



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Trabajo de Titulación

Caracterización química de metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Croton rivinifolius* Kunth y evaluar su actividad biológica.

Autora: Armijos Duarte, María Dolores

Director: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir.

LOJA – ECUADOR
2020



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

2020

Aprobación del director del trabajo de titulación

Loja, 13 de mayo de 2019

Mgtr.

Claudia Teresa Cruz Erazo

Coordinadora de Titulación

Ciudad.-

De mi consideración:

El presente Trabajo de Titulación denominado: Caracterización química de metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Croton rivinifolius* Kunth y evaluar su actividad biológica realizado por Armijos Duarte María Dolores, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma:

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín.

C.I:

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, María Dolores Armijos Duarte, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor(a) del Trabajo de Titulación denominado: Caracterización química de metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Croton rivinifolis* Kunth y evaluar su actividad biológica, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico, Capítulo 2. Materiales y Métodos, Capítulo 3. Resultados y Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo PhD. Segundo Vladimir Morocho Zaragocín, director del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTP, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autora: María Dolores Armijos Duarte

C.I.: 1104121189

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios por ser el que me da las fuerzas y la sabiduría para poder realizar todas mis metas y no decaer ante las adversidades que se me puedan presentar.

Muy especialmente a mis padres Patricio Armijos (+) y Mireya Duarte y a mis abuelitos Segundo Duarte (+) y Dolores Cabrera por siempre creer en mí, por todo su cariño y apoyo brindado especialmente en los momentos difíciles, porque sin ellos nunca lo hubiese podido lograr, ya que son el pilar fundamental en mi vida.

A mi esposo Juan José y a mi pequeño José Andrés por ser mi motivación día con día para salir adelante y nunca desfallecer.

Finalmente, se la dedico a mis demás familiares y amigos por siempre estar presentes en cada etapa de crecimiento personal y profesional.

María Dolores Armijos Duarte

Agradecimiento

Quiero agradecer primeramente a Dios por ser mi guía en todo este largo caminar, por darme siempre la fortaleza para seguir adelante y cumplir todo lo que me propongo. A mi familia por siempre tener una palabra de aliento y por su compañía durante todo momento.

Muy agradecida con todo el personal docente de la Titulación de Bioquímica y Farmacia por los conocimientos impartidos durante toda mi carrera universitaria. En especial a mi tutor de tesis PhD. Vladimir Morocho por la orientación, paciencia y tiempo brindado para la realización del presente trabajo de investigación.

María Dolores Armijos Duarte

Índice de contenidos

Aprobación del director del trabajo de titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenidos	VII
Índice de figuras.....	IX
Índice de tablas	X
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Capítulo uno.....	5
Marco teórico	5
1.1 Medicina tradicional o alternativa	5
1.2 Plantas medicinales	6
1.3 Biodiversidad en Ecuador.....	7
1.4 Familia Euphorbiaceae	8
1.5 Género <i>Croton</i>	8
1.5.1 <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	9
1.5.2 Descripción botánica de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	9
1.6 Metabolitos secundarios	9
1.6.1 Terpenoides	11
1.6.2 Compuestos fenólicos.....	12
1.6.3 Flavonoides	12
1.6.4 Alcaloides	13
1.7 Métodos de separación e identificación	14
1.7.1 Cromatografía	15
1.7.1.1 Cromatografía en columna	16
1.7.1.2 Cromatografía en capa fina	17
1.8 Técnicas espectroscópicas.....	18
1.8.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).	18
1.8.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	19
1.9 Actividad biológica	20
1.9.1 Actividad antimicrobiana	20
1.9.2 Microorganismos	21
1.9.2.1 Bacterias grampositivas.....	21
1.9.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.9.2.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	22
1.9.2.1.3 <i>Micrococcus luteus</i>	23
1.9.2.2 Bacterias gramnegativas	23
1.9.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	23
1.9.2.3 Levaduras	24
1.9.2.3.1 <i>Cándida albicans</i>	24
Capítulo dos.....	26
Materiales y métodos.....	26
2.1 Recolección del material vegetal.....	26
2.2 Secado del material vegetal	27
2.3 Obtención del extracto total de metanol.....	27
2.4 Desclorofilación del extracto metanólico	27
2.5 Cromatografía en capa fina	28
2.6 Fraccionamiento del extracto metanólico.....	28
2.7 Test para detección de flavonoides o Test de Shinoda	29
2.8 Extracción de flavonoides.....	30

2.9	Fraccionamiento de la fracción de partición de acetato de etilo.....	30
	Capítulo tres.....	32
	Resultados y discusión.....	32
3.1	Peso y rendimiento del extracto metanólico obtenido de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	32
3.2	Peso y rendimiento del extracto metanólico desclorofilado obtenido de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	32
3.3	Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	32
3.4	Resultados obtenidos en el test de Shinoda.....	34
3.5	Ensayos realizados en <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	35
3.6	Metabolitos aislados en algunas especies del género <i>Croton</i>	35
	Conclusiones.....	42
	Recomendaciones	43
	Referencias	44

Índice de figuras

Figura 1 <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	9
Figura 2 Cromatografía en columna.....	16
Figura 3 Cromatografía en capa fina.....	18
Figura 4 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	19
Figura 5 Resonancia Magnética Nuclear	20
Figura 6 Imagen microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figura 7 Imagen microscópica de <i>Enterococcus faecalis</i>	22
Figura 8 Imagen microscópica de <i>Micrococcus luteus</i>	23
Figura 9 Imagen microscópica de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 10 Imagen microscópica de <i>Cándida albicans</i>	25
Figura 11 Esquema de la metodología empleada en el aislamiento y caracterización química de metabolitos secundarios de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth.....	26
Figura 12 <i>Proceso para la obtención del extracto metanólico total</i>	27
Figura 13 Proceso de desclorofilación del extracto metanólico.....	28
Figura 14 Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas del extracto metanólico.	29
Figura 15 Bipartición líquido - líquido	30
Figura 16 Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la fracción de partición de acetato de etilo.....	31
Figura 17 Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth (Polaridad 8:1:1 Acetato:Metanol:Agua).....	32
Figura 18 Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth (Polaridad 6:4 Agua:Metanol).....	33
Figura 19 Test de Shinoda positivo	34
Figura 20 Estructura química del Tilirósido	36
Figura 21 Estructura química del β -sitosterol.....	37
Figura 22 Estructura química del Estigmasterol	39
Figura 23 Estructura química del Vomifoliol o Blumenol A.....	39
Figura 24 Estructura química de la Quercitrina.....	41

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación botánica de la especie <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	9
Tabla 2 Clasificación de los terpenos.	11
Tabla 3 Visión general de las técnicas analíticas utilizadas en fitoquímica.....	14
Tabla 4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico.	29
Tabla 5 Rendimiento del extracto metanólico total de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	32
Tabla 6 Rendimiento del extracto desclorofilado de <i>Croton rivinifolius</i> Kunth	32

Resumen

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio fitoquímico de la especie *Croton rivinifolius* Kunth perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la misma que fue recolectada en el cantón Celica, provincia de Loja.

A través de la obtención del extracto metanólico total como del extracto desclorofilado se determinó que el rendimiento fue óptimo, sin embargo, se dificultó el aislamiento de metabolitos secundarios. Adicionalmente, se pretende poner de manifiesto el gran arsenal químico que comprende el género *Croton*, esta información se ha podido validar a través de la revisión de los diferentes reportes bibliográficos, indicando que este género posee metabolitos secundarios de gran interés además de una variedad de actividades biológicas.

Palabras claves: Euphorbiaceae, *Croton*, metabolitos.

Abstract

In the present research work, the phytochemical study of the *Croton rivinifolius* Kunth species belonging to the Euphorbiaceae family was carried out, the same that was collected in the Celica canton, Loja province.

Through obtaining the total methanolic extract as well as the dechlorophilic extract, it was determined that the yield was optimal, however, the isolation of secondary metabolites was difficult. Additionally, it is intended to show the great chemical arsenal that comprises the genus *Croton*, this information has been validated through the review of the different bibliographic reports, indicating that this genus has secondary metabolites of great interest in addition to a variety of activities biological.

Keywords: Euphorbiaceae, *Croton*, metabolites.

Introducción

El sentido de conservación ha inducido a la especie humana a atesorar la salud y recobrarla cuando la pierde. Es por eso, que desde la antigüedad en su hábitat natural ha buscado todo cuanto le sirva para aliviar o curar sus males o dolencias (Avello & Cisternas, 2010).

Durante miles de años se ha evocado el valor terapéutico de la fitoterapia en todos los continentes; es así que los chinos fueron las primeras personas en usar el aloe con fines curativos hace cinco mil años. Los egipcios detallaron las propiedades del cáñamo, el opio, la cicuta. Y así se podría nombrar un sinnúmero de eventos en los cuales la fitoterapia ha jugado un papel protagónico a lo largo de la historia para el alivio de patologías (Fundación Chemonics Colombia, 2003).

La utilización de plantas medicinales es una práctica tradicional llevada a cabo hasta la actualidad, aproximadamente el 80% de la población mundial usa tratamientos basados en plantas medicinales, cabe mencionar que este tipo de terapia es principalmente ejercida por los países en desarrollo al poseer algunos de ellos disminuida capacidad económica (Ramírez et al., 2018).

El Ecuador cuenta con una rica diversidad de especies vegetales, su uso se ha relacionado directamente a los hábitos o tradiciones culturales propias de cada región, las cuales inicialmente fueron ejercidas de manera empírica y más tarde de manera más fundamentada y racional al conocer sus cualidades terapéuticas (CARRERO & Dávila, 2018). Esta práctica ancestral forma parte de un valioso legado cultural que es transmitido de generación en generación, de manera particular en las zonas rurales de nuestro país, en donde su aplicación ha asistido significativamente a la población (Ordóñez & Reinoso, 2015).

La familia Euphorbiaceae es una de las más extensas y variadas de las Angiospermas, ya que contienen aproximadamente 8000 especies en 300 géneros. Encierra especies predominantemente tropicales, pero también ampliamente repartidas en regiones

templadas. Los géneros más característicos son: *Euphorbia* (1000 especies), *Crotón* (500-600 especies) y *Phyllanthus* (400 especies) (Villalobos & Castellanos, 2010).

El género *Croton*, ostenta una gran variedad química, brindando un arsenal de compuestos entre los que se destaca la existencia de diterpenos de tipo labdano, ciclitoles, triterpenos, esteroides, sustancias fenólicas y flavonoides, los cuales, se caracterizan por tener varias actividades biológicas, lo que fomenta la investigación de nuevas sustancias bioactivas (Barrera, Gómez, & Castiblanco, 2016).

Las investigaciones de *Croton* a nivel farmacológico procedentes de usos etnobotánicos recalcan su potencial actividad como vasorrelajante, antiviral y antihipertensivo. Según la medicina tradicional diversas especies a partir de medicamentos vegetales crudos (hierbas) y las preparaciones galénicas (extractos, tinturas, etc.) derivados de ellos, son aplicados como agentes cicatrizantes y antimicrobianos, lo que nos induce a continuar con la investigación de especies del género con la finalidad de acrecentar el número de agentes terapéuticos que posean una potencial actividad frente a patologías microbianas y afines (Barrera et al., 2016).

Debido a que el género *Croton* se caracteriza por poseer un amplio rango de usos a nivel terapéutico, se ejecutó el presente trabajo de titulación el cual tiene como objetivo el aislamiento y caracterización química de metabolitos secundarios del extracto metanólico de la especie *Croton rivinifolius* Kunth y evaluar la actividad biológica de los metabolitos aislados.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 Medicina tradicional o alternativa

Desde tiempos remotos el hombre ha intentado atenuar sus dolencias y extender su vida. Esta situación se ha podido observar desde que existen registros históricos de lo sucedido de civilización en civilización, hasta la actualidad. Sin embargo, en pleno siglo XXI el hombre no ha logrado escaparse de la muerte ateniéndose a paliar síntomas de patologías e impedir el avance de otras (Avello y Cisternas, 2010).

En tiempos en que el hombre sólo contaba con los recursos que el planeta le ofrecía, buscó en éstos las herramientas o instrumentos para reducir el dolor físico e impedir la muerte. Dentro de los recursos que mayor provecho tuvieron dentro de las culturas, se encuentran los recursos minerales, ambientales y vegetales. Hasta mediados del siglo XX estos conformaron los recursos terapéuticos de primera mano, siendo los recursos vegetales los que destacan en el alivio de dolencias y en la prevención de enfermedades (Avello y Cisternas, 2010).

Es así como cada zona del mundo desarrolló su modo de aliviar basándose en las plantas medicinales, utilizando plantas endémicas de las zonas cuestionadas, lo cual lo convierte en una forma única y peculiar de aliviar dolencias. A lo largo del tiempo estas particulares terapias constituyeron la mencionada medicina tradicional y al ser atesorado o conservado por los pueblos fue denominada medicina aborígen o autóctona, constanding estos términos hasta la actualidad, como también las recetas o fórmulas tradicionales que poseen varios usos, maneras de preparación, administración, dosis entre otros parámetros farmacológicos modernos (Avello y Cisternas, 2010).

La medicina tradicional es un escenario presente en todo el mundo. Es parte del patrimonio de cada país ya que emplea conocimientos y prácticas que se han transmitido de descendencia en descendencia (Morón y Jardines, 1997). La utilización de conocimientos de

salud complementaria o alternativa es tan antigua, ya que desde el inicio de la civilización integran las prácticas de atención familiar y comunitaria (Souza et al., 2011).

Los saberes de las diferentes comunidades resultan de gran valor científico tanto para la evaluación de su patrimonio cultural, como para la consolidación del saber científico. Los estudios etnobotánicos suelen referirse principalmente a los conjuntos de personas que mantienen una relación más directa con la naturaleza, como por ejemplo los pueblos indígenas y culturas rurales, ya que el acceso de estos a la medicina moderna se dificulta por varias razones como por ejemplo la disminuida capacidad económica por lo cual continúan usando la medicina tradicional a través del uso de sustancias procedentes de plantas medicinales (Murillo et al., 2014).

La Organización Mundial de la Salud señala que la medicina tradicional es un compendio de los saberes, capacidades y destrezas fundamentados en la teorías, dogmas y vivencias propias de las culturas, que se han usado en el transcurso del tiempo para cuidar la salud, prevenir, diagnosticar, perfeccionar y dar tratamiento a las diferentes enfermedades tanto corporales como mentales(Organización Mundial de la Salud, 2013).

El uso de la Medicina Tradicional es conocido en toda Latinoamérica donde se entrelazan una serie de relaciones tanto socioculturales como económicas las cuales permiten su vigencia. El Ecuador goza de ser un país intercultural y pluricultural de creencias y prácticas milenarias que son transmitidas de generación en generación por lo que se caracteriza por su manera peculiar y distinta en el desarrollo de diagnóstico y tratamientos de patologías; al igual que su amplia variedad de plantas medicinales usadas para la recuperación de la salud de los paciente (Almeida & Almeida, 2014).

1.2 Plantas medicinales

A lo largo del tiempo las plantas medicinales han ocupado un sitio notorio, siendo el recurso terapéutico o curativo más importante para atención de la salud de individuos y su descendencia (Souza et al., 2011).

El reino vegetal destaca dentro de los reinos de la naturaleza, ya que favorece hasta hoy en reducir síntomas y prevenir enfermedades. Las plantas componen un verdadero arsenal químico ya que comprenden un complejo y sorprendente metabolismo. De este abundante arsenal tan solo un tercio se conoce, tomando en consideración que existe una variedad de especies a nivel global y aquellas que aún no han sido exploradas, sin tomar en cuenta aquellas especies que ya se encuentran extintas (Avello & Cisternas, 2010).

Las plantas medicinales gozan de propiedades curativas, las cuales se deben a sus principios activos los cuales se aíslan mediante procedimientos de laboratorio (MSPE, 2016).

Además, los recursos vegetales poseen significativas aplicaciones en la medicina moderna. Cabe recalcar que se usan como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos ya que son fuente de agentes terapéuticos. La disposición química de sus principios activos se puede usar de patrón o estándar para la realización de drogas sintéticas y tales principios se pueden aplicar como marcadores taxonómicos en la investigación y búsqueda de nuevos medicamentos (Bermúdez, Oliveira, & Velázquez, 2005).

1.3 Biodiversidad en Ecuador

En la Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía y Balslev, indican que de las 5.172 especies que tienen reportado usos, el 60% corresponde a plantas medicinales, el 55% son fuente de materia prima como por ejemplo los usados para la construcción, el 30% son comestibles y el 20% son usados en ceremonias religiosas y otras prácticas afines. La adición de estos porcentajes supera el 100% lo que indica que varias de las especies reportan diversos fines.

En Ecuador, el uso de plantas medicinales es una práctica generalizada, especialmente entre los habitantes de las zonas rurales que a menudo encuentran una amplia variedad de estas plantas en los mercados populares. Esta práctica proviene del conocimiento ancestral. Se evaluó que aproximadamente 5100 especies de plantas vegetales se utilizan por diferentes razones; sin embargo 3188 se utilizan con fines medicinales como infecciones, heridas, dolencias respiratorias, trastornos digestivos e inflamaciones, entre

otros. Según las referencias, el 75 % de estas especies medicinales son nativas, el 5% son endémicas, y el 11% se introducen siendo Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae las familias más utilizadas. La amplia diversidad de la flora del Ecuador ha fomentado investigaciones sobre la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas ya que la mayoría de estas especies aún no han sido estudiadas. (Rondón, García, Cornejo, Rojas, & Terán, 2015)

1.4 Familia Euphorbiaceae

Esta familia comprende alrededor de 300 géneros y 5000 especies distribuidas principalmente en América y el África tropical (Hegazy et al., 2010). La variación morfológica de la familia es extensa y por consiguiente es difícil de determinar, hecho que ha sugerido que las especies de ésta tengan un origen polifilético (Bittner et al., 2001).

Los géneros más importantes son: *Euphorbia* (1000 especies), *Crotón* (500- 600 especies) y *Phyllanthus* (400 especies). (Pascual & Correal, 2010)

Desde la antigüedad especies de *Euphorbia* se han utilizado en la medicina popular para tratar enfermedades de la piel, migrañas, parásitos intestinales y verrugas. Las actividades biológicas del género, incluyen actividad antitumoral, antibacteriano, antiviral y propiedades citotóxicas y diferentes efectos vasculares (Hegazy et al., 2010).

1.5 Género *Croton*

El género *Croton* (Euphorbiaceae) comprende aproximadamente 1200 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rondón et al., 2015). Estas especies son bien conocidas por su variedad de diterpenos de tipo labdano, ciclitoles, esteroides, sustancias fenólicas y flavonoides (Barrera et al., 2016). *Croton* además es rico en alcaloides activos (Salatino, Salatino, & Negri, 2007).

El género *Croton* se destaca por poseer una amplia variedad de actividades biológicas. Las hojas son empleadas como cicatrizante, además poseen cualidades antisépticas, hemostáticas y antiinflamatorias. De igual manera se han utilizado en el tratamiento de úlceras gastrointestinales, cólicos uterinos y como anticancerígeno (Barrera et al., 2016). Las especies de *Croton*, como la mayoría de las Euphorbiaceae pueden contener

látex, al cual se le asocian propiedades medicinales especialmente para tratar afecciones de la piel (Salatino et al., 2007).

1.5.1 *Croton rivinifolius* Kunth

Croton rivinifolius es un arbusto endémico del oeste de Ecuador y crece entre 0 y 500 metros sobre el nivel del mar; según la medicina popular se ha utilizado para aliviar como antiinflamatorio y antioxidante (Rondón et al., 2015).

1.5.2 Descripción botánica de la especie *Croton rivinifolius* Kunth

Figura 1

Croton rivinifolius Kunth



Tabla 1

Clasificación botánica de la especie Croton rivinifolius Kunth

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

1.6 Metabolitos secundarios

Las plantas han sido la fuente de muchos fármacos importantes porque son capaces de producir varias entidades químicas y moléculas bioactivas a través del proceso conocido como metabolismo (Shilpa, Varun, & Lakshmi, 2010).

El reino vegetal se encuentra lleno de una extraordinaria variedad de metabolitos extraños, de los cuales en su mayoría no se les ha podido adjudicar ninguna intervención evidente en los denominados procesos metabólicos primarios de la planta (fotosíntesis, respiración, etc). Por consiguiente, estos compuestos tomaron el nombre de metabolitos secundarios (Dirzo, 1985).

Inicialmente se creyó que los metabolitos secundarios no eran otra cosa que productos de desecho del metabolismo. Actualmente se ha evidenciado que algunas de estas sustancias son sintetizadas activamente por las plantas, además se ha sugerido que algunas otras de estas sustancias están implicadas en varias actividades como la protección contra la radiación ultravioleta o la de ser productos de detoxificación de venenos ambientales (Dirzo, 1985).

Cabe recalcar que también reciben la denominación de productos naturales y poseen un transcendental valor tanto medicinal como económico, procedente éste último de su uso en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Varios de estos productos naturales, que ya fueron utilizados en la medicina tradicional como antídoto para combatir patologías, se usan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc (Ávalos, A. y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios se derivan generalmente de metabolitos primarios a través de modificaciones, tales como metilación, hidroxilación y glicosilación. Por consiguiente, los metabolitos secundarios son ciertamente más complejos que los metabolitos primarios y se clasifican sobre la base de la configuración o estructura química (por ejemplo, azúcar, anillos aromáticos), composición (que contiene nitrógeno o no), su solubilidad en varios disolventes o la vía por la que se sintetizan. Se han clasificado en Terpenos (compuestos enteramente de carbono e hidrógeno), fenólicos (compuestos de azúcares simples, anillos de benceno, hidrógeno y oxígeno) y compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre. Se ha observado que cada familia de plantas, género y especie produce una mezcla característica de estos metabolitos (Shilpa et al., 2010).

Hasta la actualidad son limitadas las investigaciones realizadas a la especie *Croton rivinifolius* Kunth, sin embargo, en el estudio realizado por Luna y Suárez (2018) pudieron aislar 4 compuestos identificados como Tilirósido, Escualeno, Swerósido e Isocorydine.

1.6.1 *Terpenoides*

Dentro de los terpenos o terpenoides se encuentran más de 40.000 moléculas diferentes, por lo cual se lo considera el grupo más numeroso de productos naturales o también denominados metabolitos secundarios. De la ruta metabólica de síntesis de estas compuestas se forman tanto metabolitos primarios como secundarios (Ávalos y Pérez, 2009).

A partir de metabolitos primarios los terpenos son sintetizados por dos rutas, la primera es la ruta del ácido mevalónico, la cual se halla activa en el citosol, en donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan con la finalidad de generar ácido mevalónico que reacciona hasta generar isopentenil difosfato (IPP), la segunda ruta es la del metileritritol fosfato (MEP) que ejerce o actúa en cloroplastos y de igual manera forma IPP (Ávalos y Pérez, 2009).

Tanto el isopentenil bifosfato y el dimetilalil difosfato (DMAPP), intervienen como los iniciadores o precursores en la síntesis de terpenos en reacciones catalizadas por prenil transferasas las cuales dan lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos y farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos (Ávalos y Pérez, 2009).

Los terpenoides constituyen una clase de productos naturales constituidos por dos o más unidades isoprenicas, considerablemente distribuidas en el reino vegetal (Maciel, Cortez, & Gomes, 2006).

Ávalos y Pérez (2009), indican que los terpenos poseen la siguiente clasificación:

Tabla 2

Clasificación de los terpenos.

GRUPO	NÚMERO DE CARBONOS	NÚMERO DE UNIDADES DE ISOPROPENO
Monoterpenos	10	2

Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos		Más de 8 unidades

Nota. Adaptado de Metabolismo secundario de planta, por Ávalos & Pérez, 2009.

1.6.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pertenecen al grupo de metabolitos secundarios que se caracterizan por tener uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, fusionados o unidos a un anillo aromático (Ringuelet & Viña, 2013). Las rutas de biosíntesis más frecuentes de estos productos naturales son la del sikimato (ácido sikímico) y la vía del acetato (Martínez, 2007).

En cuanto a la estructura química, son un grupo numeroso que integra desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. A este diverso grupo también pertenecen los flavonoides (Ávalos & Pérez, 2009).

Los compuestos fenólicos poseen diversas funciones biológicas desde sustancias aromáticas u odoríferas y pigmentos, venenos, compuestos oleopáticos, componentes estructurales y agentes antifúngicos y antimicrobianos. Varios de estos metabolitos desempeñan determinadas funciones para la planta, como inhibidores de la germinación, moléculas de señalización, protectores frente a la radiación solar, entre otros importantes roles (Ringuelet & Viña, 2013).

1.6.3 Flavonoides

Los flavonoides se hallan ampliamente difundidos en el reino vegetal y presentes en las plantas vasculares de manera universal, a manera de glicósidos. Estos compuestos son esenciales para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, además conservan propiedades relacionados con la salud humana, lo cual se debe a su actividad antioxidante (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Estas sustancias, químicamente pertenecen a los compuestos de naturaleza fenólica y se distinguen por poseer un esqueleto carbonado que contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Ávalos & Pérez, 2009).

Los flavonoides se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los más destacados: antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (Ávalos & Pérez, 2009).

Farmacológicamente, los flavonoides sobresalen por su disminuida toxicidad, demostrando acción sobre el sistema vascular con actividad vitamínica P, lo que significa que tiene un efecto protector de la pared vascular. Del mismo modo poseen actividad antioxidante, pues inhiben la peroxidación lipídica, gozan de efectos antimutagénicos e inhiben diversas enzimas relacionadas con el funcionamiento vascular. Además de estas actividades, también actúan como diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria (López, 2002).

En las plantas, los flavonoides son sintetizados a partir de flavanonas procedentes a su vez de chalconas derivadas de la ruta fenilpropanoide. La síntesis de las estructuras básicas de los esqueletos flavonoides se debe a 3 grupos de enzimas las cuales son: oxigenasas dependientes del 2-oxo glutarato, citocromo P450 hidroxilasas y reductasas dependientes de NADPH (Drago, 2007).

1.6.4 Alcaloides

Cerca de 21,000 alcaloides encontrados hasta hoy en el 20% de la plantas, son moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular con una amplia variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas (Chacón, González, & Riley, 2012). Un gran número son heterocíclicos sin embargo algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como es el caso de la mescalina y la colchicina (Ávalos & Pérez, 2009).

En su estructura molecular contienen uno o varios átomos de nitrógeno, frecuentemente formando parte de un anillo heterocíclico (Ringuelet & Viña, 2013). Son sólidos incoloros y cristalizables, cuyo peso molecular oscila entre 100 y 900 D, y puntos de

fusión inferiores a 200 °C. Los alcaloides, son poco solubles en agua en su forma base y solubles en disolventes orgánicos, por otro lado cuando se encuentran en forma de sal son hidrosolubles, solubles en alcoholes e insolubles en disolventes demasiado apolares (Martínez, 2007).

Las rutas biosintéticas que dan origen a los alcaloides son varias y los precursores o iniciadores usados por las plantas son los aminoácidos (Ringuelet & Viña, 2013). Estos compuestos se dividen en tres grupos característicos: alcaloides verdaderos, los cuales constan de nitrógeno heterocíclico y siempre son procedentes de aminoácidos; protoalcaloides, que son aminas simples con carácter básico, nitrógeno no heterocíclico y derivado también a partir de aminoácidos, y pseudoalcaloides, con características idénticas a los alcaloides verdaderos, pero que no proceden de aminoácidos (Martínez, 2007).

Los alcaloides, a consecuencia de su interacción con neurotransmisores, en humanos crean respuestas tanto fisiológicas y psicológicas y la mayoría de estos administrados a dosis altas son tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas poseen un gran valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos y Pérez, 2009).

1.7 Métodos de separación e identificación

La química analítica efectúa un papel fundamental en el estudio, caracterización y cuantificación de los distintos compuestos fitoquímicos (Ringuelet & Viña, 2013).

Un determinado método analítico encierra una serie de pasos que comprenden en primer lugar el almacenamiento de la muestra a analizar, seguidamente su preparación, separación y el aislamiento de analitos, su identificación o caracterización y, finalmente, su cuantificación. Todos los pasos se deben realizar de manera minuciosa, pero se considera como etapas críticas a la preparación de la muestra y al aislamiento de los metabolitos. Actualmente, mediante una serie de técnicas de análisis, la química analítica permite el estudio de componentes fitoquímicos (Ringuelet & Viña, 2013).

Tabla 3

Visión general de las técnicas analíticas utilizadas en fitoquímica

Cromatografía	Cromatografía en capa fina (TLC)
	Cromatografía gaseosa (GC)
	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
	Cromatografía líquida capilar (μ -LC)
Electroforesis	Electroforesis en capa fina (TLE)
	Isotacoforesis (ITP) (electroforesis a velocidad uniforme)
	Electroforesis capilar (CE)
Técnicas espectroscópicas	Espectroscopía UV
	Espectroscopía infrarrojo (IR)
	Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR)
	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)
	Espectroscopía de masas (MS)

Nota. Adaptado de Productos naturales vegetales, por Ringuélet & Viña, 2013.

1.7.1 Cromatografía

La separación, caracterización y determinación de componentes en mezclas complejas es posible gracias a la cromatografía, ya que varias de dichas separaciones no son posibles por otros medios (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

Hay una gran diversidad de métodos y técnicas cromatográficas, sin embargo, todos tienen en común la utilización de una fase móvil (FM), ya sea gas o líquida, la cual traslada los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria (FE). Los componentes a separarse deben ser solubles en la fase móvil, pero deben tener la facultad de interactuar con la fase estacionaria. De este modo, Así, a lo largo de la separación cromatográfica, los analitos suelen distribuirse entre las dos fases. Este método de separación analítica se basa en la diferencia de velocidad de migración entre los componentes de la muestra. Cabe mencionar que el movimiento relativo de cada molécula resulta del equilibrio dinámico entre dos fuerzas, las primeras fuerzas son aquellas que desplazan a las moléculas en el seno de la fase móvil, mientras que las otras fuerzas son aquellas que frenan o aplacan el desplazamiento por interacciones con la fase estacionaria y suelen ser de diferente naturaleza según el tipo de cromatografía (Carro & Lorenzo, 2011).

1.7.1.1 Cromatografía en columna

La cromatografía en columna es un método de separación analítica, la cual consta de una fase móvil y una fase estacionaria. En esta técnica se usan columnas huecas verticales de vidrio las cuales están cerradas por su parte inferior con una llave, la cual facilita la regulación del flujo de la fase móvil. Como fase estacionaria se usan algunas sustancias sólidas y químicamente inertes, que tienen la cualidad de adherir o fijar débilmente en su superficie una gran variedad de compuestos, cabe destacar que la fuerza con la que se fijan las sustancias sobre el adsorbente varía de un compuesto a otro, por lo general entre los adsorbentes que usualmente se usan dentro de cromatografía en columna recalcan sílica Gel (óxido de silicio) o alúmina (óxido de aluminio) (Torres, Sanchez, Mendez, & Perez, 2005).

La técnica se fundamenta en rellenar la columna con el adsorbente seleccionado que debe sedimentar sin que se causen canales o grietas. Se ubica en la parte superior de la columna la mezcla a separar, llamada cabeza de la columna que se logra mezclando el adsorbente con la muestra con el eluyente (fase móvil) que se va a utilizar en el proceso de separación. Ya sea por gravedad o presión, se deja que el eluyente empiece a descender por la columna. La adsorción de los componentes se produce con diferentes intensidades consiguiendo que unos avancen más que otros. Se recogen en la parte inferior de la columna las diferentes fracciones cromatográficas, las cuales posteriormente se analizan y se agrupan en función de sus características (Torres, Sanchez, Mendez, & Perez, 2005).

Figura 2

Cromatografía en columna



1.7.1.2 Cromatografía en capa fina

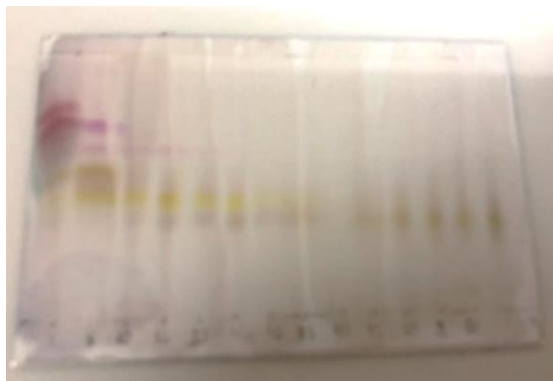
La Cromatografía en Capa Fina o TLC es una técnica muy utilizada ya que permite realizar algunas acciones entre ellas: determinar el nivel de pureza de una muestra, dar seguimiento a una reacción química, relacionar o comparar muestras, inspeccionar y controlar lo que contienen las fracciones obtenidas por cromatografía en columna y fijar las condiciones más convenientes para una cromatografía en columna (López et al., 2005).

La cromatografía de capa fina, es una forma plana de cromatografía que se emplea en el cribado o tamizaje a gran escala tanto para análisis cualitativo, como para análisis cuantitativos. La fase estacionaria consiste en una capa delgada de adsorbente delicadamente dividido, la cual está soportada ya sea sobre una placa de vidrio o de aluminio. Para que la placa tenga una excelente adherencia se debe encontrar el aglutinante adecuado es por eso que se puede emplear cualquiera de los sólidos que se utilizan en cromatografía de líquidos. En esta técnica se coloca una pequeña muestra sobre la placa, se corre ubicando el lado inferior de la placa en un disolvente apropiado. Por acción capilar el disolvente va a ascender por la placa a distintas velocidades que van a depender tanto de la solubilidad como del grado de retención por la fase. Después de este procedimiento, las manchas de soluto se hacen visibles gracias a un reactivo que forma un derivado colorido. Generalmente, las

manchas suelen trasladarse a cierta fracción de velocidad con la que se mueve el disolvente y se determina por su valor de R_f es decir la distancia que recorre el soluto frente a la distancia que recorre el disolvente (Christian, 2009).

Figura 3

Cromatografía en capa fina



1.8 Técnicas espectroscópicas

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

La cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas, componen un instrumento potente para la separación, identificación y cuantificación de componentes volátiles y semivolátiles presentes en mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Por su parte en la cromatografía de gases (GC) los componentes de la mezcla son separados, detectados y cuantificados, y el único dato proporcionado para la caracterización es el tiempo de retención de los picos cromatográficos, pero cabe destacar que este dato no basta para una identificación irrefutable, ya que se examinan muestras que poseen varios elementos (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Por su parte en la cromatografía de gases (GC) los componentes de la mezcla son separados, detectados y cuantificados, y el único dato proporcionado para la caracterización es el tiempo de retención de los picos cromatográficos, pero cabe destacar que este dato no basta para una identificación irrefutable, ya que se examinan muestras que poseen varios elementos. En cambio, la espectrometría de masas (MS) consigue identificar o caracterizar

cualquier sustancia pura de manera casi infalible, pero regularmente no es idóneo para la identificación de los componentes individuales de una mezcla sin previamente haber separado sus componentes, lo que se debe a la gran complejidad del espectro conseguido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por consiguiente, de la agrupación de estas dos técnicas surge una técnica combinada GC-MS que en principio laboran en fase gaseosa y requieren de una pequeña cantidad de muestra para su análisis o investigación, por lo cual poseen alta compatibilidad y para cuyo manejo se necesita de sistemas especiales de conexión (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Figura 4

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas



1.8.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica con amplias y reconocidas aplicaciones en el ámbito del análisis estructural (Garrido, Vélez, & Vérez, 2013). Constituye uno de los equipos más poderosos que existen actualmente para dilucidar estructuras de moléculas, evaluación de identidad y cuantificación de compuestos, especialmente moléculas orgánicas (Laurella, 2017).

Un espectrómetro de RMN se basa fundamentalmente en un imán, un emisor de radiofrecuencia y un detector de radiofrecuencia. Esta técnica se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos y se utiliza usualmente en las propiedades del núcleo de hidrógeno. Cabe mencionar que los electrones son los que van a producir modificaciones o alteraciones, débiles pero visibles, siendo esos efectos electrónicos los que darán origen a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, admitiendo de este modo

el estudio detallado y minucioso de la estructura electrónica de las moléculas, motivo de la aceptación y éxito de la Resonancia Magnética Nuclear en química orgánica (Elguero, et al., 2004).

Figura 5

Resonancia Magnética Nuclear



1.9 Actividad biológica

1.9.1 Actividad antimicrobiana

Últimamente debido a la frecuente resistencia presentada en los diferentes patógenos, se han llevado a cabo investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas como alternativas al uso de antibióticos ya conocidos. Se debe tomar en cuenta que este es un significativo problema de salud pública, ya que implica impacto en la salud, así como en el costo-beneficio que involucra dar tratamiento a estas enfermedades (Rodríguez, Zarate, & Sánchez, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), Comunidad Andina de Naciones (CAN) y la Universidad Nacional de Colombia, entre otros estados nacionales e internacionales, en sus investigaciones establecen que se podrían plantear nuevas alternativas de tratamiento, lo cual se conseguiría a través de la bioprospección y explotando los recursos naturales. Las plantas constituyen uno de los elementos que se usan hoy en día para la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos (Rodríguez et al., 2017).

1.9.2 Microorganismos

1.9.2.1 Bacterias grampositivas

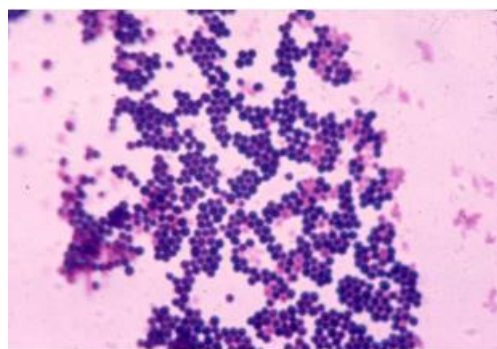
1.9.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está compuesta por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , los cuales se encuentran asociados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos. Son microorganismos no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula y son anaerobias facultativas. La gran parte producen catalasa la cual es una particularidad que se utiliza para distinguir entre el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* como *Enterococcus* que son catalasa negativos (Cervantes, García, & Salazar, 2014).

Particularmente *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico causante de varias patologías como infecciones de piel y tejidos blandos, endocarditis, bacteremia, infección del Sistema Nervioso Central y del tracto gastrourinario por esta razón y por la resistencia que ha presentado a algunos antibióticos (Antibióticos β lactámicos y meticilina) esta cepa es objeto de importantes estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos antibióticos (Gil, 2000).

Figura 6

Imagen microscópica de Staphylococcus aureus



Nota. Adaptado de Assessment the Frequency of *Staphylococcus aureus* Golden Methicillin- Resistant (MRSA) and Vancomycin-Resistant VRSA in Determining the MIC Using E-Test. Immunological Disorders and Immunotherapy, por Asadi y Jamali, 2017.

1.9.2.1.2 *Enterococcus faecalis*

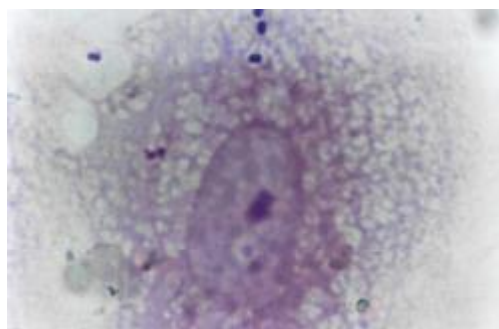
Enterococcus son células esféricas u ovoides, cuyo tamaño oscila entre 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm. Son cocos grampositivos, se presentan en forma de pares o cadenas cortas, no forman esporas. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, y poseen metabolismo fermentativo (Pérez, Martínez, & Zhurbenko, 2010).

Enterococcus faecalis puede ser responsables de infecciones graves como septicemia, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis, neumonía y sepsis intraabdominal (Arredondo, Echeguren, Arzate, & Medina, 2018).

Este género representa un reto terapéutico debido a su resistencia intrínseca, a varios antibióticos, incluyendo cefalosporinas, ertapenem, meropenem, penicilinas resistentes a penicilinas, aminoglucósidos, clotrimoxazol y clindamicina. Particularmente *E. faecalis*, es resistente a piperacilina, ampicilina e imipenem. Debido a que este género es cada vez más resistente a antimicrobianos las opciones terapéuticas son más limitadas es por eso que es de suma importancia el estudio de esta cepa y poder determinar su perfil de susceptibilidad para de esta manera evitar la propagación de enfermedades causadas por este agente (Pérez et al., 2010)

Figura 7

Imagen microscópica de Enterococcus faecalis



Nota. Adaptado de Cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano: un modelo biológico para el estudio de los

mecanismos de infección por enterococos, por Chiriboga y Fontanilla, 2004.

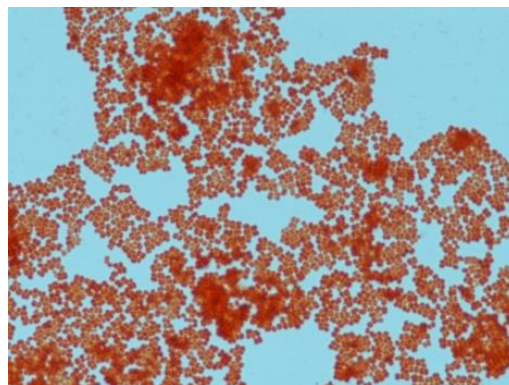
1.9.2.1.3 *Micrococcus luteus*

Micrococcus son esferas Gram-positivas que se hallan en tétradas y en grupos irregulares, generalmente no son móviles y no forman esporas. Habitualmente son aeróbicas con un metabolismo rigurosamente respiratorio y además producen catalasa (Kocur, Kloos, & Schleifer, 2006).

Forman parte de la microbiota normal de la piel del hombre, pero pueden originar infecciones como endocarditis o bacteriemia en huéspedes susceptibles (Usó, Gil, Gomila, & Tirado, 2003)

Figura 8

Imagen microscópica de Micrococcus luteus



Nota. Adaptado de Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias, por Vázquez, Martín, Silóniz, y Serrano, 2010.

1.9.2.2 Bacterias gramnegativas

1.9.2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es considerado un microorganismo perteneciente a la microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser causantes de enfermedades y producir daños ocasionando diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

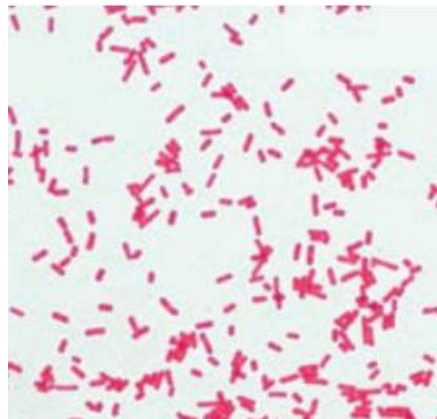
Escherichia coli puede estar involucrada tanto en problemas gastrointestinales, como en infecciones de vías urinarias y neonatales. En cuanto a las infecciones intestinales, las *E.*

coli se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Cortés et al., 2002).

A nivel mundial la resistencia antibiótica es un problema emergente vigente en varias bacterias, especialmente en la *Escherichia coli*, que posee elevados porcentajes de resistencia hacia ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol y ácido nalidíxico, lo que implica grandes inconvenientes en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido (Mosquito, Ruiz, Bauer, & Ochoa, 2011).

Figura 9

Imagen microscópica de Escherichia coli



Nota. Adaptado de Microbiología médica, por Brooks, Butel, Morse, Carroll, y Mietzner, 2010.

1.9.2.3 Levaduras

1.9.2.3.1 *Cándida albicans*

Las especies del género *Cándida* se caracterizan por ser hongos unicelulares o levaduras, siendo *Cándida albicans* su principal representante. Dicho Microorganismo es una levadura que se encuentra presente en la mayoría de los humanos como un microorganismo comensal ubicuo, se halla normalmente en piel, colón, estomago, vagina, cavidad oral y recto (Espina, Gillen, Calvo, & Meza, 2005).

Habitualmente es inofensiva en personas sanas, pero en algunos en donde su sistema inmunitario se encuentra debilitado o comprometido, puede convertirse en un patógeno que causa infecciones tanto locales como sistémicas (Espina et al., 2005).

Figura 10

Imagen microscópica de Cándida albicans



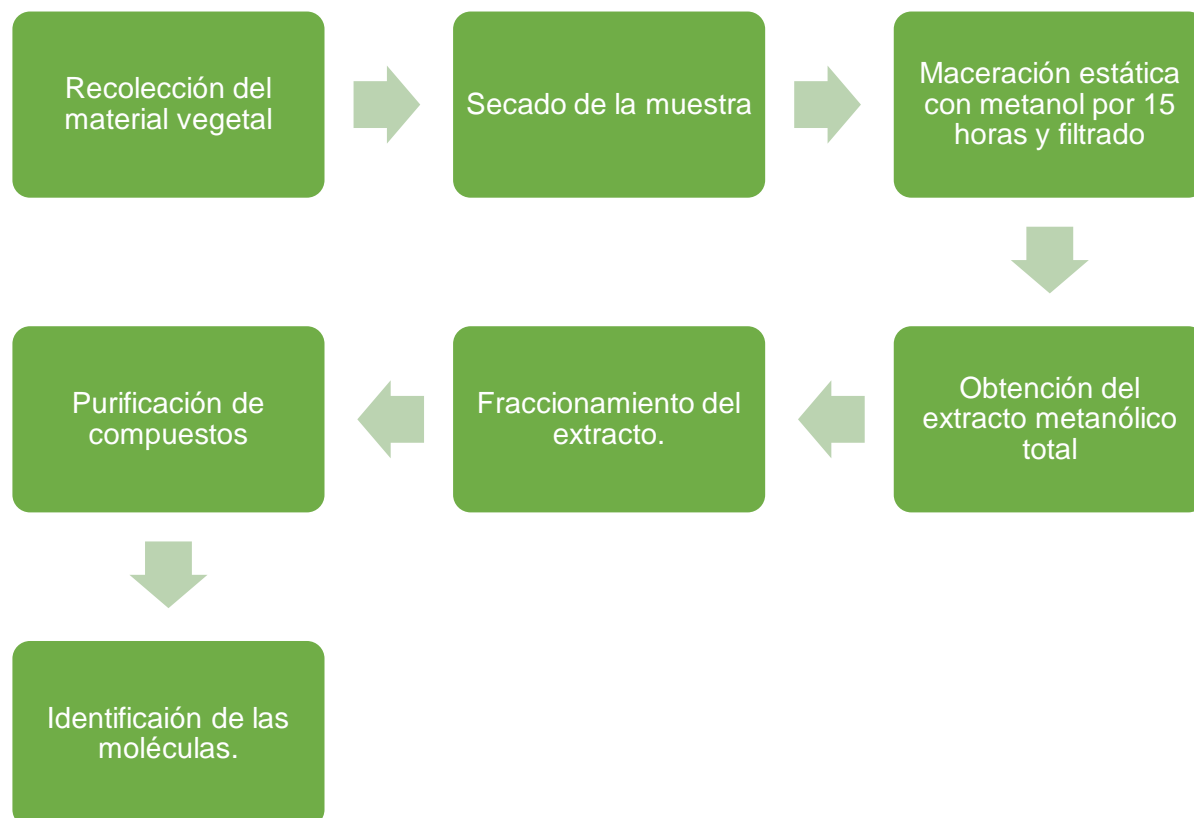
Nota. Adaptado de Microbiología médica, por Brooks, Butel, Morse, Carroll, y Mietzner, 2010.

Capítulo dos

Materiales y Métodos

Figura 11

Esquema de la metodología empleada en el aislamiento y caracterización química de metabolitos secundarios de *Croton rivinifolius* Kunth.



2.1 Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas y tallos de la planta *Croton rivinifolius* Kunth en el cantón Celica, ubicado al sur-occidente de la provincia de Loja. En la Vía Célica-Cerro Guachanamá, a una altitud de 2255 msnm, con las siguientes coordenadas geográficas 4°3'15" S y 79°53'34" W. La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. Nixon Cumbicus Torres y una muestra fue depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) con voucher HUTPL 8027.

2.2 Secado del material vegetal

Luego de haberse recolectado la materia vegetal, se procedió a descartar hojas que se encontraban en mal estado, a continuación, fue llevada hacia la cámara de secado a 34°C por 4 días, eliminando así toda el agua contenida en la planta.

2.3 Obtención del extracto total de metanol

El extracto metanólico se obtuvo a partir de 500g de muestra lo que incluyó las hojas y tallos de la planta, una vez pesado se procedió a triturar y se realizó la maceración dinámica, la cual fue durante una hora a temperatura ambiente con 3 litros y medio de metanol por cada maceración, y se la ejecutó por triplicado. Seguidamente, se filtró el extracto al vacío y se concentró a presión reducida a 30°C en donde finalmente se obtuvo el extracto total.

Figura 12

Proceso para la obtención del extracto metanólico total



Nota. a) Filtración al vacío b) Rotaevaporación c) Extracto metanólico total

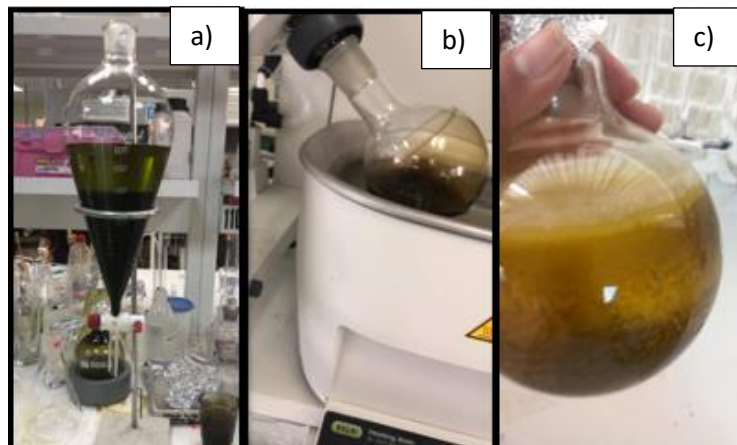
2.4 Desclorofilación del extracto metanólico

Se realizó una bipartición líquido-líquido con el propósito de eliminar las clorofilas presentes en el extracto de metanol (MeOH), para lo cual se pesó 10 gramos del extracto y luego en un embudo de decantación se añadió una mezcla de 500ml de la polaridad Metanol:Agua 8:2, posteriormente se colocó 500 ml de hexano por 3 veces y se eliminó el gas, seguidamente se puso en reposo el embudo de decantación por algunos minutos y se observó la formación de dos fases; en la primera fase se observó la parte de MeOH:H₂O y la

otra fase es la parte hexánica, finalmente se procedió a concentrar en el rotaevaporador a presión reducida la parte de Metanol:agua obtenida.

Figura 13

Proceso de desclorofilación del extracto metanólico



Nota. a) Decantación de fases b) Rotaevaporación c) Extracto metanólico desclorofilado

2.5 Cromatografía en capa fina

Antes de realizar el fraccionamiento en columna, se realizó un análisis del extracto total a través de cromatografía de capa fina con diferentes solventes y a distintas polaridades con la finalidad de determinar los analitos presentes y al mismo tiempo ver la mejor elección para la separación de los mismos.

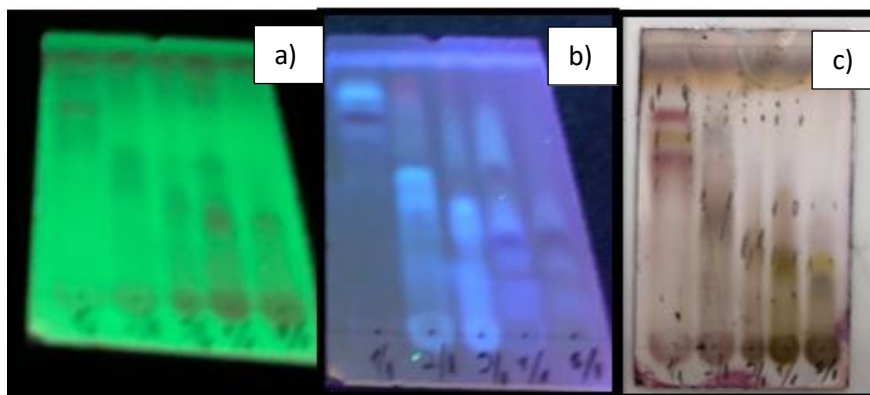
2.6 Fraccionamiento del extracto metanólico

A partir de 2g del extracto total se realizó un fraccionamiento en cromatografía en columna utilizando 200g de sílice gel 60 F254 en relación 1:100, con polaridad creciente, comenzando con acetato 100% hasta Acetato-Metanol-Agua en relación 09:05:05. Se recolectaron 159 fracciones de aproximadamente 100 mL cada una. Luego se procedió a realizar cromatografía en capa fina de las fracciones resultantes utilizando una placa de CCF (sílice gel 60 F254) como fase estacionaria y como fase móvil Acetato-Metanol-Agua relación 8:1:1. Seguidamente se observaron en una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365nm y

finalmente se unieron las fracciones de acuerdo a la similitud presente en la placa de cromatografía de capa fina y Rf, dando un total de 9 fracciones.

Figura 14

Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas del extracto metanólico.



Nota. a) Luz UV 254nm b) Luz UV 365nm c) CCF revelada

Tabla 4

Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico.

Código de la Fracción	Fracciones	Peso (mg)
L.A 1/1	35 – 44	68.2
L.A 2/1	45 – 50	33.1
L.A 3/1	51 – 60	60.9
L.A 4/1	61 – 95	92.6
L.A 6/1	96 – 104	247.2
L.A 7/1	105 – 124	291.5
L.A 8/1	125 – 159	112.5
L.A 9/1	7 – 13	27.2
L.A 10/1	14 – 24	22.8

2.7 Test para detección de flavonoides o Test de Shinoda

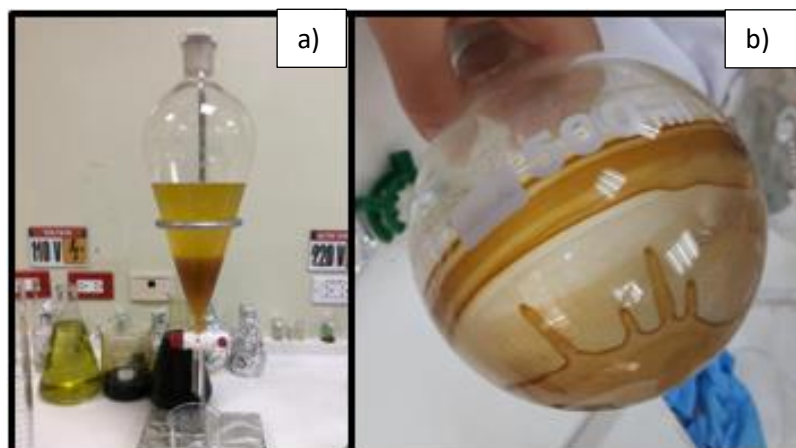
Se pesó 20mg de extracto metanólico desclorofilado y se lo disolvió en 1 ml de metanol, posteriormente se le agregó unas pocas gotas de ácido clorhídrico y una cierta cantidad de alcohol isopropílico, seguidamente se le colocó magnesio torneado. Finalmente se esperó hasta observar el color rosado que indica la presencia de flavonoides en el extracto.

2.8 Extracción de flavonoides

Una vez realizado el Test de Shinoda, se realizó una bipartición líquido-líquido, para lo cual se pesó 1 gramo del extracto metanólico y se lo disolvió con 100 ml de agua destilada, posteriormente en un embudo de decantación se añadió el extracto diluido y 500ml de acetato de etilo (por tres veces), se agitó vigorosamente y se eliminó el gas, seguidamente se puso en reposo el embudo de decantación por algunos minutos y se observó la formación de dos fases; en la primera fase se observó la parte de H₂O y la otra fase es la parte del acetato de etilo, finalmente se procedió a concentrar en el rotaevaporador a presión reducida la parte de acetato de etilo obtenida.

Figura 15

Bipartición líquido - líquido



Nota. a) Decantación de fases c) Extracto (fase de acetato de etilo)

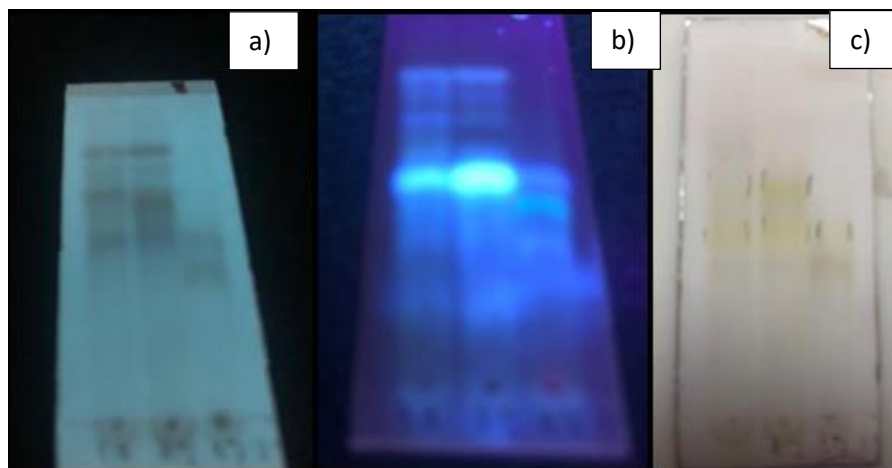
2.9 Fraccionamiento de la fracción de partición de acetato de etilo

Se trabajó en el equipo BÜCHI REVELERIS®Prep System en donde, a partir de 226.6 mg de la fracción de partición de acetato de etilo, el cual fue sujeto a un fraccionamiento en cromatografía en columna utilizando 200g de sílice gel de fase inversa, con polaridad creciente, comenzando con agua-metanol en relación 6:4, hasta metanol 100%. Se recolectaron 120 fracciones de aproximadamente 30 ml cada una. Luego se procedió a realizar cromatografía en capa fina de las fracciones resultantes utilizando una placa de CCF (sílice gel 60 F254 inversa) como fase estacionaria y como fase móvil Metanol-Agua relación 6:4. Seguidamente se observaron en una lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365nm y finalmente

se unieron las fracciones de acuerdo a la similitud presente en la placa de cromatografía de capa fina y R_f , dando un total de 4 fracciones.

Figura 16

Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la fracción de partición de acetato de etilo



Nota. a) Luz UV 254nm b) Luz UV 365nm c) CCF revelada

Capítulo tres

Resultados y Discusión

3.1 Peso y rendimiento del extracto metanólico obtenido de la especie *Croton rivinifolius* Kunth

El rendimiento obtenido del extracto metanólico se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Rendimiento del extracto metanólico total de Croton rivinifolius Kunth

Extracto	Peso inicial en g (planta seca)	Peso final en g	Rendimiento (%)
Metanol	500 g	39,5 g	7.9 %

3.2 Peso y rendimiento del extracto metanólico desclorofilado obtenido de la especie *Croton rivinifolius* Kunth

El rendimiento obtenido del extracto desclorofilado se detalla en la tabla 6.

Tabla 6

Rendimiento del extracto desclorofilado de Croton rivinifolius Kunth

Extracto	Peso en g de extracto total	Peso final en g de extracto desclorofilado	Rendimiento (%)
Metanol	10 g	7.18 g	71.8 %

3.3 Fraccionamiento del extracto metanólico de *Croton rivinifolius* Kunth

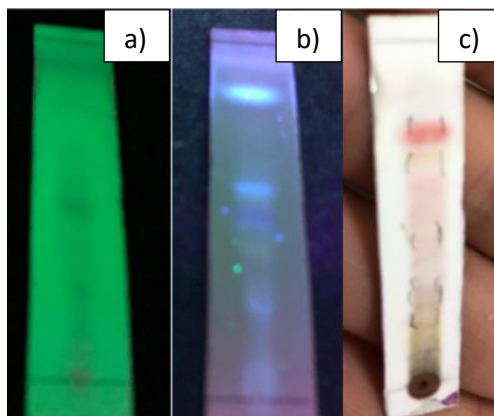
En la figura 17 el extracto metanólico se encuentra fraccionado a la polaridad 8:1:1 acetato-metanol-agua en donde se puede observar una mejor separación que en la figura 18, la cual representa el fraccionamiento del extracto metanólico pero en fase inversa a polaridad 5:5 metanol:agua. Sin embargo al realizar el método de cromatografía en columna, los resultado de separación fueron mejores al utilizar los solventes metanol:agua.

Como ya se mencionó anteriormente en la figura 17 se observa un mejor fraccionamiento en capa fina del extracto metanólico, sin embargo al realizar la cromatografía en columna, mostró que existían muchos más metabolitos que los que evidenciaba en la CCF fase directa, lo cual se puede evidenciar en la Figura 14 que contiene las fracciones obtenidas

de la cromatografía en columna manual, por lo que se procedió a realizar cromatografía en columna ultraflash Reveleris basándose en los resultados obtenidos en el fraccionamiento en capa fina fase inversa (Figura 18), en donde se observó un mejor fraccionamiento de la columna (Figura 16), hay que tomar en cuenta que la muestra usada en el Reveleris recibió otro tratamiento ya que la finalidad era extraer flavonoides, sin embargo no se pudo aislar ninguno por la abundancia de metabolitos que existían y porque se encontraban muy juntos lo que dificultó la separación de estos. Según UNAM (2007), la cromatografía en columna manual desde el punto de vista económico resulta ser la mejor, pero presenta la desventaja de no ser reproducible en cambio el Reveleris o cromatografía flash puede programarse y por ende ser reproducible ya que se pueden colocar las condiciones necesarias para que el procedimiento de separación sea efectivo.

Figura 17

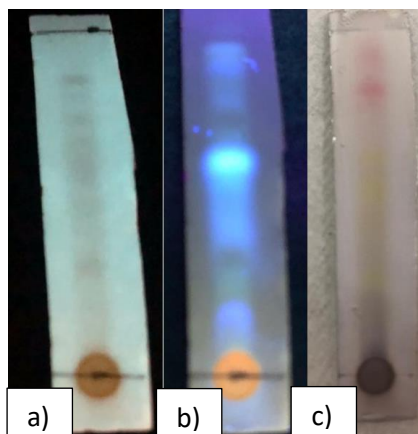
Fraccionamiento del extracto metanólico en fase directa de Croton rivinifolius Kunth (Polaridad 8:1:1 Acetato:Metanol:Agua)



Nota. a) Luz UV 254nm b) Luz UV 365nm c) CCF revelada

Figura 18

Fraccionamiento del extracto metanólico en fase inversa de Croton rivinifolius Kunth (Polaridad 5:5 Metanol:Agua)



Nota. a) Luz UV 254nm b) Luz UV 365nm c) CCF revelada

3.4 Resultados obtenidos en el test de Shinoda

En el presente trabajo de investigación se pudo determinar que la especie *Croton rivinifolius* Kunth posee flavonoides ya que el resultado del Test de Shinoda fue positivo dando una coloración tenuemente rosada. En un estudio realizado por Rondon et al. (2015) a siete especies entre ellas *Croton rivinifolius*, determinaron a través de pruebas cualitativas que esta posee presencia de Flavonoides ya que tanto en el test de NaOH al 10%, el cual indica la presencia de Xantonas, flavonas y flavonoles, como en el test de Shinoda el cual evidencia que la planta posee auronas y chalconas el resultado fue positivo.

Figura 19

Test de Shinoda positivo



3.5 Ensayos realizados en *Croton rivinifolius* Kunth

En los estudios realizados a los extractos apolares de esta especie, Luna & Suárez (2018) mencionan que a partir del extracto metanólico total de las hojas pudieron obtener fracciones de partición de hexano, diclorometano, acetato y metanol/agua, en donde de la fracción de partición de acetato lograron aislar dos compuestos, el uno que es de origen flavonoide al cual se lo conoce como Tilirósido y otro cuyo origen es iridoide glicosilado de nombre Swerosido el cual fue reportado por primera vez en esta especie. De igual forma del extracto metanólico de los tallos pudieron aislar e identificar un metabolito de tipo alcaloide nombrado como Isocorydine.

3.6 Metabolitos aislados en algunas especies del género *Croton*

Croton constituye uno de los géneros más grandes de las plantas con flores, del cual se han podido aislar compuestos de tipo terpeno (terpenoides, monoterpenoide, diterpenos), ácidos grasos insaturados, alcaloides del tipo aporfínico, tropanos, quinoleínas y constituyentes fenólicos tales como las flavonas, flavonoides glicósidos, miricetina, galocatequinas etc. Los cuales son la base en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de patologías específicas (Barrera et al., 2016).

Ciertas especies del género *Croton* son empleadas ampliamente en medicina tradicional y han manifestado poseer una interesante actividad en el tratamiento de úlceras gástricas, leishmaniasis como antiinflamatorio, anti-malárico, anti-oxidante, antileucémico, anti- HIV, como antiofídico y en el control de plagas (Quevedo, Moreno, & Nuñez, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente *Croton* posee un abundante arsenal químico; es así que en varias investigaciones realizadas a especies de este género como: *Croton thurifer* Kunth (Morocho et al., 2020), *Croton sellowi* Baill (Palmeira et al., 2006), *Croton rivinifolius* Kunth (Luna & Suárez, 2018), *Croton micans* Sw (Suarez, Chavez, Compagnone, & Orsini, 2012), *Croton pedicellatus* Kunth (Lopes, Andrade, Rocha, & Deusdenia, 2012) y *Croton huberi* Steyererm (Suárez et al., 2005) pudieron aislar un flavonoide conocido como Tilirósido

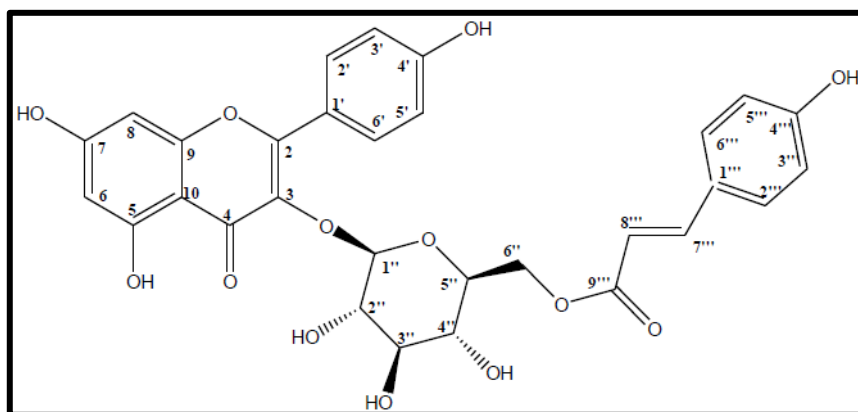
con fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{13}$ y peso molecular 594.525 g/mol; la estructura química del tilirósido se puede observar en la Figura 18.

El tilirósido pertenece a los flavonoides glucosídicos que se componen por tres partes diferentes: un flavonoide, un fenilo propanoide y un azúcar (Pierre & Gaston, 2017). Cabe mencionar que este importante flavonoide está contenido en varias plantas dietéticas, como el tilo, la rosa mosqueta y la fresa (Goto et al., 2012).

Diversos informes han manifestado importantes actividades farmacológicas de esta biomolécula (Pierre & Gaston, 2017). Además de poseer actividad antidiabético y antihiperlipidemia, el tilirosido ha manifestado una variedad de propiedades biológicas, entre las que incluye anticolinesterasa, antiprotozoal, antiinflamatorio, antirreumático, antioxidante, antioxidante, antiviral, citotóxico y efecto neuroprotector (Morocho et al., 2020).

Figura 20

Estructura química del Tilirósido



Nota. Adaptado de Chemical constituents of *Croton thurifer* kunth as α -glucosidase inhibitors, por Morocho et al., 2020.

Por otra parte, tanto en los estudios realizados a la especie *Croton micans* Sw (Suarez et al., 2012), *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch (Abega et al., 2014), *Croton sellowi* Baill (Palmeira et al., 2006), *Croton nepetaefolius* Ball (Santos & Rodríguez, 2008), *Croton stipuliformis* Bark (Ramos et al., 2008), *Croton macrobothrys* Baill (Motta et al., 2011), *Croton abutiloides* (Quituisaca, 2015) y *Croton thurifer* Kunth (Morocho et al., 2020), pudieron aislar un metabolito secundario conocido como β -sitosterol el cual posee fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$

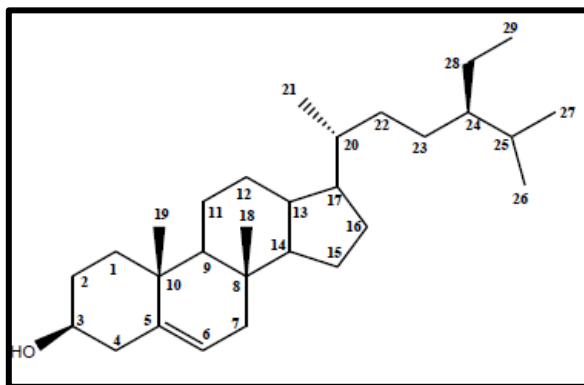
y peso molecular 414,71 g/mol. La estructura química del β -sitosterol se puede observar en la Figura 19.

El β -sitosterol pertenece al grupo de los fitosteroles que son compuestos que se encuentran presentes de forma natural en las plantas, estos esteroides contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y exhiben un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de los esteroides naturales tienen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el carbono 5. Los diferentes esteroides sólo varían en su cadena lateral, no obstante, muestran grandes diferencias en sus acciones biológicas en el organismo humano (Hung et al., 2005).

En estudios preclínicos y clínicos realizados demuestran que el β -sitosterol mejora algunas sintomatologías asociadas a la hiperplasia prostática benigna, tales como el volumen y frecuencia de la orina (Hung et al., 2005). Además, posee actividad antiinflamatoria ya que, en procesos inflamatorios, imposibilitan la liberación de factores proinflamatorios como la interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α por los monocitos activados, y además reduce el edema (Gupta et al., 1980). Otra actividad y no menos importante es su acción hipoglicémica ya que estimula la secreción de insulina, con lo cual aumenta los niveles o concentración de insulina circulante para el control de la glucosa en sangre. Aparte de esto, debido a su efecto regulador de la producción de anticuerpos, puede intervenir en los procesos inflamatorios asociados con el estado inicial de la diabetes tipo I, protegiendo contra la destrucción de las células β -pancreáticas, encargadas de la liberación de insulina (Ivorra, D'Ocon, Paya, & Villar, 1988).

Figura 21

Estructura química del β -sitosterol



Nota. Adaptado de Chemical constituents of *Croton thurifer* kunth as α -glucosidase inhibitors, por Morocho et al., 2020.

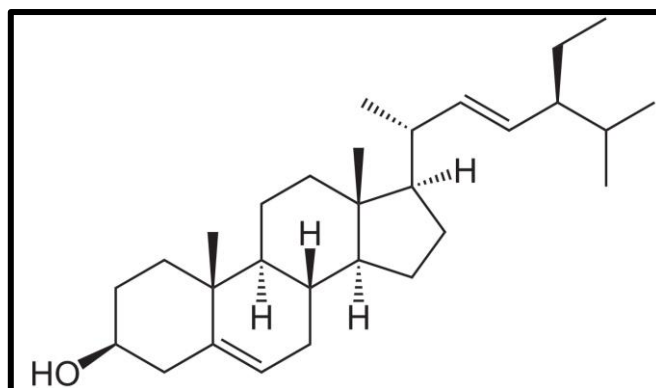
En la especie *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch (Abega et al., 2014), *Croton pierrei* Gagnep (Yenjai, Pitchayawasin, Bunsupa, & Sangkul, 2005), *Croton sellowi* Baill (Palmeira et al., 2006), *Croton nepetaefolius* Ball (Santos & Rodríguez, 2008), *Croton micans* Sw. (Suarez et al., 2012), y *Croton malambo* Karst (Suárez & Marquéz, 2014) pudieron aislar el compuesto estigmasterol cuya fórmula molecular es $C_{29}H_{48}O$ y cuyo peso molecular 412,69 g/mol. La estructura química del estigmasterol se puede observar en la Figura 20.

En cuanto a su estructura química es importante mencionar que al igual que el β -sitosterol, el estigmasterol pertenece al grupo de los fitoesteroles y tiene una estructura química similar, solo varía en su cadena lateral ya que presenta un doble enlace (Muñoz, Carlos, & Christian, 2011).

El estigmasterol actúa como precursor en la fabricación de progesterona semisintética, una importante hormona humana que cumple un papel fisiológico fundamental en los mecanismos de regulación y reconstrucción de tejidos relacionados con efectos estrógenos, de la misma manera actúa como intermediario en la biosíntesis de los andrógenos, estrógenos y corticoides (Boeckman, Bershas, Clardy, & Solheim, 1977). Otra importante función de este metabolito es que se utiliza como iniciador en la síntesis de vitamina D3 (Kametani & Furuyama, 1987). Además, ha demostrado actividad insecticida en un estudio realizado en pupas de *Drosophila melanogaster* (Peñaloza & Peláez, 2017).

Figura 22

Estructura química del Estigmasterol



Nota. Adaptado de Chemical Constituents of *Croton oligandrum* (Euphorbiaceae), por Abega et al., 2014.

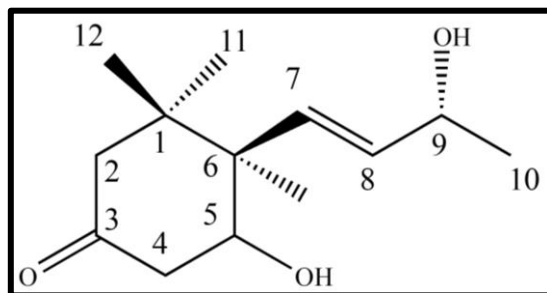
Por otra parte, el compuesto Vomifoliol o también denominado Blumenol A, ha sido aislado de especies como *Croton thurifer* Kunth (Morocho et al., 2020), *Croton huberi* Steyerm (Suárez et al., 2005), *Croton chilensis* (Bittner et al., 2001), *Croton ferrugineus* Kunth (Torres, 2019) y *Croton pedicellatus* Kunth (Lopes et al., 2012), este metabolito posee fórmula molecular $C_{13}H_{20}O_3$ y peso molecular de 224,3 g / mol. La estructura química del Vomifoliol se puede observar en la Figura 21.

El vomifoliol pertenece a los terpenoides, su estructura básica sigue un principio general que radica en residuos de 2-metilbutano, frecuentemente conocidos como unidades de isopreno, que son moléculas compuestas por 5 átomos de carbono. Particularmente el vomifoliol posee tres unidades de isopreno enlazadas y por este motivo corresponde al subgrupo de los sesquiterpenos (Wagner & Elmadfa, 2003).

En un estudio realizado por Stuart & Coke (1975), se demostró que este vomifoliol posee leve actividad antitumoral ya que se realizó ensayos de citotoxicidad in vitro de este compuesto contra líneas celulares tumorales humanas, en donde pudieron determinar que este metabolito fue generalmente citotóxico, pero no significativamente potente debido a que se trata de una molécula pequeña.

Figura 23

Estructura química del Vomifoliol o Blumenol A



Nota. Adaptado de Chemical constituents of *Croton thurifer* kunth as α -glucosidase inhibitors, por Morocho et al., 2020.

La quercitrina es un compuesto que se ha podido aislar y caracterizar de las especies *Croton huberi* Steyerm (Suárez et al., 2005), *Croton gossypifolius* Vahl (Suárez et al., 2013), *Croton glabellus* (Novoa, Céspedes, García, & Jorge, 1985) y *Croton funkianus* Mull (Vegas, 2010), su fórmula molecular es $C_{21}H_{20}O_{11}$ y su peso molecular 448,38 g/mol. La estructura química de la quercitrina se puede observar en la Figura 22.

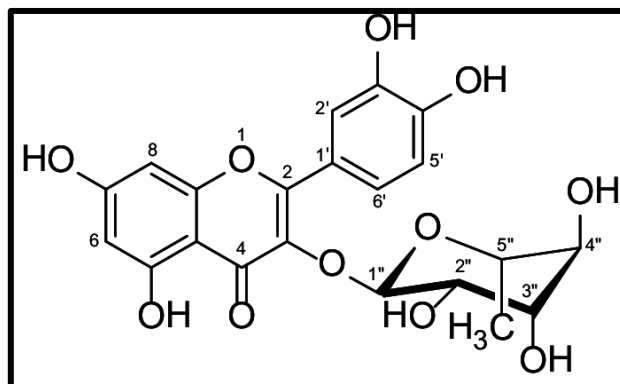
Este compuesto es un glucósido formado a partir del flavonoide quercetina y el desoxiazúcar ramnosa, Cabe mencionar que es un metabolito perteneciente a los flavonoides, específicamente al subgrupo de los flavonoles. Los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en el carbono 3 del esqueleto flavonoide, cuenta con un doble enlace entre el carbono 2 y 3, así como un oxígeno unido al carbono 4, adicionalmente esta molécula presenta una unión glicosídica a través del OH en el carbono 3. (Rocha, 2012).

El flavonoide quercitrina ha manifestado su capacidad de originar la mejora de la funcionalidad absortiva colónica, el cual es una de las complicaciones críticas en la enfermedad de Inflamación Intestinal, como las diarreas y otros. Siendo capaz de reponer completamente el transporte hidroelectrolítico colónico, lo que se traduce en una reducción de la incidencia de diarrea, uno de los síntomas que caracterizan la inflamación intestinal (Chong, 2011). En otro estudio se resalta la actividad antiinflamatoria de esta molécula así como su capacidad para permitir la regeneración de tejidos periodontales (Gómez, 2015). En un estudio realizado en ratas diabéticas se le asocia a esta biomolécula una actividad

protectora ya que previene las cataratas (Prieto, Morales, & Vicente, 2013). Finalmente según Novoa et al. (1985), quercetrina presenta actividad hipotensora (Novoa et al., 1985).

Figura 24

Estructura química de la Quercitrina



Nota. Adaptado de Chemical constituents from *Croton huberi*, por Suárez et al., 2005.

Conclusiones

Croton es uno de los géneros más importantes de plantas, el cual comprende una variedad de metabolitos secundarios como de usos, lo cual ha determinado su importancia medicinal.

En la especie *Croton* predomina la presencia de terpenos como de flavonoides, los cuales se caracterizan por poseer un extenso rango de actividades biológicas.

Recomendaciones

Profundizar el estudio de las especies pertenecientes al género *Croton* ya que los metabolitos contenidos en ellas son la base en la búsqueda de nuevos fármacos.

Referencias

- Abega, D., Kapche, D., Ango, P., Mapitse, R., Yeboah, S., & Ngadjui, B. (2014). Chemical Constituents of *Croton oligandrum* (Euphorbiaceae). *Verlag Der Zeitschrift Für Naturforschung*, (69c), 181–185. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2013-0207>
- Almeida, L., & Almeida, L. (2014). Fundamentación del modelo de gestión intercultural ecuatoriana en la atención primaria de salud. *Medisan*, 18(8), 1170. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v18n8/san19188.pdf>
- Arredondo, J., Echeguren, A., Arzate, P., & Medina, J. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium* en un hospital de tercer nivel. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 31(2), 56–61. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>
- Asadi, S., & Jamali, M. (2017). Assessment the Frequency of *Staphylococcus aureus* Golden Methicillin- Resistant (MRSA) and Vancomycin-Resistant VRSA in Determining the MIC Using E-Test. *Immunological Disorders and Immunotherapy*, 2(1). <https://doi.org/10.35248 / 2593-8509.17.2.112>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Avello, M., & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile Origins and situation of phytotherapy in Chile. *Artículo de Revisión Rev Med Chile*, 138, 1288–1293.
- Barrera, C. A. C., Gómez, D. C., & Castiblanco, F. A. (2016). Medicinal importance of *Croton* genus (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234–247.
- Bermúdez, A., Oliveira, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales. *Interciencia*,

30(8), 453–459.

Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M., & Silva, M. (2001). Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 419–431.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442001000400006>

Boeckman, R., Bershas, J., Clardy, J., & Solheim, B. (1977). A Convenient Synthesis of Progesterone from Stigmasterol. *Journal of Organic Chemistry*, 42(22), 3633–3634.
Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00442a044>

Brooks, G., Butel, J., Morse, S., Carroll, K., & Mietzner, T. (2010). *Microbiología médica*. The McGraw Hill.

Carrero, Y., & Dávila, M. (2018). Investigación científica basada en la medicina tradicional ¿Expectativa o realidad? *Mediciencias UTA*, 2(1), 7–9.
<https://doi.org/10.31243/mdc.uta.v2i1.52.2018>

Carro, A., & Lorenzo, R. (2011). *Química Analítica: materiales docentes grado de Ingeniería Química*.

Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.

Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(1), 28–40.
<https://doi.org/10.1108/eb020168>

Chacón, I., González, A., & Riley, C. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, 17(2), 189–202. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc17-2.bab>

Chiriboga, C. A., & Fontanilla, M. R. (2004). *Cultivos primarios de células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano : un modelo biológico para el estudio de los mecanismos de*

infección por enterococos. 24, 456–463. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v24n4/v24n4a13.pdf>

Chong, R. (2011). *Alimentos ricos en flavonoides y sus beneficios a la salud*. (Universidad Nacional de San Martín Tarapoto). Retrieved from <http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/3564/FIAI - Rodrigo Grey Chong Tuesta.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Christian, G. D. (2009). *Química Analítica, 6ta Edición* (McGraw-Hil; McGraw-Hill, Ed.). McGraw-Hill.

Cortés, I., Rodríguez, G., Moreno, E., Lara, J., Torres, B., & Montiel, E. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco , México. *Salud Pública México: Dagnóstico y Refererencias Epidemiológicos.*, 44(4), 297–302. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000400002

Diego, O., & Jessica, R. (2015). Uso De Plantas Medicinales Por Personas De Sabiduría. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25263/1/Tesis.pdf>

Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas, ¿Atributo panglossianos o de valor adquisitivo? *Ciencia*, Vol. 36, pp. 137–145.

Drago, M. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica Recombinant flavonoids of pharmaceutical relevance. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C.*, 38(4), 42–47. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938407>

Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R., & Santa, M. (2012). Resonancia magnética nuclear de protón: aplicaciones en química orgánica. Retrieved from Instituto de Química Médica website: http://are.iqm.csic.es/cursos/rmn_parte1.pdf

- Escusol, S. (2016). *Efectos biológicos del escualeno en la actividad gastrointestinal* (Universidad de Zaragoza). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=203394>
- Espina, M., Gillen, G., Calvo, B., & Meza, L. (2005). Caracterización morfológica y fisiológica de las especies *Cándida* aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*, 2(2), 110–119. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2052/205217265005.pdf>
- Esther, M., Sanchez, M., Mendez, J., & Perez, F. (2005). Metodos fisicos de separacion y purificacion de sustancia organicas. *Univerisad de Las Palmas de Gran Canaria*, 52. Retrieved from <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA11FQO.pdf>
- Fundación Chemonics Colombia. (2003). *Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas*.
- Garrido, R., Vélez, H., & Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: Nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. *VacciMonitor*, 22(1), 35–42.
- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 17(2), 145–152. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182000000200010>
- Gómez, M. (2015). *Testing of biomolecules and novel surfaces for periodontal and peri-implant regeneration* (Universitat de les Illes Balears). Retrieved from <https://diari.uib.cat/hemeroteca/Quercitrina-un-flavonoide-para-las-enfermedades.cid415322>
- Goto, T., Teraminami, A., Lee, J. Y., Ohya, K., Funakoshi, K., Kim, Y. II, ... Kawada, T. (2012). Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *Journal of Nutritional*

Biochemistry, 23(7), 768–776. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.04.001>

- Gupta, M., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., & Bhargava, P. (1980). Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -sitosterol. *Planta Médica*, 39, 157–163. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6967611/>
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, (122), 35–41.
- Hegazy, M. E. F., Mohamed, A. E. H. H., Aoki, N., Ikeuchi, T., Ohta, E., & Ohta, S. (2010). Bioactive jatrophone diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, 71(2–3), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.003>
- Hung, B., Falero, A., Pérez, C., Tirado, S., Balcinde, Y., & Pineda, M. (2005). Fitosteroles . Parte 1 . Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36(1). Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220583003.pdf>
- Ivorra, M., D´Ocon, M., Paya, M., & Villar, A. (1988). Antihyperglycemic and insulin releasing effects of β -sitosterol 3- β -D-glycoside and its aglycone β sitosterol. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3071280/>
- Kametani, T., & Furuyama, H. (1987). Synthesis of Vitamin D3 and Related Compounds. *Institute of Medicinal Chemistry*, 7(2), 147–171. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3033409/>
- Kocur, M., Kloos, W. E., & Schleifer, K. (2006). The Genus *Micrococcus*. In *Prokaryotes* (pp. 961–971). https://doi.org/10.1007 / 0-387-30743-5_37
- Laurella, S. L. (2017). *Resonancia magnética nuclear: Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*. Retrieved from <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/781>

- Lopes, E., Andrade, M., Rocha, E., & Deusdenia, O. (2012). Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Química Nova*, 35(11), 2169–2172. Retrieved from <https://www.scielo.br/pdf/qn/v35n11/v35n11a12.pdf>
- López, M. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4), 108–113. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Luna, R., & Suárez, A. (2018). *Estudio fitoquímico de los extractos apolares de la especie ecuatoriana Croton rivinifolius* Kunth. 89.
- Maciel, M. A. M.; Cortez, J. K. P. C.; Gomes, F. E. S. (2006). O gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. *Revista Fitos*, 2(03), 54–73.
- Martínez, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. 39. Retrieved from <https://cutt.ly/YgrNjV2>
- Morocho, V., Sarango, D., Cruz-Erazo, C., Cumbicus, N., Cartuche, L., & Suárez, A. I. (2020). Chemical constituents of *Croton thurifer* kunth as α -glucosidase inhibitors. *Records of Natural Products*, 14(1), 31–41. <https://doi.org/10.25135/rnp.136.18.11.1069>
- Morón, F., & Jardines, J. (1997). La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 35–41.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- Motta, L., Furlan, C., Santos, D., Salatino, M., Duarte, J., Negri, G., ... Salatino, A. (2011). Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 972–977. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000174>
- MSPE. (2016). *Plantas Medicinales de la Sierra*. 1–10. Retrieved from

<https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/assoc/HASH0190.dir/doc.pdf>

Muñoz, A., Carlos, U., & Christian, E. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles : Propiedades saludables. *Revista Horizonte Médico*, 11(2). Retrieved from https://medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2011_2/Art6_Vol11_N2.pdf

Murillo, E., Pardo, D., Ortíz, L., Tacha, A., Mendez, J., & Murillo, W. (2014). Estudio químico y etnobotánico de *Croton leptostachyus*. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(149), 356. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.116>

Novoa, B., Céspedes, A., García, L., & Jorge, O. (1985). QUERCITRINA : Un flavonoide con actividad hipotensora, obtenido de *Croton glabellus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 4(2), 7–13. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56641>

Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. *Estrategia de La OMS Sobre Medicina Tradicional*, 76. Retrieved from <https://cutt.ly/dgrNJZZ>

Palmeira, S., Alves, V., Fabyanne, M., Vieira, L., Conserva, L., & Lemos, R. (2006). Artigo Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(3), 397–402. Retrieved from <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n3/a18v16n3.pdf>

Pascual, M. J., & Correal, E. (2010). La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. *Grasas y Aceites*, 43(1), 39–44. <https://doi.org/10.3989/gya.1992.v43.i1.1195>

Peñaloza, G., & Peláez, C. (2017). Isolation of stigmasterol from seeds of *Crotalaria juncea* L. (sunn hemp) and bioactivity against *Drosophila melanogaster*. *Revista Cubana de*

Plantas Medicinales, 22(3). Retrieved from <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/537>

Pérez, M. D., Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147–161. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf>

Pierre, L., & Gaston, W. (2017). TILIROSIDE: Biosynthesis, Bioactivity and Structure Activity Relationship (SAR)-A Review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 343–348. Retrieved from www.phytopharmajournal.com

Prieto, M., Morales, A., & Vicente, L. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*, 30, 171–181. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/919/91931189008.pdf>

Quevedo, R., Moreno M., B., & Nuñez, L. (2007). Contribucion al estudio químico y de bioactividad de dos especies nativas: (*Croton bogotanus*.cuatr. y *Croton funckianus*.cuatr.) euphorbiaceae. *Scientia et Technica*, 1(33), 391–393. <https://doi.org/10.22517/23447214.6147>

Quituisaca, A. (2015). *Extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de Croton abutiloides de la familia Euphorbiaceae en la provincia de Loja*. (Universidad Técnica Particular de Loja). Retrieved from [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/12390/1/Quituisaca Carrillo Andrea del Cisne.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/12390/1/Quituisaca%20Carrillo%20Andrea%20del%20Cisne.pdf)

Ramírez Hernández, B. C., Robles Arellano, G., García de Alba García, J. E., Zañudo Hernández, J., Salcedo Rocha, A. L., & García de Alba Verduzco, J. (2018). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*, (39), 29. <https://doi.org/10.29340/39.238>

- Ramos, F., Takaishi, Y., Kashiwada, Y., Osorio, C., Duque, C., Acuña, R., & Fujimoto, Y. (2008). Ent-3,4-seco-labdane and ent-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 69, 2406–2410. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.025>
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. In *Universidad Nacional de La Plata* (Vol. 1). Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27885/Documento_completo__.pdf?sequence=1
- Rocha. (2012). Flavonoides. *Calameo*. Retrieved from <https://es.calameo.com/read/001752202bc2cd13fae37>
- Rodríguez, C. N., Zarate, A. G., & Sánchez, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119–129. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México: Diagnóstico y Referencias Epidemiológicos*, 44(5). Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>
- Ronco, A. L. (2009). Usos potenciales del Escualeno. *Tendencias En Medicina*, 4.
- Rondón, M., García, I., Cornejo, X., Rojas, J., & Terán, W. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacologyonline*, 3, 19–28. Retrieved from <https://cutt.ly/ZgrMyKG>
- Salatino, A., Salatino, M., & Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33. Retrieved from <https://cutt.ly/igrMsop>
- Santos, H., & Rodríguez, F. (2008). Diterpenos casbanos e acetofenonas de Croton

- nepetaefolius (Euphorbiaceae). *Química Nova*, 31(3), 601–604.
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. S. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, Vol. 5, pp. 222–247. <https://doi.org/10.3923/jps.2010.222.247>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis fundamental*. Retrieved from <https://cutt.ly/9grMJC7>
- Souza, A., Ceolin, T., Vargas, N., Heck, R. M., Vasconcellos, C. L., Borges, A. M., & Mendieta, M. C. (2011). Plantas medicinales utilizadas en la salud infantil. *Enfermería Global*, 46–52.
- Stuart, K. L., & Coke, L. B. (1975). Short Communication The Effect of Vomifoliol on Stomatal Aperture. *Planta*, 122, 307–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00385281>
- Suárez, A., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R., Tillett, S., & Torrico, F. (2013). Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), 161–170. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rlq/v41n3/v41n3a3.pdf>
- Suarez, A., Chavez, K., Compagnone, R., & Orsini, G. (2012). Perfil Fitoquímico y Farmacológico de *Croton micans* Sw. *Revista de La Facultad de Farmacia*, 75(2). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/271700716%0A>
- Suárez, A., & Marquéz, M. L. (2014). *Estudio Fitoquímico de las Hojas de la Planta Croton malambo Karst* (Universidad Central de Venezuela). Retrieved from <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877985/estudio-fitoquimico-de-las-hojas-de-la-planta-croton-malambo-karst.pdf>
- Suárez, A., Tapias, E., Compagnone, R., Tillett, S., Diaz, B., Canelón, D., & Blanco, Z. (2005). Chemical constituents from *Croton huberi*. *Revista Facultad de Farmacia*, 68(1–2). Retrieved from http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/article/view/88

- Torres, J. (2019). *Estudio fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad biológica a partir de la especie Croton ferrugineus Kunth*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- UNAM. (2007). *Técnicas cromatográficas*. Universidad Autónoma de México. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf
- Usó, J., Gil, M., Gomila, B., & Tirado, M. D. (2003). Endocarditis por *Micrococcus luteus*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(2), 117. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72895-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72895-X)
- Vázquez, C., Martín, A., Silóniz, M., & Serrano, S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. *REDUCA (Biología)*, 3(5), 15–38. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/819/834>
- Vegas, S. (2010). *Estudio químico de los compuestos bioactivos de hojas senescentes de Croton funckianus* (Universidad Nacional de Colombia). Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/3168/1/197456.2010.01.pdf>
- Wagner, C., & Elmadfa, I. (2003). Biological Relevance of Terpenoids. *Annals of Nutrition y Metabolism*, 47, 95–106. <https://doi.org/10.1159/000070030>
- Yenjai, C., Pitchayawasin, S., Bunsupa, S., & Sangkul, S. (2005). Chemical Constituents of *Croton pierreii* Gagnep. *Perspective in Natural Product Chemistry*, 3, 123–125. Retrieved from <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.677.16>