciones la acumulación en el organismo (normalmente en un órgano o tejido específico) del agente es la responsable de los estados patológicos que se generan, siendo en la mayoría de los casos de a carácter irreversible. En las intoxicaciones crónicas el efecto se manifiesta en un periodo de tres meses a varios años [38, 39, 40, 41].

En animales es necesario establecer los efectos secundarios que se puedan producir como consecuencia del uso de los compuestos extraídos, para ello se determina la DT_{50} y DL_{50} , administrando una dosis única del extracto acuoso. El uso de estos animales experimentales nos permite establecer los efectos no deseados, debido a que los mismos sirven como modelos análogos del hombre, de manera que los resultados obtenidos pueden ser extrapolados [34].

La DT_{50} esta definida como la dosis necesaria para producir un efecto toxico particular en el 50% de los animales de experimentación. La DL_{50} se conoce como la dosis necesaria para producir la muerte en el 50% de los animales. Por otra parte en las pruebas preclinicas con animales experimentales se puede determinar la DE_{50} , que se define como la dosis en la cual el 50% de los animales de experimentación muestran el efecto esperado ^[41].

Una vez obtenida la DT_{50} se pueden comenzar a realizar los experimentos para la determinación de las posibles actividades farmacológicas del extracto acuoso a investigar, utilizando dosis inferiores a este parámetro ^[41].

En general, para estudiar las sustancias de origen vegetal encontramos dos etapas: el estudio primario y el secundario. Cada una de estas etapas implica la realización de uno o más bioensayos. Ambas etapas consisten en reducir a un número manejable el conjunto de extractos vegetales para obtener el compuesto de interés ^[34].

El estudio primario debe ser de amplio espectro, es decir, debe detectar una amplia gama de actividades biológicas. También debe poseer alta capacidad para procesar muestras simultáneas, ser rápido, utilizar poca cantidad de muestra y debe ser económico para predecir la actividad biológica buscada ^[34].

Los extractos que poseen actividad en su estudio primario pasan al estudio secundario, donde se emplean bioensayos más específicos, de menor capacidad, son de respuesta más lenta, poseen mayor complejidad y el costo es más elevado que los estudios primarios ^[34].

Los estudios que se realizan en un screening secundario son:

- Ensayos para antimicrobianos CIM
- Prueba para la inhibición de células tumorales
- Actividad diurética
- Actividad antiinflamatoria
- Actividad analgésica
- Actividad hipoglicemiante
- Actividad sedante
- Toxicidad
- Actividad sobre el músculo liso de íleon de Cobayo ^[34].

IV. TAXONOMÍA DE *CROTON PUNGENS*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

SubClase: Rosididae

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

SubFamilia: Crotonoideae

Tribus: Crotoneae

Genero: *croton*

Especie: *pungens*

Arbusto de 1 a 2 m de altura. Hojas ovadas de 6 a 18 cm de largo por 2.5 a 9 cm de ancho; pecíolo con 2 a 6 o más glándulas pediceladas en el ápice, margen dentado o entero. Inflorescencia bisexual, racemosa de 14 a 40 cm de largo. Frutos de 5 a 8 mm de longitud. Se reconoce por su indumento estrellado-hispídulo, por sus hojas ovadas con la base cordada y el ápice acuminado a caudado, por sus pecíolos glandulares y por su inflorescencia con cimulas bisexuales cerca de la base.



Figura 2. Distribución de *Croton pungens*

La especie *Croton pungens*, objeto de nuestro estudio fue colectada, en la zona de Colinas de Bello Monte, en Caracas. Fue taxonómicamente identificada por la Dra. Ricarda Riina y una muestra representativa de la colección, se encuentra en el Herbario Victor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, de la UCV.

V. JUSTIFICACIÓN

Croton pungens es una especie nativa de este país y no se conocen antecedentes en la literatura, por lo que el estudio de la misma representa un aporte al conocimiento fitoquímico de esta especie perteneciente al interesante género *croton*. Es muy probable dado los antecedentes del género, que estructuras tipo diterpenicas como por ejemplo los kauranos, los cuales son comunes en estas especies y quienes presentan un amplio rango de acciones biológicas, puedan ser aisladas en este estudio.

VI. OBJETIVOS.

V.1. Objetivo General.

Caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos apolares de los tallos y las hojas de *Croton pungens* y evaluar su toxicidad aguda.

V.2 Objetivos Especificos.

- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los tallos y las hojas de *Croton pungens*.
- Caracterizar los compuestos mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C , HETCOR y EM.
- Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Croton pungens*.
- Evaluación de la posible actividad analgésica del extracto acuoso de *Croton pungens*.

VII. PARTE EXPERIMENTAL.

VII.1. Equipos

- Espectrómetro de RMN ECLIPSE-JEOL 270 MHz (Facultad de Farmacia UCV).
- Rotavaporador BUCHI B-480.
- Rotavaporador BUCHI 461.
- Lámpara de UV (λ 254 nm) UVP modelo UVG-11.
- Lámpara UVSL-58 (λ 254 / 366 nm).
- Balanza analítica OHAUS.
- Balanza analítica Mettler PC 2000.
- Estufa Memmert modelo 500.

VII.2. Materiales

VII.2.1. Solventes

- Metanol (MeOH) Grado técnico, destilado y grado p.a Aldrich.
- n-Hexano. Grado técnico, destilado.
- Diclorometano (CH_2Cl_2) Grado técnico, destilado.
- Acetato de etilo (AcOEt) Grado técnico, destilado.
- Cloroformo (CH_3Cl_3) Grado p.a. Aldrich.

VII.2.2. Solventes para análisis de RMN

- Cloroformo deuterado (CDCl_3).Grado p.a. Aldrich.
- Dimetilsulfoxido (DMSO-D_6).Aldrich.

VII.2.3. Material para cromatografía

- Silica gel G60 para cromatografía de columna (CC) 0.06-0.2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.
- Placas de silica gel para cromatografía de capa fina (CCF) Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20X20 cm. 0.20 mm de espesor.
- Placas preparativas de silica gel 60. F₂₅₄, 20X20 cm. 0.25 mm de espesor. MERK.
- TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄. Cromatografía de capa fina fase reversa. Hojas de aluminio 20x20 cm.
- Waters Sep-Park. Vac 35 cc. C₁₈. 10g.

VII.2.4. Reveladores

- **p- anisaldehído.** Se preparo mezclando 5 mL de p-anisaldehído con 90 mL de EtOH, 5 mL de H₂SO₄ y 1 mL de CH₃COOH.
- **Timol.** A 5 mL de H₂SO₄ se le añadio cuidadosamente una solución de 0.5 g. de timol en 95 mL de EtOH.
- **Acido fosfomolibdico.** Añadir a una solución etanólica al 5% el ácido fosfolmolibdico.

VII.3. Procedimiento Experimental

VII.3.1 Colecta del material vegetal

La especie *Croton pungens* fue colectada en la zona de Colinas de Bello Monte, en Caracas. Fue taxonomicamente identificada por la Dra. Ricarda Riina y una muestra representativa de la colección (VEN 381427), se encuentra en el Herbario Victor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, de la UCV.

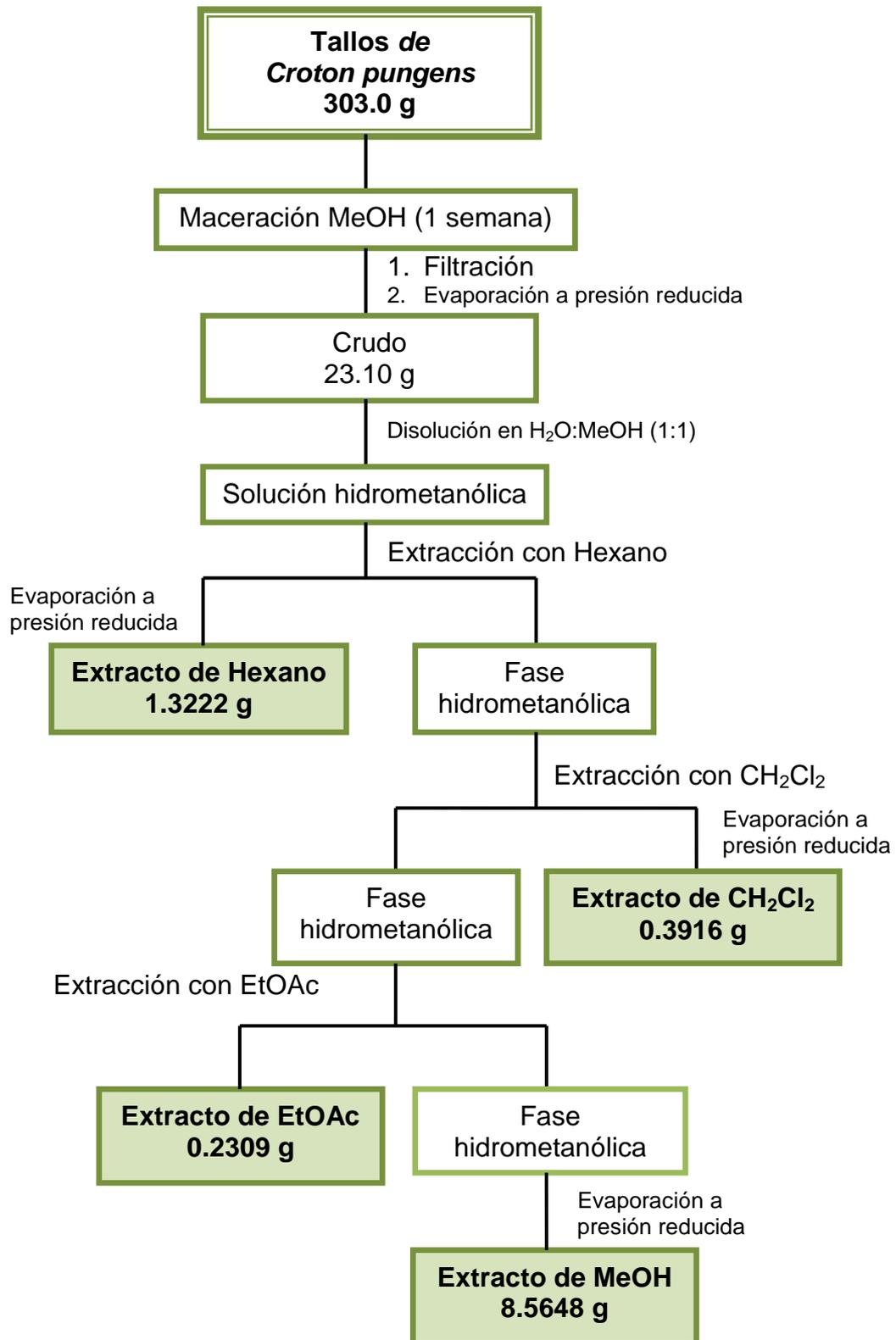
VII.3.2 Extracción

Los tallos secos (303.0 g) y las hojas secas (163.9 g) fueron sometidos a una extracción con metanol vía maceración por separado durante una semana, luego se filtraron y se concentraron al vacío hasta sequedad, para obtener así el extracto crudo.

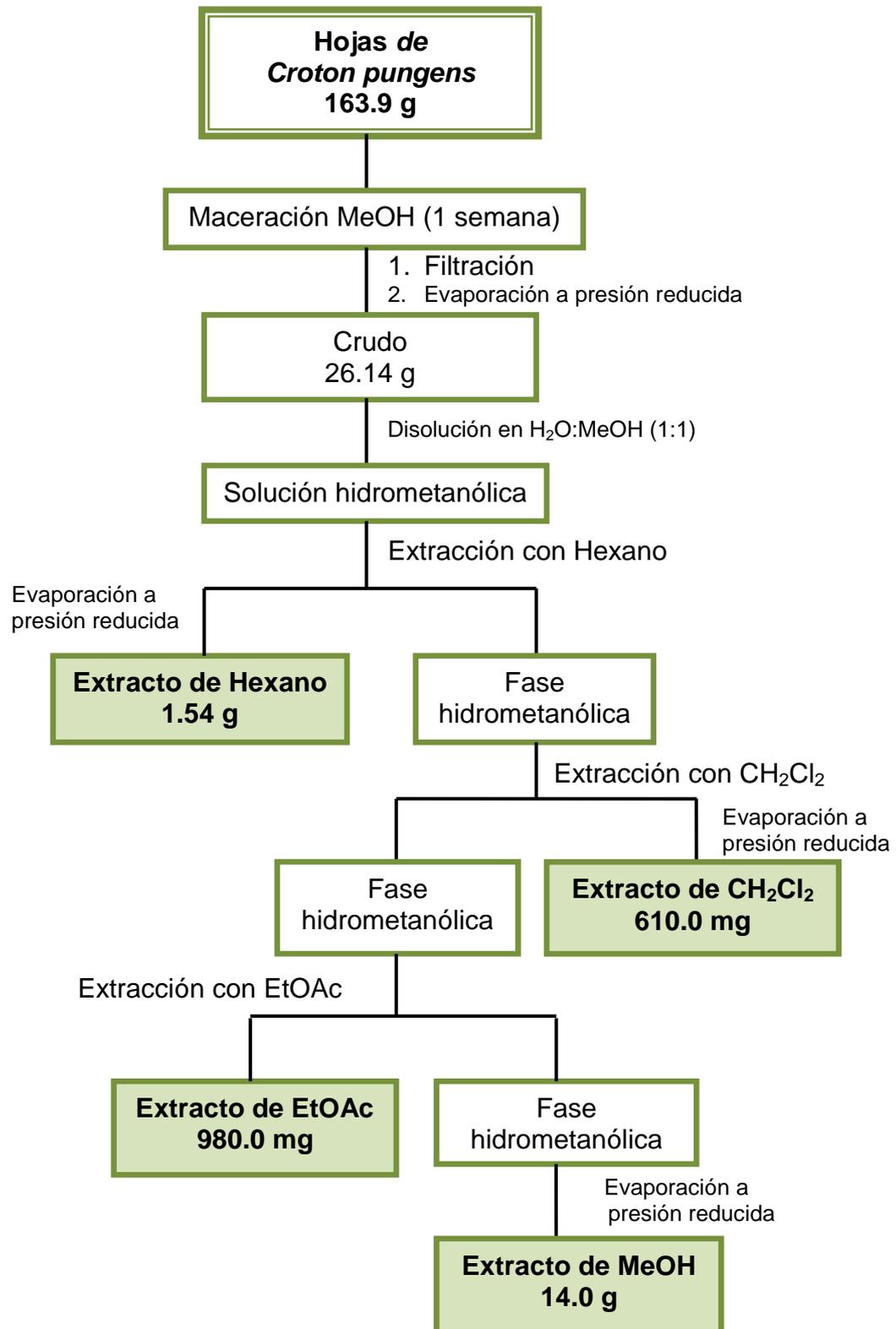
Se disolvieron el extracto crudo de los tallos (23.10 g) y por otra parte el de las hojas (26.14 g) en una mezcla metanol:agua (1:1) y se realizaron sucesivas extracciones, primero con hexano, seguida de extracción con diclorometano y finalmente con acetato de etilo, para obtener de este modo el extracto de hexano, el extracto de diclorometano, el extracto de acetato de etilo y el extracto de metanol (Esquema 1 y 2).

Todos los extractos apolares fueron secados con sulfato de magnesio anhidro, filtrados por gravedad y concentrados al vacío hasta sequedad. Luego fueron monitoreados mediante cromatografía de capa fina (CCF), visualizando las placas en una lámpara UV seguida de inmersión en solución de p-anisaldehído como agente revelador y posterior calentamiento, para la visualización de los compuestos que no absorben a la luz ultravioleta.

Los extractos apolares fueron separados mediante la técnica de cromatografía en columna de fase normal sobre sílica gel, utilizando como eluyente diferentes solventes o mezcla de solventes orgánicos. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por medio de CCF y se unieron según criterios de R_f y coloración.



Esquema 1. Extracción de los tallos de *Croton pungens*.



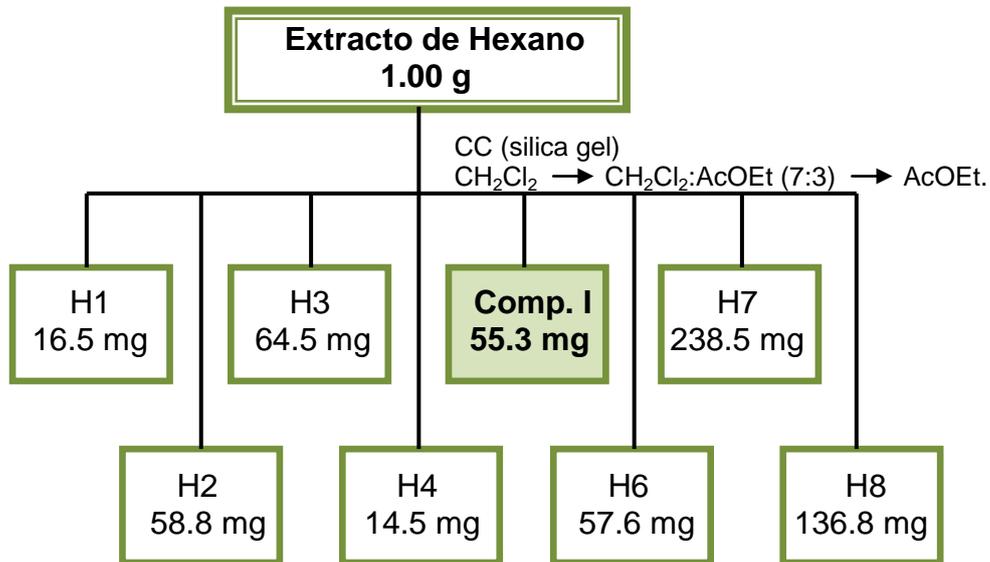
Esquema 2. Extracción de las hojas de *Croton pungens*

VII.3.3. Fraccionamiento

VII.3.3.1. Fraccionamiento del Extracto de Hexano de los Tallos.

El fraccionamiento se llevo a cabo mediante cromatografía en columna (CC) de fase normal empleando como soporte silica gel en una proporción silica/muestra 60:1. Se colocó 1.00 g del extracto y se eluyó inicialmente con CH_2Cl_2 , luego con una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) y finalmente AcOEt. Se obtuvieron 28 fracciones las cuales fueron monitoreadas mediante CCF, empleando como revelador p-anisaldehído seguido de calentamiento. Las fracciones obtenidas fueron unidas en 8 fracciones de acuerdo a su perfil cromatográfico: H1(2-3), H2(4-6), H3(7-9), H4(10-16), H5(17-18), H6(19-22), H7(23-25) y H8(26-27). A partir de la fracción identificada como H5 se obtuvo el **compuesto I**.

Las fracciones restantes a las H5 no se continuaron analizando debido a que eran mezclas de tres compuestos y las cantidades de las mismas eran muy pequeñas para lograr separarlas. Por su parte las ultimas dos fracciones (H7 y H8) eran principalmente clorofila, metabolito que no es del interés de la investigación, la misma fue identificada por una mancha de color verde que se observa al monitorear dichas fracciones por medio CCF y posteriormente visualizadas en una lampara UV (λ 366 nm) donde la mancha se torna de color rojo.



Esquema 3. Fraccionamiento del Extracto de Hexano de los tallos.

VII.3.3.2. Fraccionamiento del Extracto de Hexano de las Hojas.

El extracto fue fraccionado mediante CC de fase normal empleando como soporte sílica gel. Se colocaron 2.2462 g de muestra y se utilizó como eluyente CH₂Cl₂, luego una mezcla CH₂Cl₂:AcOEt (4:6) y finalmente AcOEt. Se obtuvieron 37 fracciones las cuales fueron monitoreadas mediante CCF y se reagruparon finalmente en 11 fracciones: HH1 (1-3), HH2 (4-10), HH3 (11-12), HH4 (13-17, 19-21), HH5 (18), HH6 (22), HH7 (23-26), HH8 (27), HH8 (28), HH10 (29-34), HH11 (35-36) y HH12 (37).

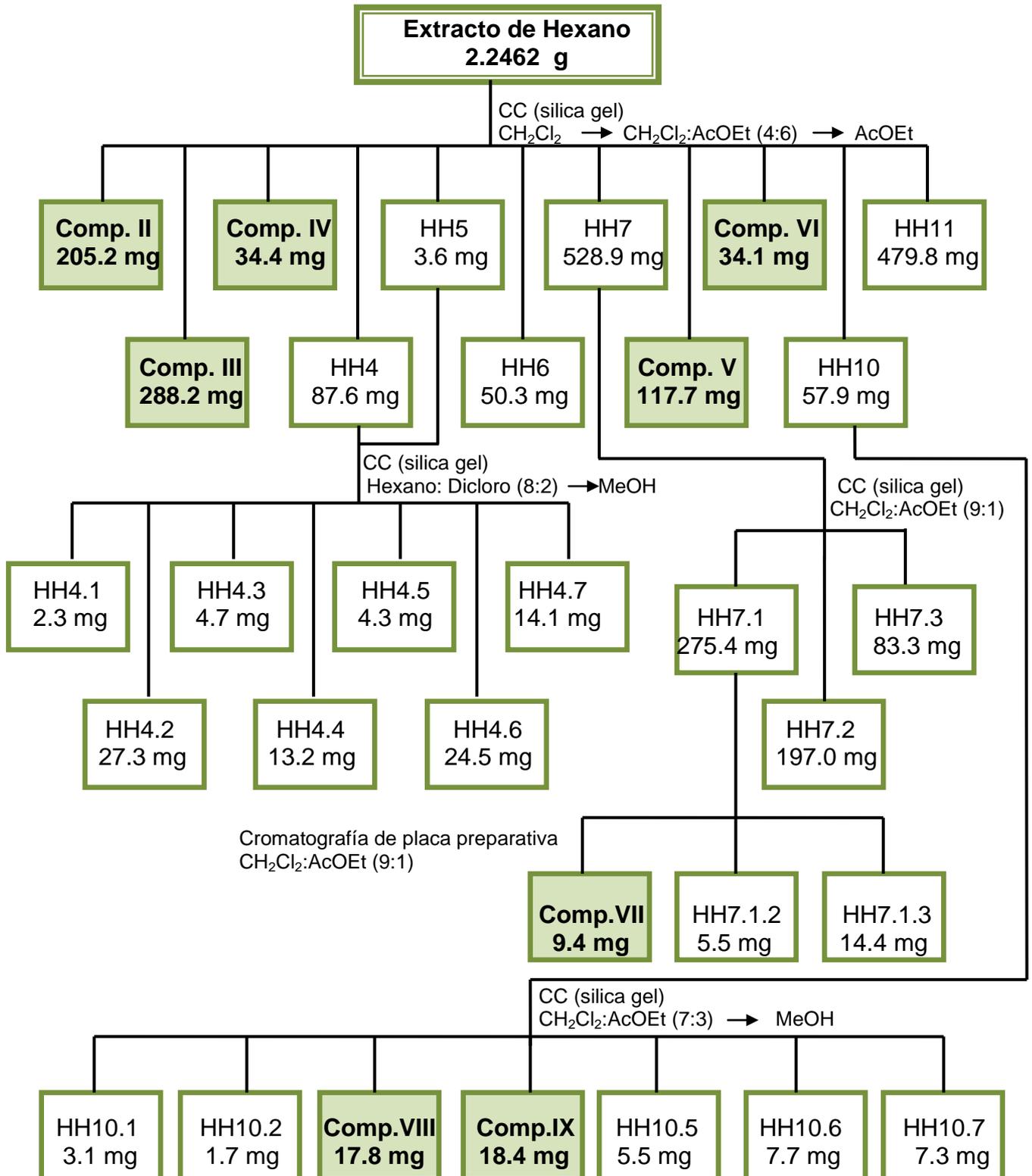
La fracción HH4 y HH5 fueron monitoreadas mediante CCF y se observó el mismo perfil cromatográfico por lo que se unieron y posteriormente fue fraccionada mediante CC sobre sílica gel eluyendo con una mezcla Hexano: CH₂Cl₂ (8:2) y finalmente MeOH. Se obtuvieron 45 fracciones y de acuerdo a los perfiles cromatográficos observados mediante CCF se unieron en 7 fracciones:

HH4.1 (1-2), HH4.2 (4-15), HH4.3 (16-18), HH4.4 (19-30), HH4.5 (31-40), HH4.6 (41) y HH4.7 (42-45). Las primeras cinco fracciones eran mezclas de dos y tres compuestos, debido a las pocas cantidades obtenidas no fue posible su posterior separación, mientras que las últimas dos fracciones eran clorofila.

La fracción HH7 fue separada mediante CC de fase normal empleando como eluyente una mezcla CH_2Cl_2 : AcOEt (9:1) y se aumento gradualmente su polaridad, obteniendose finalmente 3 fracciones: HH7.1 (5-8), HH7.2 (9-15) y HH7.3 (16). Posteriormente la fraccion HH7.1 fue separada debido a que era la única de las tres fracciones obtenidas que al monitorearla por medio de CCF presentaba otras manchas además de la que caracteriza a la clorofila, se separo mediante cromatografía de placa preparativa sobre silica gel empleando como eluyente una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (9:1). Se obtuvieron 3 fracciones HH7.1.1, HH7.1.2 y HH7.1.3. A partir de la fracción 7.1.1 se obtuvo el **compuesto VII**.

La fracción HH10 se separó mediante CC de fase normal sobre silica gel eluyendo inicialmente con una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3), gradiente de polaridad y finalmente MeOH. Se obtuvieron 96 fracciones que fueron combinadas finalmente en 7 fracciones: HH10.1 (3-8), HH10.2 (10-15), HH10.3 (16-42), HH10.4 (43-71), HH10.5 (73-89), HH10.6 (90-95) y HH10.7 (96). De la fracción HH10.3 se obtuvo el **compuesto VIII** y de la fracción HH10.4 se obtuvo el **compuesto IX**. Se obtuvo poca cantidad del resto de las fracciones.

La fracción HH6 no se continuo analizando debido a que era una mezcla de cuatro compuestos y se obtuvo muy poca cantidad para lograr separarla. La fracción HH11 era clorofila, la cual no es del interes de la investigación.



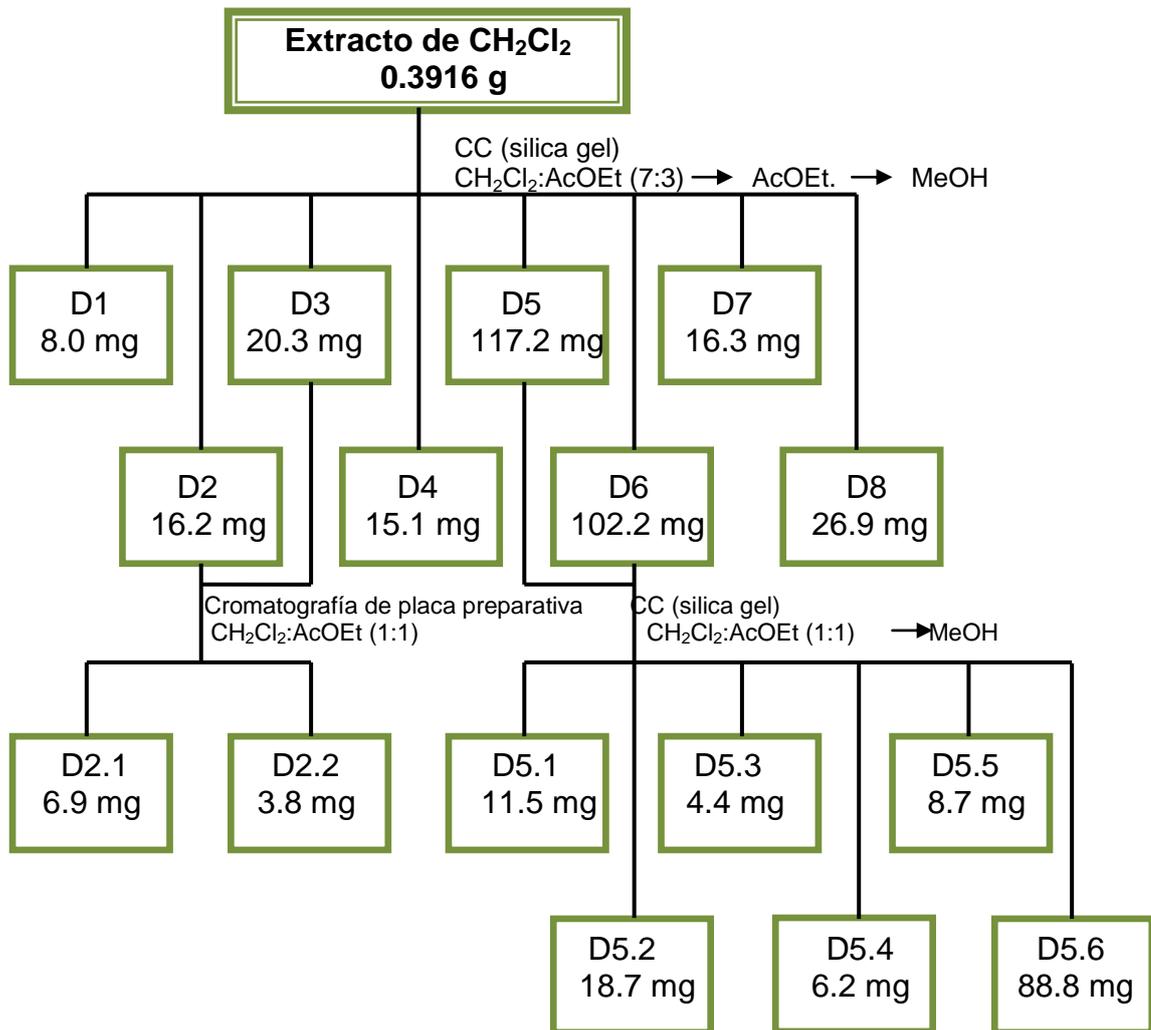
Esquema 4. Fraccionamiento del Extracto de Hexano de las hojas

VII.3.3.3. Fraccionamiento del Extracto de Diclorometano de los Tallos

El fraccionamiento del extracto se realizó mediante CC empleando silica gel en una proporción silica/muestra 60:1. Se colocaron 0.3916 g del extracto, en forma seca adsorbida en una porción de silica gel usando una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) se aumento la polaridad hasta AcOEt y se terminó de eluir con metanol anhidro. Se obtuvieron 21 fracciones que fueron monitoreadas mediante CCF y reagrupadas finalmente en 8 fracciones: D1(2-3), D2(4-5), D3(6-9), D4(10), D5(11), D6(12-13), D7(14-18) y D8(19-21).

La fracción D2 y D3 fueron monitoreadas mediante CCF y se observó el mismo perfil cromatográfico por lo que se unieron y posteriormente fue separada mediante cromatografía de placa preparativa usando como eluyente una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (1:1). Se obtuvieron dos fracciones: D2.1 y D2.2 en muy poca cantidad.

La fracción D5 y D6 también fueron monitoreadas mediante CCF y se combinaron por presentar el mismo perfil cromatográfico, luego fue separada mediante CC de fase normal sobre silica gel eluyendo inicialmente con una mezcla CH_2Cl_2 :AcOEt (1:1) y se aumentó gradualmente la polaridad del eluyente y finalmente se empleo metanol anhidro para terminar de arrastrar los compuestos. Se obtuvo 32 fracciones que fueron reagrupadas en 6 fracciones de acuerdo a su perfil cromatográfico seguido mediante CCF: D5.1 (6-9), D5.2 (11-17), D5.3 (18-21), D5.4 (22-28), D5.5 (29-31) y D5.6 (32). Las fracciones obtenidas eran mezclas de compuestos y las cantidades obtenidas eran pequeñas para una posterior separación, la última fraccion era clorofila.



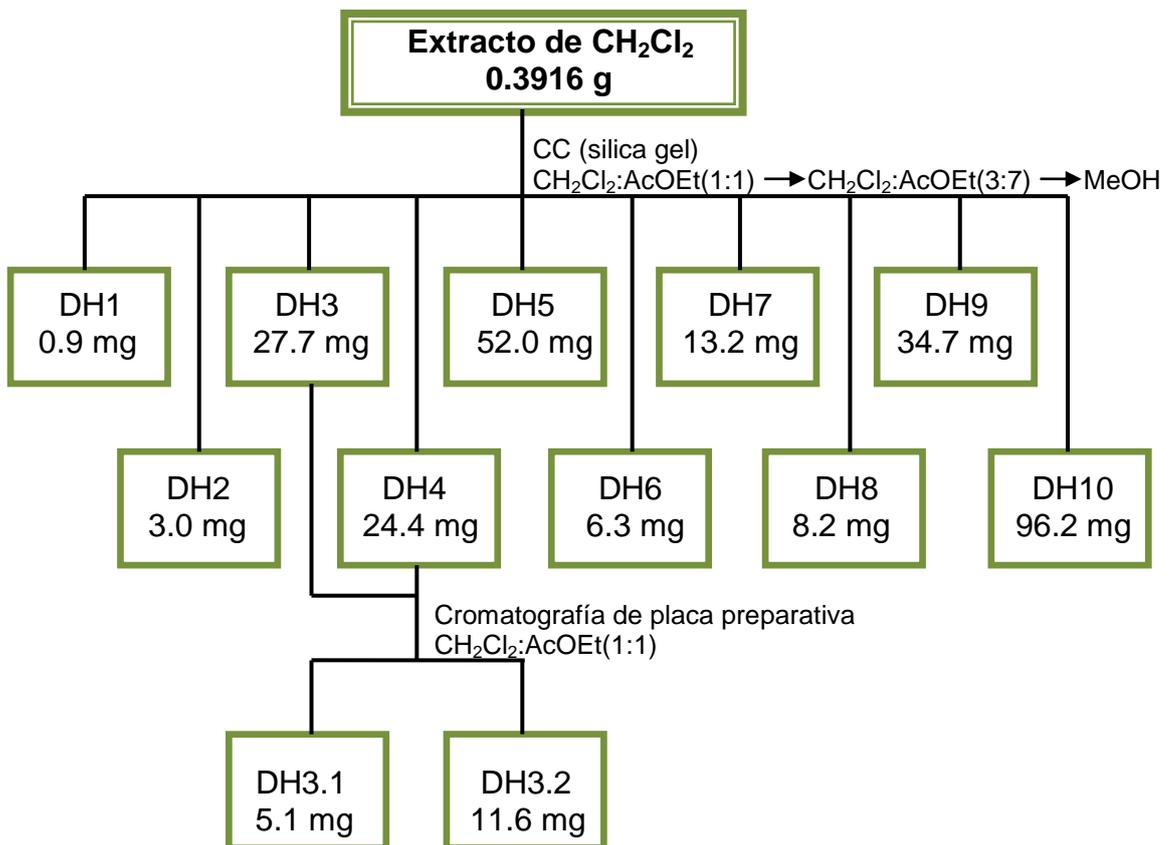
Esquema 5. Fraccionamiento del Extracto de Diclorometano de los tallos.

VII.3.3.4. Fraccionamiento del Extracto Diclorometano de las Hojas.

Este extracto se fracciona mediante CC empleando silica gel en una proporción silica/muestra 60:1 y utilizando inicialmente como eluyente una mezcla AcOEt:CH₂Cl₂ (1:1), luego una mezcla AcOEt:CH₂Cl₂ (7:3) y finalmente metanol anhidro para terminar de eluir los compuestos. Se colocaron 0.4200 g del extracto y se obtuvieron 50 fracciones que fueron monitoreadas mediante CCF para combinarlas finalmente en 10 fracciones.

La fracción DH3 y DH4 fueron monitoreadas mediante CCF y se observó el mismo perfil cromatográfico por lo que se unieron y posteriormente fue fraccionada mediante cromatografía de placa preparativa usando como eluyente una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (1:1). Se obtuvieron dos fracciones: DH3.1 y DH3.2.

El resto de las fracciones no continuaron estudiándose porque eran mezclas de varios compuestos y las cantidades obtenidas eran pequeñas.

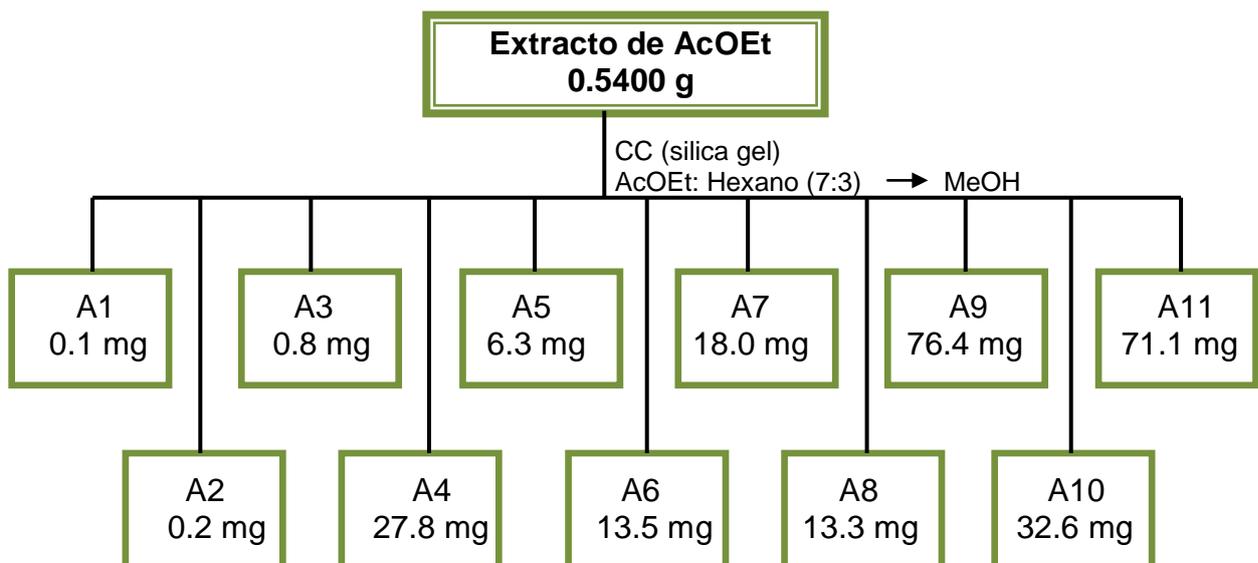


Esquema 6. Fraccionamiento del Extracto de Diclorometano de las hojas

VII.3.3.5. Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo de las Hojas y los Tallos.

Este extracto se fraccionó mediante la técnica de CC de fase normal sobre sílica gel, empleando una proporción sílica/muestra 100:1. Se colocaron 0.5400 g de muestra en forma seca adsorbida en una porción de sílica gel. Se empezó a desarrollar la columna empleando como eluyente una mezcla AcOEt:Hexano (7:3), se aumentó gradualmente la polaridad y finalmente metanol anhidro. Se obtuvo un total de 26 fracciones las cuales fueron monitoreadas mediante CCF y se combinaron finalmente en 11 fracciones: A1 (2), A2 (3), A3 (4), A4 (5-9), A5 (10-13), A6 (14-16), A7 (17-19), A8 (21-23), A9 (24), A10 (25) y A11 (26).

Las primeras tres fracciones se observaban puras en el perfil cromatográfico pero se aislaron en mínimas cantidades por lo que no fue posible tomar sus espectros y así caracterizarlos. El resto de las fracciones obtenidas eran mezclas pero no pudieron separarse por no poseer cantidad suficiente.



Esquema 7. Fraccionamiento del Extracto de Acetato de Etilo de las hojas y tallos.

VII.3.4. Características y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de los tallos de *croton pungens*.

β -sitosterol (I). Aceite incoloro (55.3 mg; 0.0183 %) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.52 (m, H-3), 5.32 (br s, H-6), 0.66 (s, H-18), 1.24 (s, H-19), 0.99 (s, H-21), 0.81 (d, H-26), 0.8342 (s, H-27), 0.86 (d, H-28). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 37.32 (C-1), 31.64 (C-2), 71.95 (C-3), 42.28 (C-4), 140.78 (C-5), 121.81 (C-6), 31.99 (C-7), 31.99 (C-8), 50.23 (C-9), 36.58 (C-10), 21.17 (C-11), 39.86 (C-12), 42.41 (C-13), 56.85 (C-14), 24.39 (C-15), 28.32 (C-16), 56.16 (C-17), 11.93 (C-18), 19.45 (C-19), 36.22 (C-20), 18.85 (C-21), 34.05 (C-22), 26.19 (C-23), 45.93 (C-24), 19.88 (C-26), 19.12 (C-27), 23.16 (C-28), 12.05 (C-29).

VII.3.5. Características y datos espectroscopicos de los compuestos aislados de las hojas de *croton pungens*.

Fitol (VII). Aceite amarillo (9.4 mg; 0.0057 %) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.13 (d, H-1), 5.34 (m, H-2), 1.64 (s, H-3), 2.3 (t, H-4), 0.81-0.88 (m, H-16, H-17, H-18, H-19, CH_3) 0.91-1.61 (m, CH, CH_2). RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 59.46 (C-1), 123.14 (C-2), 140.33 (C-3), 39.94 (C-4), 25.20 (C-5), 36.73 (C-6), 32.86 (C-7), 37.36 (C-8), 24.54 (C-9) 37.43 (C-10), 32.76 (C-11), 37.49 (C-12), 24.86 (C-13), 39.43 (C-14), 28.04 (C-15), 22.69 (C-16), 22.78 (C-17), 19.81 (C-18), 19.81 (C-19), 16.23 (C-20).

***nor-ent-kaurano* (VIII).** Aceite amarillo (17.8 mg; 0.0109%) RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.77 (H-19), 0.80 (H-17) 0.85 (H-18), .RMN ^{13}C (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 40.38 (C-1), 18.1 (C-2), 37.52 (C-3), 33.34 (C-4), 56.15 (C-5), 19.30 (C-6), 41.96 (C-7), 42.6 (C-8), 55.0 (C-9), 39.51 (C-10), 18.61 (C-11), 29.78 (C-12), 48.03 (C-13), 41.05 (C-14), 55.23 (C-15), 29.8 (C-16), 33.69 (C-17), 21.69 (C-18), 18.10 (C-19).

VII.3.6. Evaluación Toxicológica y Farmacológica

Se determinó la dosis tóxica 50 (DT₅₀) del extracto acuoso de las hojas de *Croton pungens* y su posible actividad analgésica. El estudio de la toxicidad se evaluó por el método de Lichtfield y Wilcoxon (1949) con modificaciones establecidas por la OMS (TDR/205). En la evaluación de la actividad analgésica se utilizó el método térmico establecido por Davies (1946) y el método químico descrito por Lima y col., (2005).

VII.3.6.1 Determinación de la dosis tóxica 50 (DT₅₀).

Se utilizaron ratones de la cepa NIH, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" con pesos comprendidos entre 18-20 g de ambos sexos, los cuales tuvieron libre acceso al agua y a los alimentos hasta el día del ensayo. Dichos ratones se dividieron en 5 grupos de 5 ratones cada uno, a 4 de estos grupos se les administró vía oral dosis crecientes (0.5, 1.5, 2.0 y 4.0 g/Kg) del extracto acuoso de *Croton pungens*, correspondiendo a cada grupo una dosis diferente, y el último grupo fue el grupo control, administrándosele agua destilada.

Todas las soluciones fueron administradas en un volumen requisito de 0,1 mL por cada 10 g de peso de ratón. Luego de administrar el extracto en estudio a cada grupo de ratones, se procedió a realizar las observaciones de los efectos producidos en cada animal a los 10, 30, 60, 90 minutos y a las 24 horas respectivamente.

Basados en las observaciones realizadas se determinó cual era el efecto tóxico característico, más frecuente y reversible observado en los ratones con

todas las dosis. Con el efecto tóxico característico seleccionado se procedió a obtener la DT_{50} utilizando el método de Probit®. Se realizaron los gráficos correspondientes a efecto tóxico en función de la dosis y tiempo de observación para obtener el tiempo de efecto pico (TEP).

VII.3.6.2. Determinación de la actividad analgésica del extracto acuoso de *Croton pungens* en ratones BALB/c.

Se utilizaron un total de 20 ratones macho de la cepa NIH para el ensayo del método térmico y 20 ratones para la evaluación del efecto del ácido acético al 6% sobre el síndrome de contorsión inducido por el extracto acuoso en estudio (método químico). Los animales tenían un peso comprendido entre 20 a 25 g, y fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Los animales tuvieron libre acceso al agua y a los alimentos hasta el día del ensayo.

En la evaluación de la actividad analgésica se utilizó el **Método Térmico**, donde se mide el tiempo de retiro de la cola, ante un estímulo calórico. Se hizo una selección previa de los ratones a utilizar, tomando en cuenta que solo podían incluirse, aquellos animales que tuviesen un período de latencia de retirada de la cola entre 5 y 7 segundos. Para tal fin, los animales fueron colocados en un analgesímetro (modelo LE-7106 de LETICA®, España), el cual se ajustó a una intensidad de 6 Voltios. De ésta manera, se obtuvo que el período de latencia promedio fue de $(2,31 \pm 0,23)$ seg.

Posteriormente, los ratones seleccionados se dividieron en 4 grupos de 5 animales cada uno y fueron tratados de la siguiente manera: Grupo I, Agua destilada (Control), Grupo II, sulfato de morfina (3 mg/Kg, s.c.), Grupo III: aspirina

(200 mg/kg, v.o.) y Grupo IV: extracto acuoso de *Croton pungens* (0.5113 g/Kg, ½ DT₅₀, v.o.). En todos los casos se administró un volumen requisito de 0,1 mL/10 g de peso corporal.

Luego se procedió a determinar el tiempo de reacción para cada ratón, es decir, el tiempo de la retirada de la cola, a los 15, 30, 60 y 90 minutos siguientes a la administración de cada compuesto. Se tomó 15 segundos como el tiempo máximo, para no exponer a los ratones a daño por la fuente de luz radiante. En el caso del extracto acuoso de *Croton pungens*, el tiempo de retiro de la cola fue medido 30 minutos post administración del extracto.

En la evaluación de la actividad analgésica también se utilizó el **Método químico**, donde se evalúa la contracción intestinal inducida por la administración intraperitoneal de ácido acético al 0.6 %. Los 20 ratones destinados para este ensayo, fueron divididos en 4 grupos de 5 animales cada uno y tratados de la siguiente manera: Grupo I, agua destilada (Control, v.o.), Grupo II, sulfato de morfina (3 mg/Kg, s.c.), el Grupo III, aspirina (200 mg/kg, v.o.) y el grupo IV: extracto acuoso de *Croton pungens* (1/2 DT₅₀, v.o.). A cada grupo se le administró ácido acético al 0,6% (0,1 mL/g de peso) y se procedió a registrar el numero de contorsiones intestinales presentes en 30 minutos. En el caso del extracto acuoso de *C. pungens* se administró el ácido acético 30 minutos post-administración del extracto acuoso.



Figura 3. Contracción intestinal

VII.3.6.3. Análisis Estadísticos.

Para determinar la DT_{50} y sus límites fiduciaros, se utilizó el método de Probit®. Para hacer la comparación entre todos los grupos en los ensayos de actividad analgésica, se aplicó la prueba de análisis de varianza descrito por Student-Newman-Keuls (GraphPad InStat®) para datos no apareados, tomando en cuenta un valor de $p < 0,05$.

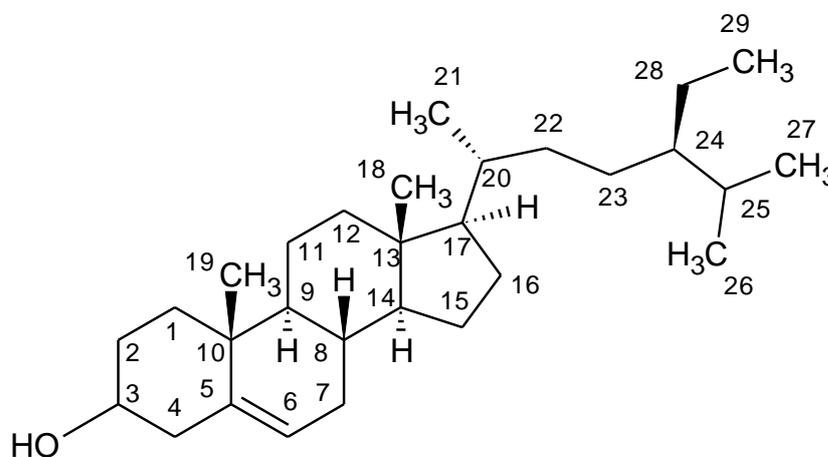
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Estudios Fitoquímicos

La identificación y caracterización de los compuestos aislados de los tallos y hojas de la planta *Croton pungens* se llevo a cabo por medio de diferentes técnicas espectroscópicas: RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135, HETCOR y CG/EM. Se muestran las comparaciones respectivas con los datos espectroscópicos reportados en la literatura. Los espectros de cada compuesto aislado se encuentran en la sección de anexos.

VIII.1.1. Compuesto I: β -sitosterol (24-etil-3 β -ol-5-colesteno)

Este compuesto fue aislado del extracto de hexano como un aceite incoloro, soluble en CH_2Cl_2 . Se obtuvo una cantidad de 55.3 mg lo que representa un 0.0183% del material vegetal inicial y un 5.53% del extracto de hexano colocado en la columna cromatográfica. En CCF mostro una mancha con $R_f=2.1$ al ser eluida en cloroformo, la cual se torno de color azul al revelado con p-anisaldehído.



Compuesto I. β -sitosterol (I)

El espectro de RMN ^1H (anexo 1a) mostró señales características de protones alifáticos y olefínicos, la señal del protón olefínico se observó en 5.32 ppm (anexo 1b). También presentó dos señales singletes, las cuales se evidenciaron a δ : 0.66 y 1.24 ppm (anexo 1c); las mismas indicaron la presencia de dos metilos singletes en la estructura. En la zona de campo medio del espectro se observó un multiplete centrado en 3.52 ppm que integra para un protón.

Tabla 1. Datos de RMN ^1H para el β -sitoesterol

Protón	δ Experimental ^a	δ Reportado ^{b [42]}
3	3.52 m	3.52 m
6	5.32 br s	5.36 br s
18	0.66 s	0.68 s
19	1.24 s	1.01 s
21	0.99	0.92 (d, 6.4)
26	0.81 d	0.81 (d, 6.5)
27	0.83	0.83 (d, 6.5)
29	0.86	0.84 (t, 7.5)

^a CDCl_3 , 270 MHz

^b CDCl_3 , 400 MHz

El espectro de ^{13}C (anexo 1d) analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 1f, 1g) mostró que la estructura presentaba 28 átomos de carbono, discriminados en seis grupos metilos (CH_3) δ ppm: 11.9, 12.0, 18.8, 19.1, 19.4, 19.9. Once metilenos (CH_2) δ : 21.2, 23.2, 24.4, 26.2, 28.3, 31.6, 32.0, 34.0, 37.3, 39.9, 42.3. Ocho metinos (CH) δ : 32.0, 36.2, 45.9, 50.2, 56.2, 56.8, 72.0, 121.8 y tres carbonos cuaternarios (C) δ : 36.6, 42.4, 140.8. Este análisis permitió la identificación de dos señales de naturaleza olefínica (121.8, 140.8) y un carbono oxigenado (72.0).

En el espectro de ^{13}C obtenido también se observan algunas señales considerablemente más intensas que el resto, lo que indica una mezcla de compuestos, las mismas son claramente diferenciables y atribuidas a una estructura tipo ácido graso, debido a señales características observadas en 179.4 ppm que corresponde al carbono carboxilo, una señal muy intensa en 29.4 ppm que implica varios metilenos equivalentes y 14.2 ppm correspondiente a un grupo metilo. La literatura reporta que los esteroides son difíciles de obtener en estado puro ^[43,44].

Realizando el análisis de las señales antes descritas se considero un esteroide, el análisis del espectro de HETCOR (anexo 1j) permitió establecer los hidrógenos correspondientes a cada carbono y la comparación de los espectros con estructuras reportadas en el género *Croton* (Tabla 1 y 2), sugirió que el compuesto aislado presenta la estructura del β -sitosterol (I) aun cuando este presenta 29 átomos de carbono y en la estructura aislada solo se identificaron 28 átomos de carbono. Sin embargo todos los desplazamientos de los 28 átomos de carbono de la estructura analizada concuerdan con los reportados en la literatura para el β -sitosterol, también se comparo el compuesto aislado con muestras auténticas de esteroides mediante CCF mostrando una mancha con $R_f = 2.0$ al ser eluida en cloroformo, la cual se torno de color azul al revelado con p-anisaldehido, dicho perfil cromatográfico era equivalente al del β -sitosterol.

Tabla 2. Datos de RMN ^{13}C para el β -sitosterol

Carbono	δ Experimental^a	δ Reportado^{b [42]}
1	37.3	37.3
2	31.6	31.6
3	72.0	71.8
4	42.3	42.2
5	140.8	140.8
6	121.8	121.7
7	32.0	31.9
8	32.0	31.9
9	50.2	51.2
10	36.6	36.5
11	21.2	21.1
12	39.9	39.8
13	42.4	42.3
14	56.8	56.8
15	24.4	24.3
16	28.3	28.3
17	56.2	56.0
18	11.9	11.9
19	19.4	19.4
20	36.2	36.2
21	18.8	18.8
22	34.0	33.9
23	26.2	26.1
24	45.9	45.9
25	-	29.2
26	19.9	19.8
27	19.1	19.3
28	23.2	23.1
29	12.0	12.2

^a CDCl_3 , 270 MHz

^b CDCl_3 , 400 MHz

El compuesto ha sido previamente reportado tanto en la familia Euphorbiaceae como en el género *Croton*, ya que ha sido aislado de especies como *Croton cuneatus* ^[12,13] y *Croton zambesicus* ^[14].

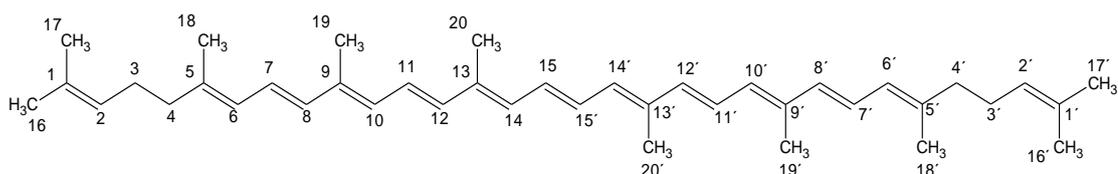
VIII.1.2. Compuesto II,III,IV,V y VI.

Los compuestos fueron aislados del extracto de hexano de las hojas. El compuesto II se aisló como un aceite amarillo y se obtuvo 288.2 mg lo que representa un 0.18% del material vegetal inicial y un 1.83% del extracto de hexano colocado en la columna. El espectro de RMN ^1H (anexo 2a) presentó una serie de señales alifáticas entre la zona 0.8 - 2.8 ppm y a 5.34 ppm un multiplete que indica la presencia de protones olefínicos. La muestra fue sometida a un análisis de CG/EM, el cromatograma (anexo 2b) indicó que contenía impurezas, según la cromatografía de gases, las impurezas con mayor proporción presentaban M^+ de 269 m/z (anexo 2c) y 294 m/z (anexo 2d) respectivamente. El compuesto mayoritario según la cromatografía de gases, presentó un M^+ de 410 m/z.

El compuesto III se obtuvo como un aceite marrón, en una cantidad de 288.2 mg lo que representa un 12.8 % del extracto de hexano colocado en la columna y un 0.18% del material vegetal inicial. El espectro de RMN ^1H (anexo 3a) presentó una serie de señales alifáticas entre la zona 0.8 - 2.8 ppm y a 5.34 ppm un multiplete que indica la presencia de protones olefínicos (anexo 3b). El espectro de ^{13}C (anexo 3d), el cual fue analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 3f) mostró que la estructura analizada presentaba 13 átomos de carbono discriminados en dos grupos metilos (CH_3) δ : 16.1, 23.5. Seis metilenos (CH_2) δ : 26.5, 26.7, 26.8, 32.0, 32.3, 39.8. Tres metinos (CH) δ : 124.3, 124.5, 125.1 y dos carbonos cuaternarios de naturaleza olefínica (C) δ : 135.3, 135.4. Realizando el análisis de las señales antes descritas, se considero inicialmente una estructura tipo carotenoide como la del licopeno, pues se observan dos tipos de señales diferentes para grupos metilos, una que corresponde a los metilos medios (metilos ubicados sobre los C-5, C-9 y C-13) y otra correspondiente a los metilos terminales, debido a esta observación se

descarta un anillo tipo β -caroteno porque el mismo presenta metilos con otros desplazamientos que difieren de los observados en el espectro.

Además de las señales mencionadas anteriormente en el espectro de ^{13}C también se observaron otras señales de menor intensidad que pertenecen a un contaminante; un metilo (CH_3) a 25.8 ppm, tres metilenos (CH_2) δ : 29.8, 29.2 y 59.1 ppm, siendo esta última señal metilénica oxigenada; un carbono cuaternario de naturaleza alifática en 17.8 ppm.

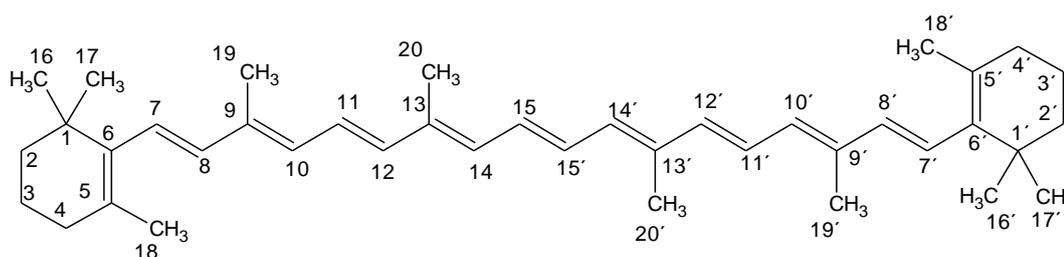


Licopeno.

La muestra también fue sometida a un análisis de CG/EM, el cromatograma (anexo 3g) indico que la muestra es una mezcla compleja de compuestos, unos en mayor proporción que otros, la biblioteca del software del equipo indico que correspondían a compuesto tipo alcoholes, ácidos carboxílicos, hidrocarburos cíclicos y alifático (anexos 3h,3i,3j). Debido a este análisis se descarto la posibilidad de tener un compuesto del tipo carotenoide como se propuso en un principio pues los espectros de masas mostraron M^+ 194 de m/z correspondientes a una fórmula molecular de $\text{C}_{14}\text{H}_{26}$ que difiere con los datos reportados en la literatura para estructuras de tipo carotenoide.

El compuesto V fue aislado como un aceite marrón y se obtuvo una cantidad de 117.7 mg lo que representa un 5.24% del extracto de hexano colocado y un 0.84% del material vegetal inicial. El espectro de RMN ^1H (anexo 5a) presentó señales características de protones alifáticos entre la zona 0.8 - 2.8 ppm, también se observó una señal en 5.32 ppm (anexo 5b) que indica la presencia de protones olefínicos.

El espectro de ^{13}C (anexo 5d), el cual fue analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 5e) mostró señales características de metilos (CH_3) tres tipos de señales diferentes, también se observaron más señales metilénicas (CH_2) que en el espectro anterior y metinos (CH), estos últimos de naturaleza olefínica (128.3 – 124.3 ppm). El análisis previamente descrito de ^{13}C y DEPT sugiere una molécula de tipo carotenoide como la del β -caroteno debido a la cantidad de señales metilénicas observadas y los diferentes tipos de metilos. Además se observan una serie de señales en el espectro de ^{13}C de menor intensidad que pertenecen a un contaminante, entre ellos un metino oxigenado.



β -Caroteno

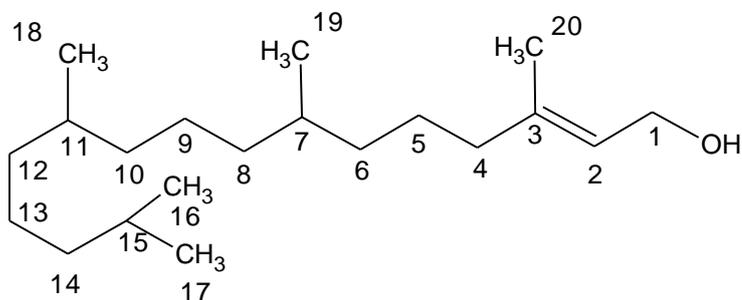
La muestra fue sometida a un análisis de CG/EM, el cromatograma (anexo 5f) indico que contenía un importante porcentaje de impurezas, el compuesto mayoritario según la cromatografía de gases presento un M^+ de 267 m/z (anexo 5g) el cual no corresponde a estructuras de tipo carotenoide al comparar con los

datos reportados en la literatura, por lo que finalmente se descarto el tipo de estructura inicialmente sugerida.

Se obtuvo 34.4 mg del compuesto IV lo que representa un 1.52% del extracto de hexano utilizado y un 0.02% del material vegetal inicial, se aisló como un aceite marrón (anexos 4a y 4b). Finalmente el compuesto VI se obtuvo como un aceite marrón y se peso 34.1 mg del mismo, lo que representa un 0.02% del material vegetal inicial y un 1.52% del extracto de hexano colocado en la columna (anexo 6a). En total se obtuvieron 5 compuestos los cuales no pudieron ser caracterizados debido a que son mezclas complejas y las mismas deben ser separadas por otra técnica.

VIII.1.3. Compuesto VII: Fitol (3, 7, 11, 15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol)

El compuesto fue aislado del extracto de hexano de las hojas como un aceite amarillo. Se obtuvo una cantidad de 9.4 mg lo que representa un 0.0057 % del material vegetal inicial y un 0.42 % del extracto de hexano colocado en la columna.



Compuesto VII. Fitol (VII)

El espectro de RMN ^1H (anexo 7a) presentó una serie de señales alifáticas entre la zona de 0.83-2.81 ppm sin una multiplicidad definida, las únicas señales con multiplicidad definida se observaron a 0.88 ppm un doblete con $J = 7.3$ Hz que integra para seis protones (anexo 7b) y a 5.33 ppm un multiplete que integra para un protón y señala la presencia de un protón olefínico.

Tabla 3. Datos de RMN ^1H para el Fitol

Protón	δ Experimental ^a	δ Reportado ^{b [45]}
1	4.13 (d)	4.16 (d)
2	5.34 (m)	5.42
3	1.64 (s)	1.68 (s)
4	2.30 (t)	2.00 (t)
16,17,18,19	0.81-0.88 (m)	0.88-0.85 (m)

^a CDCl_3 , 270 MHz ^b CDCl_3 , 500 MHz

El espectro de ^{13}C (anexo 7c), el cual fue analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 7e) mostró 20 resonancias de carbonos que se discriminaron de acuerdo a su multiplicidad y sus desplazamientos químicos en cinco metilos (CH_3) a δ : 16.23, 19.81(x2), 22.69, 22.78. Se identificaron nueve señales metilénicas (CH_2) a δ : 24.54, 24.86, 25.20, 36.73, 37.36, 37.43, 37.49, 39.43, 39.94, igualmente se identificó una señal metilénica oxigenada a 59.46 ppm. Cuatro metinos (CH) entre ellos uno de naturaleza olefínica (123.14 ppm), fueron igualmente identificados a 32.86, 32.76, 28.04 y 123.14 ppm y finalmente un solo carbono cuaternario de naturaleza olefínica se evidencio en los espectros observados a 140.33 ppm. El análisis previamente descrito de ^{13}C y DEPT permitió establecer una formula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$ que sugiere una molécula con una sola insaturación, que evidentemente está constituida por una olefina trisustituida. Al comparar los resultados obtenidos con reportes en la literatura y

de CCF con una muestra auténtica, señaló que el compuesto aislado presenta la estructura del fitol (VII).

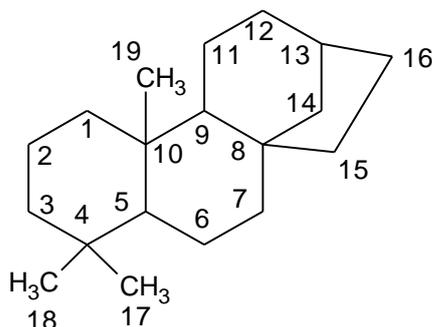
Tabla 4. Datos de RMN ^{13}C para el Fitol

Carbono	δ Experimental ^a	δ Reportado ^{b [46]}
1	59.5	59.4
2	123.1	123.1
3	140.3	140.3
4	39.9	39.9
5	25.2	25.1
6	36.7	36.6
7	32.9	32.8
8	37.6	37.3
9	24.5	24.5
10	37.4	37.4
11	32.8	32.7
12	37.5	37.3
13	24.9	24.8
14	39.4	39.4
15	28.0	28.0
16	22.7	22.6
17	22.8	22.7
18	19.8	19.7
19	19.8	19.7
20	16.2	16.2

^a CDCl_3 , 270 MHz. ^b CDCl_3 , 100 MHz.

VIII.1.4. Compuesto VIII: Nor-ent-Kaurano.

Este compuesto se aisló del extracto de hexano de las hojas como un aceite amarillo, el cual es soluble en CH_2Cl_2 . Se obtuvo una cantidad de 17.8 mg lo que representa 0.0109% de los hojas empleadas como material vegetal inicial y un 0.79 % del extracto de hexano colocado en la columna.



Compuesto VIII. Nor-ent-Kaurano (VIII)

El espectro de RMN de ^1H (anexo 8a), mostró solo señales de naturaleza alifática, características de estructuras terpenoides. Tres señales singletes integrando cada una para tres protones se evidenciaron a δ : 0.77, 0.80 y 0.85 ppm (anexo 8c); las mismas indicaron la presencia de tres metilos singletes en la estructura. Una serie de señales con multiplicidad compleja se observaron entre 0.87-2.36 ppm, indicando diferentes tipos de acoplamientos entre los protones presentes en el compuesto. Una señal compleja integrando para dos protones se presentó un poco más desapantallada a 3.87 ppm. El espectro de ^{13}C (anexo 8d, 8e) analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 8f) mostró que la estructura analizada presentaba 19 átomos de carbono, discriminados en tres grupos metilos (CH_3) δ : 18.1, 21.7, 33.7. Diez metilenos (CH_2) δ : 18.6, 18.6, 19.3, 29.8 (x2), 37.5, 40.4, 40.9, 42.0, 41.0 y 55.2; tres metinos (CH) δ : 48.0, 56.2, 55.0 y tres carbonos cuaternarios de naturaleza alifática (C) δ : 33.3, 39.5, 42.6. Este análisis permitió establecer una fórmula de $\text{C}_{19}\text{H}_{32}$, con la cual se obtiene un número de cuatro insaturaciones en la estructura. Realizando el análisis de las señales antes descritas, se consideró un hidrocarburo de tipo diterpenico, el cual consta de 4 anillos. El análisis del espectro HETCOR (anexo 8h) permitió establecer los hidrógenos correspondientes a cada carbono y la comparación de los espectros con estructuras reportadas en el género *Croton* ^[47,48,49], sugirió que el compuesto aislado presenta la estructura de un *nor-ent-kaurano* (VIII), los cuales se han sugerido sean intermediarios en la biosíntesis de las giberellinas.

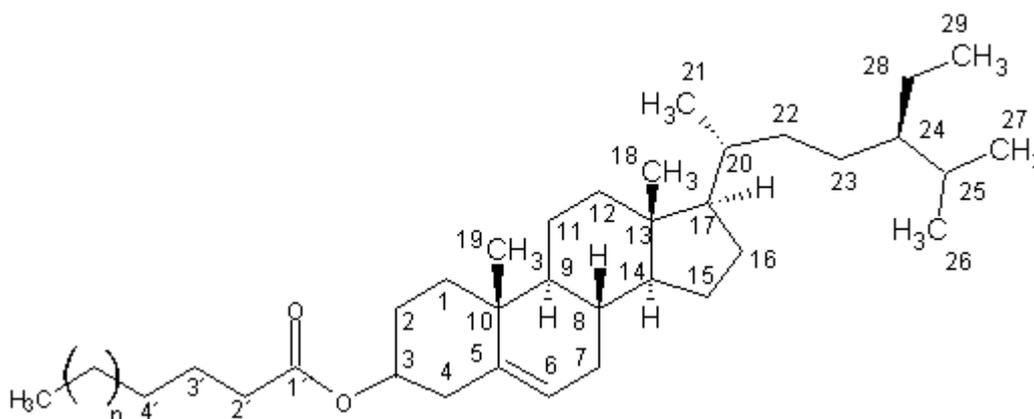
Tabla 5. Datos de RMN ^{13}C para el *nor-ent*-kaurano

Carbono	δ Experimental ^a	δ Reportado ^[48]
1	40.4	40.4
2	18.6	18.3
3	37.5	38.1
4	33.3	33.2
5	56.2	56.0
6	19.3	20.7
7	42.0	42.0
8	42.6	45.1
9	55.0	56.2
10	39.5	39.3
11	18.6	18.6
12	29.8	31.3
13	48.0	41.4
14	41.0	40.9
15	55.2	44.7
16	29.8	45.3
17	33.7	33.6
18	21.7	21.6
19	18.1	17.4

^a CDCl_3 , 270 MHz

VIII.1.5. Compuesto IX: Ester de cadena larga del β -sitosterol

Este compuesto se aisló del extracto de hexano de las hojas como un aceite amarillo, el cual es soluble en CH_2Cl_2 . Se obtuvo una cantidad de 18.4 mg lo que representa 0.01% de los hojas empleadas como material vegetal inicial y un 0.82% del extracto de hexano sembrado en la columna.



Compuesto IX. Ester de cadena larga del β -sitosterol

En el espectro de RMN ^1H (anexo 9a) se observan señales de protones alifáticos y olefínicos, la señal del protón olefínico se observó en 5.34 ppm. También presentó dos señales singletes, las cuales se evidenciaron a δ : 0.66 y 1.24 ppm (anexo 9b); lo que indicó la presencia de dos metilos singletes en la estructura. En la zona de campo medio del espectro se observa un multiplete centrado en 3.55 pm que integra para un protón y corresponde al H-3 característico del β -sitosterol, también se observa un multiplete centrado en 4.38 ppm que integra para un protón, y parece ser una impureza

El espectro de ^{13}C (anexo 9d) analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135 (anexo 9f) mostró que la estructura presentaba 34 átomos de carbono, discriminados en siete grupos metilos (CH_3) δ : 11.9, 12.1, 14.2, 18.9, 19.1, 19.4, 19.9; catorce metilenos (CH_2) δ : 22.8, 23.1, 25.0, 25.3, 26.1, 28.3, 29.5, 29.8, 32.0, 34.0, 34.4, 37.3, 39.0, 39.8; ocho metinos (CH) δ : 29.2, 31.9, 36.2, 45.9, 50.2, 56.1, 56.9, 76.6 y cinco carbonos cuaternarios (C) δ : 36.8, 42.4, 122.2, 140.4, 174.6, dos de estas señales son de naturaleza olefínica (122.2, 140.4). Al analizar estas señales se observó que 29 de las mismas coincidían perfectamente con el β -sitosterol, la única diferencia entre ellos eran los desplazamientos

correspondientes al C-3 pues aparece mas desplazado a 76.6 ppm y también se observo una nueva señal en 174.6 que corresponde a un carbono carboxilo. Este análisis permitió sugerir que el compuesto aislado presenta la estructura del β -sitosterol pero que en el C-3 se encuentra unido un grupo ester en lugar del grupo hidroxilo, al cual corresponden las cinco señales restantes (14.2, 25.3, 29.5, 29.8, 174.6 ppm) que se observan en el espectro. Se comparo el compuesto aislado con una muestra autentica del β -sitosterol mediante CCF mostrando RF diferentes. Finalmente la comparación de los espectros con estructuras reportadas en la literatura de productos naturales ^[50,51,52,53], permitió proponer que el compuesto aislado presenta la estructura de un ester de cadena larga del β -sitosterol, sin embargo debido a la falta de un espectro de masas no se pudo llegar a la estructura exacta del compuesto aislado.

Tabla 6. Datos de RMN ^{13}C para el Compuesto IX

Carbono	δ Experimental^a	δ Reportado β-sitosterol^{b [42]}
1	37.3	37.3
2	34.4	31.6
3	101.3	71.8
4	39.0	42.2
5	140.4	140.8
6	122.2	121.7
7	32.0	31.9
8	31.9	31.9
9	50.2	51.2
10	36.8	36.5
11	22.8	21.1
12	39.8	39.8
13	42.4	42.3
14	56.9	56.8
15	25.0	24.3
16	28.3	28.3
17	56.1	56
18	11.9	11.9
19	19.4	19.4
20	36.2	36.2
21	18.9	18.8
22	34.0	33.9
23	26.1	26.1
24	45.9	45.9
25	29.2	29.2
26	19.9	19.8
27	19.1	19.3
28	23.1	23.1
29	12.1	12.2

^a CDCl_3 , 270 MHz^b CDCl_3 , 400 MHz

VIII.2 Discusión y resultados de la Evaluación Toxicológica y Farmacológica.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la dosis tóxica 50 (DT₅₀) del extracto acuoso de las hojas de *Croton pungens* y su posible actividad analgésica.

VIII.2.1. Determinación de la Dosis Tóxica 50 (DT₅₀).

Los efectos tóxicos observados fueron piloerección, micción y defecación, los cuales fueron reversibles, los mismos pueden asociarse a trastornos gastrointestinales. Se determinó que el efecto característico y que persistió en todas las dosis, fue la piloerección, el cual ocurrió a partir de la dosis de 1.5 g/Kg. No hubo muertes en ninguna de las dosis evaluadas, lo que indica buena seguridad para el uso de este extracto en otras pruebas *in vivo*.

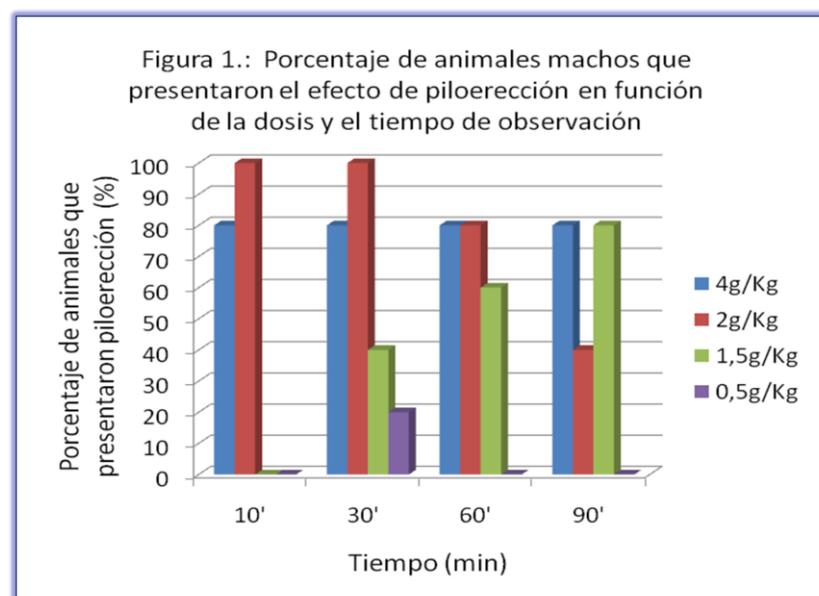
Tabla 7. Determinación del efecto tóxico

Dosis	Efectos Tóxicos	Muertes (10 min – 24 h)
4g/Kg	Piloerección, defecación y micción	No
2g/Kg	Piloerección y micción	No
1,5g/Kg	Piloerección y micción	No
0,5g/Kg	-----	No

Para la determinación de la DT₅₀ se utilizó el efecto de piloerección por ser el efecto tóxico mas representativo, en la figura 4 se observa el porcentaje de

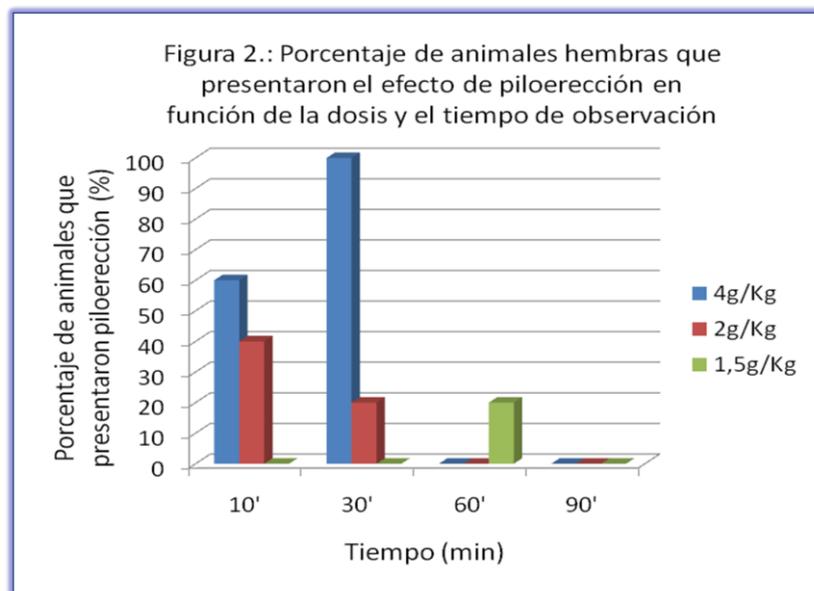
ratones machos que presentaron el efecto toxico de piloerección a las diferentes dosis y tiempos (10, 30, 60 y 90 min) ensayados. Se puede apreciar que al suministrar a los animales de experimentación una dosis de 0.5 g/Kg el efecto se observo transcurridos 30 min de la aplicación de dicha dosis, en el resto de los tiempos ensayados no se observó reacción. Al suministrar a los animales una dosis de 1.5 g/Kg el efecto de piloerección se comenzó a observar a los 30 min en un 40% de los ratones y a medida que se incrementó el tiempo aumento el porcentaje de ratones que presentaban dicho efecto en 60% (60 min) y en 80% (90 min), mientras que al suministrar a los ratones una dosis de 2.0 g/Kg se observó el efecto de piloerección en el 100% de los ratones a los 10 y 30 min de ensayo, y el porcentaje de ratones que presentaron el efecto fue disminuyendo al pasar el tiempo, 80% (60 min) y 40% (90 min). Finalmente al aplicar a los ratones machos una dosis de 4.0 g/Kg del extracto acuoso de *Croton pungens* se observó que el efecto tóxico se mantuvo durante todo el tiempo de observación en el 80% de los ratones estudiados.

Figura 4. Porcentaje de animales machos que presentaron el efecto de piloerección en función de la dosis y el tiempo de observación.



En la figura 5 se observa el porcentaje de ratones hembras que presentaron el efecto tóxico de piloerección a las diferentes dosis y tiempos ensayados, en este caso se observó que los animales comenzaron a presentar el efecto tóxico al suministrarles una dosis de 1.5 g/Kg, pues con una dosis de 0.5 g/Kg no se observaron cambios. El efecto de piloerección se observó en el 20% de los animales de experimentación transcurridos 60 min al aplicarles una dosis de 1.5 g/Kg del extracto acuoso de *Croton pungens*, mientras que al suministrarles una dosis de 2.0 g/Kg del extracto en estudio se observó el efecto tóxico en el 40% de los animales transcurridos 10 min y en el 20% transcurridos 30 min. Finalmente al ensayar la dosis de 4.0 g/Kg el 100% de los ratones presentó el efecto de piloerección.

Figura 5. Porcentaje de animales hembras que presentaron el efecto de piloerección en función de la dosis y el tiempo de observación.



La dosis tóxica cincuenta DT_{50} obtenida en la determinación de la toxicidad aguda fue de 1.0226 g/Kg en machos y 2.094 g/Kg en hembras. En base a estos resultados podemos evidenciar que la planta es segura de acuerdo a la OMS, y que la diferencia encontrada en la respuesta entre ambos géneros manifiesta las diferencias hormonales entre ellos, las hembras siempre presentan mayor resistencia.

VIII.2.2. Determinación de la actividad analgésica del extracto acuoso de *Croton pungens* en ratones BALB/c.

Se observó que a la dosis de 0.5113 g/Kg ($1/2 DT_{50}$) el extracto acuoso de *Croton pungens* no presentó actividad analgésica, ya que todos los animales continuaron presentando contorsión intestinal.

IX. CONCLUSIONES

En un primer estudio fitoquímico de los extractos apolares de los tallos y las hojas de *Croton pungens* se aislaron mediante técnicas cromatográficas y caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas nueve compuestos, de los cuales cuatro fueron identificados como: β -sitosterol (I), fitol (VII), *nor-ent*-kaurano (VIII) y para el último se sugirió una estructura tipo ester de cadena larga del β -sitosterol, los otros cinco eran mezclas complejas, el análisis de CG/EM indico que correspondían a compuesto tipo alcoholes, ácidos carboxílicos, hidrocarburos cíclicos y alifático. Estos compuestos han sido reportados previamente en la literatura de productos naturales, pero por primera vez para *Croton pungens*.

La evaluación toxicológica del extracto acuoso de las hojas de *Croton pungens* determinó que la planta es segura de acuerdo a la OMS para el uso de este extracto en otras pruebas *in vivo*. La dosis tóxica cincuenta DT_{50} determinada en la toxicidad aguda fue de 1.0226 g/Kg en machos y 2.094 g/Kg en hembras, no se observó letalidad a ninguna de las dosis ensayadas. Los efectos tóxicos observados fueron la piloerección, micción y defecación, los cuales fueron reversibles, siendo el efecto de piloerección el mas representativo.

En la evaluación de la actividad analgésica del extracto acuoso de *Croton pungens* mediante el método térmico y el método químico, se encontró que a la dosis de 0.5113 g/Kg ($1/2 DT_{50}$) el extracto no presentó actividad analgésica.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eisner T, Neimeyer H. 1996. Farmacos Naturales. Ciencia Hoy. 6
2. Ingrid, Roth y Helga. 2002. South American Medicinal Plants. Botany. Remedial Properties and General Use. 5-6
3. Salatino A, Faria M, Negri G. 2007. Traditional uses Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *J Brazil Chem Soc.* 18:11-23
4. Martínez M, Ramírez J, Durán R, Amiga E, García R, Cervantes A y Mejía R. 2002. Los géneros de la Familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional autónoma de México, Serie Botánica. 73: 155-281
5. Steinmann V. 2002. Diversidad y Endemismo de la Familia Euphorbiaceae en México.
6. www.dipbot.unict.it/sistemica-es/Euph_fam.html
7. <http://jehuite.blogspot.com/2008/08/euphorbiaceae-la-familia-de-la.html>
8. Salamanca G. La familia Euphorbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios.
9. www.ville-ge.ch/cjb/fdp/claves/pdf/euph.pdf
10. Chávez K. 2007. Aislamiento y caracterización de metabolitos presentes en las flores de *Croton caracasana* con posible actividad citotóxica. Tesis de Licenciatura en Química, Escuela de Química. UCV.
11. Maciel M, Martins J, Pinto A, Kaiser C, Esteres-Souza A, Echevarria A. 2007. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects

against ehrlich carcinoma and human K562 Leukemia cells. *J Brazil Chem Soc.* 18:391-396

12. Suárez A, Blanco Z, Compagnone R, Salazar-Bookaman M, Zapata V, Alvarado C. 2005. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology.* 105:99-101

13. Torrico F, Cepeda M, Guerrero G, Melendez F, Blanco Z, Canelón D, Díaz B, Compagnone R, Suárez A. 2007. Hypoglycaemic effects of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 17:166-169.

14. Okokon J, Nwafor P. 2009. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. *Journal of Ethnopharmacology.* 121:74-78.

15. Bacceli C, Navarro I, Block S, Abad A, Morel N, Quetin-Leclereq J. 2007. Vasorelaxant activity of diterpenes from *Croton zambesicus* and synthetic trachylobanes and their structure-Activity relationships. *J Nat Prod.* 70:910-917.

16. Kuo P, Shon Y, Yang M, Wang S, Thang T, Dung N, Chiang P, Lee K, Lee E, Wu T. 2007. Crotonkinins A y B and related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as anti-inflammatory and antitumor agents. *J Nat Prod.* 70: 1906-1909.

17. Thuong P, Dao T, Pham T, Nguyen P, Le T, Lee K, Oh W. 2009. Crotonkinensin A y B, diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. *J Nat Prod.* 72: 2040-2042.

18. Giang P, Lee J, Son P. 2004. Flavonoid Glucosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gapnep, Euphorbiaceae. *Journal of Chemistry.* 42: 125-128.

19. De Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, Iorizzi M. 2008. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* an evaluation of their antioxidant activity. *Molecules.* 13: 1219-1229.

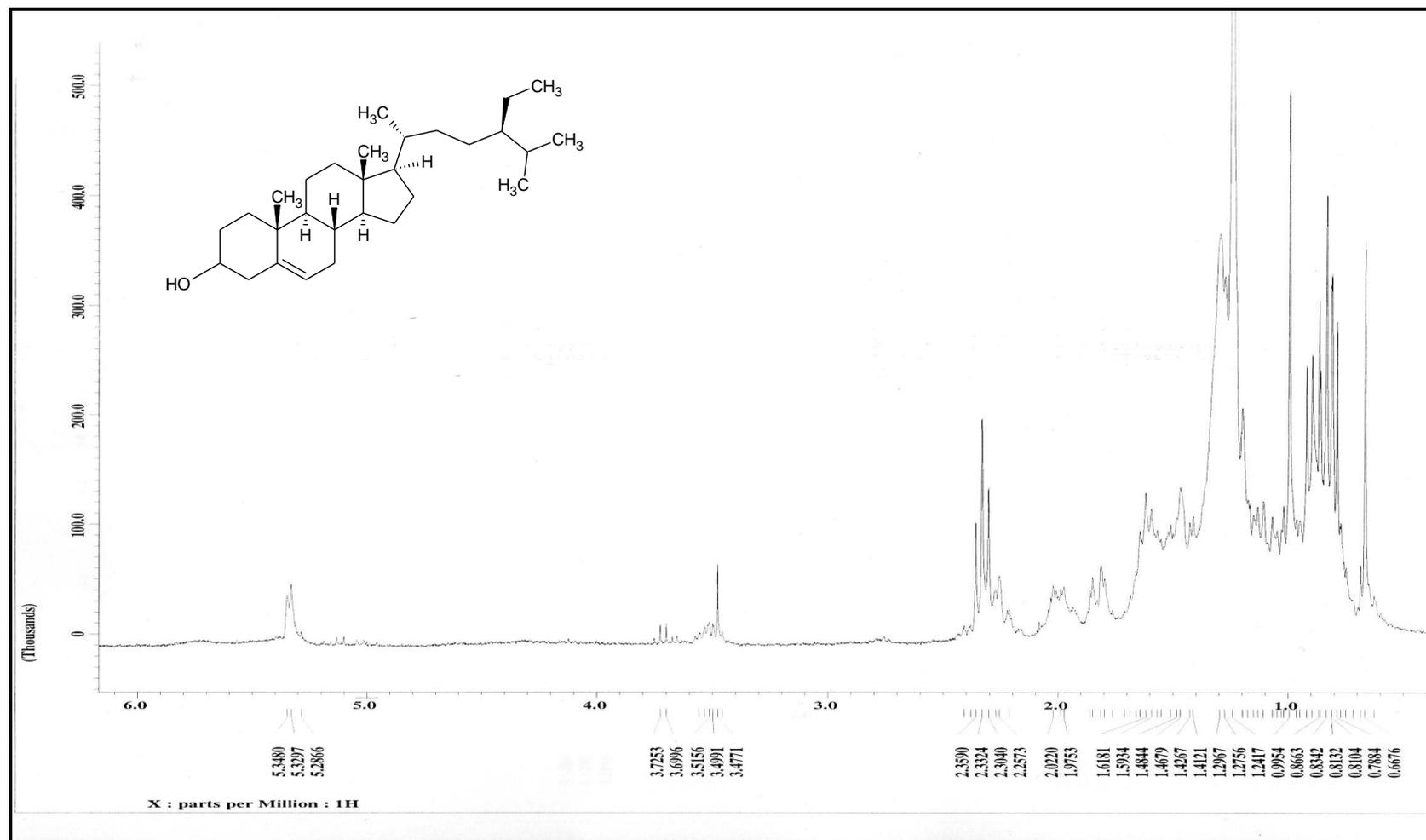
20. Aguilar-Guadarrama B, Rios M. Three new sesquiterpenes from *Croton arboreous*. 2004. *J Nat Prod.* 67: 914-917.
21. Palmeira S, Conserva L, Silveira E. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. 2005. *J Braz Chem Soc.* 16:1420-1424.
22. Yamale S, Koudou J, Samb A, Heitz A, Teulade J. 2009. Structural elucidation of a new furoclerodane from stem barks of *Croton mayumbensis* J. Leonard extracts. *International Journal of Physical Sciences.* 4: 96- 100.
23. Nihei K, Asaka Y, Mine Y, Yamada Y, Yanagisawa T, Kubo I. 2006. Musidunin and Musiduol, insect antifeedants from *Croton jatrophioides*. *J Nat Prod.* 69: 975-977.
24. Ramos F, Takaishi Y, Kashiwada Y, Osorio C, Duque C, Acuña R, Fujimoto Y. 2008. Ent-3,4-seco-labdane and ent-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry.* 69: 2406-2410.
25. Quintyne-Walcott S, Maxwell A, Reynolds W. 2007. Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *J Nat Prod.* 70: 1374-1376.
26. Ahmat N, Said I, Latip J, Din L, Hakim E. 2007. Styryldehydropyrone and clerodane-type diterpene from *Croton argyratus*. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* 11: 189-192.
27. Palmeira S, Alves V, Moura F, Vieira L, Conserva L, Lemos R. 2006. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 16: 397-402.
28. Suárez A, Compagnone R, Salazar-Bookaman M, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology.* 88:1-14.

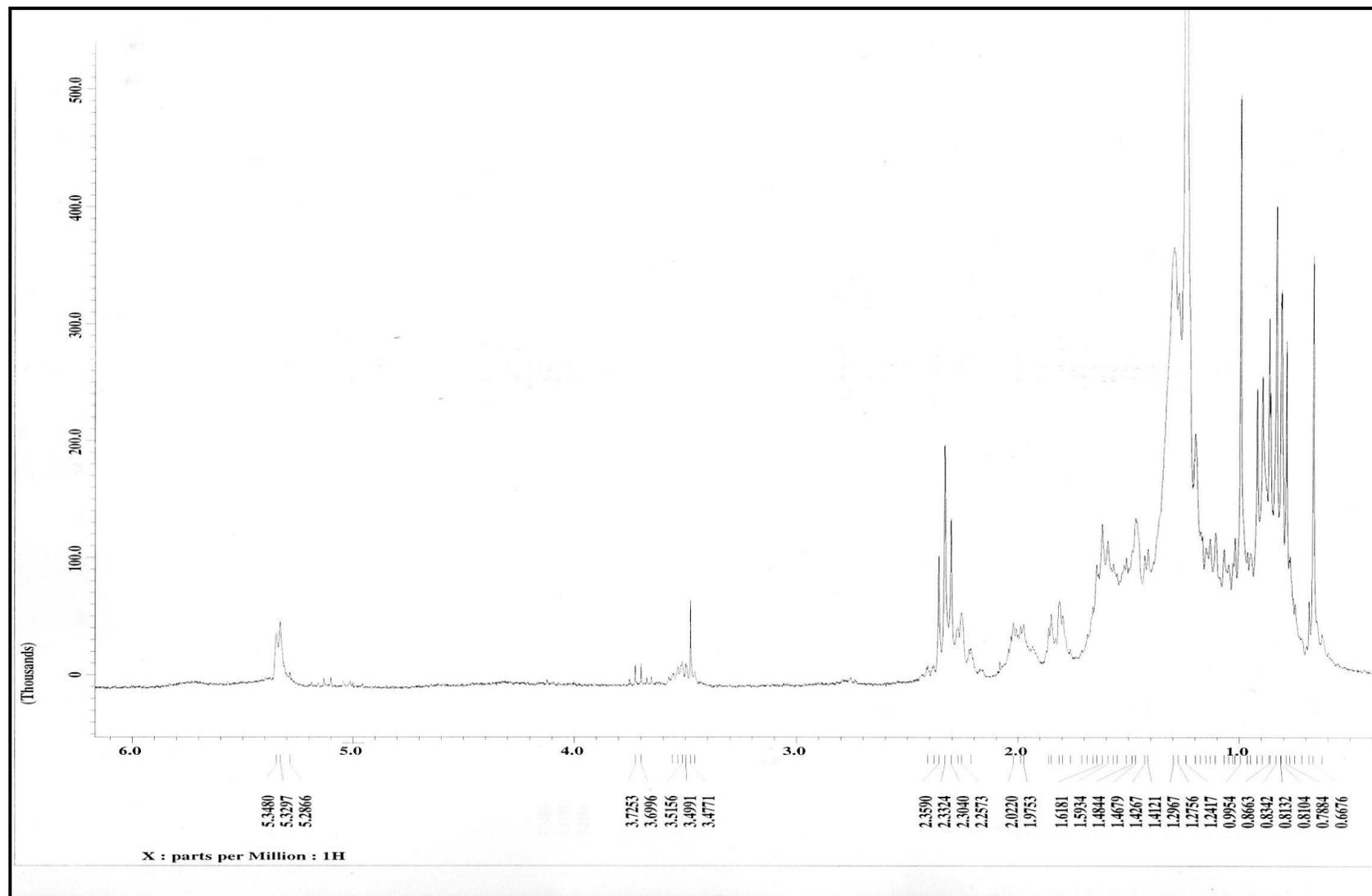
- 29.** Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suárez A, Arvelo F, Ramírez J, Galindo I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters*. 218: 109-116.
- 30.** Suárez A, Tapias E, Compagnone R, Tillett S, Díaz B, Canelón D, Blanco Z. 2005. Chemical Constituents from *Croton huberi*. *Revista Facultad de Farmacia*. 68:14-18.
- 31.** Suárez A, Rivas D, Compagnone R, Castillo A, Blanco Z. 2009. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensis*. *Revista Facultad de Farmacia*. 72: 11-17.
- 32.** Suárez A, Chávez K, Delle Monache F, Vásquez L, Delannoy D, Orsini G, Compagnone R. 2008. New 3,4-seco ent-kaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Natural Product communications*. 3: 319-322.
- 33.** Suárez A, Chávez K, Mateu E, Compagnone R, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis J. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Natural Product communications*. 4: 1547-1550.
- 34.** Alviárez P. 2007. Estudio fitoquímico y evaluación farmacológica de los tallos de *Amanoa almerindae*. Tesis de Licenciatura en Química, Escuela de Química. UCV.
- 35.** Fugh- Berman A. 2000. Herb drug interactions. *The lancet*. 355: 134-138
- 36.** Katzung B. 1999. *Farmacología Básica y Clínica séptima edición*. Editorial el manual moderno. 34-80.

- 37.** Castillo R. Acerca de las pautas de la OMS en la investigación para la evaluación de la seguridad y eficacia de los medicamentos herbarios. Revista cubana de Plantas Medicinales. 5: 5.
- 38.** Irwin S. 1964. Animal and Clinical Pharmacology Techniques. In Drug Evaluation of New Compounds in Animals. Year Book Medicinal Publishers. 36-53.
- 39.** Valle P y Lucas B. 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública México.
- 40.** Navarro M. 1998. La liofilización de productos farmacéuticos. SISTEFARMA. 4: 1.
- 41.** Litchfield J y Wilcoxon F. 1949. A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 28: 99-108.
- 42.** Pateh U, Haruna A, Garba M, Iliya I, Sule M, Abubakar M, Ambi A. 2008. Isolation of stigmasterol, β -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* and *kotchy* (ARACEAE) Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences. 7: 19-25.
- 43.** Pollock J, Stevem R. 1965. Dictionary of organic compounds 4th ed, vol 5. Eyre and spottiswoode (Publishers).
- 44.** Fieser L, Fieser M. 1962. Organic Chemistry 3rd. Ed Wiley New York. 250,353.
- 45.** Choi S Z, Choi S U, Lee K. 2004. Pytochemical Constituents of the Aerial Parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. Archibes of Pharmacal Research. 27: 164-168
- 46.** Malek N, Wahab N, Yaacob H, Shin S, Lai H, Serm L, Rahman S. 2008. Cytotoxic Activity of *Pereskia bleo* (Cactaceae) Against Selected Human Cell Lines. International Journal of Cancer Research. 4:20-27

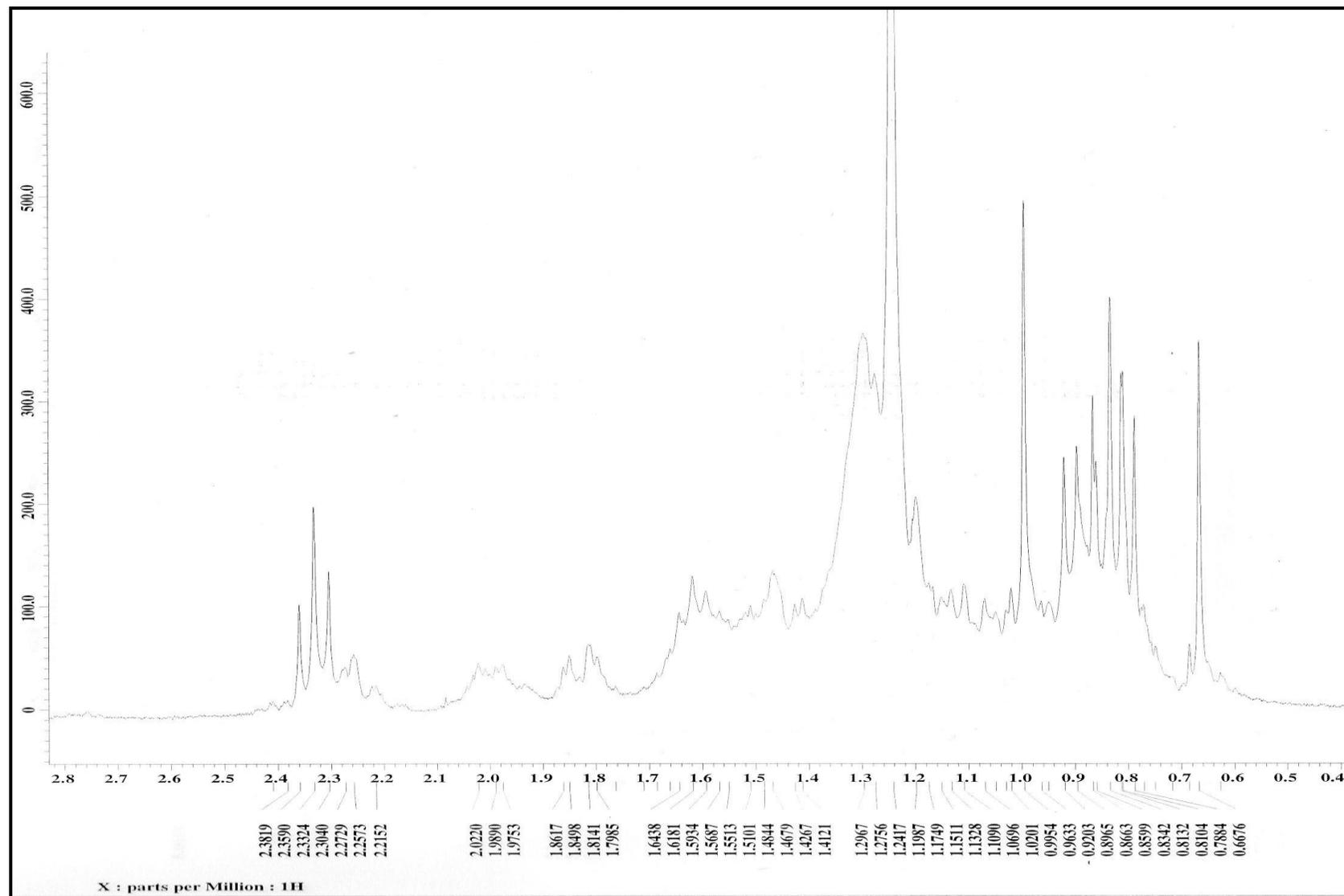
- 47.** Agrawal P, Bishnoi V, Singh A. 1994. NMR Chemical shift correlations in 16, 17-hidroxy-kauranoids: Implication for stereochemical assignments. *Phytochemistry*. 39: 929-930.
- 48.** Pinheiro J, Sousa J, Rodrigues A. 1996. Carbon-13 Spin-Lattice Relaxation Times for ent-Kaurene Diterpenes – A Study of Molecular Motion in Solution. *J.Braz.Chem.Soc.* 7: 271-274
- 49.** Ertas A, Ozturk M, Boga M, Topcu G. 2009. Antioxidant and Anticholinesterase Activity Evaluation of ent-kauane Diterpenoids from *Sideritis arguta*. *J. Nat. Prod.* 72: 500-502.
- 50.** Chung D, Tai Choi Y. 2007. Synthesis and Solubility of Hydrophilic derivates of β -sitosterol. *J Ind Eng Chem.* 3:367-372
- 51.** Xie W, Gao X, Jia Z. 2007. A New C-10 Acetylene and A New Triterpenoid from *Conyza Canadensis*. *Archives of Pharmacal Research.* 30:547-551.
- 52.** Kundakovic T, Fokialakis N, Magiatis P, Kovacevic N, Chinou I. 2004. Triterpenic Derivatives of *Achillea alexandri-regis* Bornm. & Rudski. *Chem Pharm Bull.* 52: 1462-1465.
- 53.** Barreiros M, David J, Pereira P, Guedes M, David J. 2002. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxyium passerinum*. *Journal Brazil Chemical Soc.* 13: 669-673.

XI. ANEXOS

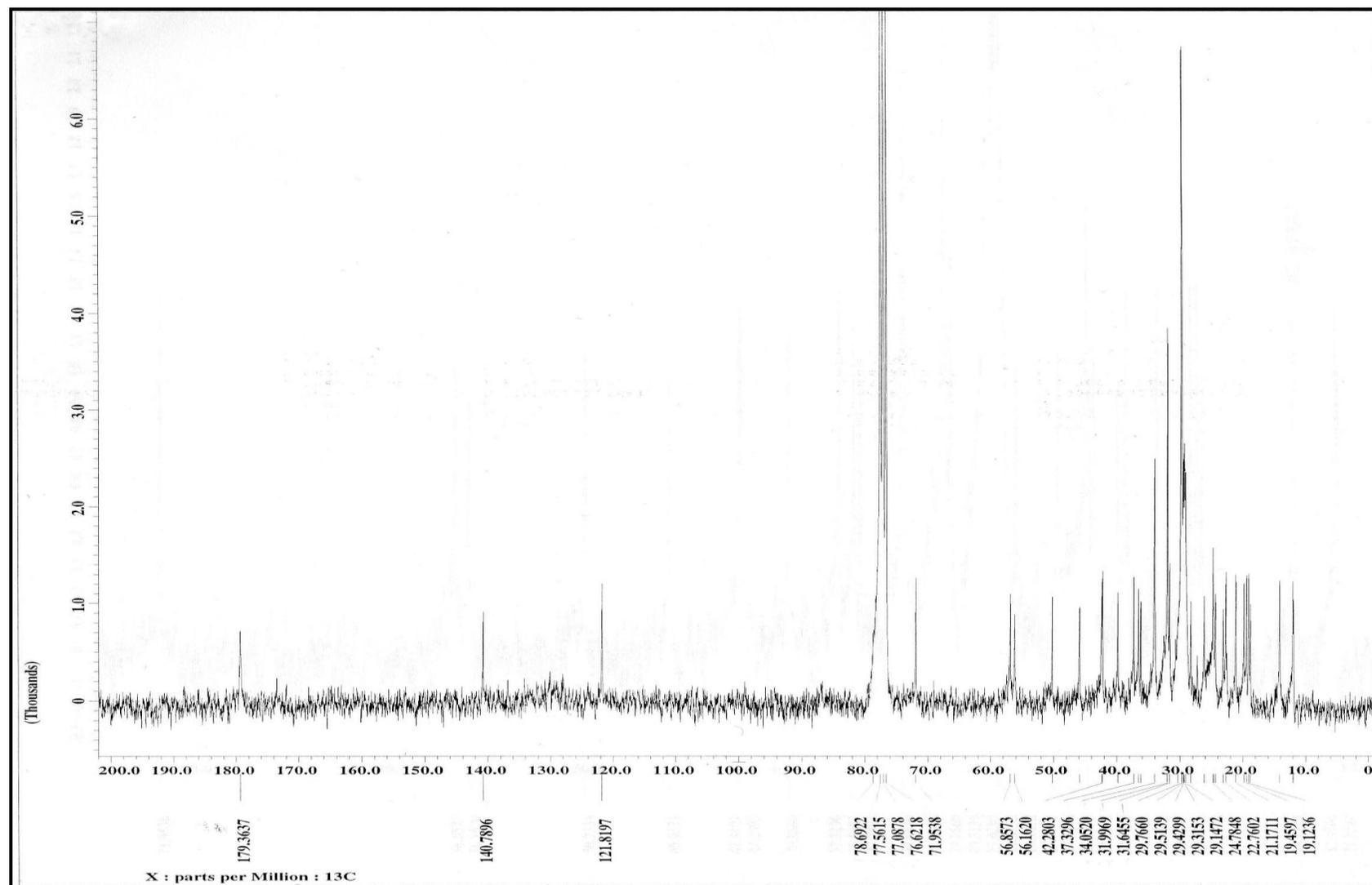
Anexo 1a. Espectro de RMN ^1H del β -sitosterol.



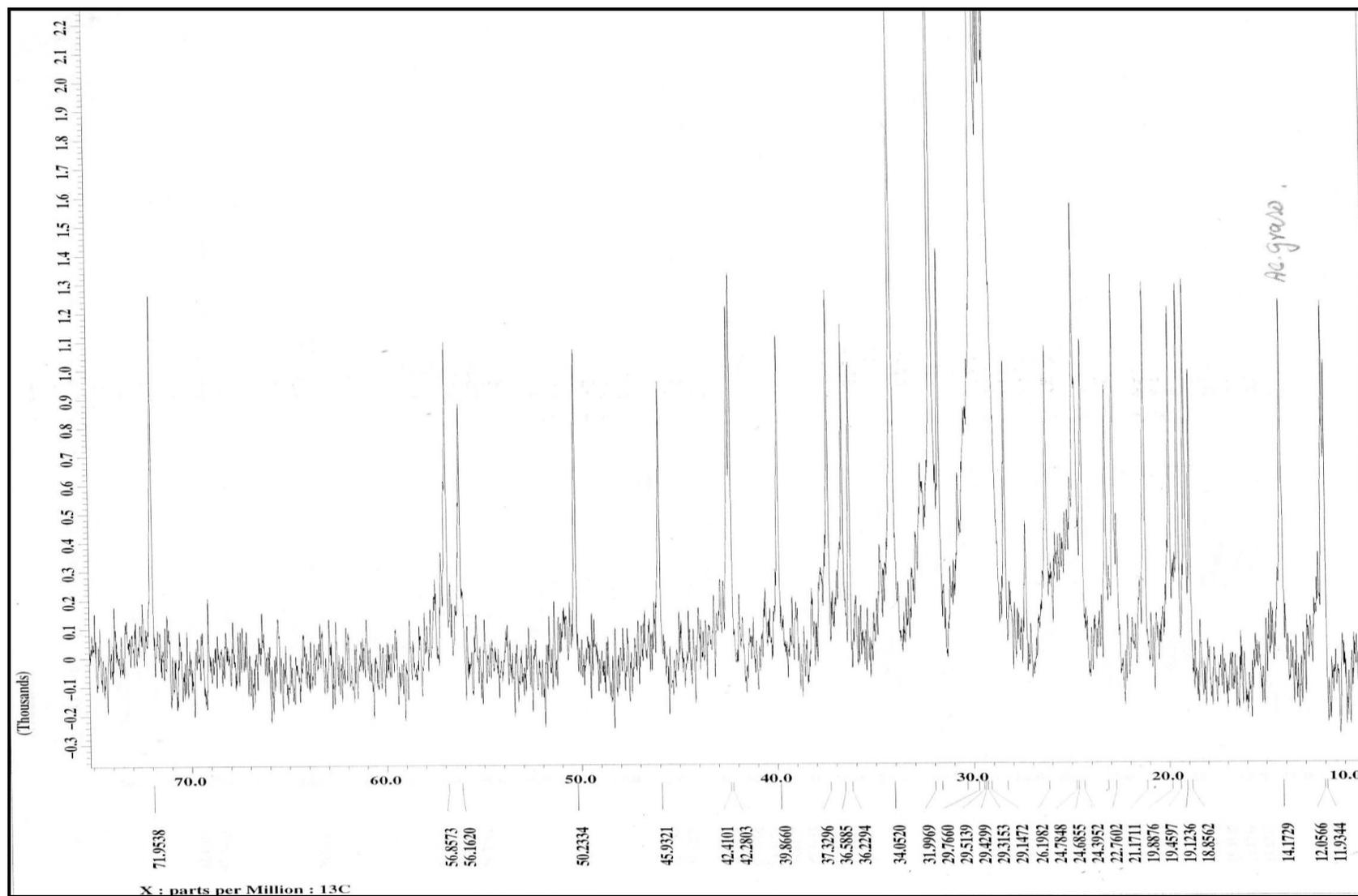
Anexo 1b. Ampliación del espectro de RMN ^1H del β -sitosterol.



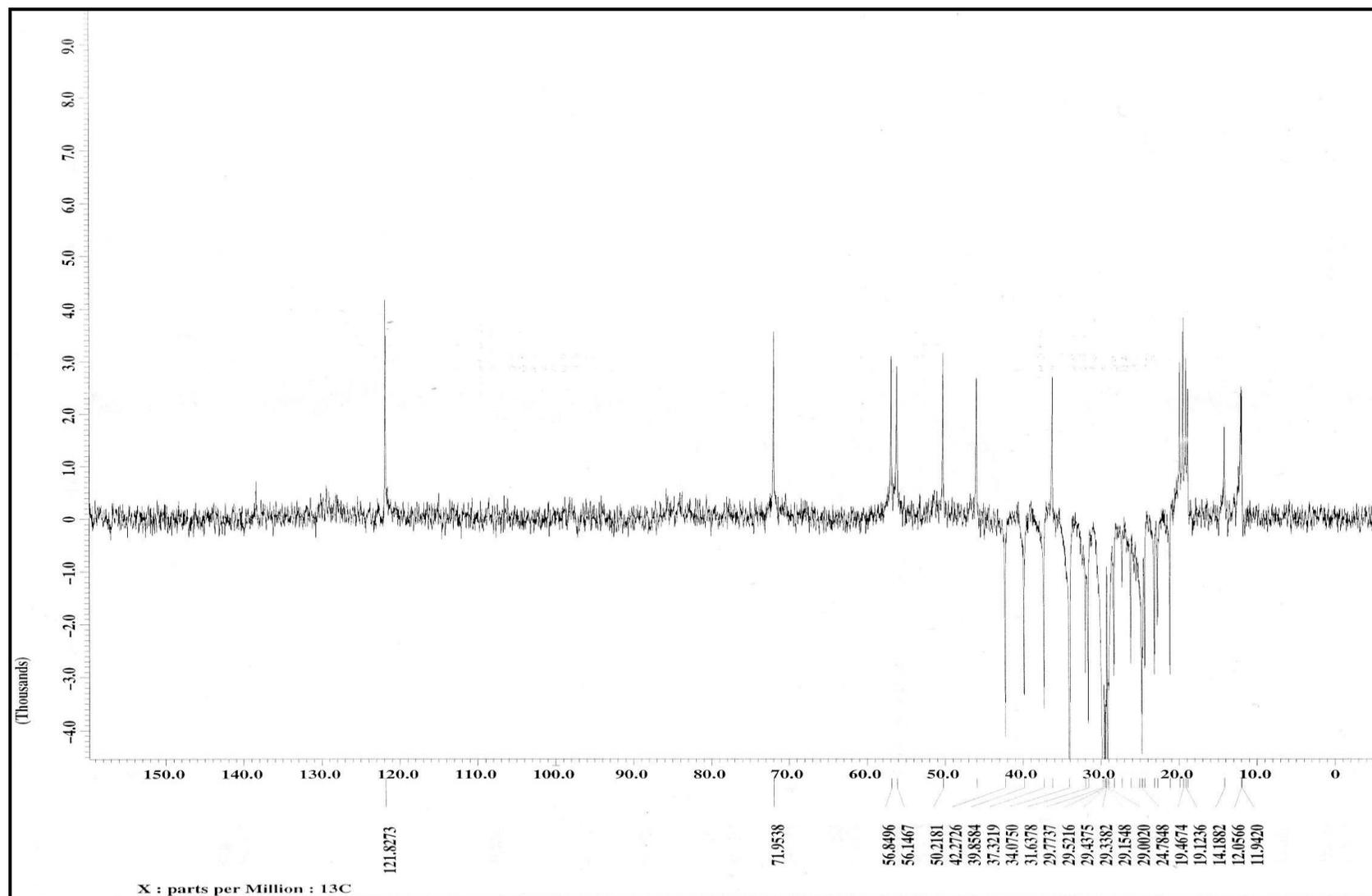
Anexo 1c. Ampliación del espectro de RMN ^1H del β -sitosterol.



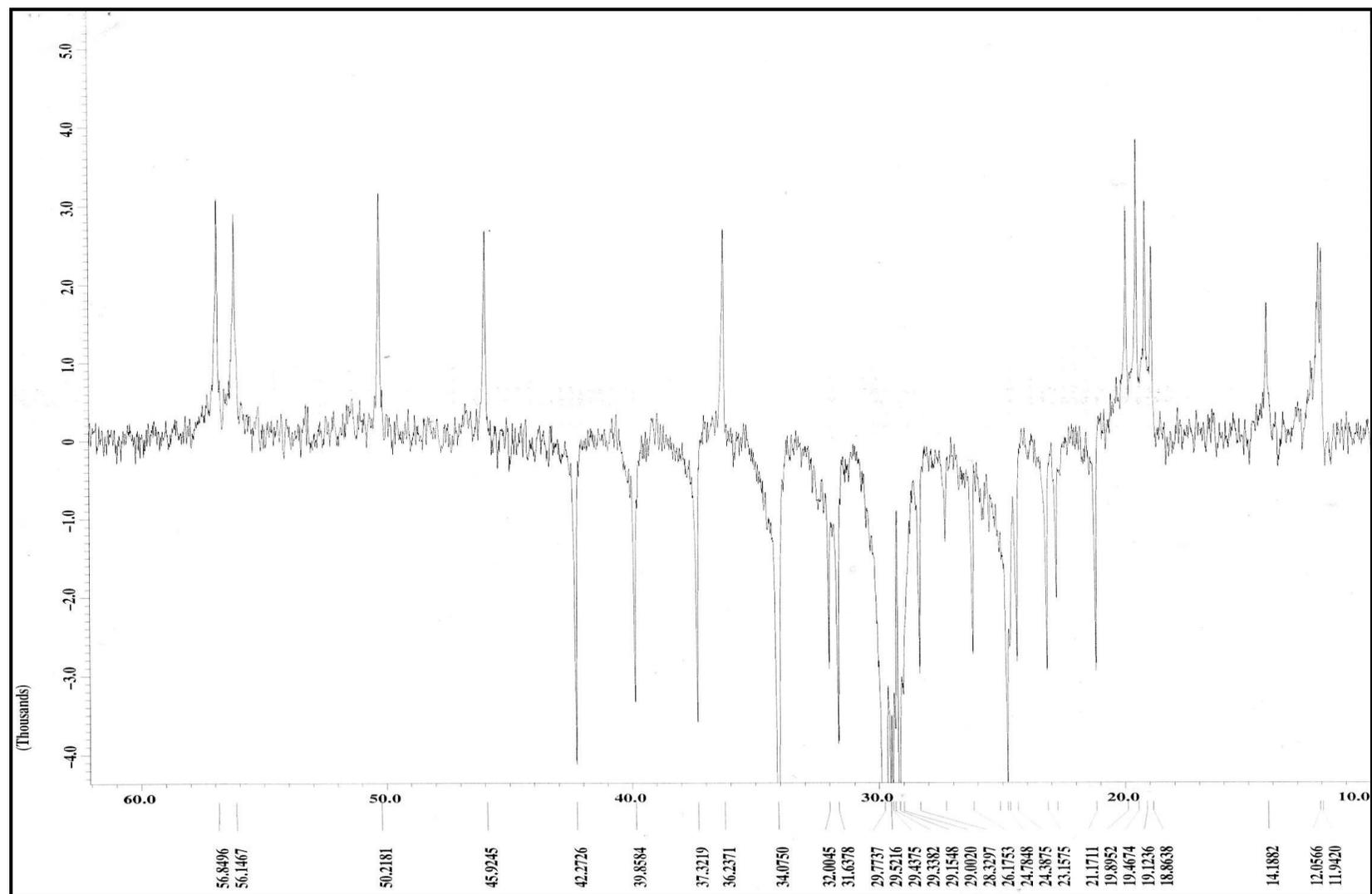
Anexo 1d. Espectro de RMN ^{13}C del β -sitosterol.



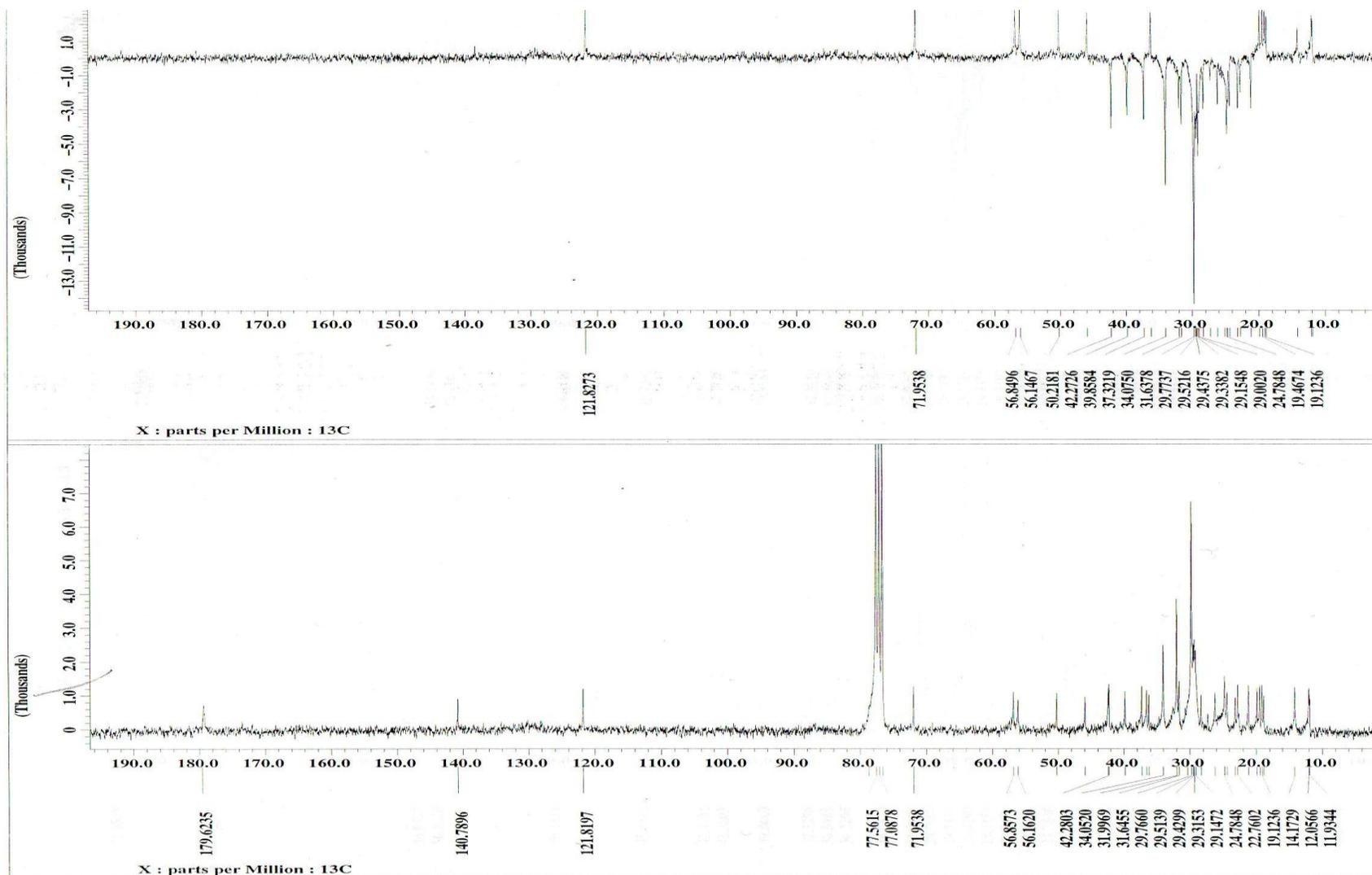
Anexo 1e. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del β -sitosterol.



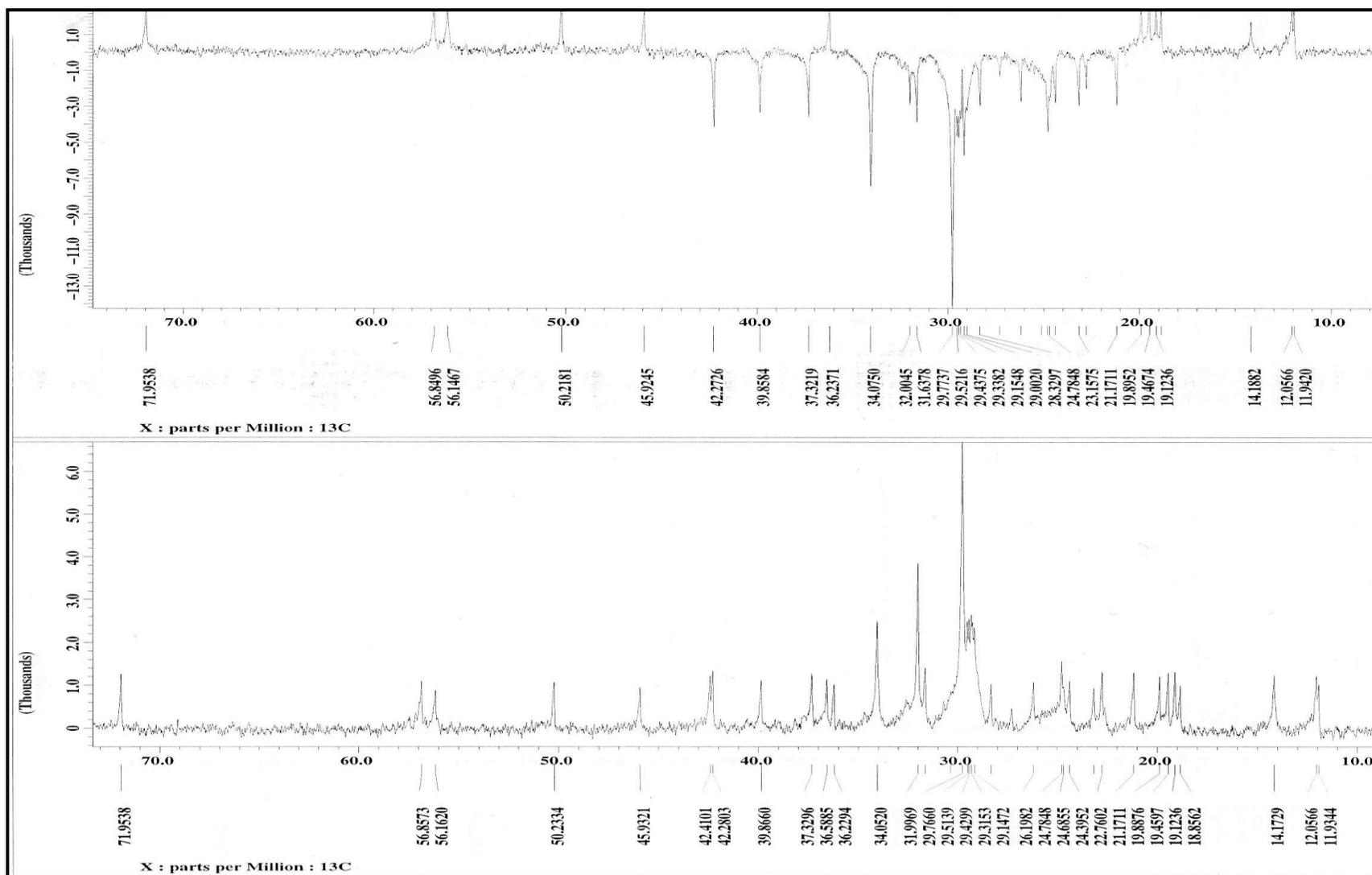
Anexo 1f. Espectro DEPT 135 del β -sitosterol.



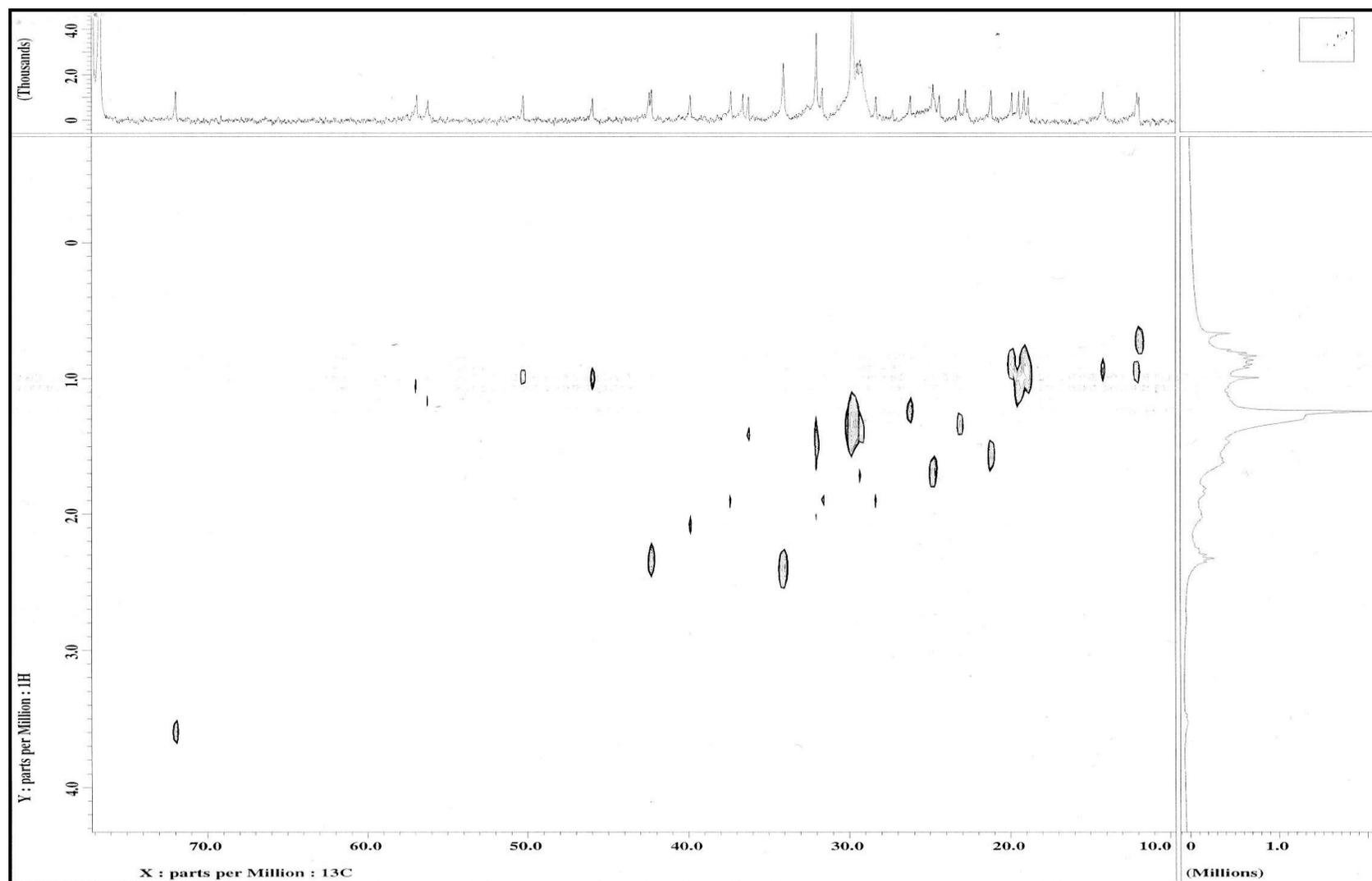
Anexo 1g. Espectro DEPT 135 del β -sitosterol.



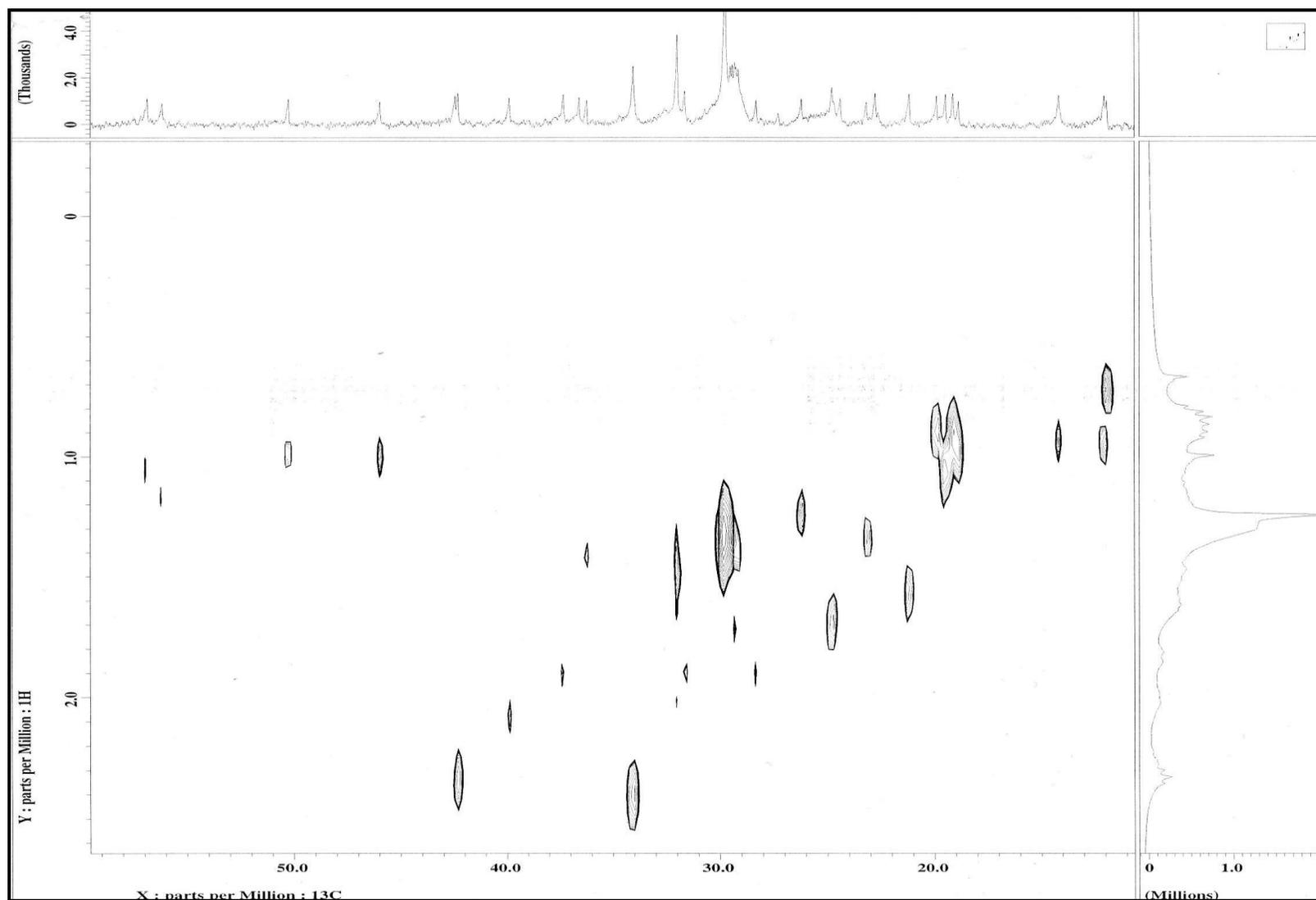
Anexo 1h. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 del β -sitosterol.



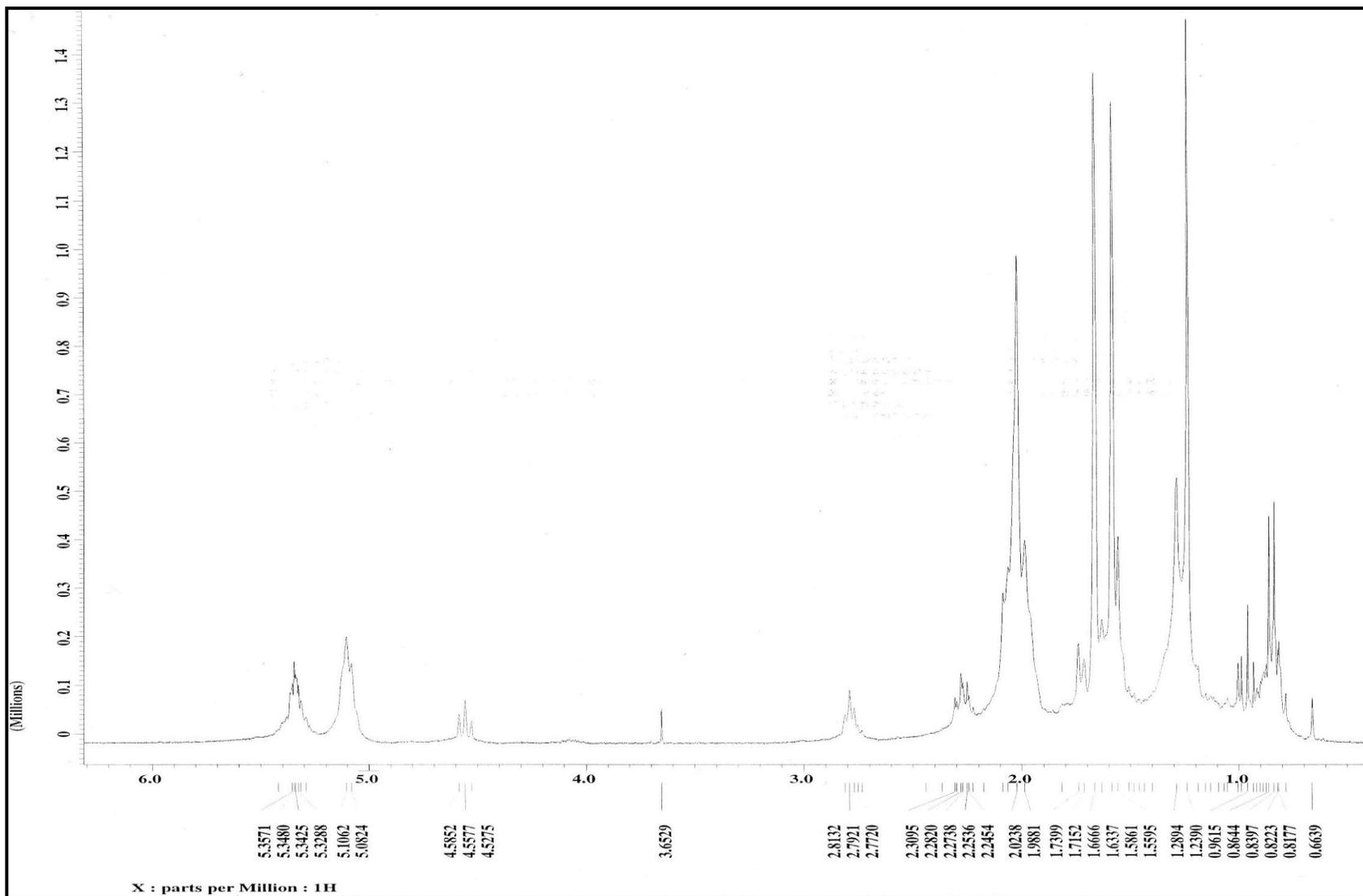
Anexo 1i. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 del β -sitosterol.



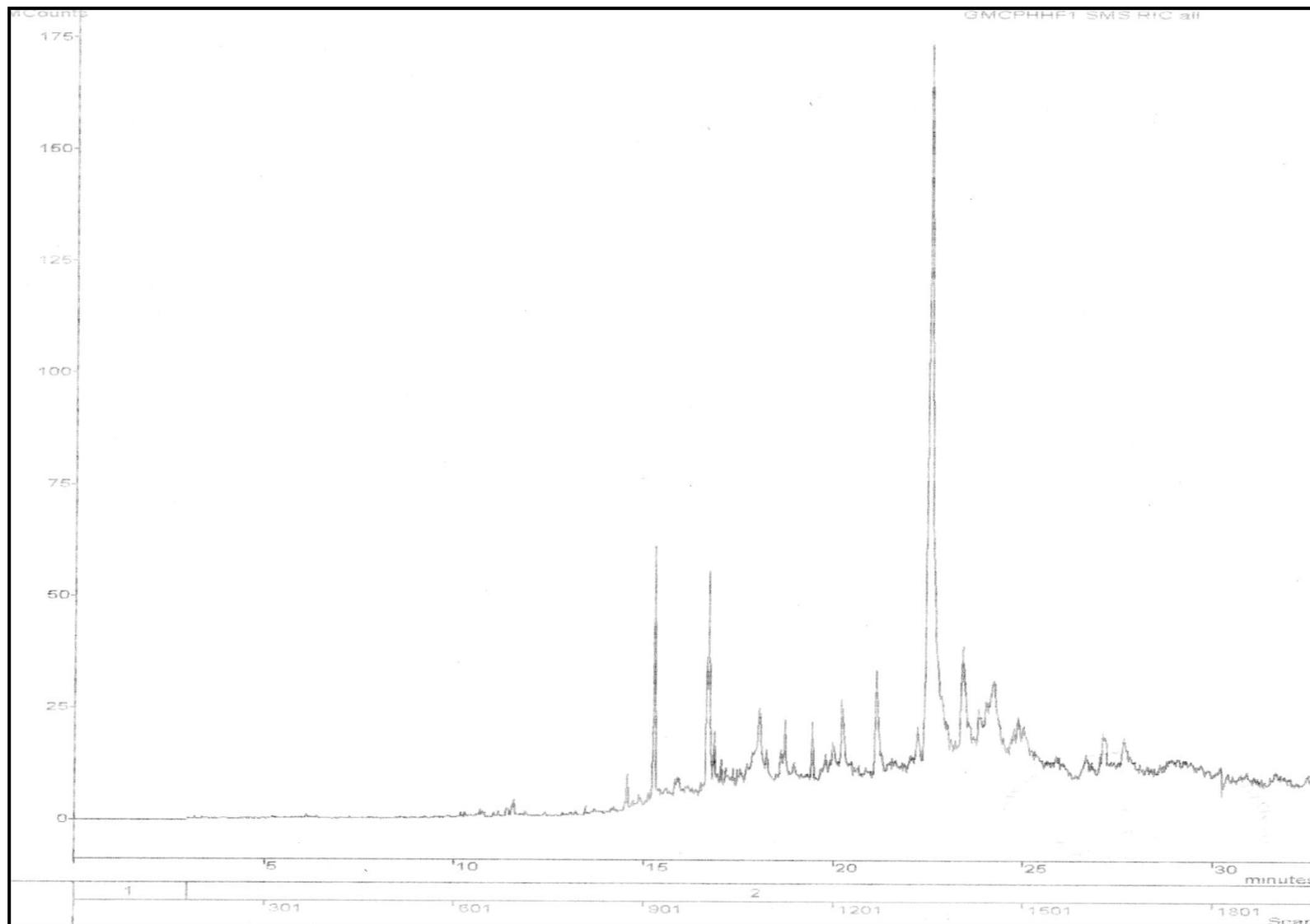
Anexo 1j. Espectro HETCOR del β -sitosterol.



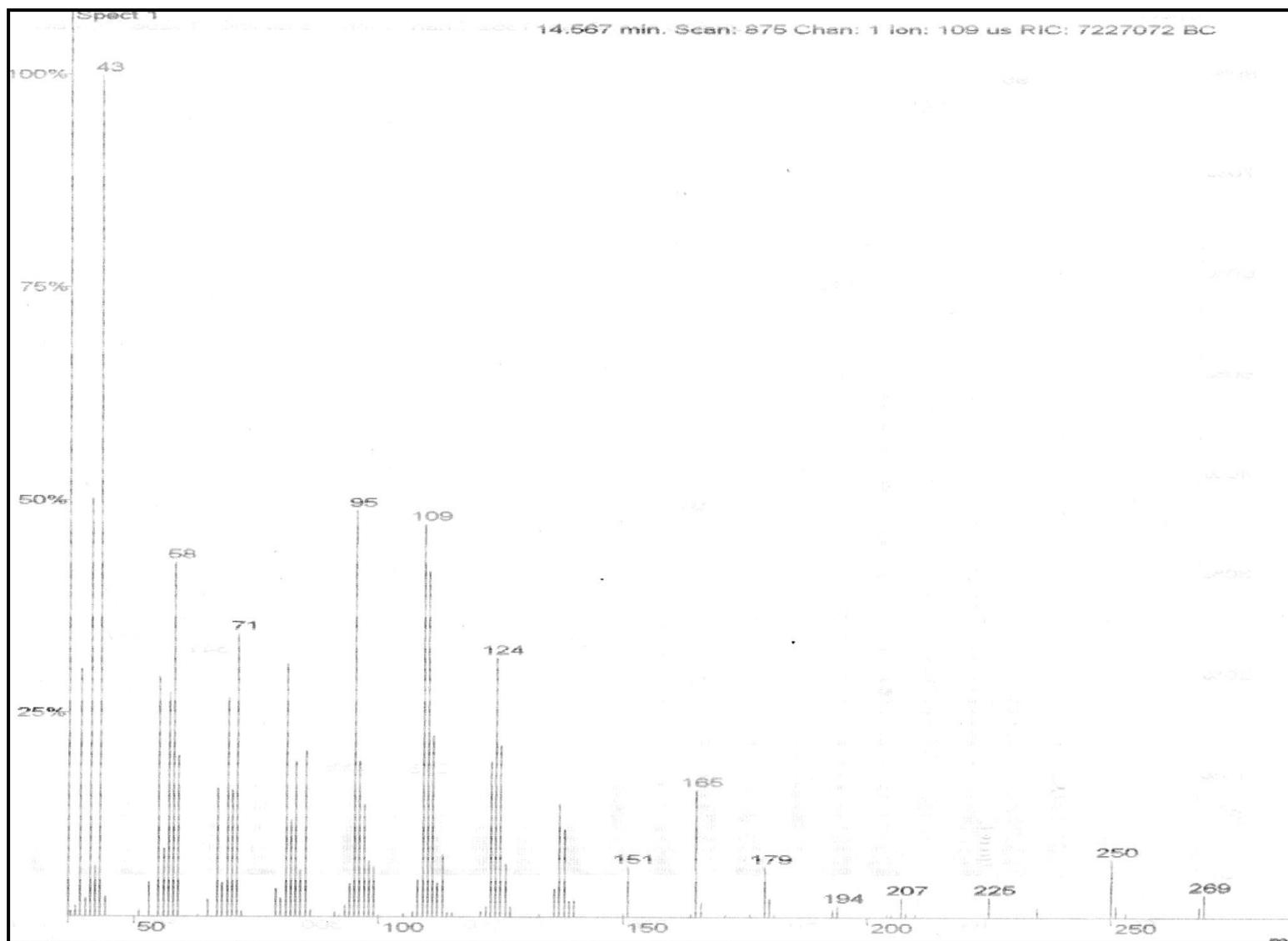
Anexo 1k. Ampliación del Espectro HETCOR del β -sitosterol.



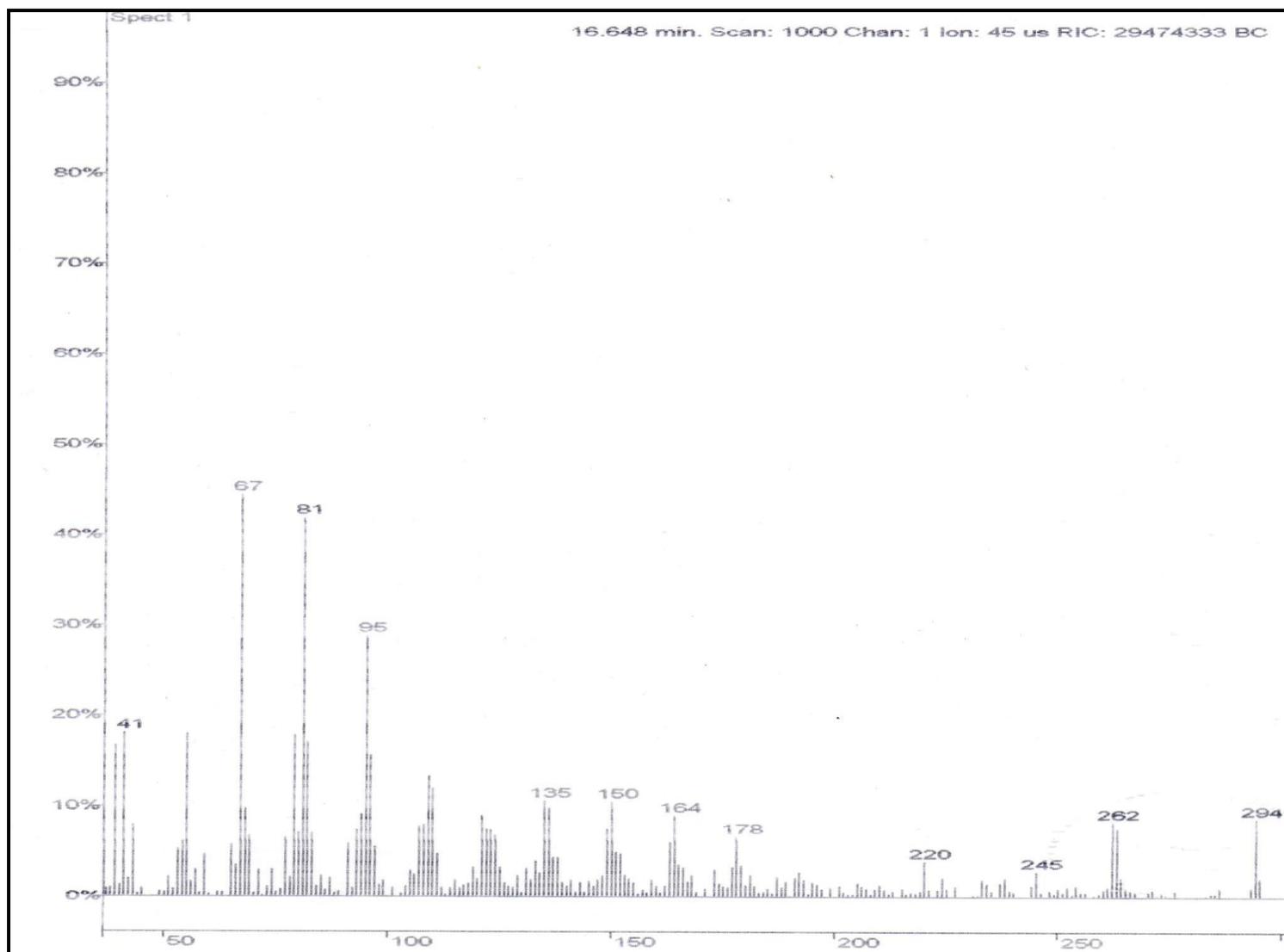
Anexo 2a. Espectro de RMN ^1H Compuesto II.



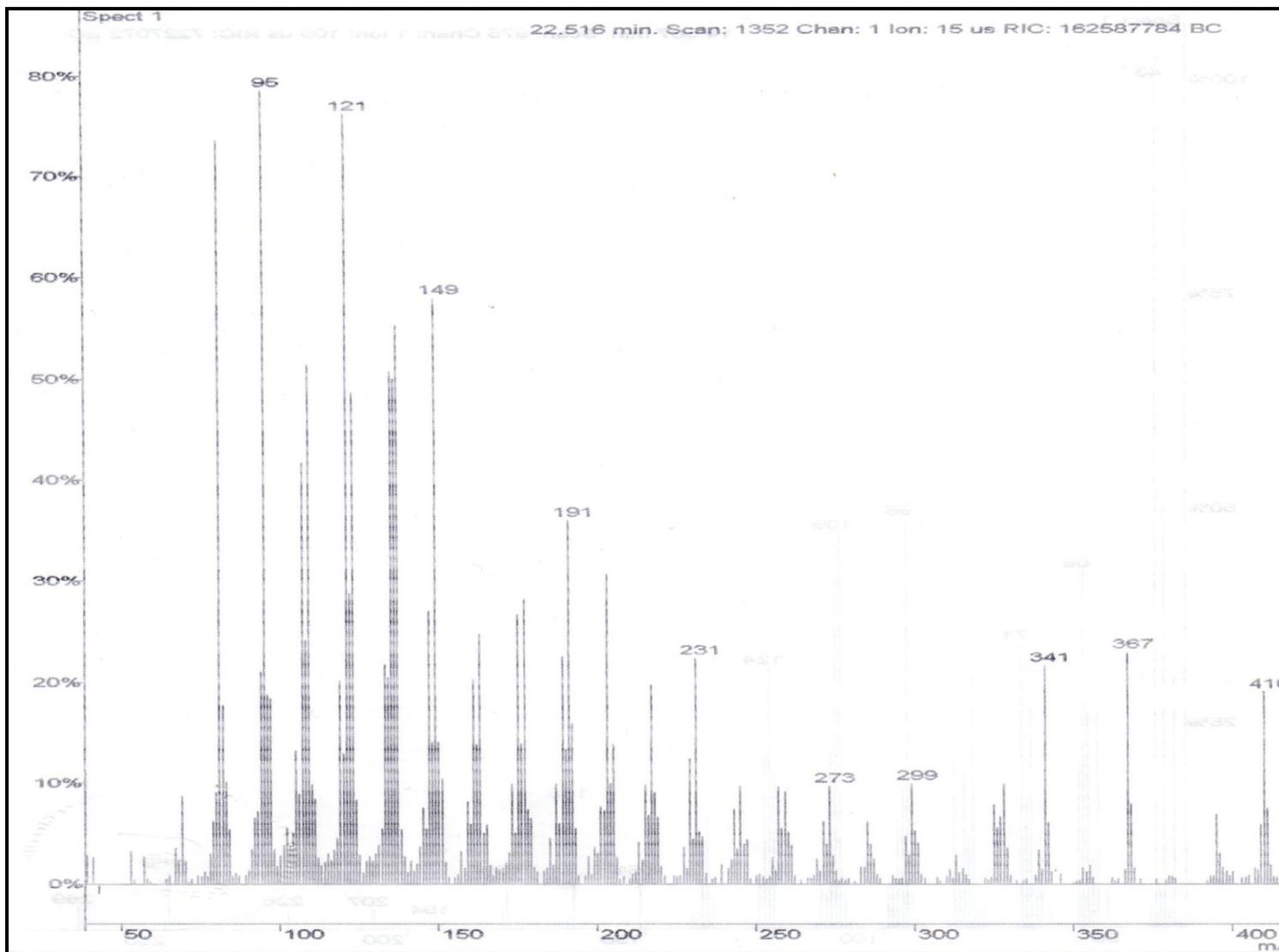
Anexo 2b. Cromatograma del Compuesto II.



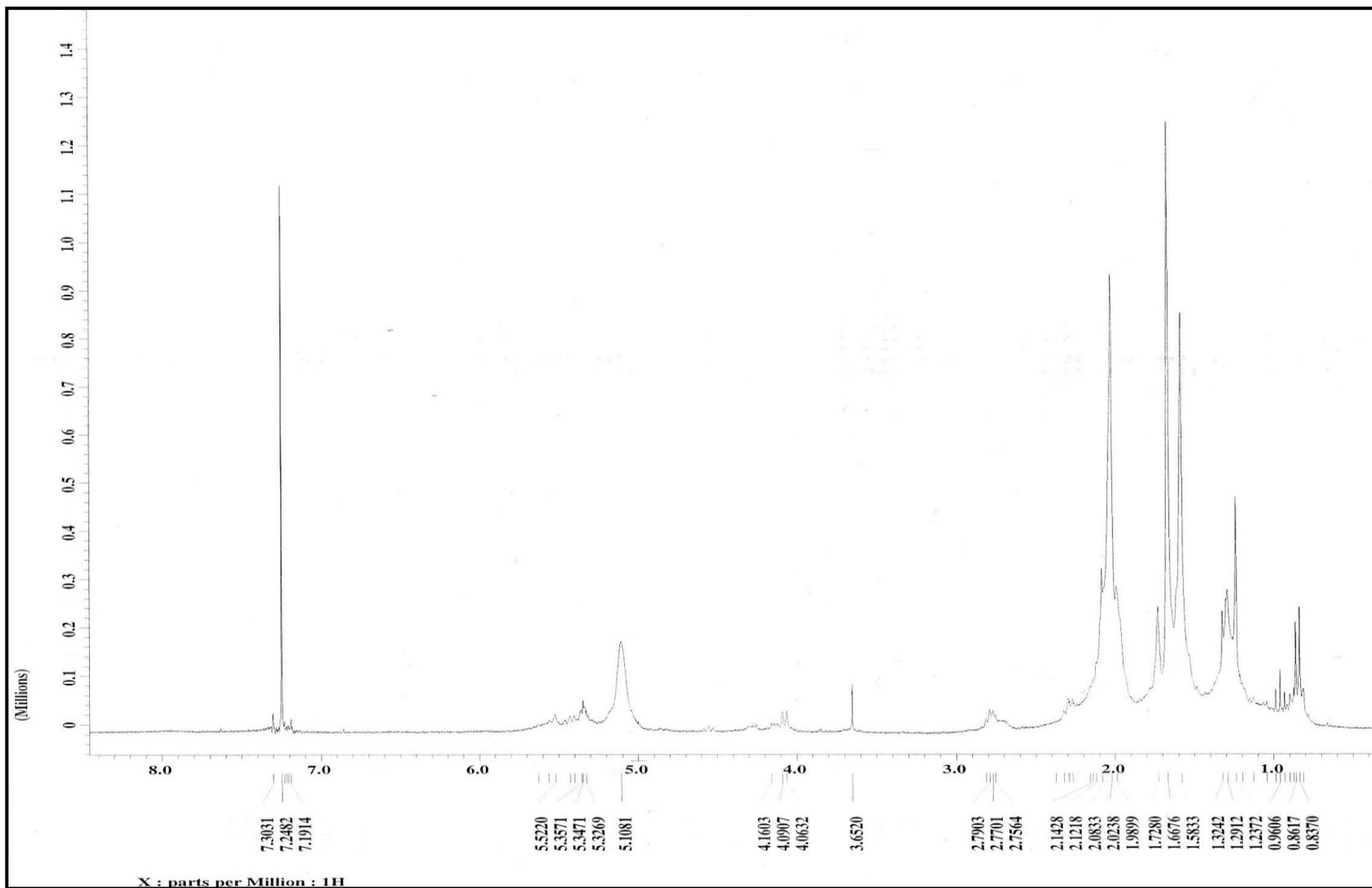
Anexo 2c. Espectro de Masa del Compuesto II.



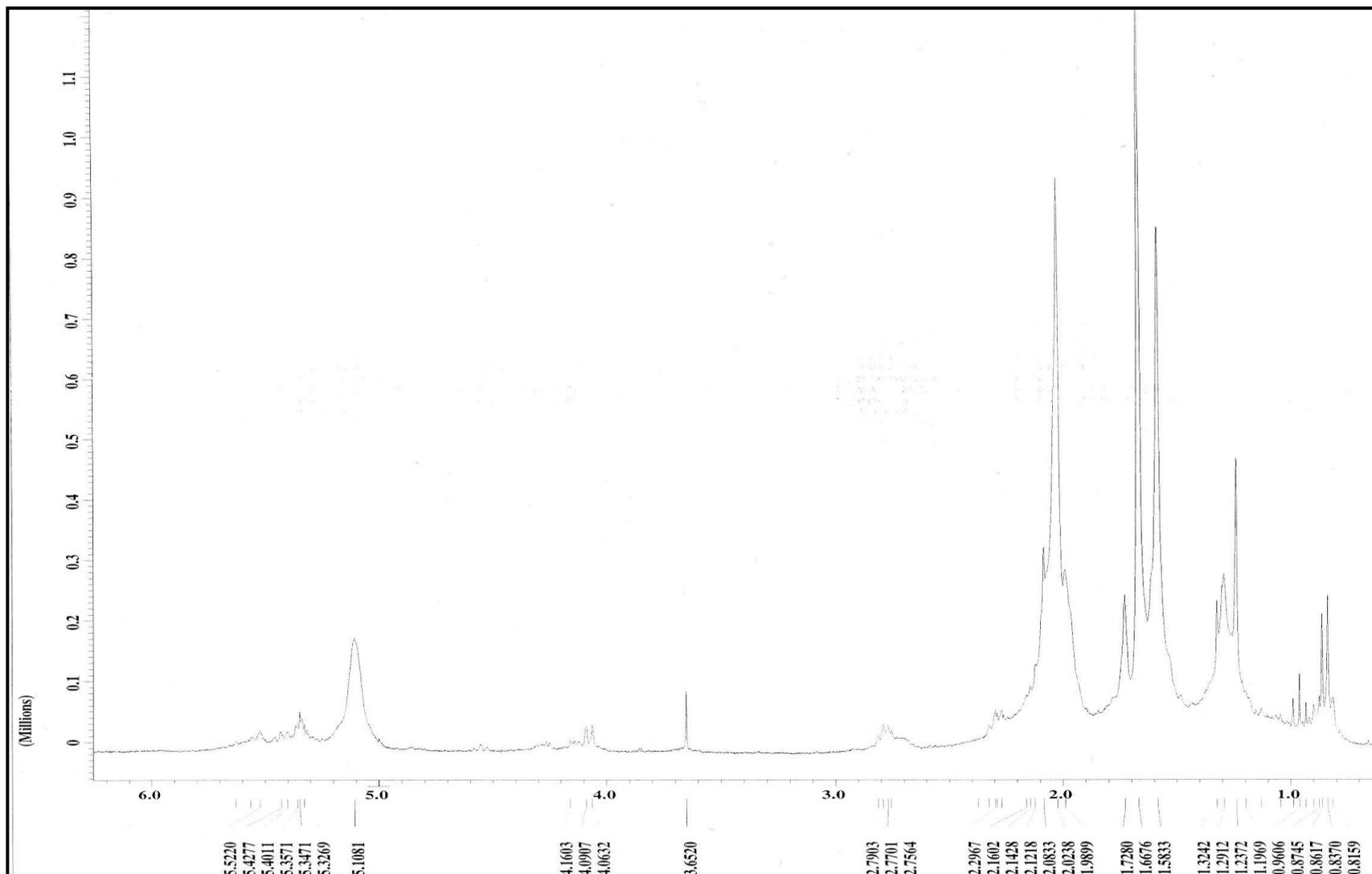
Anexo 2d. Espectro de Masa del Compuesto II.



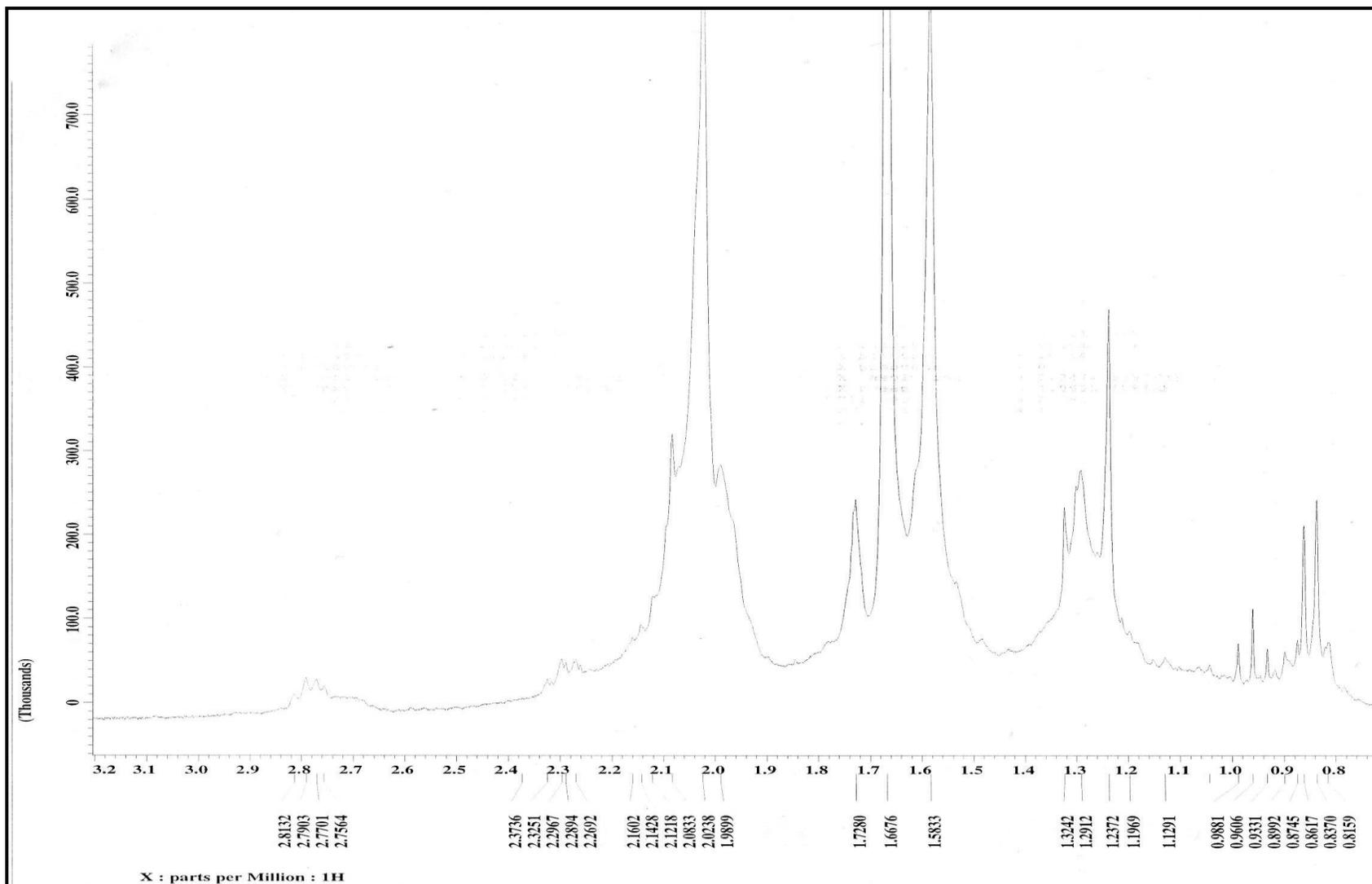
Anexo 2e. Espectro de Masa del Compuesto II.



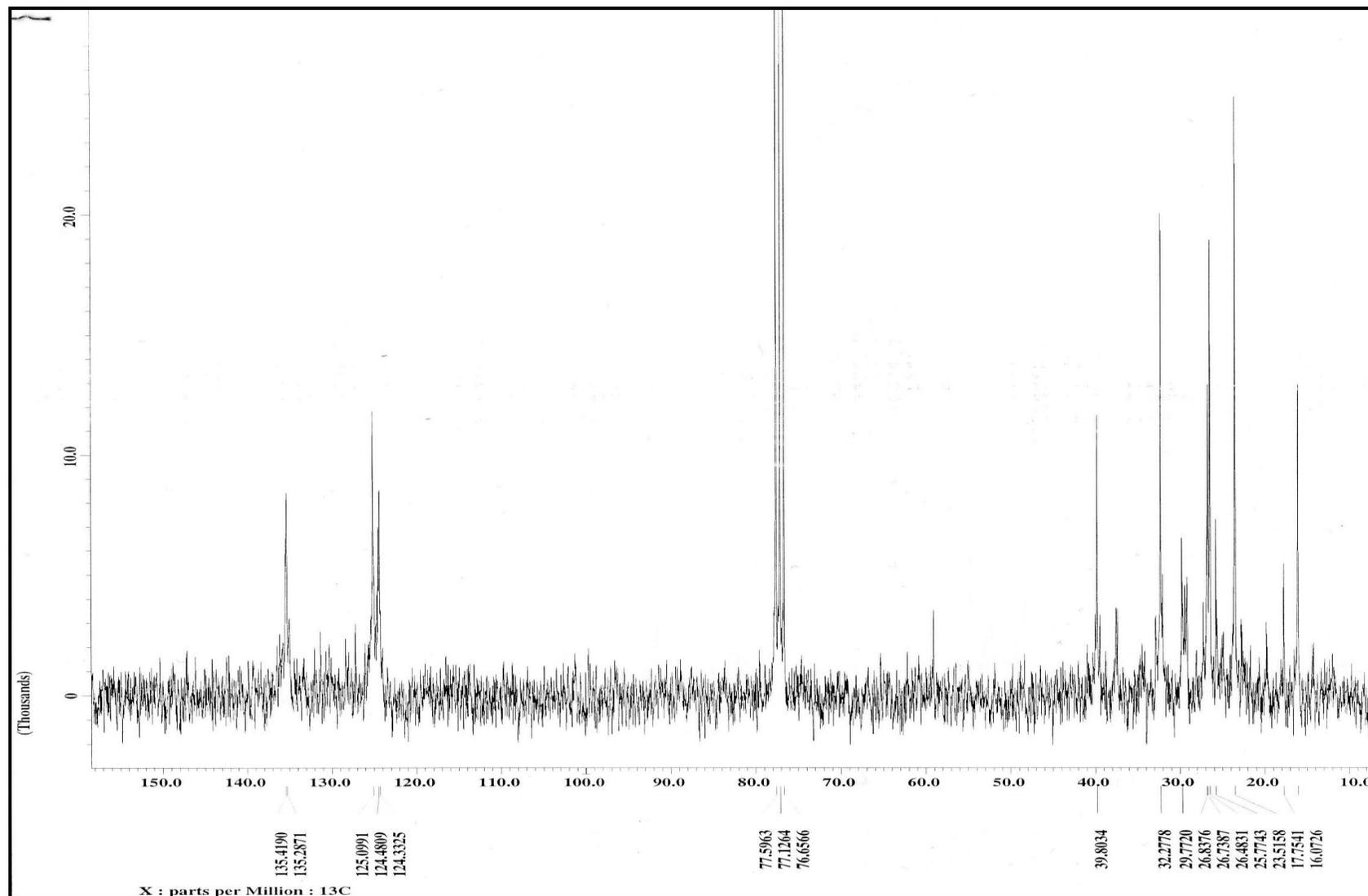
Anexo 3a. Espectro de RMN ^1H Compuesto III.



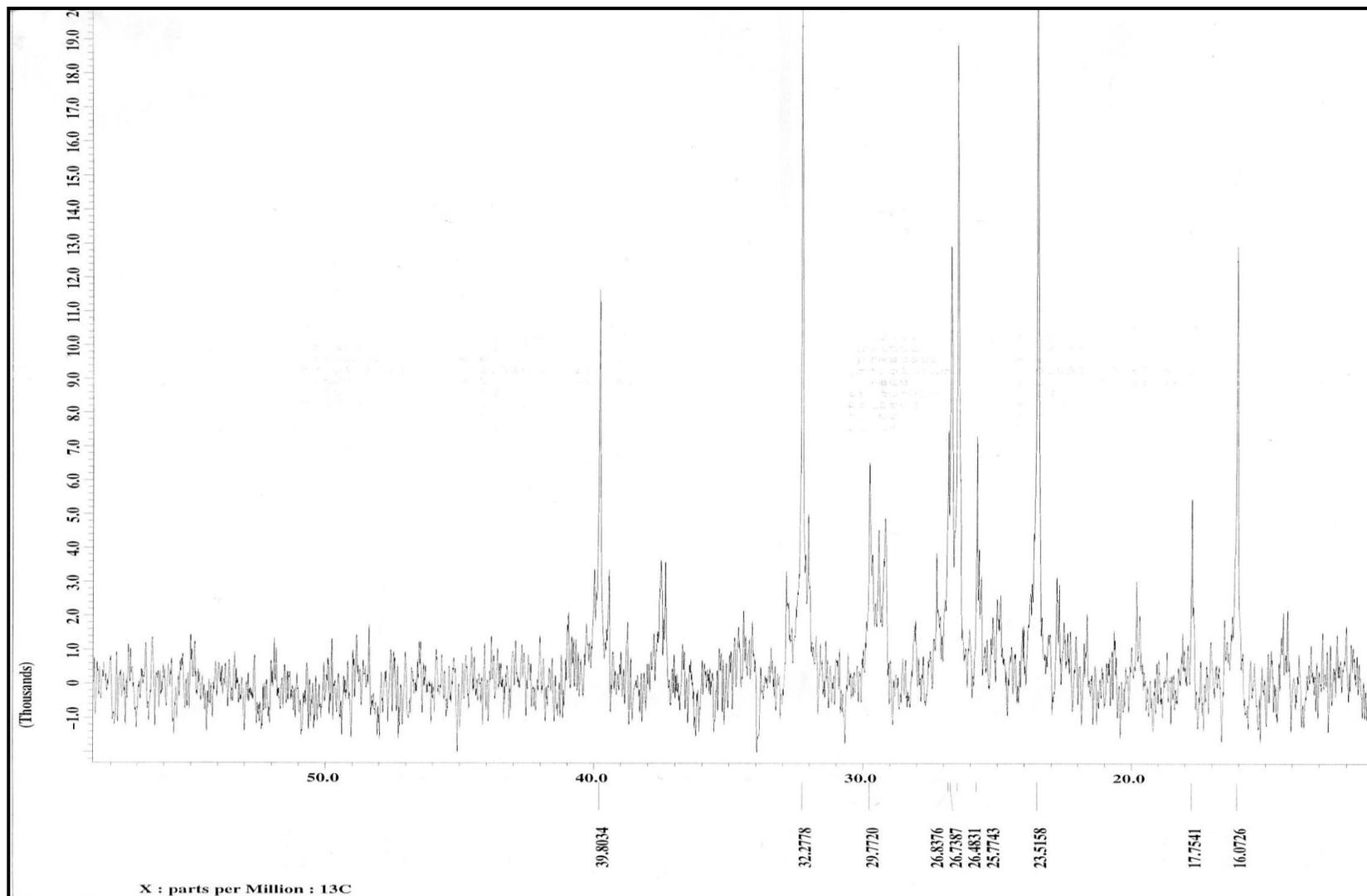
Anexo 3b. Ampliación del espectro de RMN ^1H Compuesto III.



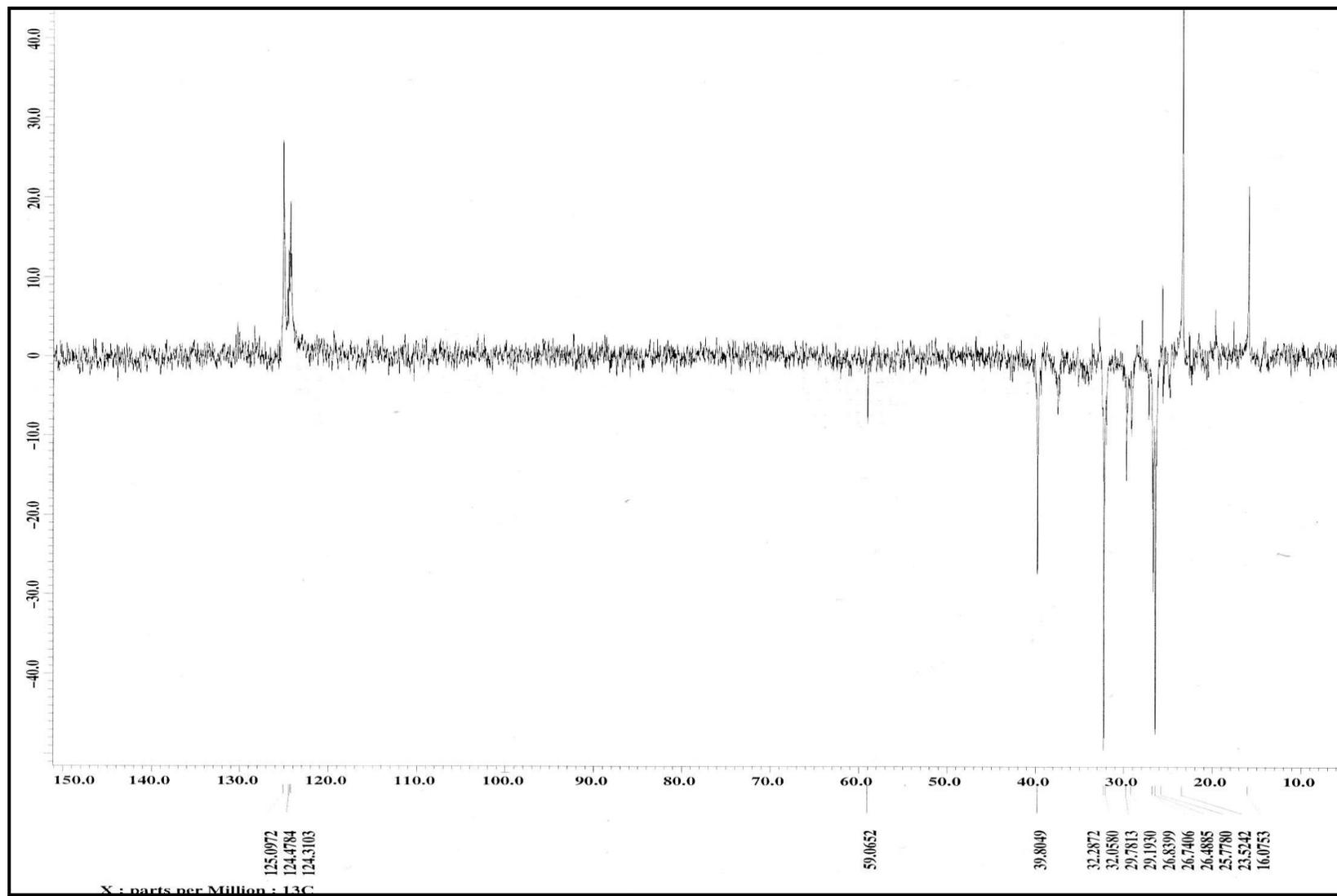
Anexo 3c. Ampliación del espectro de RMN ^1H Compuesto III.



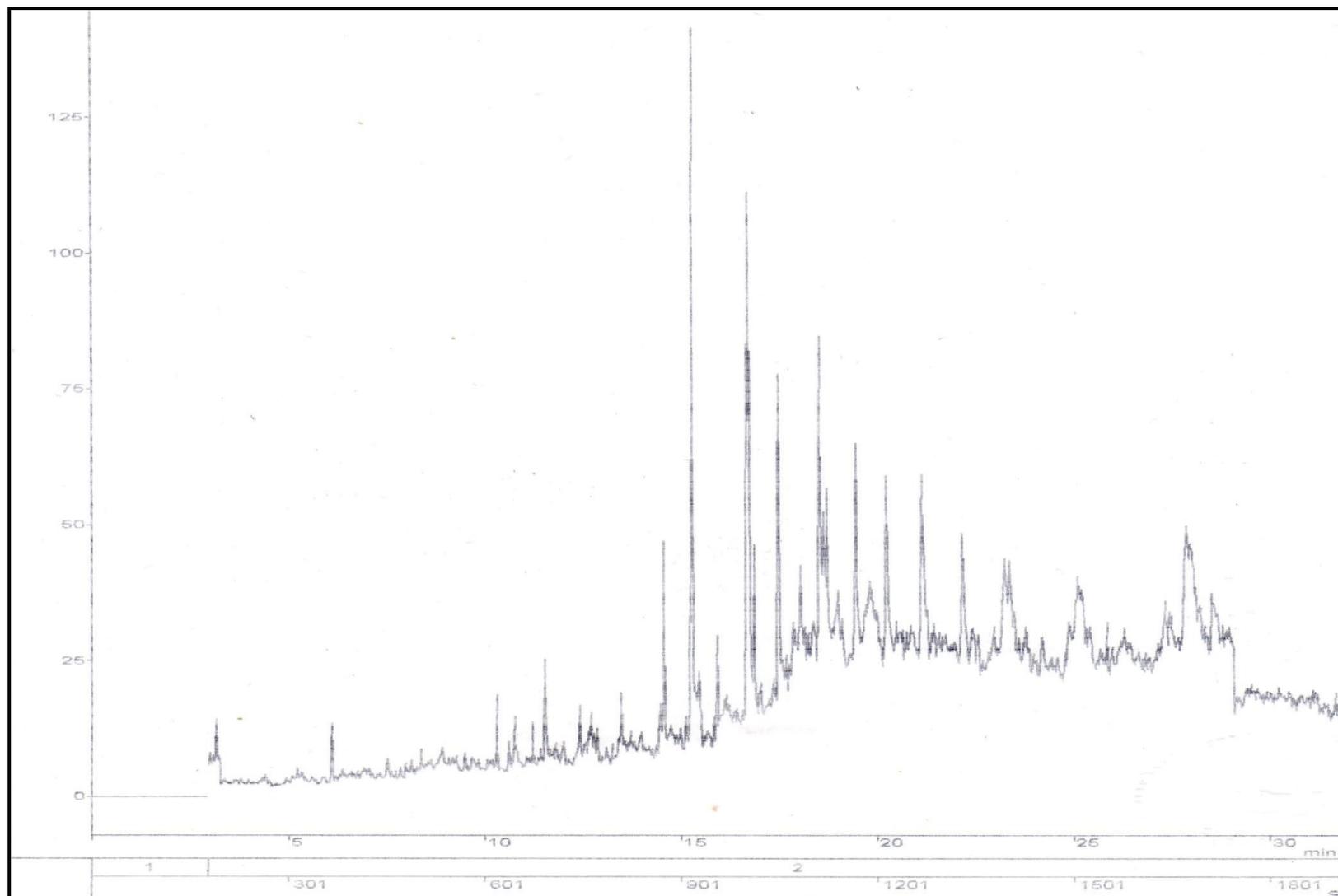
Anexo 3d. Espectro de RMN ^{13}C Compuesto III.



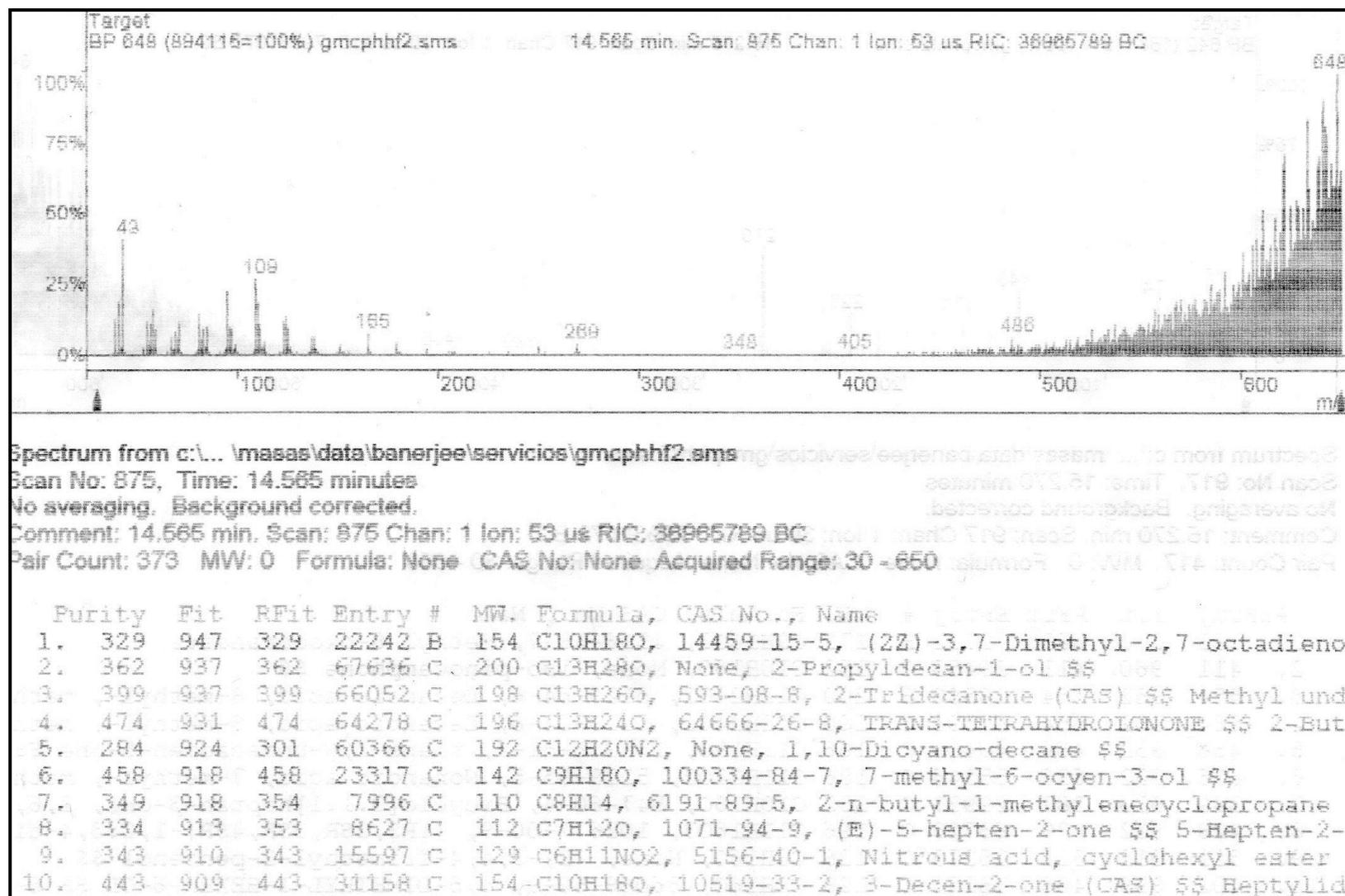
Anexo 3e. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C Compuesto III.



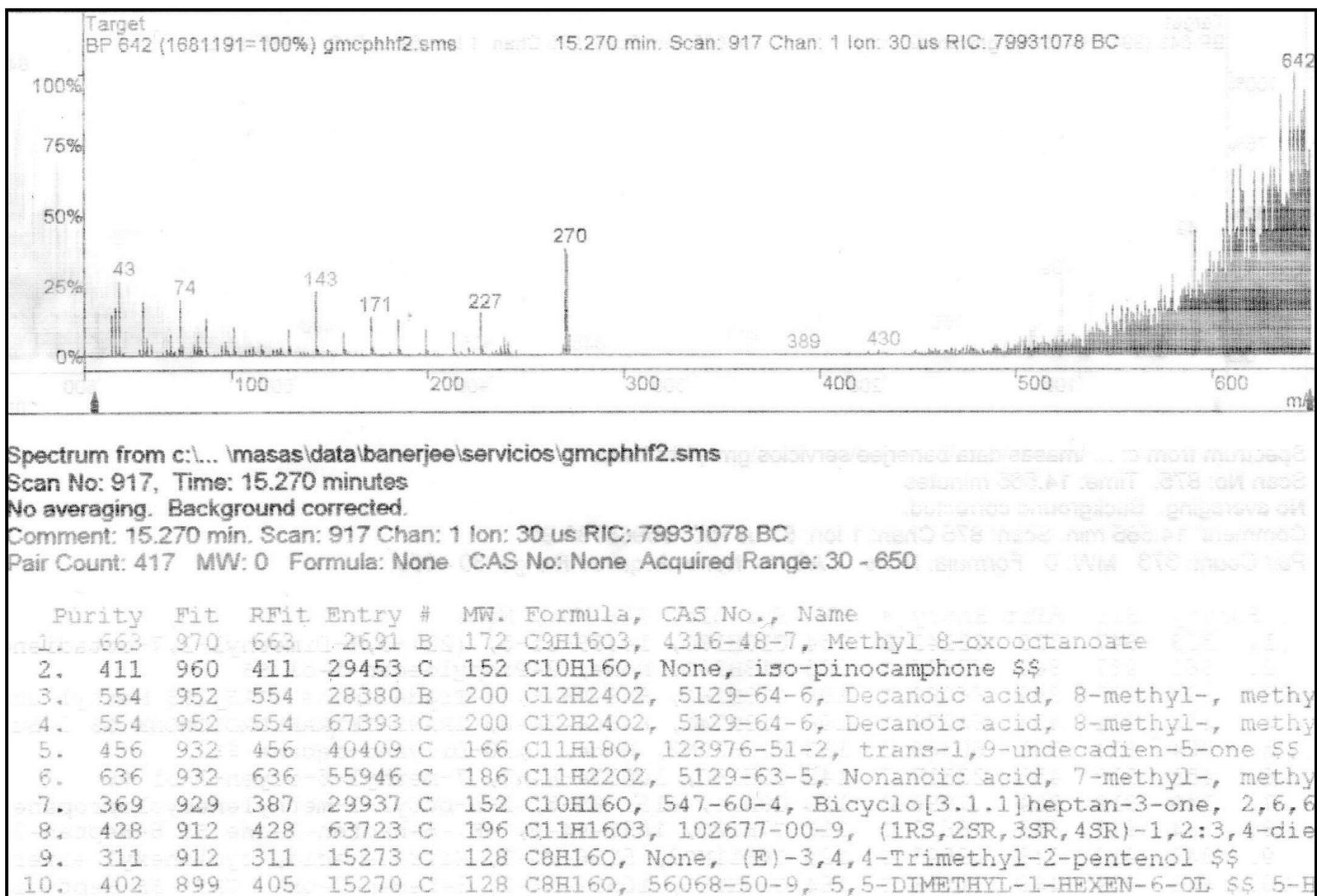
Anexo 3f. Espectro DEPT 135 del Compuesto III.



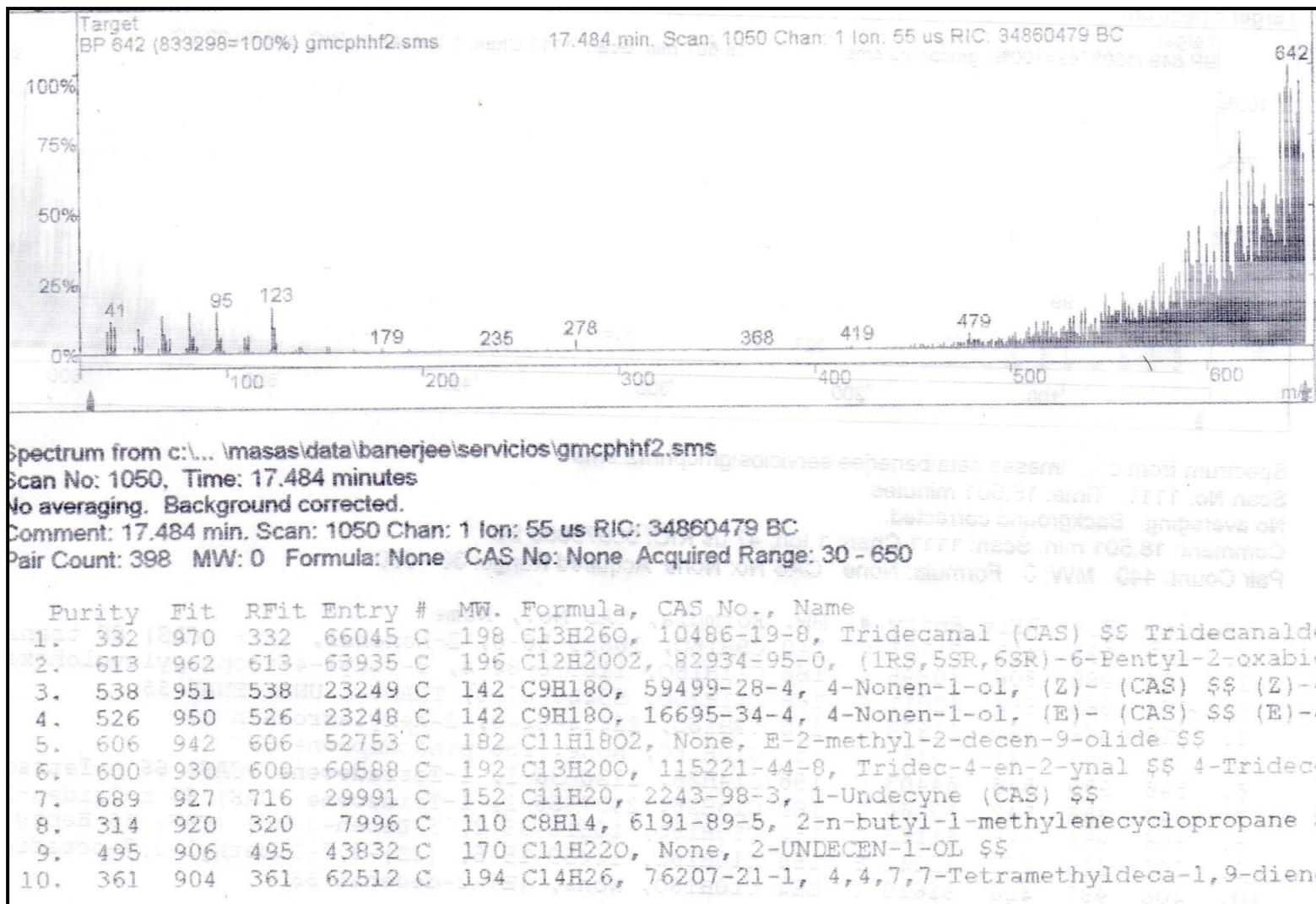
Anexo 3g. Cromatograma del Compuesto III.



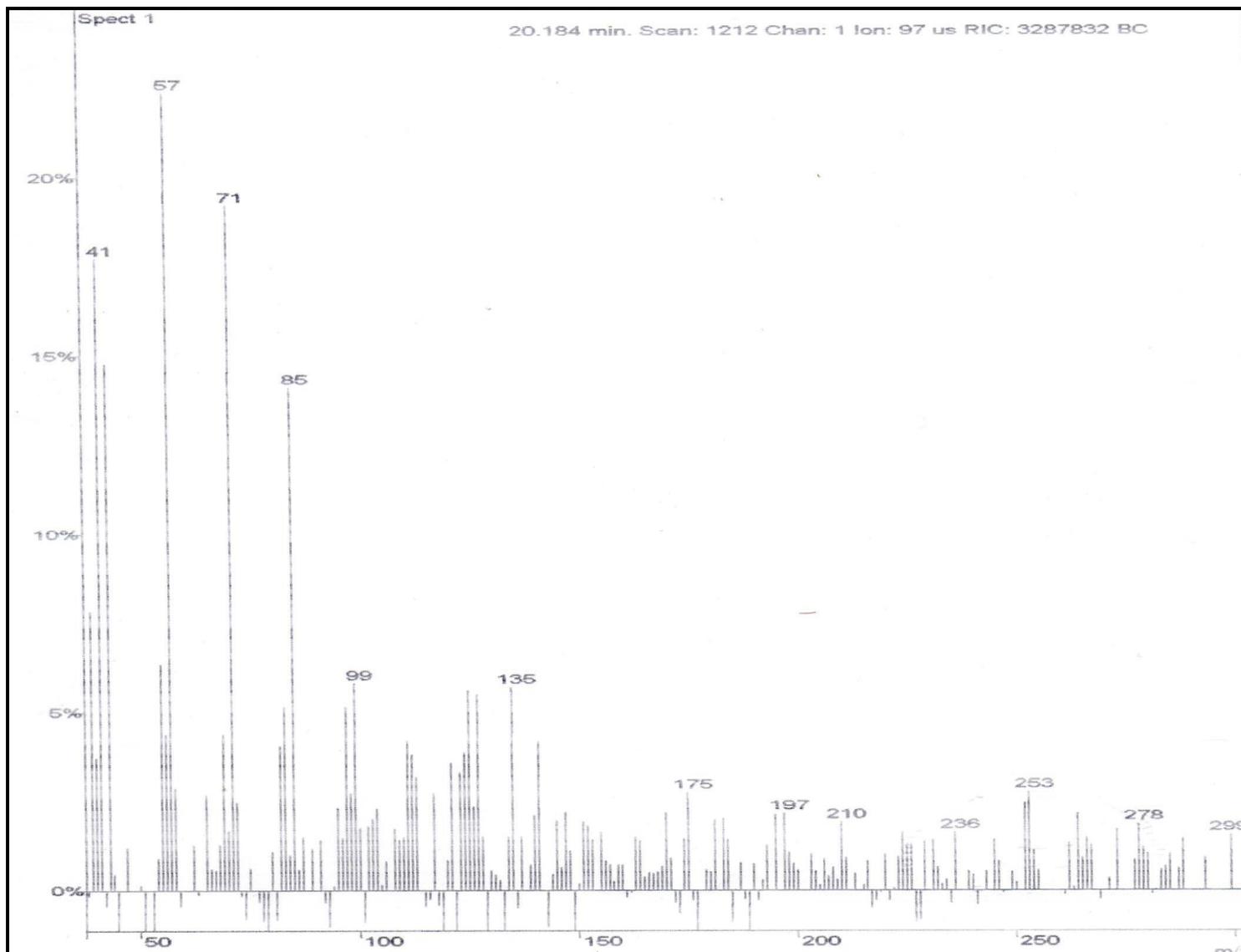
Anexo 3h. Espectro de Masa del Compuesto III.



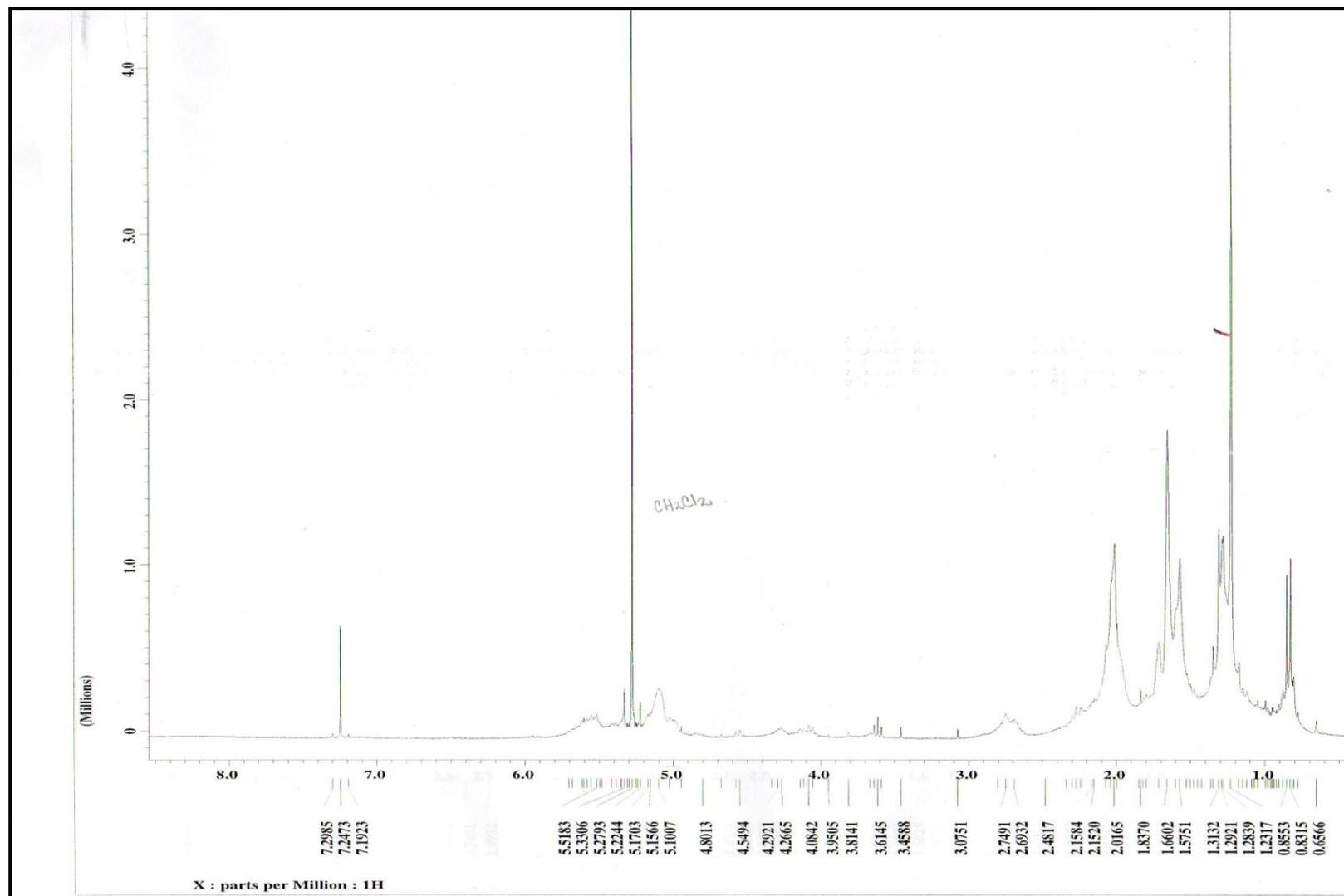
Anexo 3i. Espectro de Masa del Compuesto III.



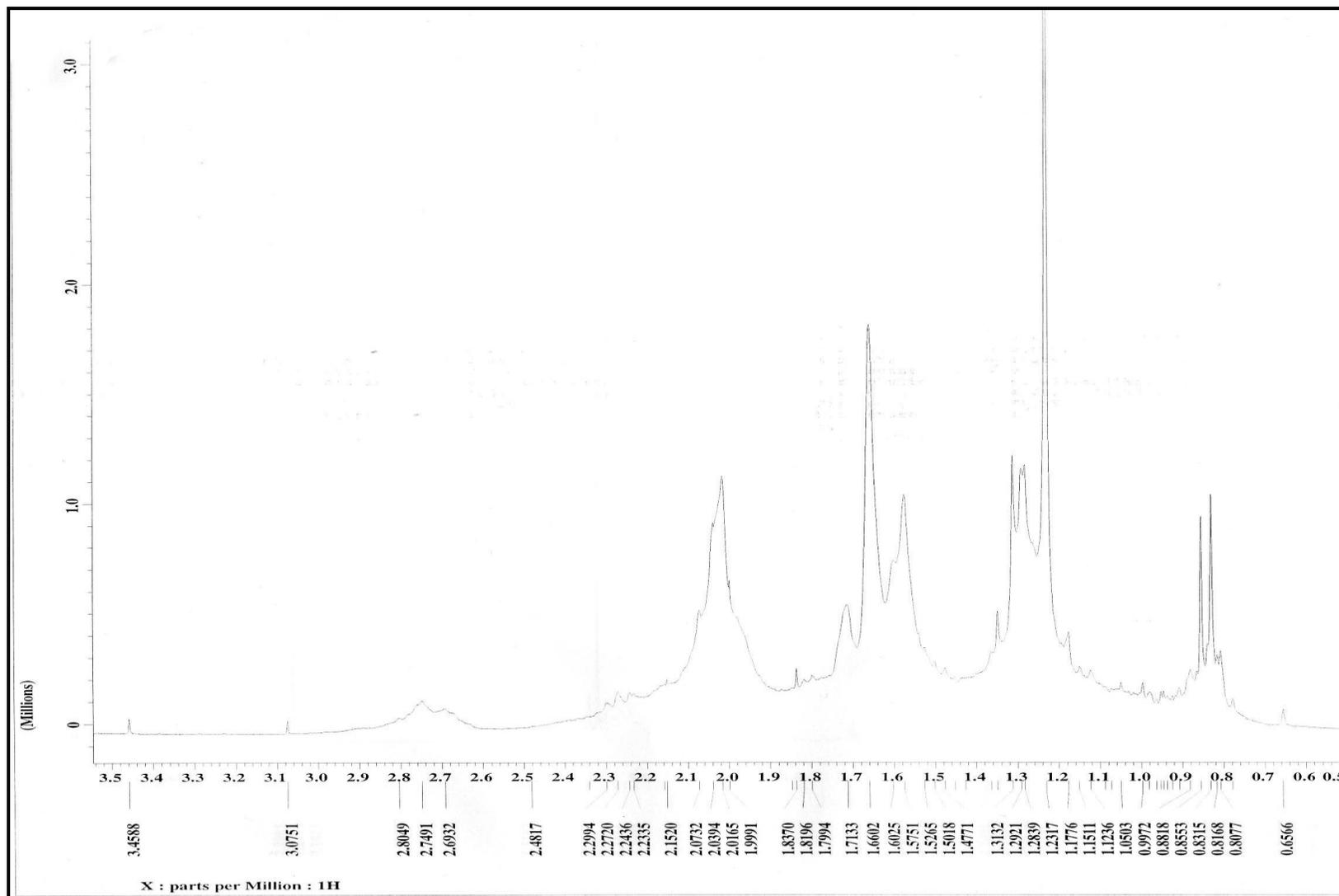
Anexo 3j. Espectro de Masa del Compuesto III.



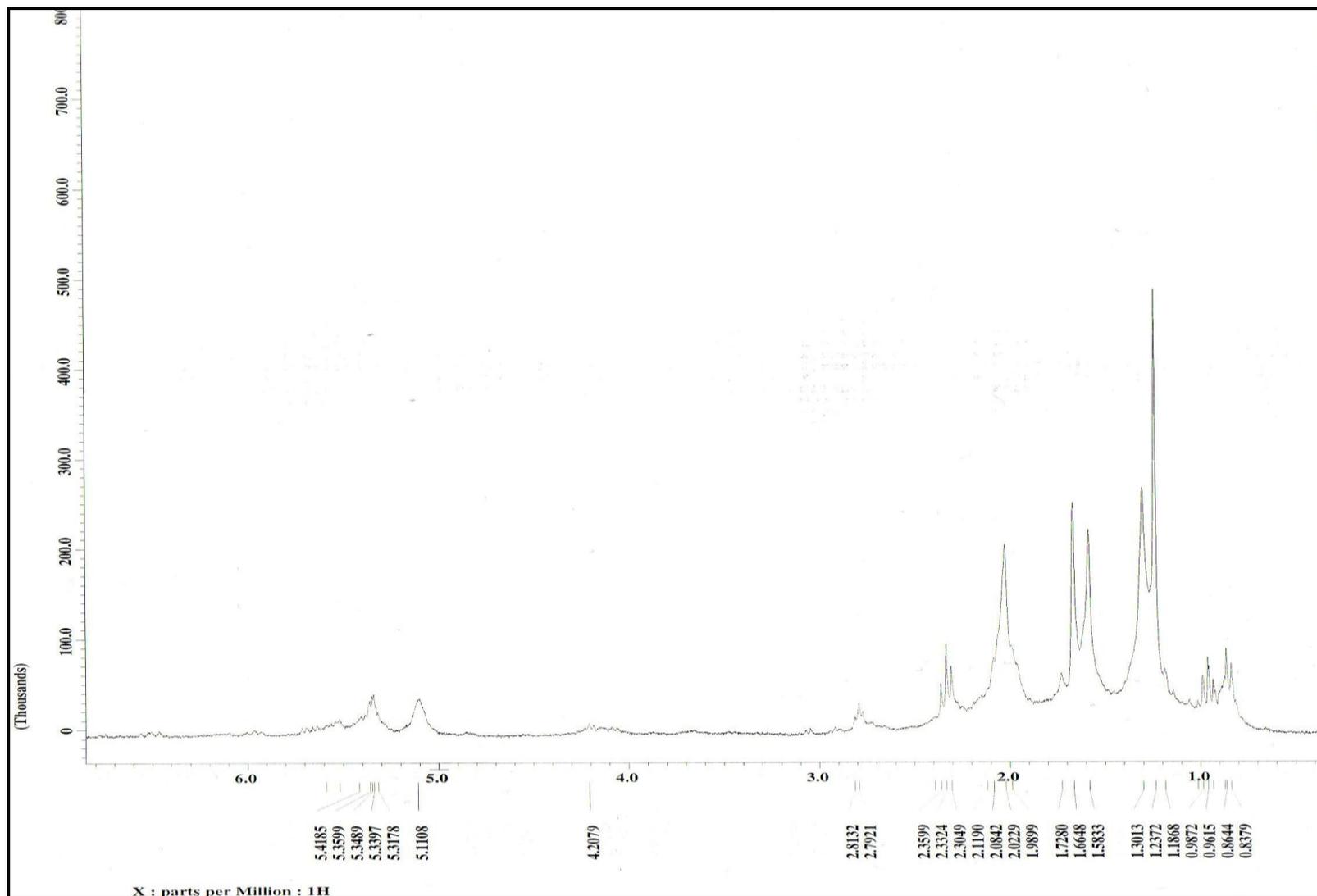
Anexo 3k. Espectro de Masa del Compuesto III.



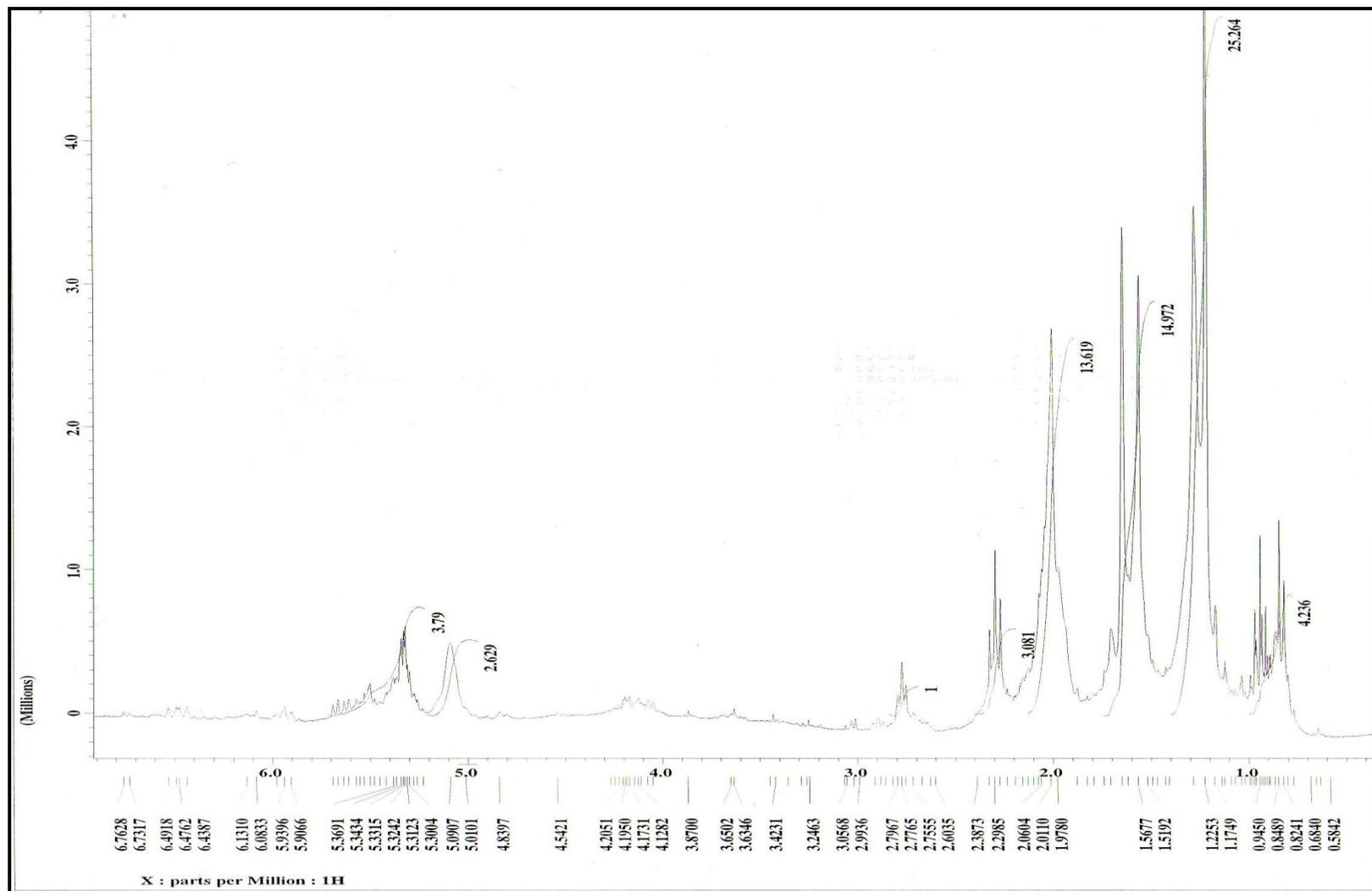
Anexo 4a. Espectro de RMN ¹H del Compuesto IV.



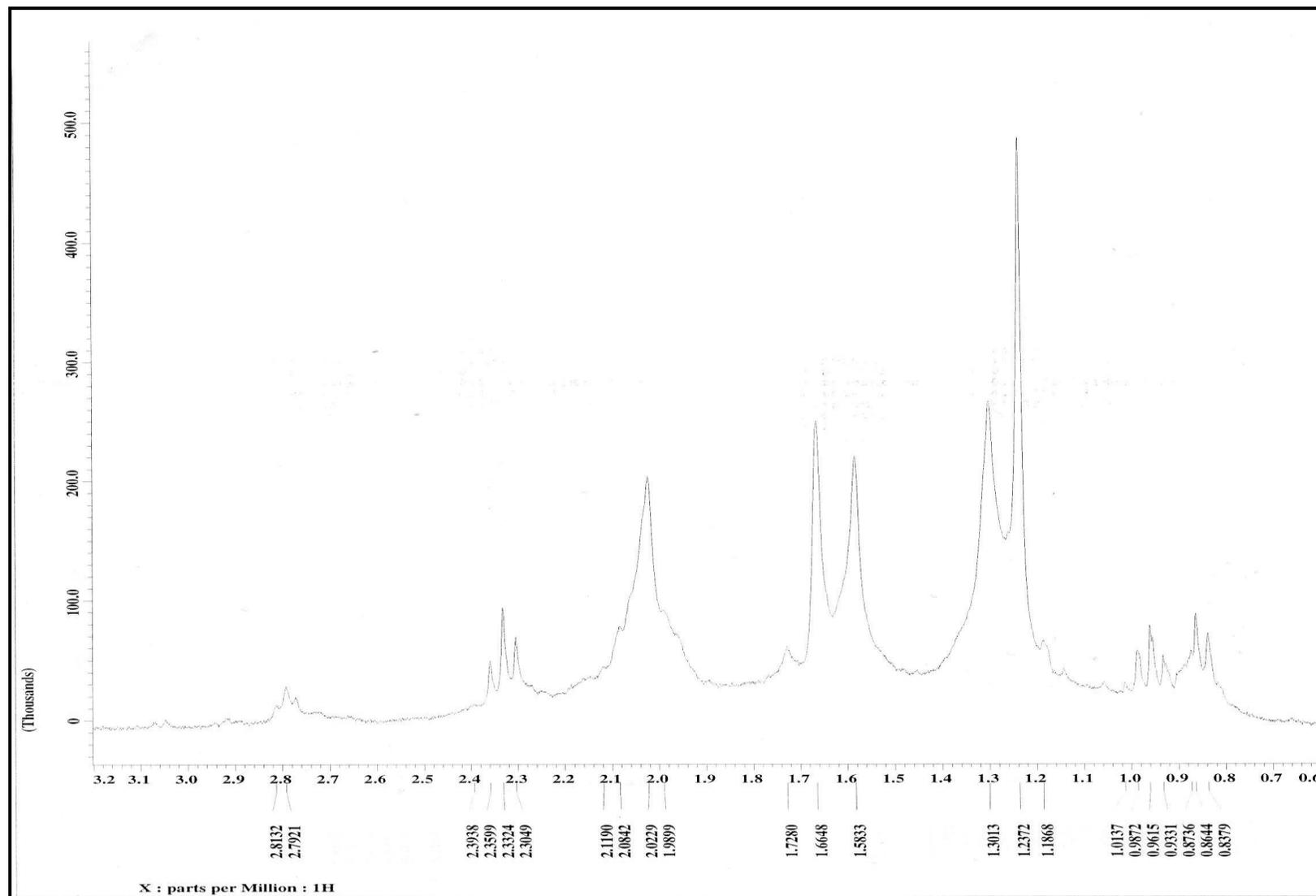
Anexo 4b. Ampliación del espectro de RMN ^1H del Compuesto IV.



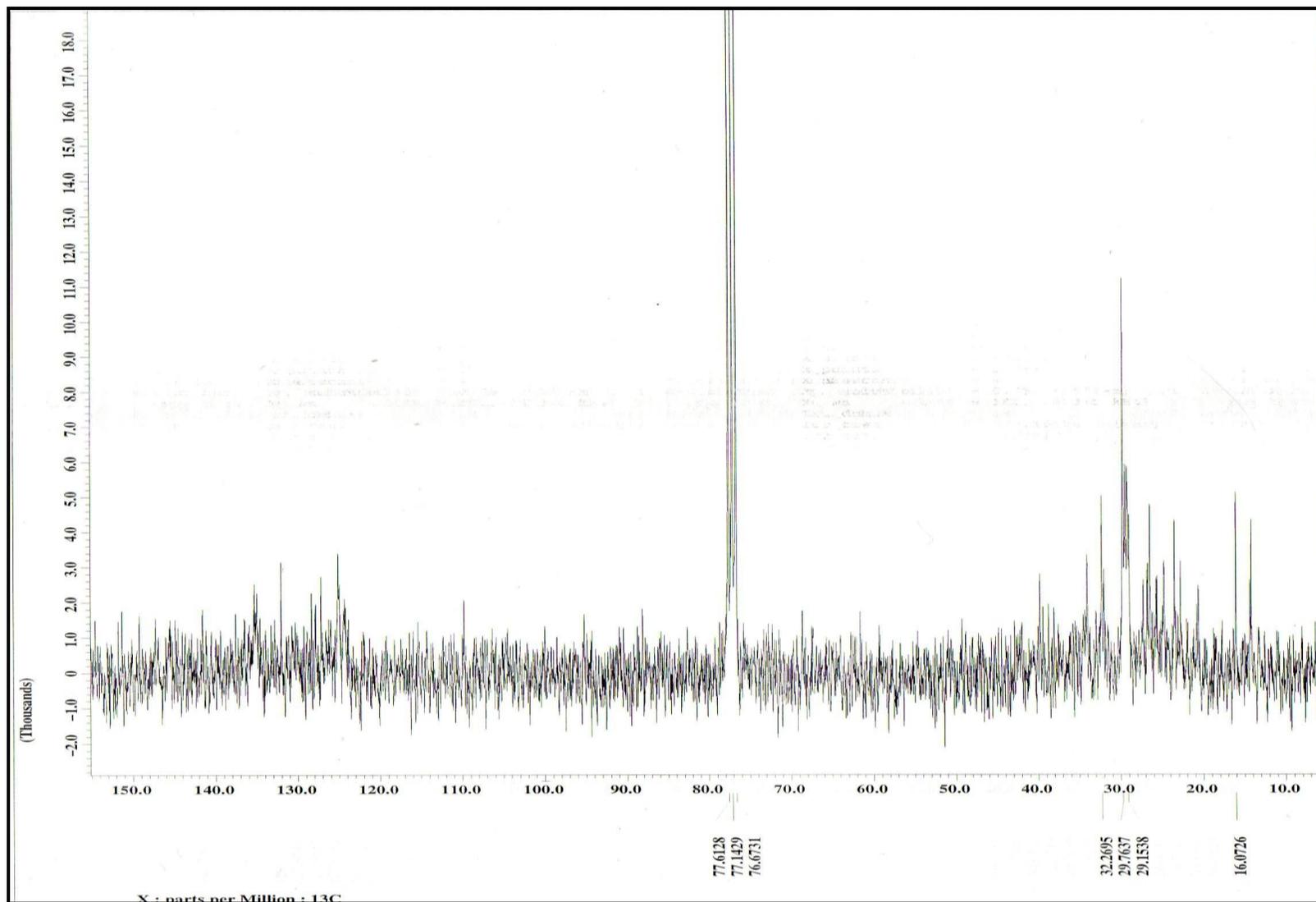
Anexo 5a. Espectro de RMN ^1H del Compuesto V.



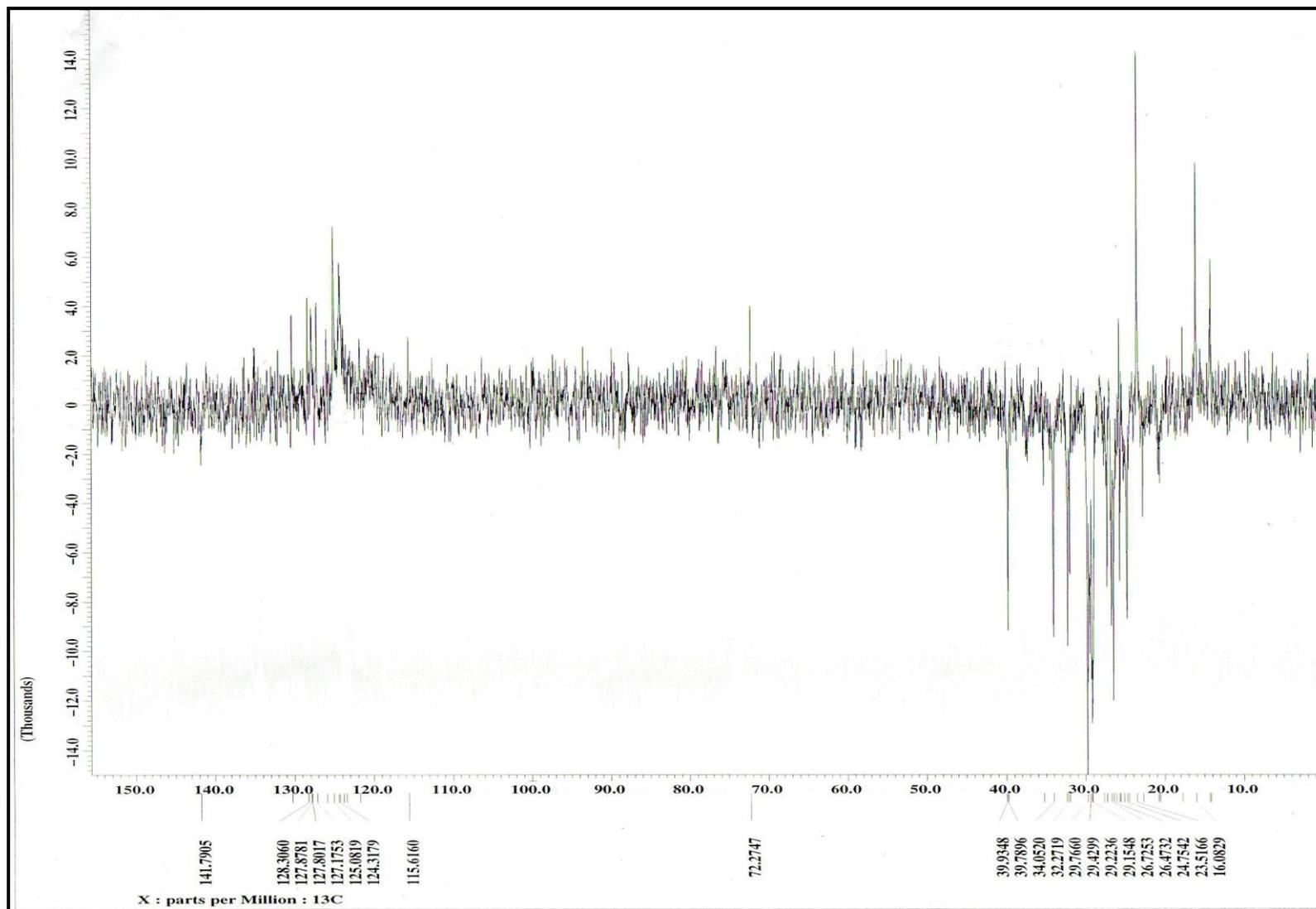
Anexo 5b. Espectro de RMN ^1H del Compuesto V.



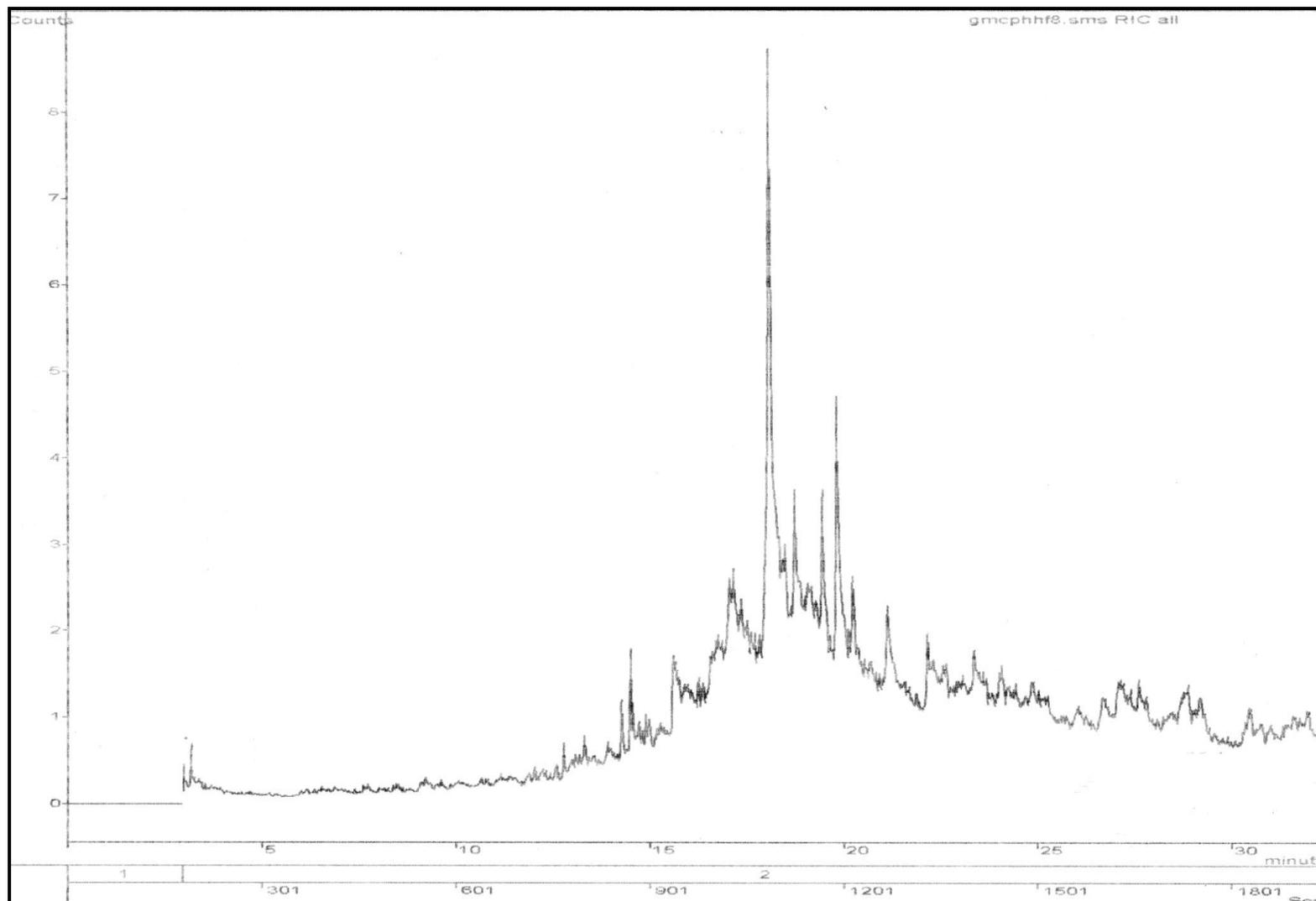
Anexo 5c. Ampliación del espectro de RMN ^1H del Compuesto V.



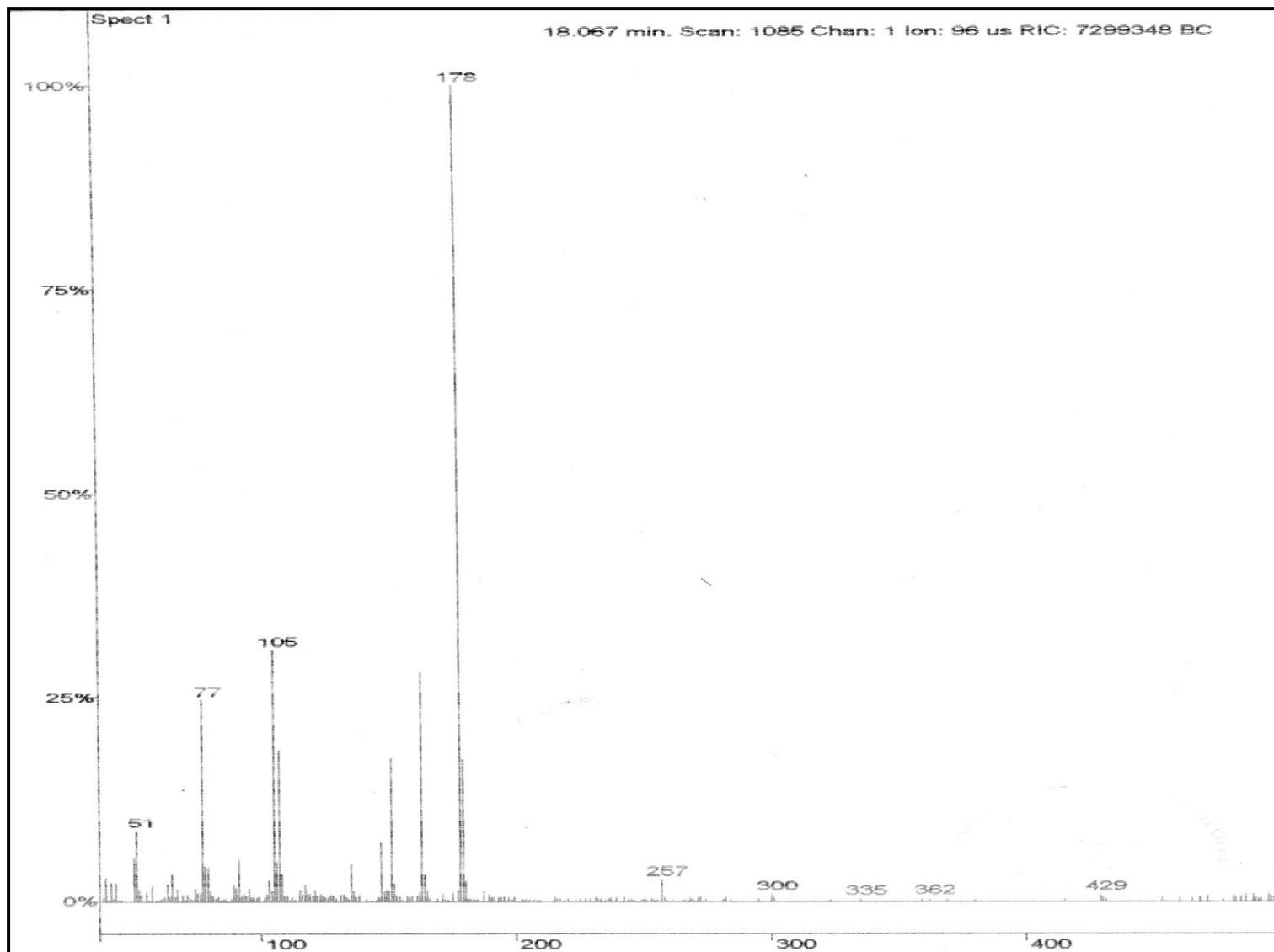
Anexo 5d. Espectro de RMN ^{13}C del Compuesto V.



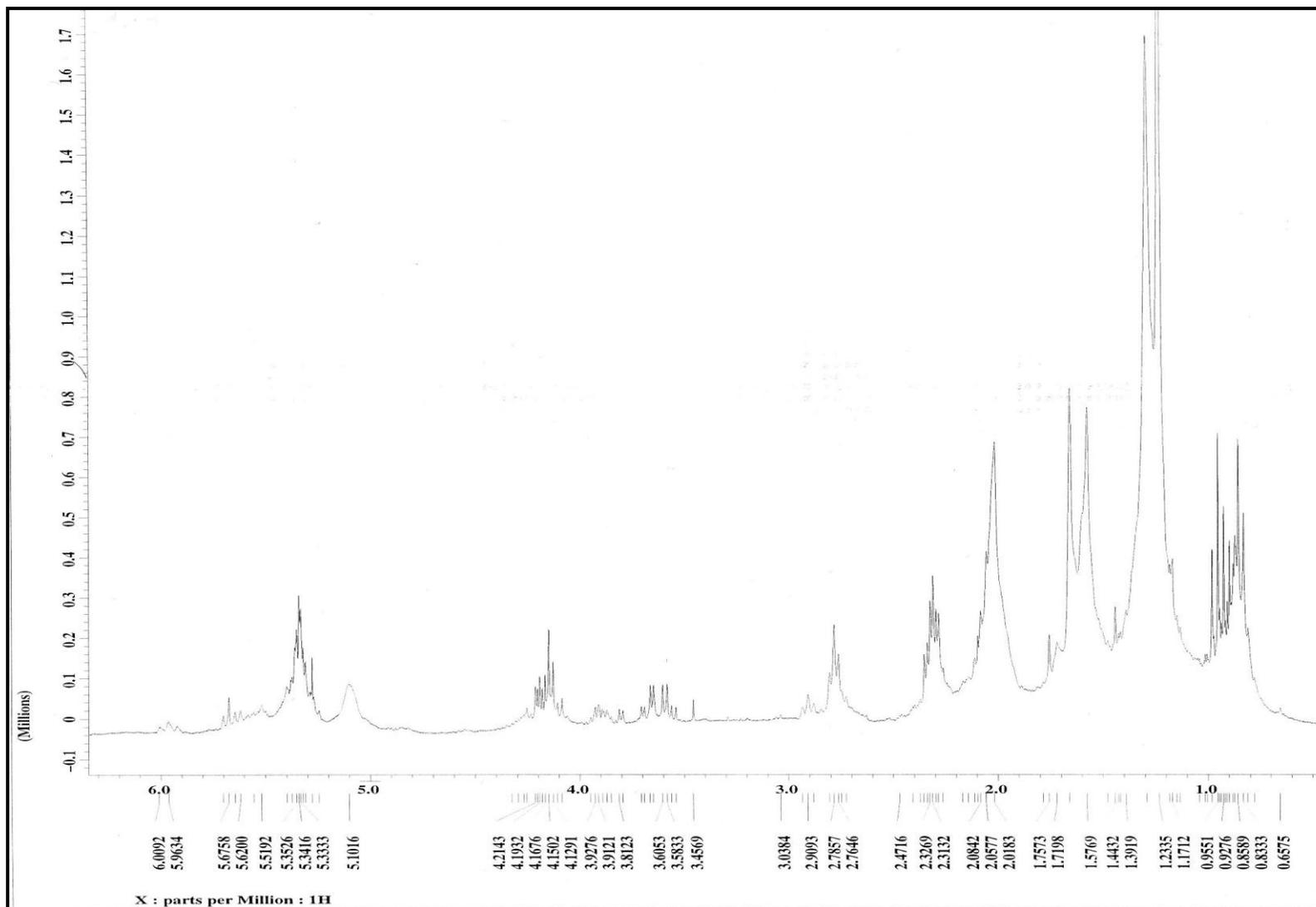
Anexo 5e. Espectro DEPT 135 del Compuesto V.



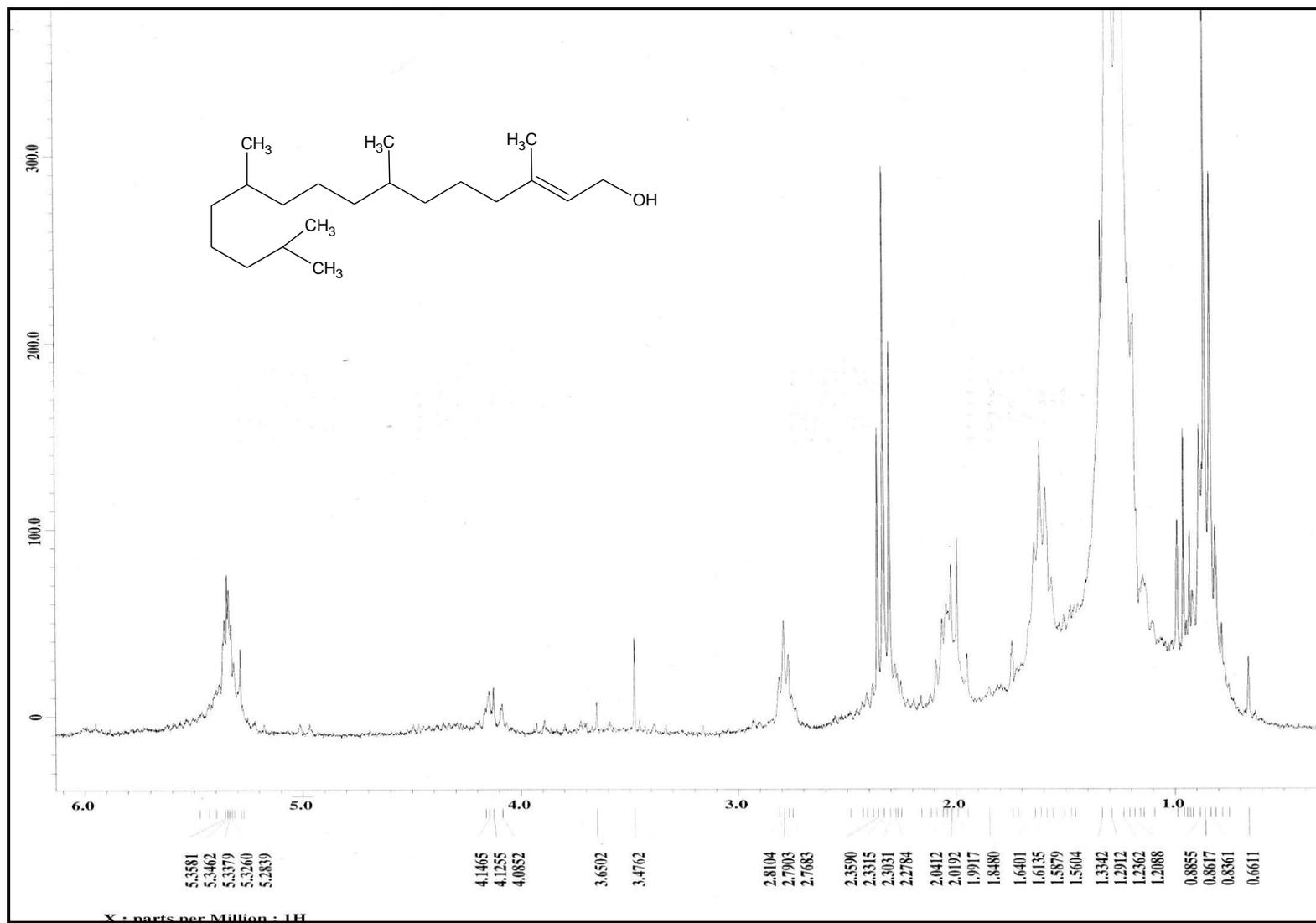
Anexo 5f. Cromatograma del Compuesto V.

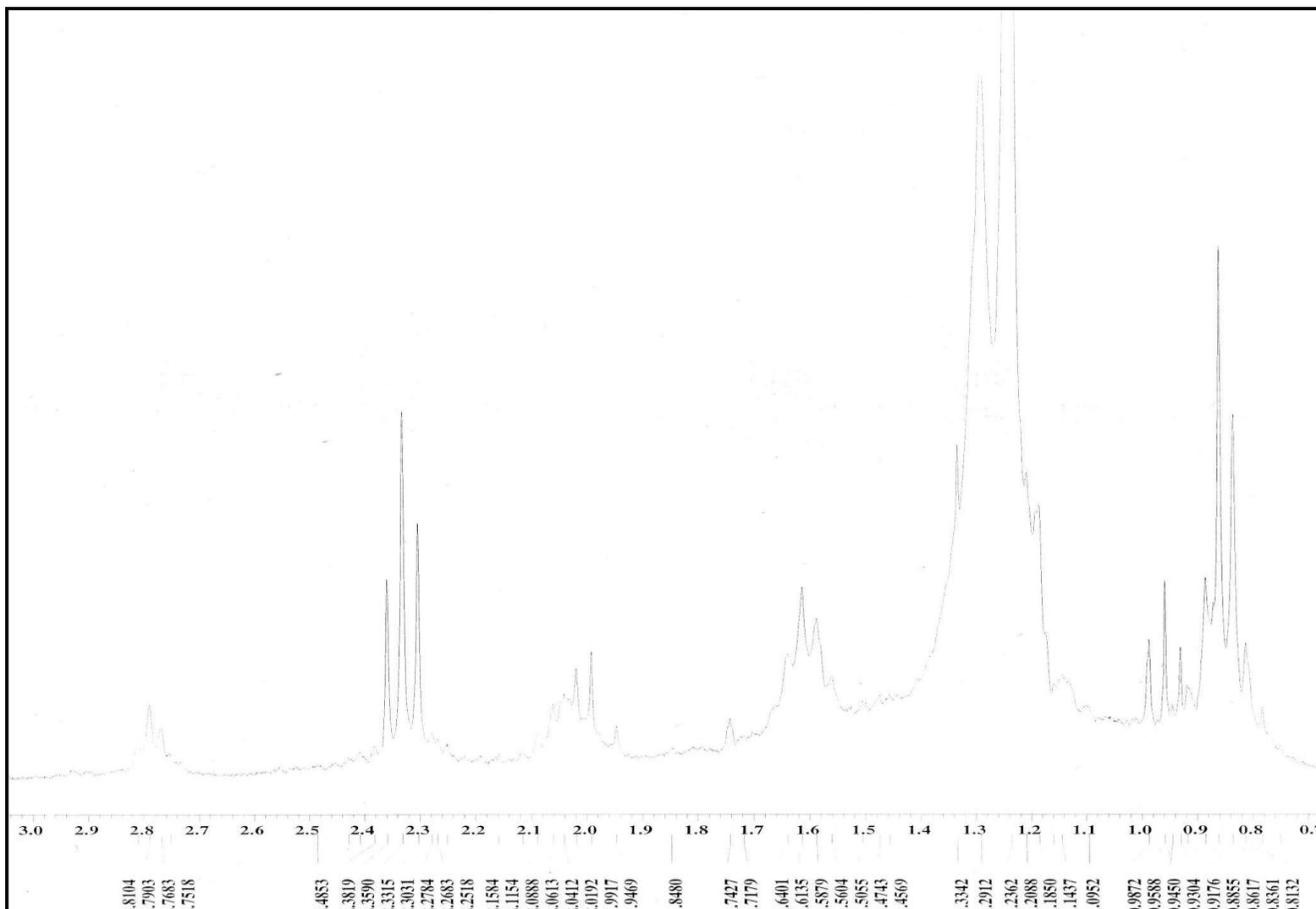


Anexo 5g. Espectro del Masa del Compuesto V.

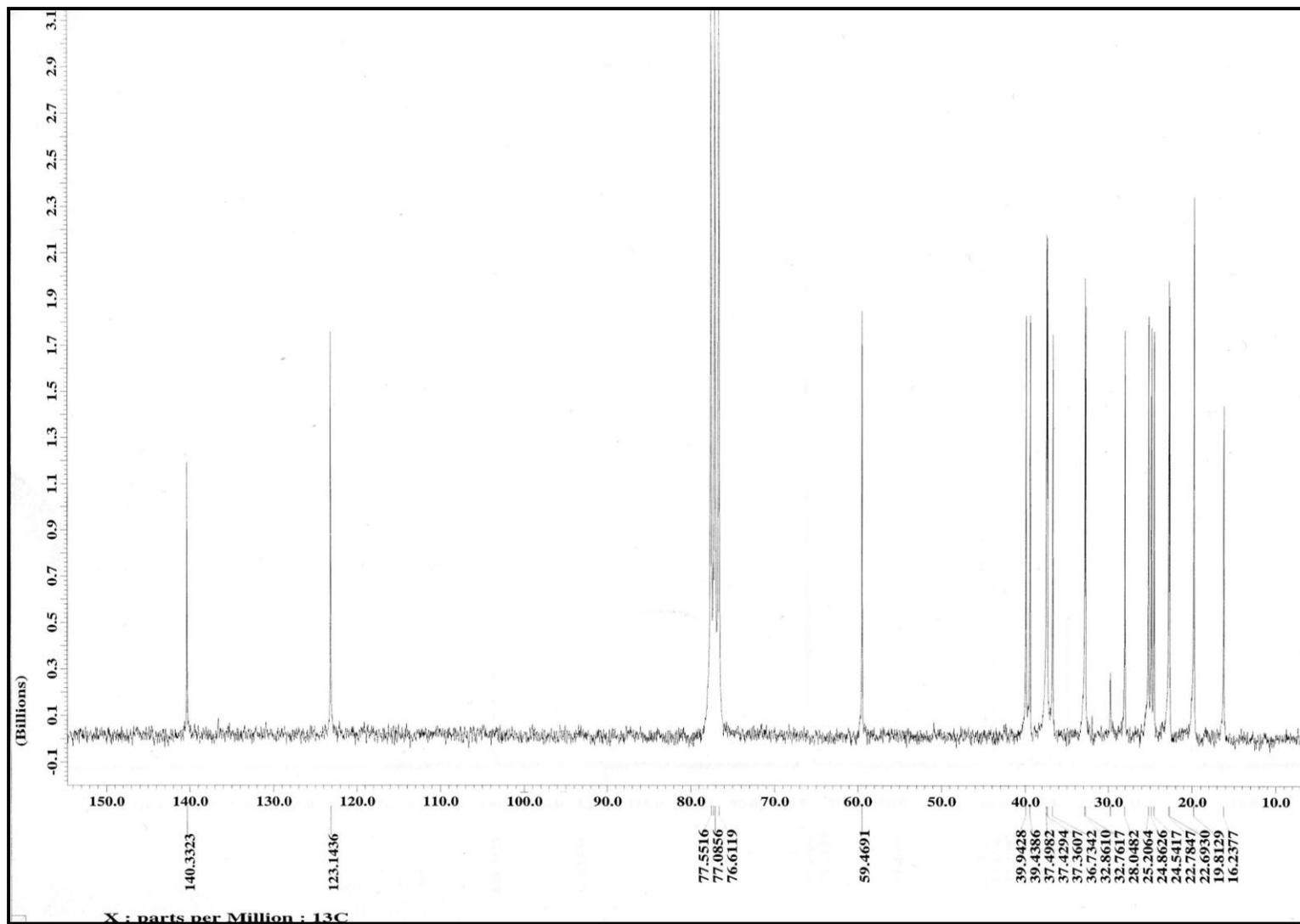


Anexo 6a. Espectro de RMN ^1H del Compuesto VI.

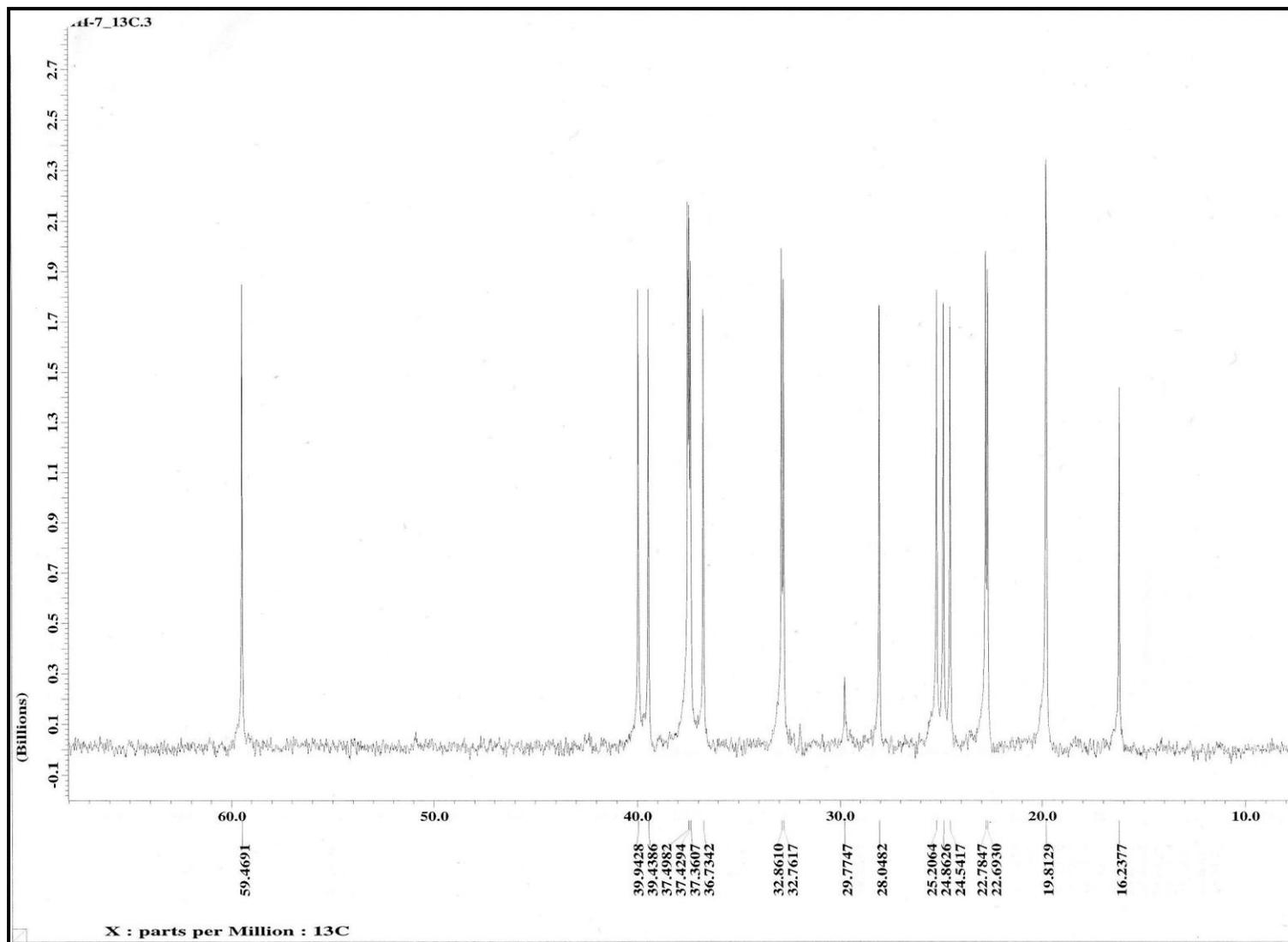
Anexo 7a. Espectro de RMN ^1H del Fitol.



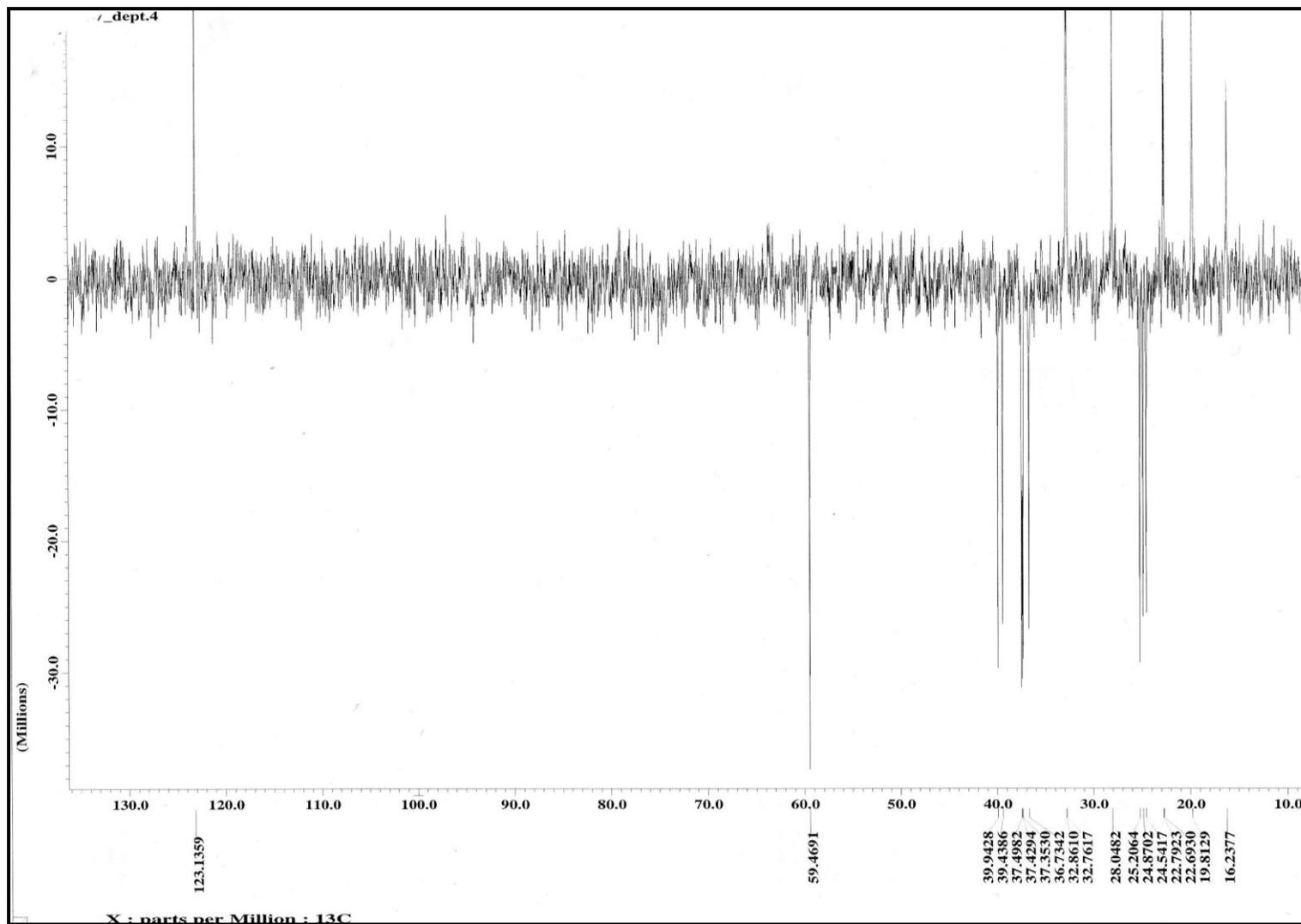
Anexo 7b. Ampliación del espectro de RMN ¹H del Fitol.



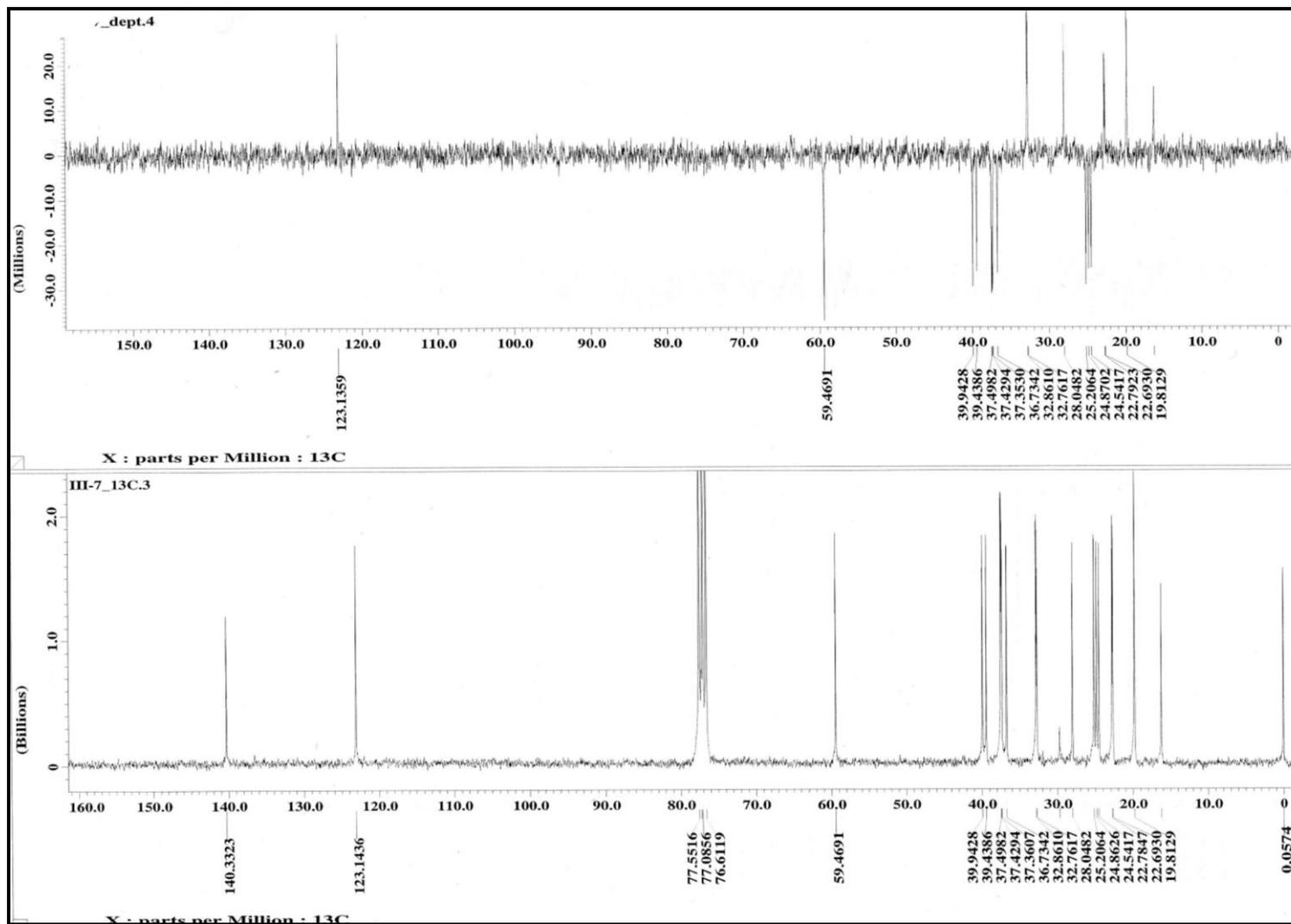
Anexo 7c. Espectro de RMN ^{13}C del Fitol.



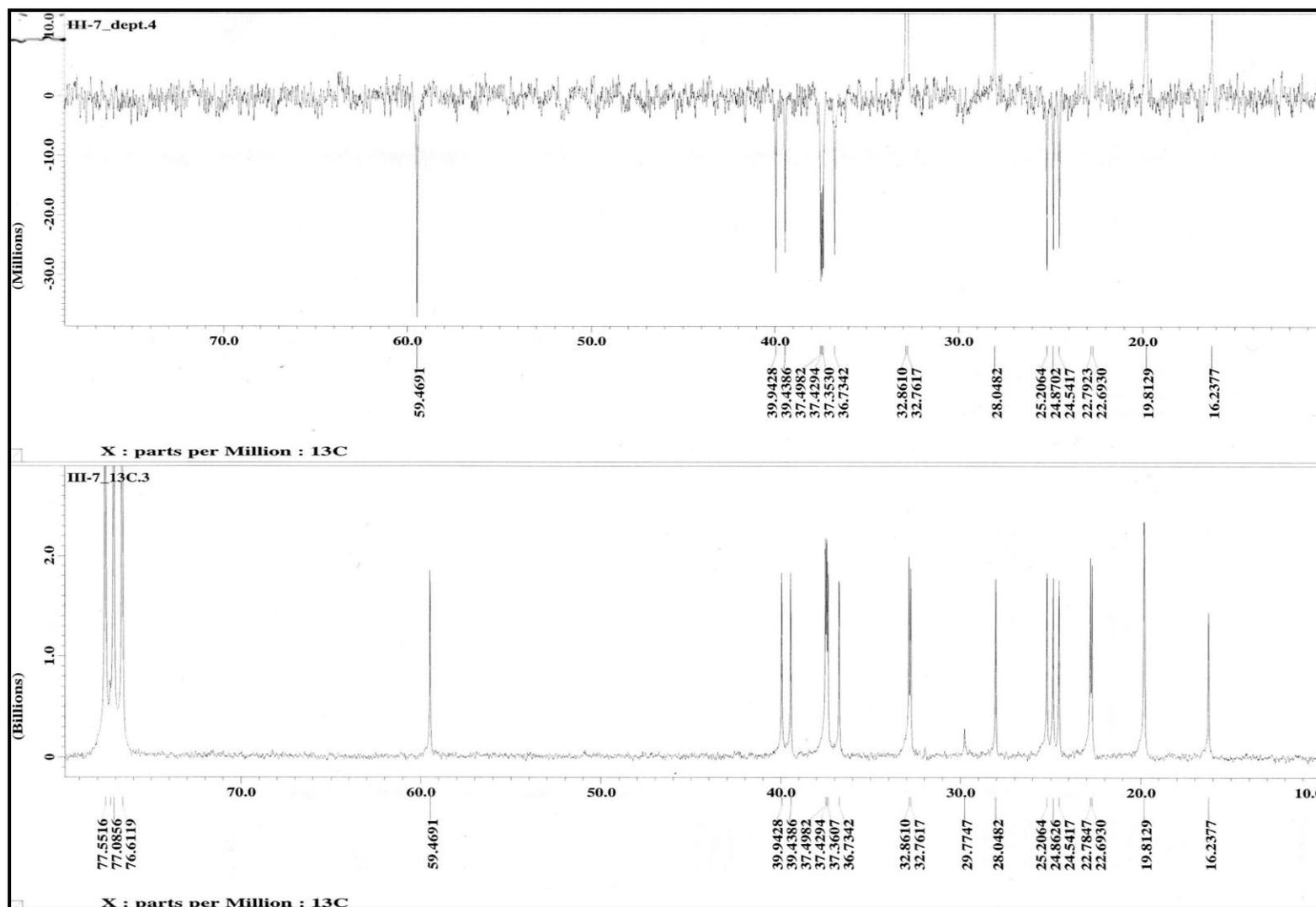
Anexo 7d. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del Fitol.



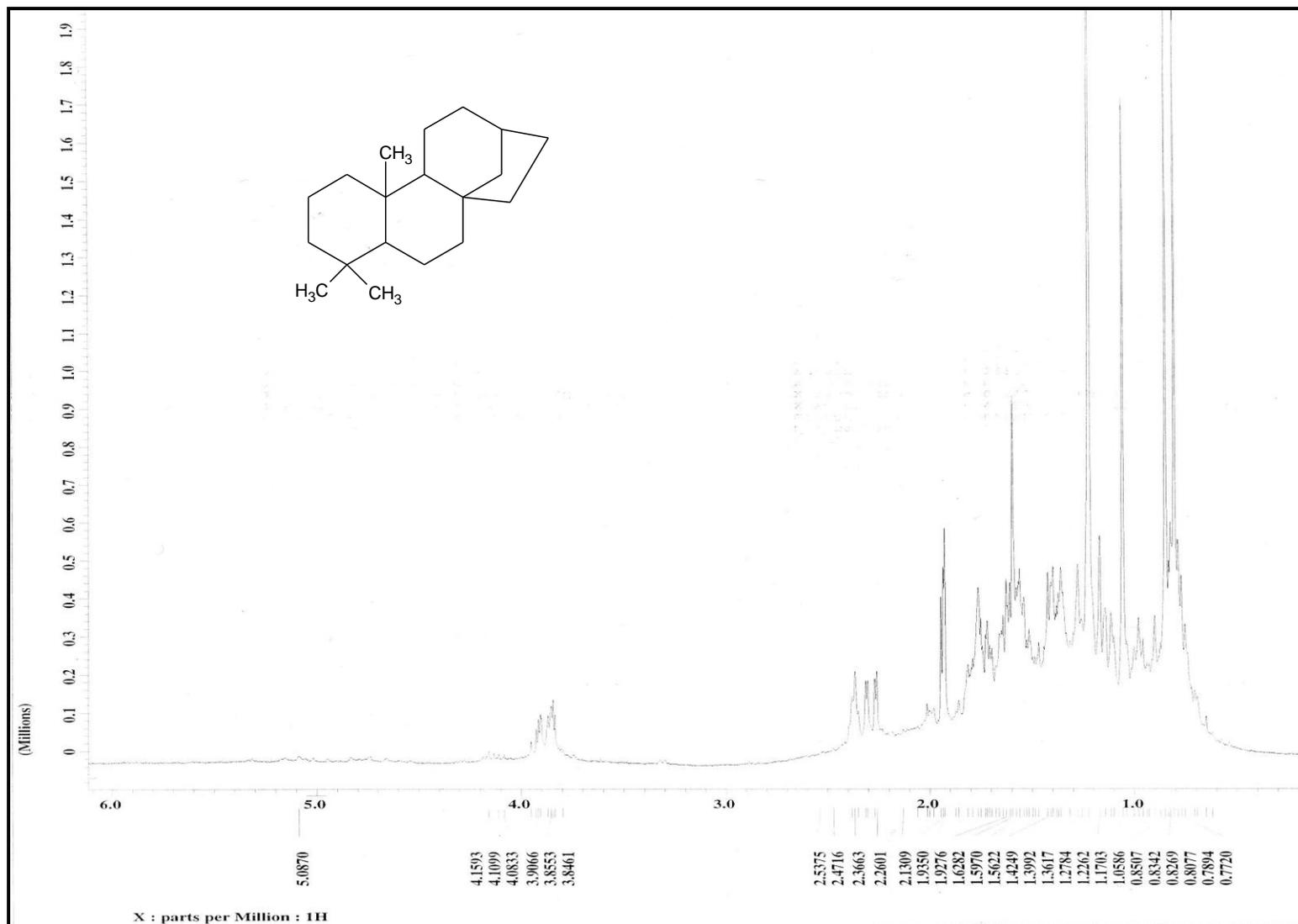
Anexo 7e. Espectro DEPT 135 del Fitol.



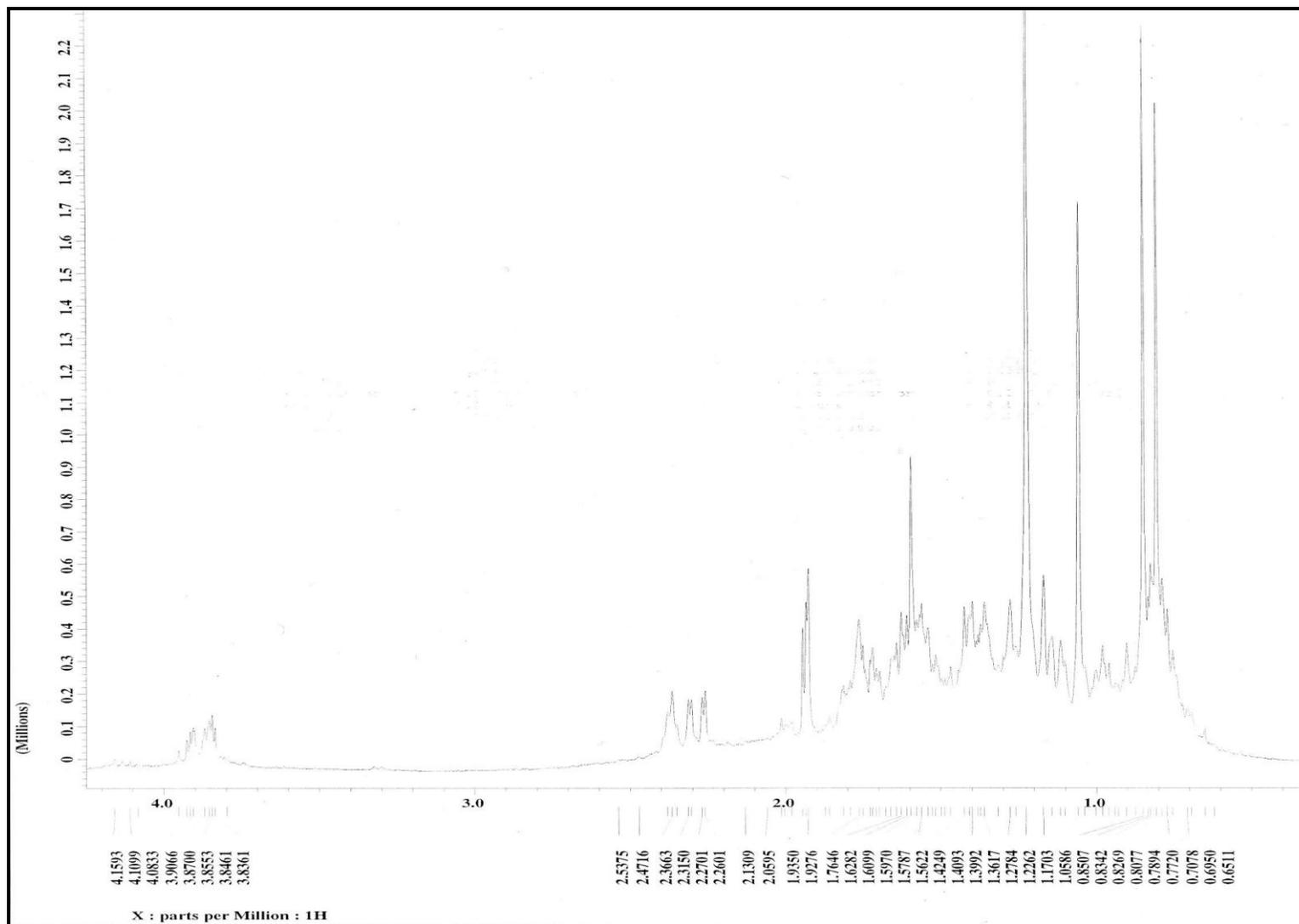
Anexo 7f. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 del Fitol.



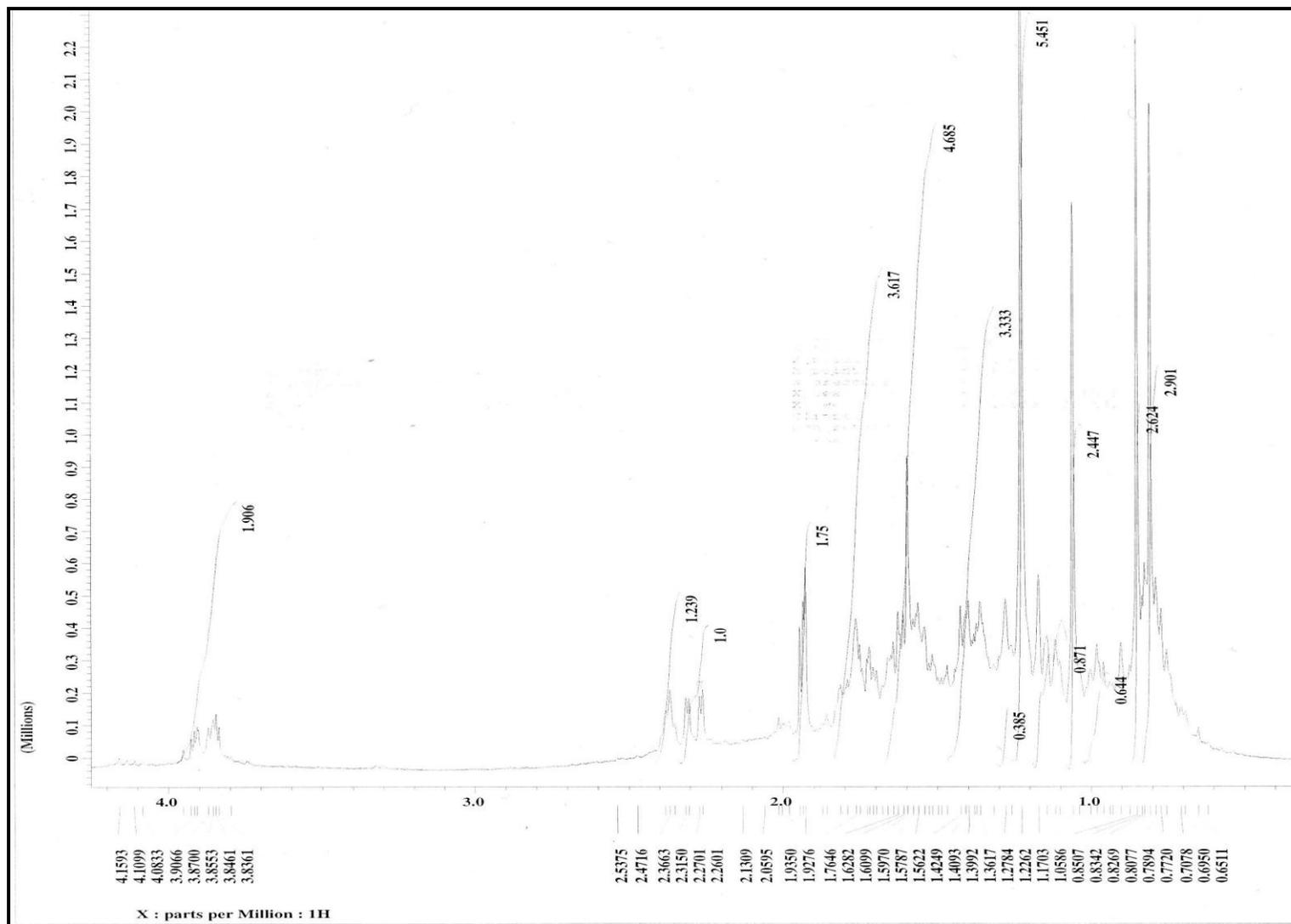
Anexo 7g. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 del Fitol.



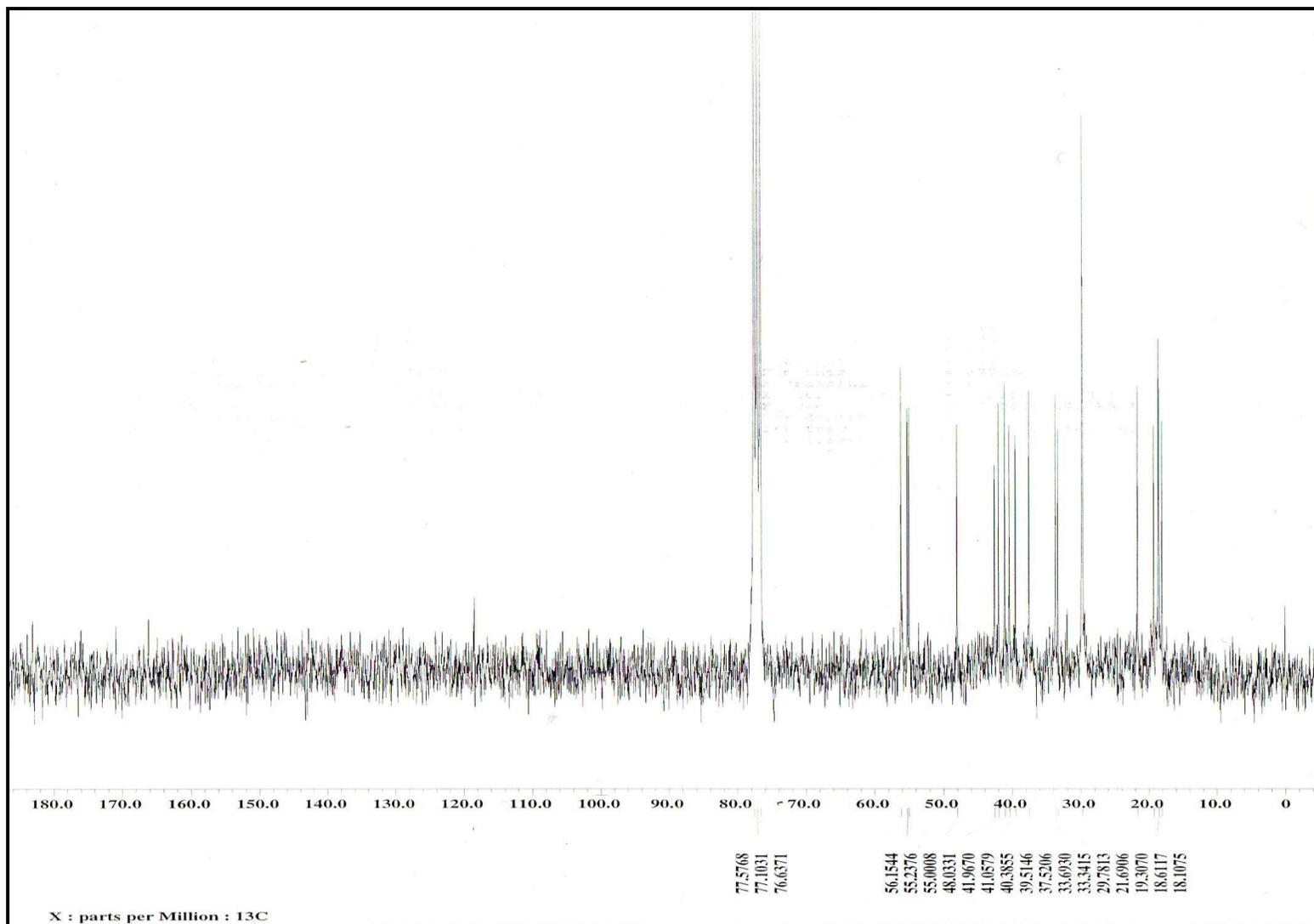
Anexo 8a. Espectro de RMN ^1H del *nor-ent*-kaurano.



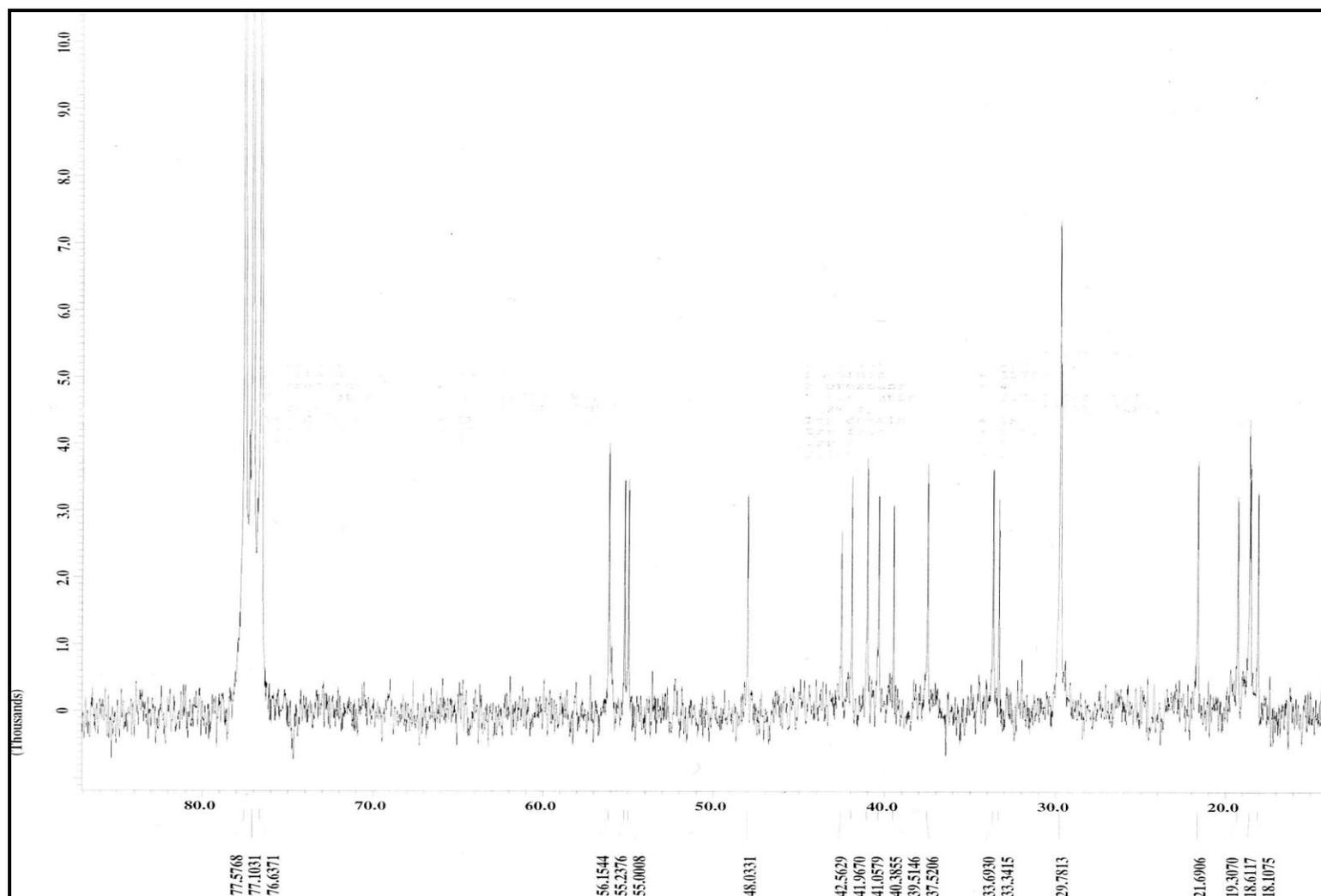
Anexo 8b. Ampliación del espectro de RMN ^1H del *nor-ent-kaurano*.



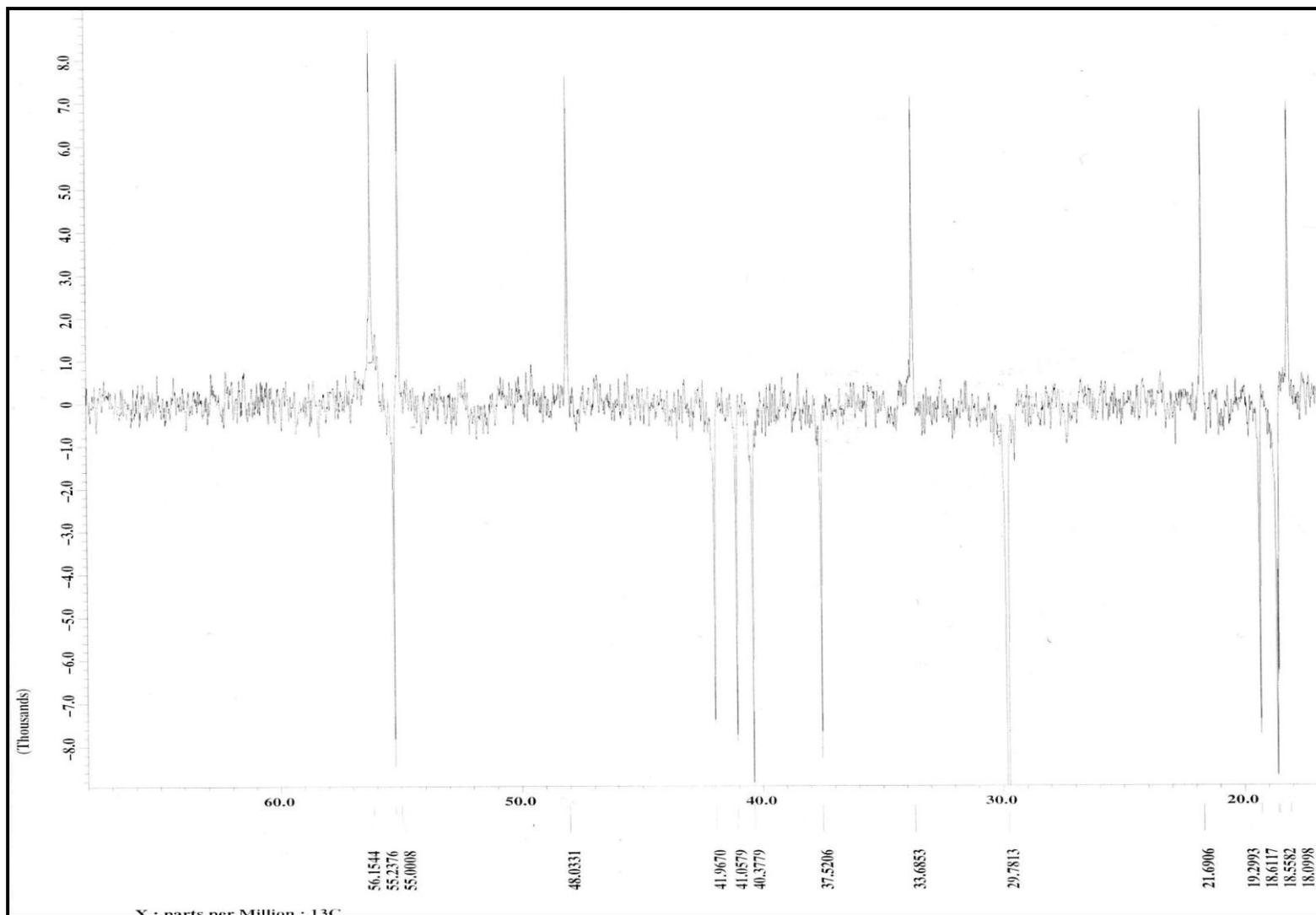
Anexo 8c. Ampliación del espectro de RMN ^1H del *nor-ent-kaurano*.



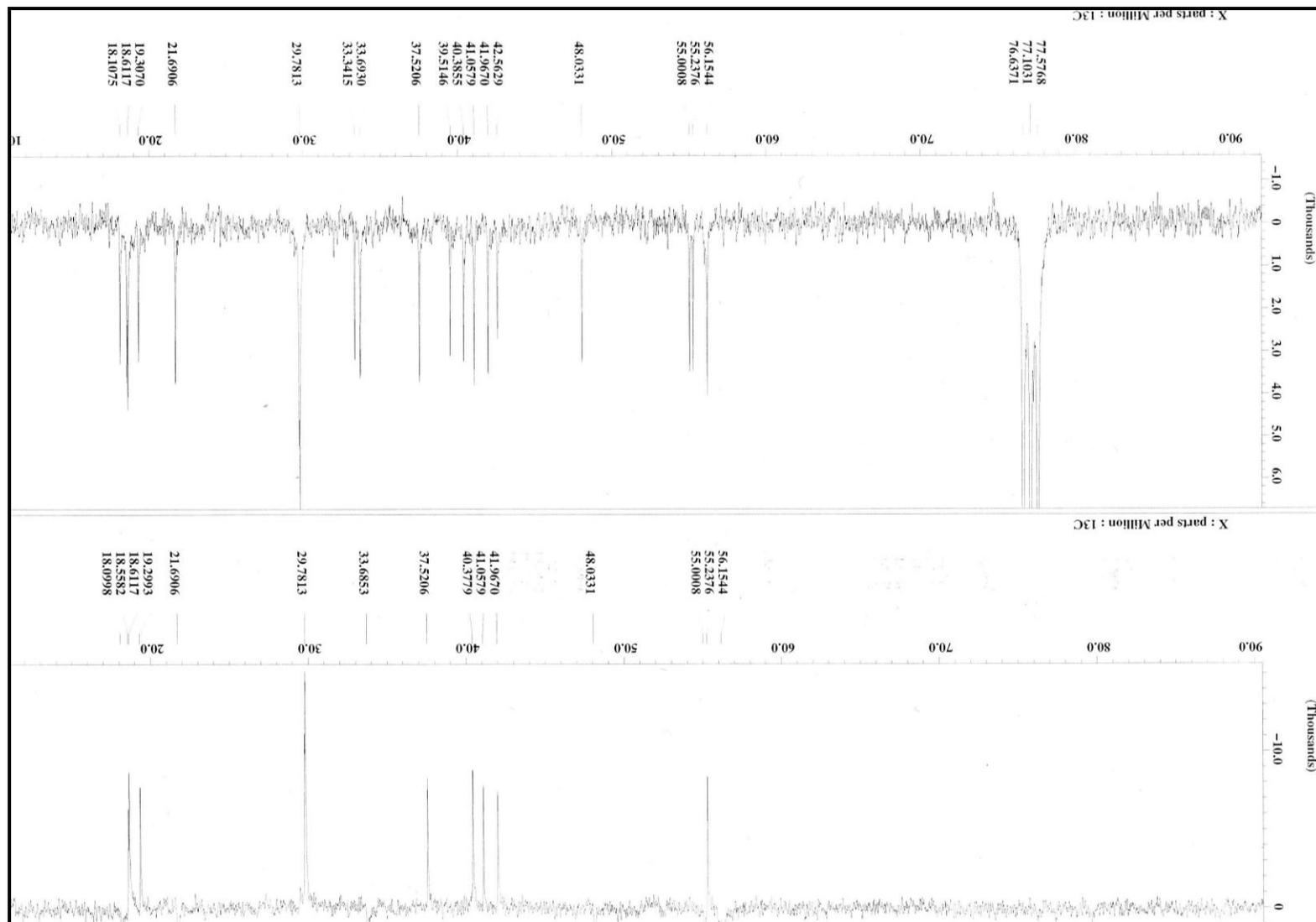
Anexo 8d. Espectro de RMN ^{13}C del *nor-ent-kaurano*.



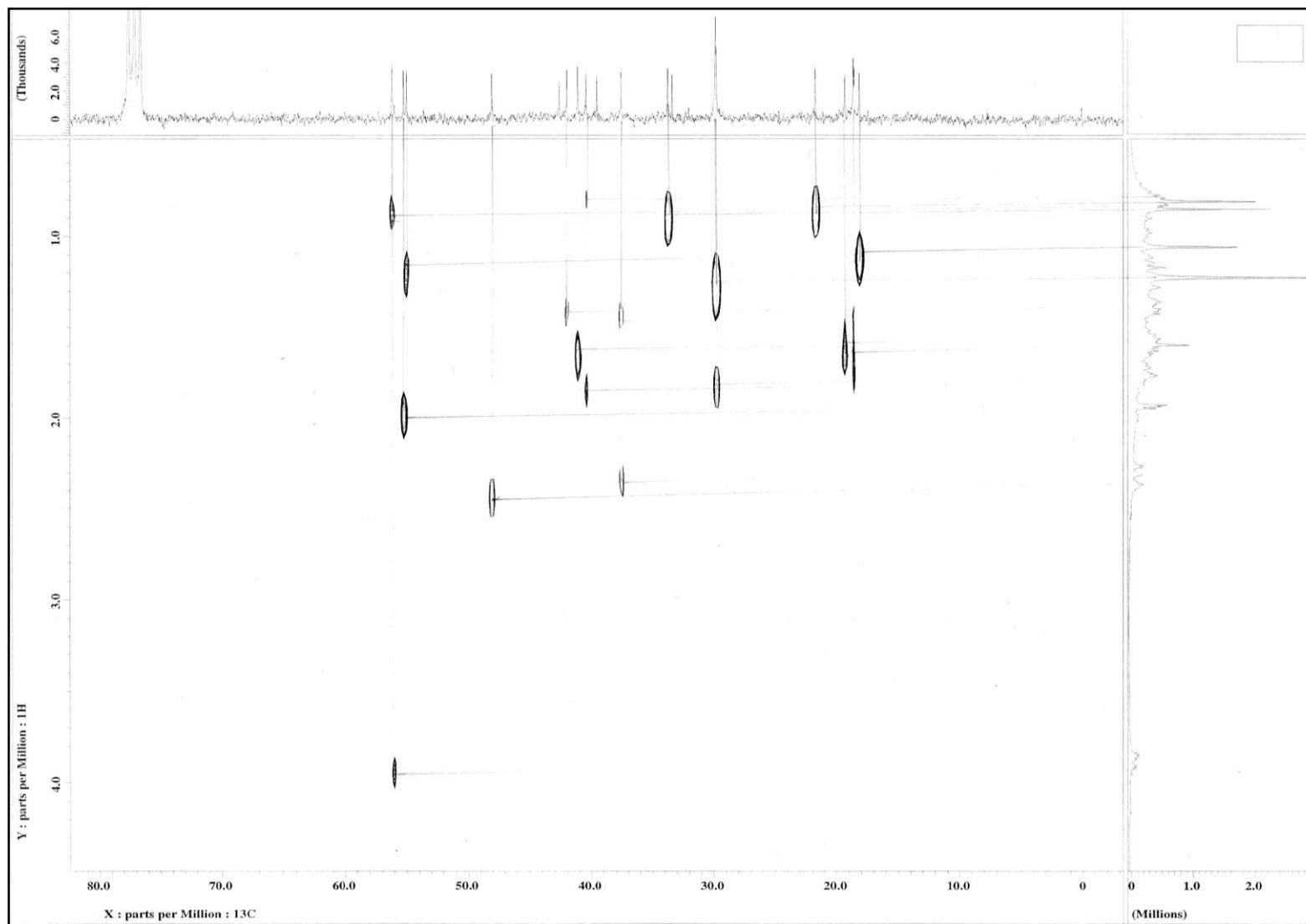
Anexo 8e. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del *nor-ent-kaurano*.



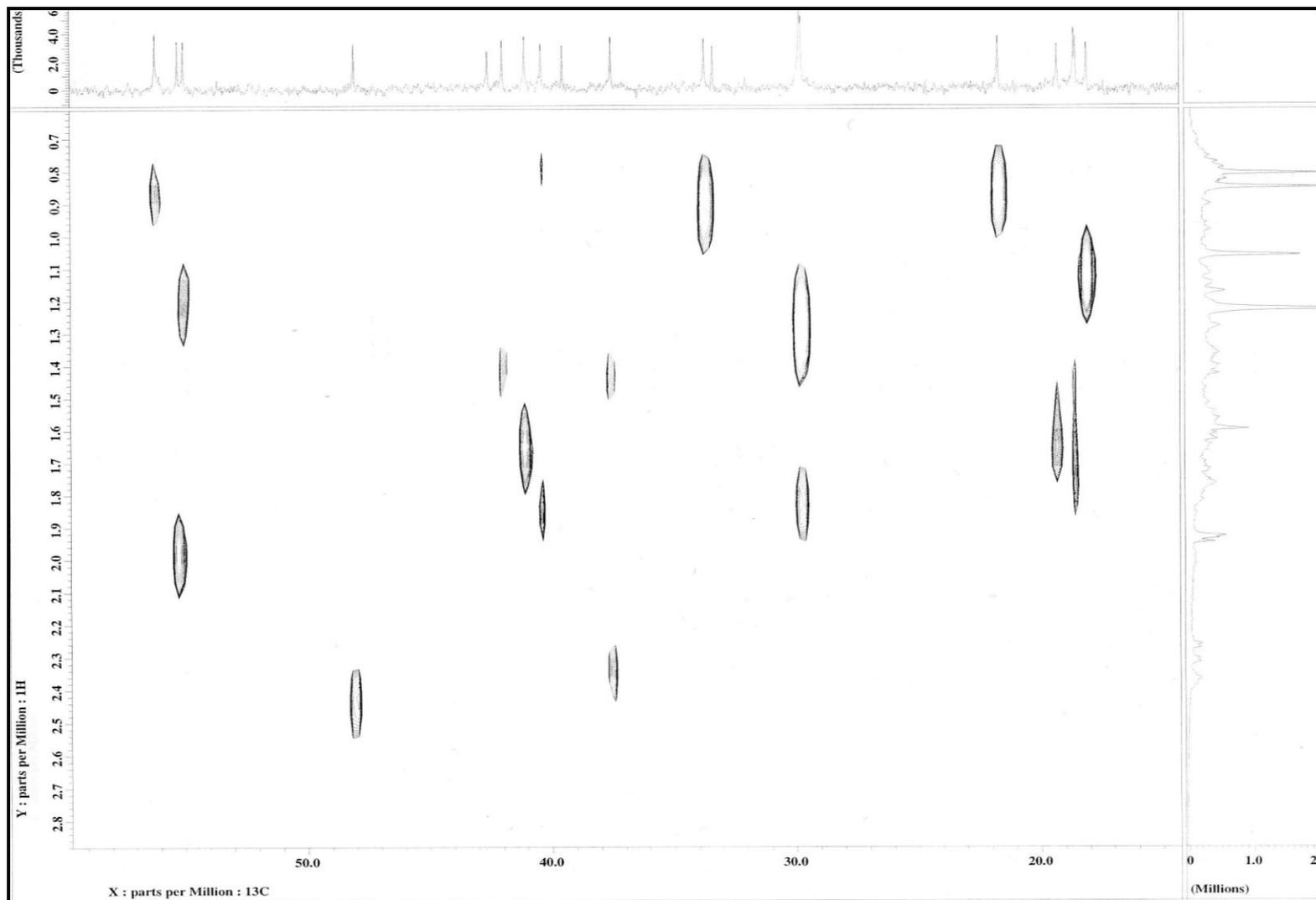
Anexo 8f. Espectro DEPT 135 del *nor-ent-kaurano*.



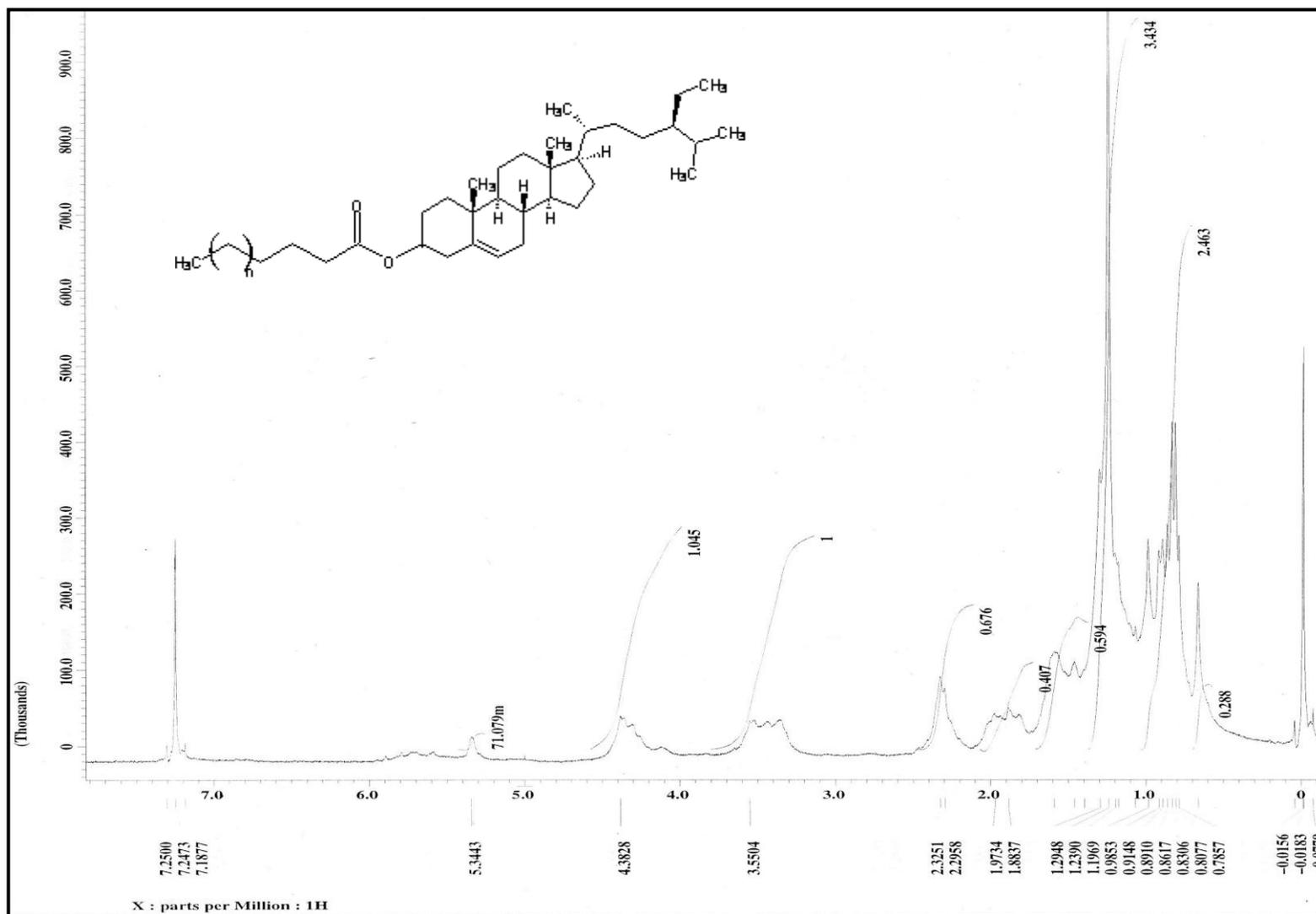
Anexo 8g. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT 135 del *nor-ent-kaurano*.



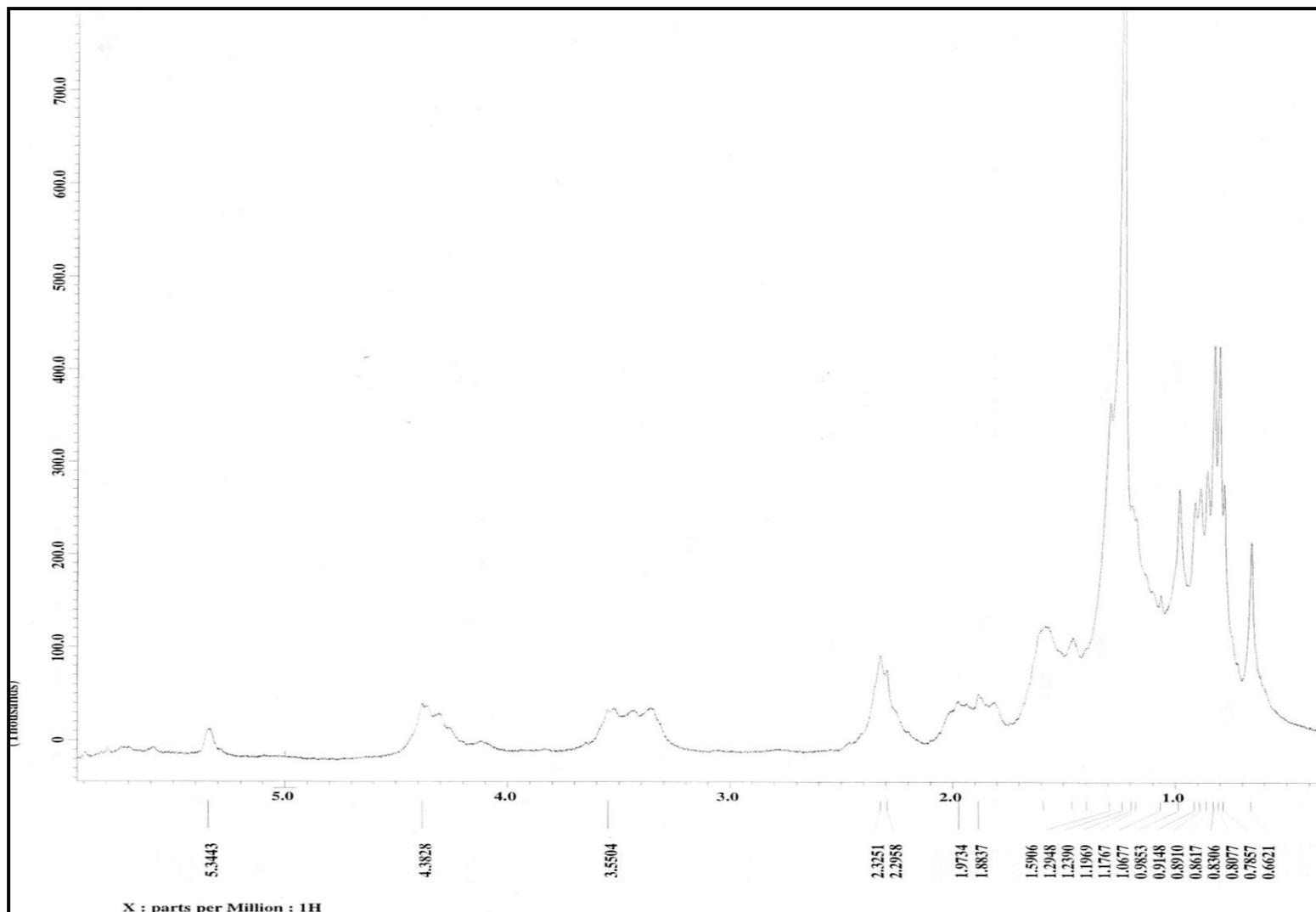
Anexo 8h. Espectro HETCOR del *nor-ent-kaurano*.



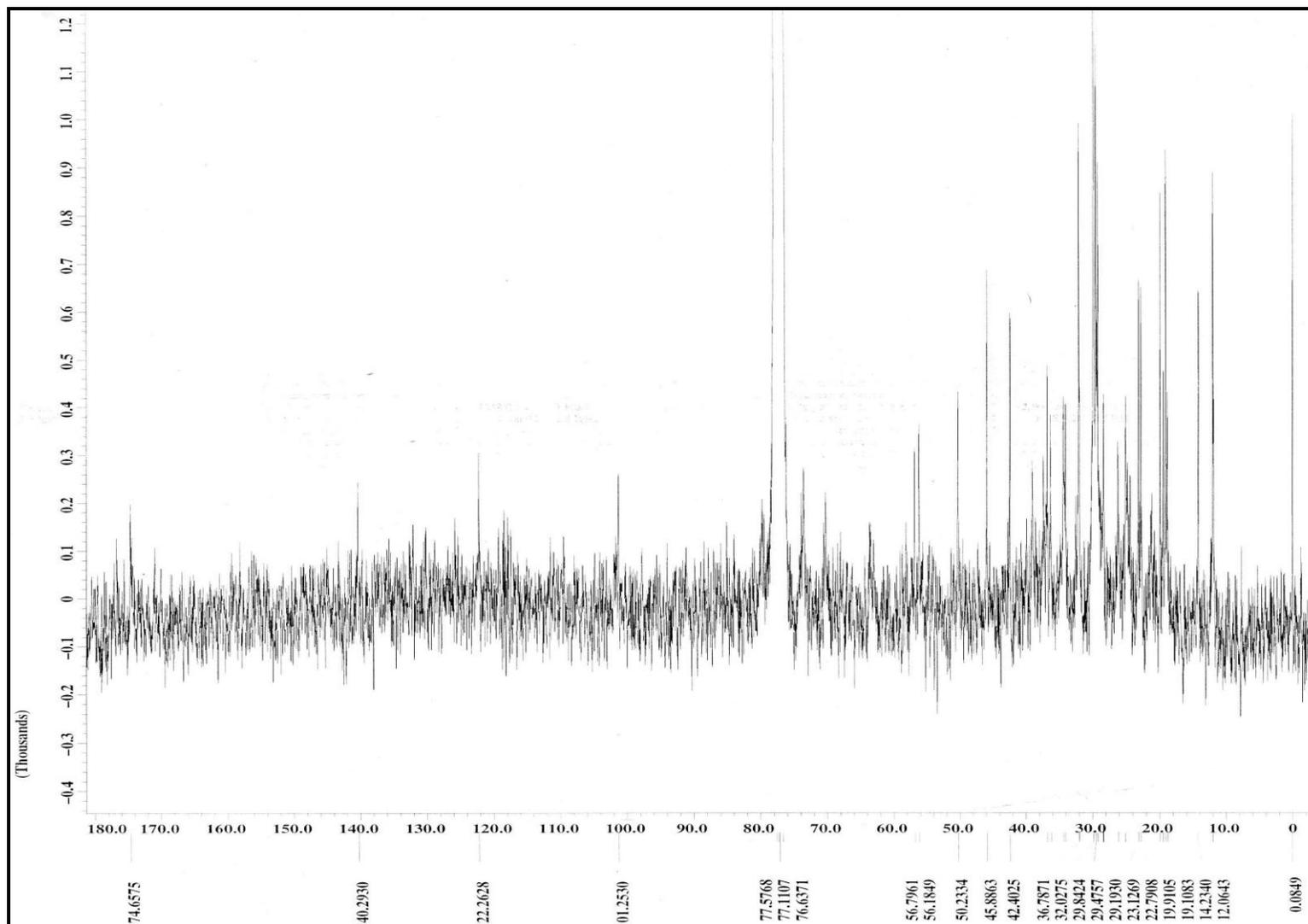
Anexo 8i. Ampliación del espectro HETCOR del *nor-ent-kaurano*.



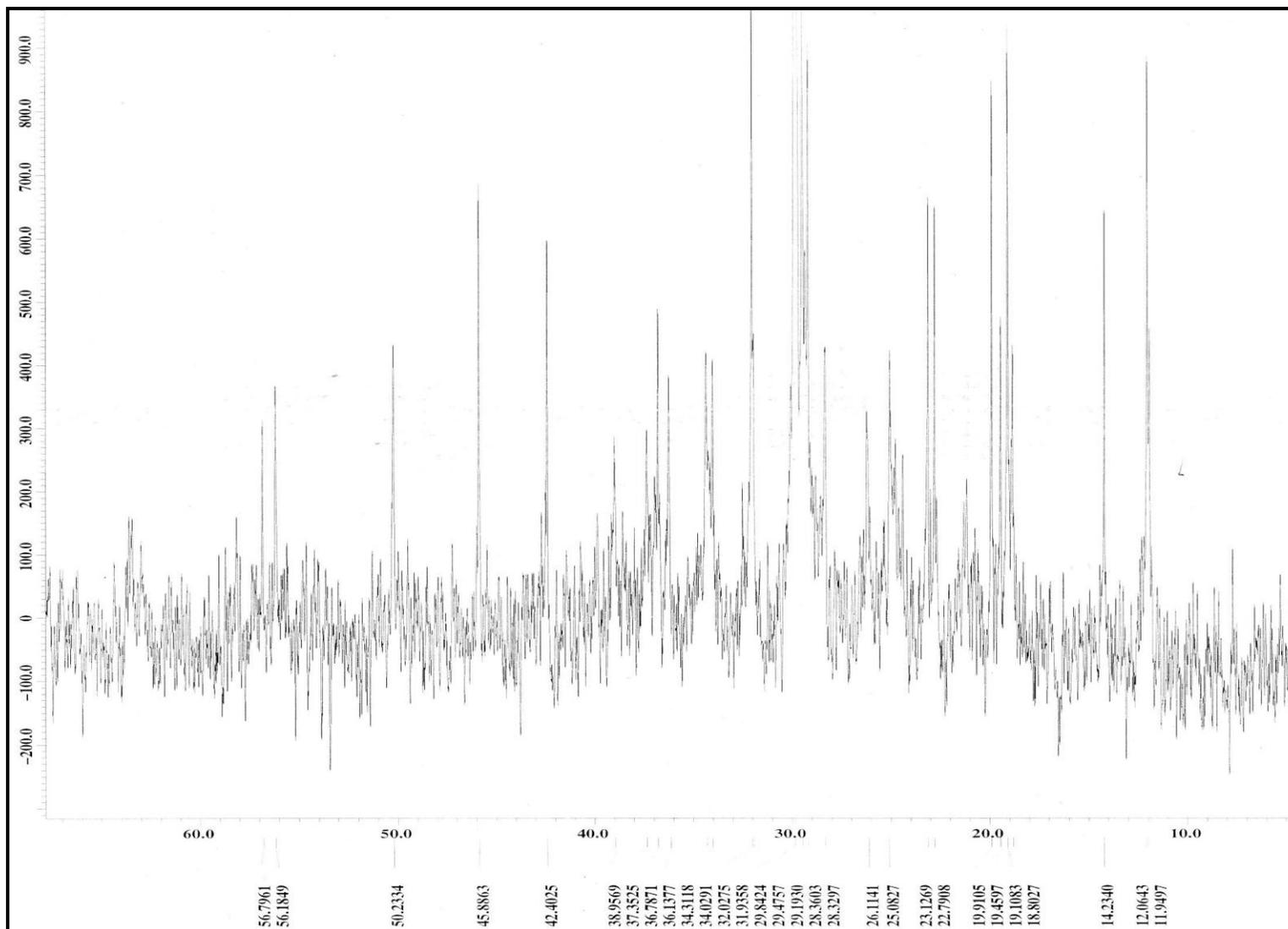
Anexo 9a. Espectro de RMN ^1H del Compuesto IX.



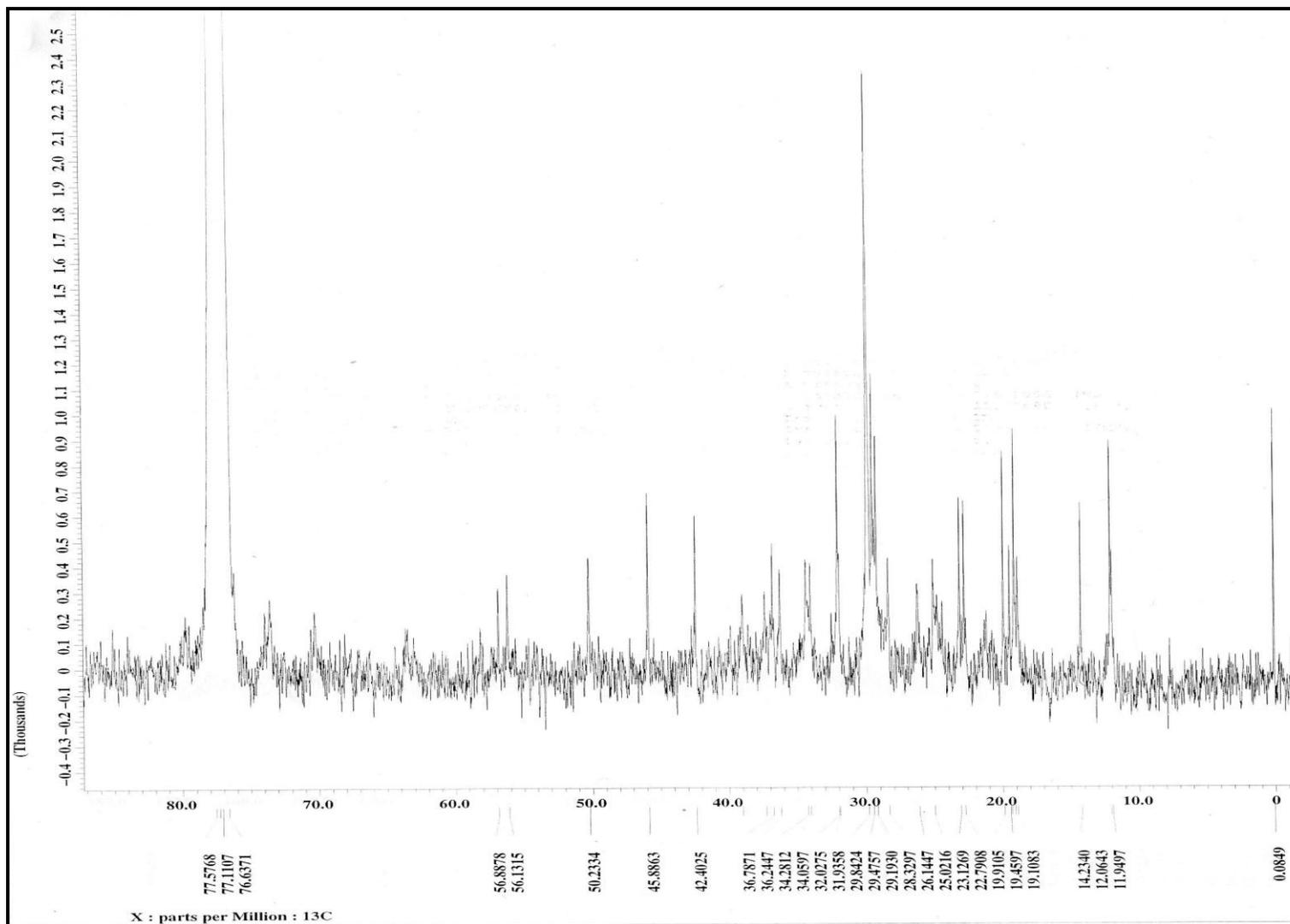
Anexo 9b. Ampliación del espectro de RMN ^1H del Compuesto IX.



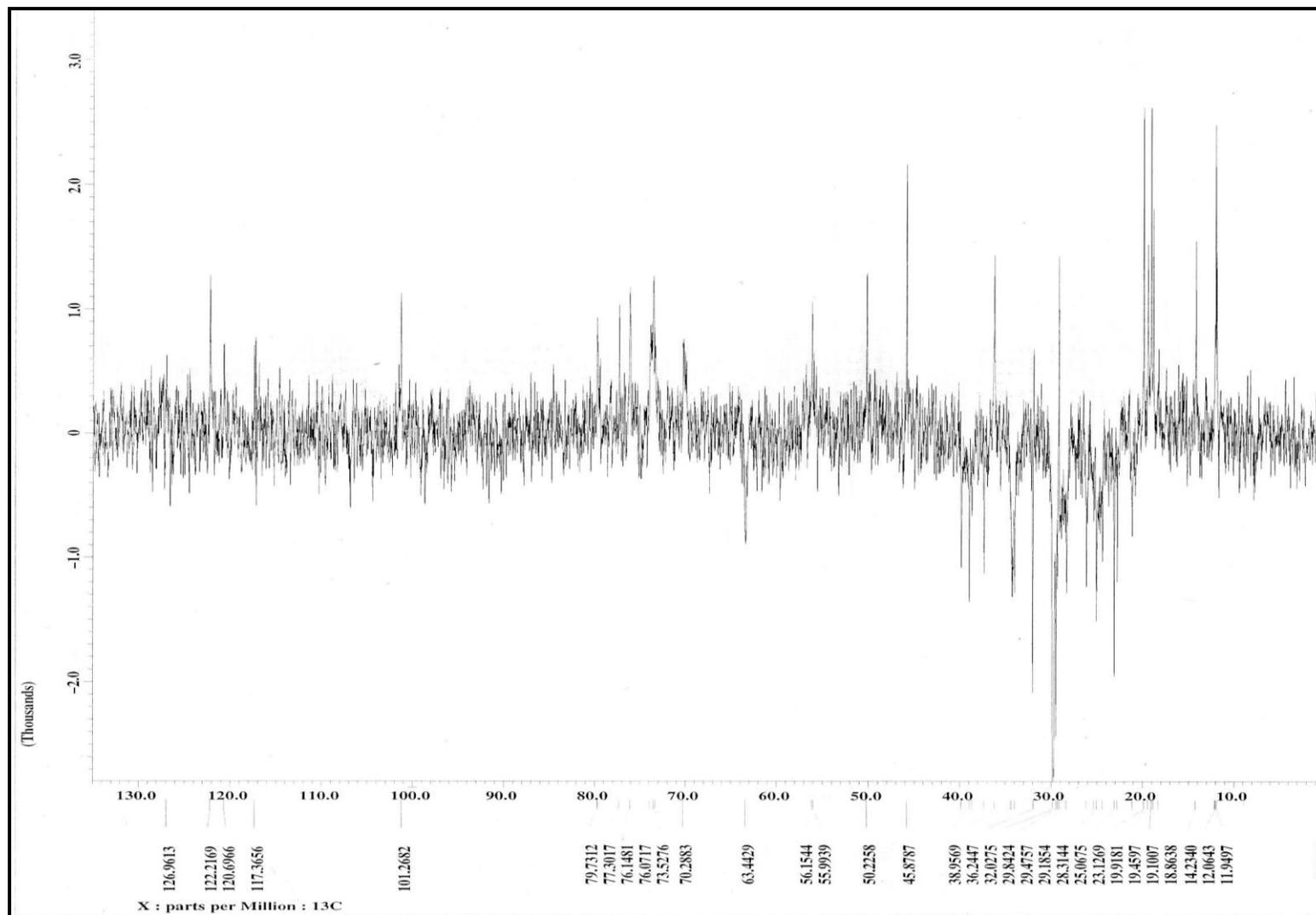
Anexo 9c. Espectro de RMN ^{13}C del Compuesto IX.



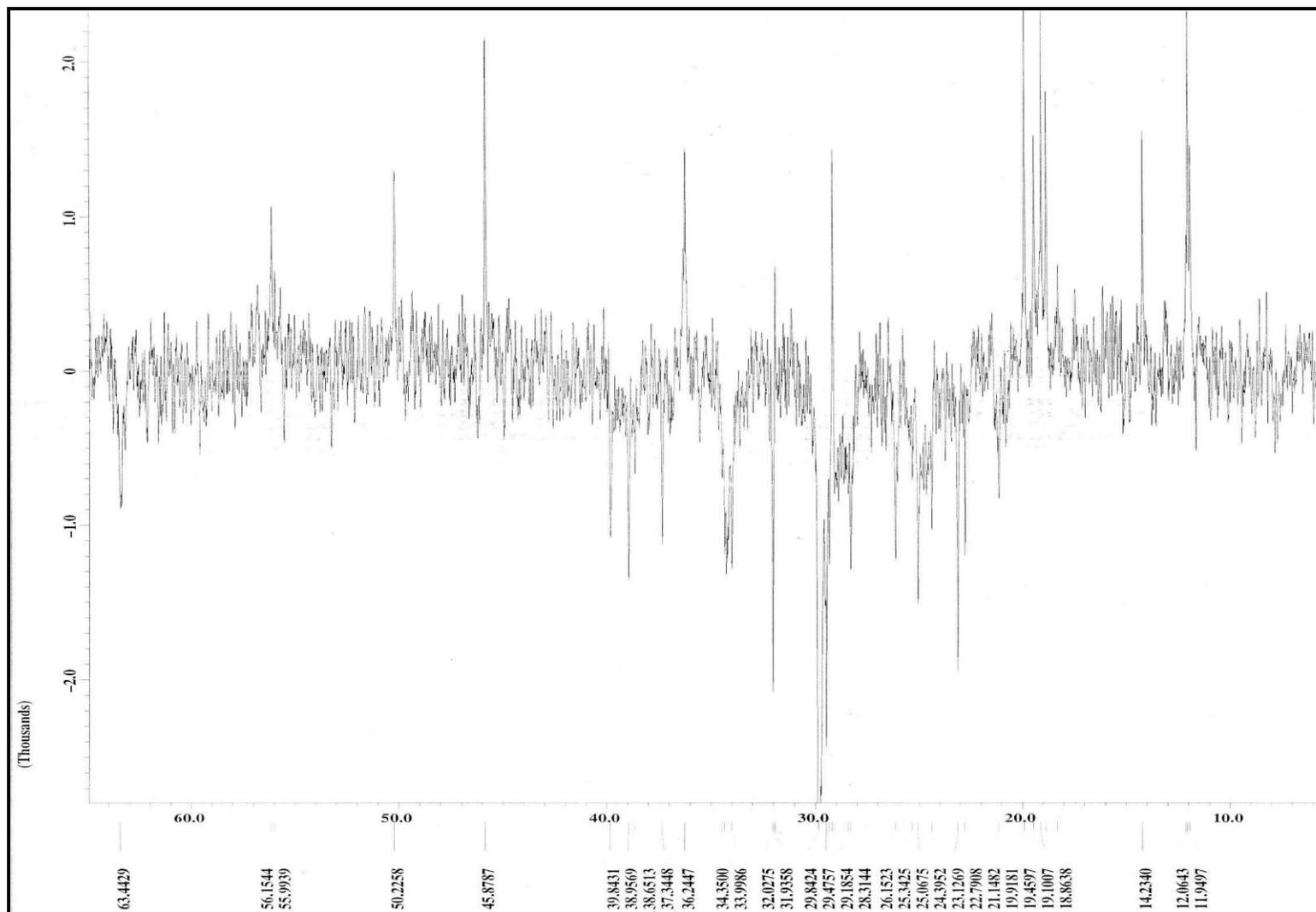
Anexo 9d. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del Compuesto IX.



Anexo 9e. Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del Compuesto IX.



Anexo 9f. Espectro DEPT 135 del Compuesto IX.



Anexo 9g. Ampliación del espectro DEPT 135 del Compuesto IX.