



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Croton schideanus*
(Euphorbiaceae)**

ANDREA CAROLINA CHIAPPE PULIDO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia
2013

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Croton schiedeanus*
(Euphorbiaceae)**

ANDREA CAROLINA CHIAPPE PULIDO

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias- Química

Director:
Ph.D. Luis Enrique Cuca Suárez

Línea de Investigación:
Productos Naturales Vegetales
Grupo de Investigación:
Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia
2013

*A mi familia que afronta conmigo los retos y los obstáculos,
con amor y sin reproches, a Ronald, mi motor y mi hombro.*

A mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales Vegetales: Jorge, Juliana, Juliet, Catalina, Diana, Victor, Juan Manuel y Elizabeth, por su consejo, ayuda y amistad.

A los Profesores Mónica Ávila y Wilman Delgado, por sus valiosos aportes, ayuda, amistad y enseñanza continua.

Al profesor Luis Enrique Cuca Suárez, por recibirme en el grupo, por confiar en mí y compartir conmigo su conocimiento y alegría, por sus enseñanzas y su valiosa amistad.

Al profesor Mario Francisco Guerrero Pabón, por incluirme en su proyecto de investigación, por enseñarme farmacología y ayudarme con los ensayos de actividad.

A las compañeras de Farmacia, Julieta Tamayo y Diana Buitrago, por su colaboración para el desarrollo de la actividad biológica.

A mis padres, que me despedían con un beso cada mañana y me recibían con un abrazo cada noche, que soportaron junto a mí cada segundo de esta travesía; a mis hermanos que siempre han creído en mí, me apoyan y me guían.

A Gabriel, mi angelito sapo, que con un abrazo soluciona todos mis problemas.

A Ronald, el motor de mi vida.

... el descubrimiento de que mi problema era un problema de todos los hombres, un problema de toda la vida y de todo pensamiento... Demián-83

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe los resultados obtenidos del estudio fitoquímico parcial de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* (Euphorbiaceae), de la cual se aislaron 3 compuestos flavonoides: Pachypodol, 3,7-di-O-metil quercetina (DMQ) y Ayanina

Debido a los reportes etnobotánicos y estudios previos realizados con la especie en los cuales se demuestra la actividad antihipertensiva y vasodilatadora del extracto etanólico y la presencia de los flavonoides ayanina y DMQ como componentes mayoritarios. Se propone un método de extracción selectivo de estos dos compuestos, además se realizan reacciones de hemisíntesis (metilación, demetilación y acetilación) para realizar un estudio posterior acerca del mecanismo de acción y la relación estructura actividad con el fin de evaluar un posible efecto potencializador antihipertensivo y vasodilatador. De las reacciones de hemisíntesis se obtuvieron 5 compuestos: **DMQA1** (3',4'-diacetil- 3,7-di - O -metil quercetina), **DMQA2** (3',4'.5-triacetil-3,7-di-O- metil quercetina), **AA3** (3'-acetil-3,7,4'-tri-O- metil quercetina), **AM3** (3,7,3',4'-tetra-O- metil quercetina) y **DMQD5** (7- O -metil Quercetina).

Se determinó la composición relativa del aceite esencial por medio de CG-EM y se encontró que es un aceite de tipo terpénico dentro del cual se encuentran un 62.2% de compuestos monoterpénicos y un 26.32% de sesquiterpenos y que sus componentes mayoritarios son α Pineno, β Pineno, Germancreno D, β Elemeno y β Mirceno.

Palabras clave: *Croton schiedeanus*, Euphorbiaceae, flavonoides, vasodilatador, antihipertensivo, hemisíntesis.

ABSTRACT

This research describes the results of partial phytochemical study of the leaves of the *Croton schiedeanus* (Euphorbiaceae), three flavonoid compounds were isolated: Pachypodol, 3,7 di-O-methyl quercetin (DMQ) and Ayanin.

Ethnobotanic reports and previous studies of the *Croton schiedeanus* (Euphorbiaceae), demonstrate the antihypertensive and vasodilator activity of ethanolic extract and the presence of the flavonoids ayanin and DMQ as major components. We propose a selective extraction method of these two compounds, additionally, are carried out hemisynthesis's reactions (methylation, demethylation and acetylation) to perform a further study about the mechanism of action and structure-activity relationship, in order to evaluate a possible potentiating effect. From hemisynthesis reactions, five compounds were obtained: **DMQA1** (3',4'-diacetyl- 3,7-di - O - methyl quercetin), **DMQA2** (3',4',5-tri-acetyl-3,7-di-O- methyl quercetin), **AA3** (3'-acetyl-3,7,4'-tri-O- methyl quercetin), **AM3** (3,7,3'-4' tetra-O- metyl quercetin) y **DMQD5** (7, O -methyl quercetin).

The relative composition of the essential oil components was determined by GC-MS, in this way it was found that it is a terpene-type oil with a 62.2 % of monoterpenes and a 26.32 % of sesquiterpenes and that its main components are α pinene, β pinene, α caryophyllene, β elemene and Myrcene.

Keywords: *Croton schiedeanus*, Euphorbiaceae, flavonoids, vasodilator, antihypertensive, hemisynthesis.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	x
Lista de Figuras	xiii
Lista de tablas	xiv
Lista de símbolos y abreviaturas.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	20
2.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae	20
2.2 Descripción morfológica de la familia Euphorbiaceae	21
2.3 Usos de la familia Euphorbiaceae.....	21
2.4 Estudios fitoquímicos y de actividad biológica en la familia Euphorbiaceae	23
2.4.1 Terpenos	23
2.4.2 Flavonoides.....	25
2.4.3 Cumarinas	27
2.4.4 Lignanós.....	27
2.5 Generalidades del género <i>Croton</i>	28
2.6 Descripción morfológica del género <i>Croton</i>	28
2.7 Usos de las especies del género <i>Croton</i>	28
2.8 Estudios fitoquímicos y de actividad farmacológica realizados con especies del género <i>Croton</i>	29
2.8.1 Aceites esenciales.....	29
2.8.2 Diterpenos	30
2.8.3 Flavonoides.....	31
2.8.4 Alcaloides.....	32

2.9 Generalidades de la especie <i>Croton schiedeanus</i>	33
3. METODOLOGÍA.....	35
3.1 Procedimientos generales	35
3.1.1 Cromatografía en capa fina y en columna	35
3.1.2 Cromatografía de gases - espectrometría de masas.....	35
3.1.3 HPLC acoplado a espectrometría de masas	35
3.1.5 Espectrometría infrarroja y puntos de fusión	36
3.1.6 Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C	36
3.2 Estudio fitoquímico.....	36
3.2.1 Recolección e identificación del material vegetal.....	36
3.2.2 Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Caracterización fitoquímica preliminar	39
4.2 Elucidación estructural de compuestos puros	40
4.2.1 Compuesto HCS1	41
4.2.2 Compuesto HCS2	45
4.2.3 Compuesto HCS3	47
4.3 Derivados hemisintéticos de los flavonoides mayoritarios.....	49
4.3.1 Derivados Acetilados	49
4.3.2 Derivados Metilados.....	53
4.3.3 Derivados Demetilados.....	54
4.4 Determinación de la composición química del aceite esencial de las hojas de <i>Croton schiedeanus</i>	55
5. CONCLUSIONES.....	58
6. RECOMENDACIONES	59

7.	ANEXOS.....	60
8.	BIBLIOGRAFÍA	67

Lista de Figuras

Figura 2.1: Distribución de la familia Euphorbiaceae a nivel mundial.....	20
Figura 2.2: Características morfológicas de las especies de la familia Euphorbiaceae: (a) Hojas palmadas de <i>Ricinus communis</i> ; (b) Ciato, inflorescencia característica del género <i>Euphorbia</i> ; (c) Frutos en forma de esquizocarpo de <i>Euphorbia piscatoria</i>	21
Figura 2.3: (a) Hojas e inflorescencias de <i>Croton tiglium</i> y (b) exudado coloreado de la corteza de <i>Croton lechleri</i>	28
Figura 2.4: Hojas e inflorescencias de <i>Croton schiedeanus</i>	34
Figura 3.1: Extracción, fraccionamiento del extracto etanólico y purificación de metabolitos secundarios... ..	38
Figura 4.1: Perfil de HPLC del compuesto HCS1.....	41
Figura 4.2: Espectro de masas del compuesto HCS1.....	41
Figura 4.3: Espectro de ^1H compuesto HCS1 (DMSO-d_6 400 MHz).....	42
Figura 4.4: Espectro de RMN ^1H compuesto HCS1, ampliación de la región entre 6 y 8 ppm (DMSO-d_6 400 MHz).....	42
Figura 4.5: Comparación del espectro de (a.) RMN ^{13}C y (b.) DEPT 135 del compuesto HCS1.....	43
Figura 4.6: Espectro de HMQC compuesto HCS1.....	44
Figura 4.7: Ampliación del espectro de HMBC del compuesto HCS1.....	44
Figura 4.8: Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto HCS1.....	45
Figura 4.9: Perfil de HPLC del compuesto HCS3.....	45
Figura 4.10: Espectro de masas del compuesto HCS3.....	46
Figura 4.11: Espectro de ^{13}C del compuesto HCS2 (CD_3OD 100MHz).....	46
Figura 4.12: Perfil de HPLC compuesto HCS3.....	47
Figura 4.13: Espectro de masas compuesto HCS3.....	47
Figura 4.14: Espectro de RMN ^1H compuesto HCS3 (DMSO-d_6 400MHz).....	48
Figura 4.15: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto DMQA1.....	50
Figura 4.16: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto DMQA2.....	51
Figura 4.17: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto AA3.....	52
Figura 4.18: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto AM3.....	54
Figura 4.19: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto DMQD5.....	55
Figura 4.20: Cromatograma del aceite esencial de las hojas de la especie <i>Croton schiedeanus</i>	56

Lista de tablas

<i>Tabla 2.1: Usos etnobotánicos de la familia Euphorbiaceae</i>	22
<i>Tabla 2.2. Usos de algunas especies del género Croton</i>	29
<i>Tabla 4.1: Señales obtenidas en el espectro de HMQC</i>	44
<i>Tabla 4.2: Señales del espectro de 13C del compuesto HCS2 y comparación con la literatura*(Guerrero, et al., 2002)</i>	46
<i>Tabla 4.3: Señales obtenidas en el espectro de 1H para el compuesto HCS3 y comparación con la literatura* (Carrón, et al., 2010)</i>	48
<i>Tabla 4.4: Señales de 13C para DMQ y DMQA1</i>	50
<i>Tabla 4.5: Señales de 13C para DMQ y DMQA2</i>	51
<i>Tabla 4.6: Señales de 13C para Ayanina y AA3</i>	52
<i>Tabla 4.7: Señales de 13C para Ayanina y AM3</i>	54
<i>Tabla 4.8: Señales de 13C para HCS3 y DMQD5</i>	55
<i>Tabla 4.9: Composición relativa del aceite esencial de las hojas de la especie Croton schiedeanus</i>	56

Lista de símbolos y abreviaturas

DMQ	3,7 di-O- metil quercetina
ECV	enfermedades cardiovasculares
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DMQA1	3',4'-diacetil- 3,7-di - O -metil quercetina
DMQA2	3',4'.5-triacetil-3,7-di-O- metil quercetina
AA3	3'-acetil-3,7,4'-tri-O- metil quercetina
AM3	3,7,3',4'-tetra-O- metil quercetina
DMQD5	7- O -metil Quercetina
CDD	Cromatografía en capa delgada
nm	nanómetros
CC	Cromatografía en columna
CF	Cromatografía flash
CLV	Cromatografía líquida al vacío
HPLC	High-performance liquid chromatography
DMSO _{d6}	Dimetil sulfóxido deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Espectroscopia de Correlación homonuclear (Correlation spectroscopy) Espectroscopia de correlación heteronuclear directa (Heteronuclear Multiple Quantum
HMQC	Coherence) Espectroscopia de correlación heteronuclear a múltiples enlaces (Heteronuclear
HMBC	Multiple Bond Correlation)
MHz	Megahertz
EE	Fracción de éter etílico
EP	Fracción de éter de petróleo
R	Residuo
C ₆ H ₅ CH ₃	Tolueno
AcOipr	Acetato de isopropilo

CH ₃ COOH	Ácido acético
C ₆ H ₁₄	Hexano
(CH ₃) ₂ CO	Acetona
DMSO	Dimetilsulfóxido
HA	Hojas con arrastre por vapor
H	Hojas sin arrastre por vapor
d	Doblete
t	Triplete
m	Multiplete
td	triple doblete
dd	doble de dobles
ddd	doble de dobles de dobles
dt	doble triplete
J	constante de acoplamiento
Hz	Hertz
IR C	Indice de retención calculado
IR T	Indice de retención teórico

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los recursos vegetales con los que cuenta nuestro país se encuentra la familia Euphorbiaceae, que está distribuida principalmente en los departamentos Cundinamarca y Amazonas en donde sus especies son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones de la piel, contra la hipertensión, fiebre y cólicos (García, 1992). Debido a su aplicación en el campo medicinal y su actividad biológica promisoriosa, se encuentran reportes acerca de la composición química y estudios farmacológicos de varias especies de esta familia; por ejemplo, algunas especies del género *Croton* presentan actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatoria y frente a las enfermedades del sistema circulatorio. Las llamadas enfermedades cardiovasculares (ECV) son reconocidas como la principal causa de muerte en todo el mundo, se calcula que en el 2008 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, lo que representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo. La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre los factores de riesgo, como el consumo del tabaco, las dietas malsanas, la obesidad y la inactividad física. Dentro de las ECV, la más común y preocupante es la hipertensión arterial que causa 9.4 millones y medio de muertes anuales, es decir el 16.5% de las muertes en el mundo (OMS, 2013).

Particularmente, en la medicina tradicional, algunas especies del género *Croton* (*Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius*, *Croton glabellus*) (Siqueira, et al., 2006) (García, et al., 1986) y especialmente las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* son usadas en forma de infusión para el tratamiento de la hipertensión. Debido a los reportes de esta actividad se han realizado estudios fitoquímicos de especies del género, en los cuales se han encontrado compuestos tipo flavonoide y terpenoide, además de estudios farmacológicos que han confirmado la actividad antihipertensiva y vasorelajante producida por los extractos etanólico y acuoso.

Debido a que los flavonoides son reconocidos por sus diversas actividades biológicas, (antioxidantes, antiinflamatorios, agregadores plaquetarios), se han realizado diversos ensayos para determinar la relación de estructura actividad de estos compuestos. En el caso del tratamiento de enfermedades cardiovasculares (hipertensión), se ha demostrado que la presencia y ubicación de sustituyentes de tipos metoxilo e hidroxilo alteran notablemente la efectividad del efecto antihipertensivo y vasodilatador (Mladenka, et al., 2010).

El efecto antihipertensivo y vasodilatador de *Croton schiedeanus* fue estudiado en ratas hipertensas y normotensas, en el cual se encontró que las ratas tratadas con el extracto etanólico mostraban disminución en la presión arterial y la frecuencia cardiaca, mientras que las ratas normotensas no presentaban efectos adversos (Guerrero, et al., 2001).

Por otra parte, en un estudio posterior se realizó un fraccionamiento bioguiado en el cual se determinó que el flavonoide ayanina era uno de los componentes mayoritarios del extracto y que también poseía propiedades relajantes en músculo liso comportándose como un potencial agente vasodilatador. Aunque el estudio de actividad se realizó bajo diferentes parámetros farmacológicos (reactivos y condiciones) no fue posible determinar completamente el mecanismo de acción (Correa-Hernández, et al., 2008).

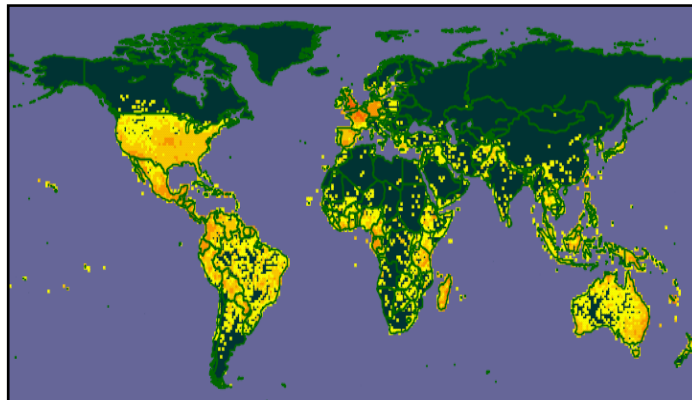
Teniendo en cuenta estos antecedentes, para continuar con el estudio de los efectos antihipertensivos de la especie *Croton schiedeanus* se plantean dos objetivos: primero modificar el método de extracción de manera que permita aislar los componentes mayoritarios del extracto de una manera selectiva y segundo realizar reacciones de hemisíntesis que permitan la determinación del mecanismo de acción y la evaluación un posible efecto potencializador. Estos estudios serán realizados en el departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por el grupo de Farmacología molecular (FARMOL), dirigido por el profesor Mario Francisco Guerrero Pabón.

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes y diversas de las angiospermas, conteniendo alrededor de 8000 especies distribuidas en 300 géneros. Incluye especies predominantemente tropicales pero también se encuentra ampliamente distribuida en las zonas templadas (Grosso, 2006). Los géneros más importantes son: *Euphorbia* (1000 especies), *Croton* (500-600 especies) y *Phyllanthus* (400 especies) (Villalobos and Castellanos, 1992). Está presente en países como: Colombia, Argentina, Australia, Belice, Bolivia, Brasil, Camerun, China, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guinea Ecuatorial, Francia, Guayana francesa, Alemania, India, Indonesia, Israel, Korea, Madagascar, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Filipinas, Estados Unidos, Inglaterra y Venezuela. En Colombia se encuentra distribuida en todo el territorio nacional. En la Figura 2.1 se observa la distribución de la familia Euphorbiaceae en el mundo (GIBF, 2011).

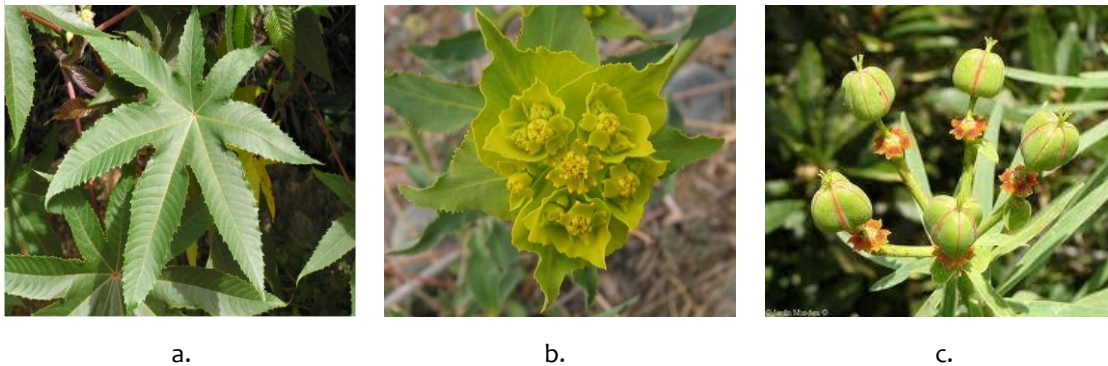
Figura 2.1: Distribución de la familia Euphorbiaceae a nivel mundial



2.2 Descripción morfológica de la familia Euphorbiaceae

Esta familia presenta una gran diversidad de formas de crecimiento desde árboles altos de selvas lluviosas a lianas, arbustos, hierbas anuales y perennes, suculentas y acuáticas flotantes. Las hojas son generalmente simples, cuando se presentan compuestas son palmeadas, alternas u opuestas y con estípulas que pueden estar transformadas en espinas o glándulas; un ejemplo de estas son las hojas de la especie *Ricinus communis*, Figura 2.2 (a). Las flores generalmente son imperfectas monoicas o dioicas, dispuestas en espigas o racimos; las especies del género *Euphorbia* presentan unas inflorescencias características llamadas ciato, Figura 2.2 (b), que tienen su estructura en forma de copa que consiste en un involucreo con glándulas variadas en el borde, dentro del cual hay numerosas flores estaminadas (reducidas a un estambre) que se hallan rodeando a una única flor pistilada central. Los frutos son generalmente esquizocárpicos, Figura 2.2 (c), algunas veces con forma de drupa y las semillas poseen embrión recto o curvo, a menudo con ornamentación muy variada y de alto interés taxonómico, en ocasiones con abundante endosperma oleaginoso. Algunas especies de la familia Euphorbiaceae contienen látex lechoso o incoloro que es extraído de sus tallos (Garces, 2009), (Murillo, 2000), (Nordeste, 2010).

Figura 2.2: Características morfológicas de las especies de la familia Euphorbiaceae: (a) Hojas palmeadas de *Ricinus communis*; (b) Ciato, inflorescencia característica del género *Euphorbia*; (c) Frutos en forma de esquizocarpo de *Euphorbia piscatoria*.



2.3 Usos de la familia Euphorbiaceae

Debido a la amplia distribución y adaptabilidad se encuentran diversos reportes de usos etnobotánicos que las comunidades le han dado a las especies de la familia Euphorbiaceae. Actualmente, sus usos más frecuentes son en alimentación y en la producción de medicinas, venenos, aceites y grasas, ceras, gomas, caucho, componentes para pinturas, barnices y otros productos industriales; algunas de ellas se cultivan como ornamentales (Villalobos and Castellanos, 1992). A continuación en la Tabla 2.1 se detallan algunos de los usos reportados para especies de la familia Euphorbiaceae:

Tabla 2.1: Usos etnobotánicos de la familia Euphorbiaceae

	Especie	Uso	Ref.
Etnobotánico	<i>Euphorbia canariensis</i>	Las hojas se emplean para el tratamiento de forúnculos.	(C-SUR, 2011)
	<i>Euphorbia lamarckii</i>	Se utiliza su látex en forma de cataplasma para usos analgésicos.	
	<i>Euphorbia hirta</i>	El látex se usa para quita verrugas y mezquinos, combate enfermedades de los ojos y dolor de muela.	
	<i>Euphorbia hypericifolia</i>	Se usa el látex en forma de cataplasma para curar úlceras gangrenosas.	(Barriga, 1992, García, 1992), (Grosso, 2006), ((UNNE)), 2005)
	<i>Euphorbia lathyris</i>	Se usa para curar callos y verrugas, sus hojas en infusión son usadas como eméticas y purgantes.	
	<i>Euphorbia neriifolia</i>	Se usa para el tratamiento de afecciones de los labios y placas en la garganta.	
	<i>Euphorbia orbiculata</i>	El látex se usa como purgante, para quitar verrugas o papilomas.	
	<i>Jatropha curcas</i>	El aceite de su fruto es emético y purgante, además se usa para el tratamiento de erupciones y afecciones de la piel.	
	<i>Jatropha gossypifolia</i>	La infusión de sus hojas se utiliza para tratar cólicos. Las semillas son diuréticas y purgantes.	
	<i>Jatropha urens</i>	El aceite de sus semillas se usa como purgante.	
	<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	Su raíz tiene efecto vomitivo, expectorante y se usa en el tratamiento de enfermedades hepáticas y afecciones sifilíticas.	
	<i>Phyllanthus niruri</i>	Es usada como insecticida, diurética, purgante y como tratamiento contra diabetes.	
	<i>Phyllanthus lathyroides</i> HBK	La infusión de la raíz es usada como diurética, espasmódica y estimulante contra las molestias del aparato urogenital.	
Alimento	<i>Manihot dulcis</i> (yuca)	La raíz tuberculosa se usa como fuente de alimentación.	
	<i>Manihot succulenta</i>	La fermentación de su raíz se usa para la fabricación de chicha.	
Industria	<i>Ricinus communis</i>	En la industria se usa para el tratamiento del cabello, la producción de aceite para motores, la fabricación de pinturas, lacas plásticos y fertilizantes.	(Garces, 2009, García, 1992)
	<i>Euphorbia antisyphilitica</i>	Fuente de cera vegetal.	(Steinmann, 2002)
	<i>Croton eluteria</i>	Sus tallos se usan como estacas para los campos agrícolas.	(Belmonte and García-Ortega, 2011)
	<i>Euphorbia delicatula</i>	Sus tubérculos se mastican como chicle.	
	<i>Hevea brasiliensis</i>	El látex se usa en la fabricación de caucho.	
	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Es usada en decoración.	(C-SUR, 2011)
<i>Euphorbia balsamifera</i>	Se usa en decoración. Su corteza se usa en la fabricación de corcho y combustible.		

2.4 Estudios fitoquímicos y de actividad biológica en la familia Euphorbiaceae

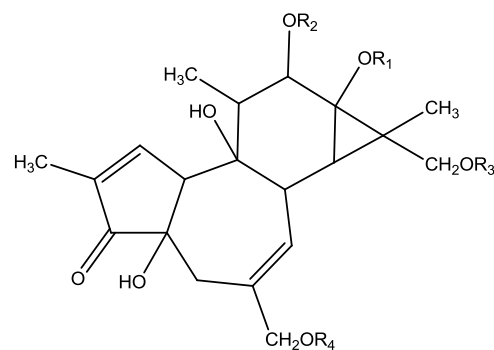
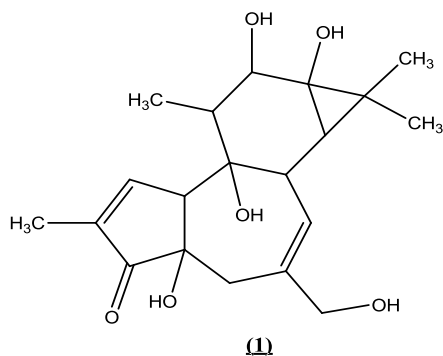
Teniendo en cuenta los diferentes usos etnobotánicos referenciados para las especies de la familia Euphorbiaceae (tratamiento de dolores abdominales, antihistaminicas, afrodisiacos, bronquitis, diabetes, enemas y enfermedades urinarias entre otras), se han realizado estudios fitoquímicos que señalan la presencia de grupos de metabolitos secundarios tales como: terpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides, cumarinas, lignanos y compuestos fenólicos (Grosso, 2011).

2.4.1 Terpenos

2.4.1.1 Diterpenoides

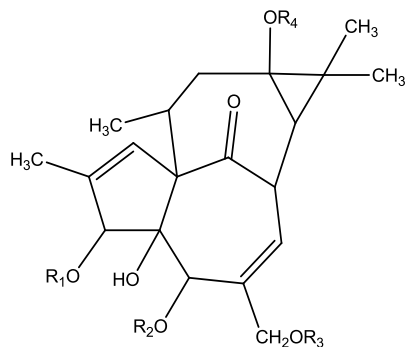
Este tipo de metabolitos se ha encontrado en los tallos, hojas y látex de algunas especies de la familia Euphorbiaceae, dentro de los reportes se encuentran estructuras de tipo diterpénico, estos compuesto se caracterizan por poseer actividad antimicrobiana, tóxica e irritante de la piel.

Se encuentran reportes de algunos compuestos relacionados estructuralmente con los esteres de alcoholes diterpenicos, producidos por algunos géneros de la familia (*Aleurites*, *Baliospermum*, *Croton*, *Euphorbia*, *Exoecaria*, *Hippomane*, y *Synadeum*) (Grosso, 2006). Los esteroides diterpénicos presentan un rango de actividad biológica que incluye inducción tumoral y proliferación celular, inflamación epidérmica, producción de prostaglandinas y estimulación o degradación de neutrófilos. Ejemplos de estos compuestos son los derivados esterificados del forbol **(1)** (Satyanarayana, et al., 2001), como el 12-O-palmitil-13-O-acetil-16-hidroxi-forbol **(2)**, y el 13-O-acetil-16-hidroxi-forbol **(3)** aislados de los frutos de *Aleurites fordii* (Okuda, et al., 1975). Del extracto metanólico de las hojas de *Euphorbia cornigera* se aislaron tres esteroides diterpenicos derivados del ingenol: 13-acetoxi-20-O-angelilingenol **(4)**, 5-O-angeloil-13-acetoxiingenol **(5)**, 3-O-(2,3-dimetilbutanoil)-5-O-acetil-13-O-dodecanoil-20-O-hexadecanoilingenol **(6)**, esta planta es popularmente usada en el norte de Irán para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo cáncer (Baloch and Baloch, 2011).



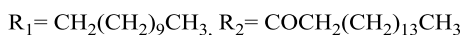
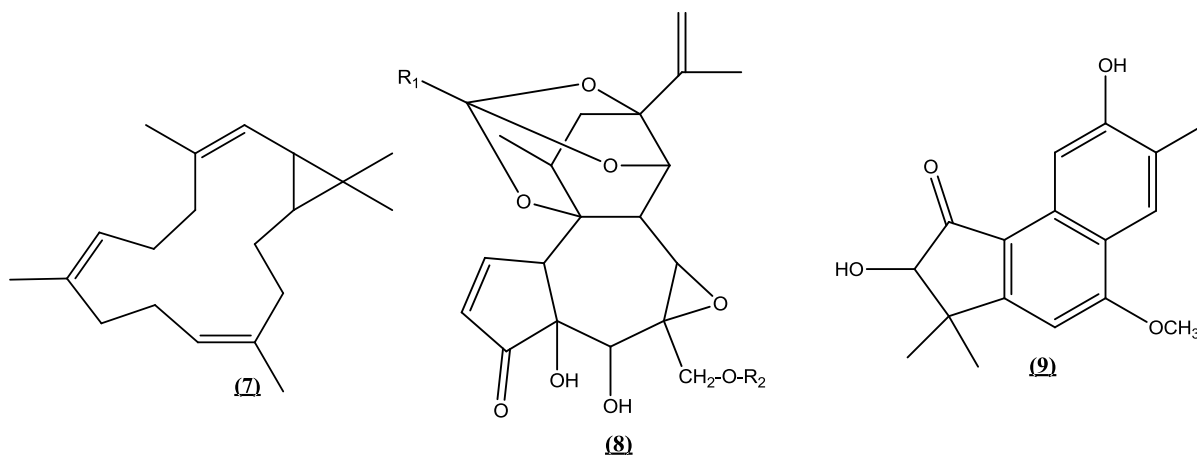
(2) $R_1 = \text{COMe}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14} \text{Me}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

(3) $R_1 = \text{COMe}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

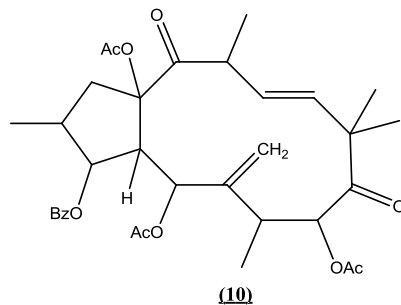


- (4) R₁=R₂= H, R₃= angeloil, R₄= acetil
- (5) R₁= H, R₂= angeloil, R₃= H, R₄= acetil
- (6) R₁= 2,3-dimetilbutanoil, R₂= acetil, R₃=hexadecanoil, R₄=dodecanoil

Las especies de la familia Euphorbiaceae producen una gran diversidad de diterpenoides con esqueletos macrocíclicos y policíclicos (derivados del tigliano, daphnano e ingenano) (Hohmann and Molnár, 2004). Uno de los diterpenos más comunes dentro de la familia es el casbeno (**7**), aislado de 5 especies (*Ricinus communis*, *Sapium sebiferum*, *Euphorbia resinífera*, *Euphorbia ésula* y *Homolanthus nutanus*), (Kirby, et al., 2010). Los diterpenos glabrescina (**8**) y neoboutonina (**9**) fueron aislados del tallo de la especie *Neoboutonia glabrescens*, usada en África para el tratamiento de los dolores abdominales y como antiparasitario (Tchinda, et al., 2003).

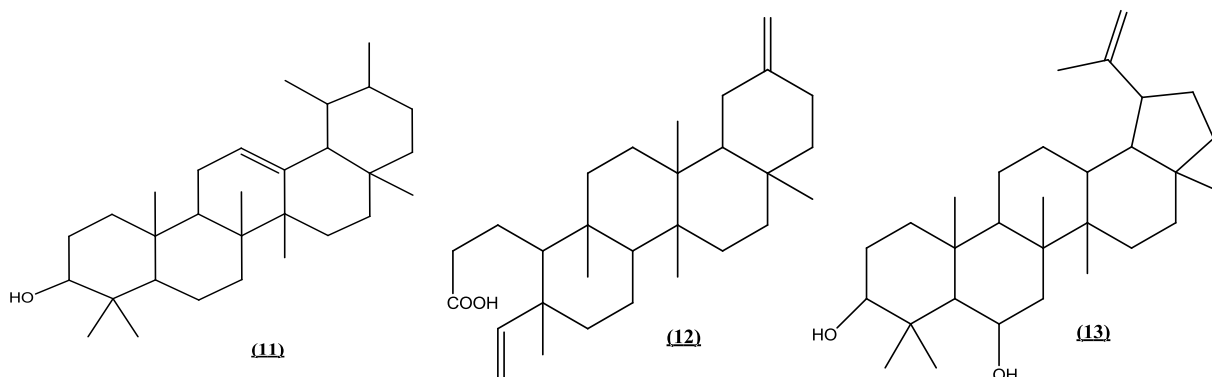


Otro tipo de diterpeno de esqueleto menos común (jatropano), aislado de la raíz de la especie *Euphorbia hyberna*, es el 5,8,15-Tiacetoxi-3-benzoiloxi-9,14-dioxojatropha-6(17) ,11 *E*-dieno (**10**), esta especie es endémica del este y sur de Europa y no se reportan más estudios fitoquímicos o farmacológicos (Ferreira, et al., 2002).



2.4.2.2 Triterpenos

Los triterpenos aislados de las especies de la familia Euphorbiaceae se caracterizan por ser pentacíclicos (ursanos, friedelanos, lupanos entre otros) (Martinez, et al., 2008). Uno de los triterpenos más comunes encontrados es el Ursano **(11)** (Grosso, 2006), además, en las raíces de *Phyllanthus oxyphyllus* se encontró un triterpeno de estructura inusual denominado Ácido 29-nor-3,4-seco-friedelan-4(23),20(30)-dien-3-oico **(12)** (Sutthivaiyakit, et al., 2003). De los frutos de *Drypetes inaequalis* se aisló el triterpeno lup-20(29)-eno-3 β ,6 α -diol **(13)**, que posee una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram + y Gram - (Awanchiri, et al., 2009).



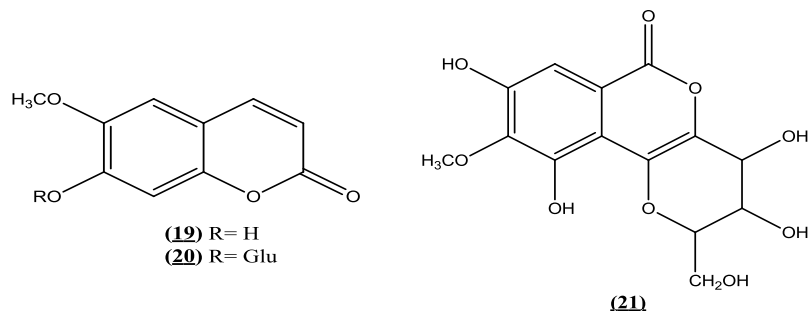
2.4.2 Flavonoides

La familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides, particularmente flavonas, flavonoles y antocianidinas, que se han identificado en varios géneros. Estos se presentan como O- y C-glicósidos y generalmente se encuentran polimetoxilados. También se presentan flavanonas pero en relativamente pocas especies. El aislamiento de este tipo de metabolitos se ha realizado en diferentes partes de la planta, a excepción de las raíces (García, et al., 1986, Grosso, 2006, Grosso, 2011, Guerrero, et al., 2001, Puebla, et al., 2004).

En un estudio realizado con las hojas de *Sydnadenium grantii*, se hallaron tres derivados de antocianidina sustituidas con el monosacárido apiosa, 3-O-(2''-(5'''-(*E-p*-cumaroil)- β -apiofuranosil)- β -xilopiranosido)-5-O- β -glucopiranosido **(14)**, cianidina 3-O-(2''-(5'''-(*E*-caffeoil)- β -apiofuranosil)- β -xilopiranosido) **(15)** y cianidina 3-O-(2''-(5'''-(*E*-feroil)- β -apiofuranosil)- β -xilopiranosido) **(16)** (Andersen, et al., 2010).

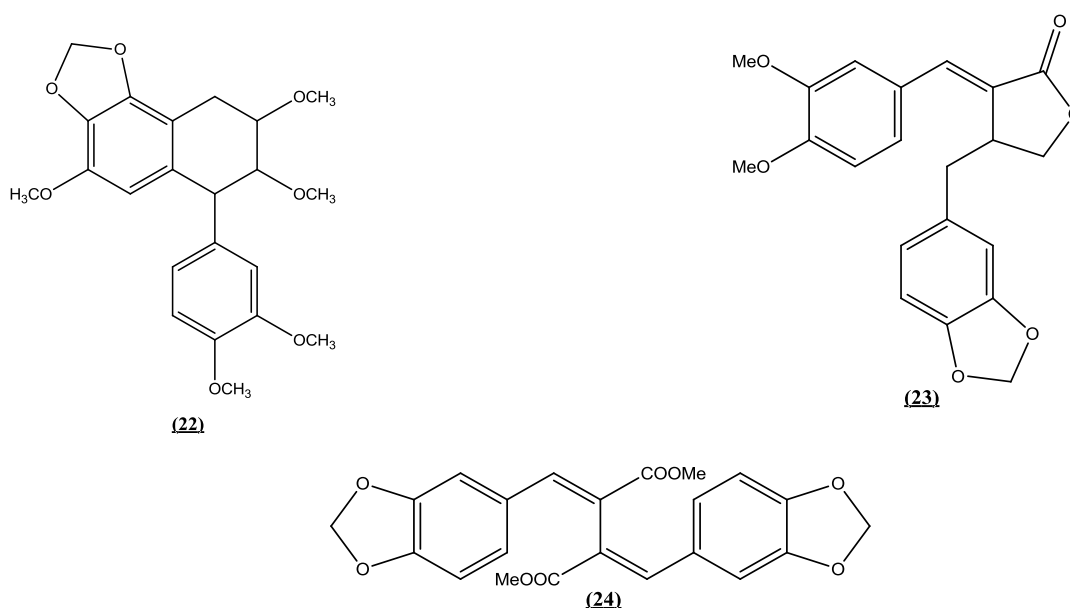
2.4.3 Cumarinas

Estos compuestos, se han aislado de relativamente pocas especies de la familia Euphorbiaceae. En un estudio realizado con las raíces de *Manihot esculenta* se aislaron las cumarinas escopoletina (**19**) y escopolina (**20**) (Bayoumi, et al., 2008). Otro tipo de cumarinas menos comunes, las isocumarinas, han sido encontradas en la corteza de *Mallotus japonicus* Muell, de la cual se aisló la bergenina (**21**) (Grosso, 2006), este compuesto posee la característica de ser polihidroxilado y tener un anillo oxigenado, también polihidroxilado, como sustituyente angular.



2.4.4 Lignanos

Han sido identificados solamente en los géneros *Jatropha*, *Alchornea* y *Phyllanthus*. Las hojas de *Phyllanthus miruri* Linneo contienen hipofilantina (**22**) (Grosso, 2006). Del género *Jatropha* se han estudiado las especies *Jatropha gossypiflora* (Das and Das, 1995) y *Jatropha gossypifolia* (Das and G, 1999), de las cuales se aislaron los lignanos gossipifan (**23**) y gossipidien (**24**). Estos dos compuestos han presentado actividad antitumoral, citotóxica e insecticida.



2.5 Generalidades del género *Croton*

Croton es el segundo género más numeroso y diverso de las Euphorbiaceae con cerca de 500 especies de distribución pantropical. En Colombia, el género *Croton* está distribuido en todo el territorio nacional, especialmente en los departamentos de Amazonas, Cundinamarca y Tolima (Murillo, 1999).

2.6 Descripción morfológica del género *Croton*

Las especies del género *Croton* incluyen desde hierbas hasta árboles que poseen un indumento de pelos estrellados a lo largo de toda la planta, presentan formas variadas de hojas y la mayoría de las especies presentan glándulas en la base de la lámina y/o sobre el pecíolo, sus flores son femeninas con pétalos reducidos o ausentes con un ovario generalmente tri carpelar y un óvulo por lóculo, además poseen un exudado coloreado que sale de su corteza. En la Figura 2.3 (a) se muestran las hojas e inflorescencias características de las especies del género *Croton*, además del exudado coloreado de su corteza en la Figura 2.3 (b). Estas características sumadas a la disposición de las flores femeninas en la inflorescencia, al número de partes del cáliz, división de los estilos y el grado de desarrollo de los sépalos femeninos han servido para diferenciar las especies del género (Nordeste, 2010).

Figura 2.3: (a) Hojas e inflorescencias de *Croton tiglium* y (b) exudado coloreado de la corteza de *Croton lechleri*

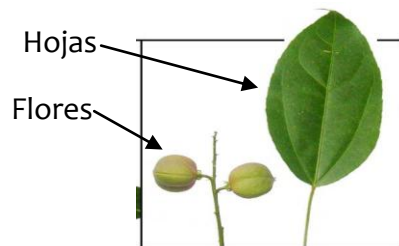


Figura 2.4. (a)



Figura 2.4. (b)

2.7 Usos de las especies del género *Croton*

Las especies del género *Croton* han sido usadas en la medicina tradicional principalmente para facilitar la digestión, curar úlceras y afecciones de la piel, combatir la amebiasis y los cólicos (Barriga, 1992, García, 1992), debido a los reportes de los usos etnobotánicos que se encuentran para este género, se han realizado diferentes estudios que han demostrado actividades biológicas. En la Tabla 2.2 se escriben algunos usos de las especies del género *Croton*.

Tabla 2.2. Usos de algunas especies del género *Croton*

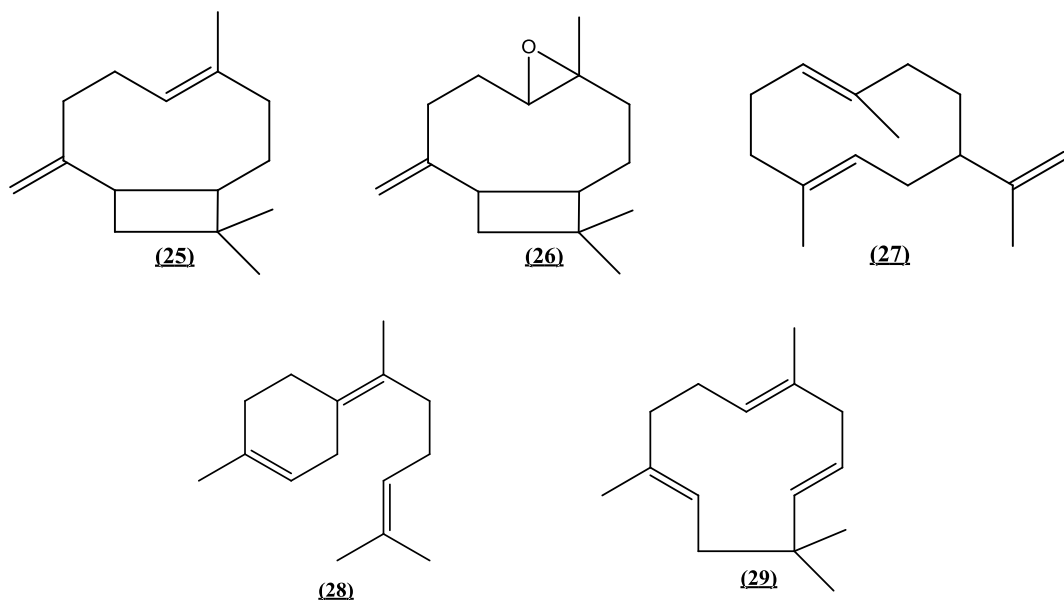
ESPECIE	USO	REFERENCIA
<i>Croton sonderianus</i>	Relajación de músculos lisos antinociceptivo	(Pinho-da-Silva, et al., 2010) (Santos, et al., 2005)
<i>Croton celtidifolius</i>	Antioxidante y antiinflamatorio	(Nardi, et al., 2007)
<i>Croton lechleri</i>	Mutagénico y antioxidante	(Lopes, et al., 2004)
<i>Croton urucurana</i>	Antimicrobiano	(Peres, et al., 1997)
<i>Croton zambesicus</i>	Antihemostático Antiplasmodial	(Robert, et al., 2010) (Okokon and Nwafor, 2009)
<i>Croton celtidifolius</i>	Antinociceptivo	(Nardi, et al., 2006)
<i>Croton glabellus</i>	Facilita la digestión	(García, 1992)
<i>Croton funckianus</i>	Se usa para el tratamiento de la amebiasis y para curar úlceras duodenales	
<i>Croton leptostachyus</i>	Se usa para aliviar la fiebre	

2.8 Estudios fitoquímicos y de actividad farmacológica realizados con especies del género *Croton*

Debido a los usos etnobotánicos reportados y los estudios farmacológicos realizados con las especies del género *Croton*, (Martinsen, et al., 2010, Pinho-da-Silva, et al., 2010, Santos, et al., 2005), se han desarrollado estudios fitoquímicos donde se ha evidenciado la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, terpenos y alcaloides entre otros.

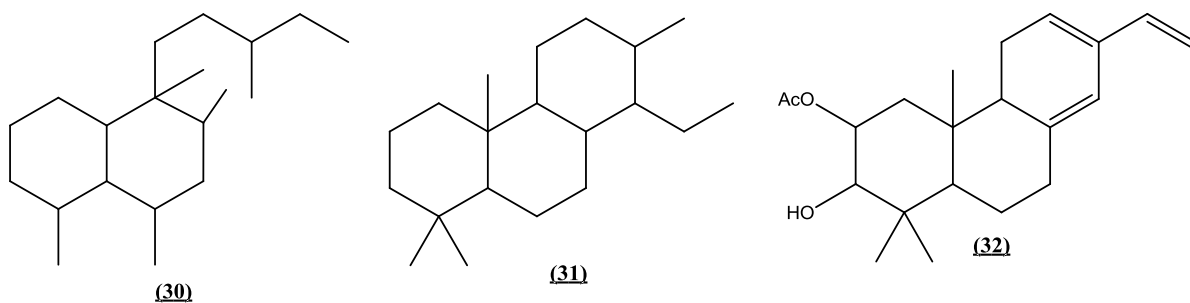
2.8.1 Aceites esenciales

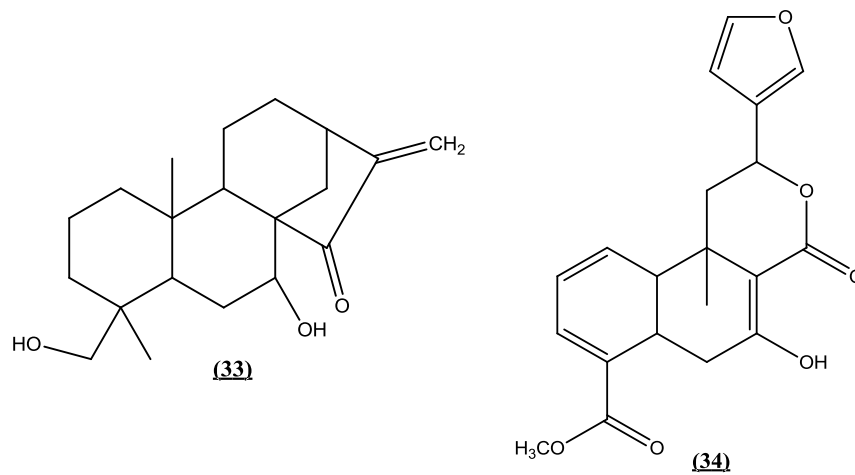
En el aceite esencial de las hojas de la especie *Croton sonderianus*, que tiene actividad antinociceptiva, se encontró la presencia de compuestos de tipo sesquiterpénico como: cariofileno (**25**), óxido de cariofileno (**26**) y germancreno (**27**) (Pinho-da-Silva, et al., 2010), así como los compuestos γ -bisaboleno (**28**) y α -humuleno (**29**) que presentan actividad anticancerígena y que fueron identificados en el aceite esencial extraído de las hojas de la especie *Croton flavens* (Sylvestre, et al., 2006).



2.8.2 Diterpenos

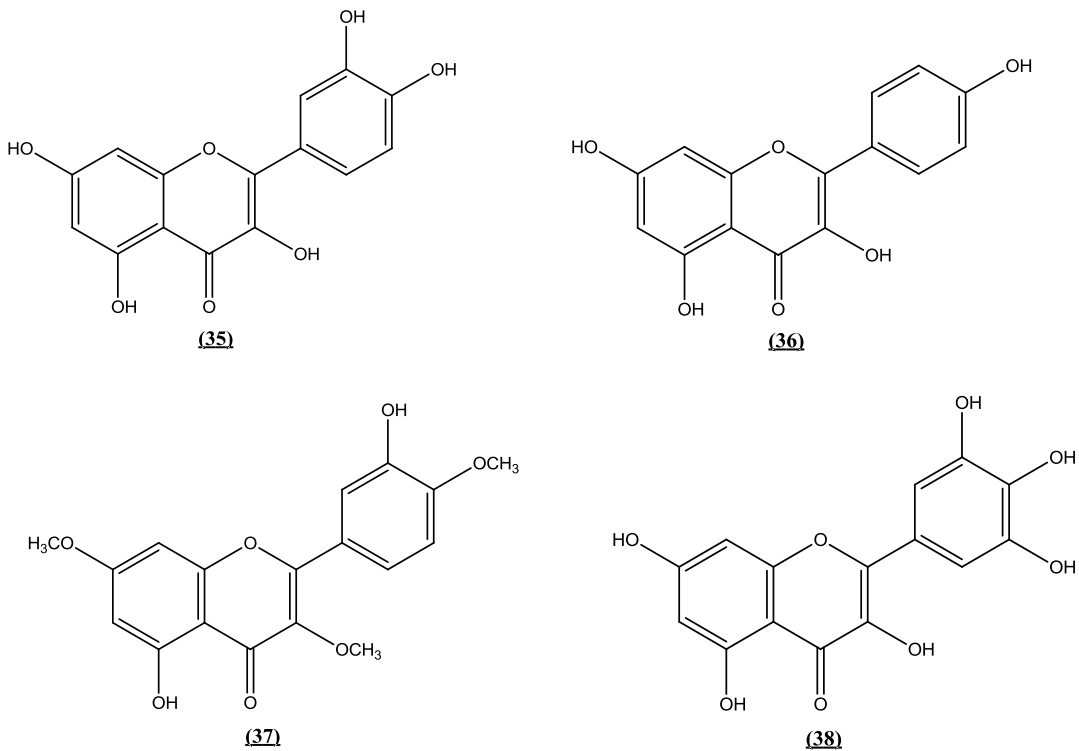
Dentro de las especies del género *Croton*, se encuentran principalmente compuestos diterpénicos, en especial los derivados del núcleo del clerodano (30) y cleistantano (31) (Santos, et al., 2005) encontrados en la especie *Croton soderianus* y que presentan actividad antifúngica y antibacterial. Además se encuentran reportes de otro tipo de diterpenos como el 2-acetoxi-3-hidroxi-labda-8(17),12 (*E*),14-trieno (32), derivado del núcleo del labdano, que posee actividad citotóxica (Roengsumran, et al., 2001), el *ent*-7 β -hidroxi-15-oxokaur-16-en-18-ol (33), derivado del núcleo del kaurano (Minh, et al., 2004) y la crotomacrina (34), un diterpeno derivado del núcleo del clerodano aislado de *C. macrostachyus* (Tane, et al., 2004).



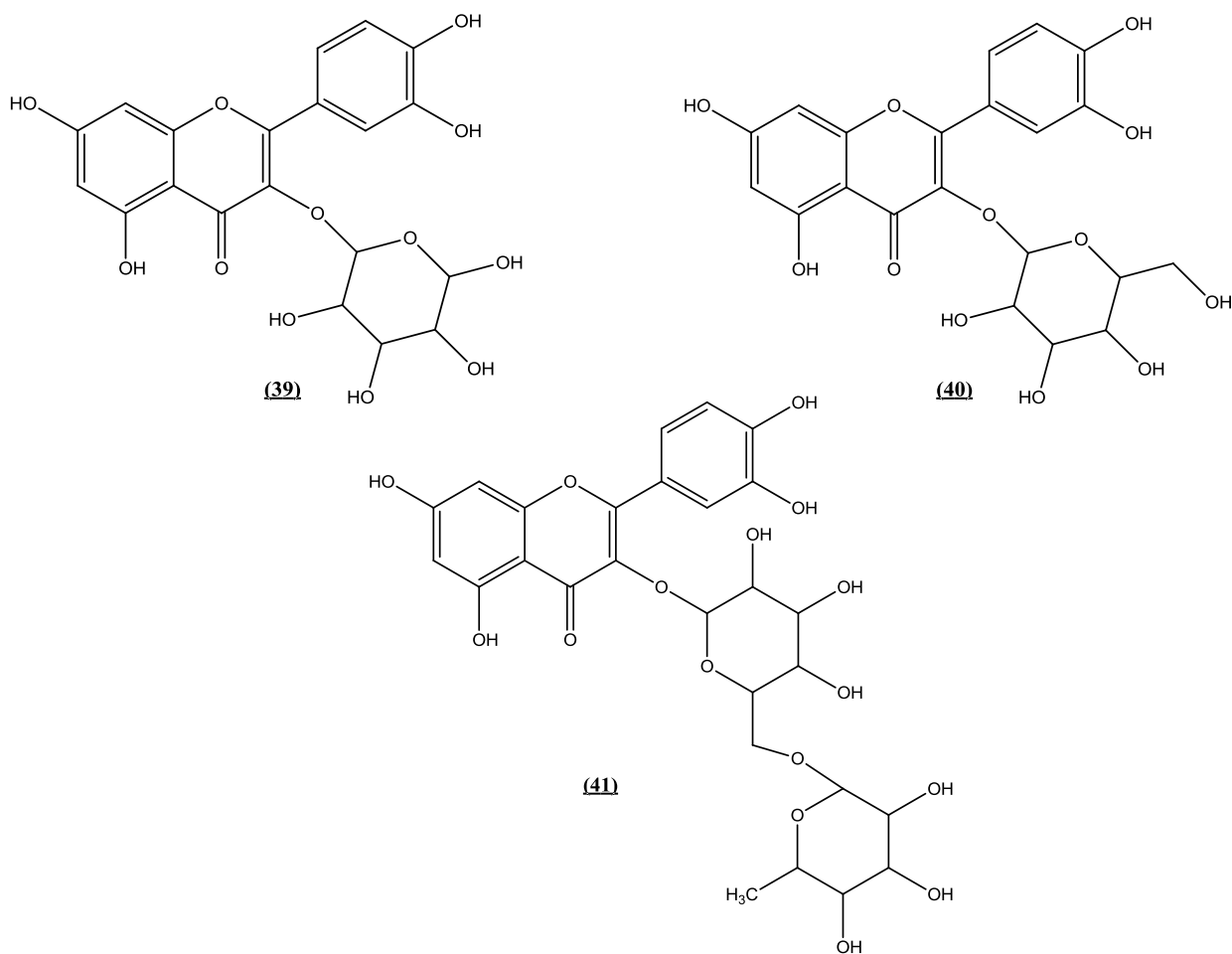


2.8.3 Flavonoides

Las especies del género *Croton* son ricas en flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles que se pueden presentar como *O*- y *C*- glicósidos, metil ésteres o polihidroxilados. Estos compuestos se han purificado de diferentes partes de la planta a excepción de las raíces. De la corteza de la especie *Croton celtidifolius* se aisló el flavonoide quercetina (35) (Nardi, et al., 2007), que presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria; otros flavonoides encontrados en las especies del género *Croton* son: canferol (36) (Yuan and Zhong-Mei, 2008), ayanina (37) (García, et al., 1986) y miricetina (38) (Puebla, et al., 2004).

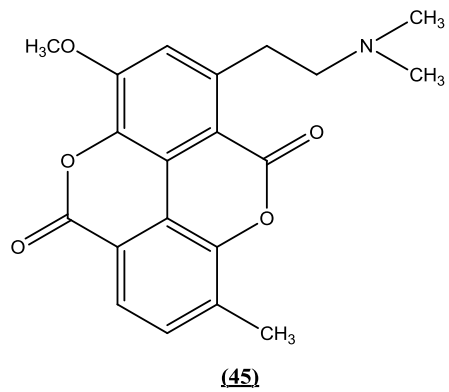
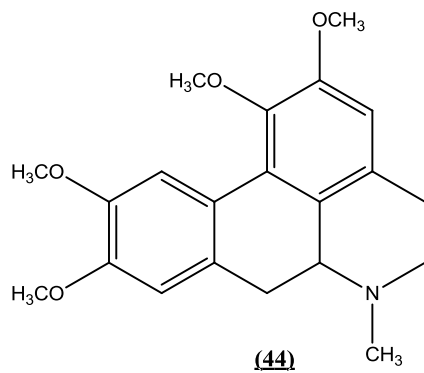
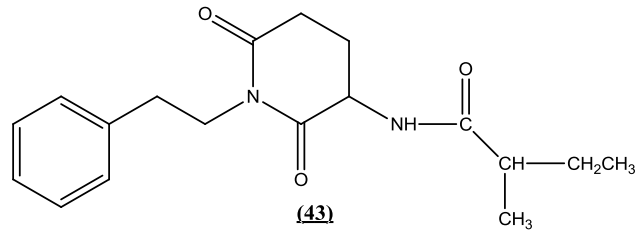
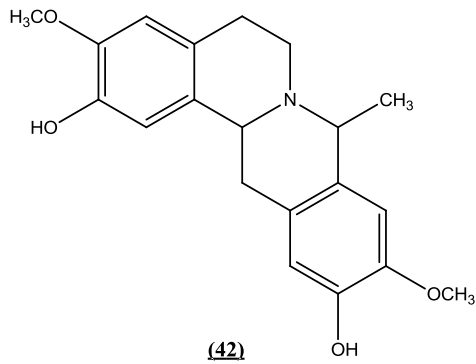


Algunos de los flavonoides presentes en este género, se encuentran glicosidados en la posición 3, como en el caso de la quercitrina **(39)**, que tiene como sustituyente una ramnosa, y es encontrada en las especies, *C. glabellus* y *C. bonplandianus*, además de otros flavonoides glicosidados como: hiperósido **(40)** y rutina **(41)**, que han sido aislados de otras especies de *Croton* y de los cuales se ha estudiado su actividad antihipertensiva y vasorelajante (Puebla, et al., 2004).



2.8.4 Alcaloides

En especies del género *Croton* se han encontrado diferentes tipos de alcaloides derivados del núcleo de la tetrahidroprotoberberina como por ejemplo la hemiargirina **(42)** (Amaral and Barnes, 1998), aislada de la especie como *Croton hemiargyreus*; un derivado del núcleo de glutarimida, llamado julocratina **(43)**, (Aboagye, et al., 2000), aislado de la especie *Croton membranaceus*. Además se encuentran reportes de la presencia de alcaloides de tipo porfínico como la glaucina **(44)** y la taspina **(45)** (Bettolo and Scarpati, 1979).



2.9 Generalidades de la especie *Croton schiedeanus*

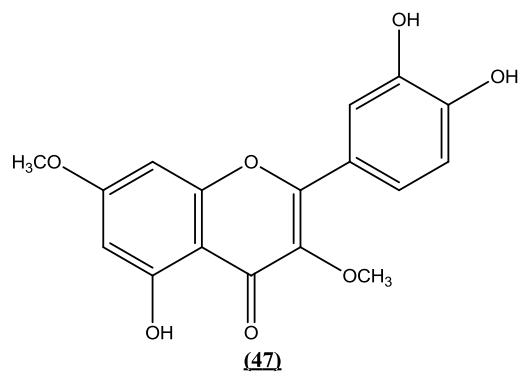
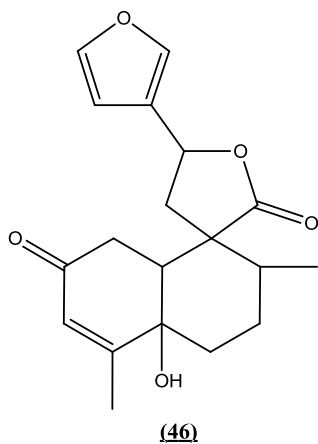
La especie vegetal *Croton schiedeanus*, Figura 2.5, está presente en los países: Belice, Costa Rica, Ecuador, México, Nicaragua y Panamá (GBIF, 2011). En el territorio Colombiano se encuentra particularmente en los departamentos de Amazonas y Cundinamarca (Puebla, et al., 2003).

Es un árbol comúnmente conocido como almizclillo y puede tener entre 8 y 24 metros de altura, sus frutos son verrugosos de color café, sus flores blancas y su corteza grisácea, y es usado en la medicina tradicional para el tratamiento de la hipertensión (Salas and Guerrero, 2010).

Figura 2.4: Hojas e inflorescencias de *Croton schiedeanus*



Los estudios fitoquímicos previos realizados en la especie *Croton schiedeanus* muestran la presencia de diterpenoides del núcleo *neo-clerodano*, como el 5 β -hidroxi-*cis*-dehidrocrotonina **(46)** (Puebla, et al., 2003) y flavonoides del tipo flavonol polihidroxiado como 3,7-di-O-metil quercetina **(47)**. Estudios farmacológicos realizados con el extracto etanólico de las hojas de *Croton schiedeanus* han demostrado su actividad antihipertensiva y vasorelajante (Guerrero, et al., 2001).



3. METODOLOGÍA

3.1 Procedimientos generales

3.1.1 Cromatografía en capa fina y en columna

Para la cromatografía en capa delgada (CCD) se usaron cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), como reveladores se usaron: luz UV de 254 y 365 nm, vapores de yodo, amoníaco y vainillina/H₃PO₄. Para la cromatografía en columna (CC) se empleó sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm) (Merck); para la cromatografía flash (CF) se usó sílica gel 60 (0,04- 0,063 mm) (Macherey- Nagel) y para la cromatografía líquida al vacío (CLV) se usó sílica gel 60 HF₂₅₄ (Merck).

3.1.2 Cromatografía de gases - espectrometría de masas

La determinación de la composición del aceite esencial fue realizada por medio de cromatografía de gases en un equipo Agilent 6890, acoplado a un detector de masas Agilent 5975 con una columna HP5 MS (60 m), en un tiempo de corrida de 70 min. El gas de arrastre utilizado fue helio; la temperatura del horno se programó de la siguiente manera: iniciando en 40°C, sube 4°C/min hasta 160°C, luego sube 2.5°C/min hasta 220°C y posteriormente llega a una temperatura de 280 °C aumentando 8°C/min. La determinación de los compuestos se hace por medio de la comparación con la librería interna del equipo NIST 08 y el cálculo de índices de retención.

3.1.3 HPLC acoplado a espectrometría de masas

Para la toma de los perfiles de HPLC y espectros de masas de los flavonoides puros, se utilizó un cromatógrafo líquido 1260-LC (Agilent Technologies) con detector DAD, acoplado a un detector de masas con interfase ESI como fuente de ionización e IT como analizador (HPLC-DAD-ESI IT-MS).

La columna empleada fue una Zorbax Eclipse Plus, 4.6 mm x 150 mm * 1.8 µm. Se utilizó una separación en gradiente (fases móviles A: H₂O+0.5% ácido acético; y B: ACN) El proceso de separación se realizó variando la composición de fase móvil del 95% A al 0% A en 30 min. El flujo de la fase móvil fue 0.8 mL/min y el volumen de inyección 10 µL. El gas de arrastre fue nitrógeno con un flujo de 1L/min.

3.1.5 Espectrometría infrarroja y puntos de fusión

Los espectros de IR fueron tomados en un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR en pastillas de KBr. Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Fischer-Johns.

3.1.6 Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

Los experimentos de resonancia magnética nuclear RMN ^1H , ^{13}C , DEPT y bidimensionales COSY, HMQC y HMBC, fueron tomados en un equipo Bruker Avance operado a 300 y 400 MHz, utilizando solventes deuterados DMSO d_6 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ y CDCl_3 .

3.2 Estudio fitoquímico

3.2.1 Recolección e identificación del material vegetal

Las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* fueron recolectadas por el Dr. Mario Francisco Guerrero Pabón, docente del departamento de Farmacia, en el municipio de Tocaima-Cundinamarca en el mes de Mayo de 2010. Un ejemplar de la especie fue llevado Herbario Nacional Colombiano donde fue determinada por el Dr. José Luis Fernández, una muestra reposa en el herbario bajo el número COL-432164.

3.2.2 Extracción, fraccionamiento y purificación de metabolitos secundarios

Para la obtención del extracto etanólico, 1 Kg de hojas frescas se sometieron a secado a temperatura ambiente, se trituraron y llevaron a maceración con etanol al 96 % obteniendo 145 g de extracto. Con un gramo de extracto etanólico se realizaron ensayos de coloración y precipitación (Bilbao, 1997, Sanabria, 1983, Shenoy, et al., 2009), que permitieron identificar los posibles grupos de metabolitos secundarios presentes en la muestra.

Una parte del extracto etanólico (130 g) se sometió a fraccionamiento asistido por ultrasonido (García, et al., 1986), con éter de petróleo y éter etílico, obteniendo 3 fracciones finales: éter de petróleo (EP) 40 g, éter etílico (EE) 56 g y residuo (R) 30 g.

40 g de la fracción EE se sometieron a fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV) con solventes de polaridad creciente: Tolueno, Cloroformo, Acetato de Isopropilo y Metanol, obteniendo 14 fracciones, nombradas como EE-1/EE-14.

Después de realizar el chequeo por CCD de las fracciones obtenidas, la fracción EE2 (1.5 g), fue sometida a purificación por CF con una mezcla de $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ - AcOipr- CH_3COOH 1:1:0.1 obteniendo 4 fracciones (EE2-1/EE2-4); la fracción EE2-3 (937 mg), se sometió a CF con una mezcla de C_6H_{14} - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 9:1 obteniendo 7 fracciones (EE2-3-1/EE2-3-7). En la fracción EE2-3-6 se obtuvieron 40 mg de un sólido amarillo soluble en DMSO denominado compuesto **HCS1**.

Las fracciones EE-12- EE-14 se reunieron en una sola fracción debido a la similitud presentada en el chequeo por CCD, obteniendo un peso final de 4.8 g. De esta fracción por medio de cromatografías en columna sucesivas, se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 100 mg soluble en metanol denominado como compuesto **HCS2**.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio por CCD de la fracción EE; 1.5 g de esta se tomaron aparte y se sometieron a fraccionamiento por CF con una mezcla de $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ - AcOipr 95:5 obteniendo 16 fracciones (EE-F1/EE-F16), la fracción EE-F5 con un peso de 170 mg, se

fraccionó nuevamente por CF con una mezcla de $C_6H_5CH_3$ - AcOipr 7:3 obteniendo 6 fracciones (EE-F5-1/EE-F5-6); de las fracciones EE-F5-2 y EE-F5-3 se obtuvieron 15 mg de compuesto **HCS3**, este mismo fue hallado en menor cantidad en algunas de las fracciones que se trabajaron después del fraccionamiento por CLV. A continuación en la Figura 3.1 se explica la extracción y fraccionamiento del extracto etanólico y la purificación de metabolitos secundarios.

Figura 3.1: Extracción, fraccionamiento del extracto etanólico y purificación de metabolitos secundarios.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados del trabajo experimental combinados con la discusión. Primero se explicará la obtención y elucidación de los metabolitos secundarios, posteriormente el proceso y los resultados de las reacciones de hemisíntesis llevadas a cabo con los flavonoides mayoritarios y por último la caracterización de los componentes del aceite esencial.

4.1 Caracterización fitoquímica preliminar

La marcha fitoquímica preliminar consiste en un conjunto de pruebas de coloración y/o precipitación que nos dan un indicio de los posibles tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en el extracto etanólico. Esta marcha fitoquímica se realizó con el extracto etanólico (pruebas para identificación de taninos, flavonoides, alcaloides y quinonas) y fracción etérea (carotenoides, esteroides y triterpenoides), para la comparación de resultados se usaron controles positivos

Las pruebas se realizaron con los extractos de hojas con destilación por arrastre con vapor (HA) hojas sin destilación por arrastre con vapor (H), con el fin de determinar si el proceso de extracción del aceite había alterado de alguna manera el material vegetal, de acuerdo a los resultados obtenidos, no se presenta cambio alguno, sin embargo se decide trabajar con las hojas sin arrastre con vapor H debido a la cantidad de extracto obtenido (145 g).

A partir de los resultados de la marcha fitoquímica preliminar, se puede evidenciar la presencia de metabolitos secundarios de tipo carotenoide, fenólico, flavonoide y alcaloide; lo que está de acuerdo con la quimiotaxonomía de la familia y el género. A continuación se explicaran algunas consideraciones generales de los resultados para las pruebas con resultado positivo.

Carotenoides y esteroides: Los esteroides o carotenoides que posean por lo menos un doble enlace dentro de su estructura dan prueba positiva para Liebermann-Burchard, la prueba se basa en la formación de complejos coloreados o formación de fases. Al realizar los revelados respectivos de CCD se encontraron manchas de coloración azul, verde, amarillo y violeta, lo que podría indicar la presencia de compuestos de tipo esteroide y triterpenoide (azul-verde) y carotenoide (amarillo).

Taninos: las pruebas para determinar la presencia de taninos se basan en la propiedad de estos compuestos de producir precipitados con sales de plomo y hierro, además de la formación de soluciones azules o negras al adicionar el reactivo de cloruro férrico, esta última prueba es especial para reconocer grupos fenólicos, dando coloración azul para derivados del ácido gálico.

Flavonoides: en la prueba de Shinoda los flavonoides reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio para dar una coloración rosada, roja o naranja. En ocasiones los flavonoides dan coloración verde o azul.

Quinonas: las quinonas tienden a dar coloraciones amarillas, rojo o púrpura al estar en presencia de ácidos o alcalis concentrados (prueba de donador o aceptor de electrones), la reacción se basa en la reducción de los grupos carbonilo de la molécula, por lo cual se podría obtener un resultado falso positivo con otro tipo de compuestos presentes en la muestra.

Alcaloides: uno de los mayores inconvenientes para realizar las pruebas de reconocimiento de alcaloides es la especificidad de las mismas. Uno de los mayores problemas al realizar esta prueba es la formación de falsos positivos, que se pueden dar por lo general debido a la presencia de un grupo carbonilo α β insaturado, además de posiciones oxigenadas cercanas a una alta densidad electrónica (carbono beta unido a grupos alquilo); por esta razón, aunque las pruebas para alcaloides dieron un resultado positivo al realizar la marcha fitoquímica preliminar, no se puede afirmar completamente la presencia de estos dentro del extracto.

4.2 Elucidación estructural de compuestos puros

Debido a que uno de los objetivos principales de trabajo de investigación era la extracción de los metabolitos de tipo flavonoide de una manera selectiva, se decidió realizar un proceso de fraccionamiento selectivo para este tipo de compuestos (García, et al., 1986), como se había mencionado en la metodología, este proceso se llevó a cabo asistido con ultrasonido usando como solventes éter de petróleo y éter etílico. Al realizar el estudio comparativo de las fracciones obtenidas, se decidió trabajar con la fracción de EE, debido a su perfil cromatográfico.

A partir de este proceso de extracción se obtuvieron fracciones ricas en compuesto de tipo flavonoide que posteriormente fueron purificadas por medio de CC y CF, de las cuales se obtuvieron 3 compuestos de tipo flavonoide y un sesquiterpeno, a continuación se explicará el proceso de purificación y elucidación estructural de estas sustancias.

4.2.1 Compuesto HCS1

El compuesto HCS1 se obtuvo como un sólido amarillo soluble en DMSO con un peso de 40 mg y un punto de fusión de 163-165 °C.

Después de obtener el perfil de HPLC presentado en la Figura 4.1, el compuesto fue analizado por EM en modo negativo, Figura 4.2, donde se observa un pico de ión pseudomolecular $[M-H]^-$ m/z 342.9 en modo negativo, lo que sugiere que el peso del compuesto es 344.

Figura 4.1: Perfil de HPLC del compuesto HCS1

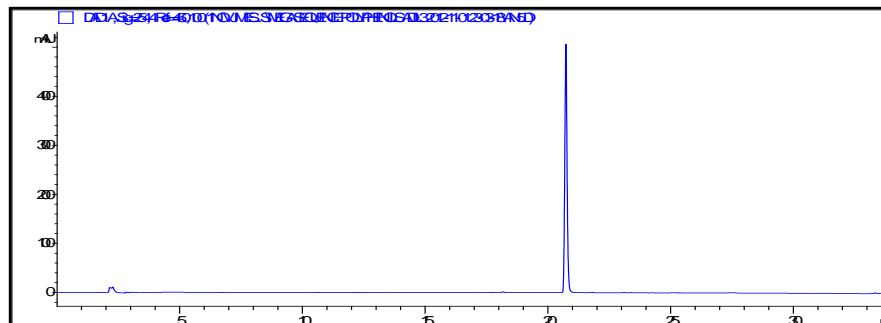
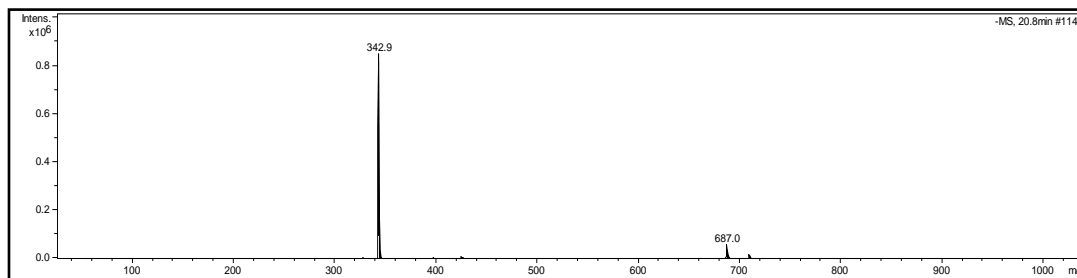
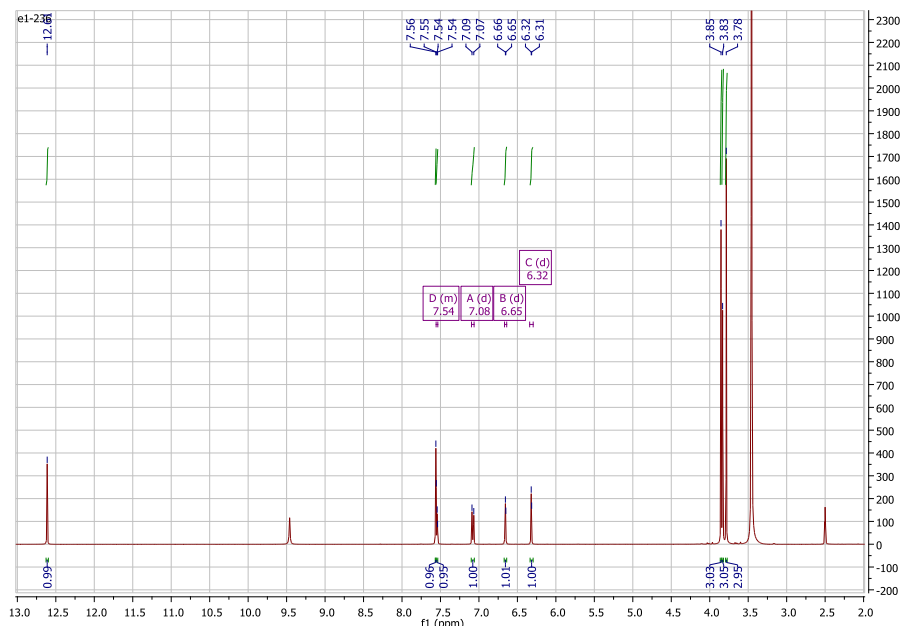


Figura 4.2: Espectro de masas del compuesto HCS1



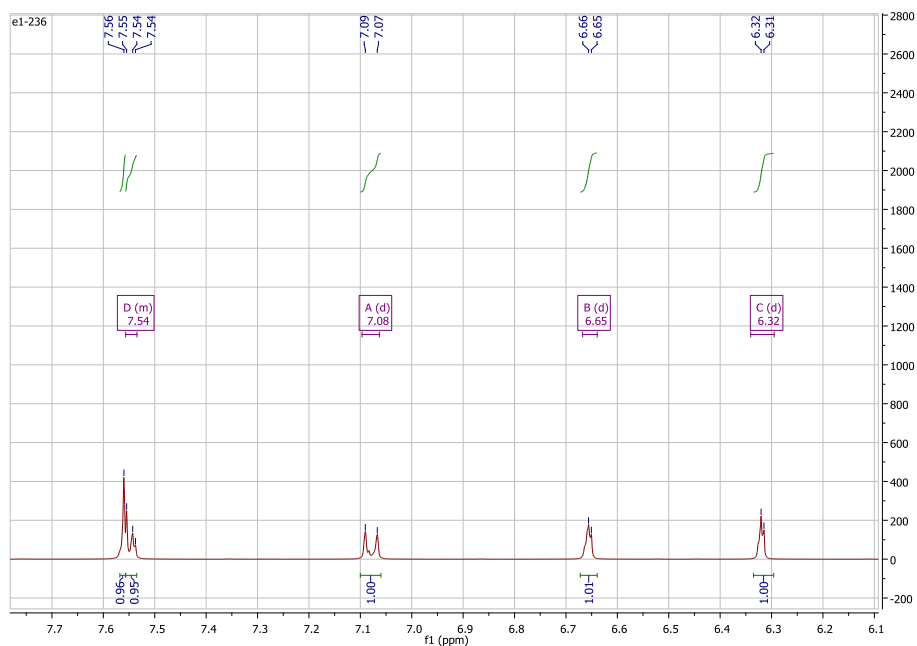
El espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO d_6), Figura 4.3, presentó en la región de campo alto tres singletes que de acuerdo con su desplazamiento corresponden a hidrógenos de grupo metoxilo (O-CH_3), en δ 3.78 (s, 3H); δ 3.83 (s, 3H) y δ 3.85 (s, 3H) (Harborne, et al., 1975), (Vázquez, et al., 2006); en la región entre δ 6.10 y δ 7.80, se observaron las siguientes señales: δ 6.32 (d, 1H, $J=2$ Hz); δ 6.65 (d, 1H, $J=2$ Hz); δ 7.08 (d, 1H, $J=9$ Hz); δ 7.55 (m, 1H); δ 7.56 (d, 1H, $J=2$ Hz), además en δ 12.61, se observó un singlete ancho característico de grupo hidroxilo vecino a un carbonilo.

Figura 4.3: Espectro de ^1H compuesto HCS1 (DMSO $_d$ 400 MHz)



De acuerdo a las señales obtenidas en la región entre δ 6.10 y δ 7.80, Figura 4.4, se puede evidenciar la presencia de dos anillos aromáticos, uno de ellos tetrasustituido con 2 protones en posición meta que presentan una constante de acoplamiento de $J=2$ Hz; mientras que el otro anillo se encuentra trisustituido, con un protón que se encuentra en posición orto y meta de otros dos vecinos y que presenta constantes de acoplamiento características de posición orto $J=9$ Hz y meta $J=2$ Hz.

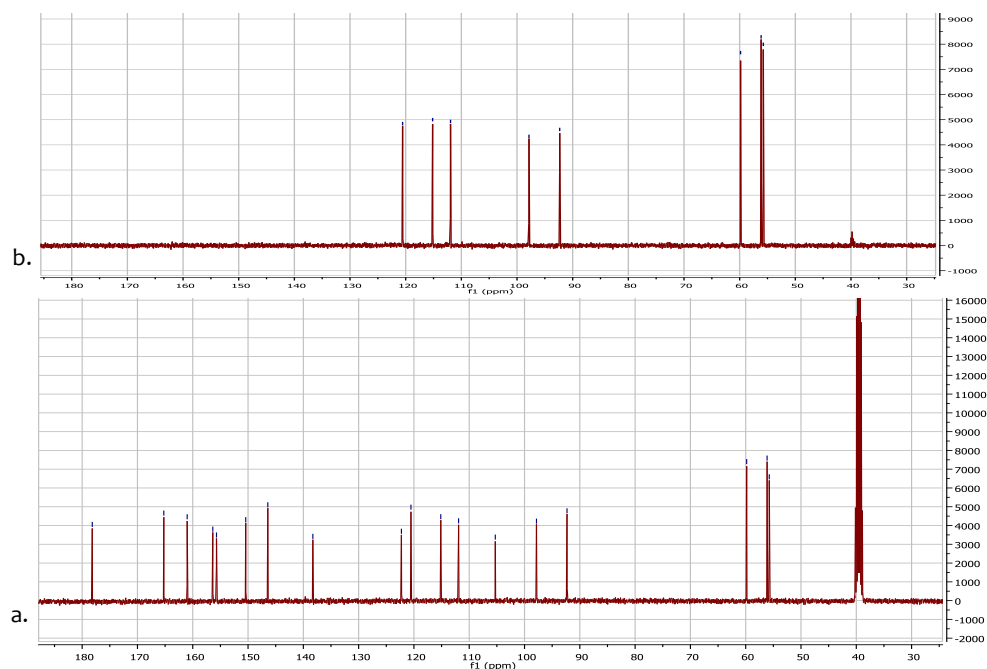
Figura 4.4: Espectro de RMN ^1H compuesto HCS1, ampliación de la región entre 6 y 8 ppm (DMSO $_d$ 400 MHz)



Se observa además la presencia de un hidrógeno perteneciente a un grupo hidroxilo en δ 12.61, que por su desplazamiento indica la presencia de un grupo carbonilo adyacente que genera un efecto de desprotección al permitir la formación de un puente de hidrógeno (Harborne, et al., 1975). A partir de las señales obtenidas en el espectro de RMN ^1H , se puede confirmar la presencia de dos anillos aromáticos característicos de estructuras de metabolito secundario de tipo flavonoide.

El espectro de RMN ^{13}C , Figura 4.5(a), muestra la presencia de 18 carbonos que al ser comparados con el experimento DEPT 135, Figura 4.5(b), se clasifican de la siguiente manera: 5 carbonos correspondientes metínicos (92.3; 97.8; 111.9; 115.1 y 120.5 ppm), 3 carbonos metílicos, que por su desplazamiento se asignan a grupos metoxilo (55.7; 56.1 y 59.8 ppm) y 10 carbonos cuaternarios (105.2; 122.2; 138.2; 146.4; 150.4; 155.7; 156.3; 161.0; 165.2 y 178.1 ppm), el carbono de 178.1 ppm, se caracteriza por su desplazamiento químico que confirma la presencia de un grupo carbonilo dentro de la molécula.

Figura 4.5: Comparación del espectro de (a.) RMN ^{13}C y (b.) DEPT 135 del compuesto HCS1



Para establecer la conectividad entre hidrógenos y carbonos se realizó el experimento HMQC, Figura 4.6, los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Señales obtenidas en el espectro de HMQC

Carbono ppm	δ Hidrógeno
55.7	3.85
56.1	3.83
59.8	3.78
92.3	6.65
97.8	6.32
111.9	7.08
115.1	7.56
120.5	7.55

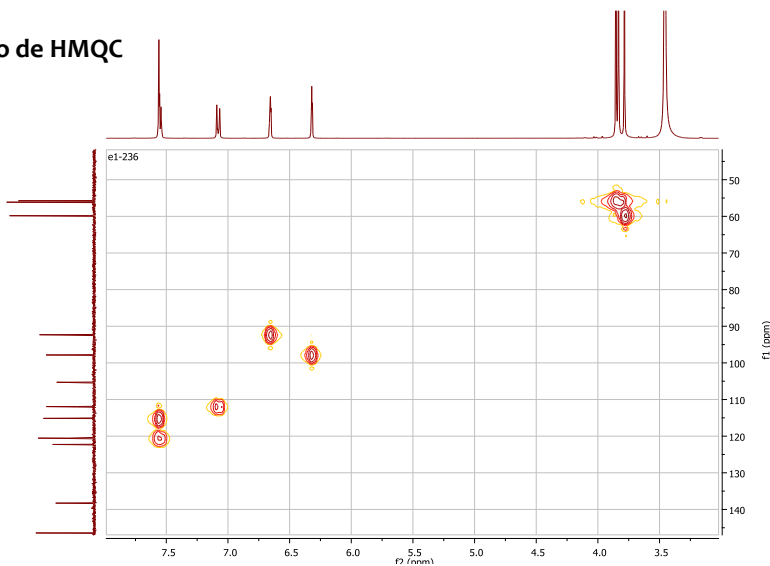
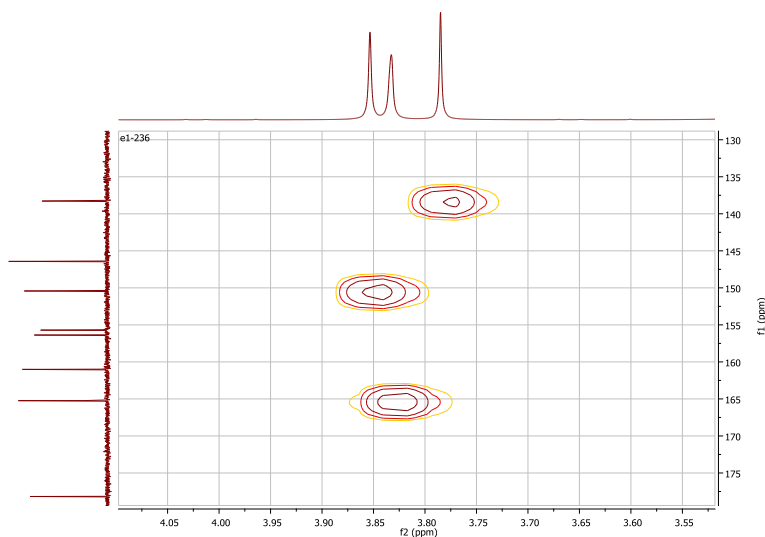


Figura 4.6: Espectro de HMQC compuesto HCS1

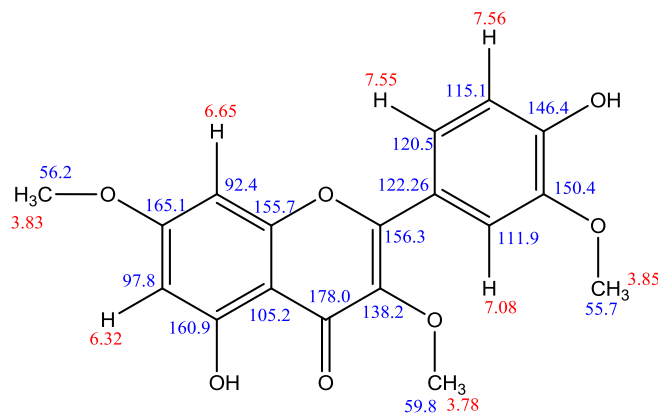
A partir de los resultados obtenidos en el experimento HMBC fue posible la asignación de la posición de los sustituyentes y los carbonos cuaternarios dentro de la molécula; entre las señales más importantes se encuentran las siguientes correlaciones a tres enlaces a través de heteroátomo para la asignación de los sustituyentes tipo metoxilo, Figura 4.7, entre los protones en δ 3.78 con el carbono cuaternario en 138.2 ppm; los protones en δ 3.83 con el carbono cuaternario en 165.2 ppm y los protones en δ 3.85 con el carbono cuaternario en 150.4 ppm.

Figura 4.7: Ampliación del espectro de HMBC del compuesto HCS1



La asignación completa de las señales de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto HCS1 se encuentra en la Figura 4.8.

Figura 4.8: Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto HCS1



Luego de la comparación con la literatura se pudo determinar que el compuesto HCS1 corresponde al flavonoide Pachypodol (3,7,3'- tri-O- metil quercetina), que ya había sido reportado en la especie *Croton ciliatoglanduliferus* (Vázquez, et al., 2006).

4.2.2 Compuesto HCS2

El compuesto HCS2 se obtuvo como un sólido amarillo soluble en metanol con un peso de 100 mg y con un punto de fusión de 219-221 °C. Después de obtener el perfil de HPLC presentado en la Figura 4.9 donde se observa la pureza de la sustancia, el compuesto fue analizado por EM, Figura 4.10, donde se observa un pico de ión pseudomolecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 328.9 en modo negativo, lo que indica un peso de 330.

Figura 4.9: Perfil de HPLC del compuesto HCS3

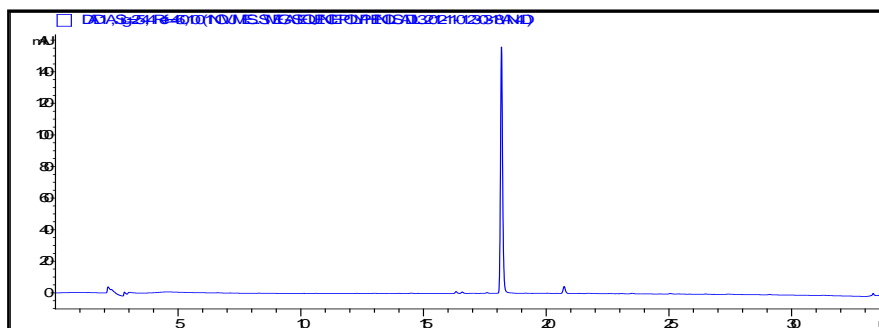
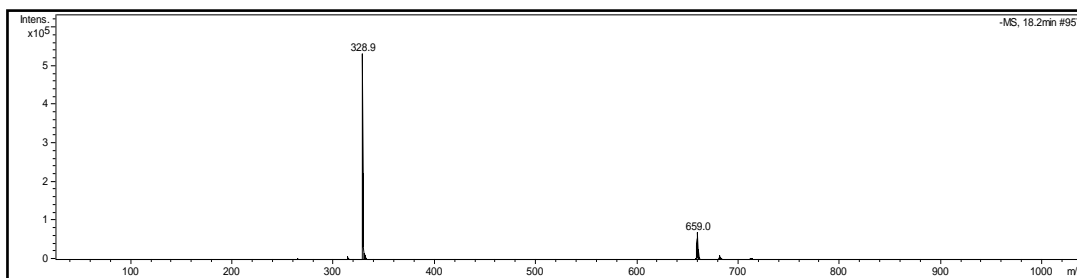


Figura 4.10: Espectro de masas del compuesto HCS3



Al obtener los datos espectroscópicos se compraron con la literatura encontrando que el compuesto HCS2 corresponde al flavonoide 3-7-di-O-metilquercetina (DMQ), que había sido aislado anteriormente de esta especie (Guerrero, et al., 2002). El espectro de ^{13}C se encuentra en la Figura 4.11 y la comparación de datos espectroscópicos con la literatura se encuentra en la tabla 4.2.

Al comparar los datos espectroscópicos obtenidos de los compuestos HCS1 y HCS2, se concluye que es una sustancia de tipo flavonoide metoxilado. La diferencia entre las señales de los compuestos se basa en la cantidad de grupos metoxilo presentes en la molécula. En el caso HCS2 se observan 3 señales (55.7; 56.1 y 59.8 ppm) mientras que en HCS2 se observan solamente dos (55.9 y 59.5 ppm); sin embargo estos grupos presentan el mismo desplazamiento obtenido en HCS1 indicando que estas sustituciones se encuentran sobre los carbonos 3 y 7 del esqueleto flavonoide.

Tabla 4.2: Señales del espectro de ^{13}C del compuesto HCS2 y comparación con la literatura*(Guerrero, et al., 2002)

C	HCS3	DMQ*
7- O-Metilo	55.9	56.0
3- O-Metilo	59.5	59.5
8	92.1	92.1
6	97.6	97.6
10	105.0	105.1
2'	115.4	115.5
5	115.6	115.7
6'	120.5	120.6
1'	120.6	120.7
3	137.7	137.8
3'	145.1	145.2
4'	148.7	148.8
2	155.8	155.9
9	156.1	156.1
5	160.8	160.9
7	165.0	165.0
4	177.9	178.0

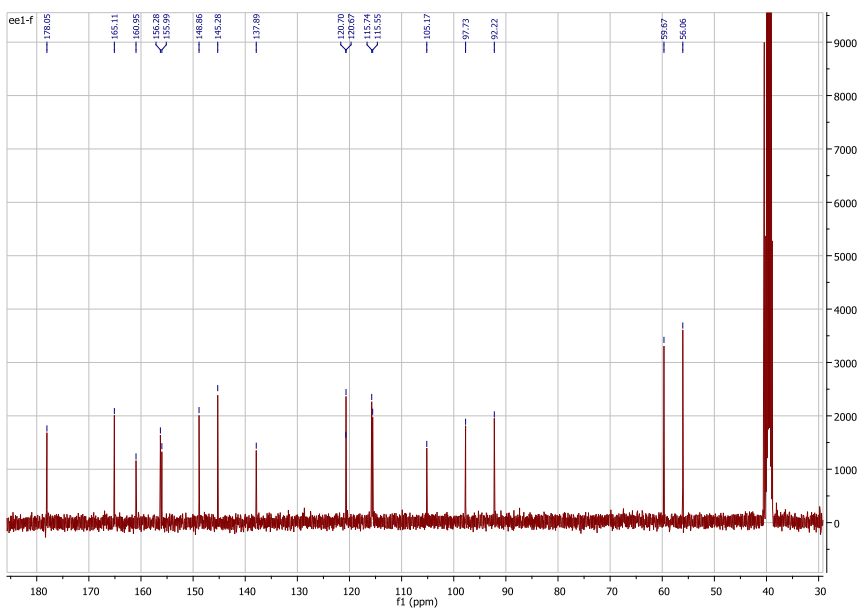


Figura 4.11: Espectro de ^{13}C del compuesto HCS2 (CD₃OD 100MHZ)

4.2.3 Compuesto HCS3

El compuesto HCS3 (15 mg) se obtuvo en forma de agujas amarillas solubles en DMSO con un punto de fusión de 169-171 °C. Después de obtener el perfil de HPLC presentado en la Figura 4.12, el compuesto fue analizado por EM, Figura 4.13, donde se observa un pico de ión pseudomolecular $[M-H]^-$ m/z 342.9 en modo negativo, lo que indica un peso de 344.

Figura 4.12: Perfil de HPLC compuesto HCS3

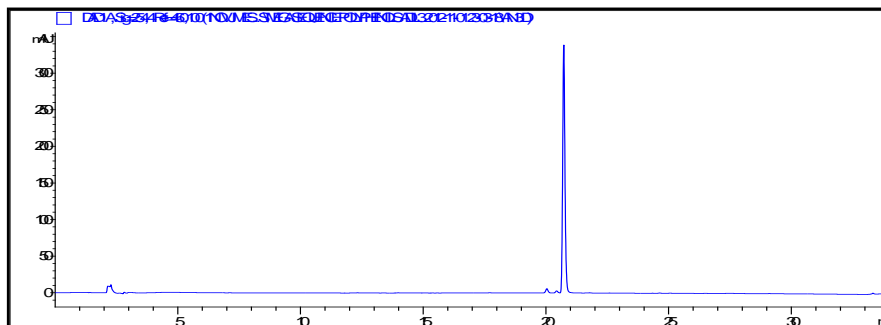
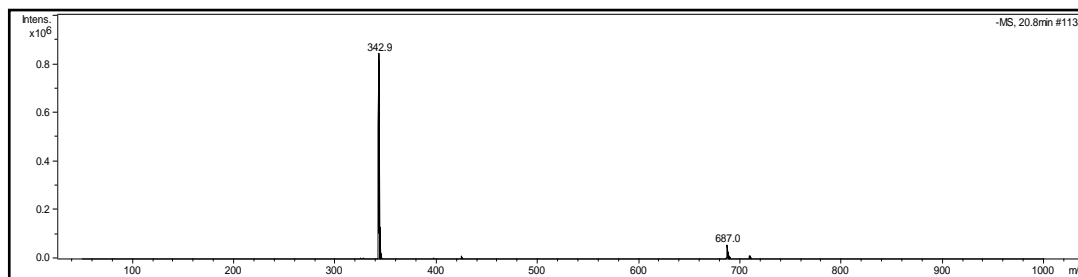


Figura 4.13: Espectro de masas compuesto HCS3



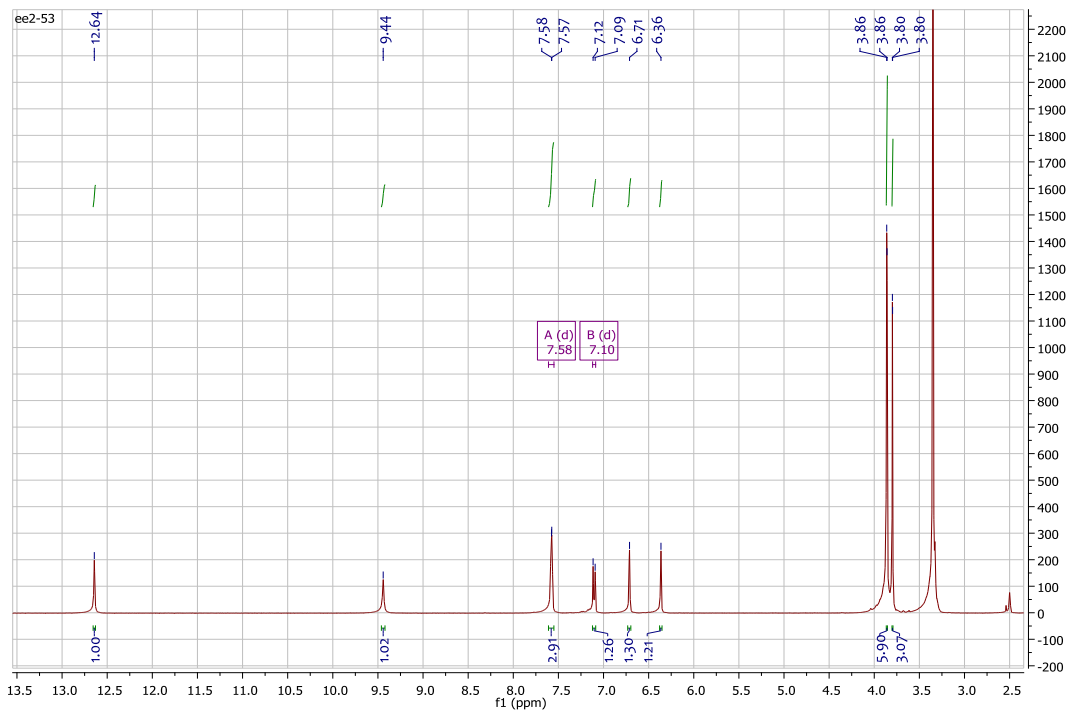
El análisis espectroscópico para determinar su estructura se realizó de la misma manera que con HSC1. Al obtener los datos espectroscópicos se compraron con la literatura encontrando que el compuesto HCS3 corresponde al flavonoide 3-7-4'-tri-O-metil quercetina (ayanina), que había sido aislado anteriormente de esta especie (Carrón, et al., 2010). El espectro de RMN ^1H se encuentra en la Figura 4.14 y la comparación de datos espectroscópicos con la literatura se encuentra en la tabla 4.3.

Aunque las señales del espectro de RMN ^1H de los compuestos HCS1 y HCS3, muestran la misma cantidad de señales y multiplicidad, la diferencia entre estos dos radica en los desplazamientos químicos, en los cuales se evidencia un cambio de posición en los sustituyentes del anillo B del esqueleto flavonoide.

Tabla 4.3: Señales obtenidas en el espectro de ^1H para el compuesto HCS₃ y comparación con la literatura* (Carrón, et al., 2010)

HCS4		Ayanina*	
δ 3.80	s, 3H	δ 3.83	s, 3H
δ 3.86	s*, 6H	δ 3.87	s, 3H
δ 6.36	d*, 1H	δ 3.90	s, 3H
δ 6.70	d*, 1H	δ 6.35	d, 1H, $J = 2$ Hz
δ 7.12	d, 1H, $J = 9$ Hz	δ 6.30	d, 1H, $J = 2$ Hz
δ 7.60	m, 1H	δ 7.10	d, 1H, $J = 10$ Hz
δ 12.60	s, 1H	δ 7.60	m, 1H
		δ 12.60	s, 1H

Figura 4.14: Espectro de RMN ^1H compuesto HCS₃ (DMSO d_6 400MHz)



4.3 Derivados hemisintéticos de los flavonoides mayoritarios

La especie *Croton schiedeanus* es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la hipertensión arterial, debido a esto se han realizado estudios farmacológicos que demuestran que el extracto etanólico disminuye la presión ejercida sobre anillos de aorta de ratas (vasodilatación); además estudios fitoquímicos posteriores han evidenciado que los flavonoides ayanina (3-7-4' tri-O-metil quercetina) y DMQ (3-7-di-O-metilquercetina) son los componentes mayoritarios del extracto (Carrón, et al., 2010). Así mismo se realizó un estudio para determinar la actividad vasodilatadora encontrando como resultado que el compuesto DMQ es más activo que la ayanina; en este mismo estudio se pudo realizar una aproximación a la relación estructura-actividad al determinar que en algunos casos los sustituyentes hidroxilados en las posiciones 3' y 4' aumentan el potencial vasodilatador, al igual que las sustituciones metoxiladas en las posiciones 3 y 7 (Guerrero, et al., 2002).

Con este referente se han realizado varios estudios en los cuales se prueba la acción de diferentes compuestos flavonoides y en los que se determinó que la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y la presencia de varios sustituyentes hidroxilo, especialmente en el anillo B ocasionan un descenso en la actividad, por otra parte, la potencialización de la actividad con posiciones hidroxiladas o metoxiladas en los carbonos 3 y 5 aún ha sido comprobada (Mladenka, et al., 2010).

Debido a que aún no se tiene claridad acerca del mecanismo de acción de los flavonoides presentes en el *Croton schiedeanus*, se plantean diferentes reacciones de hemisíntesis que en un posterior estudio permitirán evaluar la potencialización o no de este efecto al incluir sustituyentes de tipo acetilo y metoxilo en diferentes posiciones, además de la demetilación de los grupo metoxilo ya existentes dentro de las moléculas.

4.3.1 Derivados Acetilados

Se tomaron aproximadamente 25 mg de compuesto flavonoide y se sometieron a acetilación por el método anhídrido acético- piridina (Hermoso, et al., 2003), obteniendo los siguientes derivados acetilados.

- Derivados acetilados de DMQ

Después de realizar la reacción de acetilación, el producto fue chequeado por CCD usando como fase móvil $C_6H_5CH_3$ - AcOipr 7:3, encontrándose una mezcla de compuestos con un peso de 50 mg que fue separada por CC obteniendo 5 fracciones numeradas DMQA1- DMQA5, después de realizar el análisis por RMN ^{13}C de las fracciones DMQA1 y DMQA2 se encontraron las siguientes estructuras.

4.3.1.1: DMQA1

El compuesto DMQA1 (3mg) se analizó por RMN ¹³C, los resultados y la comparación con las señales del compuesto DMQ se muestran en la Tabla 4.4.

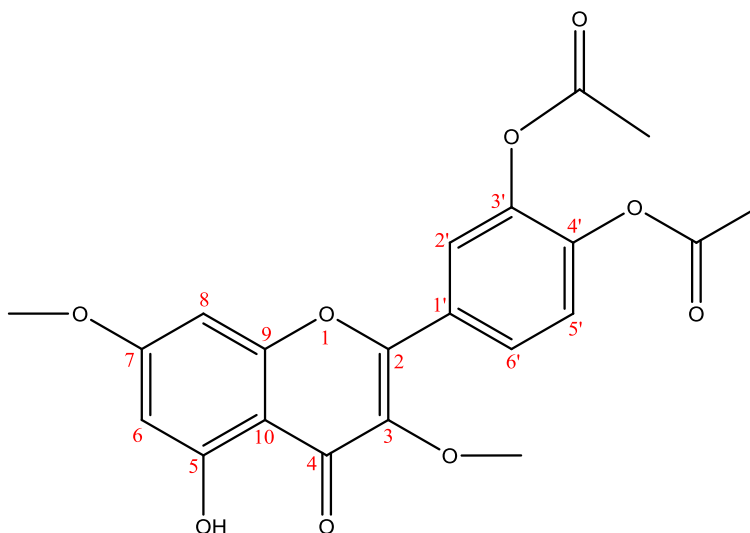
Al realizar el análisis del espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del compuesto DMQA1, se evidencia la presencia de 4 nuevos carbonos en 20.83, 20.87, 168.04 y 168.28 ppm, por su desplazamiento, se puede concluir que los carbonos en 20.8 y 20.8 ppm pertenecen a un grupo metilo de acetilo, que se confirma con la presencia de los carbonos en 168.0 y 168.2 ppm, sugiriendo la presencia de 2 grupos acetilo dentro de la molécula.

Para determinar las posiciones de sustitución se realizó el análisis del resto de la molécula y la comparación con las señales de RMN ¹³C del esqueleto básico del compuesto DMQ. Respecto a las señales del anillo A de la molécula no se presenta mayor cambio, pero al analizar las señales correspondientes al anillo B, se encuentra que los carbonos sufren un desplazamiento considerable hacia campo bajo lo que indica un fenómeno de desprotección. Los carbonos que se ven más afectados corresponden a los de las posiciones que anteriormente no presentaban sustituyentes, (es decir 2', 5' y 6'), debido a que en el compuesto DMQ, estos se veían influenciados a través del espacio por el oxígeno de un grupo OH que ahora esta reemplazado por un éster. Sin embargo, los carbonos unidos directamente al grupo acetilo (3' y 4') no presentan mayor cambio de desplazamiento. El compuesto obtenido corresponde a la 3'-4'-di-acetil- 3-7-di-O-metil Quercetina, Figura 4.15.

Tabla 4.4: Señales de ¹³C para DMQ y DMQA1

C	DMQ	DMQA1
2	155.99	153.85
3	137.89	140.14
4	178.05	178.96
5	160.95	162.18
6	97.73	98.27
7	165.11	165.88
8	92.22	92.37
9	156.28	156.88
10	105.17	106.31
1'	120.70	129.14
2'	115.55	123.89
3'	145.28	142.29
4'	148.86	144.14
5'	115.74	123.86
6'	120.67	127.00
3-O- Metilo	59.67	60.63
7-O- Metilo	56.06	56.01
3' O- Acetilo		168.04
3' O- Acetilo		20.87
4' O- Acetilo		168.28
4' O- Acetilo		20.83

Figura 4.15: Estructura y señales de ¹³C para el compuesto DMQA1



4.3.1.2: DMQA2

El compuesto DMQA2 (28 mg) se analizó por RMN ^{13}C los resultados y la comparación con las señales del compuesto DMQ se muestran en la Tabla 4.5.

Al realizar el análisis del espectro de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto D2, se evidencia la presencia de 6 nuevos carbonos en 20.82, 20.85, 21.30, 168.04, 168.27 y 169.80 ppm, por su desplazamiento, se puede concluir que los carbonos en 20.82, 20.85 y 21.30 ppm pertenecen a un grupo metilo de acetilo, que se confirmaría con la presencia de los carbonos en 168.04, 168.27 y 169.80 ppm, sugiriendo la presencia de 3 grupos acetilo dentro de la molécula.

Para determinar las posiciones de sustitución se realizó el mismo análisis explicado anteriormente con DMQA1, en este caso se observó el mismo comportamiento para el anillo B pero además se observó un cambio considerable en los desplazamientos de los carbonos del anillo A; en el cual todos se desplazan hacia campo bajo sugiriendo la presencia de la sustitución por un grupo acetilo en la posición 5. El compuesto obtenido corresponde a la 3'-4'-5-tri-acetil-3-7-di-O- metil Quercetina, Figura 4.16.

Tabla 4.5: Señales de ^{13}C para DMQ y DMQA2

C	DMQ	DMQA2
2	155.99	152.32
3	137.89	141.93
4	178.05	173.29
5	160.95	150.66
6	97.73	108.56
7	165.11	163.67
8	92.22	98.71
9	156.28	157.92
10	105.17	111.54
1'	120.70	129.29
2'	115.55	123.79
3'	145.28	142.26
4'	148.86	143.91
5'	115.74	123.68
6'	120.67	126.84
3 O- Metilo	59.67	60.43
7 O- Metilo	56.06	56.18
5 O- Acetilo		169.80
5 O- Acetilo		21.30
3' O- Acetilo		168.27
3' O- Acetilo		20.85
4' O- Acetilo		168.04
4' O- Acetilo		20.82

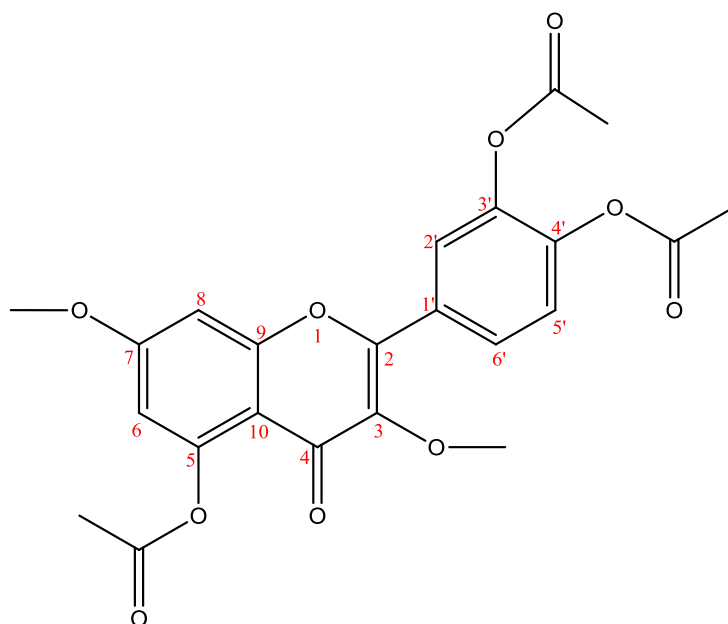


Figura 4.16: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto DMQA2

- **Derivado acetilado de Ayanina**

Después de realizar la acetilación, se realizó el chequeo por CCD donde se observó que se encontraba una mezcla de compuestos con un peso de 30 mg que fue separada por CC usando como fase móvil C₆H₅CH₃- AcOipr 7:3, obteniendo 3 fracciones numeradas AA1- AA3, la fracción AA3, se solubilizó en CDCl₃ y se le realizó el análisis por RMN ¹³C obteniendo los siguientes resultados.

4.3.1.3: AA3

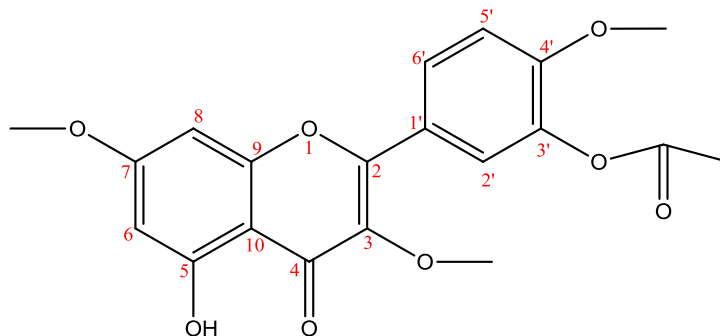
El compuesto AA3 (28 mg) se analizó por RMN ¹³C los resultados y la comparación con las señales de la Ayanina se muestran en la Tabla 4.6.

Al realizar el análisis del espectro de ¹³C (CDCl₃ 100 MHz) del compuesto AA3, se evidencia la presencia de 2 nuevos carbonos en 20. 81 ppm y 169.01 ppm que de acuerdo a los análisis anteriores sugiere la presencia de un grupo acetilo dentro de la molécula. Para determinar la posición de sustitución se realizó el mismo análisis explicado anteriormente con DMQA1 y DMQA2 en el cual se comprobó que las señales correspondientes al anillo B fueron las que se desplazaron hacia campo bajo, indicando la sustitución acetilo en esa parte de la molécula. El compuesto obtenido corresponde a la 3'-acetil-3-7-4'-tri-O- metil Quercetina, Figura 4.17.

Tabla 4.6: Señales de ¹³C para Ayanina y AA3

C	Ayanina	AA3
2	155.59	154.79
3	138.17	139.33
4	178.05	178.86
5	160.89	162.11
6	97.73	98.07
7	165.12	165.63
8	92.24	92.28
9	156.27	156.80
10	105.18	106.17
1'	120.36	123.12
2'	115.03	123.18
3'	146.32	139.77
4'	150.28	152.70
5'	111.84	112.22
6'	122.14	127.92
3 O- Metilo	56.03	59.60
5 O- Metilo	55.61	55.95
4'O- Metilo	59.69	56.18
3' O- Acetilo		169.01
3' O- Acetilo		20.81

Figura 4.17: Estructura y señales de ¹³C para el compuesto AA3



4.3.2 Derivados Metilados

Se tomaron 30 mg de compuesto (DMQ y Ayanina por separado) y se sometieron a metilación con sulfato de dimetilo (Rao and Owoyale, 1976) obteniendo el siguiente producto.

- Derivado metilado Ayanina

Después de realizar la reacción de metilación, el crudo de reacción fue chequeado por CCD usando como fase móvil $C_6H_5CH_3$ - AcOipr 8:2, encontrándose una mezcla de compuestos con un peso de 52.3 mg que fue separada por CC obteniendo 3 fracciones numeradas AM1- AM3; la fracción AM1 se solubilizó en DMSO *d6* y se analizó por RMN ^{13}C . Al realizar el análisis de las otras fracciones obtenidas de la purificación se observó que además de obtener el derivado AA3, se obtuvo otro compuesto que fue identificado como el mismo HCS3.

4.3.2.1: AM3

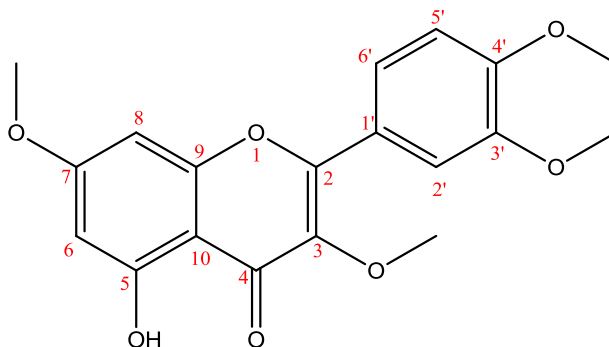
El compuesto AM3 se obtuvo en forma de cristales amarillos con un peso de 10 mg y soluble en DMSO *d6*. Después de comprobar la pureza del compuesto por medio de CCD, se procedió a realizar un análisis espectroscópico de ^{13}C (Anexo 10) los resultados y la comparación con las señales de la ayanina se muestran en la Tabla 4.7.

Al realizar el análisis del espectro de ^{13}C del compuesto AM3, se evidencia la presencia de un nuevo carbono en 55.91 ppm, por su desplazamiento, se puede concluir que pertenece a un carbono de grupo metoxilo. Para determinar la posición de sustitución se realizó el análisis del resto de la molécula y la comparación con las señales de RMN ^{13}C del esqueleto básico de la Ayanina. Respecto a las señales del anillo A de la molécula no se presenta mayor cambio, pero al analizar las señales correspondientes al anillo B, se observa un cambio en el carbono de la posición 3', que tiene un pequeño desplazamiento a campo alto indicando un cambio de sustituyente por un grupo protector, en este caso el intercambio de un átomo de H del grupo hidroxilo por CH_3 . El compuesto obtenido corresponde a la 3-7-3'-4'-tetra-O- metil quercetina, Figura 4.18.

Tabla 4.7: Señales de ^{13}C para Ayanina y AM₃

C	Ayanina	AM ₃
2	155.59	155.79
3	138.17	138.60
4	178.05	178.38
5	160.89	161.07
6	97.73	98.15
7	165.12	165.47
8	92.24	92.84
9	156.27	156.68
10	105.18	105.53
1'	120.36	112.37
2'	115.03	111.31
3'	146.32	148.68
4'	150.28	151.55
5'	111.84	111.78
6'	122.14	122.25
3 O- Metilo	56.03	56.10
7 O- Metilo	55.61	56.40
3' O- Metilo	59.69	55.91
4' O- Metilo		55.86

Figura 4.18: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto AM₃



4.3.3 Derivados Demetilados

Se tomaron 30 mg de cada uno de los compuestos (DMQ y Ayanina por separado) y se sometieron a demetilación con HI y fenol (King, et al., 1952). A partir de la reacción de demetilación de ayanina se obtuvo el compuesto HCS₃, en la reacción con la DMQ se obtuvieron los siguientes resultados.

- Derivado demetilado de DMQ

Después de realizar la reacción de demetilación, el producto fue chequeado por CCD usando como fase móvil $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ - AcOipr 7:3, encontrándose una mezcla de compuestos con un peso de 28 mg que fue separada por CC obteniendo 5 fracciones numeradas DMQD1- DMQD5; la fracción DMQD5 se solubilizó en CD_3OD y se analizó por RMN ^{13}C .

4.3.2.1: DMQD5

El compuesto DMQD5 (8mg) se analizó por RMN ^{13}C , los resultados y la comparación con las señales de la DMQ se muestran en la Tabla 4.8.

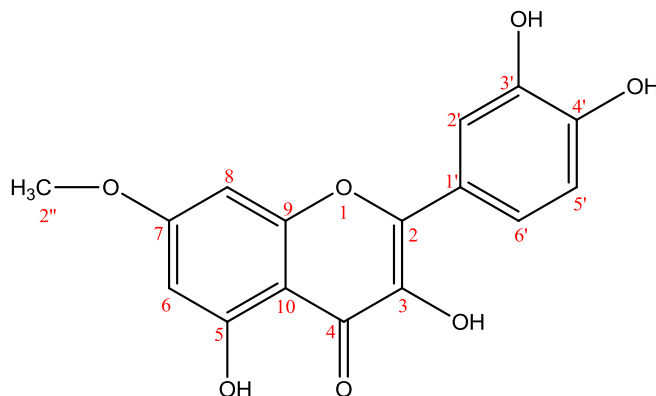
Al realizar el análisis del espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD 100 MHz) del compuesto DMQD5, se evidencia la ausencia del carbono de grupo metoxilo en 59.6 ppm que corresponde al sustituyente del carbono 7, indicando de esta manera la pérdida de este grupo en el carbono 3. Para confirmar

esta posición se realizó el análisis del resto de la molécula. Las señales del anillo A de la molécula no se presentan mayor cambio, lo que confirma que el sustituyente metoxilo permanece en el carbono 7, al analizar las señales correspondientes al anillo C se encuentra que los carbonos sufren un desplazamiento hacia campo alto, confirmando de esta manera la pérdida del sustituyente en la posición 3. El compuesto obtenido corresponde a 7-O-metil Quercetina, Figura 4.19.

Tabla 4.8: Señales de ^{13}C para HCS₃ y DMQD₅

C	DMQ	DMQD ₅
2	155.99	148.8
3	137.89	136.3
4	178.05	176.1
5	160.95	162.4
6	97.73	98.5
7	165.11	165.6
8	92.22	92.5
9	156.28	158.1
10	105.17	104.5
1'	120.70	121.7
2'	115.55	115.5
3'	145.28	146.2
4'	148.86	150.1
5'	115.74	116.2
6'	120.67	121.6
3 O- Metilo	59.67	
7 O- Metilo	56.06	56.0

Figura 4.19: Estructura y señales de ^{13}C para el compuesto DMQD₅

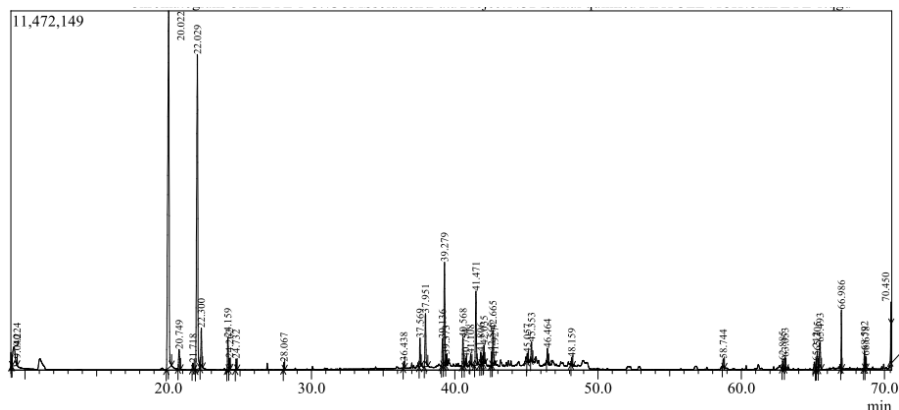


4.4 Determinación de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Croton schiedeanus*

Se tomaron 630 g de hojas frescas y se sometieron a destilación por arrastre con vapor durante 2 horas obteniendo 1 mL de aceite que fue secado sobre sulfato de sodio anhidrido y almacenado a 4°C.

El aceite esencial de las hojas de *Croton schiedeanus* fue analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG-EM. En las condiciones de análisis fue posible la identificación del 88.52 % de los componentes del aceite, dentro de los cuales se encuentra un 62.2 % de monoterpenos y un 26.32 % compuestos sesquiterpenicos. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 4.20.

Figura 4.20: Cromatograma del aceite esencial de las hojas de la especie *Croton schiedeanus*

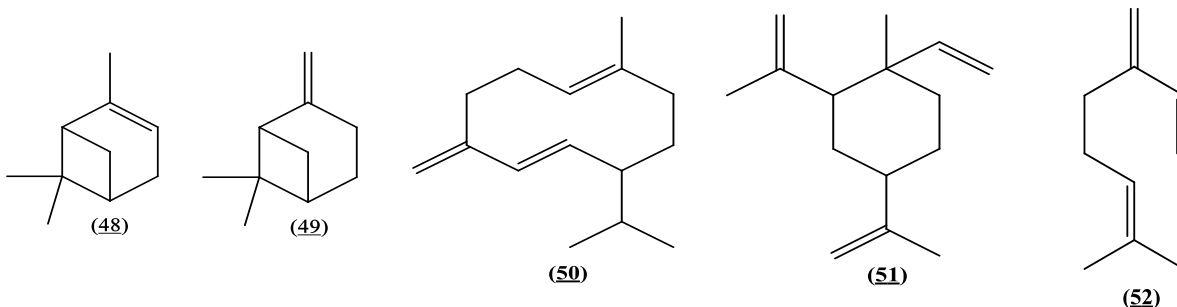


Para determinar la composición relativa del aceite esencial, Tabla 4.9, se calcularon los índices de retención calculados (IR C) y se compararon con los reportados en la literatura (IR T) (Adams, 1995), se tuvo en cuenta el porcentaje de coincidencia de acuerdo al espectro de masas (Anexos) y la librería interna del equipo (NIST 08).

Tabla 4.9: Composición relativa del aceite esencial de las hojas de la especie *Croton schiedeanus*

TR	IR C	IR T	%	Nombre	% Coincidencia EM
20.022	936	939	31.70	α Pineno	97
20.747	952	953	1.30	Canfeno	95
21.718	974	969	0.39	β Felandreno	93
22.029	981	980	23.76	β Pineno	96
22.300	987	991	2.26	β Mirceno	93
24.159	1029	1031	1.59	Limoneno	94
24.262	1031	1032	0.50	α Terpineno	93
24.732	1042	1050	0.47	β Ocimeno	95
28.067	1117		0.28	NI	-
36.438	1379	1351	0.26	α Cubebeno	92
37.569	1389	1384	1.34	α Copaeno	94
37.953	1399	1398	3.28	β Elemeno	93
39.136	1415	1416	1.42	Aristoleno	85
39.279	1417		5.94	NI	-
39.373	1418		0.40	NI	-
40.568	1435	1436	1.54	α Cariofileno	93
40.754	1437	1439	0.38	α Guaieno	
41.108	1442	1440	0.46	Aromadendreno	
41.471	1447	1444	4.18	Germacreno D	90
41.806	1452		0.57	NI	-
41.927	1453		0.50	NI	-
42.035	1455	1455	0.97	α Selineno	92
42.565	1462	1475	0.69	γ Muuroleno	91
42.665	1463	1487	1.94	Cis 1,4 cadinadieno	90
45.057	1496	1576	0.40	Spathulenol	87
45.353	1500		0.94	NI	-
46.464	1515	1514	0.70	β Cadineno	79
48.159	1538	1532	0.36	Epiglobulol	80

De acuerdo a los índices de retención y la comparación con la librería interna del equipo los componentes mayoritarios del aceite esencial son: α Pineno **(48)**, β Pineno **(49)**, Germanceno D **(50)**, β Elemeno **(51)** y Mirceno **(52)**.



Estudios anteriores realizados con especies del género han encontrado que estos aceites se caracterizan por ser de tipo terpenico y que por lo general sus componentes mayoritarios son monoterpenos como el α y β pineno (Santos, et al., 2005), (Sylvestre, et al., 2006) y el sesquiterpeno bisaboleno.

Estos aceites han demostrado diferentes actividades farmacológicas, en el caso de las especies *Croton sonderianus*, *Croton cajucara Benth* y *Croton nepetaefolius* (Santos, et al., 2005), se encontró que tienen un efecto antinociceptivo en ratones; por otro lado, el aceite de *Croton flavens* (Sylvestre, et al., 2006) posee un efecto cito toxico contra células tumorales.

Además se encuentra un estudio acerca del efecto cardiovascular del aceite esencial en ratas normotensas (Siqueira, et al., 2006), en el cual se demostró que los componentes mayoritarios del aceite de las hojas de la especie *Croton zehntneri*, estragol y E- anetol causan un efecto hipotensor en ratas previamente tratadas con medicamentos para aumentar su presión arterial.

5. CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico preliminar mostró diferentes tipos de metabolitos presentes en la especie, principalmente terpenos y flavonoides
- A partir del estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Croton schiedeanus*, se logró el aislamiento de 3 compuestos de tipo flavonoide
- El flavonoide Pachypodol no había sido reportado anteriormente como componente de la especie, sin embargo se tienen reportes de su aislamiento en la especie *Croton ciliatoglanduliferus*.
- Se desarrollaron diferentes reacciones de hemisíntesis (metilación, demetilación y acetilación) que dieron lugar a la formación de 5 compuestos flavonoide: **DMQA1**, **DMQA2**, **AA3**, **AM3** y **DMQD5**.
- Este trabajo presenta el primer reporte acerca de la composición relativa del aceite esencial de *Croton schiedeanus*.
- El perfil cromatográfico del aceite esencial de las hojas de *Croton schiedeanus* es de tipo terpénico, presentando en su mayoría compuestos de tipo sesquiterpénico aunque los componentes mayoritarios son los monoterpenos α Pineno, β Pineno, β Mirceno y los sesquiterpenos Germancreno D y β Elemeno. Este comportamiento está de acuerdo con los obtenidos en otras especies del género.

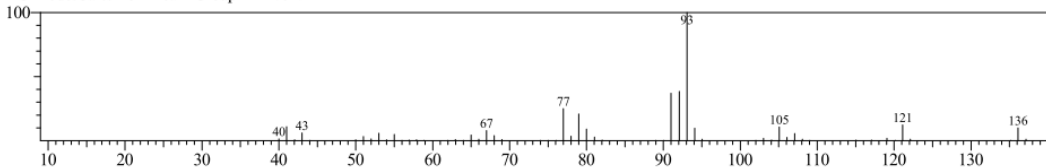
6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio de las fracciones obtenidas del extracto etanólico (éter etílico y residuo) para determinar su composición y la posible presencia de otros compuestos de tipo flavonoide que puedan contribuir con la actividad antihipertensiva presentada por el extracto etanólico.
- Realizar el estudio fitoquímico de otras partes de la planta (tallos, frutos, hojas) y realizar un ensayo antihipertensivo preliminar para comprobar su actividad.
- Realizar los ensayos de actividad antihipertensiva con los derivados flavonoides obtenidos.
- Realizar otras reacciones de hemisíntesis con los flavonoides mayoritarios para seguir aportando al estudio de la relación estructura actividad.

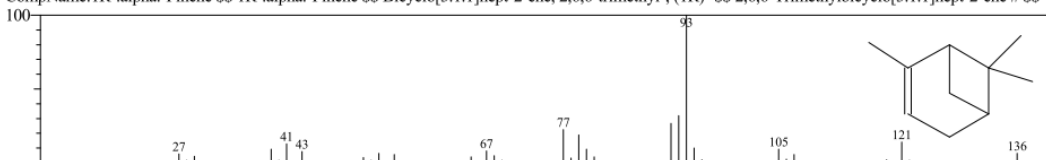
7. ANEXOS

<< Target >>

Line#:3 R.Time:20.020(Scan#:1654) MassPeaks:68
RawMode:Averaged 20.013-20.027(1653-1655) BasePeak:93.05(3165687)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

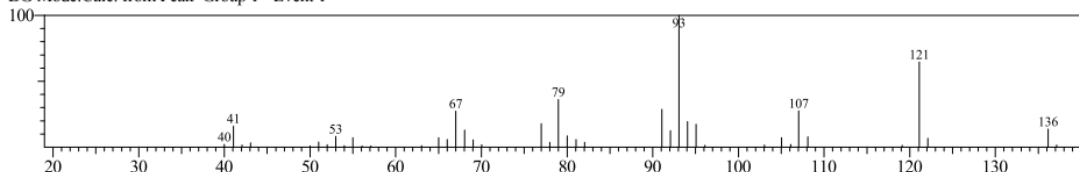


Hit#:1 Entry:9788 Library:NIST08.LIB
SI:97 Formula:C10H16 CAS:7785-70-8 MolWeight:136 RetIndex:948
CompName:1R-.alpha.-Pinene \$\$ 1R-.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-, (1R)- \$\$ 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene # \$\$

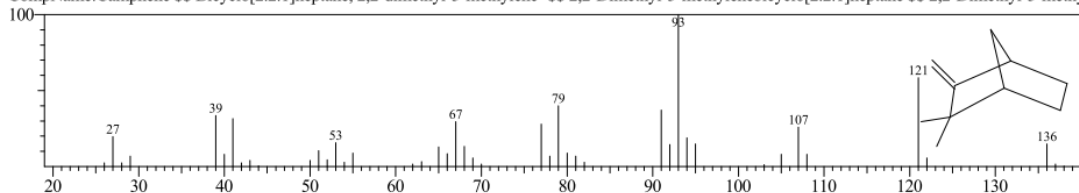


<< Target >>

Line#:4 R.Time:20.747(Scan#:1763) MassPeaks:42
RawMode:Averaged 20.740-20.753(1762-1764) BasePeak:93.05(122030)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

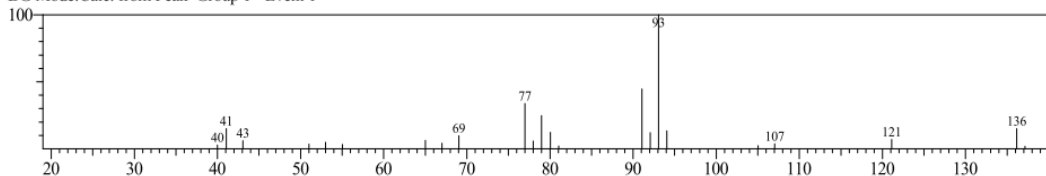


Hit#:1 Entry:9790 Library:NIST08.LIB
SI:95 Formula:C10H16 CAS:79-92-5 MolWeight:136 RetIndex:943
CompName:Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene- \$\$ 2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane \$\$ 2,2-Dimethyl-3-methyl

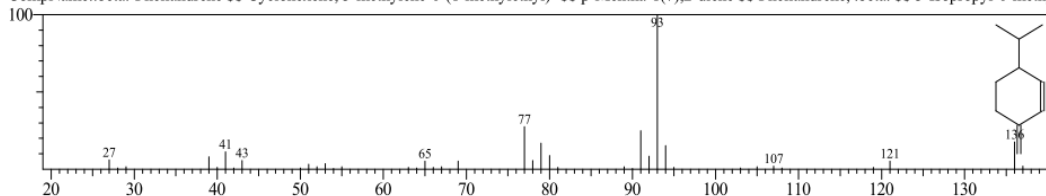


<< Target >>

Line#:5 R.Time:21.720(Scan#:1909) MassPeaks:23
RawMode:Averaged 21.713-21.727(1908-1910) BasePeak:93.05(58449)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

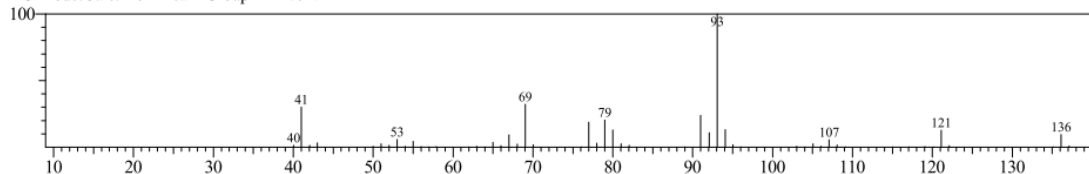


Hit#:3 Entry:9762 Library:NIST08.LIB
SI:93 Formula:C10H16 CAS:555-10-2 MolWeight:136 RetIndex:964
CompName:.beta.-Phellandrene \$\$ Cyclohexene, 3-methylene-6-(1-methylethyl)- \$\$ p-Mentha-1(7),2-diene \$\$ Phellandrene, .beta. \$\$ 3-Isopropyl-6-methyl



<< Target >>

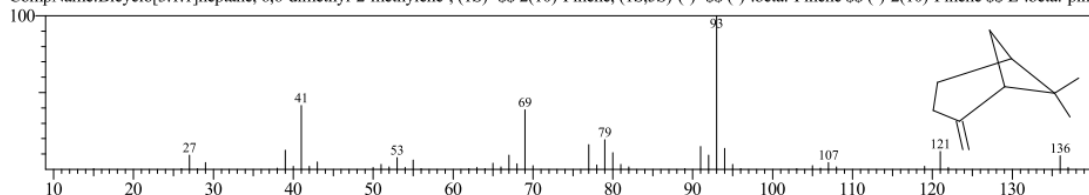
Line#:6 R.Time:22.027(Scan#:1955) MassPeaks:65
 RawMode:Averaged 22.020-22.033(1954-1956) BasePeak:93.05(2809191)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:9747 Library:NIST08.LIB

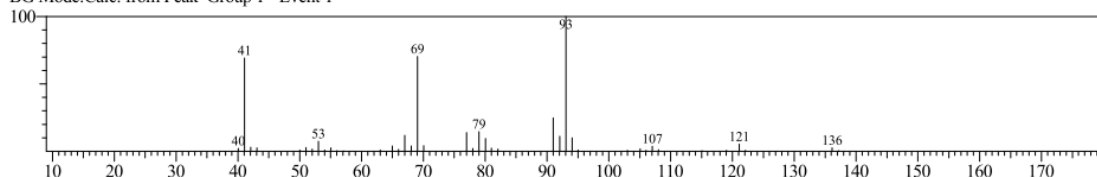
SI:96 Formula:C10H16 CAS:18172-67-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- SS 2(10)-Pinene, (1S,5S)-(-)- SS (-)-beta.-Pinene SS (-)-2(10)-Pinene SS L.-beta.-pinene



<< Target >>

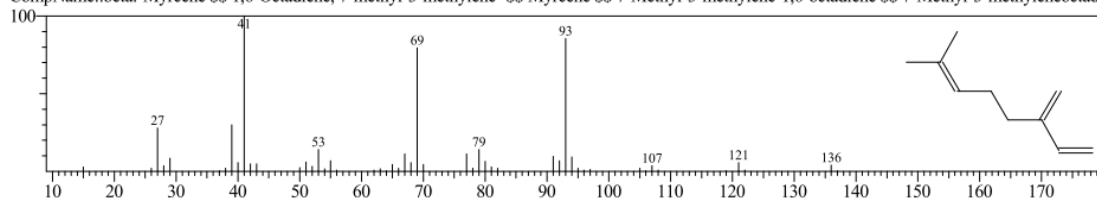
Line#:7 R.Time:22.300(Scan#:1996) MassPeaks:43
 RawMode:Averaged 22.293-22.307(1995-1997) BasePeak:93.05(300844)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:9689 Library:NIST08.LIB

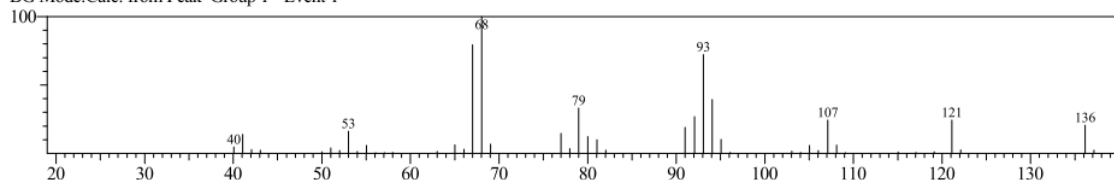
SI:93 Formula:C10H16 CAS:123-35-3 MolWeight:136 RetIndex:958

CompName:.beta.-Myrcene SS 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- SS Myrcene SS 7-Methyl-3-methylene-1,6-octadiene SS 7-Methyl-3-methylenooctadiene



<< Target >>

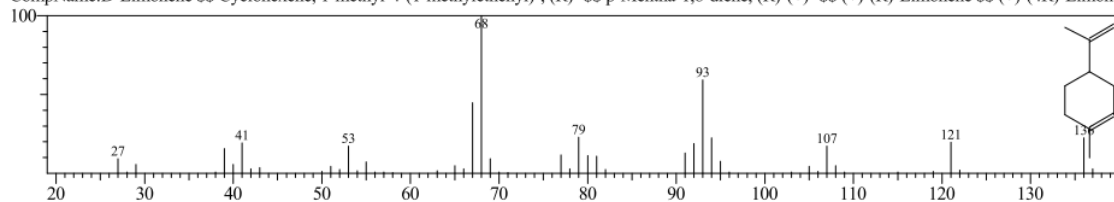
Line#:8 R.Time:24.160(Scan#:2275) MassPeaks:45
 RawMode:Averaged 24.153-24.167(2274-2276) BasePeak:68.05(157234)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:9719 Library:NIST08.LIB

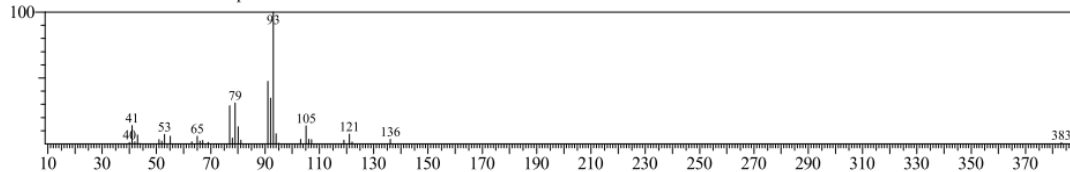
SI:94 Formula:C10H16 CAS:5989-27-5 MolWeight:136 RetIndex:1018

CompName:D-Limonene SS Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)- SS p-Mentha-1,8-diene, (R)-(+)- SS (+)-(R)-Limonene SS (+)-(4R)-Limonene

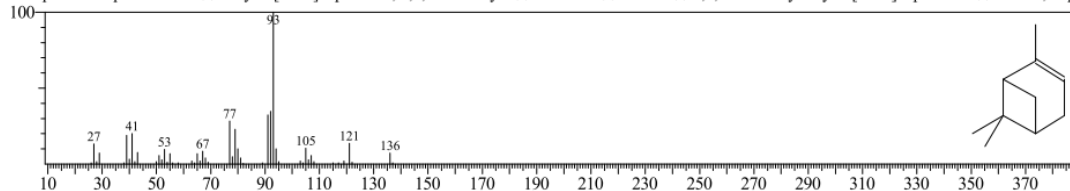


<< Target >>

Line#:9 R.Time:24.260(Scan#:2290) MassPeaks:33
 RawMode:Averaged 24.253-24.267(2289-2291) BasePeak:93.05(73755)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

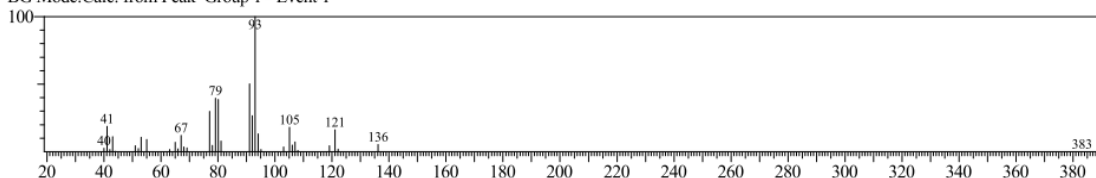


Hit#:1 Entry:9787 Library:NIST08.LIB
 SI:93 Formula:C10H16 CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948
 CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ Pinene \$\$ 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene \$\$ Pinene, .alp

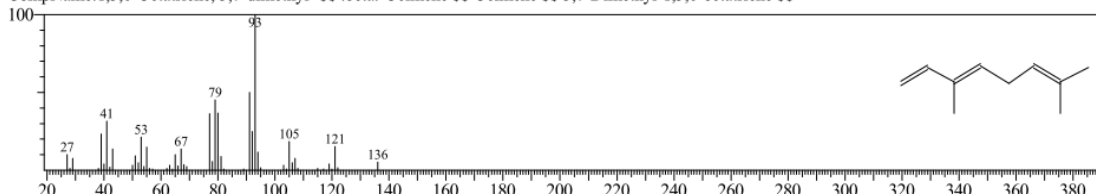


<< Target >>

Line#:10 R.Time:24.733(Scan#:2361) MassPeaks:35
 RawMode:Averaged 24.727-24.740(2360-2362) BasePeak:93.05(71488)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

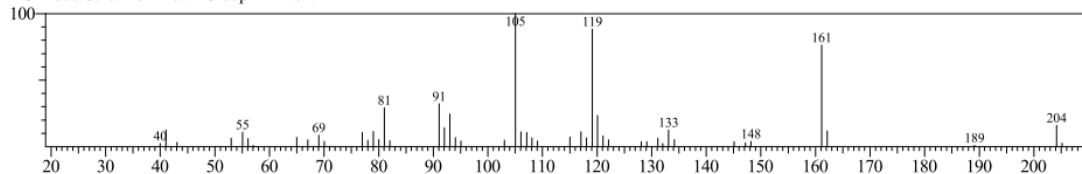


Hit#:1 Entry:9779 Library:NIST08.LIB
 SI:95 Formula:C10H16 CAS:13877-91-3 MolWeight:136 RetIndex:976
 CompName:1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl- \$\$.beta.-Ocimene \$\$ Ocimene \$\$ 3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene \$\$

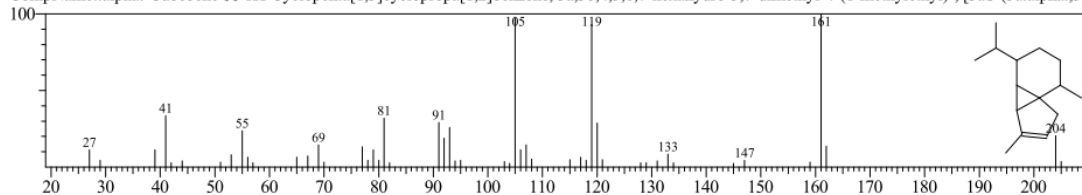


<< Target >>

Line#:12 R.Time:36.440(Scan#:4117) MassPeaks:51
 RawMode:Averaged 36.433-36.447(4116-4118) BasePeak:105.05(29357)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

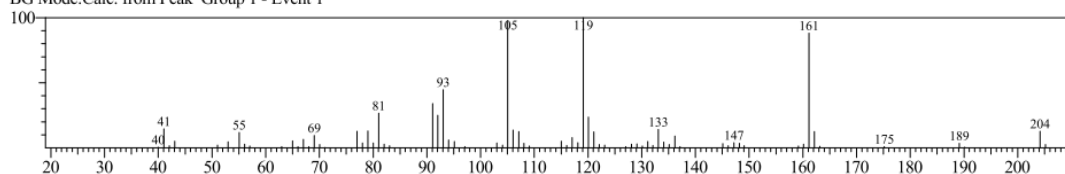


Hit#:1 Entry:45513 Library:NIST08.LIB
 SI:92 Formula:C15H24 CAS:17699-14-8 MolWeight:204 RetIndex:1344
 CompName:.alpha.-Cubebene \$\$ 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, 3a,3b,4,5,6,7-hexahydro-3,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b



<< Target >>

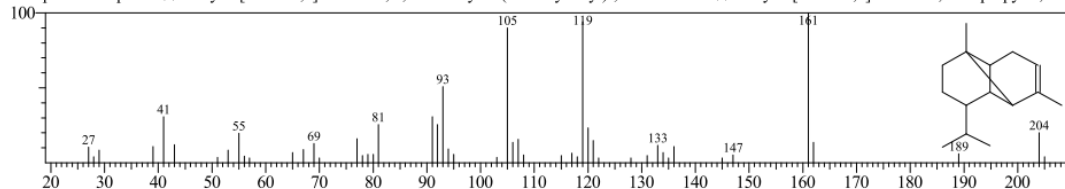
Line#:13 R.Time:37.567(Scan#:4286) MassPeaks:73
 RawMode:Averaged 37.560-37.573(4285-4287) BasePeak:119.10(121306)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:45521 Library:NIST08.LIB

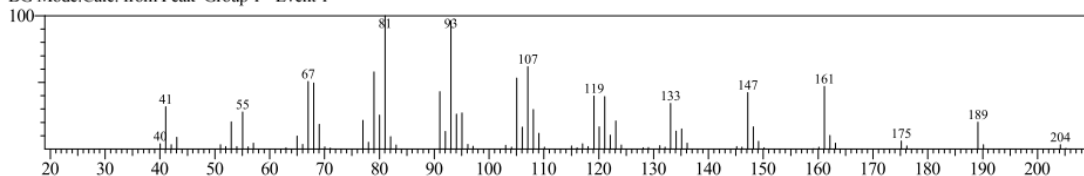
SI:94 Formula:C15H24 CAS:3856-25-5 MolWeight:204 RetIndex:1221

CompName:Copaene \$\$ Tricyclo[4.4.0.02,7]dec-3-ene, 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-, stereoisomer \$\$



<< Target >>

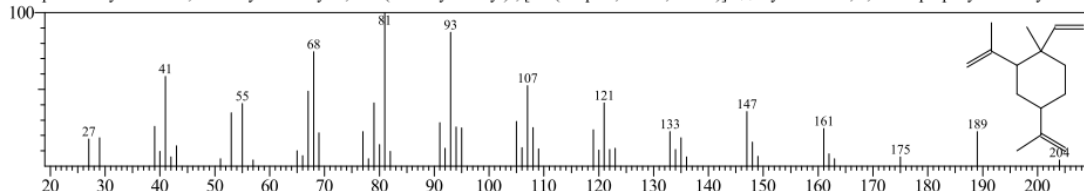
Line#:14 R.Time:37.953(Scan#:4344) MassPeaks:76
 RawMode:Averaged 37.947-37.960(4343-4345) BasePeak:81.05(134950)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:45406 Library:NIST08.LIB

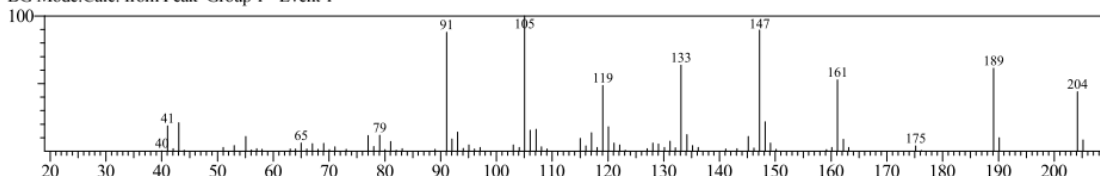
SI:93 Formula:C15H24 CAS:515-13-9 MolWeight:204 RetIndex:1398

CompName:Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]- \$\$



<< Target >>

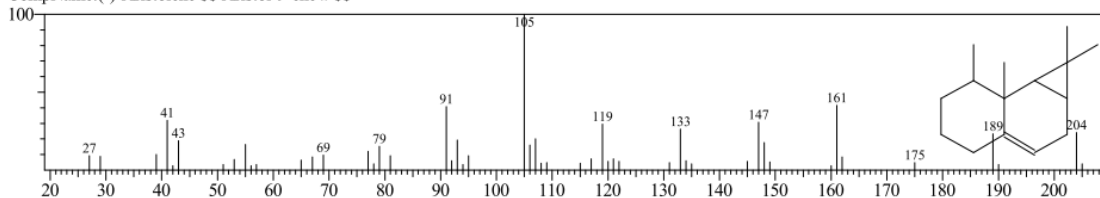
Line#:15 R.Time:39.133(Scan#:4521) MassPeaks:81
 RawMode:Averaged 39.127-39.140(4520-4522) BasePeak:105.05(83238)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:45451 Library:NIST08.LIB

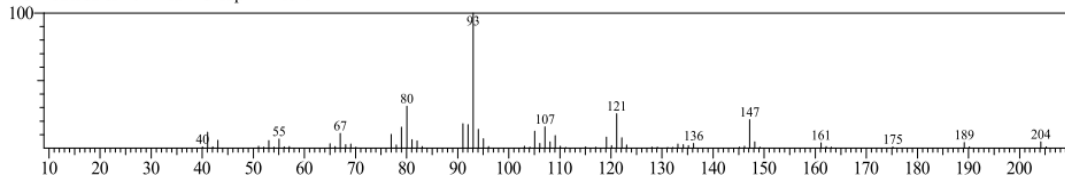
SI:85 Formula:C15H24 CAS:6831-16-9 MolWeight:204 RetIndex:1403

CompName:(-)-Aristolene \$\$ Aristol-9-ene # \$\$



<< Target >>

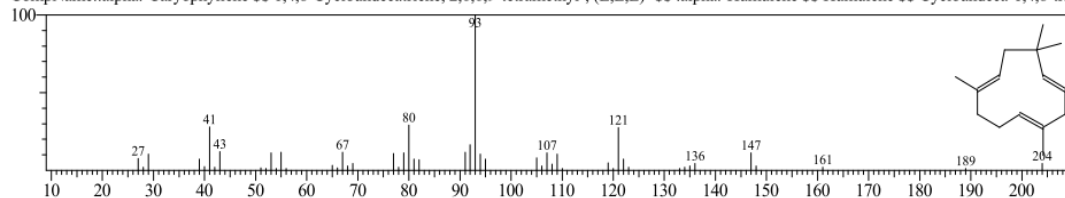
Line#:18 R.Time:40.567(Scan#:4736) MassPeaks:68
 RawMode:Averaged 40.560-40.573(4735-4737) BasePeak:93.05(198287)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:2 Entry:45423 Library:NIST08.LIB

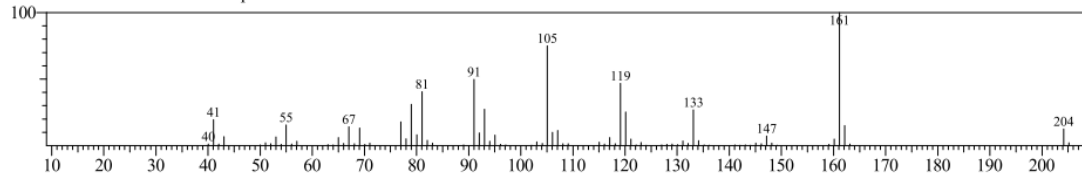
SI:93 Formula:C15H24 CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:1579

CompName:.alpha.-Caryophyllene SS 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- SS .alpha.-Humulene SS Humulene SS Cycloundeca-1,4,8-trie



<< Target >>

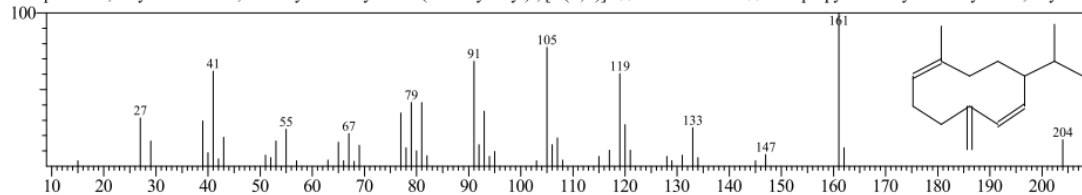
Line#:21 R.Time:41.473(Scan#:4872) MassPeaks:80
 RawMode:Averaged 41.467-41.480(4871-4873) BasePeak:161.15(319235)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:45510 Library:NIST08.LIB

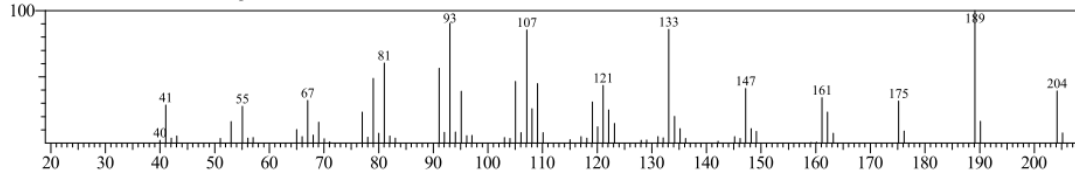
SI:90 Formula:C15H24 CAS:23986-74-5 MolWeight:204 RetIndex:1515

CompName:1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]- SS Germacrene D SS 8-Isopropyl-1-methyl-5-methylene-1,6-cyclodec



<< Target >>

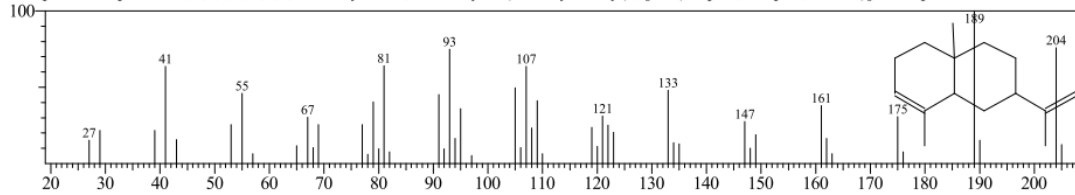
Line#:24 R.Time:42.033(Scan#:4956) MassPeaks:71
 RawMode:Averaged 42.027-42.040(4955-4957) BasePeak:189.15(33845)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:45550 Library:NIST08.LIB

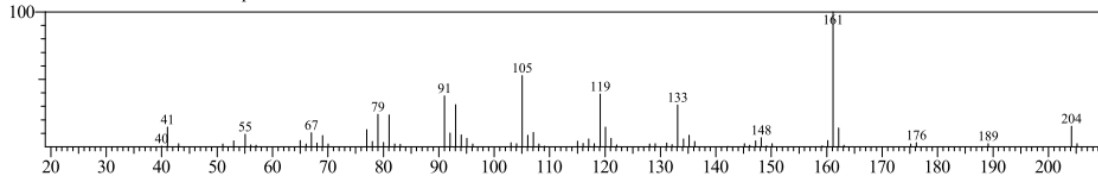
SI:92 Formula:C15H24 CAS:473-13-2 MolWeight:204 RetIndex:1474

CompName:Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]- SS .alpha.-Selinene SS 2-Isopr

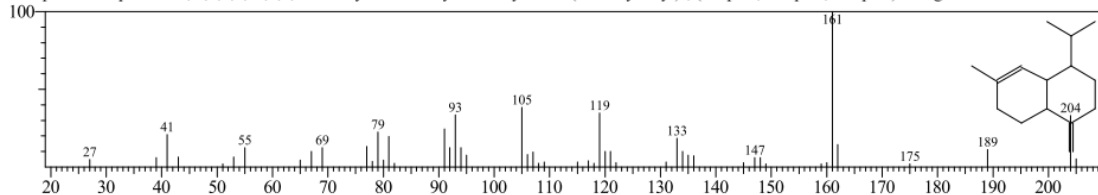


<< Target >>

Line#:25 R.Time:42.567(Scan#:5036) MassPeaks:68
 RawMode:Averaged 42.560-42.573(5035-5037) BasePeak:161.15(49998)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

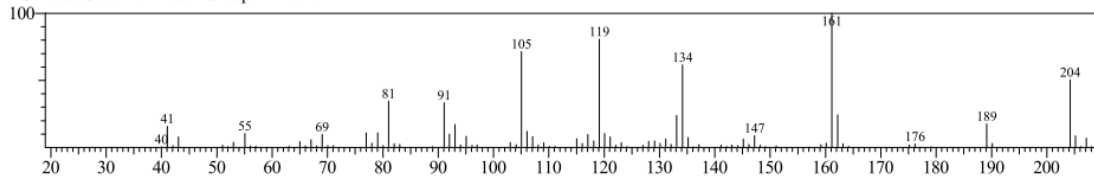


Hit#:1 Entry:45514 Library:NIST08.LIB
 SI:91 Formula:C15H24 CAS:30021-74-0 MolWeight:204 RetIndex:1435
 CompName:Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)- SS .gamma.-Muuroleone SS 1.

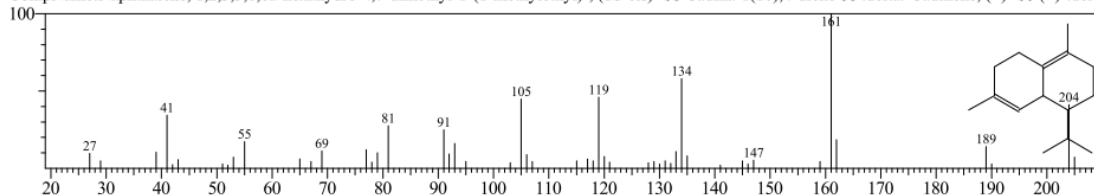


<< Target >>

Line#:26 R.Time:42.667(Scan#:5051) MassPeaks:91
 RawMode:Averaged 42.660-42.673(5050-5052) BasePeak:161.15(118778)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

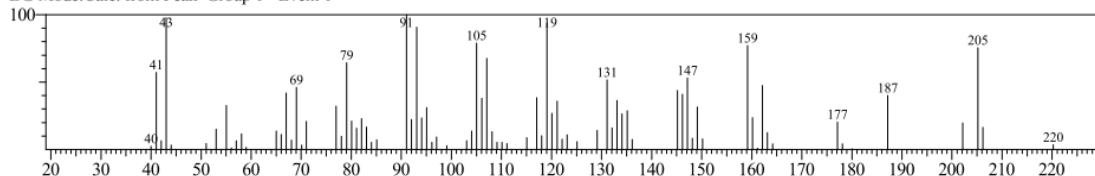


Hit#:1 Entry:45523 Library:NIST08.LIB
 SI:90 Formula:C15H24 CAS:483-76-1 MolWeight:204 RetIndex:1469
 CompName:Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)- SS Cadina-1(10),4-diene SS .delta.-Cadinene, (+)- SS (+)-.delta.

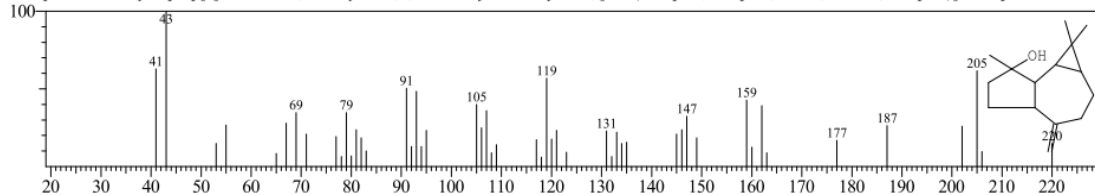


<< Target >>

Line#:27 R.Time:45.060(Scan#:5410) MassPeaks:81
 RawMode:Averaged 45.053-45.067(5409-5411) BasePeak:91.05(9943)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

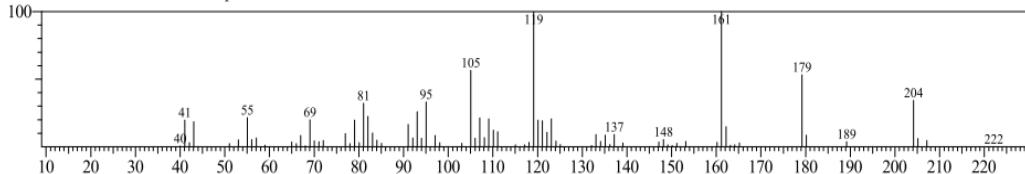


Hit#:1 Entry:55924 Library:NIST08.LIB
 SI:87 Formula:C15H24O CAS:6750-60-3 MolWeight:220 RetIndex:1536
 CompName:1H-Cycloprop[e]azulene-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- SS Spathulenol SS 1.



<< Target >>

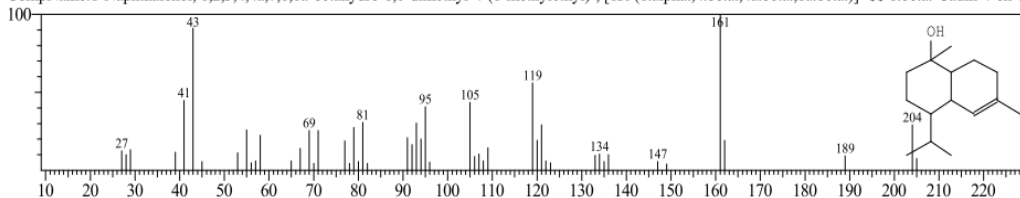
Line#:29 R.Time:46.467(Scan#:5621) MassPeaks:80
RawMode:Averaged 46.460-46.473(5620-5622) BasePeak:161.15(47655)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:3 Entry:57503 Library:NIST08.LIB

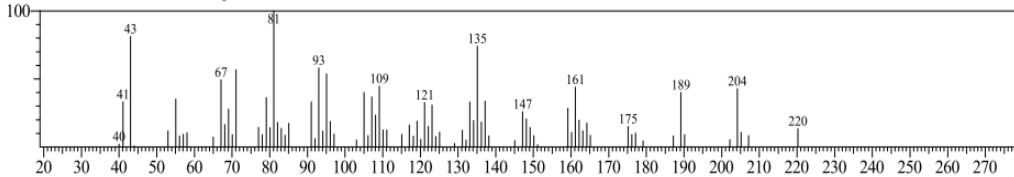
SI:79 Formula:C15H26O CAS:19435-97-3 MolWeight:222 RetIndex:1580

CompName:1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha.,4.beta.,4a.beta.,8a.beta.)]-SS 1.beta.-Cadin-4-en-10



<< Target >>

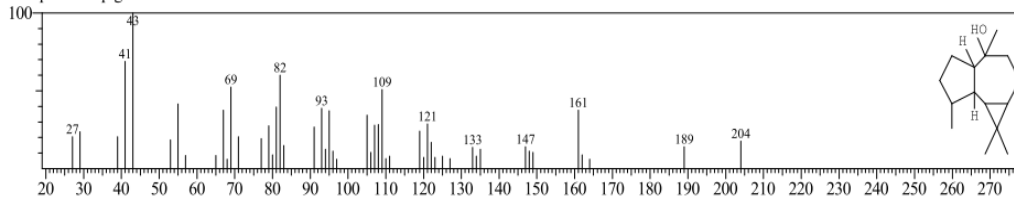
Line#:30 R.Time:48.160(Scan#:5875) MassPeaks:83
RawMode:Averaged 48.153-48.167(5874-5876) BasePeak:81.05(13618)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:5 Entry:57434 Library:NIST08.LIB

SI:80 Formula:C15H26O CAS:0-00-0 MolWeight:222 RetIndex:1530

CompName:Epiglobulol



8. BIBLIOGRAFÍA

- (UNNE), F., Guía de consultas diversidad vegetal, <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Rosideas/Eurosidess%20l/2-Subclado%2ode%2ola%20Celastrales,%20Malpighiales%20y%20Oxalidales/2-Malpighiales/2-Euphorbiaceae.pdf> (Consultado el 03-08-2011)
- Aboagy, F. A., Sam, G. M., Massiot, G. and Lavaud, C. (2000). "Julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton membranaceus*", *Fitoterapia*, **71**, 461-462
- Adams, R. (1995). *Identification of essential oil components by Gas chromatography/ Mass spectroscopy*, Carol Stream, Illinois, Allured Publishing Corporation. (46-451)
- Amaral, A. C. F. and Barnes, R. A. (1998). "A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*", *Phytochemistry*, **47**, (7), 1445-1447
- Andersen, O., Jordheim, M., Bymukama, R., Mbabazi, A., Ogweng, G., Skaar, I. and Kireme, B. (2010). "Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Sydnadenium grantii* (Euphorbiaceae)", *Phytochemistry*, **71**, (1558-1563),
- Awanchiri, S., Dufat, H. T.-V., Shirri, J. C. and Dongfack, M. (2009). "Triterpenoids with antimicrobial activity from *Drypetes inaequalis*", *Phytochemistry*, **70**, 419-423
- Baloch, I. B. and Baloch, M. K. (2011). "Isolation and characterization of ingenol esters from *Euphorbia cornigera*", *Chinese Chemical Letters*, **22**, 451-454
- Barriga, H. G. (1992). *Flora medicinal de Colombia*. Tomo II, Bogotá, Tercer Mundo (537)
- Bayoumi, S., Rowan, M., Blagbrough, I. and Beeching, J. (2008). "Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z- isomerisation stage", *Phytochemistry*, **69**, 2928-2936
- Belmonte, J. and García-Ortega, M. P., Euphorbiaceae, descripción y distribución en España, <http://lap.uab.cat/aerobiologia/general/pdf/altres/euphor.pdf> (Consultado el 30 de Noviembre de 2011)
- Bettolo, R. M. and Scarpati, L. (1979). "Alkaloids from *Croton draconoides*", *Phytochemistry*, **18**, 520
- Bilbao, M. R. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar*, Armenia, Universidad del Quindío.
- Braca, A., Leo, M. D., Mendez, J. and Morelli, I. (2004). "Constituents of *Conceveiba guianensis* (Euphorbiaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 225-228
- Bülöw, N. and König, W. A. (2000). "The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements.", *Phytochemistry*, **55**, 141-168
- C-SUR, Proyecto de dinamización de la carretera general del sur <http://www.caucesur.com/descargar/Caucesur1.pdf> (Consultado el 25 de Noviembre 2011)
- Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., Román, L. S. and Pabón, M. F. G. (2010). "Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats", *Colombia Médica*, **41**, (1), 10-16
- Correa-Hernández, S. X., Puebla-Ibáñez, P., Calle, R. C. d. I., Martín-Calvo, M. L., Barrio, L. S. R. d. and Pabón, M. F. G. (2008). "Perfil vasodilatador de compuestos flavonoides y fenilbutanoides aislados de *Croton schiedeianus* SCHLECHT", *Revista de la Facultad de Medicina*, **56**, (4), 291-301
- Crews, P., Rodríguez, J. and Jaspars, M. (1998). *Organic structure analysis*, Oxford University Press. (59-176)
- Das, B. and Das, R. (1995). "Gossypifan, a lignan from *Jatropha gossypifolia*", *Phytochemistry*, **40**, (3), 931-932
- Das, B. and G, A. (1999). "Gosypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*", *Phytochemistry*, **51**, 115-117

- Feliciano, A. S., Pérez, A. L. and Fernández, E. d. O. (2008). Manual de determinación estructural de compuestos naturales, Bogotá, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED) y Organización del Convenio Andres Bello. (369-397)
- Ferreira, A., Carvalho, L., Carvalho, M., Sequeira, M. and Silva, A. (2002). "Jatrophane and lathyrane diterpenoids from *Euphorbia hyberna* L.", *Phytochemistry*, **61**, 373-377
- García, H. (1992). *Flora Medicinal de Colombia Tomo I*,
- García, L. d., Guarín, D. L. and Tobar, M. C. (1986). "Obtención de ayanina de las hojas de *Croton glabellus*", *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **15**, 95-98
- GBIF, Global Biodiversity Information Facility, <http://data.gbif.org/species/3060306/> (Consultado el 03 de Agosto de 2011)
- GBIF, Global Biodiversity Information Facility <http://data.gbif.org/species/4691/> (Consultado el 03 de Agosto de 2011)
- Grosso, G. S., La familia euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios,
http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/euforbiaceae.pdf
(Consultado el 04-08-2011)
- Grosso, G. S., La familia euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios,
http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/productos_naturales/euforbiaceae.pdf
(Consultado el 3 de Agosto de 2011)
- Guerrero, M. F., Carron, R., Martín, M. L., Roman, L. S. and Reguero, M. T. (2001). "Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, **75**, 33-36
- Guerrero, M. F., P. Puebla, Carron, R., Martín, M. L. and Roman, L. S. (2002). "Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **54**, (10), 1373-1378
- Günther, H. (1994). *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry*, Chichester, John Wiley and sons. (29-52)
- Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*, Londres, Chapman and Hall.
- Hermoso, A., Jiménez, I., Mamani, Z., Bazzocchi, I., Piñero, J., Ravelo, A. and Valladares, B. (2003). "Antileishmanial activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic compounds. Structural requirements for activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**, (18), 3975- 3980
- Hohmann, J. and Molnár, J. (2004). "Euphorbiaceae diterpenes: ¿plant toxins or promising molecules for the therapy?", *Acta Pharmaceutica Hungarica*, **74**, (3), 149-157
- Joulain, D. and König, W. A. (1998). *The atlas of spectra data of sesquiterpene hydrocarbons*, Hamburgo, Druckerei Rosch, ScheBlitz. (151)
- King, F. E., King, T. J. and Sellars, K. (1952). "The chemistry of extractives from hardwoods. Part V. The isolation of 3:7:4'-trimethylquercetin (Ayanin) from the heartwood of *Distemonanthus benthamianus*", *Journal of Chemical Society*, 92-95
- Kirby, J., Nishimoto, M., Park, G. and Withers, S. (2010). "Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*", *Phytochemistry*, **71**, 1466-1473
- Lopes, M. I., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J. A. P. and Salvador, M. (2004). "Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems", *Journal of Ethnopharmacology*, **95**, 437-445
- Martinez, J., Pérez, C., Jiménez, C. and Ravelo, Á. (2008). Manual de determinación estructural de compuestos naturales, Bogotá, Quebecor World. (415-486)
- Martinsen, A., Baccelli, C., Navarro, I., Abad, A., Quentin-Leclercq, J. and Morel, N. (2010). "Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane", *Vascular pharmacology*, **52**, 63-69
- Minh, P. T. H., Ngoc, P. H., Taylor, W. and Cuong, N. M. (2004). "A new ent- kaurane diterpenoid from *Croton Tonkinensis* leaves", *Fitoterapia*, **75**, 552-556
- Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipisky, T. and Hrdina, R. (2010). "Cardiovascular effects of flavonoids are not caused by direct antioxidant activity", *Free Radical Biology & Medicine*, **49**, 963-975

- Murillo, J. (1999). "Composición y distribución del género *Croton* (Euphorbiaceae) en Colombia, con cuatro especies nuevas", *Caldasia*, **21**, (2), 141-166
- Murillo, J. (2000). "Las Euphorbiaceae de Colombia", *Biota Colombiana*, **5**, (2), 200-218
- Nardi, G. M., DalBo, S., Monached, F. D., Pizzolatti, M. G. and Ribeiro-do-Valle, R. M. (2006). "Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae)", *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 73-78
- Nardi, G. M., Junior, J. M. S., Monache, F. D., Pizzolatti, M. G., Ckless, K. and Ribeiro-do-Valle, R. M. (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Baillon on carrageenan-induced pleurisy in rats", *Phytomedicine*, **14**, 115-122
- Okokon, J. E. and Nwafor, P. A. (2009). "Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*", *Journal of Ethnopharmacology*, **121**, 74-78
- Okuda, T., Yoshida, T., Koike, S. and toh, N. (1975). "New diterpene esters from *Alurites fordii* fruits", *Phytochemistry*, **14**, 509-515
- OMS, O. M. D. L. S.-Enfermedades Cardiovasculares, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html> (Consultado el
- Peres, M. T. L. P., Monache, F. D., Cruz, A. B., Pizzolatti, M. G. and Yunes, R. A. (1997). "Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton uruncara* Baillon (Euphorbiaceae)", *Journal of Ethnopharmacology*, **56**, 223-226
- Pinho-da-Silva, L., P.V.Mendes-Maia, T.M.doNascimentoGarcia, J.S.Cruz, S.M.deMorais, Coelho-de-Souza, A. N., S.Lahlou and J.H.Leal-Cardoso (2010). "*Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle", *Phytomedicine*, **17**, 721-725
- Puebla, P., Guerrero, M. F. and Correa, S. X. (2004). "Flavonoides del género *Croton*", *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **33**, 77-85
- Puebla, P., Lopeza, J. L., Guerrero, M., Carron, R., Martín, M. L., Roman, L. S. and Feliciano, A. S. (2003). "Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeianus*", *Phytochemistry*, **62**, 551-555
- Rao, K. and Owoyale, J. (1976). "Partial Methylation of Quercetin: Direct synthesis of tamarixetin, ombuin and ayanin", *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **13**, (6), 1293- 1295
- Reich, H. J., 5.3 Spin-Spin Splitting: J-Coupling, <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-03-jcoupl.htm> (Consultado el 24 de Julio de 2013)
- Robert, S., Baccelli, C., Devel, P., Dogné, J.-M. and Quentin-Leclercq, J. (2010). "Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis", *Journal of Ethnopharmacology*, **128**, 641-648
- Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Vilaivan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth, C. and Phuthong, S. (2001). "Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*", *Phytochemistry*, **56**, 103-107
- Sanabria, G. A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y aplicación.*, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
- Santos, F. A., Jeferson, F. A., Santos, C. C., Silveira, E. R. and Rao, V. S. N. (2005). "Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice", *Life Sciences*, **77**, 2953-2963
- Satyanarayana, P., Kumar, K., Singh, S. and Rao, G. (2001). "A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*", *Fitoterapia*, **72**, 304-306
- Shenoy, C., Kumar, R., Patil, S. and Patil, M. (2009). "Preliminary phytochemical investigation and wound healing activity of *Allium cepa* Linn (Liliaceae)", *International journal of pharmacaetical sciences* **2**, 167-1175
- Siqueira, R. J. B. d., Magalhaes, P. J. C., Leal-Cardoso, J. H., Duarte, G. P. and Lahlou, S. (2006). "Cardiovascular effects of the essential oil from *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats", *Life Sciences*, **78**, 2365-2232
- Steinmann, V. W. (2002). "Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México", *Acta Botánica Mexicana*, **61**, 61-93
- Sutthivaiyakit, S., Nakorn, N. N., Kraus, W. and Sutthivaiyakit, P. (2003). "A novel 29-nor-3,4-seco-friedelane triterpene and a new guaiane sesquiterpene from the roots of *Phyllanthus oxyphyllus*", *Tetrahedron*, **59**, (9991-9995),
- Sutthivaiyakit, S., Unganont, S., Sutthivaiyakit, P. and Suksamrarn, A. (2002). "Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*", *Tetrahedron*, **58**, 3619-3622

- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagaub, F. and Legault, J. (2006). "Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe", Journal of Ethnopharmacology, **103**, 99-102
- Tane, P., Tatsimo, S. and Connolly, J. (2004). "Crotomacrine, a new clerodane diterpene from the fruits of *Croton macrostachyus* ", Tetrahedron, **45**, 6997-6998
- Tchinda, A., Tsopmo, A., Tene, M., Kamnaing, P., Ngnokam, D., Tane, P., Ayafor, J., Connolly, J. and Farrugia, L. (2003). "Diterpenoids from *Neoboutonia glabrescens* (Euphorbiaceae)", Phytochemistry, **64**, 575-581
- Uyehara, T., Suzuki, I. and Yamamoto, Y. (1988). "Stereospecific synthesis of 3- oxo- a- bourbonene and cisoid isomer for structural determination of the toxic component of *Lansium domesticum*", The Chemical Society of Japan, **61**, (7), 2672-2674
- Vázquez, R. G.-., Díaz, B. K., Aguilar, M. I., Diego, N. and Lotina-Hennsen, B. (2006). "Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water- splitting enzyme inhibitor on thylakoids", Journal of Agricultural and food chemistry, **54**, 1217-1221
- Villalobos, M. J. P. and Castellanos, E. C. (1992). "La familia euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica ", Grasas y aceites, **43**, (1), 39-44
- Yuan, W. and Zhong-Mei, Z. (2008). "Sesquiterpenes from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. tomentosus Hook.", Chinese Journal of Natural Medicines, **6**, (5), 339-341