

**Universidad de La Habana
Facultad de Química
Centro de Estudios de Productos Naturales**

**Fitoquímica de especies cubanas del género
Croton (Euphorbiaceae), con potencial
actividad biológica**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Químicas**

ARMANDO LUIS PAYO HILL

La Habana

2015

**Universidad de La Habana
Facultad de Química
Centro de Estudios de Productos Naturales**

**Fitoquímica de especies cubanas del género
Croton (Euphorbiaceae), con potencial
actividad biológica**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Químicas**

Por

Autor: MCs. Armando Luis Payo Hill

**Tutores: Prof. Tit., Lic. Iraida Spengler Salabarría Dr.C.
Prof. Tit., Lic. Hermán Vélez Castro Dr.C.**

**La Habana
2015**

Agradecimientos.

A mis tutores la Dr.C. Iraida Spengler Salabarría por acogerme como su pupilo sin vacilación y al Dr.C. Hermán Vélez Castro por su amistad e incondicional apoyo en todo momento. A ambos, gracias por su guía científica y sus sugerencias sabias y oportunas.

A los Dr. Jorge Alberto Pino Alea y Dr. David Marrero Delange, consultores y colegas en el trabajo con los aceites esenciales y los extractos hexánicos. Así como, a la Dra. Sonia Rosete Blandaris por estar presente en momentos claves de la culminación de este documento de tesis y por la edición del mismo.

A la Facultad de Química de la Universidad de La Habana (FQ-UH) y en particular al claustro de profesores del Doctorado Curricular Colaborativo en Química, por su empeño en proporcionar todo el conocimiento necesario para aumentar mi nivel profesional y técnico, así como a la Dra. Julieta Coro Bermello y a la especialista Migdalia Romero, por la preocupación constante con los detalles burocráticos que exige todo proceso de obtención de Grado Científico.

Al Centro de Estudios de Productos Naturales de la FQ-UH, por haber facilitado sus instalaciones, equipamientos y reactivos para desarrollar parte del trabajo experimental y acogerme como uno más del colectivo, por lo que nunca me sentí como un extraño. Quiero resaltar en especial la colaboración del Lic. Antonio Fernández por haber podido contar con él, sin importarle horario, día, vacaciones, ni fines de semanas. A la técnica Caridad Elvira Pérez Fuentes por estar siempre cuando me fue necesaria su ayuda, a la MCs Trina Haydé García Pérez por su incondicional colaboración y por auxiliarme en el aprendizaje de programas informáticos ChemDraw Ultra y MestreNova.

A mis preponentes, Drs. Adonis Bello Alarcón y Daniel García Rivero, así como a la Dra. Clara Noguerras, por sus sabias recomendaciones y sugerencias para mejorar este documento de tesis que hoy se defiende.

A los compañeros de la Dirección de Recursos Humanos de la alta casa de estudios por su gran cooperación, en especial a su Director Juan J. Rodríguez Martínez por su incondicionalidad, así como a otras dependencias y trabajadores de dicho centro que me brindaron su apoyo.

A los Drs. Lourdes C. dos Santos y Wagner Vilegas, por facilitar la realización de los espectros RMN ^1H , ^{13}C y bidimensionales en los Laboratorios del Instituto de Química de Araraquara y el Campus Experimental Paulista de San Vicente, Sao Pablo, Brasil. Así como, al Dr. Lucas Rastrelis de la Universidad de Salerno, Italia y al Dr. Wilmer Perera Córdova por facilitarme bibliografía actualizada, así como a este último por la realización de análisis de compuestos fenólicos de las muestras.

Al Instituto de Ecología y Sistemática (IES), por fomentar el interés por mi superación profesional, que permitirá afrontar empeños superiores en el futuro.

A mis colegas de los grupos de Fitoquímica y Biotecnología Vegetal: Téc. Zulaika Vázquez Díaz, MCs. Miriam Liset Prede Rodríguez, Esp. Carlos Alberto Pino González y Téc. Virginia Saharay Carrera Díaz, que sin su ayuda cotidiana y valiosa, estos resultados no habrían podido ser expuestos en el día de hoy.

A mis compañeros de la Subdirección de Botánica del IES, que comprendieron la necesidad de cooperar con disciplina y entrega, para poder sobrellevar mi responsabilidad como Subdirector y lograr el objetivo de defender el doctorado.

A la Ingeniero Ramona Oviedo Prieto (Curadora del Herbario del IES), por su desinteresada ayuda, no sólo en la colecta e identificación de las especies, sino por todos los momentos en que he necesitado de su colaboración. Al igual que al Ing. Ricardo Rosa Angulo, por las colectas y fotos.

A la Téc. Tomasa González Echeverría, por la elaboración de los mapas de distribución de las especies y al Ilustrador Científico Gustavo Pineda Quiala por su esmero en la elaboración de las ilustraciones de los ejemplares que hoy se exponen en este documento.

A los Drs. Ileana Fernández García, del grupo de Entomología y Julio de Jesús Mena Portales, del grupo de Micología del IES por la revisión de la nomenclatura taxonómica de las especies de insectos y microorganismos, respectivamente, incluidas en los capítulos del presente documento.

Al Grupo de Productos Naturales y Homeopatía del Instituto Finlay, especialmente a la MCs. Olga Alicia Echemendía Arana; así como a la MCs. Odalys Fidalgo Perera y al resto de su colectivo, por la realización de los ensayos antimicrobianos, complemento necesario e imprescindible de los resultados obtenidos, que dieron realce a los mismos.

Al Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), en especial a los Drs. Rubén Avilés Pacheco y Margarita Alfonso Hernández y a las técnicas Nancy Ramos Gómez y Yolanda Martínez Suárez por los ensayos como control de plagas, que coadyuvaron a la novedad científica de esta tesis. Sin olvidar a mi colega de curso en la Maestría y en el Doctorado, MCs. Daylin Gamiotea Turro, por estar presente siempre que fue necesario.

A Mirmaida Payo Rey quien ha sido mi tabla salvadora en asuntos de tesis, por su reincidencia oportuna y decidida.

A mis hijos, Daryl Armando Payo Torres y Emilio Alejandro Payo Prede, por su comprensión.

A toda mi familia, por su apoyo y paciencia, especialmente a mi hermana Lisette, por su constancia, preocupación y ocupación.

A todos, los mencionados y olvidados involuntariamente,

Muchas Gracias.

A mi familia

ABREVIATURAS

C.: *Croton*

CG-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Masas

CAT: Crudo de Alcaloides Totales

CLAE: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

ESI-IT-MS/MS: Inyección directa con ionización por electronebulización trampa de iones y Análisis espectral de masas en *tandem*

Fig.: Figura

HAC: Herbario de la Academia de Ciencias

sp. div.: Especies diversas

D: Desconocido

H: Hojas

Fr: Frutos

Pa: Parte aérea

Pc: Planta completa

C: Corteza

T: Tallos

R: Raíces

S: Semillas

L: Látex

A: Aceite

UV: Ultravioleta

IR: Infrarrojo

RMN ¹H: Resonancia Magnética Nuclear Protónica

δ: Desplazamiento o Corrimiento químico

ppm: Partes por millón

SNC: Sistema Nervioso Central

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CM#: *Croton micradenus* #

Rf: Factor de retención

PCMH I: Precipitado obtenido de *C. micradenus* extracto hexánico

CHCl₃/EtOH: Cloroformo–Etanol

RMN ¹³C: Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13

MSTFA: N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida

MeOH/H₂O: Metanol/Agua

ELS: Detector evaporativo de dispersión de luz	DEPT: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
IFD: Índice de fago depresión	HC-COSY Experimento de correlación heteronuclear directa
Ir: Índice de retención	λ : Longitud de onda
NI: No identificados	col: colaboradores
tR: Tiempo de retención	max: máxima
tr: trazas	Me: metilo
DMSO: dimetilsulfóxido	Sist.: Sistema
CDCl ₃ : Cloroformo deuterado	EM: Espectrometría de Masas
TMS: Tetrametilsilano	int. rel.: Intensidad relativa
RDA: Reordenamiento Retro Diels Alder	$[\alpha]_D$: Rotación específica
¹ H- ¹ H-COSY: Experimento de correlación mononuclear protónica directa	c: concentración
HSQC: Correlación heteronuclear a simple cuanto.	OMe: Oxígeno unido a metilo (CH ₃)
HMQC: Correlación heteronuclear múltiple cuántica	Extr.: Extractos
	v/v: Volumen/Volumen

SÍNTESIS

La abundancia, elevado porcentaje de endemismos y diversos usos atribuidos popularmente a especies de la flora cubana, incluidas las del género *Croton*, constituyen aspectos de interés para Fitoquímicos. El objetivo del trabajo fue identificar metabolitos secundarios en los aceites esenciales y extractos bioactivos de las hojas y tallos de la especie endémica *Croton micradenus*, y determinar la presencia de estos en los endemismos *Croton myricifolius* y *Croton spiralis*, que crecen en la zona costera Maisí-Guantánamo. Por hidrodestilación se obtuvieron los aceites esenciales: *C. micradenus* 2,0%; *C. myricifolius* 0,9% y *C. spiralis* 0,5%. Se identificaron en total 153 compuestos mediante CG-MS, 22 comunes para los tres aceites. Se determinaron un total de 64 compuestos por CG-MS, 57 comunes para los extractos hexánicos de las tres especies. Se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos en el crudo de alcaloides de la especie *C. micradenus*, cuatro alcaloides conocidos y por primera vez se reportan norocobotrina y nildahillina con esqueleto morfinandienónico. Se precisó mediante CLAE/ESI-IT-MS/MS, la diferencia en los perfiles de alcaloides entre dos muestras de *C. micradenus*, colectadas en diferentes localidades y fechas de colectas, así como la presencia de alcaloides aislados de esta especie en *C. myricifolius* y *C. spiralis*. Se confirmó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y de los extractos hexánicos de *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como la actividad antiapetitiva del extracto etanólico de las hojas y tallos de *C. micradenus* frente a *Mocis latipes*.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS	
SÍNTESIS	
INTRODUCCIÓN	1
Problema científico	3
Hipótesis	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Novedad científica	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Aspectos botánicos del género <i>Croton</i>	5
1.2. Aspectos etnobotánicos del género <i>Croton</i>	8
1.2.1. Medicinales	9
1.2.2. Control de plagas y enfermedades	11
1.3. Aspectos químicos el Género <i>Croton</i>	12
1.3.1. Alcaloides aporfínicos	15
1.3.2. Alcaloides morfinandienónicos	16
1.3.3. Aceites esenciales	16
1.3.4. Aldehídos, alcoholes grasos, hidrocarburos saturados, esteroides y ácidos grasos	18
1.4. Espectroscopía	19
1.4.1. Ultravioleta (UV)	19
1.4.1.1. Aporfinas	19
1.4.1.2. Morfinandienonas	20
1.4.2. Infrarrojo (IR)	20
1.4.2.1. Morfinandienonas	20
1.4.3. Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico	20
1.4.3.1. Aporfinas	20
1.4.3.2. Morfinandienonas	20
1.4.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	22
1.4.4.1. Aporfinas	22
1.4.4.2. Morfinandienonas	23
1.5. Farmacología	23
1.5.1. Aporfinas	23
1.5.2. Morfinandienonas	23
1.5.3. Aceites esenciales	24
1.5.4. Aldehídos, alcoholes grasos, hidrocarburos saturados, esteroides y ácidos grasos	25

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.1. Reactivos y equipos	26
2.2.1. Reactivos	26
2.2.2. Equipamientos	26
2.2. Recolecta de las especies	27
2.3. Procesamiento del material vegetal	27
2.4. Obtención de aceites esenciales de <i>C. micradenus</i> 1, <i>C. myricifolius</i> 1 y <i>C. spiralis</i> 1	28
2.4.1. Determinación del contenido de humedad del material para la obtención de los aceites esenciales	29
2.4.2. Determinación del contenido de aceite volátil	29
2.5. Técnicas cromatográficas	30
2.5.1.- Cromatografía de columna	30
2.5.1.1. Preparación de las columnas cromatográficas	30
2.5.2. Cromatografía de capa delgada	30
2.5.3. Cromatografía de capa delgada preparativa	30
2.5.4. Reveladores	31
2.6. Obtención, fraccionamiento y purificación de los CAT	31
2.6.1. Obtención de extractos y CAT de <i>C. micradenus</i> 2, <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2	31
2.6.2. Obtención del crudo de alcaloides totales de <i>C. micradenus</i> 1	32
2.6.3. Fraccionamiento y purificación de alcaloides de <i>C. micradenus</i> 1	32
2.6.4. Métodos de caracterización de alcaloides de <i>C. micradenus</i> 1	34
2.7. Análisis por espectrometría de Gases-Masas de los aceites esenciales	34
2.8.1. Preparación de las muestras	34
2.8.2. Obtención de los espectros de masas y cromatogramas	34
2.8. Análisis por espectrometría de Gases-Masas de los extractos hexánicos	35
2.8.1. Preparación de las muestras	35
2.8.2. Obtención de los espectros de masas y cromatogramas	35
2.9. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	36
2.9.1. Preparación de las muestras	36
2.9.2. Obtención de los perfiles cromatográficos	37
2.10. Análisis por espectrometría de masas en <i>tándem</i> (ESI-IT-MS/MS)	37
2.10.1. - Preparación de las muestras	37
2.10.2. - Análisis por inyección directa	37
2.11. Ensayos biológicos	38

2.11.1. Bioensayo antimicrobiano de muestras de las tres especies en estudio	38
2.11.2. Bioensayo como control de plagas (<i>Mocis latipes</i> L.)	39
2.11.2.1. Ensayo antiapetitivo del extracto clorofórmico de <i>C. micradenus</i> 1	39
CAPÍTULO 3. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Composición química, rendimiento y actividad biológica de los aceites esenciales de las hojas de las especies <i>C. micradenus</i> 1, <i>C. myricifolius</i> 1 y <i>C. spiralis</i> 1	40
3.1.1. Composición de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio	40
3.1.2. Rendimiento de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio	43
3.1.3. Actividad biológica de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio	45
3.2. Composición química de PCMH-I y de los extractos hexánicos de las hojas y tallos de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2. Actividad biológica	46
3.2.1. Composición química de la fracción activa PCMH-I del extracto hexánico de las hojas y tallos de la especie <i>C. micradenus</i> 2	46
3.2.2. Composición química de los extractos hexánicos de las hojas y tallos de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2	47
3.2.2.1. Composición química del extracto hexánico de las hojas y tallos de <i>C. myricifolius</i> 2	47
3.2.2.2. Composición química del extracto hexánico de las hojas y tallos de <i>C. spiralis</i> 2	47
3.2.2.3. Comparación con los metabolitos detectados en PCMH-I con los identificados en los extractos hexánicos de las hojas y tallos de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2	48
3.2.3. Actividad antimicrobiana de la fracción PCMH-I obtenida del extracto hexánico de las hojas y tallos de la especie <i>C. micradenus</i> 2 y de los extractos hexánicos de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2	49
3.3. Caracterización de los compuestos presentes en el CAT de las hojas y tallos de la especie <i>C. micradenus</i> 1 con potencial actividad antiapetitiva	51
3.3.1. Alcaloide CM1	52
3.3.2. Alcaloide CM2	60
3.3.3. Alcaloide CM 3	62
3.3.4. Alcaloide CM4	67
3.3.5. Alcaloide CM5	72
3.3.6. Alcaloide CM6	79
3.3.7. Consideraciones generales	86

3.3.8. Resultados de las pruebas biológicas	88
3.3.8.1. Ensayo como control de plagas	88
3.4. Comparación de la composición de alcaloides aislados de <i>C. micradenus</i> 1 con el CAT de la muestra <i>C. micradenus</i> 2 e identificación de los alcaloides aislados de <i>C. micradenus</i> 1 en los CAT de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2	88
3.4.1. Comparación de la composición de alcaloides aislados de <i>C. micradenus</i> 1 con el CAT de la muestra <i>C. micradenus</i> 2, mediante CLAE y ESI-IT-MS/MS	88
3.4.2. Identificación de los alcaloides aislados de <i>C. micradenus</i> 1 en los CAT de <i>C. myricifolius</i> 2 y <i>C. spiralis</i> 2, mediante CLAE y ESI-IT-MS/MS.	93
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La riqueza y diversidad de las especies nativas (alrededor de 7500), naturalizadas y exóticas cultivadas y el elevado porcentaje de endemismos de la flora cubana (51,4 %)¹, constituyen elementos de interés para investigaciones fitoquímicas de plantas con potencial actividad biológica.

Dentro de esta alta diversidad vegetal, sobresale la familia Euphorbiaceae, no sólo por ser una de las más numerosas en nuestra flora, sino también por la cantidad y diversidad de elementos químicos y de aplicaciones que posee². Dentro de ella, las especies pertenecientes al género *Croton* L. no constituyen una excepción; ocupando un importante lugar las medicinales, así como aquellas utilizadas en el control de plagas y enfermedades.

En Cuba, la mencionada familia está integrada por 38 géneros, entre los cuales *Croton* resalta tanto por el número de especies que lo componen (53), de ellas 37 endémicas que representan el 69,8 %³, como por los reportes en cuanto a los usos en medicina tradicional y otros fines^{2,4-5}. Por citar algunos ejemplos, se pueden relacionar su efectividad como diurética, diaforética, detersiva, antiespasmódica, antimalárica, antimicrobiana, insecticida, molusquicida y nematocida.

Dada la variada actividad fisiológica que desencadenan, los alcaloides constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios de las plantas. Según resultados preliminares en la detección y posteriores en el aislamiento y caracterización de estos fitoconstituyentes en especies cubanas de este género, se reporta que el contenido en la planta endémica *Croton micradenus* Urb., fue 0,41 % en las hojas y 0,05 % en los tallos⁶, así como la presencia de alcaloides con esqueletos morfinandienónico (ocobotrina, sinoacutina y 8,14-dihidrosalutaridina) y aporfínico (isoboldina)⁷.

De igual forma, los aceites esenciales han sido ampliamente usados como bactericida, virucida, fungicida, antiparasitario, insecticida y en aplicaciones cosméticas. Ellos contienen una variedad de moléculas volátiles como los terpenos, terpenoides y componentes aromáticos derivados del fenol, los cuales le confieren las diversas acciones biológicas que se les atribuyen⁸⁻⁹.

No menos interesantes por la actividad biológica mostrada han sido los extractos hexánicos de varias especies de la familia, incluyéndose las del género *Croton*, entre ellas *Croton campestris* A.¹⁰ y *Croton scabiosus* Bebb.¹¹ por exhibir actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Pseudomonas aeruginosa* (Schoroeter) Migula y *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers, entre otros microorganismos patógenos.

Investigaciones fitoquímicas y etnobotánicas se han enfocado principalmente durante décadas en la búsqueda de un solo “principio activo” en las plantas, asumiendo que tienen uno o unos ingredientes que determinan sus efectos terapéuticos. Pero el sistema tradicional de medicina, generalmente asume que una sinergia de todos los ingredientes de las plantas provoca el máximo de eficacia terapéutica¹².

La producción de estos metabolitos secundarios puede afectarse por factores genéticos, ontogénicos y medioambientales, incluso la edad de los individuos, las estaciones, y el nivel de nutrientes, tensión osmótica y fotoperiodo¹³.

Las poblaciones fundamentales de las especies del género *Croton* en el archipiélago cubano se caracterizan por crecer en ecosistemas costeros y pre-costeros, en condiciones de extrema sequía, alta intensidad solar y de fuertes vientos (brisas) sostenidos la mayor parte del tiempo¹⁴. *C. micradenus* es una de las especies que caracteriza al Distrito Fitogeográfico de la Zona Costera Maisí-Guantánamo por su representatividad en la mayor parte de la vegetación

xerofítica del sur de las provincias orientales principalmente y que junto a las especies endémicas *Croton myricifolius* Griseb. y *Croton spiralis* Muell. Arg. entre otras del género, integran las principales poblaciones en esta región Oriental de Cuba¹⁵⁻¹⁶.

Considerando los aspectos anteriormente planteados nos encontramos con el siguiente **Problema científico**: Se desconoce la composición de metabolitos secundarios presentes en especies endémicas del género *Croton* que crecen en Cuba en la zona costera Maisí-Guantánamo con potencial actividad biológica.

Para resolver dicho problema nos planteamos la siguiente **Hipótesis**:

Es posible caracterizar metabolitos secundarios con potencial actividad biológica a partir de los aceites esenciales y extractos de las hojas y tallos de especies endémicas del género *Croton* que crecen en la zona costera Maisí-Guantánamo, Cuba.

Atendiendo a la hipótesis planteada, se decide realizar el estudio químico de la especie endémica *C. micradenus*, potencialmente medicinal¹⁷, y comparar los resultados con las especies endémicas *C. myricifolius* y *C. spiralis* que crecen en la zona costera Maisí-Guantánamo, para lo cual se formula como **objetivo general**:

- ✓ Realizar el estudio químico de diferentes fracciones de las hojas y tallos de las especies endémicas *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis* que crecen en la zona costera Maisí-Guantánamo.

Y los siguientes **objetivos específicos**:

- ✓ Identificar los compuestos presentes en los aceites esenciales de las hojas de las especies *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis* con potencial actividad antimicrobiana, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Masas (CG-MS).

- ✓ Comparar los compuestos presentes en la fracción con mayor actividad antimicrobiana del extracto hexánico de las hojas y tallos de la especie *C. micradenus* con los extractos hexánicos de *C. myricifolius* y *C. spiralis*, mediante CG-MS.
- ✓ Identificar alcaloides presentes en el crudo de alcaloides totales (CAT) de las hojas y tallos de la especie *C. micradenus* con potencial actividad antiapetitiva, mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos.
- ✓ Determinar la presencia de algunos alcaloides identificados en *C. micradenus*, en los CAT de *C. myricifolius*, *C. spiralis* y de otra muestra de *C. micradenus* recolectada en diferente localidad y fecha de recolecta, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) e Inyección Directa con Ionización por Electronebulización Trampa de Iones y Análisis Espectral de Masas en *Tandem* (ESI-IT-MS/MS).

Novedad científica

- Por primera vez se determina la composición química de los aceites esenciales de las tres especies mediante CG-MS y se comprueba la actividad antimicrobiana.
- Se identifican por primera vez los constituyentes de la fracción más activa del extracto hexánico de *C. micradenus*, se comparan con los extractos hexánicos de las otras dos especies endémicas cubanas mediante CG-MS y se determina la acción antimicrobiana.
- Se caracterizan dos nuevos alcaloides morfinandienónicos para la ciencia en la especie endémica cubana *C. micradenus*, mediante técnicas espectroscópicas.
- Se detectan diferencias en la composición de los CAT de *C. myricifolius*, *C. spiralis* y entre las dos muestras estudiadas de *C. micradenus*, utilizando las técnicas de CLAE y ESI-IT-MS/MS.

CAPITULO 1. - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos botánicos del género *Croton*

La familia *Euphorbiaceae* a nivel mundial está integrada por unos 300 géneros y cerca de 5000 especies, con una distribución predominantemente tropical, aunque existen fuertes concentraciones de tipo local, particularmente del género *Euphorbia*, en regiones extratropicales, como el sur de los Estados Unidos, la cuenca mediterránea, el Medio Oriente y el sur de África.

En los trópicos, la concentración más rica de la familia se encuentra quizás en la región Indomalaya, con los Neotrópicos en segundo lugar. El género *Croton*, por ejemplo, está muy bien representado en América del Sur, con unas 300 especies en Brasil. Aunque está bien representada en África, no es tan rica ni tan diversa como en los otros dos centros tropicales (Indomalasia y Nuevo Mundo)¹⁸ (Fig. 1).

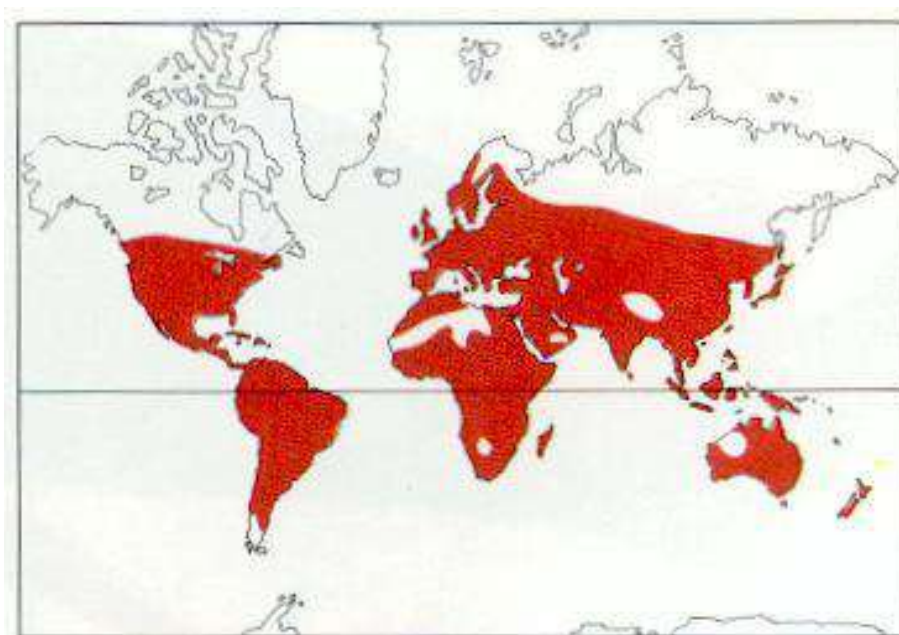


Fig. 1. Esquema de distribución mundial de la familia Euphorbiaceae¹⁸.

En el área caribeña (Indias Orientales) según Acevedo-Rodríguez y Strong³, la familia Euphorbiaceae abarca un total de 431 especies y se encuentra entre las diez familias de plantas con semillas más diversas, con un total de 56 géneros (11 endémicos, 19,6 %) y 314 especies endémicas (72,8 %), de las cuales pertenecen al género *Croton* unas 100 (80 endémicas, 80 %).

En Cuba, esta familia está representada por 38 géneros y cerca de 255 especies. De ellas, 53 corresponden al género *Croton*, de las cuales 37 son endémicos (69,8 %), entre ellas se incluyen *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis*, además de reunir a 15 especies nativas y 1 cultivada (*Croton tiglium* L.)³.

La distribución geográfica en el archipiélago cubano de las especies *C. micradenus* y *C. spiralis*, endemismos locales de la zona costera Maisí-Guantánamo y de la especie *C. myricifolius* con una distribución más amplia se representan en las Fig. 2, 3 y 4, a partir de la información contenida en el Herbario de la Academia de Ciencias (HAC) “Onaney Muñiz”, del Instituto de Ecología y Sistemática del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

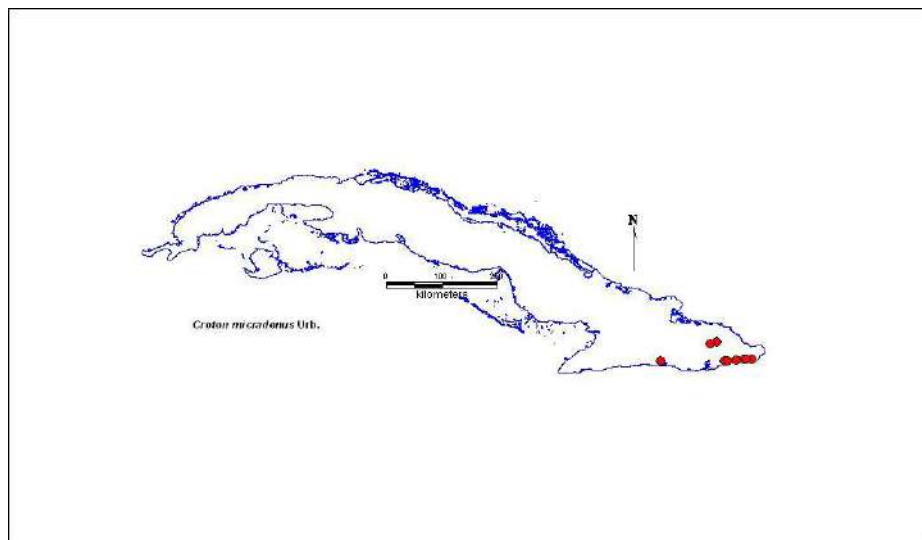


Fig. 2. Mapa de distribución de la especie *C. micradenus*.

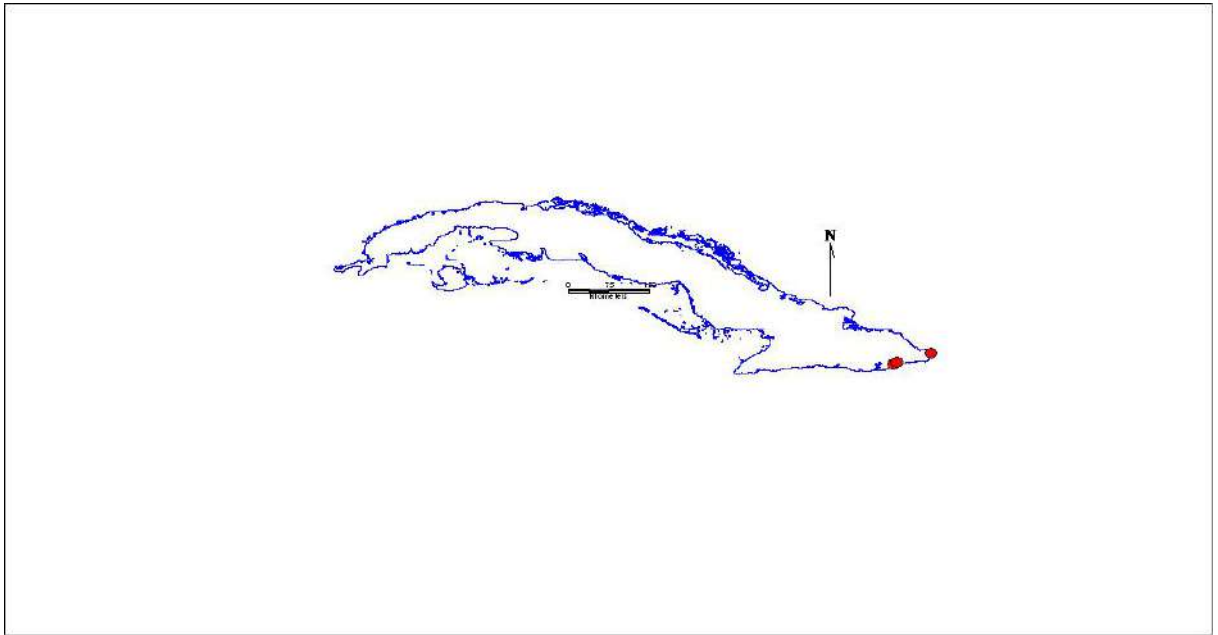


Fig. 3. Mapa de distribución de la especie *C. spiralis*.

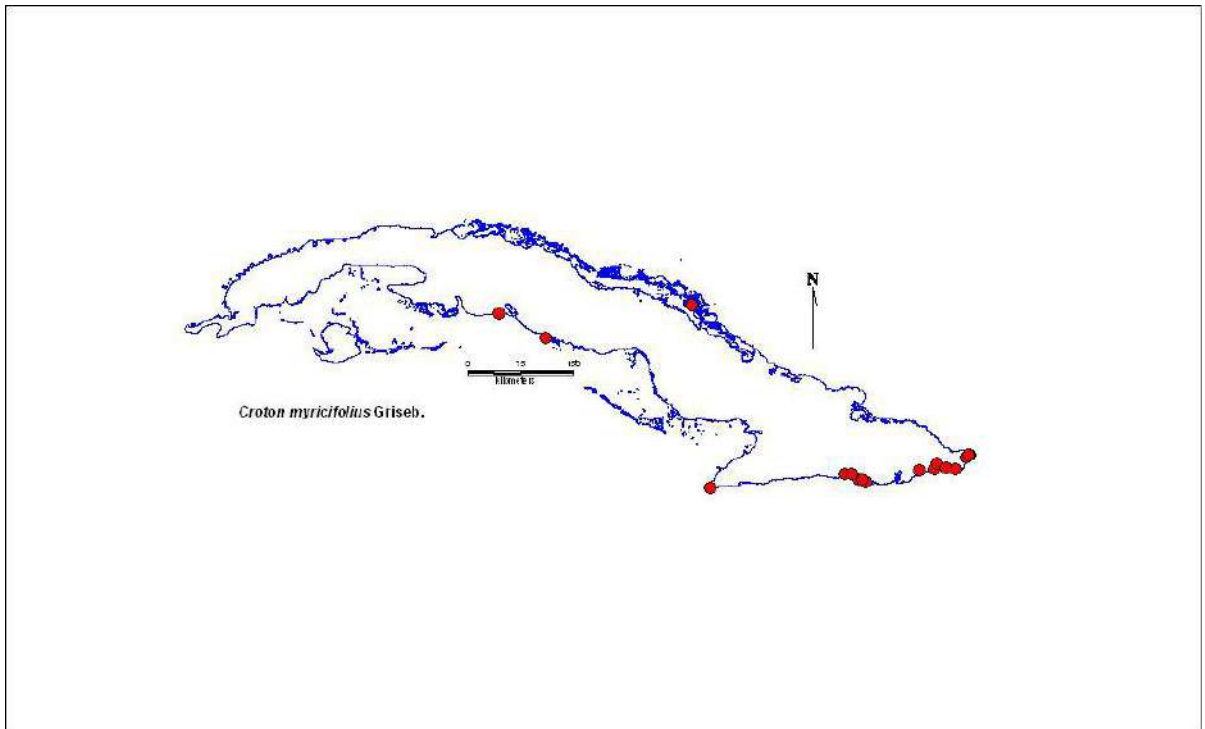


Fig. 4. Mapa de distribución de la especie *C. myricifolius*.

La ubicación taxonómica actualizada de las especies se refiere a continuación¹⁹:

División: Magnoliophyta.

Familia: Euphorbiaceae.

Clase: Magnoliopsida.

Subfamilia: Crotonoideae.

Subclase: Rosidae.

Tribu: Crotoneae.

Orden: Euphorbiales.

Género: *Croton*.

La especie *C. micradenus* se caracteriza por ser un arbusto monoico de hasta 2 m de altura, hojas lanceoladas a lanceolado-lineales, agudas a obtusitas en la base, el ápice agudo u obtuso, de 2 a 5,5 cm, estrellado-tomentoso en ambas caras. Inflorescencia terminal de 1,5 a 5 cm; 16 estambres, bifurcados; cápsula globosa, emarginada en el ápice, de 3,5 a 4 mm, tomentosa²⁰ (Anexo1).

La especie *C. spiralis* se caracteriza por ser un arbusto de unos 2 m.; hojas aovadas a suborbiculares, de 1-3 cm, obtusas a redondeadas y mucronaditas en el ápice, acorazonadas en la base, estrellado-tomentosas en ambas caras, blancuzcas en el envés; inflorescencia terminal, corta; 12 estambres, filamentos tomentosos; cápsula densamente estrellado-tomentosa de 4 mm²⁰. (Anexo 2).

La especie *C. myricifolius* se caracteriza por ser un arbusto de 1-2 m; hojas lineal-elípticas a lineal-oblongas de 1-8 mm, redondeadas y emarginadas en el ápice, obtusas en la base, lampiñas en el haz, escamosas en el envés, las escamas blancas, estrelladas, mezcladas con algunas pardas, margen a menudo revoluto. Racimos de 3-7 mm; 12 estambres, filamentos tomentosos; 2-4 estilos partidos, cápsula de 4 mm²⁰. (Anexo3).

1.2. Aspectos etnobotánicos del género *Croton*

La familia Euphorbiaceae es considerada como una de las mayores dentro de las Angiospermas, con extrema diversidad botánica y química, por lo que es lógico suponer que el

rango de aplicaciones sea grande. El uso de las plantas de esta familia en nuestra sociedad abarca una amplia gama de categorías: alimenticias, venenosas, medicinales, materiales industriales, entre otras². Las especies pertenecientes al género *Croton* no constituyen una excepción; dentro de ellas ocupan un importante lugar las utilizadas como medicinales y como control de plagas y enfermedades.

1.2.1. Medicinales

Desde el punto de vista medicinal, a las especies del género *Croton*, se le han atribuido por parte de la población propiedades curativas frente a diversos tipos de dolencias (Tabla I).

Tabla I. Reportes sobre los usos medicinales en especies del género *Croton*^{5,21}.

Especie	Actividad
<i>Croton alamosanum</i> N. E. Rose	Antiodontálgica
<i>Croton cortesianus</i> H.B.K.	Contra la dermatitis
<i>Croton eluteria</i> (L.) Sw.	Tónica
<i>Croton flavens</i> L.	Alivia el dolor de pecho
<i>Croton humilis</i> L.	Enfermedades urinarias
<i>Croton linearis</i> Jacq.	Febrífuga
<i>Croton macrostachys</i> A. Rich.	Antihelmíntica (vermífugo)
<i>Croton sellowii</i> Baill.	Antibiótica (antibacteriana)
<i>Croton sp. div.</i>	Antiasmática
<i>Croton sp. div.</i>	Anticancerígena
<i>Croton sp. div.</i>	Antidiabética
<i>Croton sp. div.</i>	Antimalárica
<i>Croton sp. div.</i>	Antirreumática
<i>Croton sp. div.</i>	Laxante
<i>Croton tiglium</i> L.	Oftálmica (conjuntivitis)

La planta *Croton funckianus* Muell. Arg. se usa por los campesinos colombianos para extraer muelas, su savia, pura o diluida, tiene aplicaciones como droga de acción local. Además, es conocido su uso como hipotensor. Su látex se emplea contra la amebiasis y la cura de úlceras duodenales. La corteza del *Croton glabellus* L. se emplea en cocimientos o en forma de extracto o tintura para facilitar la digestión (estomáquico). En Colombia, la decocción de las

hojas es utilizada como hipotensora, aunque también se reporta que a los aquejados de lepra se le suministra como calmante²².

Roig²³, recopila no solo lo investigado por él y otros investigadores acerca de los usos de las especies vegetales que crecen en Cuba, incluyendo las plantas del género *Croton*, sino también lo informado por conocedores de la flora de nuestro país (Tabla II).

Tabla II. Reportes sobre los usos medicinales de las especies cubanas del género *Croton*²³.

Nombre Científico	Nombre Vulgar	Parte Empleada	Usos
<i>Croton glandulosus</i> L.	-	-	Antiespasmódica
<i>Croton linearis</i> Jacq.	Romero de costa	-	Amarga Febrífuga
<i>Croton lobatus</i> L.	Frailecillo cimarrón	Hojas y ramas	Diurético Laxante
<i>Croton myricifolius</i> Griseb.	Romero de costa	Planta entera	Anticatarral Antirreumático Estomáquico
<i>Croton niveus</i> Jacq.	Cascarilla de Trinidad	Corteza	Antihemorroidal Antimalárica Antirreumático Astringente Febrífuga Tónica
<i>Croton nummulariaefolius</i> A. Rich.	Yerba de la Virgen de la Caridad del Cobre	Planta entera	Anticolítico Dolor de vientre
<i>Croton organifolius</i> Lam.	Romero de costa	-	Detersiva Diaforética
<i>Croton sagraeanus</i> Muell. Arg.	Aceitillo	-	Amargo Corroborante Febrífugo

Existen otros informes referentes al *C. nummulariaefolius* que le atribuyen propiedades curativas contra los nervios y pujos. Además, le confieren propiedades medicinales al *C. lobatus* frente a los nacidos, dolor de cabezas, erisipela y neuralgias²⁴.

Fuentes¹⁷, al realizar el inventario sobre plantas medicinales cubanas, elevó considerablemente la cifra de las contenidas en la obra de Roig²³, denominándolas como especies potencialmente medicinales, dentro de las que se incluyen las siguientes plantas del género *Croton*.

<i>Croton betulinus</i> Vahl.	<i>Croton monogynus</i> Urb.
<i>Croton brittonianus</i> Carabia	<i>Croton myricifolius</i> Griseb.
<i>Croton cerinus</i> Muell. Arg.	<i>Croton origanifolius</i> Lam.
<i>Croton craspedotrichus</i> Griseb.	<i>Croton rosmarinoides</i> Millsp.
<i>Croton heteropleurus</i> Urb.	<i>Croton stenophyllus</i> Griseb.
<i>Croton lucidus</i> L.	<i>Croton vaccinioides</i> A. Rich.
<i>Croton micradenus</i> Urb.	<i>Croton yunquensis</i> Griseb.

1.2.2. Control de plagas y enfermedades

El empleo por el hombre de medios para la protección de sus cultivos del ataque de plagas y enfermedades ha incluido en mayor o menor grado el uso de plaguicidas de origen botánico; éste es el caso de las plantas del género *Croton* (Tabla III).

Tabla III. Reportes sobre los usos para el control de plagas y enfermedades en especies del género *Croton*^{4, 25-28}.

Especie	Actividad	Organismo Controlado	Parte Activa
<i>Croton adipatus</i> HBK	Antídoto	Mordedura de serpiente	D
<i>Croton bonplandianum</i> Bail.	Herbicida	<i>Cyperus rotundus</i> L.	H y Fr
<i>Croton californicus</i> Muell. Arg.	Insecticida	Áfidos	D
<i>Croton caudatus</i> Geisel	Insecticida	<i>Musca domestica</i> L.	Pa
<i>Croton ciliatoglandulosus</i> Ortega	Insecticida	Desconocido	Pc
<i>Croton neluteria</i> (L.) Sw.	Repelente	Mosquitos	C
<i>Croton flavens</i> L.	Insecticida, Repelente Insecticida	Desconocido	D H-T-R-C

Especie	Actividad	Organismo Controlado	Parte Activa
<i>Croton klotzschianus</i> Thw.	Insecticida Acaricida	Áfidos Ácaros	S
<i>Croton macrostachys</i> A. Rich.	Antialimentario Nematicida	Desconocido Plaga de Animales	D H, S y L
<i>Croton oblongifolius</i> Roxb.	Insecticida, Ictiotóxica, Tóxica	Desconocido	S
<i>Croton sonorae</i> Torr.	Insecticida	Desconocido	H y R
<i>Croton sparsiflorum</i> Morong.	Nematicida	<i>Meloidogyne sp.</i> <i>Rotylenchulus sp.</i>	Pc
<i>Croton texensis</i> Muell. Arg.	Antialimentario Insecticida	<i>Attagenus piceus</i> (Olivier) Desconocido	Pc Pa
<i>Croton tiglium</i> L.	Insecticida Molusquicida	Áfidos Mosquitos <i>Bombyx mori</i> (L.) <i>Musca domestica</i> L. <i>Dactynotu ssp.</i> <i>Rondotia sp.</i> <i>Dysdercus koenigii</i> F. <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner) <i>Spodoptera litura</i> Fab. <i>Lipaphiserysimi</i> (Kalt.) <i>Lymnaea sp.</i>	S S S S S S y A S D D S S

H- Hojas; Fr- Frutos; T- Tallos; S- Semillas; C- Corteza; R- Raíces; L- Látex; A- Aceite; Ra- Ramas; Pa- Parte aérea; Pc- Planta completa; D- Desconocido

1.3. Aspectos químicos del género *Croton*

Las especies del género *Croton* se caracterizan desde el punto de vista de su contenido de alcaloides por presentar varias esqueletos de dichos metabolitos (Fig. 5), entre otros: aporfinas, proaporfinas, morfinandienonas, tetrahidroprotoberberinas, bencilisoquinolinas, fenantridinas y quinolinas² (Tabla IV).

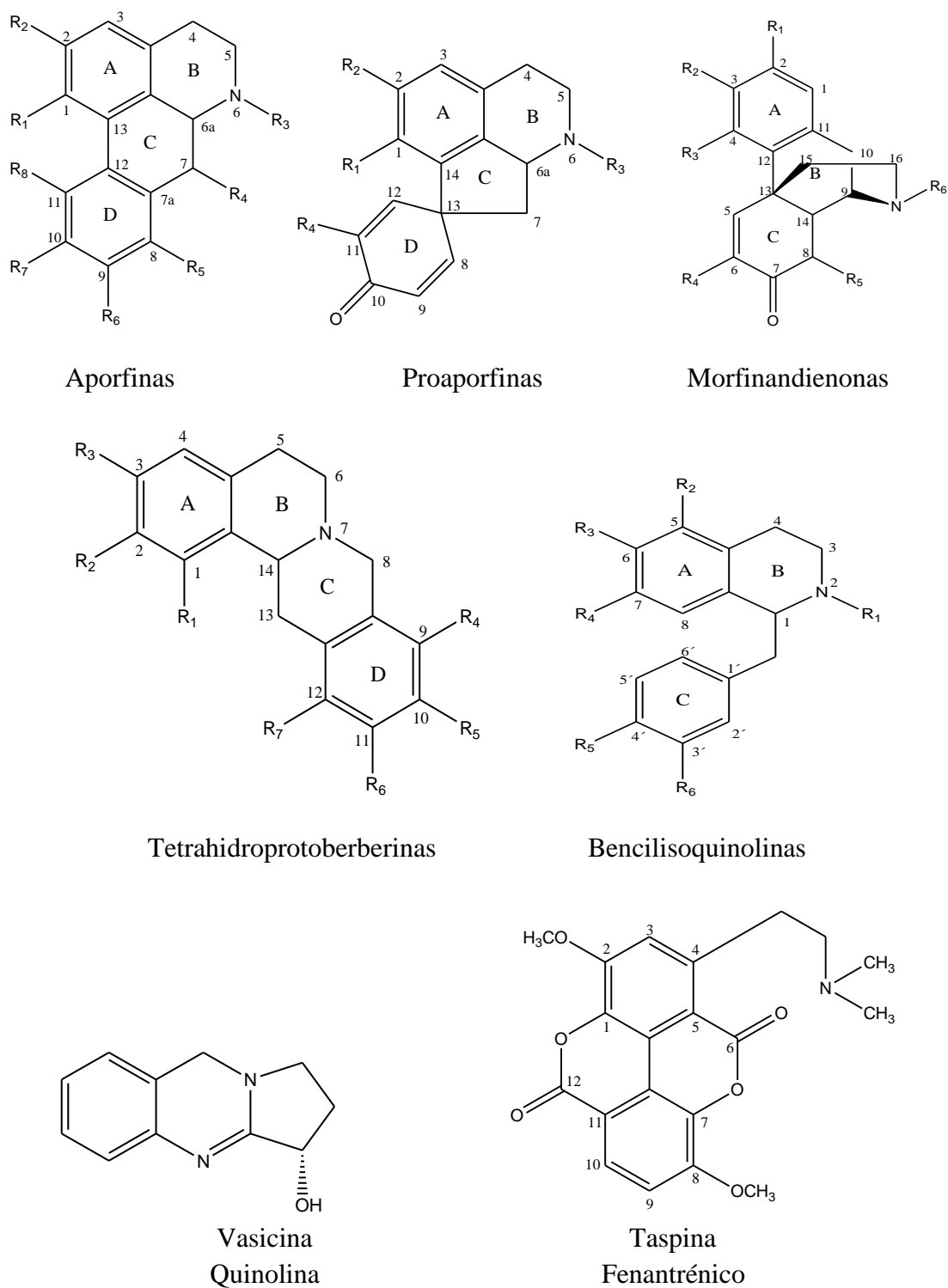


Fig. 5. Esqueletos de alcaloides aislados de especies del género *Croton*.

Tabla IV. Alcaloides aislados en especies del género *Croton*^{2, 22, 29}.

Especie	Alcaloides aislados	Tipo de alcaloide
<i>Croton balsamifera</i> Jacq.	norsinoacutina; salutaridina; sinoacutina; flavinina; flavinantina.	morfinandienona
<i>Croton bonplandianum</i> Bail.	crotsparina (crotoflorina).	aporfina
	3-metoxi-4,6-dihidroxi-morfinandien-7-ona.	morfinandienona
<i>Croton discolor</i> Willd.	crotonosina; discolorina; jaculadina	proaporfina
<i>Croton draconoides</i> Muell. Arg.	glaucina; taliporfina	aporfina
<i>Croton flavens</i> L.	flavinantina; flavinina; norsinoacutina; sinoacutina.	morfinandienona
	linearisina.	proaporfina
<i>Croton hemiargyreus</i> Muell. Arg.	Hemiargyrina	tetrahidroprotoberberina
<i>Croton linearis</i> Jacq.	crotonosina; discolorina; homolinarisina; linearisina; jacularina; pronuciferina; isococlorina;	proaporfina
	coclorina; norcoclorina.	bencilisoquinolina
	8,14-dihidronorsalutaridina; sinoacutina; flavinina; 8,14-dihidrosalutaridina; flavinantina; norsinoacutina.	morfinandienona
<i>Croton plumieri</i> Urb.	crotonosina; discolorina; homolinarisina; jaculadina;	proaporfina
	8,14-dihidrosalutaridina; salutaridina; flavinantina; flavinina; norsinoacutina.	morfinandienona
<i>Croton salutaris</i> Casar.	N-norsalutaridina; salutarina; salutaridina.	morfinandienona
<i>Croton sparsiflorus</i> Morong.	sparciflorina.	aporfina
	crotsparina (crotoflorina); N,O-dimetilcrotsparinina; N-metildihidrocrotsparinina; crotsparinina (jacularina); N-O-dimetilcrotsparina; N-metilcrotsparina; N-metilcrotsparinina.	proaporfina
<i>Croton sp. div.</i>	taspina	fenantrénico
	vasicina	quinolina
<i>Croton wilsonii</i> Griseb.	O-O-dimetilmagnoflorina; O-metilisoboldina; hernosina; N-metilhernosina; O ¹⁰ -metilhernovina; N-metil-O ¹⁰ -metilhernovina; wilsonirina.	aporfina

1.3.1. Alcaloides aporfínicos

Las aporfinas constituyen el segundo grupo más grande dentro de los alcaloides isoquinolínicos, después de las bisbencilisoquinolinas. Esta clase de alcaloides se ha encontrado en especies de las familias Annonaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Berberidaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Hernandiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae y Rhamnaceae³⁰.

Las posiciones 1 y 2 siempre se encuentran sustituidas por grupos hidroxilo, metoxilo o metilendioxi. Las posiciones 9, 10 y 11 pueden o no estar sustituidas, mientras que las sustituciones en las posiciones 3 y 8 son menos frecuentes. En pocos casos la función hidroxílica se localiza en el C-7 y sólo un alcaloide está oxigenado en la posición 4: steporfina.

Un ejemplo de alcaloide aporfínico lo constituye la sparsiflorina, aislada del *C. sparsiflorus*³⁰ (Fig. 6).

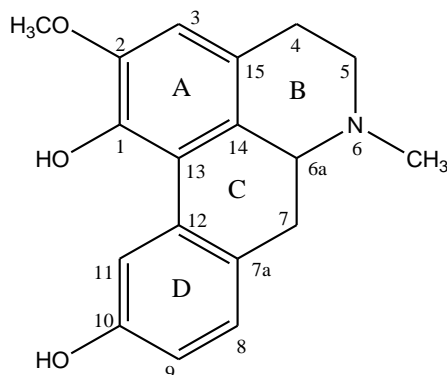


Fig. 6. Estructura del alcaloide sparsiflorina.

1.3.2. Alcaloides morfinandienónicos

Las morfinandienonas son alcaloides ampliamente distribuidos en varias plantas de las familias Papaveraceae y Menispermaceae. Un ejemplo de alcaloide morfinandienónico lo constituye la salutaridina, aislada del *C. salutaris*³¹ (Fig. 7).

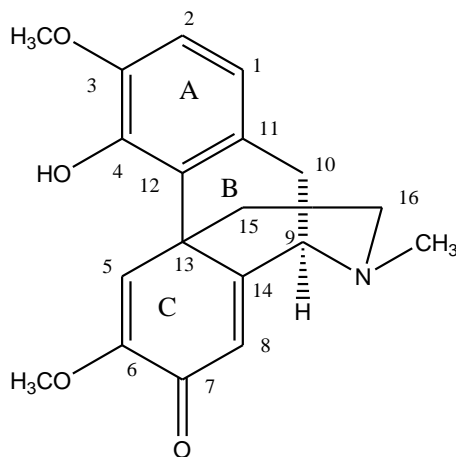


Fig. 7. Estructura del alcaloide salutaridina.

1.3.3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Asteraceae, Euphorbiaceae, Labiatae, Lauraceae, Mirtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, Umbeliferae, entre otras. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas, en las raíces, en el pericarpio del fruto, en las semillas, en el tallo, en las flores y en los frutos³².

La mayoría de las especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae no son conocidas como aromáticas, aunque se reporta que algunas especies del género *Croton* contienen aceites volátiles, en los cuales se han encontrado sesquiterpenos comunes entre ellas³².

Los aceites volátiles de las hojas y de los tallos de *Croton nepetifolius* Baill. contienen monoterpenos, tales como 1,8-cineol y terpineol, sesquiterpenos, como el biciclogermacreno,

y fenilpropanoides volátiles, como el metileugenol y la acetofenona xanthoxylina³³. El aceite volátil de los retoños de *Croton zehntneri* Pax & K. Hoom. está compuesto principalmente de fenilpropanoides, tales como anetol, metileugenol y estragol³⁴⁻³⁵. Metileugenol también se encuentra en los aceites volátiles de otras especies de *Croton*, como *Croton jimenezii* Standl. & Valerio de América Central³⁶. En el aceite volátil de las raíces de *Croton sarcopetalus* Mull. Arg., el *trans*-metil isoeugenol se encuentra como principal constituyente³⁷. El aceite volátil de las partes aéreas de *Croton malambo* H. Karst., especie venezolana, está compuesto principalmente de metileugenol, metilisoeugenol, elemicina, veratralisoelemicina y δ -cadinol³⁸. El aceite volátil de los retoños de *Croton cuneatus* Miq., otra especie venezolana, está compuesto por α -11-eudesmeno, metileugenol, metilisoeugenol, 4- α -seleniol, cedril-propil éter, τ -cadinol, cubenol, veratral y agarospirol³⁸. La misma parte de la planta rindió el sesquiterpeno sellin-11-en-4- α -ol.

El aceite volátil de *Croton cajucara* Benth. contiene sesquiterpenos³⁹, aunque se conoce es rico en monoterpenelinalol⁴⁰⁻⁴². Linalol y cineol son monoterpenoides aparentemente frecuentes en *Croton*. Ambos son constituyentes mayoritarios en el aceite volátil de la especie africana *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch⁴³. Linalol está entre los constituyentes mayoritarios del aceite volátil de *Croton stellulifer* Hutch, una especie endémica de Sao Tomé y Príncipe; este aceite contiene kesano, un óxido sesquiterpenoide no encontrado en otras especies de *Croton*⁴⁴. El aceite volátil de las hojas de *Croton sacaquinha* Benth. también contiene linalol, además de los sesquiterpenos β -elemeno y germacreno D⁴⁵. 1,8-cineol es un constituyente importante del aceite de *Croton sonderianus* Müll. Arg.⁴⁶. Murillo y col.⁴⁷ obtuvieron los nor-terpenoides: 9-dehidrovomifoliol y 2,3-dihidrovomifoliol de las semillas y 1-hidroxijunenol de los tallos de *Croton draco* Cham. & Schltld. Los sesquiterpenos τ -cadinol

y epicubenol y la acetofenona xanthoxilina fueron encontrados en los retoños de *Croton hieronymi* Griseb.⁴⁸. Los sesquiterpenos: óxido de cariofileno y *trans*-cariofileno se encontraron como predominantes en las hojas, mientras óxido de cariofileno y cubenol predominan en los tallos de *Croton sellowii* Baill., una especie del nordeste de Brasil. En las raíces de las mismas especies, fueron componentes mayoritarios mesitileno y los sesquiterpenos α , β y γ -eudesmol⁴⁹. Los retoños de *Croton arboreus* Millsp., una especie de arbusto de México, contienen los sesquiterpenos $5\alpha,7\alpha,10\beta$ H-3-patchoulen-2-one, $5\alpha,7\alpha,10\beta$ H-4-(14)-patchoulen-2 α -ol y $9\alpha,10\beta$ -dihidroxi-2 $\beta,4\beta$ -peroxi-1 $\alpha,5\beta,7\alpha$ H-guaiano, junto con otros 14 compuestos conocidos, incluyendo ácido junceico clerodano⁵⁰. Otra especie con aceite volátil que contiene predominantemente sesquiterpenos (cariofileno, óxido de cariofileno, germacrenos, cadinol, espatulenol) es la especie venezolana *Croton ovalifolius* Vahl.⁵¹. Las hojas de *C. zambesicus* tienen aceite volátil que contiene principalmente sesquiterpenos (β -cariofileno, óxido decariofileno y α -copaeno), monoterpenos (linalol y β -pineno) y cantidades más pequeñas de diterpenos (trachylobanos, isopimaranos y kaurenos)⁵².

1.3.4. Aldehídos, alcoholes grasos, hidrocarburos saturados, esteroides y ácidos grasos

Las partes aéreas de *Croton draco* L. contienen β -sitosterol, stigmasterol y un nuevo esteroide el $5\alpha,8\alpha$ -ergasterol endoperóxido⁵³. De las hojas de *Croton betulaster* Müell. Arg., una especie del nordeste de Brasil, Barbosa y col.⁵⁴ obtuvieron los triterpenos lupenona, lupeol, 3-oxo-22-hidroxihipano, 3-oxo-20- β -hidroxitaraxastano, 3-oxo-20-hidroxilupano, ácido 3-oxo-olean-12-en-28-oico, ácido 3-oxo-olean-18-en-28-oico, y ácido 3-oxo-cicloart-24E-en-26-oico. El triterpeno ácido acetil aleuritólico se ha obtenido de dos especies de *Croton* nativas de Brasil, el *Croton cajucara* Muell. Arg.^{55,56} y *Croton urucurana* Sw.^{57,58}. Del extracto metanólico de esta última especie, se han obtenido el stigmasterol, β -sitosterol, campesterol y β -sitosterol-*O*-

glicósido. Los retoños de *Croton hieronymi* L. contienen un análogo C-25 del *trans*-fitol y triterpenos, tales como el α - y β -amirina, lupeol y hop-22(29)-en-3-ol, además de los derivado del squaleno el *all-trans*-10-metilen-2,6,10,14,18,22-hexaen-3-ol y 2,6,15,19,23-pentametiltetracos-2,6,10(28),14,22,28-hexaen-11-ol, y esteroides, tales como el colesterol, el colest-8(14)-en-3 β -ol, stigmasterol, gramisterol, sitosterol, campesterol, 22-dihidrobrassicasterol, lofenol, isofucosterol, colest-4-en-3-ona, ergosta-4-22-dien-3-ona y sitostenona⁵⁹.

Usando Cromatografía Gaseosa de alta temperatura y alta resolución acoplada Espectrometría de Masas (HT-HRGC-MS), Pereira y col.^{60,61} caracterizaron en los retoños de *Croton hemiargyreus* Bail. más de 100 compuestos, incluyendo alcaloides, aminoácidos, terpenoides y esteres de cera. Entre los compuestos detectados un triterpenoide de masa molecular alto (simiarenol) y esteres de amirina con ácidos grasos que contienen cadenas por encima de 20 átomos de carbono. De los retoños de *Croton celtidifolius* L.⁶² se aislaron los polialcoholes 1L-1-O-*mio*-inositol y *neo*-inositol. Benzoil-metilpolioles fueron aislados de *Croton betulaster* HBK y *Croton luetzelburgii* Pax & K. Hoffm⁶³.

1.4. Espectroscopía

1.4.1. Ultravioleta (UV)

1.4.1.1. Aporfinas

La espectroscopía UV puede ser una herramienta valiosa en la elucidación estructural de las aporfinas. Aquellas 1,2,9,10 sustituidas muestran máximos cercanos a 220, 282 y 305 nm, mientras las aporfinas 1,2,10,11 sustituidas exhiben máximos alrededor de 220, 270 y 305 nm. Aporfinas con sustitución 1,2,9 tienen bandas a 233 (h), 280, 310 (h) nm y para las series

1,2,10 las bandas están alrededor de 226, 266, 275 y 305 nm. Para las aporfinas disustituidas en 1,2, los máximos están situados en la vecindad de 234, 273 y 312 nm³⁰.

1.4.1.2. Morfinandienonas

Las bandas de absorción en UV de las morfinandienonas se observan entre 235-240 y 275-290 nm, con una relación aproximada de 2:1 con respecto a su coeficiente de extinción molecular.

Los compuestos sustituidos en C-2 y C-3 tienen usualmente una absorción alrededor de los 290 nm, sin embargo, los derivados con sustituyentes en C-3 y C-4 manifiestan una absorción cercana a los 275 nm³¹.

1.4.2. Infrarrojo (IR)

1.4.2.1. Morfinandienonas

La parte ciclohexadienónica de las morfinandienonas muestra bandas características de absorción IR³¹ en las regiones de 1665, 1635 y 1615 cm⁻¹, mientras los dihidroderivados muestran bandas de absorción a 1690 y 1645 cm⁻¹.

1.4.3. Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico

1.4.3.1. Aporfinas

El espectro de masas por impacto electrónico de las aporfinas 1, 2, 9, 10 sustituidas difiere del de las 1, 2, 10, 11 sustituidas ya que en las primeras el fragmento (M-1)⁺ es el pico base, a diferencia de las segundas, donde el pico base es el ión molecular y el fragmento (M-1)⁺ tiene el 50 % o menos de la intensidad del pico base. Los fragmentos (M-15)⁺, (M-17)⁺ y (M-31)⁺ son usualmente más intensos en estas últimas³⁰.

1.4.3.2. Morfinandienonas

Se ha demostrado que la fragmentación de la salutaridina muestra una ruptura inicial de un enlace alílico o bencílico, seguido de la pérdida de un grupo metilo. En el caso de las 8,14-

dihidro- o 5,6,8,14-tetrahidro sustituidas, la espectrometría de masas es un método conveniente para determinar la estereoquímica entre los anillos B y C (Fig. 7). En la serie B/C *cis*, los compuestos N-metilo muestran un pico intenso en m/z 59, mientras que los compuestos de la serie B/C *trans*, no dan esta fragmentación, o sólo aparece un pico débil en m/z 59. La diferencia se atribuye a la disposición espacial del H-14 y a la cadena lateral que contiene el N, la cual está involucrada en el paso clave de fragmentación³¹.

Como ejemplos ilustrativos se muestran las fragmentaciones de la O-metilpallidina y de la tetrahidroamurina³¹ (Fig. 8 y 9).

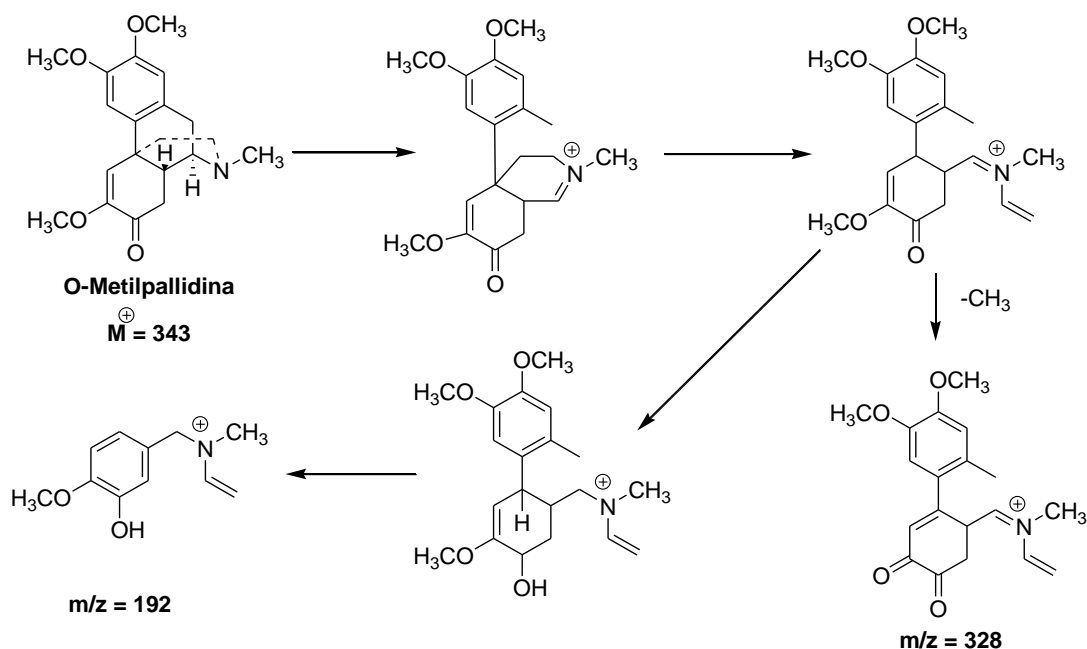


Fig. 8. Fragmentaciones de masas del alcaloide O-metilpallidina.

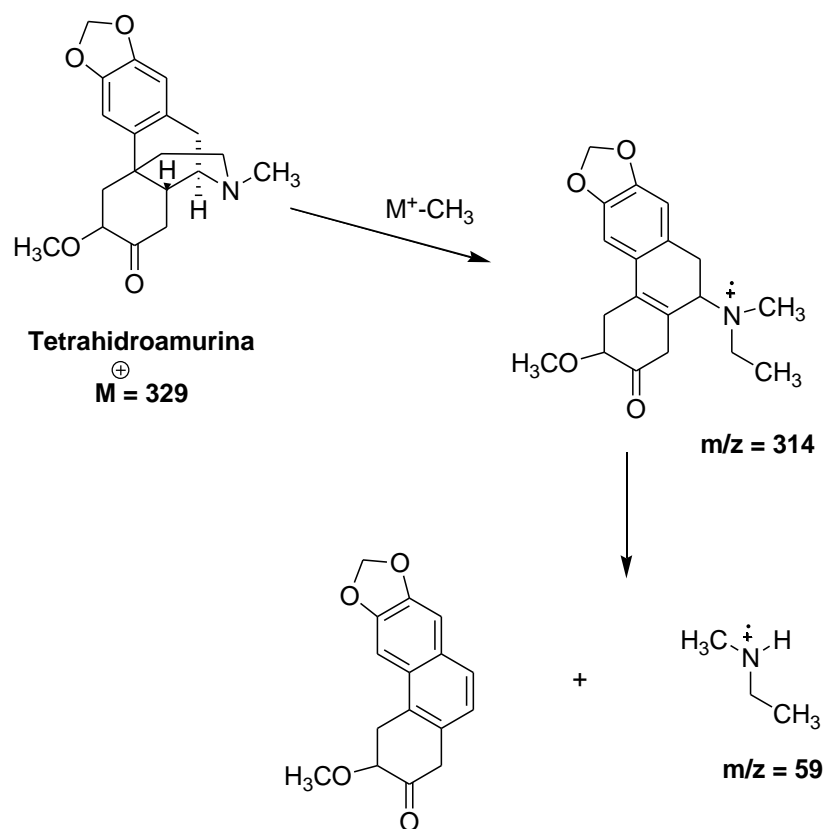


Fig. 9. Fragmentaciones de masas del alcaloide tetrahydroamurina.

1.4.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN 1H)

1.4.4.1. Aporfinas

Un grupo metoxilo en C-1 aparecerá consistentemente a campos más altos (δ 3,4 - 3,7 ppm) que cuando está en C-2, C-9 o C-10 (δ 3,8 - 3,9 ppm), mientras que en C-11 estará a un corrimiento químico intermedio (δ 3,6 - 3,8 ppm). El protón aromático que está en C-3 aparece frecuentemente a campos más altos (δ 6,5-6,7 ppm) mientras que el del C-11 lo hace a campos más bajos (δ 7,6 - 8,2 ppm) debido probablemente al efecto del cono de blindaje del anillo aromático A. El otro protón aromático aparece usualmente entre δ 6,7 y 7,4 ppm³⁰.

Para localizar la posición de la función fenólica en esta familia de alcaloides se ha usado este método espectroscópico desarrollando experimentos de intercambio con deuterio.

1.4.4.2. Morfinandienonas

En los alcaloides de la serie *trans* B/C 8,14-dihidromorfinandienonas (ocobotrina) hay una aproximación espacial del grupo hidroxilo del C-4 y el protón olefínico en el C-5, lo que provoca que este último resuene a frecuencias altas (δ 7,76 ppm) en el espectro RMN ^1H . En el caso de los análogos de la serie *cis* B/C (isosinomenina) esta cercanía no existe y por lo tanto el protón en C-5 aparece a frecuencias más bajas δ 6,75 ppm³¹.

1.5. Farmacología

1.5.1. Aporfinas

Las aporfinas tienen un amplio rango de actividad fisiológica. El alcaloide apocodeína puede ser útil por su actividad emética. Bulbocapnina afecta el Sistema Nervioso Central y causa catatonía. Boldina es ligeramente tóxica y no causa adicción, tiene una suave acción sedativa, diurética y antiparasitaria; también incrementa las secreciones de las glándulas salivales y el hígado. Isotebaina deprime el SNC, mientras que glaucina y dicentrina causan narcosis en animales y en grandes dosis provocan convulsiones. Se ha demostrado, además, las propiedades antitusivas del primero de ellos. El clorhidrato de laurifolina posee cierta actividad hipotensora, mientras que corytuberina acelera la respiración y baja el pulso. Finalmente, una de las sustancias inhibidoras de la alimentación de insectos, presentes en las hojas de *Cocculus trilobus* D.C., es el alcaloide aporfínico isoboldina³⁰.

1.5.2. Morfinandienonas

La salutaridina ejerce actividad antitumoral contra el carcinosarcoma de Walker 256 y se puede considerar como un competidor parcial del complejo receptor GABA/benzodiazepina. La sinococculina, por su parte, mostró actividad contra el sarcoma 180A y la leucemia linfocítica P-388 en ratones³¹.

1.5.3. Aceites esenciales

Además de las propiedades sensoriales en condimentos y fragancias, las actividades antimicrobianas y antioxidantes son las más importantes de los aceites esenciales de las plantas y los componentes de los aceites esenciales y por consiguiente han sido estudiadas extensivamente durante los últimos años. Interesantes resultados se han logrado, por ejemplo explicando las interacciones entre el cuerpo humano o la piel y los componentes de los aceites esenciales en las fragancias⁶⁴.

Algunas de las sustancias que constituyen los aceites esenciales de diversas especies estudiadas exhiben importantes actividades biológicas, tales como el β -cariofileno con actividad espasmolítica, anestésico local y antiinflamatorio y el β -mirceno, sustancia analgésica y con actividad antioxidante⁶⁵.

Reportes relacionados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del género *Croton*; expresan que estos tienen entre otras propiedades, acción bactericida frente a un amplio rango de microorganismos patógenos, tales como: *Listeria innocua* Clarke, *Salmonella typhimurium* (Löffler) Castellani & Chalmers, *E. coli*, *Shigella disentería* (Shiga) Castellani & Chalmers, *Basillus cereus* Frankland & Frankland, *S. aureus* y *Staphylococcus typhimurium* Rosenbach⁶⁶.

El aceite esencial de *Croton heliotropiifolius* Kunth. mostró actividad inhibitoria frente a *S. aureus* (MR 358) en una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 512 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que el aceite de *Croton blanchianus* Baill. inhibió el crecimiento de *E. coli* (CMI 512 $\mu\text{g/mL}$), *B. cereus* (CMI 256 mg/mL) y *S. aureus* (CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$)⁶⁷.

1.5.4. Aldehídos, alcoholes grasos, hidrocarburos saturados, esteroides y ácidos grasos

Sobre los esteroides β -sitosterol, estigmasterol y campesterol, entre otros; se ha reportado acción farmacológica en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna⁶⁸.

Gomathi y Sheriff⁶⁹, encontraron que una mezcla de ácidos constituido principalmente por los ácidos eicosapentanoico, palmítico y oleico, inhibieron el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* Clarke. También hallaron respuestas diferentes de actividad antibacteriana entre ácidos grasos insaturados y saturados, los primeros mostraron una actividad más potente, mientras que los últimos no mostraron actividad o resultó débil frente al mismo patógeno.

El extracto de los ácidos grasos de *Erucaria pinnata* (Brassicaceae) constituido por los ácidos láurico, mirístico, palmítico, oleico, linoleico y linolénico, mostró diferente efecto inhibitorio frente a los microorganismos *Mycobacterium phlei* Lehmann & Neumann y *Basilus subtilis* (Ehrenberg) Cohn a una concentración de 150 mg/mL⁷⁰.

Los valores de CMI de los ácidos grasos linolénico, láurico, margárico y esteárico frente a los microorganismos *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* y *Salmonella typhi* fueron del rango de 1,34 a 4,21 mg/mL, resultando el ácido esteárico el compuesto más activo contra los microorganismos Gram positivos y Gram negativos ensayados, los datos de CMI de este ácido se encontraron entre 1,34 y 2,99 mg/mL⁷¹.

CAPÍTULO 2. - MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y equipos

2.1.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad puro para análisis (PA), excepto el etanol que fue comercial.

Acetato de etilo VWR PROLABO	Cloroformo VWR PROLABO
Acetona VWR PROLABO	Cloruro de mercurio Merck
Ácido acético glacial VWR PROLABO	Etanol comercial
Ácido fórmico BDH	Éter de petróleo BDH
Ácido tartárico BDH	<i>n</i> -hexano BDH
Agua destilada	Nitrógeno
Alcohol metílico C & B	Subnitrato básico de bismuto Panreac
Benceno BDH	Sulfato de sodio anhidro BDH
Bicarbonato ácido de potasio Merck	Tolueno VWR PROLABO
Bromuro de potasio Merck	Yoduro de potasio VWR PROLABO

2.1.2. Equipamiento

Balanza analítica. Zadtady.	Packard serie 6890 GC.
Balanza técnica. Denver Instruments.	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia.
Baño de agua. Unipan.	LC-Jasco ® con detectores UV y ELS.
Cromatógrafo de Gases 8000. Fison Instruments.	Equipo de punto de fusión. Reichert-Thermovar.
Cromatógrafo de Gases. Konik 4000 A GC	Espectrómetro de masas. Jeol DX-300.
Cromatógrafo de Gases-Masas. Hewlett-	Espectrómetro de masas. ThermoFinnigan

LCQ Deca.	Espectrofotómetro UV. Specord.
Espectrómetro de RMN. Bruker AC 250F.	Estufa con recirculación de aire. Memmert.
Espectrómetro de RMN. Jeol FX-90Q.	Evaporador rotatorio. Unipan.
Espectrómetro RMN. Varian Gemini 200 MHz.	Lámpara UV. Camag.
Espectrómetro RMN. Varian Inova 500 MHz.	Manta de calentamiento. Electromantle.
Espectrofotómetro IR. Pye Unicam SP 1100.	Polarímetro. Polartronic Universal.
	Recolector de compuestos densos. Clevenger.
	Refrigerador. Minsk.

2.2. Recolecta de las especies

Las hojas y los tallos de individuos adultos estériles de las especies *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis* se recolectaron en localidades de San Antonio del Sur, Provincia Guantánamo, Cuba, por la Ingeniera Ramona Oviedo Prieto, quien además las identificó. Un ejemplar de cada especie se encuentra depositado en el HAC del Instituto de Ecología y Sistemática del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. (Tabla V)

Tabla V. Localidades y fechas de recolecta de las tres especies en estudio.

Especie	Localidad	Fecha de colecta	No. Herbario
<i>C. micradenus</i> 1	Buenavista	12 de mayo 2002	HAC 41194
<i>C. myricifolius</i> 1	Buenavista	12 de mayo 2002	HAC 41195
<i>C. spiralis</i> 1	Buenavista	12 de mayo 2002	HAC 41196
<i>C. micradenus</i> 2	Mina Yeso, Baitiquirí	19 de mayo 2012	HAC 41947
<i>C. myricifolius</i> 2	Buenavista	19 de mayo 2012	HAC 41948
<i>C. spiralis</i> 2	Buenavista	19 de mayo 2012	HAC 41949

2.3. Procesamiento del material vegetal

Los aceites esenciales de las tres especies estudiadas y el CAT de *C. micradenus* se obtuvieron a partir de las especies colectadas en mayo de 2002 (nombradas **especies 1**), mientras que para

la obtención de los extractos hexánicos y etanólicos se procesaron las especies colectadas en mayo 2012 (nombradas **especies 2**).

Para la obtención de los aceites esenciales el material vegetal se secó a la sombra a temperatura ambiente durante cinco días y se separaron cuidadosamente las hojas de los tallos, las cuales fueron divididas en pequeños fragmentos para facilitar el proceso de extracción de los aceites esenciales.

Por otra parte, para la obtención de los extractos hexánicos, etanólicos de las especies 2 y el CAT de *C. micradenus* 1, las hojas y tallos fueron secados a temperatura ambiente por espacio de cinco días y posteriormente se colocaron en estufa con recirculación de aire a temperatura entre 40 y 50 °C durante 72 h. El material vegetal seco fue molido hasta polvo fino.

La Tabla VI presenta el peso total del material (hojas y tallos) para la obtención de los extractos hexánicos, etanólicos y CAT, así como el de las hojas para la obtención de los aceites esenciales.

Tabla VI. Peso del material vegetal seco y molido usado en la preparación de las muestras.

Especie	Peso total (g)	Extractos (g)	CAT (g)	Aceites esenciales (g)
<i>C. micradenus</i> 1	7800	-	7500	300
<i>C. myricifolius</i> 1	200	-	-	200
<i>C. spiralis</i> 1	175	-	-	175
<i>C. micradenus</i> 2	100	100	-	-
<i>C. myricifolius</i> 2	100	100	-	-
<i>C. spiralis</i> 2	100	100	-	-

2.4. Obtención de aceites esenciales de *C. micradenus* 1, *C. myricifolius* 1 y *C. spiralis* 1

Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación durante 4 h, con el empleo de un recolector de compuestos densos “Clevenger”. La cantidad de material vegetal correspondiente a cada especie se colocó en un balón con agua destilada sobre una manta de

calentamiento a temperatura de 150 °C durante 4 h. Los volúmenes de los aceites recolectados fueron medidos en cm³.

2.4.1. Determinación del contenido de humedad del material para la obtención de los rendimientos de los aceites esenciales

En la determinación del rendimiento de aceites esenciales en las plantas trabajadas se calculó el contenido de humedad de las hojas a extraer, según ISO 939⁷². La norma antes mencionada se basa en la determinación de la cantidad de agua atrapada por destilación azeotrópica, utilizando un líquido orgánico inmiscible con ella (tolueno) y recolectada en un tubo graduado. Se pesaron 4 g de la muestra y el porcentaje de humedad se expresó como:

$$H (\%) = 100 V/m$$

donde

V es el volumen de agua recolectada en mL

m es la masa de la porción de ensayo en g

2.4.2. Determinación del contenido de aceites volátiles

Se procedió de acuerdo a ISO 6571⁷³, con la única excepción que no se utilizó xileno para fijar el aceite esencial, con vistas a poder realizar el análisis posterior del aceite por Cromatografía Gaseosa. El contenido de aceite volátil se expresó en mL por 100 g de producto seco, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (100 V/m) 100/ (100 - H)$$

donde

V es el volumen total de aceite volátil en mL

m es la masa de la porción de ensayo en g

H es el contenido de humedad expresado como porcentaje de masa

2.5. Técnicas cromatográficas

2.5.1. Cromatografía de columna: Se midió el diámetro de las mismas, sumándole los bordes. La longitud de la columna debe ser 10 veces su diámetro. Por cada g de muestra, se emplearon de 50 a 100 g de gel de sílice, siempre para lograr acercarse al máximo valor. En caso de ser necesaria la preparación de un taco, se tomaron entre 5 y 6 % de gel de sílice a utilizar en la columna.

2.5.1.1. Preparación de las columnas cromatográficas: Las columnas cromatográficas provistas de un algodón en su extremo inferior se prepararon por vía húmeda, añadiendo por su parte superior una papilla preparada con gel de sílice 60 (0,2 a 0,5 mm) (35 a 70 mesh ASTM) como adsorbente y la mezcla cloroformo - etanol de polaridad creciente con la que se realizó la elusión. Para lograr un empaquetamiento uniforme se golpeó suavemente la superficie externa de la columna mientras se asienta la papilla. Posteriormente se aplicó la muestra problema sobre el lecho de la columna y se eluyó con la mezcla de disolventes seleccionada.

La marcha del fraccionamiento se siguió por cromatografía de capa delgada, los eluatos obtenidos (100) de 200 mL con comportamiento semejante fueron agrupados en ocho fracciones y se ordenaron según el orden de extracción (CM0, CM1, CM2, CM3, CM4, CM5, CM6 y CM7).

2.5.2. Cromatografía de capa delgada: Se utilizaron placas de gel de sílice 60 GF₂₅₄ con soporte de aluminio o vidrio y se usaron diferentes mezclas de los disolventes *n*-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Las placas cromatográficas se revelaron con el reactivo seleccionado.

2.5.3. Cromatografía de capa delgada preparativa: Se pesaron 30 g de gel de sílice 60 F₂₅₄ para capa delgada por placa (20 cm x 20 cm) y 70 mL de agua destilada, formándose una

papilla que se añadió sobre la placa. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 h aproximadamente y luego se activaron en la estufa 6 h a 120 °C.

2.5.4. Reveladores:

Dragendorff: Se midieron 5 mL de disolución al 1,6 % de subnitrito de bismuto en ácido acético glacial, 5 mL de disolución acuosa al 40 % de yoduro de potasio, 20 mL de ácido acético glacial, enrasado hasta 100 mL con agua destilada⁷⁴.

UV: Las placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ eluidas y secas, se colocaron bajo una lámpara UV y se observaron a longitud de onda de 254 nm.

Mayer: Se pesaron 1,36 g de cloruro de mercurio y se disolvieron en 60 mL de agua destilada. Por otra parte, se disolvieron en agua destilada 5 g de yoduro de potasio. Se mezclaron ambas disoluciones y se aforó a 100 mL con agua destilada⁷⁵.

2.6. Obtención, fraccionamiento y purificación de los crudos de alcaloides totales

2.6.1. Obtención de extractos y CAT de *C. micradenus 2*, *C. myricifolius 2* y *C. spiralis 2*

Se extrajeron a reflujo en equipo Soxhlet 100 g del material vegetal seco y molido de cada especie con 100 mL de *n*-hexano y a continuación con 100 mL de etanol durante 4 h cada vez.

Los extractos se filtraron y dejaron enfriar a temperatura ambiente.

En el caso del extracto hexánico de la especie *C. micradenus 2* al enfriarse se observó la aparición de un polvo amarillo, el cual se filtró y pesó (1 g). Por procesos de cristalizaciones sucesivas con cloroformo caliente y enfriamiento a 15 °C, se obtuvo un polvo blanco designado como: Precipitado *C. micradenus* hexano I (PCMH-I).

Por otra parte los extractos etanólicos se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio para obtener los CAT de cada especie, posteriormente los extractos secos fueron tratado con mezcla éter de petróleo:benceno (1:1) y ácido tartárico al 5 %, la fase acuosa ácida fue separada y

alcalinizada hasta pH 9 con bicarbonato ácido de potasio y extraída cuatro veces con mezcla cloroformo:etanol (2:1)⁷⁶. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, fue concentrada y llevada a sequedad. Se obtuvieron los CAT correspondiente a cada especie con peso de 0,45 g; 0,38 g y 0,24 g para el *C. micradenus* 2, *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2, respectivamente.

2.6.2. Obtención del crudo de alcaloides totales de *C. micradenus* 1

Para la obtención del CAT, los 7,5 kg del material vegetal seco y molido de *C. micradenus* 1 se extrajeron con cantidad suficiente de etanol al 96 % durante 24 h a temperatura ambiente, se filtró y repitió la operación cuatro veces, hasta ensayo negativo al reactivo de Mayer. El extracto etanólico se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio, seguidamente el extracto seco fue tratado con mezcla éter de petróleo:benceno (1:1) y ácido tartárico al 5 %, la fase acuosa ácida fue separada y alcalinizada hasta pH 9 con bicarbonato ácido de potasio y extraída cuatro veces con mezcla cloroformo:etanol (2:1)⁷⁶. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, posteriormente fue concentrada y llevada a sequedad y se obtuvo un CAT con un peso de 30,5 g, lo cual representa un 0,41 % con respecto al peso seco del material vegetal.

2.6.3. Fraccionamiento y purificación de alcaloides de *C. micradenus* 1

El fraccionamiento del CAT de la especie se realizó por cromatografía de columna sobre gel de sílice 60 (0,2 a 0,5 mm) (35 a 70 mesh ASTM) y como fase móvil sistema cloroformo – etanol (CHCl₃/EtOH) de polaridad creciente, eluyendo un total de 100 fracciones de 200 mL cada una, las cuales se unieron por comportamiento similar a cromatografía de capa delgada en las fracciones 1 (CM0) y 2 (CM1) en CHCl₃; 3 (CM2 – CM3) y 4 (CM4) en CHCl₃/EtOH 1 %; 5 (CM5) en CHCl₃/EtOH 5 %; 6 (CM6) en CHCl₃/EtOH 10 % y 7 (CM7) en CHCl₃/EtOH 50 %.

Se realizó cromatografía de capa delgada a las siete uniones de fracciones sobre gel de sílice Merck GF₂₅₄ como absorbente, mezcla CHCl₃/EtOH (95:5) como eluyente y reactivo de Dragendorff como revelador. Se obtuvo un cromatograma con ocho manchas definidas de alcaloides (Fig. 10), con los siguientes valores de Rf:

Rf ₁	0,67	CM0
Rf ₂	0,53	CM1
Rf ₃	0,43	CM2
Rf ₄	0,37	CM3
Rf ₅	0,29	CM4
Rf ₆	0,18	CM5
Rf ₇	0,09	CM6
Rf ₈	0,07	CM7

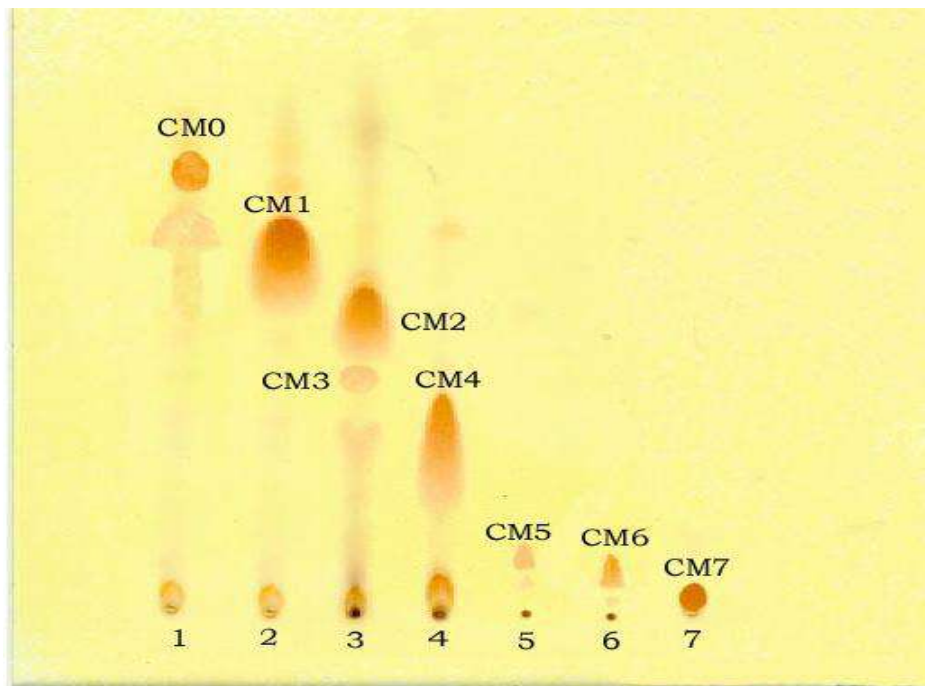


Fig. 10. Cromatografía en capa delgada de las uniones de fracciones obtenidas de la columna 1^{ra}.

Las uniones de fracciones obtenidas de la columna primaria se purificaron, según el caso, mediante columnas cromatográficas y placas preparativas, con las fases estacionarias y sistemas de disolventes seleccionados casuísticamente. Se obtuvieron los compuestos semipuros o puros según se muestra en el diagrama de flujo (Anexo 4). Entre paréntesis se consignan el sistema de disolventes en el cual eluyó cada compuesto y la masa obtenida.

2.6.4. Métodos de caracterización de los alcaloides de *C. micradenus* 1

La determinación de la temperatura de fusión y rotación específica se hizo en un microscopio modelo MHK y un equipo Polartronic (Universal), respectivamente.

Los espectros UV se registraron en un equipo Specord, en cubetas de 1 cm y diferentes disolventes. Se obtuvieron los espectros de IR con un equipo PyeUnicam SP 1100, en pastillas de bromuro de potasio. Se registraron los espectros de masas con un equipo Jeol DX-300 a 70 ev. Los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y bidimensionales se obtuvieron indistintamente en los equipos Jeol FX-90Q, Varían Gemini 200 MHz, Bruker AC 250 F y Varian Inova 500 MHz. Se utilizaron tubos de 5 mm de diámetro interno y diferentes disolventes o mezclas de ellos. Los parámetros de registro de cada espectro son dependientes del equipo.

2.7. Análisis por espectrometría de Gases-Masas de los aceites esenciales

2.7.1. Preparación de las muestras

Los aceites esenciales se diluyeron con n-pentano al 10 % v/v, para su inyección en los equipos que a continuación se describen.

2.7.2. Obtención de los espectros de masas y cromatogramas

El análisis de Cromatografía de Gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Konik 4000A GC, con inyección directa (FID) y columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). El

programa de temperatura fue de 70 °C (4 min) hasta 280 °C (4 °C/min). El inyector y detector de temperaturas estaban ambos a 250 °C. El gas portador (hidrógeno) a un mL/min. Los índices de retención lineales fueron calculados en base a n-parafinas. Se cuantificaron los componentes como el porcentaje del área total de volátiles de la integración electrónica (EZChrom v 6.7 software), descuidando los FID factores de contestación.

El análisis de GC-MS de los aceites se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Parkard serie 6890 GC con una interfase unida directamente a un detector selectivo de masas HP-4440 operado en modo de impacto de electrón (70 eV) con interfase de 230 °C. La detección se realizó en el modo escáner entre 30 y 400 Daltons. Fue usada una columna HP-5 Ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las condiciones cromatográficas fueron las mismas descritas para CG (FID). El gas portador (helio) a 1 mL/min. Los componentes se identificaron por los espectros de masas y los índices de la retención relativos. Donde fue posible, también se compararon los índices de retención y los espectros de masa con aquellos de muestras auténticas. También se compararon espectros de masa de la literatura.

2.8. Análisis por espectrometría de Gases-Masas de los extractos hexánicos

2.8.1. Preparación de las muestras

Para el análisis por CG-EM se pesaron 4 mg del sólido, se disolvieron en 0,2 mL de cloroformo y se derivatizaron con 100 µL de N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) a 70 °C durante 30 min en un termostato seco.

2.8.2. Obtención de los espectros de masas y cromatogramas

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5975 B inert (Agilent, EEUU) con un sistema de cómputo y una columna capilar HP-5 Ms (30 m x

0,25 mm d.i. y 0,25 μm de espesor de película, Agilent, EEUU). El horno se programó desde 60 (4 min isotérmico) hasta 200 °C a 20 °C/min, y desde 200 hasta 320 °C (20 min isotérmico) a 8 °C/min. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo *splitless*, se mantuvo a 320 °C. Las temperaturas de la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 300, 280 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. La adquisición se realizó desde 20 hasta 1000 m/z. Se inyectó 1 μL .

La identificación se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los de las bibliotecas NIST 2011 y Wiley-275, así como con los de sustancias de referencias comerciales disponibles y los de la literatura. También se compararon los tiempos de retención con los de sustancias de referencia comerciales. La determinación del porcentaje relativo se basó en el método de normalización interna (n=3).

Los reactivos empleados poseían calidad puro para análisis; esteroides: β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y colesterol; alcoholes grasos: C24OH-C30OH; AG: C10:0-C30:0 y MSTFA (Sigma Aldrich Inc, EEUU); hidrocarburos alifáticos: C6-C44 (Supelco, EEUU).

Los disolventes fueron de grado cromatográfico o analítico (Merck, Alemania).

2.9. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

2.9.1. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras correspondientes a los crudos de alcaloides de las tres especies de *Croton* estudiadas y las muestras de los alcaloides estándar ocobotrina, 8,14 dihidrosalutaridina, isoboldina y nildahillina, se procedió de la siguiente manera: 2 mL de una disolución (1 mg/mL) de cada extracto en metanol/agua (MeOH/H₂O) 8:2 (v/v) se extrajeron en fase sólida usando cartucho RP18 y se eluyeron con MeOH/H₂O 8:2 (v/v). Después de

secado el extracto, se tomó 1 mg el cual se disolvió en 1 mL de mezcla MeOH/H₂O 8:2 (v/v) y se filtró a través de una membrana de nailon de 0,22 µm (Disolución A).

2.9.2. Obtención de los perfiles cromatográficos

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron en un equipo LC-(Jasco ®) con detector UV y ELS, con una columna de fase reversa C-18, Phenomenex ® Luna (2) (250 × 4.6 mm id, 5 mm y como fase móvil agua acidificada con 0,1 % de ácido fórmico (eluyente A) y metanol con 0,1 % de ácido fórmico (eluyente B). El gradiente de elución fue de 30 a 100 % de B durante 30 minutos a una velocidad de 1mL/min, monitoreado a $\lambda = 200$ a 300 nm.

2.10. Análisis por espectrometría de masas en *tandem* (ESI-IT-MS/MS)

2.10.1. Preparación de las muestras

Para el análisis por espectrometría de masas, se preparó la disolución A y se tomó una alícuota de 10 µL y se diluyó con MeOH/H₂O 8:2 (v/v) hasta 1 mL, posteriormente se filtró a través de un filtro con membrana de nailon de 0.22 µm. Una alícuota de la disolución anterior (150 µL) fue diluida con MeOH/H₂O 8:2 (v/v) hasta una concentración final de 1 ppm y finalmente fue introducida por inyección directa a 5 µL/min en la fuente ESI.

2.10.2. Análisis por inyección directa

El análisis por inyección directa de cada crudo se desarrolló en un espectrómetro de masas con trampa de iones ThermoFinnigan LCQ Deca (San José, CA) equipado con una interfase ESI. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo positivo. Los espectros de iones totales (huellas) y *tandem* (MSⁿ) fueron tomados en el rango de m/z 50 a 2000. Las fragmentaciones para el análisis en *tandem* se realizaron con una energía de colisión entre 20 y 35 %. Los parámetros optimizados fueron: temperatura del capilar 300 °C; voltaje del capilar 13 V;

voltaje del aerosol 5 kV; velocidad de flujo del gas nebulizador 35 (nitrógeno, unidades arbitrarias); velocidad de flujo del gas auxiliar 10 (unidades arbitrarias).

2.11. Ensayos biológicos

2.11.1. Bioensayo antimicrobiano de muestras de las tres especies en estudio

Los ensayos de la actividad antimicrobiana fueron realizados en los Laboratorios del Grupo de Productos Naturales y Homeopatía del Instituto Finlay con las cepas de referencia *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *E. coli* (ATCC 10536) y *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC 10231). Todos los microorganismos fueron ajustados a 0,5 escala Mc Farland.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos de *C. micradenus* 2, *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2, del polvo blanco obtenido del extracto hexánico de *C. micradenus* 2 (PCMH-I) y de los aceites esenciales de las tres especies mediante el método de microdilución⁷⁷.

De cada muestra se realizaron diluciones dobles en placas de 96 pozos. En cada pozo se añadieron 50 µL del extracto diluido, 50 µL del medio de cultivo y 10 µL del microorganismo ajustado a 0,5 escala Mc Farland. Las placas se incubaron a 37 °C por 2 h, posteriormente se aplicaron 5 µL de cada dilución por triplicado en placas con medio Tristona Soya Agar; las placas se incubaron de 24 a 48 h a 37 °C. Se empleó como control el antibiótico cloranfenicol a una concentración de 5 mg/mL.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la concentración más baja capaz de inhibir totalmente el crecimiento bacteriano.

2.11.2. Bioensayo como control de plagas (*Mocis latipes* L.)

2.11.2.1. Ensayo antiapetitivo del extracto etanólico de *C. micradenus* 1

Este bioensayo se realizó en el Laboratorio de Prueba de Productos del Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical con la especie de insecto fitófago *Mocis latipes* Guerin “gusano de las hierbas” (Lepidoptera: Noctuidae), usado normalmente como indicador biológico en ensayos de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos⁷⁸.

Se cortaron hojas frescas de *Sorghum halepense* L. (Don Carlos) en redondeles de 1 cm de diámetro y se sumergieron por espacio de un min en el extracto etanólico de la especie *C. micradenus* 1, a una concentración, estandarizada por dichos laboratorios para ensayos de rutina (de screening biológico) con muestras de productos naturales de plantas, de 12,5 % v/v para luego dejarlo secar al aire. Los discos usados como controles fueron tratados solamente con agua destilada.

Se colocaron de forma alterna 10 discos (cinco tratados y cinco controles) en cada placa Petri de 14 cm de diámetro, a las cuales se le colocaron previamente un papel de filtro humedecido. A continuación se liberaron en su interior cinco larvas en estadio L3 (edad: 7 días). Se utilizaron cuatro réplicas por tratamiento, se dejó un testigo absoluto, donde todos los discos fueron tratados con agua.

Las evaluaciones se realizaron transcurridas las 24 h, se calculó el área foliar consumida en porcentaje y por último se determinó el índice de fago depresión (IFD) mediante a siguiente expresión:

$$\text{IFD} = \frac{\% \text{ consumido en los discos testigos} - \% \text{ consumido en los discos tratados}}{\% \text{ consumido en los discos testigos}}$$

CAPÍTULO 3. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

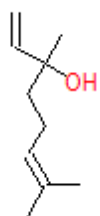
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición química, rendimiento y actividad biológica de los aceites esenciales de las hojas de las especies *C. micradenus* 1, *C. myricifolius* 1 y *C. spiralis* 1

3.1.1. Composición de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio

Los resultados de la composición química de los aceites esenciales de las especies en orden de elusión de la columna, índice de retención (Ir) y porcentaje de cada uno de los constituyentes, se muestran en las Tablas VII, VIII y IX.

Se identificaron 78 de 79 compuestos en *C. micradenus* que representan un 98,7 %. Los componentes mayoritarios fueron linalol (34,9 %), un compuesto no identificado (NI) de peso molecular 168 (5,9 %) y α -pineno (5,3 %) (Fig. 11), los cuales representan un 46,1 % del total. Las estructuras de dos de los componentes mayoritarios se presentan en la Figura 12.



Linalol

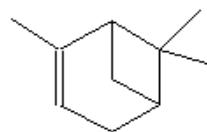
 α -pineno

Fig. 12. Estructuras de los componentes mayoritarios de *C. micradenus*.

Para la especie *C. myricifolius* se identificaron 82 de 85 compuestos que representan un 96,5 %. Los componentes mayoritarios fueron borneol (8,8 %), óxido de cariofileno (7,8), acetato de bornilo (6,7 %) y un compuesto no identificado (NI) de peso molecular 238 (5,9 %) (Fig. 13), los cuales representan un 29,2 % del total. Las estructuras de los tres componentes mayoritarios se presentan en la Figura 14.

Tabla VII. Composición química del aceite de las hojas de *C. micradenus*.

No.	Compuesto	Ir	Porcentaje
1	triciclono	925	0,4
2	α -pineno	939	5,3
3	canfeno	954	2,0
4	tuya-2,4(10)-dieno	957	<0,1
5	benzaldehido	961	<0,1
6	verbeneno	967	<0,1
7	sabineno	976	0,7
8	β -pineno	981	1,1
9	mirceno	991	2,1
10	mesitileno	994	<0,1
11	α -felandreno	1005	0,3
12	α -terpineno	1018	<0,1
13	α,p -dimetil estireno	1026	0,5
14	limoneno	1031	4,5
15	1,8-cineol	1034	1,1
16	<i>Z</i> - β -ocimeno	1040	0,1
17	γ -terpineno	1062	0,1
18	óxido de <i>cis</i> -linalol (forma furanoide)	1074	0,1
19	<i>p</i> -cimeneno	1089	0,4
20	linalol	1098	34,9
21	isoforona	1118	<0,1
22	<i>trans</i> -sabinol	1139	<0,1
23	4-ceto-isoforona	1141	3,9
24	<i>trans</i> -verbenol	1143	3,7
25	alcanfor	1145	0,6
26	borneol	1163	2,2
27	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1166	<0,1
28	terpinen-4-ol	1177	0,7
29	<i>p</i> -metil-acetofenona	1180	0,2
30	<i>p</i> -cimen-8-ol	1183	1,9
31	α -terpineol	1188	1,2
32	mirtenol	1194	0,2
33	<i>cis</i> -carveol	1229	0,1
34	(<i>Z</i>)-ocimenona	1231	1,6
35	cuminaldehído	1237	<0,1
36	(<i>E</i>)-ocimenona	1239	0,2
37	carvona	1242	0,4
38	(<i>Z</i>)-anetol	1251	<0,1
39	acetato de <i>cis</i> -crisantenilo	1265	0,2
40	acetato de bornilo	1289	3,3
41	timol	1290	<0,1

No.	Compuesto	Ir	Porcentaje
42	γ -terpinen-7-al	1292	0,7
43	<i>trans</i> -benzalacetona	1330	<0,1
44	α -cubebeno	1351	0,2
45	(<i>E</i>)-cinamato de metilo	1377	0,5
46	β -elemeno	1390	0,3
47	NI	1411	5,9
48	β -cariofileno	1416	2,4
49	ácido nérico	1421	0,2
50	benzoato de isoamilo	1433	0,3
51	α -humuleno	1455	0,3
52	(<i>E</i>)- β -farneseno	1457	0,1
53	6-fenil-2-hexanona	1462	<0,1
54	(<i>Z</i>)-cinamato de etilo	1467	<0,1
55	γ -muuroleno	1480	0,1
56	germacreno D	1485	0,1
57	(<i>E</i>)- β -ionona	1489	0,1
58	δ -selineno	1493	0,1
59	epi-cubenol	1494	<0,1
60	8-hidroxicarvotanacetona	1500	0,1
61	β -bisaboleno	1506	0,2
62	γ -cadineno	1514	<0,1
63	<i>trans</i> -calameneno	1529	<0,1
64	δ -cadineno	1523	0,2
65	α -calacoreno	1546	0,2
66	germacreno B	1562	0,4
67	alcohol cariofileno	1568	<0,1
68	óxido de cariofileno	1583	2,8
69	globulol	1585	0,1
70	guaiol	1601	0,2
71	epóxido de humuleno II	1608	0,2
72	1,10-di-epi-cubenol	1619	0,1
73	epi- α -cadinol	1640	0,2
74	α -muurolol	1646	0,3
75	cubenol	1648	<0,1
76	α -cadinol	1653	0,1
77	bulnesol	1664	0,1
78	acetato de α -bisabolol	1798	2,4
79	acetato de epi- α -bisabolol	1802	0,5

Espectro de masas del compuesto no identificado (NI), m/z (int. rel. %): 150(100), 91(94), 107(90), 135(69), 109(66), 79(49), 77(43), 67(35), 39(34), 168(24).

Tabla VIII. Composición química del aceite de las hojas de *C. myricifolius*.

No.	Compuestos	Ir	Porcentaje
1	(<i>E</i>)-2-hexenal	854	<0,1
2	triciclono	926	1,3
3	α -pineno	939	3,9
4	canfeno	953	2,6
5	tuya-2,4(10)-dieno	956	1,2
6	benzaldehido	961	<0,1
7	sabineno	976	0,1
8	β -pineno	979	2,0
9	6-metil-5-hepten-2-ona	985	<0,1
10	mirceno	991	0,2
11	α -terpineno	1018	<0,1
12	<i>p</i> -cimeno	1026	2,2
13	1,8-cineol	1033	4,3
14	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1040	<0,1
15	γ -terpineno	1060	0,1
16	hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1068	0,1
17	óxido de <i>cis</i> -linalol (forma furanoide)	1074	0,3
18	canfenilona	1082	0,4
19	óxido de <i>trans</i> -linalol (forma furanoide)	1087	<0,1
20	α , <i>p</i> -dimetilestireno	1089	0,4
21	2-nonanona	1091	0,7
22	linalol	1098	1,2
23	α -fenchol	1112	0,3
24	α -canfolenal	1124	1,4
25	nopinona	1136	<0,1
26	<i>trans</i> -pinocarveol	1139	3,9
27	alcanfor	1143	0,9
28	<i>trans</i> -verbenol	1145	2,7
29	pinocarvona	1162	1,5
30	borneol	1165	8,8
31	terpinen-4-ol	1177	1,4
32	<i>p</i> -metil-acetofenona	1181	0,1
33	α -terpineol	1189	3,8
34	mirtenal	1193	0,9
35	mirtenol	1195	0,9
36	verbenona	1204	1,7
37	<i>trans</i> -carveol	1218	1,1
38	<i>cis</i> -carveol	1229	<0,1
39	formato de isobornilo	1233	<0,1
40	cuminaldehído	1239	0,1
41	carvona	1242	0,3
42	carvotanacetona	1246	<0,1
43	piperitona	1252	<0,1
44	carvenona	1252	<0,1
45	perilla aldehído	1271	0,1

No.	Compuestos	Ir	Porcentaje
46	acetato de bornilo	1285	6,7
47	<i>p</i> -cimen-7-ol	1287	<0,1
48	2-undecanona	1291	0,1
49	perilla alcohol	1295	0,2
50	carvacrol	1298	0,1
51	δ -elemeno	1339	0,1
52	α -cubebeno	1351	<0,1
53	eugenol	1356	<0,1
54	isoledeno	1372	0,1
55	α -copaeno	1376	0,2
56	propanoato de isobornilo	1382	0,1
57	sativeno	1385	0,1
58	(<i>E</i>)- α -damascona	1390	0,1
59	cipereno	1398	0,1
60	β -cariofileno	1418	0,8
61	α -santaleno	1420	<0,1
62	<i>trans</i> - α -bergamoteno	1436	0,1
63	α -humuleno	1454	0,2
64	viridifloreño	1491	2,1
65	epi-cubebol	1494	0,4
66	β -dihidroagarofurano	1496	1,7
67	cupareno	1502	<0,1
68	γ -cadineno	1513	0,3
69	7-epi- α -selineno	1517	0,3
70	<i>cis</i> -calameneno	1521	0,2
71	δ -cadineno	1524	0,2
72	<i>trans</i> -calameneno	1531	0,3
73	NI 1	1542	1,9
74	ledol	1565	0,2
75	óxido de cariofileno	1581	7,8
76	NI 2	1583	3,2
77	globulol	1584	0,5
78	epóxido de α -humuleno II	1606	1,0
79	10-epi- γ -eudesmol	1619	4,0
80	γ -eudesmol	1631	3,5
81	hinesol	1638	2,6
82	NI 3	1647	5,9
83	valerianol	1655	4,4
84	kaur-16-eno	2011	0,1
85	manol	2055	0,2

Espectros de masas de los compuestos no identificados (NI) [m/z (int. rel. %)]:

NI1: 220(100), 82(69), 123(46), 205(46), 202(46), 147(42), 109(37), 163(29), 43(22), 187(19), 234(10).

NI2: 163(100), 234(88), 149(59), 191(57), 43(51), 109(46), 123(44), 91(36), 135(29), 77(20), 219(20), 176(17).

NI3: 223(100), 238(97), 162(75), 43(45), 205(39), 82(36), 125(35), 97(31), 69(23), 181(21).

Tabla IX. Composición química del aceite de las hojas de *C.spiralis*.

No.	Compuestos	Ir	Porcentaje
1	4-metil-3-penten-2-ona	847	1,1
2	(<i>E</i>)-2-hexenal	854	<0,1
3	santolina trieno	908	<0,1
4	α -tuyeno	931	0,3
5	α -pineno	939	2,8
6	canfeno	953	0,2
7	benzaldehido	961	<0,1
8	sabineno	976	<0,1
9	β -pineno	980	6,9
10	mirceno	991	1,0
11	α -felandreno	1005	<0,1
12	δ -3-careno	1011	0,3
13	α -terpineno	1018	0,1
14	<i>p</i> -cimeno	1025	1,2
15	1,8-cineol	1033	3,8
16	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1041	0,1
17	γ -terpineno	1062	0,2
18	hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1068	0,3
19	óxido de <i>cis</i> -linalol (forma furanoide)	1074	<0,1
20	terpinoleno	1087	0,3
21	hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1097	0,4
22	linalol	1098	0,1
23	<i>cis</i> -tuyona	1102	0,1
24	4-acetil-1-metilciclohexeno	1135	6,7
25	<i>trans</i> -sabinol	1140	0,4
26	<i>trans</i> -verbenol	1144	0,1
27	pinocarvona	1162	0,1
28	borneol	1165	0,2
29	terpinen-4-ol	1177	0,7
30	<i>p</i> -metilacetofenona	1182	0,1
31	α -terpineol	1189	2,1
32	mirtenal	1193	<0,1
33	mirtenol	1194	0,6
34	verbenona	1204	<0,1
35	<i>trans</i> -carveol	1216	<0,1
36	timol metil éter	1234	<0,1
37	carvona	1242	<0,1
38	perilla aldehído	1271	<0,1
39	acetato de isobornilo	1285	<0,1
40	timol	1290	<0,1
41	perilla alcohol	1294	0,1
42	carvacrol	1297	<0,1
43	α -cubebeno	1351	0,1
44	eugenol	1356	0,1
45	α -ilangeno	1371	0,1

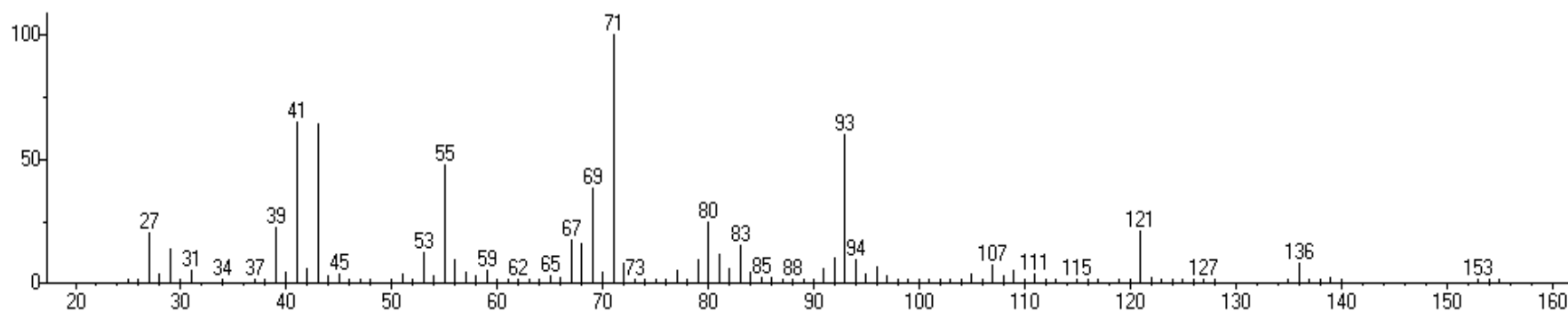
No.	Compuestos	Ir	Porcentaje
46	α -copaeno	1374	0,2
47	β -bourboneno	1385	0,1
48	metileugenol	1401	0,5
49	β -cariofileno	1416	5,4
50	β -gurjuneno	1432	0,1
51	<i>trans</i> - α -bergamoteno	1436	0,8
52	vestistenona	1444	0,1
53	α -humuleno	1455	2,5
54	(<i>E</i>)- β -farneseno	1458	0,5
55	valenceno	1491	0,4
56	α -muuroleno	1499	1,1
57	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	1507	0,3
58	γ -cadineno	1513	0,1
59	cubebol	1514	0,7
60	(<i>Z</i>)- γ -bisaboleno	1517	0,6
61	δ -cadineno	1523	0,9
62	germacreno B	1556	0,4
63	(<i>E</i>)-nerolidol	1563	0,5
64	espatulenol	1576	7,1
65	óxido de cariofileno	1580	2,0
66	epóxido de α -humuleno I	1593	1,0
67	epóxido de α -humuleno II	1606	2,1
68	NI 1	1615	2,2
69	epi- α -muurolol	1641	0,8
70	NI 2	1647	1,9
71	óxido de α -bisabolol B	1654	2,3
72	α -bisabolol	1682	16,2
73	juniper alcanfor	1690	1,8
74	NI 3	1697	2,0
75	(<i>E</i>)- γ -atlantona	1701	13,4
76	epi-13-manol	1960	0,1

Espectros de masas de los compuestos no identificados [m/z (int. rel. %)]:

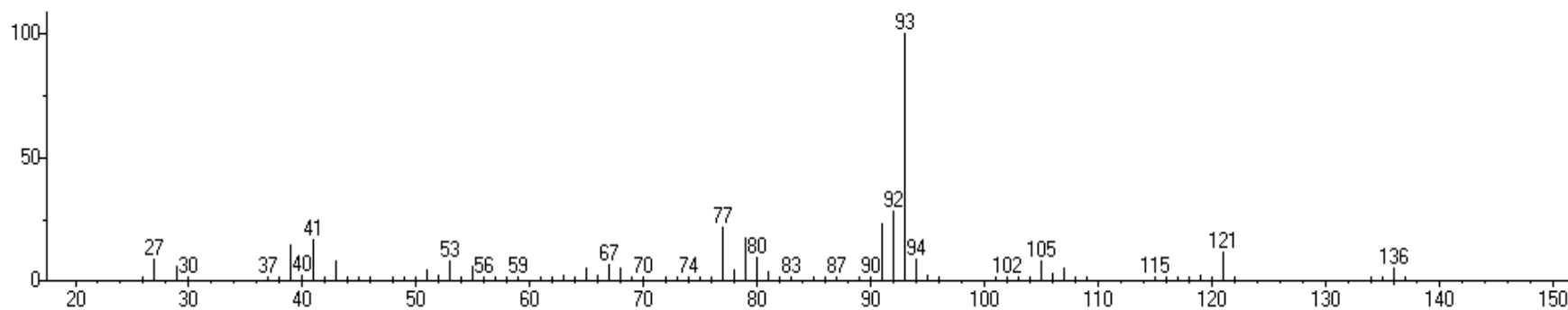
NI1: 123(100), 109(78), 108(31), 81(28), 179(26), 190(20), 41(17), 207(9), 222(6).

NI2: 119(100), 202(37), 91(37), 107(33), 134(26), 79(19), 41(7), 55(6), 187(4).

NI3: 83(100), 135(78), 123(62), 203(37), 218(32), 107(32), 55(24), 41(15), 150(15), 175(10).



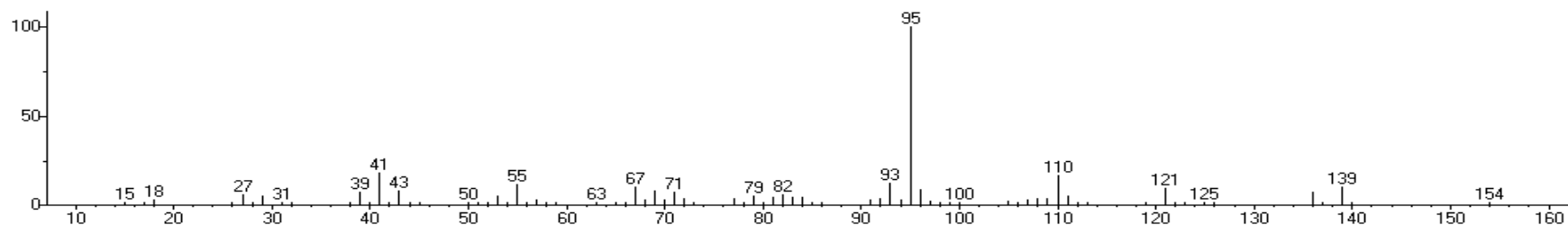
Linalol m/z (int. rel. %): 71 (100), 41 (64), 43 (64), 93 (59), 55 (47), 69 (38), 80 (24), 39 (22), 121 (21)



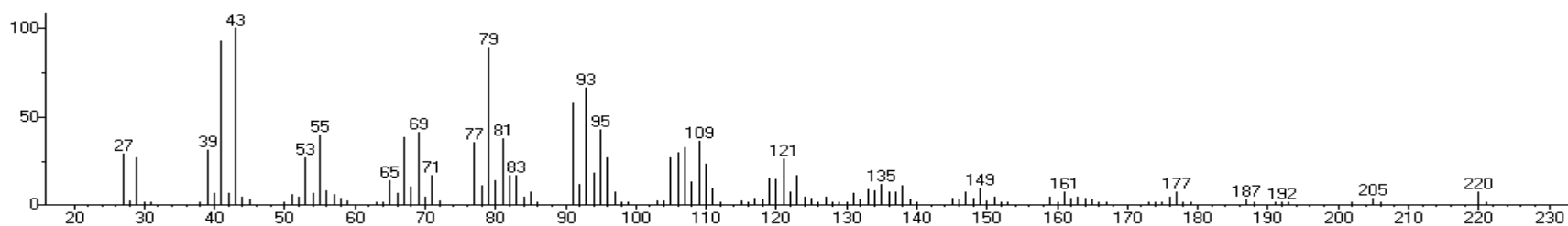
α -pineno m/z (int. rel. %): 93 (100), 92 (28), 91 (22), 77 (21), 79 (17), 41 (16), 39 (14), 121 (11), 80 (88)

Compuesto no identificado (NI) m/z (int. rel. %): 150 (100), 91 (94), 107 (90), 135 (69), 109 (66), 79 (49), 77 (43), 67 (35), 39 (34), 168 (24)

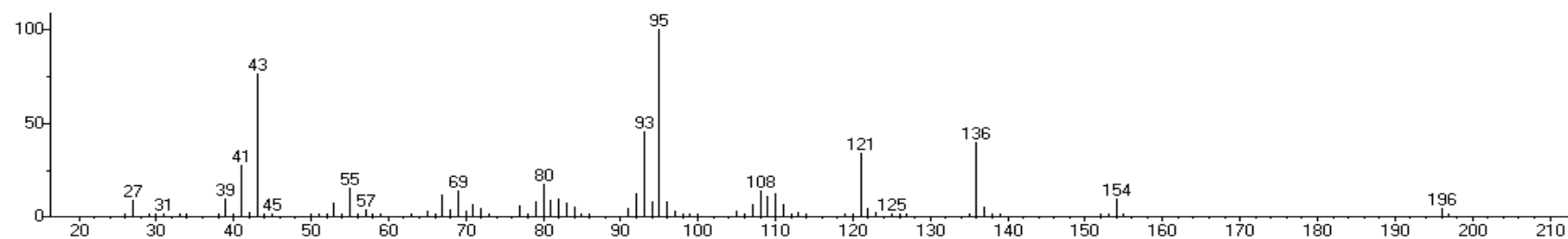
Fig. 11. Espectros de masas de los componentes mayoritarios identificados en *C. micradenus*.



Borneol m/z (int. rel. %): 95 (100), 41 (18), 110 (16), 93 (12), 55 (11), 67 (10), 139 (9), 121 (9), 96 (8), 69 (8)



Óxido de cariofileno m/z (int. rel. %): 43 (100), 41 (93), 79 (88), 93 (66), 91 (57), 95 (42), 69 (41), 55 (39), 67 (38), 81 (37)



Acetato de bornilo m/z (int. rel. %): 95 (100), 43 (76), 93 (45), 136 (39), 121 (34), 41 (27), 80 (17), 55 (148), 108 (13), 69 (13)

Compuesto no identificado (NI) m/z (int. rel. %): 223 (100), 238 (97), 162 (75), 43 (45), 205 (39), 82 (36), 125 (35), 97 (31), 69 (23), 181 (21)

Fig. 13. Espectros de masas de los componentes mayoritarios identificados en *C. myricifolius*.

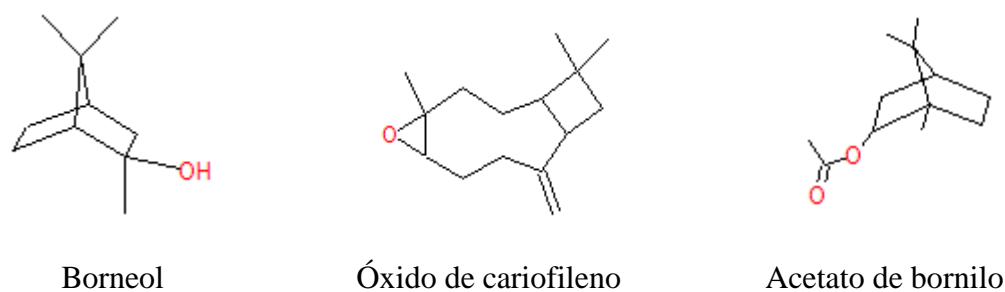


Fig. 14. Estructuras de los componentes mayoritarios de *C. myricifolius*.

Mientras que se identificaron 73 de 76 compuestos en *C. spiralis* que representan un 96,1 %. Los componentes mayoritarios fueron α -bisabolol (16,2 %), (*E*)- γ -atlantona (13,4 %), espatulenol (7,1 %), β -pineno (6,9 %), 4-acetil-1-metilciclohexeno (6,7 %) y β -cariofileno (5,4%) (Fig. 15), los cuales representan un 55,7 % del total. Las estructuras de los seis componentes mayoritarios se presentan en la Figura 16.

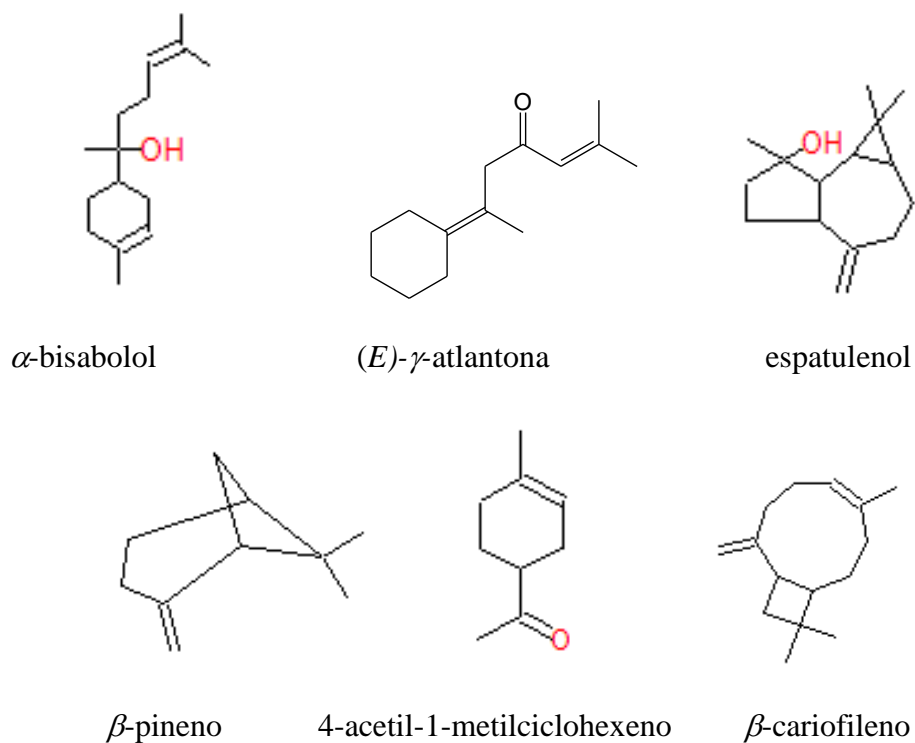
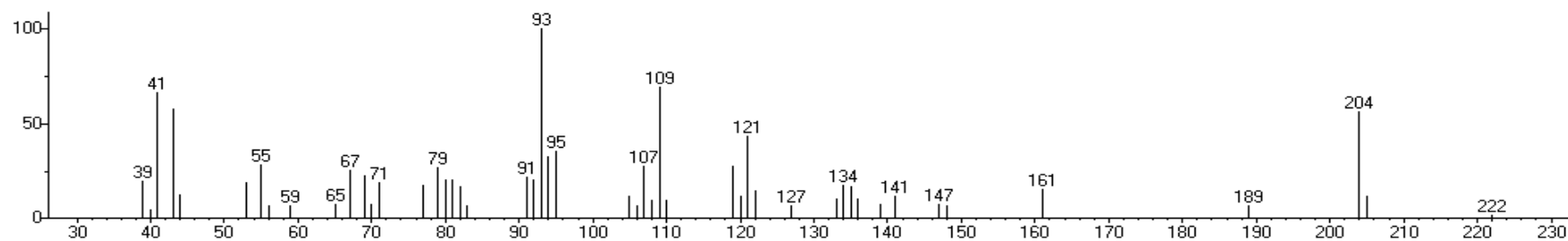
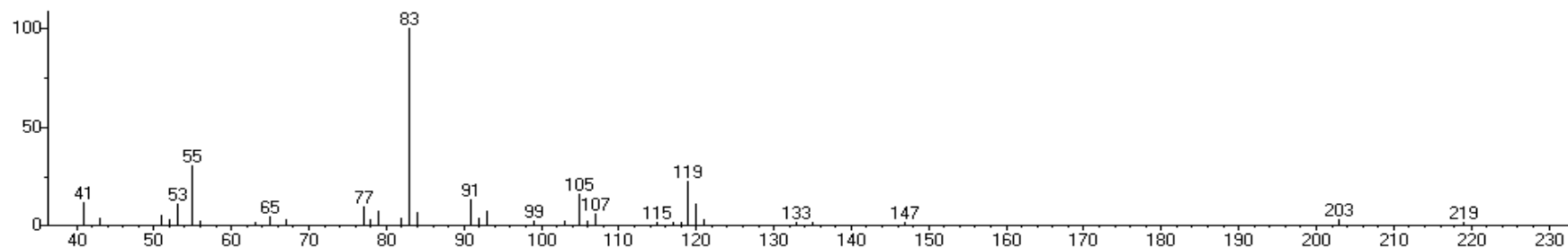


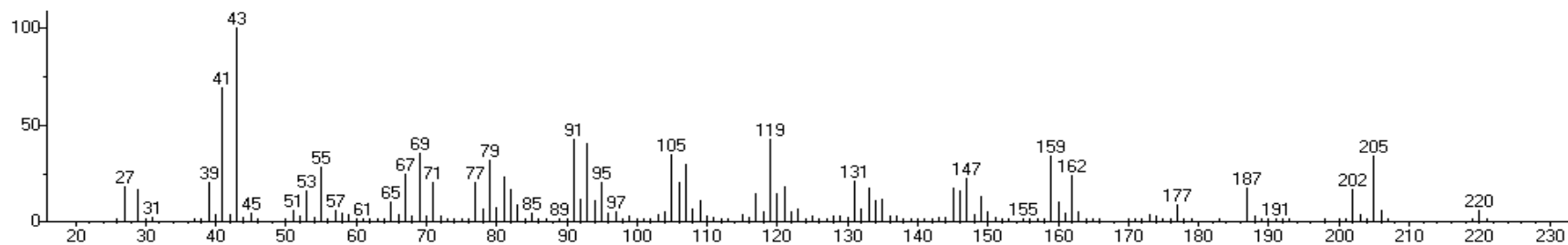
Fig. 16. Estructuras de los componentes mayoritarios de *C. spiralis*.



α -bisabolol m/z (int. rel. %): 93 (100), 109 (69), 41 (66), 43 (57), 204 (56), 121 (43), 95 (35), 94 (32), 55 (28), 107 (27)

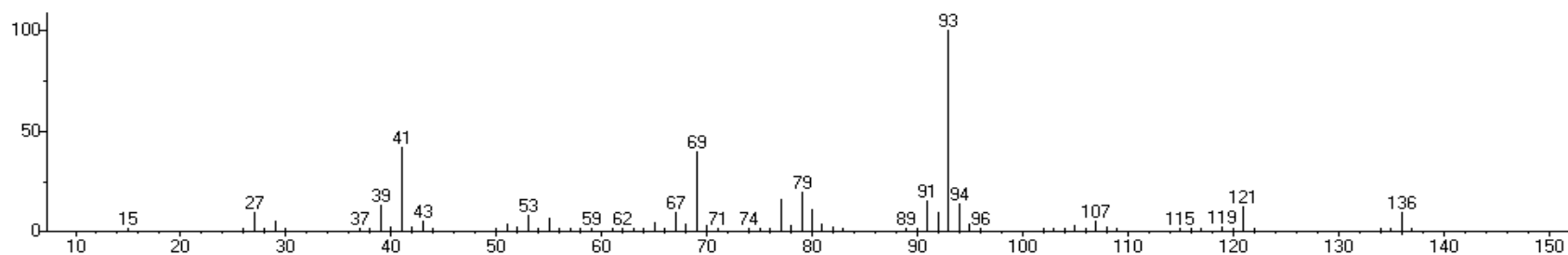


(*E*)- γ -atlantona m/z (int. rel. %): 83 (100), 55 (30), 119 (22), 105 (16), 91 (13), 41 (11), 53 (10), 120 (10), 77 (9), 79 (7)

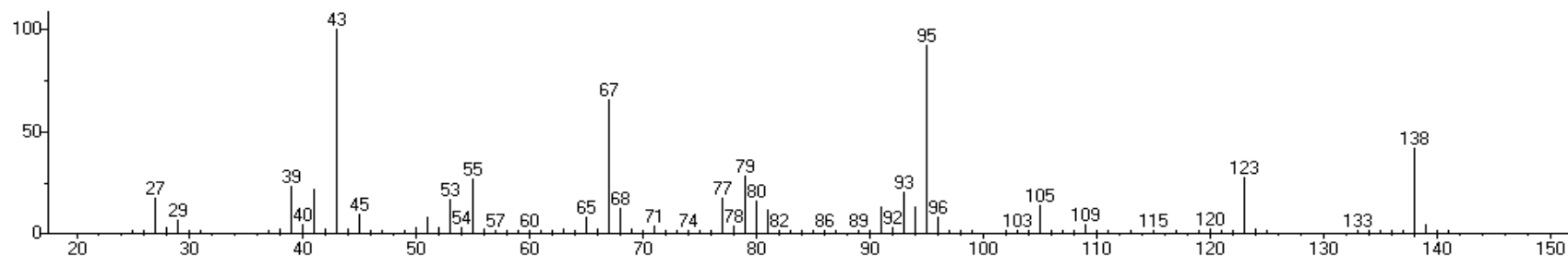


Espatulenol m/z (int. rel. %): 43 (100), 41 (69), 91 (42), 119 (42), 93 (39), 69 (35), 105 (34), 159 (34), 205 (33), 79 (32)

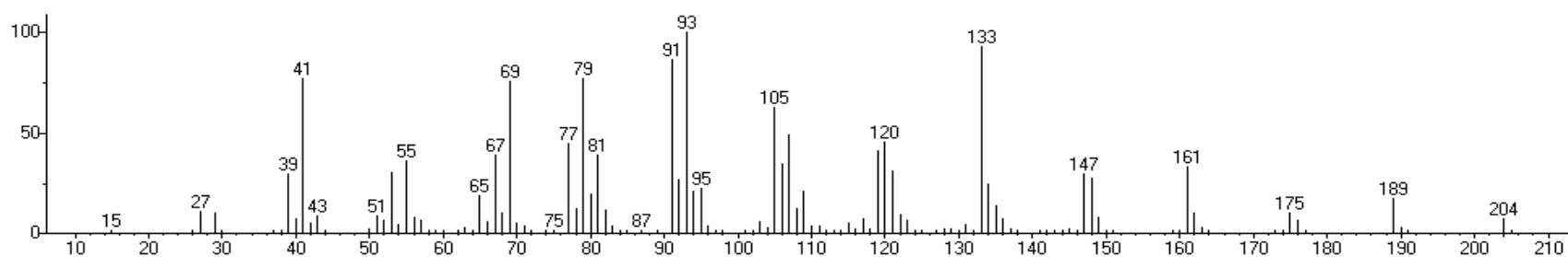
Fig. 15. Espectros de masas de los componentes mayoritarios identificados en *C. spiralis*.



β -pineno m/z (int. rel. %): 93 (100), 41 (42), 69 (39), 79 (19), 77 (16), 91 (15), 94 (14), 39 (12), 121 (12), 80 (12)



4-acetil-1-metilciclohexeno m/z (int. rel. %): 43 (100), 95 (92), 67 (65), M^+ 138 (41), 79 (28), 123 (27), 55 (26), 39 (23), 41 (21), 93 (20)



β -cariofileno m/z (int. rel. %): 93 (100), 133 (92), 91 (86), 41 (77), 79 (76), 69 (75), 105 (62), 107 (48), 120 (45), 77 (44)

Fig. 15. (cont.) Espectros de masas de los componentes mayoritarios identificados en *C. spiralis*.

En total se identificaron 153 de 160 compuestos, de los cuales 22 fueron comunes para los tres aceites y se reconocen 32 compuestos que solo aparecen en la composición para la especie *C. spiralis* (3 NI), mientras que se registran 36 compuestos para *C. micradenus* y *C. myricifolius* (4 NI) (Tabla X).

Los resultados del análisis de los compuestos mayoritarios que contienen los aceites esenciales de las hojas de un gran número de especies del género *Croton* reportados en la literatura⁶⁵ (Tabla XI), muestran diferencias cualitativas y cuantitativas con los compuestos identificados en los aceites de las tres especies en estudio, sin embargo β -cariofileno y germacreno D, a menudo aparecen como principales constituyentes del aceite esencial de varias especies del género.

No obstante, es de señalar que linalol y α -pineno los componentes mayoritarios de *C. micradenus*, se encuentra el primero en las especies *C. cajucara* (41,2 %), *C. palanostigma* (25,4 %) y *C. sacaquinha* (5,8 %), mientras que el segundo aparece en las especies *C. adenocalyx* (32,6 %) y *C. lanjouwensis* (26,6 %). Por su parte, en *C. myricifolius*, de los tres componentes mayoritarios que tiene, solo óxido de cariofileno se encuentra en las especies *C. campestris* (29,9 %) y *C. zambesicus* (19,5 %). Mientras, β -cariofileno uno de los componentes mayoritarios en *C. spiralis*, está en las especies *C. adenocalyx* (10,2 %), *C. cajucara* (6,9 %), *C. palanostigma* (21,0 %), *C. sacaquinha* (5,7 %) y *C. zambesicus* (10,8 %). En el caso de otro de los mayoritarios de *C. spiralis*, el α -pineno es uno de los compuestos que comparte con *C. micradenus*, cuyo comentario se expresó anteriormente. En tal sentido, podemos plantear que los resultados obtenidos para las tres especies en estudio no se alejan de lo reportado en la literatura para el género⁶⁵.

Tabla X. Comparación entre la composición química de los aceites esenciales de las tres especies.

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			<i>C. micradenus</i>	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
1	4-metil-3-penten-2-ona	847	-	-	1,1
2	(<i>E</i>)-2-hexenal	854	-	<0,1	<0,1
3	santolina trieno	908	-	-	<0,1
4	triciclono	925	0,4	1,3	-
5	α -tuyeno	931	-	-	0,3
6	α -pineno	939	5,3	3,9	2,8
7	canfeno	954	2,0	2,6	0,2
8	tuya-2,4(10)-dieno	957	<0,1	1,2	-
9	benzaldehido	961	<0,1	<0,1	<0,1
10	verbeneno	967	<0,1	-	-
11	sabineno	976	0,7	0,1	<0,1
12	β -pineno	981	1,1	2,0	6,9
13	6-metil-5-hepten-2-ona	985	-	<0,1	-
14	mirceno	991	2,1	0,2	1,0
15	mesitileno	994	<0,1	-	-
16	α -felandreno	1005	0,3	-	<0,1
17	δ -3-careno	1011	-	-	0,3
18	α -terpineno	1018	<0,1	<0,1	0,1
19	<i>p</i> -cimeno	1026	0,5	2,2	1,2
20	limoneno	1031	4,5	-	-
21	1,8-cineol	1034	1,1	4,3	3,8
22	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1040	0,1	<0,1	0,1
23	γ -terpineno	1060	0,1	0,1	0,2
24	hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1068	-	0,1	0,3
25	óxido de <i>cis</i> -linalol (forma furanoide)	1074	0,1	0,3	<0,1
26	canfenilona	1082	-	0,4	-
27	terpinoleno	1086	-	-	0,3
28	óxido de <i>trans</i> -linalol (forma furanoide)	1087	-	<0,1	-
29	<i>p</i> -cimeneno	1088	0,4	-	-
30	α , <i>p</i> -dimetil estireno	1089	0,5	0,4	-
31	2-nonanona	1091	-	0,7	-
32	hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1097	-	-	0,4
33	linalol	1098	34,9	1,2	0,1
34	<i>cis</i> -tuyona	1102	-	-	0,1
35	α -fenchol	1112	-	0,3	-
36	isoforona	1118	<0,1	-	-
37	α -canfolenal	1124	-	1,4	-
38	4-acetil-1-metilciclohexeno	1135	-	-	6,7
39	nopinona	1136	-	<0,1	-

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			<i>C. micradenus</i>	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
39	<i>trans</i> -sabinol	1139	<0,1	-	0,4
40	<i>trans</i> -pinocarveol	1140	-	3,9	-
41	4-ceto-isoforona	1141	3,9	-	-
42	<i>trans</i> -verbenol	1144	3,7	2,7	0,1
43	alcanfor	1145	0,6	0,9	-
44	pinocarvona	1162	-	1,5	0,1
45	borneol	1165	2,2	8,8	0,2
46	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1166	<0,1	-	-
47	terpinen-4-ol	1177	0,7	1,4	0,7
48	<i>p</i> -metil-acetofenona	1180	0,2	0,1	0,1
49	<i>p</i> -cimen-8-ol	1183	1,9	-	-
50	α -terpineol	1188	1,2	3,8	2,1
51	mirtenal	1193	-	0,9	<0,1
52	mirtenol	1194	0,2	0,9	0,6
53	verbenona	1204	-	1,7	<0,1
54	<i>trans</i> -carveol	1216	-	1,1	<0,1
55	<i>cis</i> -carveol	1229	0,1	<0,1	-
56	(<i>Z</i>)-ocimenona	1231	1,6	-	-
57	formato de isobornilo	1233	-	<0,1	-
58	timol metil éter	1234	-	-	<0,1
59	cuminaldehído	1237	<0,1	0,1	-
60	(<i>E</i>)-ocimenona	1239	0,2	-	-
61	carvona	1242	0,4	0,3	<0,1
62	carvotanacetona	1246	-	<0,1	-
63	(<i>Z</i>)-anetol	1251	<0,1	-	-
64	piperitona	1252	-	<0,1	-
65	carvenona	1252	-	<0,1	-
66	acetato de <i>cis</i> -crisantenilo	1265	0,2	-	-
67	perilla aldehído	1271	-	0,1	<0,1
68	acetato de isobornilo	1285	-	-	<0,1
69	<i>p</i> -cimen-7-ol	1287	-	<0,1	-
70	acetato de bornilo	1289	3,3	6,7	-
71	timol	1290	<0,1	-	<0,1
72	2-undecanona	1291	-	0,1	-
73	γ -terpinen-7-al	1292	0,7	-	-
74	perilla alcohol	1294	-	0,2	0,1
75	carvacrol	1297	-	0,1	<0,1
76	<i>trans</i> -benzalacetona	1330	<0,1	-	-
77	δ -elemeno	1339	-	0,1	-
78	α -cubebeno	1351	0,2	<0,1	0,1
79	eugenol	1356	-	<0,1	0,1
80	α -ilageno	1371	-	-	0,1

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			<i>C. micradenus</i>	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
81	isoledeno	1372	-	0,1	-
82	α -copaeno	1374	-	0,2	0,2
83	(<i>E</i>)-cinamato de metilo	1377	0,5	-	-
84	propanoato de isobornilo	1382		0,1	
85	sativeno	1385		0,1	
86	β -bourboneno	1385	-	-	0,1
87	(<i>E</i>)- α -damascona	1390		0,1	
88	β -elemeno	1391	0,3		
89	cipereno	1398		0,1	
90	metileugenol	1401	-	-	0,5
91	NI	1411	5,9	-	-
92	β -cariofileno	1416	2,4	0,8	5,4
93	α -santaleno	1420		<0,1	
94	ácido nérico	1421	0,2	-	-
95	β -gurjuneno	1432	-	-	0,1
96	benzoato de isoamilo	1433	0,3	-	-
97	<i>trans</i> - α -bergamoteno	1436	-	0,1	0,8
98	vestistenona	1444	-	-	0,1
99	α -humuleno	1455	0,3	0,2	2,5
100	(<i>E</i>)- β -farneseno	1457	0,1	-	0,5
101	6-fenil-2-hexanona	1462	<0,1	-	-
102	(<i>Z</i>)-cinamato de etilo	1467	<0,1	-	-
103	γ -muuroleno	1480	0,1	-	-
104	germacreno D	1485	0,1	-	-
105	(<i>E</i>)- β -ionona	1489	0,1	-	-
106	δ -selineno	1493	0,1	-	-
107	valenceno	1491	-	-	0,4
108	viridifloreno	1491	-	2,1	-
109	epi-cubenol	1494	<0,1	0,4	-
110	β -dihidroagarofurano	1496	-	1,7	-
111	α -muuroleno	1499	-	-	1,1
112	8-hidroxicarvotanacetona	1500	0,1	-	-
113	cupareno	1502	-	<0,1	-
114	β -bisaboleno	1506	0,2	-	-
115	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	1507	-	-	0,3
116	γ -cadineno	1513	<0,1	0,3	0,1
117	cubebol	1514	-	-	0,7
118	(<i>Z</i>)- γ -bisaboleno	1517	-	-	0,6
119	7-epi- α -selineno	1517	-	0,3	-
120	<i>cis</i> -calameneno	1521	-	0,2	-
121	δ -cadineno	1523	0,2	0,2	0,9

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			<i>C. micradenus</i>	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
122	<i>trans</i> -calameneno	1529	<0,1	0,3	-
123	NI	1542	-	1,9	-
124	α -calacoreno	1546	0,2	-	-
125	germacreno B	1556	-	-	0,4
126	germacreno B	1562	0,4	-	-
127	(<i>E</i>)-nerolidol	1563	-	-	0,5
128	ledol	1565	-	0,2	-
129	alcohol cariofileno	1568	<0,1	-	-
130	espatulenol	1576	-	-	7,1
131	óxido de cariofileno	1583	2,8	7,8	2,0
132	NI	1583	-	3,2	-
133	globulol	1585	0,1	0,5	-
134	epóxido de α -humuleno I	1593	-	-	1,0
135	guaiol	1601	0,2	-	-
136	epóxido de α -humuleno II	1606	0,2	1,0	2,1
137	NI	1615	-	-	2,2
138	1,10-di-epi-cubenol	1619	0,1	-	-
139	10-epi- γ -eudesmol	1619	-	4,0	-
140	γ -eudesmol	1631	-	3,5	-
141	hinesol	1638	-	2,6	-
142	epi- α -cadinol	1640	0,2	-	-
143	epi- α -muurolol	1641	-	-	0,8
144	α -muurolol	1646	0,3	-	-
145	NI	1647	-	5,9	-
146	NI	1647	-	-	1,9
147	cubenol	1648	<0,1	-	-
148	α -cadinol	1653	0,1	-	-
149	óxido de α -bisabolol B	1654	-	-	2,3
150	valerianol	1655	-	4,4	-
151	bulnesol	1664	0,1	-	-
152	α -bisabolol	1682	-	-	16,2
153	juniper alcanfor	1690	-	-	1,8
154	NI	1697	-	-	2,0
155	(<i>E</i>)- γ -atlantona	1701	-	-	13,4
156	acetato de α -bisabolol	1798	2,4	-	-
157	acetato de epi- α -bisabolol	1802	0,5	-	-
158	epi-13-manol	1960	-	-	0,1
159	kaur-16-eno	2011	-	0,1	-
160	manol	2055	-	0,2	-

NI – no identificado

Tabla XI. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales en especies del género *Croton* reportados en la literatura⁶⁵.

Especie	Componente mayoritario	%
<i>C. adenocalyx</i>	α -pineno	32,6
	biciclogermacreno	13,9
	β -cariofileno	10,2
	germacreno D	10,1
<i>C. bogotanus</i>	limoneno	55,2
	safrol	11,3
<i>C. cajucara</i>	linalol	41,2
	(<i>E</i>)-nerolidol	12,6
	β -cariofileno	6,9
<i>C. campestris</i>	óxido de cariofileno	29,9
	óxido de humuleno II	8,0
<i>C. flavens</i>	viridifloreño	12,2
	germacreno D	5,2
	(<i>E</i>)- γ -bisaboleno	5,2
<i>C. gossypifolius</i>	óxido de α -cedreno	18,6
	espatuleno	16,3
	valenceno	5,8
	pentanoato de geranilo	5,3
<i>C. grewioides</i>	(<i>E</i>)-anetol	65,5
	metileugenol	10,6
	(<i>Z</i>)-anetol	4,6
	(<i>E</i>)-metil isoeugenol	4,7
<i>C. heterocalix</i>	germacreno D	12,5
	biciclogermacreno	11,2
	δ -elemeno	9,2
	β -elemeno	8,2
<i>C. jimenezii</i>	metileugenol	29,5
	germacreno D	15,6
	β -cariofileno	12,9
<i>C. lanjouwensis</i>	α -pineno	26,6
	α -felandreno	8,5
<i>C. palanostigma</i>	linalol	25,4
	β -cariofileno	21,0
	metileugenol	17,2
	β -elemeno	6,0
<i>C. sacaquinha</i>	β -elemeno	12,0
	germacreno D	10,1
	linalol	5,8
	β -cariofileno	5,7
<i>C. sonderianus</i>	β -felandreno	20,4
	biciclogermacreno	29,1
	β -elemeno	17,8
<i>C. zambesicus</i>	óxido de cariofileno	19,5
	β -cariofileno	10,8
	α -copaeno	6,3

A pesar de esta valoración, se debe destacar que los resultados alcanzados constituyen una novedad, si tenemos en cuenta que las especies estudiadas son endemismos cubanos, por lo que la determinación de la composición química de los aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de estas tres especies, constituye un estudio que se realiza por primera vez.

3.1.2. Rendimiento de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio

La obtención de los aceites esenciales, mediante el método de hidrodestilación⁷⁹, alcanzó los siguientes rendimientos expresados en base al peso seco del material vegetal (Tabla XII).

Tabla XII. Rendimiento de los aceites esenciales de las especies de *Croton* estudiadas.

Especie	Localidad	Peso (gr)	Aceite (mL)	H (%)	Rendimiento (%)
<i>C. micradenus</i>	Buenavista, San Antonio del Sur	300	7	15	2.0
<i>C. myricifolius</i>	Buenavista, San Antonio del Sur	200	2	11	0.9
<i>C. spiralis</i>	Buenavista, San Antonio del Sur	175	1	20	0.5

Como se aprecia en la tabla, se expresan el peso del material vegetal empleado, el volumen de aceite obtenido, el porcentaje de humedad y el rendimiento de aceite en las tres especies los cuales son considerables, siendo *C. micradenus* la de mayor producción de aceites volátiles con 2,0 %, seguida de *C. myricifolius* (0,9 %) y *C. spiralis* (0.5 %).

Comparando estos resultados con los obtenidos para otras especies del género se aprecia que los mismos no se alejan de los reportados en la literatura. De las hojas frescas y flores de *C. micans*, se extrajeron por hidrodestilación aceites cuyos rendimientos fueron 0,1 % en las hojas y 0,2 % en las flores, según su peso seco, mientras que el rendimiento de aceite de las hojas de *Croton matourensis* Aubl. fue 1,0 %⁸⁰. Por otra parte, en los tallos de *Croton kongensii* Gagnep⁸¹ y *Croton cajucara* Benth⁸², los rendimientos fueron 1,3 % y 0,1 %, respectivamente. La producción de aceite en hojas y tallos de las especies *Croton jacobinensis* Baill., *Croton rhamnifolius* H. B. K., *Croton muscicapa* Müll. Arg. y *C. micans* osciló en los

rangos de 1,1 a 0,6 %, en las hojas y de 0,7 a 0,1 % en los tallos⁸³, mientras que en las hojas de *Croton heliotropiifolius* Kunth y *Croton blanchetianus* Baill. los rendimientos relativos al peso fresco del material empleado fueron de 0,1 y 0,7 %, respectivamente⁶⁷.

Como se puede apreciar, los rendimientos alcanzados para las tres especies estudiadas no se alejan de los reportados para otras especies del género, siendo el más bajo el de la especie *C. spiralis* (0,5 %), mientras que la producción de volátiles en *C. myricifolius* (0,9 %) se encuentra entre los límites superiores de los resultados de las especies del género. Es de destacar el rendimiento obtenido para *C. micradenus* (2 %), valores promisorios para la obtención de esencias.

No obstante, es necesario señalar que el contenido de aceite esencial varía según el origen geográfico y las diferentes partes del vegetal que se analicen⁸⁴. Además, pueden influir en los rendimientos de las esencias el método de extracción⁸² y el de secado⁸⁵. De igual forma, el rendimiento depende del cultivar, área y años de cultivo. Así como, difiere entre variedades, condiciones climáticas y estado del material vegetal (fresco o seco)⁸⁶.

Si tenemos en cuenta que en este estudio las muestras (una por especie) fueron colectadas en la provincia de Guantánamo, razón que dilató el procesamiento del material vegetal y que el porcentaje de humedad superó el 10 %, los valores de rendimientos alcanzados pudieran cambiar si las condiciones de trabajo varían.

Por tal motivo, siempre que sea de interés conocer la producción de aceite esencial de cualquier especie, en este caso particular las tres en estudio, se debe realizar una investigación de dinámica de acumulación de aceite esencial en cada una de ellas, para conocer cómo influyen los factores antes mencionados en dicha producción.

3.1.3. Actividad biológica de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio

Los resultados de las pruebas biológicas frente a los microorganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *C. albicans* se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas de las especies en estudio.

Especie	Microorganismo CMI (mg/mL)				Control
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
<i>C. micradenus</i>	0,78	50,0	50,0	12,5	Cloranfenicol 5 mg/mL
<i>C. myricifolius</i>	0,78	50,0	50,0	25,0	
<i>C. spiralis</i>	3,75	30,0	50,0	25,0	

Las tres especies mostraron halo de inhibición diferenciado frente a los cuatro microorganismos, a CMI variables entre 0,78 y 50 mg/mL. Se destacan los resultados mostrados por los tres aceites esenciales obtenidos de las especies *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis* como agentes antimicrobianos frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* con valores de CMI de 0,78; 0,78 y 3,75 mg/mL, respectivamente y el de *C. micradenus* frente al hongo *C. albicans*, comparados con la concentración ensayada del control (5 mg/mL), la cual se considera sensible.

Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura relacionados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del género *Croton*; varios estudios expresan que estos tienen entre otras propiedades, acción bactericida frente a un amplio rango de microorganismos patógenos, tales como: *Listeria innocua* Clarke, *Salmonella typhimurium* (Löffler) Castellani & Chalmers, *E. coli*, *Shigella disentería* (Shiga) Castellani & Chalmers, *Basillus cereus* Frankland & Frankland, *S. aureus* y *Staphylococcus typhimurium* Rosenbach⁶⁶.

El aceite esencial de *Croton heliotropiifolius* Kunth. mostró actividad inhibitoria frente a *S. aureus* (MR 358) en una CMI de 512 µg/mL. Mientras que el aceite de *Croton blandeckianus* Baill. mostró actividad inhibitoria frente a *E. coli* (CMI 512 µg/mL), *B. cereus* (CMI 256 mg/mL) y *S. aureus* representando el resultado más significativo con una baja CMI de 64 µg/mL⁶⁷.

Al comparar estos resultados reportados para especies no endémicas cubanas con los mostrados por los aceites esenciales de las tres especies en estudio, se aprecia que son inferiores. No obstante, valorando los resultados alcanzados en el acápite anterior sobre los rendimientos de las tres especies, estas pudieran tenerse en cuenta para la obtención de esencias según intereses, con destaque para la especie *C. micradenus*.

3.2. Composición química de PCMH-I (*C. micradenus* 2) y de los extractos hexánicos de las hojas y tallos de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2. Actividad biológica

3.2.1. Composición química de la fracción activa (PCMH-I) del extracto hexánico de las hojas y tallos de la especie *C. micradenus* 2

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana se decidió identificar mediante CG-MS (Fig. 17) los metabolitos secundarios presentes en el precipitado PCMH-I, el cual mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados de la composición química en orden de elusión de la columna, tiempo de retención (tR) y porcentaje de cada uno de los constituyentes se presentan en la Tabla XIV.

Se identificaron 63 de 67 compuestos en la fracción PCMH-I que representan un 94 %. Los componentes mayoritarios fueron 1-octacosanol (C28OH) (12,5 %), triacontanal (C30Al) (9,11 %), octacosanal (C28Al) (7,67 %), heptacosanal (C27Al) (6,58 %), 1-hexacosanol (C26OH) (6,58 %), 5,5-dimetil-1-etil 1,3-ciclopentadieno (5,70 %), triacontanol (C30OH)

(4,62 %), nonacosano (C29) (3,46 %), ácido triacontanoico (C30:0) (3,44 %), ácido palmítico (C16:0) (3,36 %), 1-tetracosanol (C24OH) (2,90 %), ftalato de bis (2-etilhexilo) (2,74 %) y 1-nonacosanol (C29OH) (2,24 %), los cuales representan un 70,9 % del total. En las Figuras 18 y 19 se muestran los cromatogramas y las estructuras de dos de los componentes mayoritarios identificados.

3.2.2. Composición química de los extractos hexánicos de las hojas y tallos de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2

3.2.2.1. Composición química del extracto hexánico de hojas y tallos de *C. myricifolius* 2

Se identificaron mediante CG-MS (Fig. 20) los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de *C. myricifolius* y se identificaron 57 de 64 compuestos que representan un 89,1 %. Los componentes mayoritarios fueron 1-octacosanol (C28OH) (16,7 %), ácido octacosanoico (C28:0) (8,64 %), 1-hexacosanol (C26OH) (7,82 %), ácido triacontanoico (C30:0) (7,43 %), triacontanol (C30OH) (7,30 %), %, ácido palmítico (C16:0) (3,69 %), fitol (3,46), ácido hexacosanoico (C26:0) (3,05 %), 1-heptacosanol (C27OH) (2,82 %), β -sistosterol (2,42 %), los cuales representan un 63,3 % del total (Tabla XV). En las Figuras 21 y 22 se muestran los cromatogramas y las estructuras de dos de los componentes mayoritarios identificados.

3.2.2.2. Composición química del extracto hexánico de las hojas y tallos de *C. spiralis* 2

Se identificaron mediante CG-MS (Fig. 23) los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de *C. spiralis* y se identificaron 54 de 65 compuestos que representan un 83 % (Fig. 20). Los componentes mayoritarios fueron 1-octacosanol (C28OH) (14,54 %), ácido octacosanoico (C28:0) (10,05 %), ácido palmítico (C16:0) (9,95 %), ácido triacontanoico (C30:0) (8,50 %), triacontanol (C30OH) (6,49 %), 1-hexacosanol (C26OH) (4,76 %), ácido

esteárico (C18:0)+ NI (3,97 %), ácido hexacosanoico (C26:0) (3,96 %), ácido dotriacontanoico (C32:0) (2,98 %) y dotriacontanol (C32OH) (2,81 %), los cuales representan un 68,01 % del total (Tabla XVI). En las Figuras 24 y 25 se muestran los cromatogramas y las estructuras de dos de los componentes mayoritarios identificados.

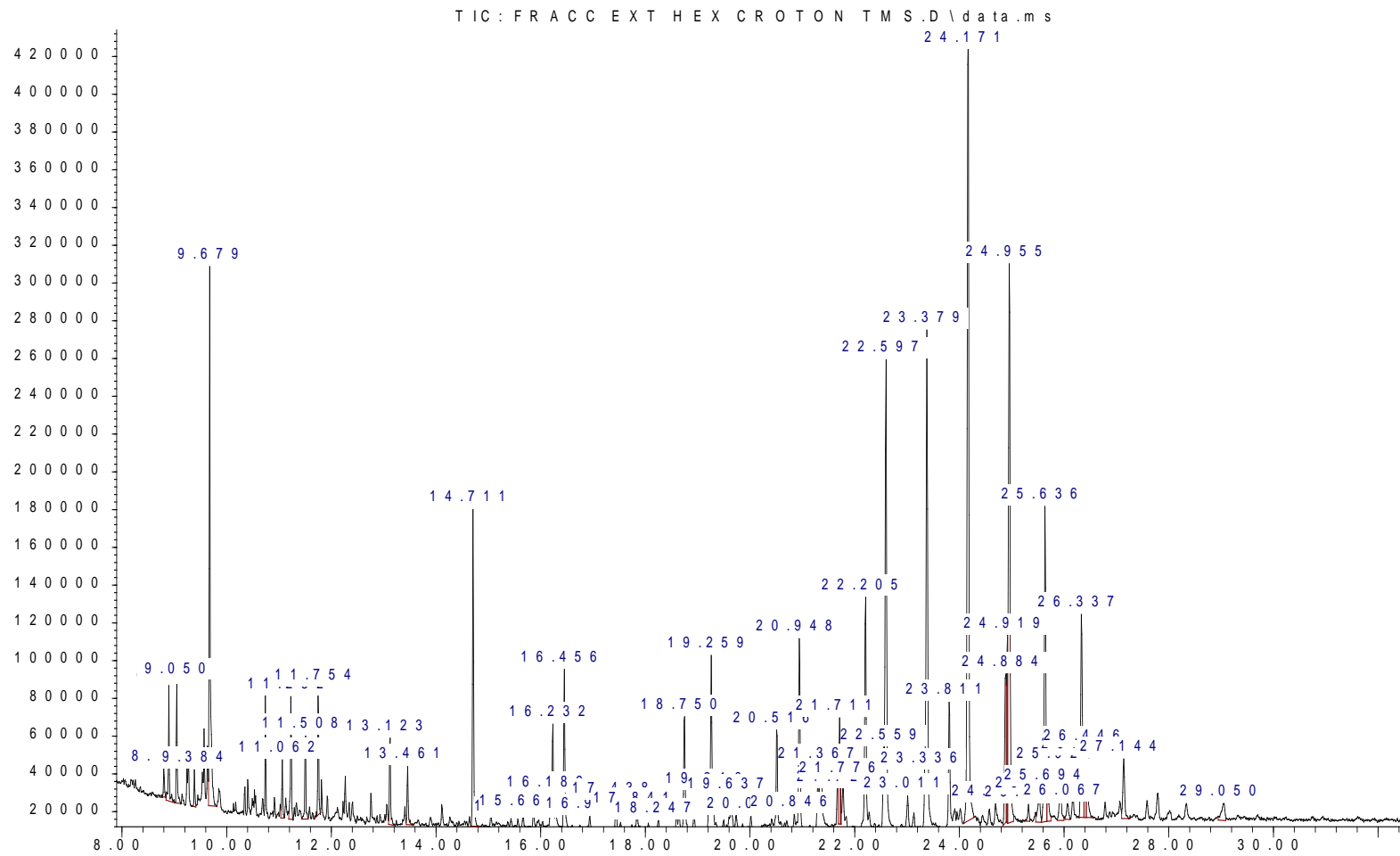
3.2.2.3. Comparación de los metabolitos detectados en PCMH-I con los identificados en los extractos hexánicos de las hojas y tallos de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2

En la Tabla XVII se muestra la comparación entre la composición química del precipitado PCMH-I obtenido del extracto hexánico de la especie *C. micradenus* 2 y los extractos hexánicos de las especies *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2 en orden de elusión de la columna, tiempo de retención (tR) y porcentaje de cada uno de los constituyentes.

Se identificaron 64 de 81 compuestos, de los cuales 57 fueron comunes para las tres muestras, entre ellos todos los alcoholes (12), ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular (11) y ácidos grasos (9) presentes. Se destaca que entre los alcoholes que comparten las tres especies son mayoritarios para todas 1-octacosanol (C28OH) (12,5 %, 14.54 % y 16.7), 1-hexacosanol (C26OH) (6,58 %, 4,76 % y 7,82 %) y triacontanol (C30OH) (4,62 %, 6.49 % y 7.30 %), entre los ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular el ácido triacontanoico (C30:0) (3,44 %, 8.50 % y 7.43 %) y entre los ácidos grasos el ácido palmítico (C16:0) (3,36 %, 9.95 % y 3.69 %). (Anexo. 5)

Algunos alcanos, aldehídos y otros grupos de compuestos aparecen indistintamente en una o dos de las muestras en las tres combinaciones posibles: PCMH-I / *C. myricifolius*, PCMH-I / *C. spiralis* y *C. myricifolius* / *C. spiralis*. Así como, se reconocen cinco compuestos que solo aparecen en PCMH-I; un esteroide (lup-20-(2)-en-3-ona) y cuatro compuestos NI para el extracto hexánico de *C. spiralis*, mientras que de los 17 compuestos NI de las tres especies,

Abundance



Time -->

Fig. 17. Cromatograma del precipitado obtenido del extracto hexánico de la especie *C. micradenus* (PCMH-I)

Tabla XIV. Composición del precipitado PCMH-I obtenido del extracto hexánico de *C. micradenus*.

No.	Compuesto	tR (min)	Porcentaje
1	<i>cis</i> -verbenona	8,800	0,26
2	borneol	8,899	1,08
3	ácido benzoico	9,050	1,16
4	glicerina	9,264	0,10
5	acetato de bornilo	9,384	0,29
6	5,5-dimetil-1-etil-1,3-ciclopentadieno	9,679	5,70
7	NI	10,407	0,03
8	NI	10,526	tr
9	<i>cis</i> -calameneno	11,062	0,55
10	fitol	11,232	1,32
11	NI	11,508	0,88
12	ácidoláurico (C12:0)	11,754	1,29
13	ácido azelaico	12,758	0,10
14	ácidomirístico (C14:0)	13,123	1,05
15	NI	13,462	0,68
16	ácidopentadecanoico (C15:0)	13,883	0,05
17	ácido palmítico (C16:0)	14,711	3,36
18	ácido margárico (C17:0)	15,564	0,11
19	1-octadecanol (C18OH)	15,663	0,18
20	ácido linoleico (C18:2)	16,189	0,34
21	ácido oleico (C18:1)	16,232	1,48
22	ácido esteárico (C18:0)+ NI	16,456	1,91
23	tricosano (C23)	16,937	0,18
24	1-eicosanol (C20OH)	17,438	0,36
25	tetracosano (C24)	17,841	0,24
26	ácidoeicosanoico (C20:0)	18,247	0,14
27	pentacosano (C25)	18,750	1,62
28	1-docosanol (C22OH)	19,216	0,32
29	ftalatode bis(2-etilhexilo)	19,259	2,74
30	hexacosano (C26)	19,637	0,69
31	ácidodocosanoico (C22:0)	20,015	0,16
32	heptacosano (C27)	20,516	1,46
33	pentacosanal (C25Al)	20,846	0,22
34	ácidotricosanoico (C23:0)	20,881	0,03
35	1-tetracosanol (C24OH)	20,948	2,90
36	óctacosano (C28)	21,367	1,75
37	hexacosanal (C26Al)	21,711	1,43
38	ácidotetracosanoico (C24:0)	21,726	0,30
39	1-pentacosanol (C25OH)	21,776	0,67

No.	Compuesto	tR (min)	Porcentaje
40	nonacosano (C29)	22,205	3,46
41	ácidopentacosanoico (C25:0)	22,539	0,03
42	heptacosanal (C27Al)	22,559	1,59
43	1-hexacosanol (C26OH)	22,597	6,58
44	triacontano (C30)	23,011	0,57
45	ácidohexacosanoico (C26:0)	23,336	0,57
46	octacosanal (C28Al)	23,379	7,67
47	1-heptacosanol (C27OH)	23,394	0,10
48	hentriacontano (C31)	23,811	1,84
49	ácidoheptacosanoico (C27:0)	24,116	0,20
50	1-octacosanol (C28OH)	24,171	12,50
51	dotriacontano (C32)	24,692	0,43
52	ácidooctacosanoico (C28:0)	24,884	1,78
53	1-nonacosanol (C29OH)	24,930	2,24
54	triacontanal (C30Al)	24,955	9,11
55	tritriacontano (C33)	25,321	0,24
56	estigmasterol	25,525	0,65
57	ácidononacosanoico (C29:0)	25,592	0,20
58	triacontanol (C30OH)	25,636	4,62
59	hentriacontanal (C31Al)	25,694	0,61
60	β -sistosterol	25,928	0,97
61	β -amirina	26,067	0,33
62	ácidotriacontanoico (C30:0)	26,337	3,44
63	lupeol	26,406	0,88
64	dotriacontanal (C32Al)	26,446	1,23
65	dotriacontanol (C32OH)	27,144	1,08
66	ácidodotriacontanoico (C32:0)	28,017	0,05
67	tetratriacontanol (C34OH)	29,050	0,57

NI- No identificado

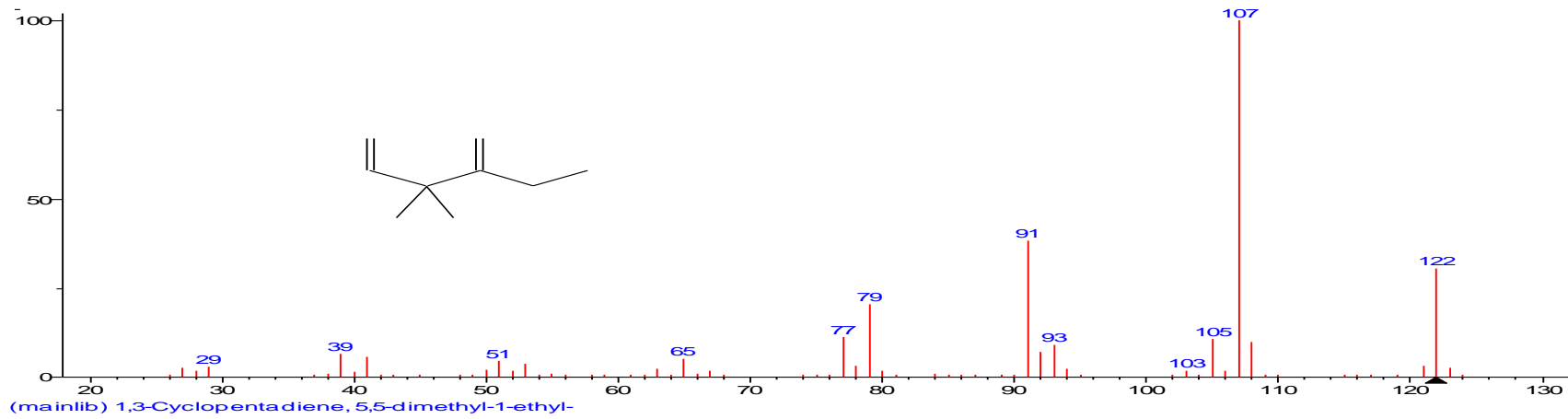


Fig. 18. Cromatograma y estructura del 5,5-dimetil-1-etil 1,3-ciclopentadieno.

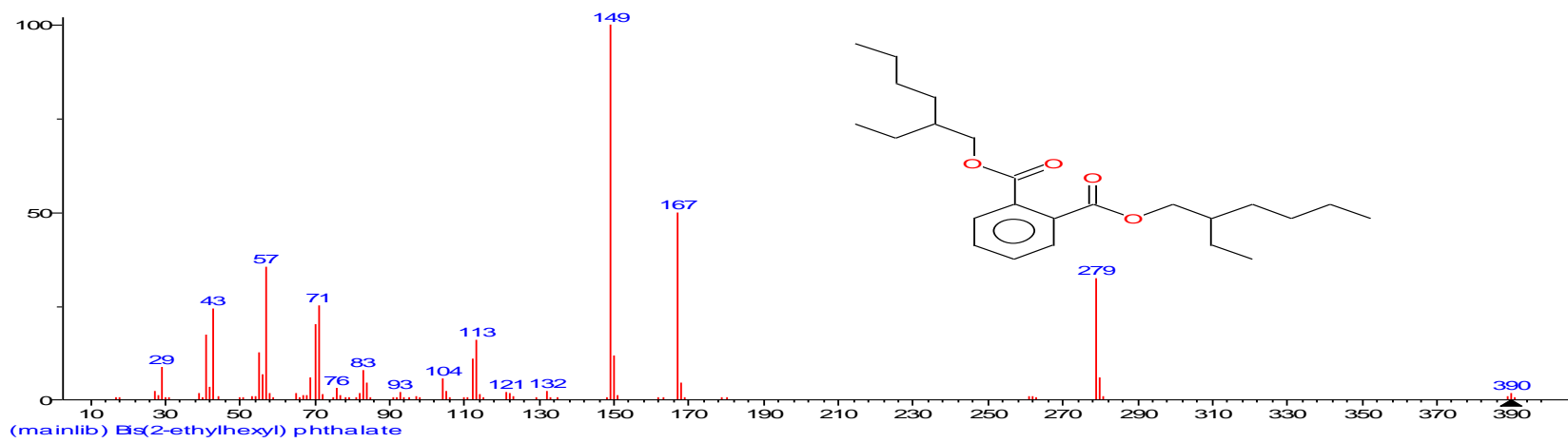


Fig. 19. Cromatograma y estructura del ftalato de bis (2-etilhexilo).

Abundance

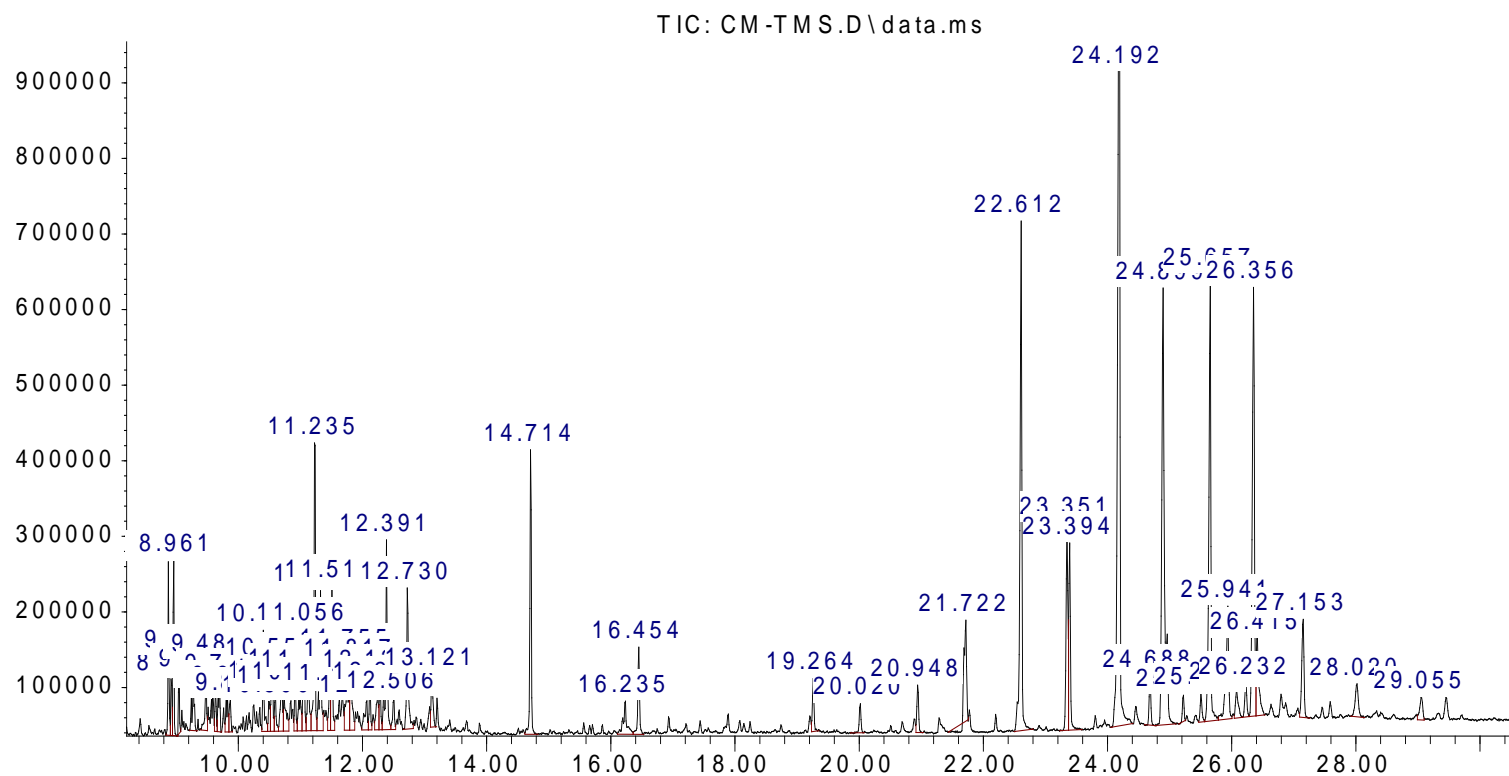


Fig. 20. Cromatograma del precipitado obtenido del extracto hexánico de la especie *C. myricifolius*.

Tabla XV. Composición del extracto hexánico de *C. myricifolius*.

No	Compuesto	tR (min)	Porcentaje %
1	borneol	8.879	1,45
2	NI	8.961	1,62
3	ácido benzoico	9.050	0,64
4	NI	9.484	0,82
5	5,5-dimetil-1-etil 1,3-ciclopentadieno	9.677	0,57
6	NI	10.407	1,13
7	<i>cis</i> -calameneno	11.052	1,25
8	fitol	11.231	3,46
9	NI	11.324	1,23
10	NI	11.511	1,65
11	ácidolaúrico (C12:0)	11.750	0,92
12	NI	12.386	2,11
13	ácido azelaico	12.725	2,06
14	ácidomirístico (C14:0)	13.121	0,87
15	ácidopentadecanoico (C15:0)	13.885	0,12
16	ácido palmítico (C16:0)	14.714	3,69
17	ácido margárico (C17:0)	15.564	0,13
18	1-octadecanol (C18OH)	15.660	0,10
19	ácido linoleico (C18:2)	16.190	0,17
20	ácido oleico (C18:1)	16.230	0,49
21	ácido esteárico (C18:0)+ NI	16.454	1,26
22	tricosano (C23)	16.932	0,24
23	1-eicosanol (C20OH)	17.438	0,19
24	ácidoeicosanoico (C20:0)	18.242	0,19
25	pentacosano (C25)	18.742	0,11
26	1-docosanol (C22OH)	19.209	0,23
27	ftalato de bis (2-etilhexilo)	19.259	0,83
28	hexacosano (C26)	19.639	0,02
29	ácidodocosanoico (C22:0)	20.016	0,43
30	heptacosano (C27)	20.510	0,08
31	ácidotricosanoico (C23:0)	20.881	0,10
32	1-tetracosanol (C24OH)	20.948	0,70
33	ácidotetracosanoico (C24:0)	21.718	1,89
34	1-pentacosanol (C25OH)	21.775	0,26
35	nonacosano (C29)	22.200	0,24
36	ácidopentacosanoico (C25:0)	22.549	0,49
37	heptacosanal (C27Al)	22,559	tr
38	1-hexacosanol (C26OH)	22.608	7,82
39	triacontano (C30)	23.011	0,10
40	ácidohexacosanoico (C26:0)	23.351	3,05

No	Compuesto	tR (min)	Porcentaje %
41	octacosanal (C28Al)	23,379	tr
42	1-heptacosanol (C27OH)	23.394	2,82
43	hentriacontano (C31)	23.804	0,19
44	ácidoheptacosanoico (C27:0)	24.128	0,63
45	1-octacosanol (C28OH)	24.189	16,7
46	dotriacontano (C32)	24.688	0,75
47	ácidooctacosanoico (C28:0)	24.895	8,64
48	1-nonacosanol (C29OH)	24.933	0,68
49	triacontanal (C30Al)	24.959	1,50
50	tritriacontano (C33)	25.219	0,40
51	estigmasterol	25.511	0,44
52	ácidononacosanoico (C29:0)	25.592	0,11
53	triacontanol (C30OH)	25.654	7,30
54	hentriacontanal (C31Al)	25,694	tr
55	β -sistosterol	25.937	2,42
56	β -amirina	26.084	0,66
57	lup-20(2)-en-3-ona	26.232	0,60
58	ácidotriacontanoico (C30:0)	26.351	7,43
59	lupeol	26.410	1,35
60	dotriacontanal (C32Al)	26.442	0,22
61	dotriacontanol (C32OH)	27.153	1,87
62	ácidodotriacontanoico (C32:0)	28.021	0,92
63	tetratriacontanol (C34OH)	29.055	0,60
64	éster NI	32.153	1,14

NI- No identificado

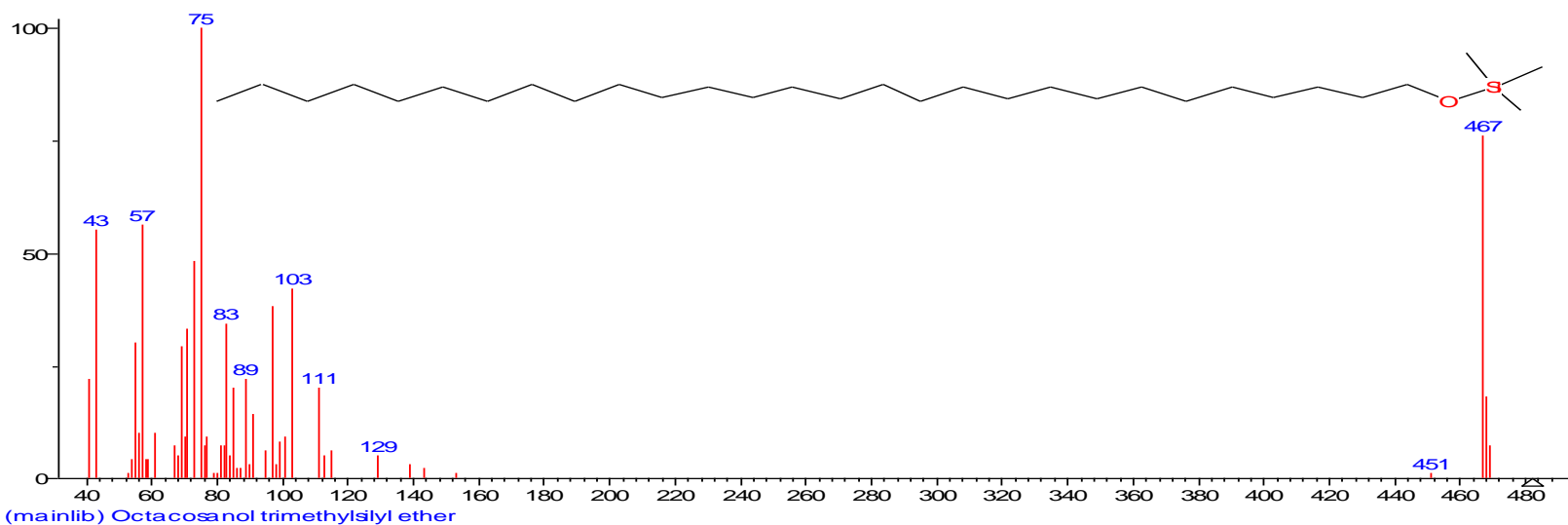


Fig. 21. Cromatograma y estructura del 1-octacosanol.

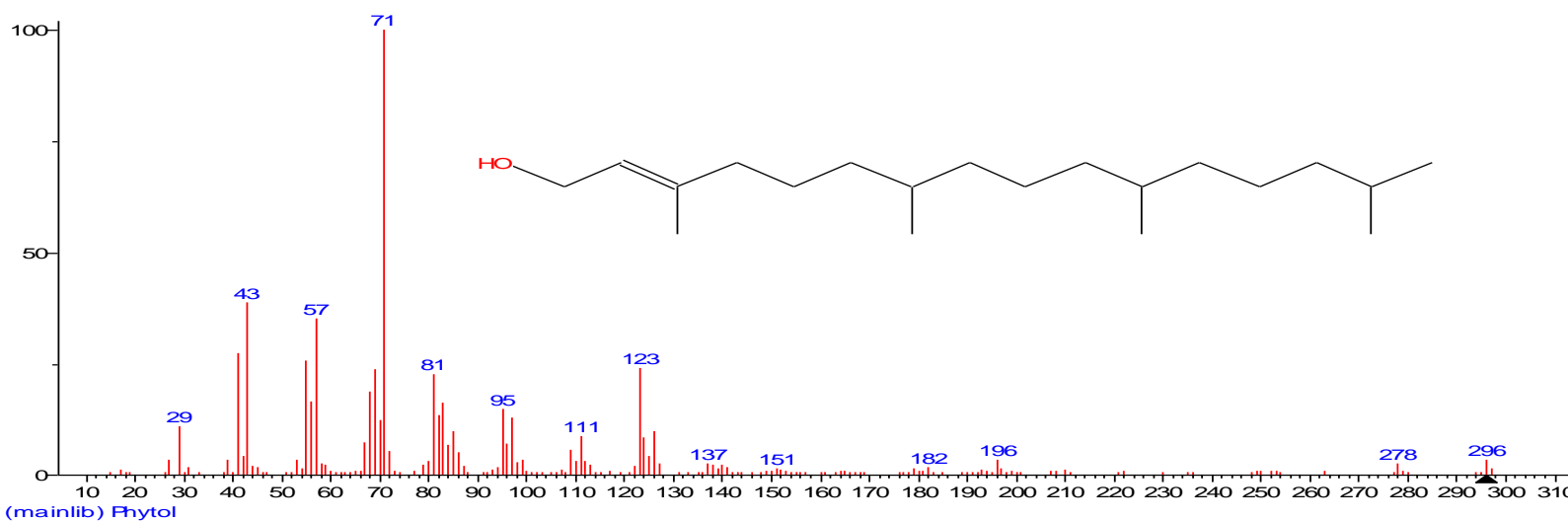


Fig. 22. Cromatograma y estructura del fitol.

Abundance

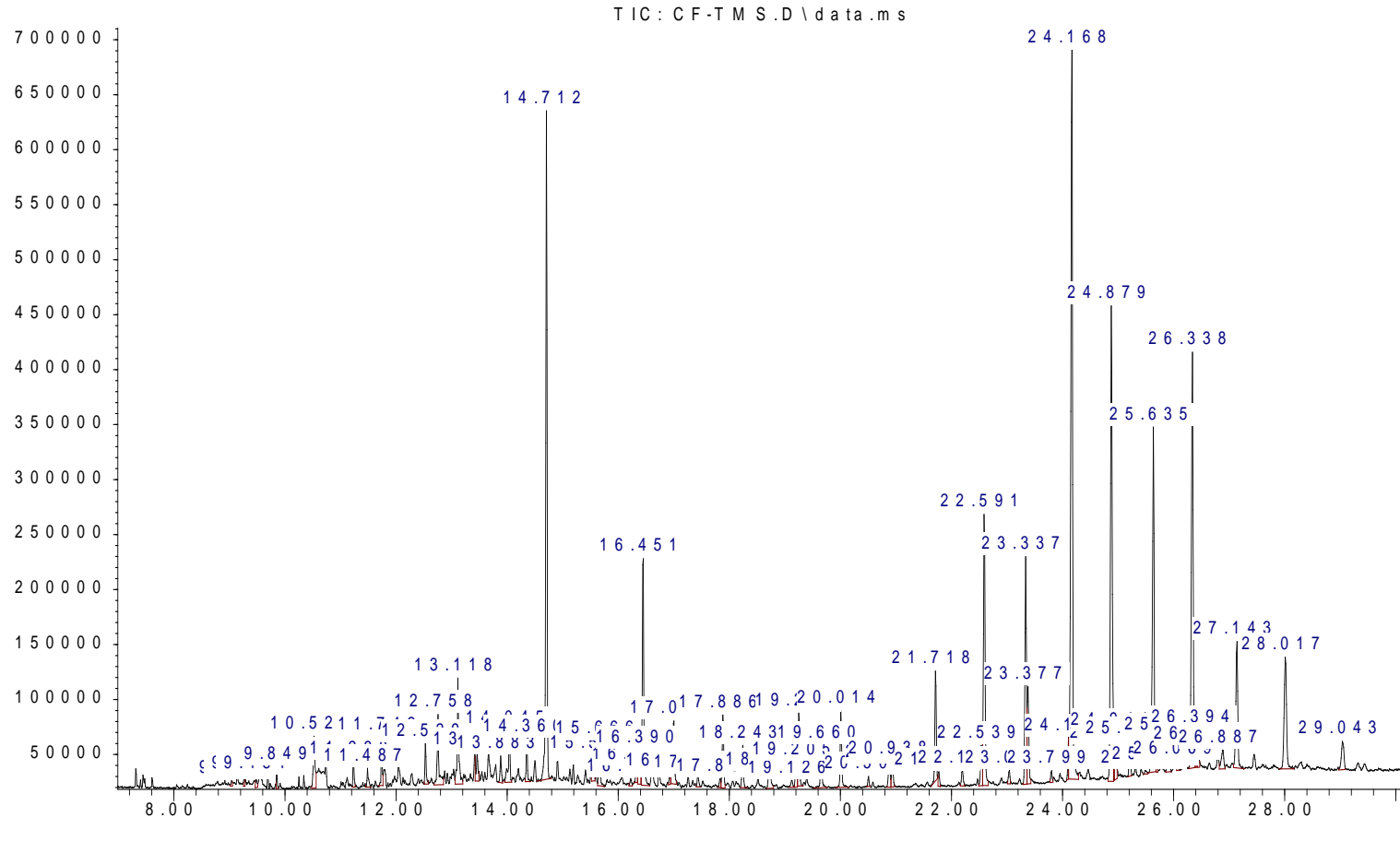


Fig. 23. Cromatograma del precipitado obtenido del extracto hexánico de la especie *C. spiralis*.

Tabla XVI. Composición del extracto hexánico de *C. spiralis*.

No	Compuesto	tR (min)	Porcentaje
1	ácido benzoico	9.041	0,06
2	glicerina	9.264	0,10
3	NI	9.481	0,16
4	ácido 3-metilhexanedioico	9.849	0,16
5	NI	10.526	1,05
6	fitol	11.233	0,35
7	ácidolaúrico (C12:0)	11.742	0,63
8	NI	12.529	0,52
9	ácido azelaico	12.758	1,34
10	ácidomirístico (C14:0)	13.118	1,85
11	NI	13.461	0,52
12	ácidopentadecanoico (C15:0)	13.883	0,38
13	NI	14.045	1,05
14	NI	14.360	0,63
15	ácido palmítico (C16:0)	14.712	9,95
16	ácido margárico (C17:0)	15.563	0,52
17	1-octadecanol (C18OH)	15.666	0,84
18	ácido linoleico (C18:2)	16.20	0,13
19	ácido oleico (C18:1)	16.22	0,27
20	NI	16.390	0,57
21	ácido esteárico (C18:0)+ NI	16.451	3,97
22	tricosano (C23)	16.929	0,18
23	NI	17.000	1,61
24	1-eicosanol (C20OH)	17.434	0,20
25	tetracosano (C24)	17.836	0,12
26	NI	17.886	1,23
27	ácidoeicosanoico (C20:0)	18.243	0,68
28	pentacosano (C25)	18.722	0,55
29	1-docosanol (C22OH)	19.205	0,60
30	ftalato de bis (2-etilhexilo)	19.258	1,26
31	NI	19.660	0,84
32	ácidodocosanoico (C22:0)	20.014	1,33
33	heptacosano (C27)	20.505	0,14
34	ácidotricosanoico (C23:0)	20.881	0,53
35	1-tetracosanol (C24OH)	20.938	0,46
36	ácidotetracosanoico (C24:0)	21.718	1,81
37	1-pentacosanol (C25OH)	21.770	0,23
38	nonacosano (C29)	22.195	0,30
39	ácidopentacosanoico (C25:0)	22.539	0,82
40	heptacosanal (C27Al)	22.559	tr
41	1-hexacosanol (C26OH)	22.591	4,76

No	Compuesto	tR (min)	Porcentaje
42	triacontano (C30)	23.040	0,23
43	ácidohexacosanoico (C26:0)	23.337	3,96
44	octacosanal (C28Al)	23,379	tr
45	1-heptacosanol (C27OH)	23.377	1,60
46	hentriacontano (C31)	23.799	0,19
47	ácidoheptacosanoico (C27:0)	24.106	0,46
48	1-octacosanol (C28OH)	24.168	14,54
49	ácidooctacosanoico (C28:0)	24.879	10,05
50	1-nonacosanol (C29OH)	24.922	0,42
51	triacontanal (C30Al)	24.941	0,78
52	tritriacontano (C33)	25.211	0,53
53	estigmasterol	25.489	0,07
54	ácidononacosanoico (C29:0)	23,379	0,2
55	triacontanol (C30OH)	25.635	6,49
56	hentriacontanal (C31Al)	25.689	tr
57	β -sistosterol	25.908	0,79
58	β -amirina	26.069	0,15
59	ácidotriacontanoico (C30:0)	26.338	8,50
60	lupeol	26.394	0,50
61	dotriacontanal (C32Al)	26.435	0,33
62	NI	26.887	0,55
63	dotriacontanol (C32OH)	27.143	2,81
64	ácidodotriacontanoico (C32:0)	28.017	2,98
65	tetratriacontanol (C34OH)	29.043	0,79

NI- No identificado

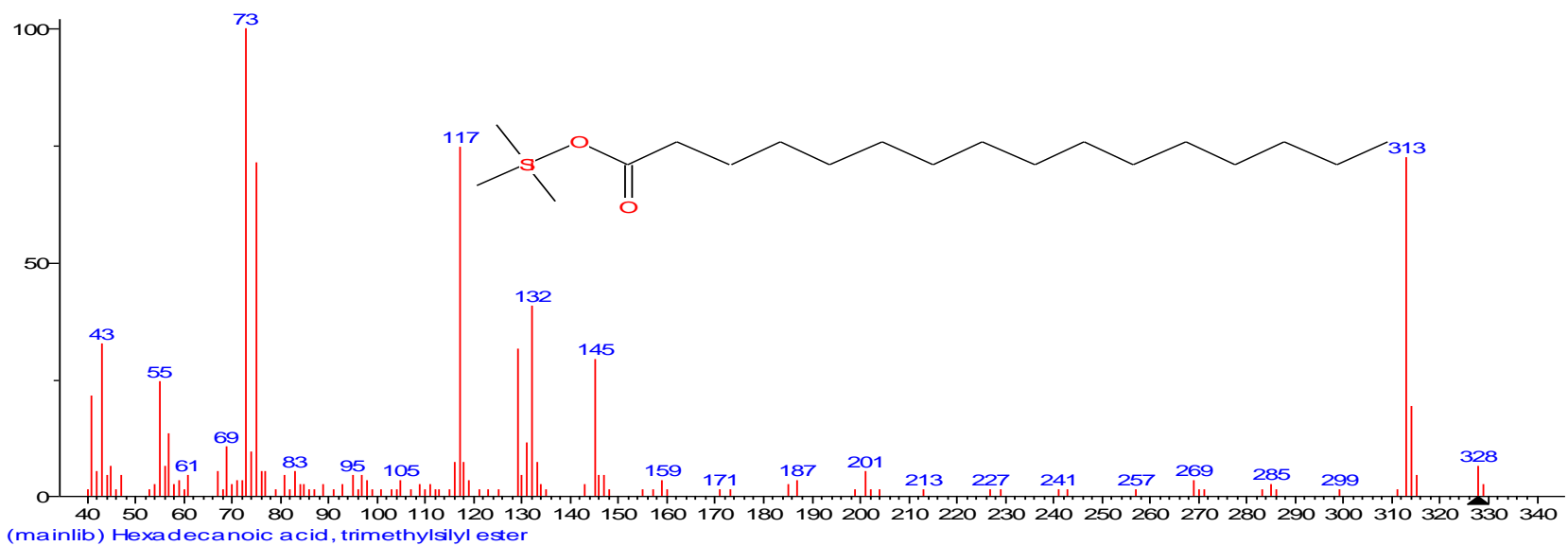


Fig. 24. Cromatograma y estructura del ácido palmítico o hexadecanoico.

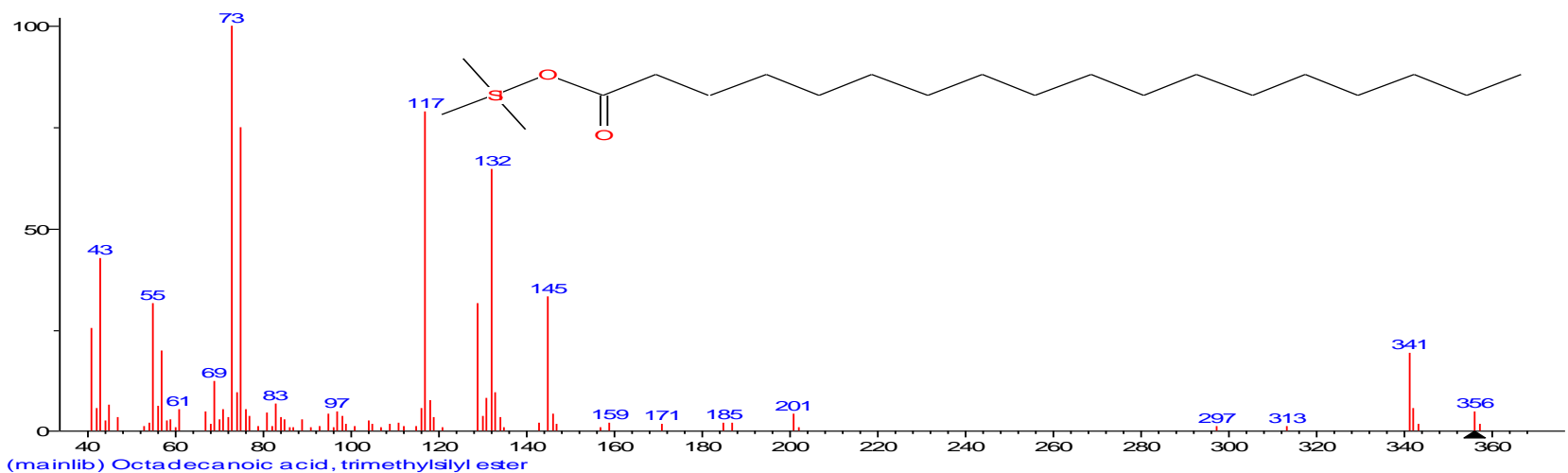


Fig. 25. Cromatograma y estructura del ácido esteárico u octadecanoico.

Tabla XVII. Comparación entre la composición química de PCMH-I y los extractos hexánicos de las especies *C. myricifolius* y *C. spiralis*.

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			PCMH-I	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
1	<i>cis</i> -verbenona	8,800	0,26	-	-
2	borneol	8,899	1,08	-	1,45
3	NI	8.961	-	-	1,62
4	ácido benzoico	9,050	1,16	0,06	0,64
5	glicerina	9.264	0,10	0,10	-
6	acetato de bornilo	9,384	0,29	-	-
7	NI	9.481	-	0,16	0,82
8	5,5-dimetil-1-etil 1,3-ciclopentadieno	9,679	5,70	-	0,57
9	ácido 3-metil hexanedioico	9.849	-	0,16	-
10	NI	10.407	0,03	-	1,13
11	NI	10.526	tr	1,05	-
12	<i>cis</i> -calameneno	11,062	0,55	-	1,25
13	fitol	11,232	1,32	0,35	3,46
14	NI	11.324	-	-	1,23
15	NI	11,508	0,88	-	1,65
16	ácidolaúrico (C12:0)	11,754	1,29	0,63	0,92
17	NI	12.386	-	-	2,11
18	NI	12.529	-	0,52	-
19	ácido azelaico	12.758	0,10	1,34	2,06
20	ácido mirfístico (C14:0)	13,123	1,05	1,85	0,87
21	NI	13,462	0,68	0,52	-
22	ácido pentadecanoico (C15:0)	13.883	0,05	0,38	0,12
23	NI	14.045	-	1,05	-
24	NI	14.360	-	0,63	-
25	ácido palmítico (C16:0)	14,711	3,36	9,95	3,69
26	ácido margárico (C17:0)	15,564	0,11	0,52	0,13
27	1-octadecanol (C18OH)	15,663	0,18	0,84	0,10
28	ácido linoleico (C18:2)	16,189	0,34	0,13	0,17
29	ácido oleico (C18:1)	16,232	1,48	0,27	0,49
30	NI	16.390	-	0,57	-
31	ácido esteárico (C18:0)+ NI	16,456	1,91	3,97	1,26
32	tricosano (C23)	16,937	0,18	0,18	0,24
33	NI	17.000	-	1,61	-
34	1-eicosanol (C20OH)	17,438	0,36	0,20	0,19
35	tetracosano (C24)	17,841	0,24	0,12	-
36	NI		-	1,23	-
37	ácidoeicosanoico (C20:0)	18,247	0,14	0,68	0,19
38	pentacosano (C25)	18,750	1,62	0,55	0,11
39	1-docosanol (C22OH)	19,216	0,32	0,60	0,23
39	ftalato de bis (2-etilhexilo)	19,259	2,74	1,26	0,83
40	hexacosano (C26)	19,637	0,69	-	0,02

No.	Compuesto	tR (min)	Contenido (%)		
			PCMH-I	<i>C. myricifolius</i>	<i>C. spiralis</i>
41	NI	19.660	-	0,84	-
42	ácidodocosanoico (C22:0)	20,015	0,16	1,33	0,43
43	heptacosano (C27)	20,516	1,46	0,14	0,08
44	pentacosanal (C25Al)	20,846	0,22	-	-
45	ácidotricosanoico (C23:0)	20.881	0,03	0,53	0,10
46	1-tetracosanol (C24OH)	20,948	2,90	0,46	0,70
47	octacosano (C28)	21,367	1,75	-	-
48	hexacosanal (C26Al)	21,711	1,43	-	-
49	ácidotetracosanoico (C24:0)	21,726	0,30	1,81	1,89
50	1-pentacosanol (C25OH)	21,776	0,67	0,23	0,26
51	nonacosano (C29)	22,205	3,46	0,30	0,24
52	ácidopentacosanoico (C25:0)	22.539	0,03	0,82	0,49
53	heptacosanal (C27Al)	22,559	1,59	tr	tr
54	1-hexacosanol (C26OH)	22,597	6,58	4,76	7,82
55	triacontano (C30)	23,011	0,57	0,23	0,10
56	ácidohexacosanoico (C26:0)	23,336	0,57	3,96	3,05
57	octacosanal (C28Al)	23,379	7,67	tr	tr
58	1-heptacosanol (C27OH)	23,394	0,10	1,60	2,82
59	hentriacontano (C31)	23,811	1,84	0,19	0,19
60	ácidoheptacosanoico (C27:0)	t24.116	0,20	0,46	0,63
61	1-octacosanol (C28OH)	24,171	12,5	14,54	16,7
62	dotriacontano (C32)	24,692	0,43	-	0,75
63	ácidooctacosanoico (C28:0)	24,884	1,78	10,05	8,64
64	1-nonacosanol (C29OH)	24,930	2,24	0,42	0,68
65	triacontanal (C30Al)	24,955	9,11	0,78	1,50
66	tritriacontano (C33)	25,321	0,24	0,53	0,40
67	estigmasterol	25,525	0,65	0,07	0,44
68	ácidononacosanoico (C29:0)	25.592	0,20	0,20	0,11
69	triacontanol (C30OH)	25,636	4,62	6,49	7,30
70	hentriacontanal (C31Al)	25,694	0,61	tr	tr
71	β -sistosterol	25,928	0,97	0,79	2,42
72	β -amirina	26,067	0,33	0,15	0,66
73	lup-20(2)-en-3-ona	26.232	-	-	0,60
74	ácidotriacontanoico (C30:0)	26,337	3,44	8,50	7,43
75	lupeol	26,406	0,88	0,50	1,35
76	dotriacontanal (C32Al)	26,446	1,23	0,33	0,22
77	NI		-	0,55	-
78	dotriacontanol (C32OH)	27,144	1,08	2,81	1,87
79	ácidodotriacontanoico (C32:0)	28.017	0,05	2,98	0,92
80	tetracontanol (C34OH)	29,050	0,57	0,79	0,60
81	éster NI	32.153	-	-	1,14

NI – no identificado

ocho forman parte de los constituyentes del extracto hexánico de *C. myricifolius*, el resto lo comparte con las otras dos especies estudiadas, excepto un ácido graso (ácido 3-metil hexano dióico) que solo aparece en esta especie (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Diferencias encontradas en la composición de las muestras obtenidas de los extractos hexánicos de las especies

Muestra	Compuesto	Tipo de compuesto
PCHM-I (<i>C. micradenus</i> 2)	octacosano (C28)	alcano
	pentacosanal (C25Al)	aldehído
	hexacosanal (C26Al)	
	cis-verbenona	terpeno
	acetato de bornilo	éster
<i>C. myricifolius</i> 2	ácido 3-metil hexanedioico	ácido graso
<i>C. spiralis</i> 2	lup-20-(2)-en-3-ona	esterol

Al analizar los resultados obtenidos de la composición química del precipitado PCMH-I (*C. micradenus*) y de los extractos hexánicos de *C. myricifolius* y *C. spiralis*, se constata que no difieren de lo reportado en la literatura⁵³⁻⁶³ para los diferentes tipos de compuestos que componen estos extractos apolares en especies del género *Croton*. La presencia de esteroides como el β -sistosterol, compuestos como el fitol, ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular, entre otros, soportan esta idea. No obstante, se debe resaltar que estos resultados son novedosos al caracterizar químicamente estos extractos por primera vez ya que se tratan de tres especies endémicas cubanas nunca antes estudiadas en este sentido.

3.2.3. Actividad antimicrobiana de la fracción PCMH-I obtenida del extracto hexánico de las hojas y tallos de la especie *C. micradenus* 2 y de los extractos hexánicos de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2

A los extractos hexánicos obtenidos por reflujo a partir de las hojas de las especies *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2 y al precipitado (PCMH-I) obtenido por recrystalización del

extracto hexánico *C. micradenus* 2, se les evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de microdilución⁷⁷, utilizando cepas de referencia de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *C. albicans*. Los resultados se muestran en la Tabla XIX.

Tabla XIX. Actividad antimicrobiana del precipitado PCMH-I y de los extractos hexánicos de *C. myricifolius* y *C. spiralis*

Muestra	Microorganismo CMI (mg/mL)				Control
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
PCMH-I	3,1	3,1	Negativo	Negativo	Cloranfenicol 5 mg/mL
<i>C. myricifolius</i>	4,0	32,0	32,0	8,0	
<i>C. spiralis</i>	3,75	30,0	No evaluado	No evaluado	

Todas las muestras ensayadas mostraron halo de inhibición al menos frente a dos de los cuatro microorganismos estudiados. Se destacan los valores de 3,1 mg/mL de CMI mostrados por PCMH-I frente a *S. aureus* y *E. coli*, resultados a considerar comparados con el control.

Los extractos hexánicos de *C. myricifolius* y *C. spiralis* mostraron halo de inhibición frente *S. aureus* y *E. coli*, a concentraciones mínima inhibitoria (CMI) inferiores para el caso del primer microorganismo de 4,0 y 3,75 mg/mL y superiores para el segundo de 32,0 y 30,0 mg/mL, respectivamente. Frente a la bacteria *P. aeruginosa* y al hongo *C. albicans* solo se evaluó el extracto de *C. myricifolius*, el que mostró una respuesta diferente frente a ambos patógenos con una CMI de 32,0 y 8,0 mg/mL, respectivamente. Se destacan los resultados mostrados por los dos extractos como agentes antimicrobianos frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* y el de *C. myricifolius* frente al hongo *C. albicans*, comparados con la concentración ensayada para el control (5 mg/mL).

La presencia de ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular en muestras de origen natural con actividad biológica, como por ejemplo el octacosanol (C28)⁸⁷ y de los esteroides: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol, entre otros componentes de extractos

lipofílicos⁶⁸, así como de los ácidos eicosapentanoico (66.4%), palmítico (15.9%) y oleico (7.5%) responsables de la inhibición del crecimiento de la bacteria *Streptococos mutans* Clarke⁸⁸, le atribuyen a estos compuestos responsabilidad en la respuesta biológica de los extractos ensayados de las tres especies en estudio.

La presencia de ácido palmítico en la muestra PCHM-I (*C. micradenus*) (3,36 %) y en los extractos hexánicos de *C. myricifolius* (3,69 %) y *C. spiralis* (9,95 %), así como de ácido esteárico en esta última⁷¹, le confieren responsabilidad sobre la actividad antimicrobiana expresada por las muestras ensayadas; pero la acción sinérgica con otros constituyentes de las muestras pudieran potenciar la misma.

3.3. Caracterización de compuestos presentes en el CAT de las hojas y tallos de la especie *C. micradenus* 1 con potencial actividad antiapetitiva

Como resultado del procesamiento del CAT, obtenido de las hojas y los tallos de la especie *C. micradenus* 1 se pudieron aislar seis alcaloides que se denominaron **CM1, CM2, CM3, CM4, CM5 y CM6**.

Una vez analizadas las propiedades físico-químicas y los espectros obtenidos de los diferentes compuestos aislados, se hizo una comparación con el trabajo previo con esta especie⁷ y los datos existentes en la literatura de los diferentes tipos de alcaloides encontrados con anterioridad en las especies de este género^{2, 20}, que permitió clasificar estas sustancias en compuestos con esqueleto morfínandienónico y un compuesto con esqueleto aporfínico (Fig. 26).

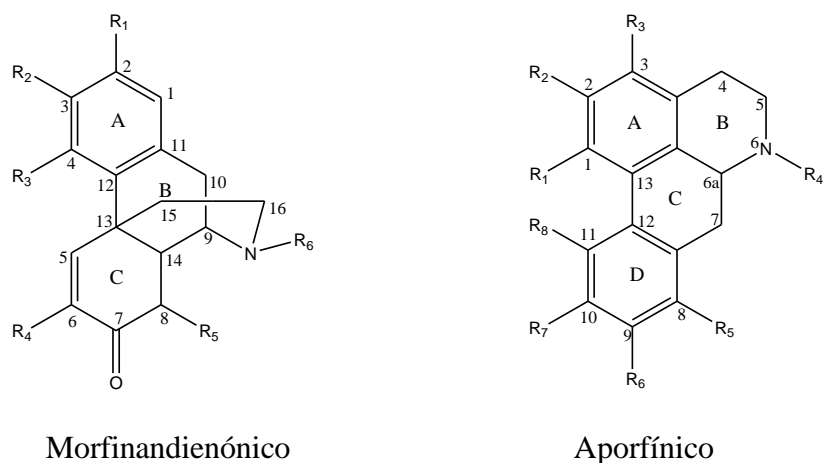


Fig. 26. Esqueletos de alcaloides aislados en especies del género *Croton*.

La discusión con detalle de los resultados obtenidos posibilitó identificar algunos de los compuestos aislados con sustancias ya conocidas y proponer otras de estructuras novedosas.

3.3.1. Alcaloide CM1

El compuesto **CM1** eluyó y cristalizó en CHCl_3 , su rendimiento fue de 0,15 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (10,9 g), por lo que resultó ser el alcaloide mayoritario.

La temperatura de fusión entre 98-103 °C y el valor de rotación específica $[\alpha]_D^{25}$ de -91,30° (c = 0,46; MeOH).

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 236 (3,89); 266 (3,95).

Los valores de los máximos de absorción encontrados en el espectro UV de **CM1** se localizan a 266 y 236 nm, atribuibles al núcleo aromático A sustituido y a un grupo cromóforo carbonilo α,β insaturado en el anillo C, respectivamente (Fig. 27). Estas características sugieren que se trata de un alcaloide tipo morfínandienónico para el cual se reportan máximos de absorción cercanos a 275-290 y 235-240 nm³¹.

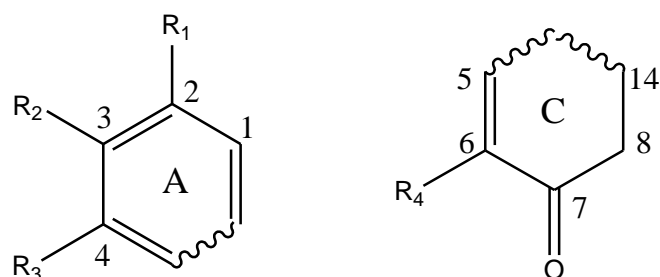


Figura. 27. Asignaciones posibles espectro UV de los anillos A y C del compuesto **CM1**

IR: $\gamma_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3540; 2946; 1685; 1625; 1485.

CM1 muestra bandas en 3540 y 2946 cm^{-1} , características de vibraciones de valencia con H, en el primer caso con oxígeno (OH), indicando la presencia de este grupo funcional en la estructura y en el segundo caso con carbono (CH). La banda a 1685 cm^{-1} , propia de un grupo carbonilo α,β insaturado, confirma la información obtenida en el espectro UV acerca de la existencia del grupo en este alcaloide (C-7). Las bandas que aparecen a 1625 y 1485 cm^{-1} confirman la presencia de insaturaciones en la molécula, ya que pertenecen a las vibraciones de los dobles enlaces C-C olefínico y aromático, respectivamente (Fig. 28).

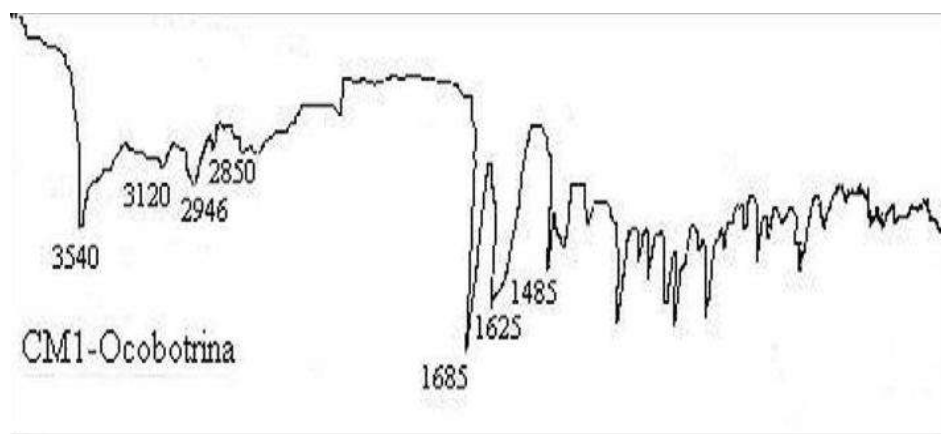


Figura. 28. Espectro IR del compuesto **CM1**.

Cuando se comparan los datos de la literatura³¹ para los alcaloides del tipo morfinandienona que poseen en su estructura un anillo ciclohexadienónico con los dihidroderivados, se puede

observar que para los primeros existen bandas a 1665, 1635 y 1615 cm^{-1} , mientras que para los segundos solamente se observan a 1690 y 1645 cm^{-1} , por lo que los datos obtenidos sugieren que el compuesto aislado pertenece al último grupo señalado.

RMN ^1H : [90 MHz, CDCl_3 , TMS, 5 (ppm)]: 2,34 (s, NMe); 3,63 (s, OMe); 3,89 (s, OMe); 6,30 (s, OH); 6,71 (2H, Sist. AB, $J = 7,5$ Hz); 7,77 (1 H, s).

El espectro de RMN ^1H muestra un singlete a δ 2,33 ppm, atribuible al grupo NCH_3 . Dos señales, cada una de tres protones, a δ 3,69 y 3,82 ppm, indican la presencia de dos grupos OCH_3 . Una señal ensanchada y de poca intensidad a δ 6,30 ppm, característica del grupo OH, asegura lo exhibido en el espectro IR. Se observa la aparición de una señal centrada a δ 6,71 ppm (dd, 2H), con una constante de acoplamiento de $J = 8$ Hz perteneciente a los protones aromáticos en posición *orto* (C-1 y C-2)³¹ (Fig. 29). Se observa también un singlete a δ 7,59 ppm, el cual sugiere la presencia de un sustituyente oxigenado en posición 4 del anillo bencénico A y vecino espacialmente, correspondiente al protón olefínico en posición 5, fuertemente desapantallado por la presencia del sustituyente oxigenado³¹. De acuerdo con esta información los grupos metóxilos se encuentran como sustituyentes de C-3 y C-6.

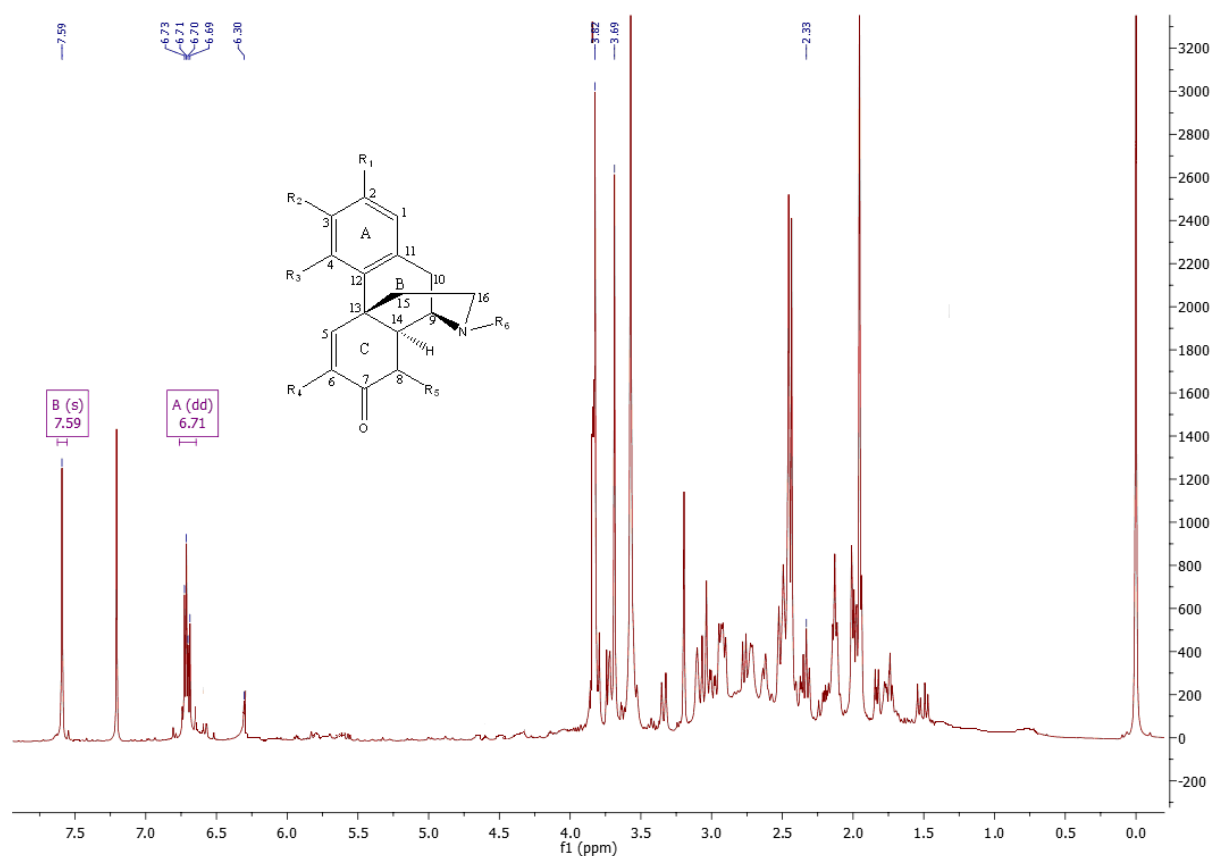


Fig. 29. Espectro RMN ^1H del compuesto **CMI**.

El espectro RMN ^{13}C se presenta en la Fig. 30, se constató la presencia de un total de 19 átomos de carbono en la molécula. Con ayuda de la técnica INEPT se asignaron 3 grupos metilos (2 OCH_3 y 1 NCH_3), 4 grupos metilenos [CH_2], 5 grupos metinos [CH], 6 átomos de carbonos cuaternarios y un carbono carbonílico (C-7) (Fig. 31). Con ayuda de la literatura se realizó la asignación de cada una de las señales⁸⁸.

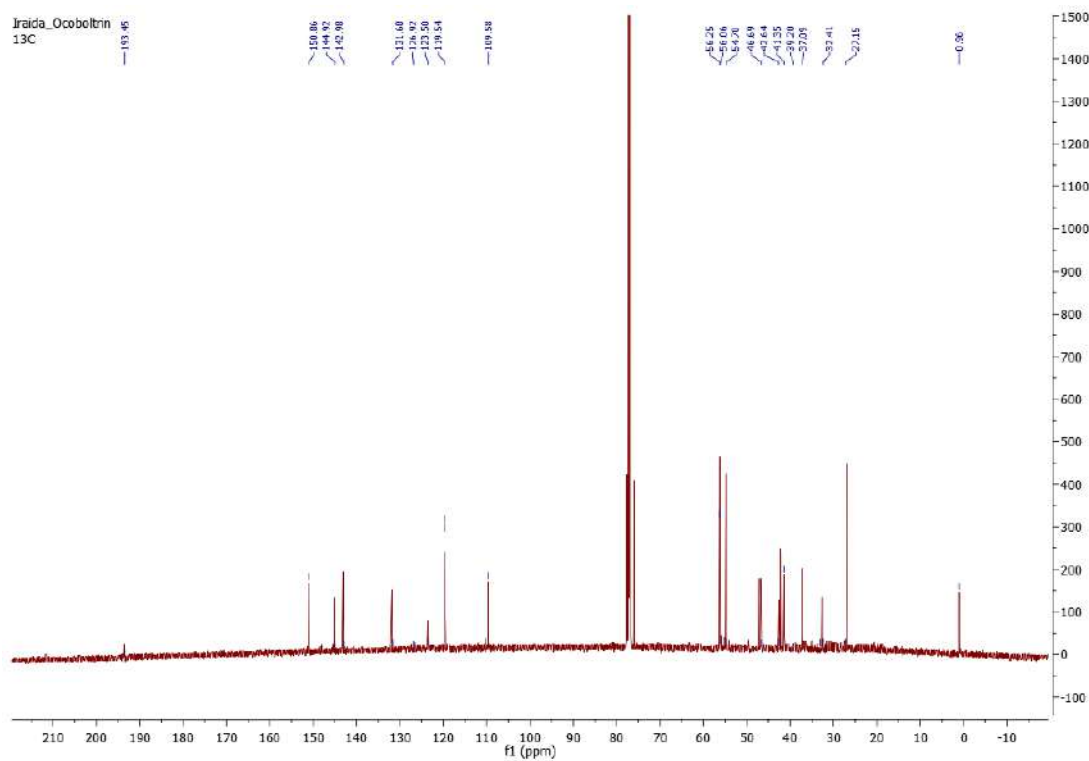


Fig. 30. Espectro RMN ^{13}C del compuesto **CMI**.

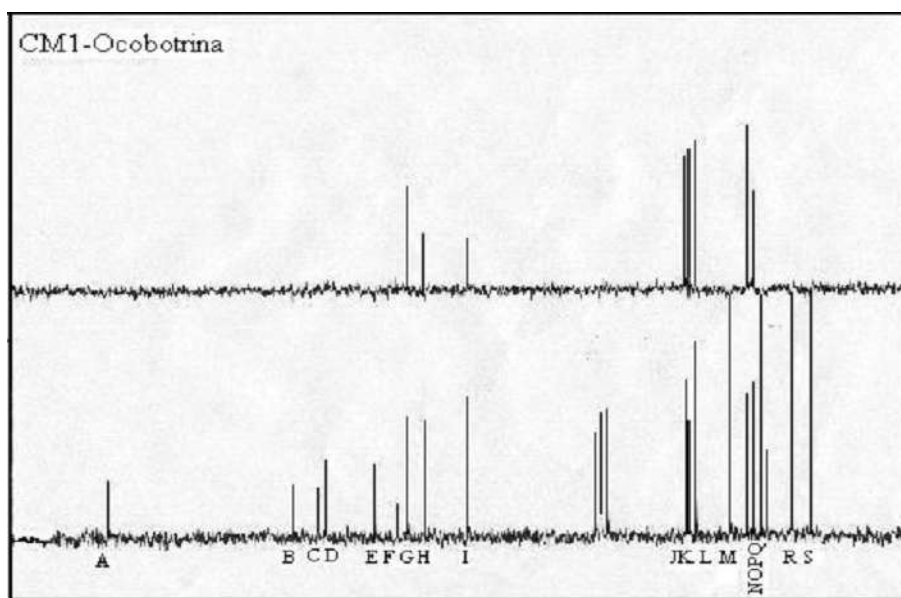


Fig. 31. Espectros de RMN ^{13}C del compuesto **CMI**, completamente desacoplado e INEPT.

A= 194,5; B= 150,9; C= 144,8; D= 143,2; E= 131,3; F= 126,3; G= 123,7; H= 119,5; I= 109,2; J= 56,7; K= 56,3; L=54,8; M= 46,8; N= 42,7; O= 41,1; P= 39,4; Q= 37,9; R= 32,2; S=27,8.

RMN ^{13}C : [22,5 MHz, CDCl_3 . TMS, δ (ppm)]: 193,45 (C-7); 150,86 (C-6); 144,92 (C-3); 142,98 (C4); 131,68 (C-11); 126,92 (C-12); 123,50 (C-5); 119,54 (C-1); 109,58 (C-2); 56,25 (C-9); 56,03 (OMe); 54,70 (OMe); 46,69 (C-16); 42,35 (N-Me); 41,35 (C-14); 39,20 (C-8); 37,09 (C-13); 32,41 (C-15); 27,15 (C-10).

EM [m/z] (int. rel. %): 329 (M^+ , 59 %); 314(100); 286(19); 271(5); 192(28); 189 (9); 157 (6); 115 (16); 84 (15); 42 (47).

A continuación analizamos el espectro de masas del compuesto **CM1** (Fig. 32) el cual muestra el pico ión molecular en M^+ 329, con una intensidad relativa de 59 %. Los inones fragmentos principales son la pérdida de 15 unidades de masa a partir de este fragmento M^+ , que constituye el pico base (m/z 314), y la pérdida posterior de 28 unidades (m/z 286) que confirman la pertenencia de este compuesto al grupo de los alcaloides morfinandienónicos³¹. Otro ión fragmento de interés es el m/z 192, consecuencia de la pérdida de 137 unidades de masa ($\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$).

Como se aprecia en el esquema de fragmentación (Fig. 33), la ruptura inicial pudo haber ocurrido en un enlace arílico o bencílico, seguido por la pérdida de un grupo metilo y posteriormente de un CO, fragmentaciones comunes de las morfinandienonas³¹, que da como resultado un pico apreciable en $\text{M}^+ - 43$.

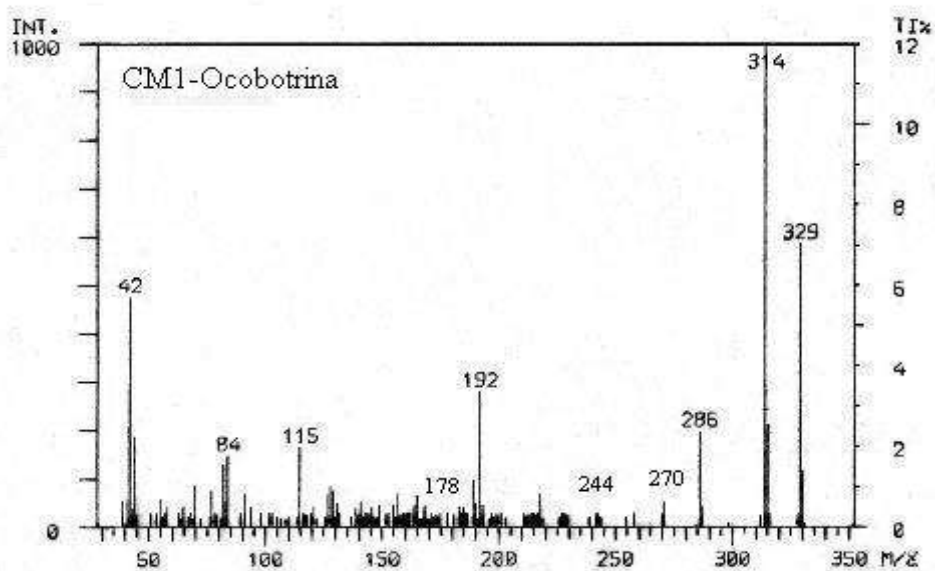


Fig. 32. Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto **CM1**.

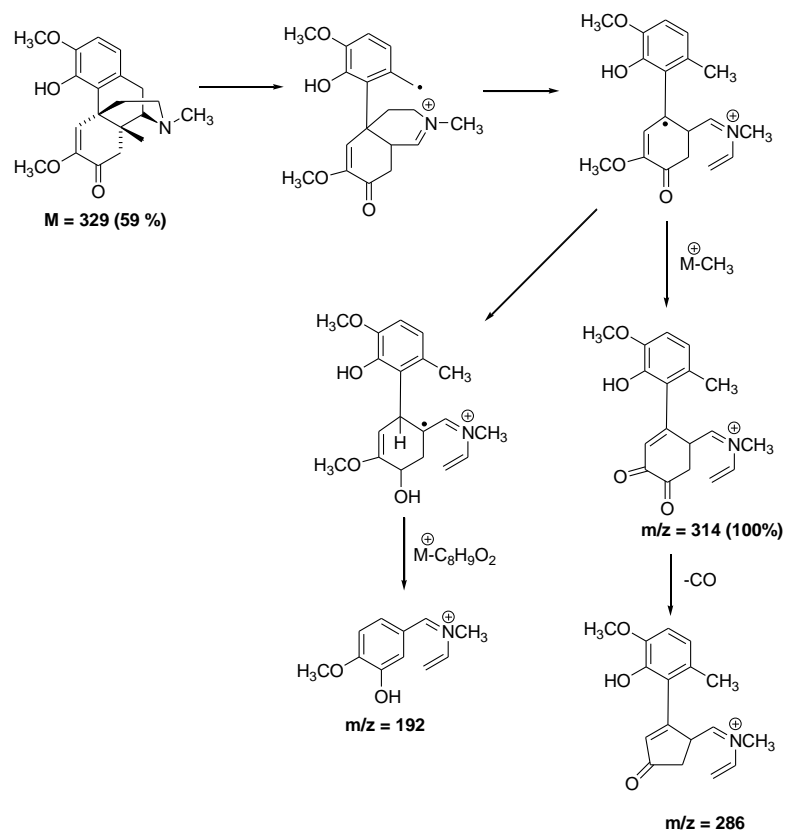


Fig. 33. Esquema de fragmentación propuesto para el compuesto **CM1**

La presencia de centros estereogénicos en la estructura de esta clase de alcaloides, fundamentalmente en los carbonos 9, 13 y 14, ha traído como consecuencia la existencia de diversidad de isómeros. Con el auxilio de la técnica de Espectrometría de Masas ha sido posible el establecimiento de la estereoquímica de la fusión de los anillos B/C, ya que los patrones de fragmentación de los compuestos de la serie B/C *cis* y la serie B/C *trans* difieren.

Los compuestos B/C *cis* muestran un pico fragmento característico en m/z 59, mientras que los derivados de la serie B/C *trans* no lo presentan o sólo aparece un pico muy débil. Esta diferencia se le atribuye a la disposición espacial del H-14 y a la cadena lateral que contiene el N, la cual está involucrada en el paso clave de fragmentación³¹. Este fragmento característico ($C_3H_9N^{\bullet+}$) se considera que proviene de la eliminación *cis*, a través de un estado de transición de un anillo de cuatro miembros⁸⁹ (Fig. 34).

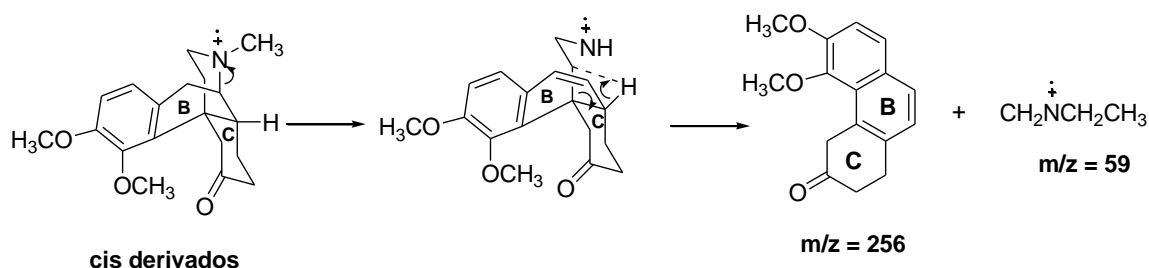


Fig. 34. Esquema de fragmentación producto de la eliminación *cis*.

En el caso del compuesto **CM1**, no se observa el pico fragmento a m/z 59, lo que sugiere la presencia del isómero *trans*.

La comparación de las constantes físicas y los datos espectroscópicos analizados del compuesto **CM1** con los del alcaloide morfínandienónico ocobotrina^{31,90-91}, aislado de la especie *Ocotea brachybotra* Mez, perteneciente a la familia Lauraceae⁸⁸ y de *C. micradenus*⁷, permite asegurar que estas estructuras son equivalentes.

Por todas esas razones para el compuesto **CM1**, de peso molecular 329 y fórmula general $C_{19}H_{23}O_4N$, se propone la estructura conocida (Fig. 35) correspondiente al alcaloide ocobotrina, una base de esqueleto morfínandienónico.

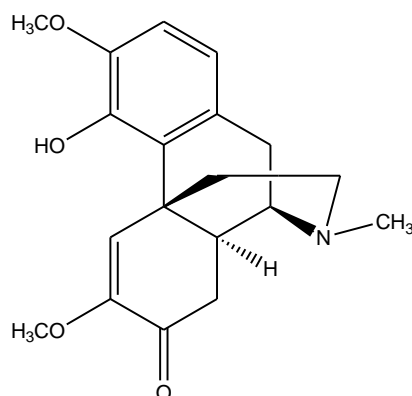


Fig. 35. Estructura del alcaloide ocobotrina.

3.3.2. Alcaloide CM2

El compuesto **CM2** eluyó con $CHCl_3/EtOH$ (1 %) y cristalizó en EtOH, su rendimiento fue de 0,00052 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (su peso fue de 39,7 mg).

La temperatura de fusión entre 191-195 °C y la rotación específica $[\alpha]^{25}_D = -95,23^\circ$ ($c = 0,32$; EtOH).

UV: λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ): 243 (4,28); 279 (3,79)

Este compuesto presenta los máximos de absorción característicos de los alcaloides del tipo morfínandienona³¹. El valor a 279 nm indica, similar al compuesto **CM1**, la presencia del núcleo aromático sustituido en las posiciones 3 y 4 del anillo A. Sin embargo, el máximo a 243 nm señala la aparición del sistema dienónico conjugado del anillo C, a diferencia de **CM1** (ocobotrina).

IR: γ_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3500-3400; 2950; 1670; 1640; 1613; 1480

En el espectro IR del compuesto **CM2** (Fig. 36) se aprecia una banda ancha entre 3500-3400 cm^{-1} características de vibraciones de valencia O-H, que demuestra la presencia de este grupo

funcional en la estructura. Otra banda más definida aparece a 2950 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de valencia C-H.

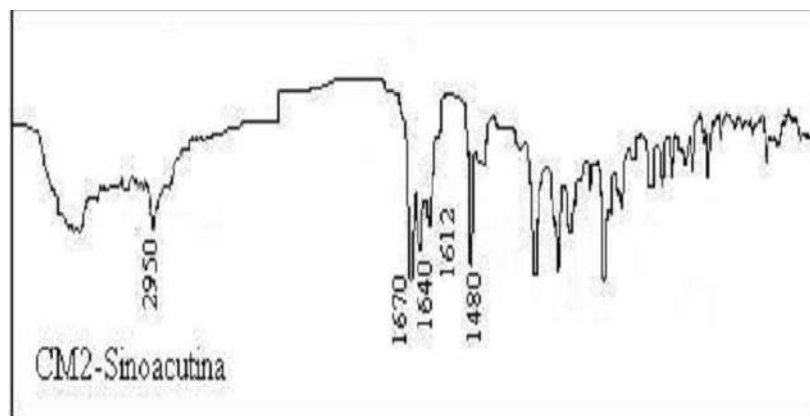
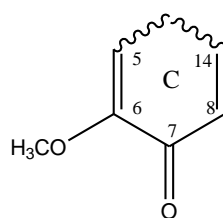


Fig. 36. Espectro IR del compuesto **CM2**.

A diferencia del compuesto **CM1**, se observan bandas a 1670 , 1640 y 1612 cm^{-1} , propias de un sistema cruzado α -metoxiciclohexadienónico conjugado, característico del anillo C de este grupo de morfinaandienonas³¹, lo que ratifica lo apreciado en el espectro UV. La banda intensa y aguda a 1480 cm^{-1} pertenece a la vibración de los dobles enlaces C-C aromáticos.



RMN ^1H : [200 MHz, CDCl_3 , TMS, δ (ppm)]: 2,45 (s, N-Me); 3,75 (s, O-Me); 3,89 (s, O-Me); 6,25 (ancha, OH); 6,32 {s, 1H, H-8); 6,65 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, H-2); 6,75 (d, $J = 8,2, \text{H-1}$); 7,54 (s, 1 H, H-5).

Se aprecian en la zona de los protones alifáticos del espectro de RMN tres singletes, correspondientes a tres protones cada una, a δ 2,45; 3,75 y 3,89 ppm, atribuibles a los metilos del grupo NCH_3 y a dos grupos OCH_3 , respectivamente. Además, se observa una señal

ensanchada a δ 6,25 ppm, característica de un grupo OH, que reafirma lo planteado en el espectro IR sobre este grupo. Se detecta una señal singlete y apantallada a δ 6,32 ppm correspondiente al protón olefínico de C-8, uno de los elementos distintivos estructuralmente entre los compuestos **CM1** y **CM2**. La señal a δ 6,65 ppm con una constante de acoplamiento de $J = 8,2$ Hz indica la presencia de un protón aromático acoplado a otro cuyo desplazamiento químico se aprecia a δ 6,75 ppm, correspondientes a los protones H-2 y H-1, respectivamente. Y el singlete a δ 7,54 ppm que se atribuye al protón olefínico H-5, fuertemente desapantallado por la presencia de un sustituyente oxigenado en C-4.

Los corrimientos químicos de los protones del anillo A muy semejantes a los protones de este anillo en **CM1** indican que el grupo hidroxilo se encuentra en el C-4 y el metoxilo en el C-3. Lo antes expresado indica que el otro grupo metoxilo está en el C-6.

EM [m/z] (int. rel. %): 327 (M^+ , 100%); 312 (42); 299 (55); 284 (86); 268 (22); 256 (17); 242(27); 226 (20); 42 (32).

El compuesto **CM2** muestra el pico ión molecular en M^+ 327 (Fig. 37), con una intensidad relativa del 100 %, por lo que constituye el pico base, por el contrario a lo que sucede en **CM1**. Las pérdidas de un grupo metilo a partir del fragmento M^+ y de un grupo CO, de 28 unidades, es el comportamiento típico de los alcaloides morfinandienónicos. El pico fragmento en m/z 59 no es apreciable, característico de los derivados N-metilo que poseen una insaturación entre los carbonos 8 y 14, a diferencia de los derivados N-metilo saturados que sí pueden exhibirlo⁹².

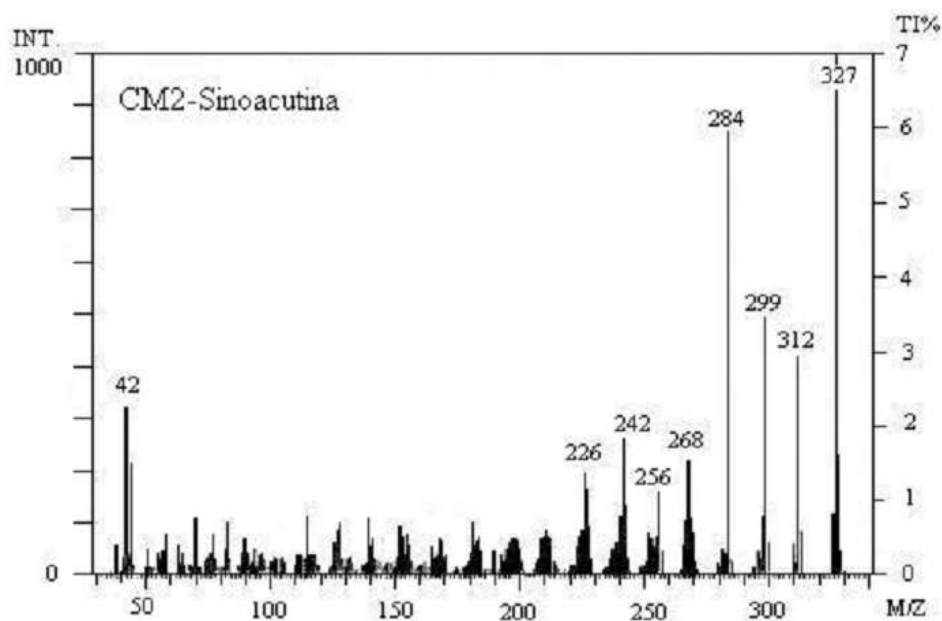


Fig. 37. Espectro de masas del compuesto **CM2**.

Los valores obtenidos de los espectros y de las constantes físicas del compuesto **CM2**, comparados con los reportados para la base sinoacutina^{93,94}, reflejan analogía lo que permite asegurar que ambas estructuras son semejantes. Este alcaloide ha sido caracterizado con anterioridad en las especies *C. balsamifera*, *C. flavens*, *C. linearis*^{95,96}, *O. brachybotra*⁹² y *C. micradenus*⁷.

Por todas esas razones para el compuesto **CM2**, de peso molecular 327 y fórmula general $C_{19}H_{21}O_4N$, se propone la estructura representada en la Fig. 38, correspondiente al alcaloide sinoacutina, una base de esqueleto morfínandienónico similar al compuesto **CM1** con ligeras diferencias estructurales que se destacaron en la discusión.

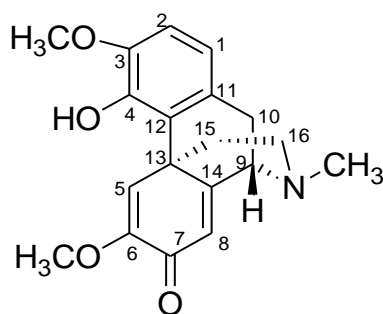


Fig. 38. Estructura del alcaloide sinoacutina.

3.3.3. Alcaloide CM3

Los espectros obtenidos para el compuesto **CM3** evidencian la presencia de un tipo de núcleo alcaloidal diferente a los estudiados anteriormente.

El compuesto **CM3** eluyó con $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (1 %) y cristalizó en MeOH, su rendimiento fue de 0,00018 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (14,2 mg), siendo el alcaloide minoritario. La temperatura de fusión entre 120-122 °C y su rotación específica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 851,6^\circ$ (c = 0,16; EtOH).

IR: $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3500-3300; 1595; 1505, 1400; 1330; 1310; 1280; 1243; 1110; 1080.

En su espectro IR se aprecia una banda ancha entre 3500-3300 cm^{-1} , característica de vibraciones de valencia O-H. Además, se observan bandas a 1595 y 1505 cm^{-1} que pertenecen a las vibraciones de dobles enlaces C-C aromáticos, que justifican la presencia de grupos funcionales e insaturaciones en la molécula.

RMN ^1H ; [200 MHz, CDCl_3 , TMS, δ (ppm)]: 2,53 (s, N-Me); 3,90 (s, O-Me); 3,91 (s, O-Me); 6,13 (s, OH); 6,53 (1H, s); 6,79 (1H, s); 8,00 (1H, s).

Las señales singletes a δ 2,53; 3,90 y 3,91 ppm corresponden a un grupo N-CH₃ y a dos grupos metoxilos, respectivamente. La aparición de los grupos metoxilos a δ 3,90 y 3,91 ppm indica la existencia de un núcleo aporfínico sustituido en los carbonos C-2, C-9 o C-10³⁰. El

singlete a δ 6,13 ppm, corresponde en este caso a una señal ensanchada típica de protones intercambiables como los del grupo OH. Los protones aromáticos que aparecen a δ 6,53; 6,79 y 8,00 ppm pueden ser asignados a C-3, C-8 y C-11, respectivamente, lo que constituye una característica de un alcaloide de este tipo³⁰.

EM [m/z] (int. rel. %): 327 (M^+ , 90%); 326 (100); 312 (27); 310 (14); 296 (8); 284 (40); 269(11); 253 (19).

Otro elemento que confirma la estructura con esqueleto aporfínico, lo constituye las fragmentaciones en Espectrometría de Masas (Fig. 39), pues sigue los principales caminos de fragmentación de este grupo de alcaloides (Fig. 40). Dentro de este tipo de bases naturales, específicamente se comporta como una aporfina 1,2,9,10 sustituidas, ya que el pico ($M-1$)⁺ es el pico base (m/z 326), a diferencia de las sustituidas en las posiciones 1,2,10,11; donde esto no ocurre³⁰.

Los fragmentos de m/z 312 ($M-15$)⁺, 310 ($M-17$)⁺, 296 ($M-31$)⁺, 284 ($M-43$)⁺ representan respectivamente la pérdida de un grupo CH_3 , OH, OCH_3 y CH_2NCH_3 , este último producto de un proceso Retro Diels-Alder a partir del ión M^+ . Por la pérdida de CH_3 y OCH_3 se producen los iones fragmentos de m/z 269 ($M-43-15$)⁺ y 253 ($M-43-31$)⁺, respectivamente³⁰.

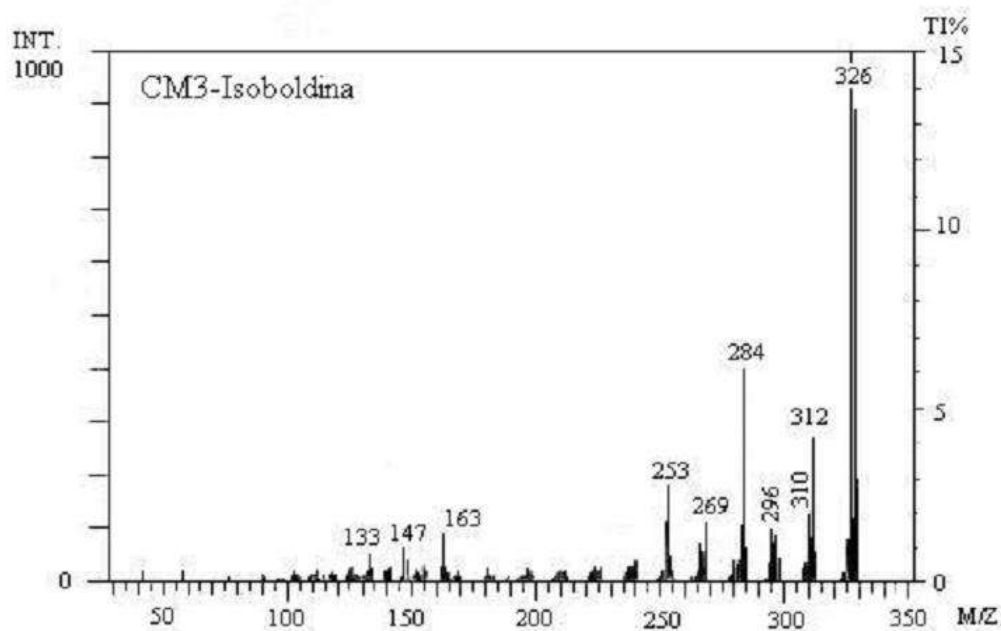


Fig. 39. Espectro de masas del compuesto **CM3**.

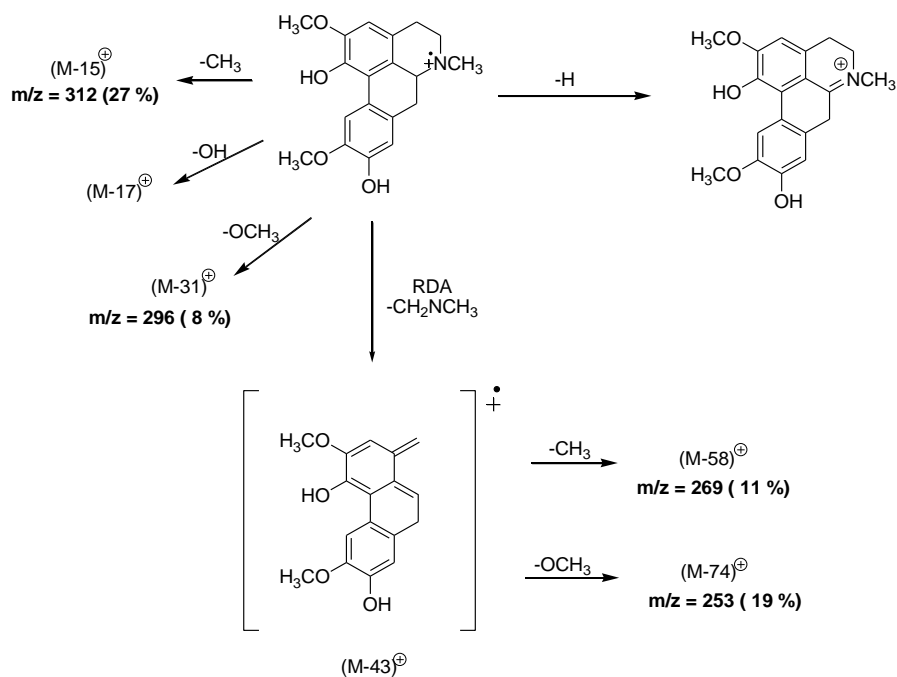


Fig. 40. Esquema de fragmentación del compuesto **CM3**.

Cuando hacemos la comparación entre los valores de los datos espectroscópicos y propiedades físicas del compuesto **CM3** y el alcaloide aporfínico isoboldina⁹³, se comprueba la identidad entre ellos. Los reportes consultados aportan la información de la presencia de este alcaloide en diversas plantas de diferentes familias entre las que se encuentran *Eritrina abyssinica* Lam.⁹⁷ (Papilionaceae), *Ocotea glaziovii* Mez⁹⁸, *Berberis integerrima* Bunge⁹⁹ y *Mahonia aquifolium* Nutt.¹⁰⁰ (Berberidaceae), *Delphinium dictyocarpum* DC.⁹⁹ (Ranunculaceae), *Guatteria melosma* Diels y *Xylopia danguyella* Ghesq. Ex Cavaco et Keraudr. (Annonaceae), *Hernandia cordigera* Vieill.¹⁰¹ (Hernandiaceae) y *C. micradenus*⁷ (Euphorbiaceae).

Por todas esas razones para el compuesto **CM3**, de peso molecular 327 y fórmula general C₁₉H₂₁O₄N, se propone la estructura representada en la Fig. 41, correspondiente al alcaloide isoboldina, una base de esqueleto aporfínico.

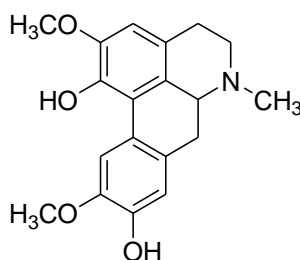


Fig. 41. Estructura del alcaloide isoboldina.

3.3.4. Alcaloide CM4

El compuesto **CM4** eluyó con CHCl₃/EtOH (1 %) y cristalizó en n-hexano/metanol (*n*-hexano/MeOH), su rendimiento fue de 0,0018 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (su peso fue de 103,8 mg). La temperatura de fusión entre 195-198 °C y la rotación específica $[\alpha]_{D}^{25} = -9,56^{\circ}$ (c= 0,35; EtOH).

UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 235 (3,25); 268 (3,32)

Los máximos de absorción, característicos de los alcaloides morfinandienónicos³¹ del tipo de la 8,14-dihidrosalutaridina, pertenecientes al núcleo aromático sustituido (268 nm) y al grupo cromóforo carbonilo α,β insaturado (235 nm) se aprecian en el espectro de este compuesto.

IR: $\gamma_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3350; 2900-2860; 1679; 1610; 1570; 1480

El compuesto muestra dos bandas anchas, una a 3350 cm^{-1} y la otra entre $2900\text{-}2860 \text{ cm}^{-1}$, características de vibraciones de valencia OH en el primer caso, que apoya la presencia del grupo funcional en la estructura (C-4) y en el segundo caso con carbono (CH).

La banda a 1679 cm^{-1} es propia de un grupo carbonilo α,β insaturado, que conjuntamente con la banda a 1610 cm^{-1} confirman la estructura del dihidroderivado, similar al compuesto **CM1**. El resto de las bandas que aparecen a 1610 , 1570 y 1480 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones de los dobles enlaces C-C olefinicos o aromáticos³¹.

RMN ^1H : [90 MHz, CDCl_3 , TMS, δ (ppm)]: 2,38 (s, NMe); 3,67 (s, OMe); 3,82 (s, OMe); 6,68 (2H, Sist. AB, $J = 7,5 \text{ Hz}$); 6,74 (1H, s).

El espectro de RMN ^1H (Fig. 42) muestra un singlete correspondiente a tres protones a δ 2,38 ppm, atribuible al grupo NCH_3 , dos señales, cada una de tres protones, a δ 3,67 y 3,82 ppm que indican la presencia de los dos grupos OCH_3 ; una señal ensanchada a δ 6.30 ppm, característica del grupo OH, la presencia de un sistema AB centrado a δ 6,68 ppm, con una constante de acoplamiento de $J = 7,5 \text{ Hz}$, perteneciente a los dos protones aromáticos en posición orto (C-1 y C-2), y un singlete a δ 6,74 ppm, correspondiente al protón olefinico en posición 5. Lo antes expuesto evidencia que el anillo A de esta molécula es idéntico al anillo A en **CM1** y **CM2**.

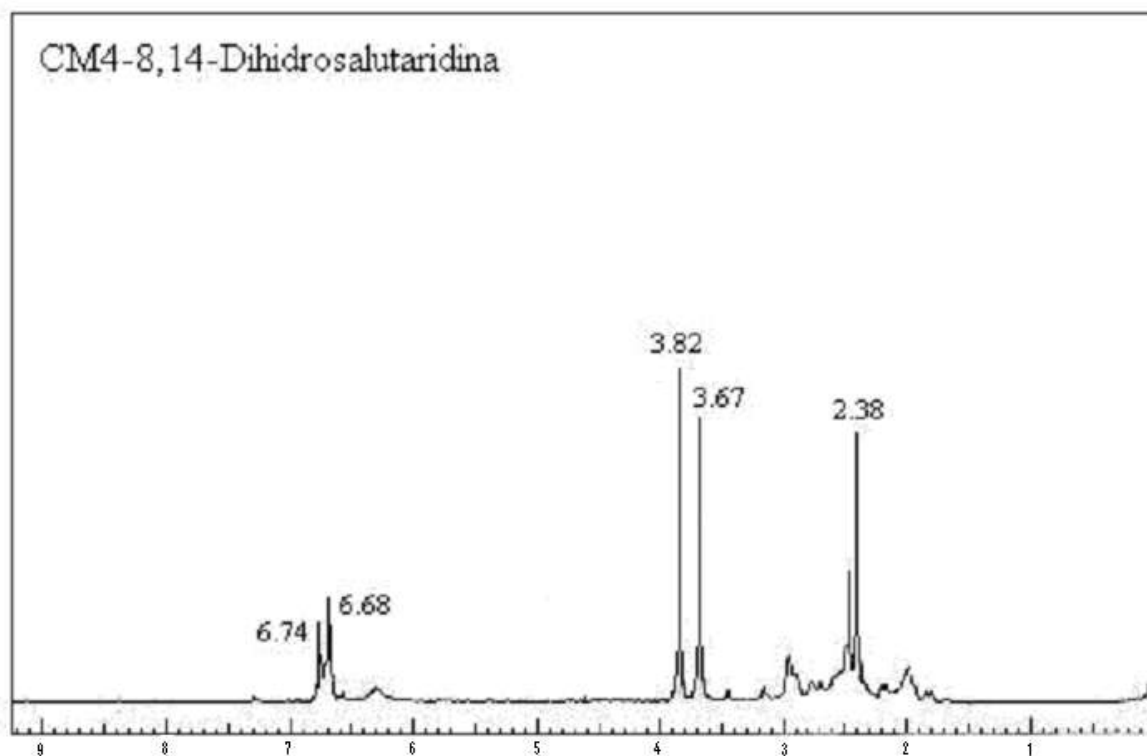


Fig. 42. Espectro de RMN ^1H del compuesto **CM4**

En el espectro RMN ^{13}C desacoplado (Fig. 43) se constató, al igual que el compuesto **CM1**, la presencia de 19 átomos de carbonos, atribuidos con el auxilio de la técnica INEPT a los 3 grupos metilos (2 OCH_3 y 1 NCH_3), 4 grupos metilenos [CH_2], 5 grupos metinos [CH], 6 átomos de carbonos cuaternarios y un carbono carbonílico (C-7).

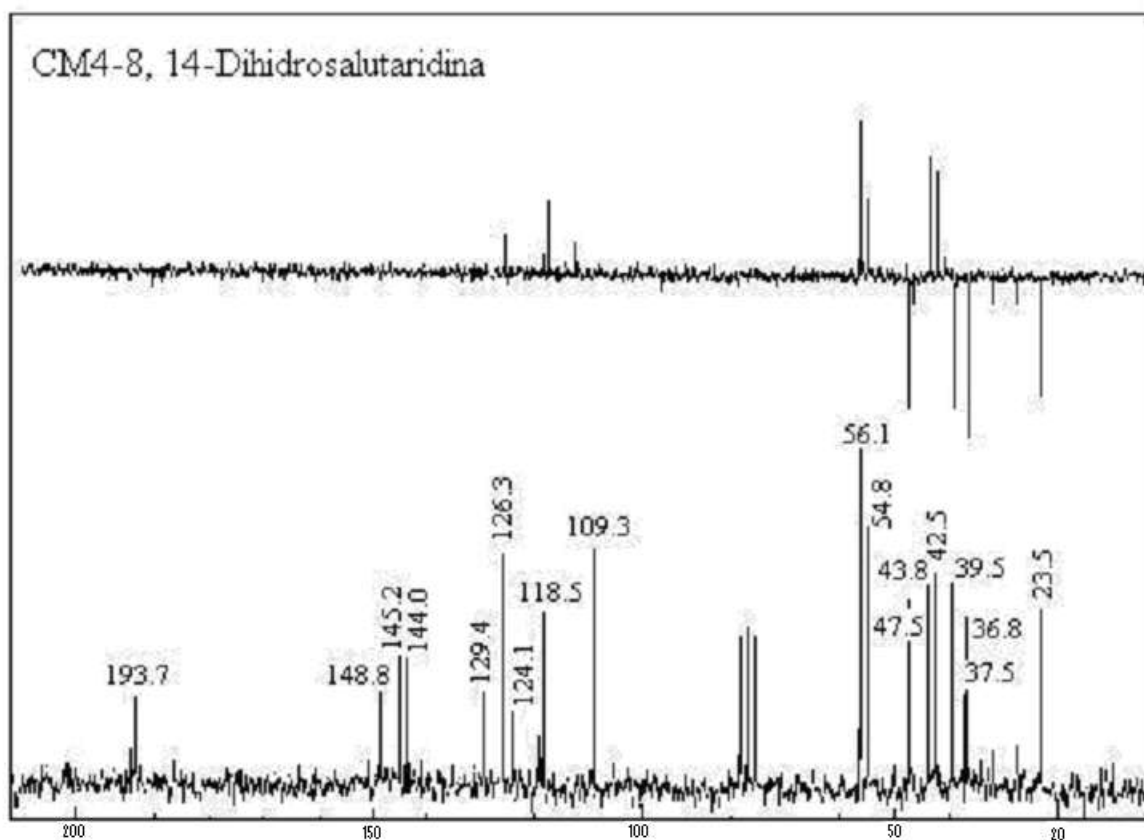


Fig. 43. Espectro de RMN ^{13}C desacoplado e INEPT del compuesto **CM4**

RMN ^{13}C : [22,5 MHz, CDCl_3 , TMS, δ (ppm)]: 193,7 (C-7); 148,8 (C-6); 145,2 (C-3); 144,0 (C-4); 129,4 (C-11); 126,3 (C-5); 124,1 (C-12); 118,5 (C-1); 109,3 (C-2); 56,1 (C-9); 56,1 (OMe); 54,8 (OMe); 47,5 (C-16); 43,8 (C-14); 42,5 (NMe); 39,5 (C-8); 37,5 (C-13); 36,8 (C-15); 23,5 (C-10).

EM [m/z] (int. rel. %): 329 (M^+ , 79 %); 314 (100); 286 (9); 270 (14); 244 (26); 210 (4); 192 (16); 178 (7); 146 (10); 115 (6); 91 (3); 82 (4); 59 (5); 42 (12).

CM4 sigue los patrones de fragmentación propios de las morfinandienonas³¹. Su espectro de masas (Fig. 44) muestra el pico ión molecular en M^+ 329, con una intensidad relativa de 75,9 %. La pérdida de un grupo CH_3 a partir de este fragmento M^+ constituye el pico base. A

continuación, se aprecia en el espectro la pérdida de monóxido de carbono. Otro ión fragmento de interés es el de m/z 192, consecuencia de la pérdida de 137 unidades de masas ($C_8H_9O_2$).

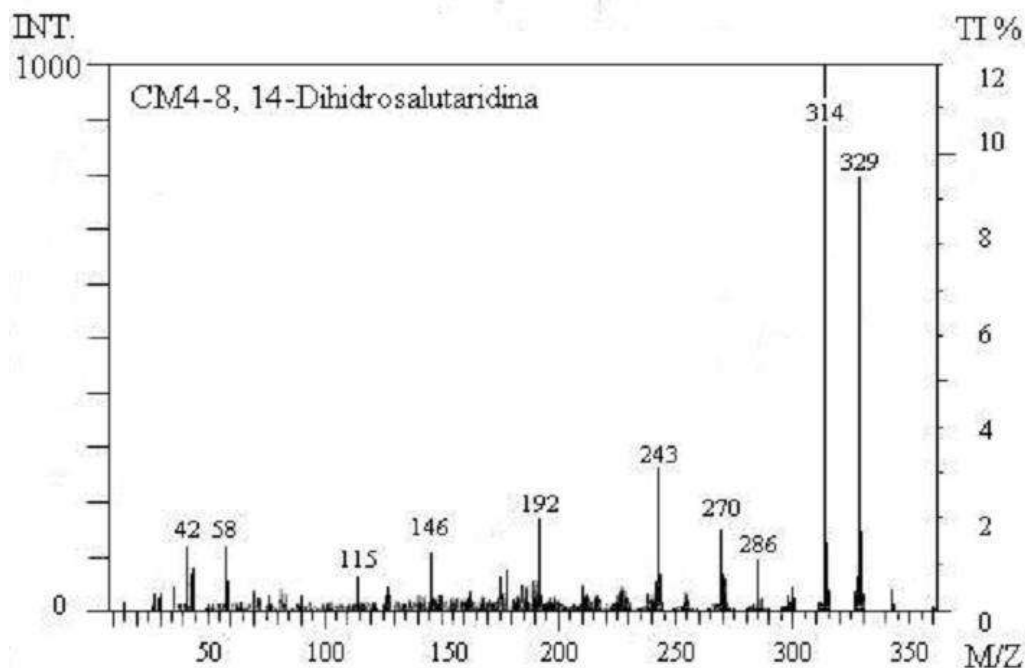


Fig. 44. Espectro de masas del compuesto **CM4**.

A diferencia del espectro del compuesto **CM1**, el pico fragmento en m/z 59 aparece con una intensidad de 5 %, lo que indica la presencia de un isómero de la ocobotrina. Al comparar los espectros y constantes físicas del compuesto **CM4** y del alcaloide 8,14-dihydrosalutaridina¹⁰² aislado anteriormente de las plantas *C. linearis*, *C. discolor*, *C. plumieri* y *C. stenophyllus*¹⁰²⁻¹⁰⁴ y *C. micradenus*⁷, se aprecia analogía entre ambos, lo que permite certificar la identidad estructural entre ambos alcaloides.

Para el compuesto **CM4**, de peso molecular 329 y fórmula general $C_{19}H_{23}O_4N$, se propone la estructura que se muestra en la figura 45, correspondiente al alcaloide 8,14-dihydrosalutaridina, una base de esqueleto morfinandienónico similar al compuesto **CM1** con ligeras diferencias desde el punto de vista estereoquímico.

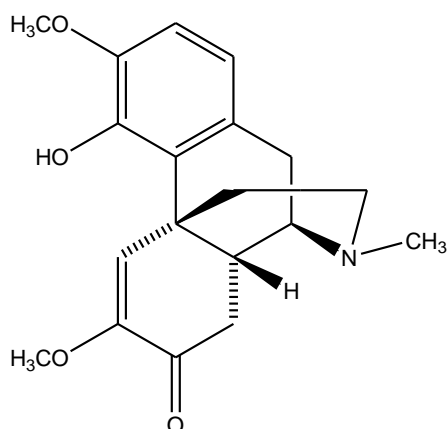


Fig. 45. Estructura del alcaloide 8,14-dihidrosalutaridina.

3.3.5. Alcaloide CM5

El compuesto **CM5** eluyó con $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 5 % y cristalizó en MeOH, su rendimiento fue de 0,00058 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (peso 43,3 mg). La temperatura de fusión entre 195-200 °C y la rotación específica $[\alpha]_D^{25} = +288,37^\circ$ (EtOH; c 0,22).

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 231 (3,90), 268 (3,96).

Se aprecian máximos de absorción con valores a 268 y 231 nm, similares a los observados para el alcaloide **CM1**, característicos del núcleo aromático A sustituido (C-3 y C-4) y del grupo cromóforo carbonilo α,β insaturado (C-7) en el anillo C, respectivamente.

IR: $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3460-3420, 2960, 1699, 1630, 1600, 1500.

El compuesto **CM5** muestra una banda ancha entre 3460-3420 cm^{-1} , así como otra más definida en 2960 cm^{-1} , características de vibraciones de valencia con OH en el primer caso que soportan la presencia en la estructura (C-4) y CH en el otro. La banda a 1699 cm^{-1} es propia de un grupo carbonilo α,β insaturado que corrobora lo apreciado en el espectro UV, mientras que las bandas que aparecen a 1630, 1600 y 1500 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones de los dobles

enlaces C-C olefínico y aromático, presentes en la molécula. Las bandas a 1699 y 1630 cm^{-1} refuerzan la hipotética estructura de un dihidroderivado³¹.

RMN ^1H :(250 MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 3,57 (s, OMe); 3,86 (s, OMe); 6,66 (d, H); 6,76 (d, H); 7,64 (s, ancha).

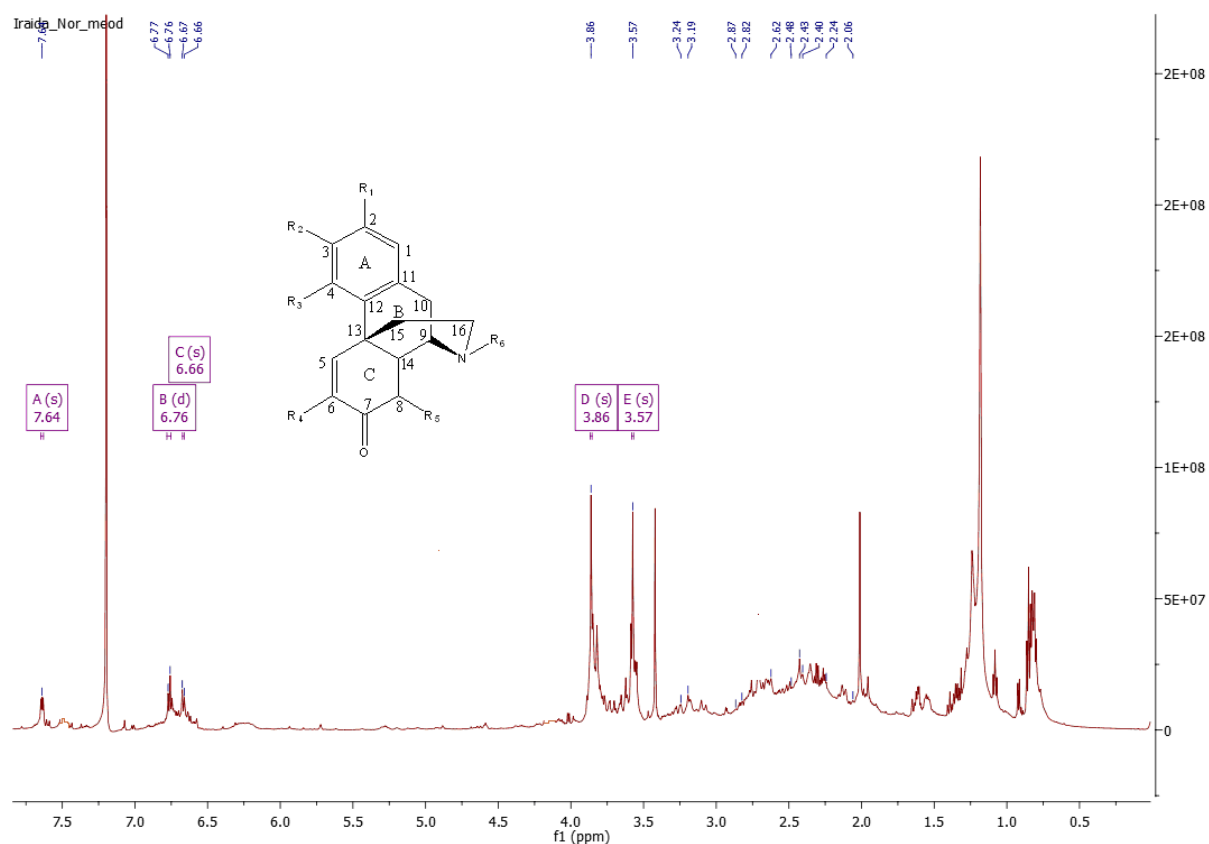


Figura. 46. Espectro de RMN ^1H del compuesto **CM5**.

El espectro de RMN ^1H (Fig. 46) muestra dos señales de tres protones cada una a δ 3.57 y 3,86 ppm, que indican la presencia de dos grupos OCH_3 . A diferencia de **CM1**, una señal en la zona alifática del espectro entre δ 2,34 y 2,45 ppm que integre tres protones correspondiente al grupo NCH_3 , no se observa, por lo que apunta a que **CM5** sea un N nor-derivado.

Se observan, además, la presencia de dos señales a δ 6,66 y δ 6,76 ppm, típicas de dos protones aromáticos en posición orto (C-1 y C-2) y un singlete a δ 7,64 ppm, atribuible al protón

olefínico (H-5), fuertemente desapantallado por la presencia de un sustituyente oxigenado en posición 4 (OH), vecino espacialmente. Estos corrimientos químicos para los protones del anillo A son semejantes a los encontrados para este anillo en los alcaloides **CM1**, **CM2** y **CM4**.

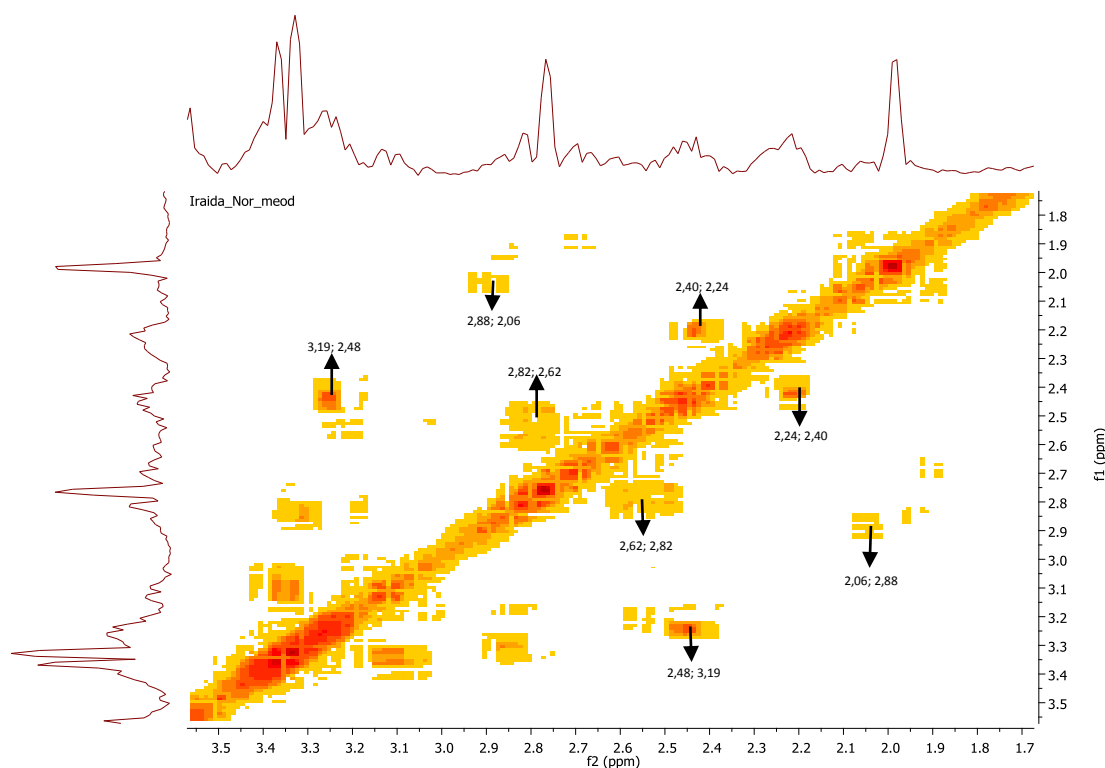


Fig. 47. Espectro de ^1H - ^1H -COSY del compuesto **CM5**.

Dada la multiplicidad de las señales protónicas alifáticas se registró su espectro ^1H - ^1H -COSY (Fig. 47) el cual permitió identificar interacciones entre los pares de señales a δ 2,48 y δ 3,19 ppm; δ 2,88 y δ 2,06 ppm; δ 2,24 y δ 2,40 ppm; así como a δ 2,62 y δ 282 ppm, asignables a los protones axiales y ecuatoriales de los carbonos 16, 15, 10 y 8, respectivamente.

El espectro HSQC (Fig. 48) y HMBC (Fig. 49) del compuesto **CM5** permitió realizar la asignación de todos los átomos de la molécula (Tabla. XX).

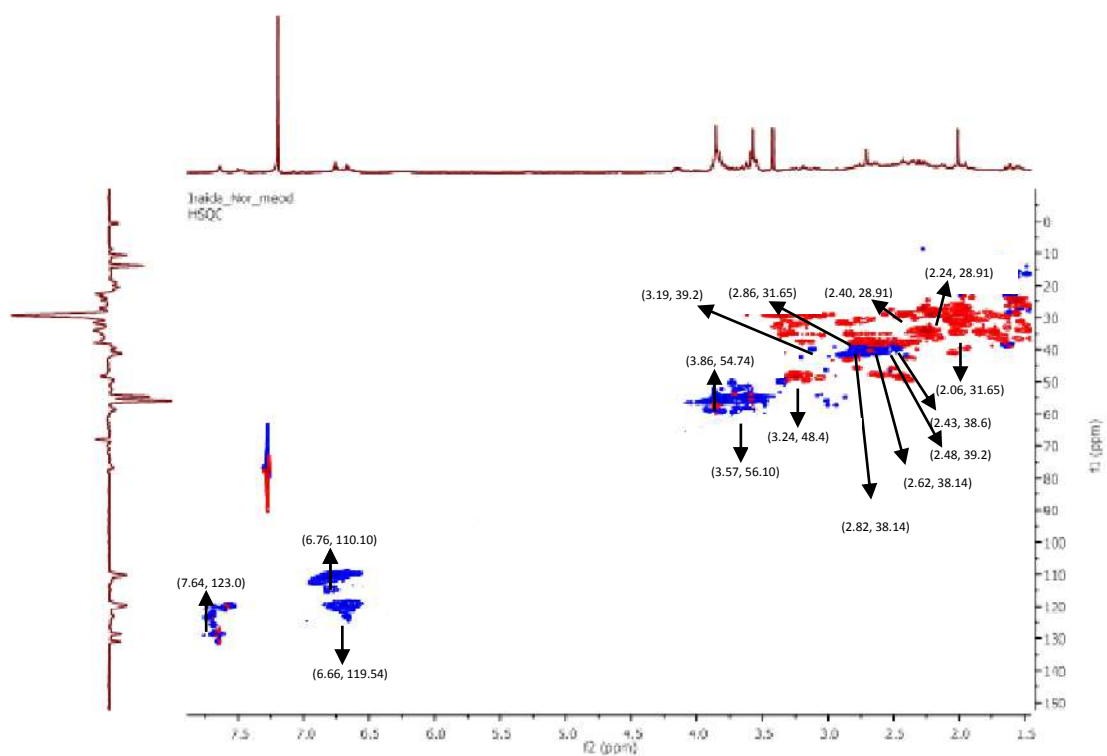


Figura 48. Espectro de HSQC del compuesto **CM5**.

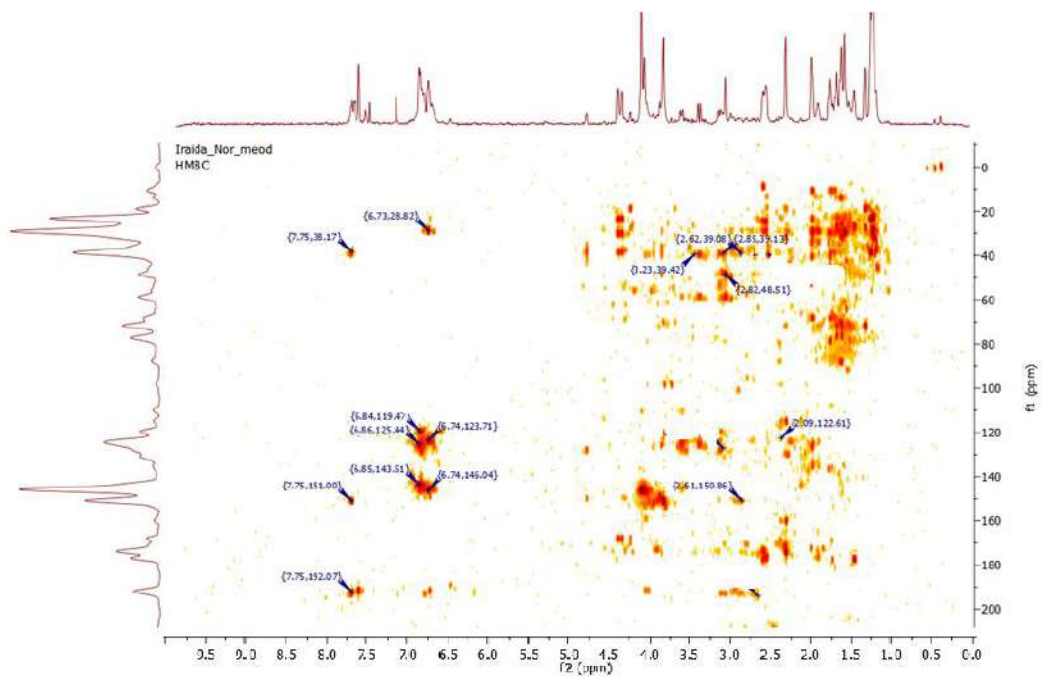
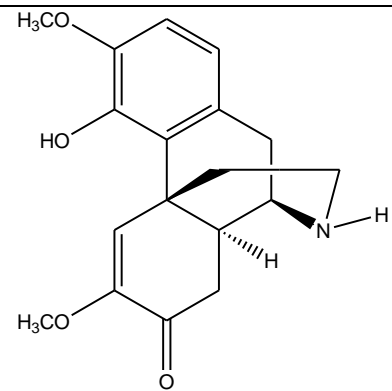


Figura 49. Espectro de HMBC del compuesto **CM5**.

Tabla XX. Desplazamientos químicos de RMN-¹H y RMN-¹³C de CM5.

Posición			
	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	HMBC
1	6,66	119,54	C ₅ , C ₃ , C ₁₀
2	6,76	110,10	C ₄ , C ₁₁ , C ₁
3	-	146,06	
4	-	143,59	
5	7,64	123,0	C ₇ , C ₆ , C ₁₄
6	-	150,93	
7	-	192,73	
8	2,62 2,82	38,14	C ₆ , C ₁₃ , C ₉
9	3,24	48,4	C ₁₄
10	2,24 2,40	28,91	C ₁ , C ₁₂
11	-	125,6	
12	-	124,25	
13	-	37,9	
14	2,43	38,6	C ₁₂ , C ₁₅
15	2,88 2,06	31,65	C ₁₄ , C ₁₂ , C ₅
16	2,48 3,19	39,2	C ₉ , C ₁₅
O-CH ₃	3,57	54,74	C ₆
O-CH ₃	3,86	56,10	C ₃

EM [m/z] (int. rel. %): 315 (100) C₁₈H₂₁O₄N, 300 (73), 272 (24), 227 (13), 189 (37), 178 (20), 151 (17), 68 (27).

El espectro de masas de **CM5** (Fig. 50) permitió confirmar la estructura propuesta. El mismo muestra el pico ión molecular en M⁺ 315, que constituye al mismo tiempo el pico base. A partir de este ión M⁺ se aprecia (Fig. 51) la pérdida de un grupo CH₃ y a continuación la de 28 unidades de masa, correspondientes al grupo CO. Otro ión fragmento de interés es el de m/z 178, consecuencia de la pérdida de 137 unidades de masa (C₈H₉O₂). Todas las fragmentaciones ocurridas son características de las bases del tipo morfinandienonas³¹.

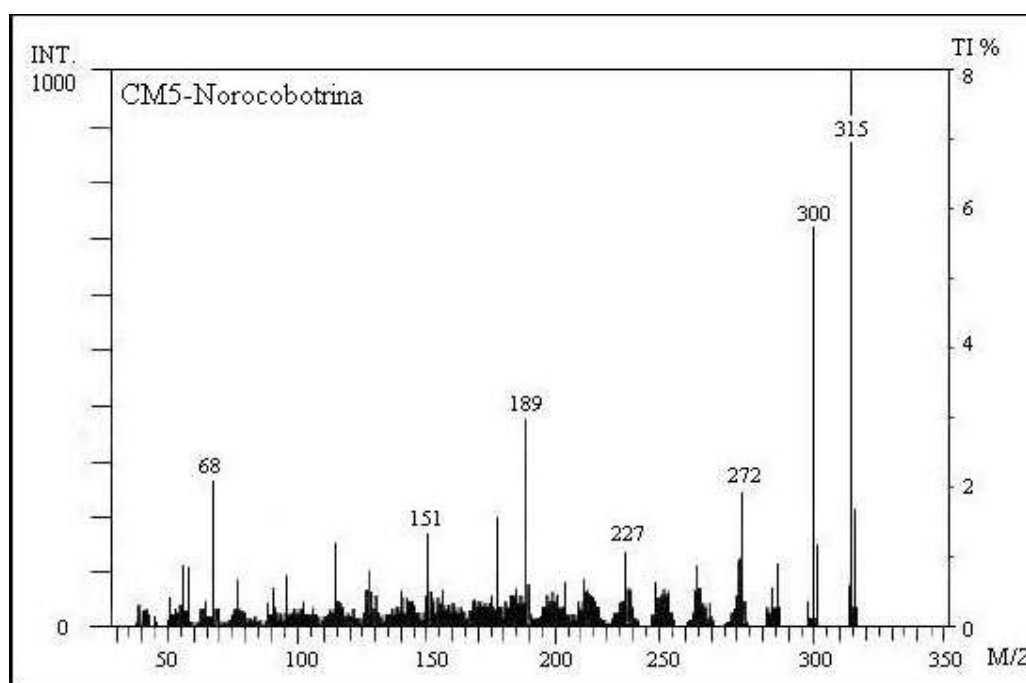


Figura 50. Espectro de masas del compuesto **CM5**.

Para determinar la estereoquímica de este compuesto se siguió el mismo análisis que para los compuestos N-metilo (**CM1** y **CM4**). Se observa que en su espectro de masas no aparece el pico fragmento en m/z 59, pero hay que señalar que en los N nor-derivados, este

pico es de muy poca abundancia (0,3), mientras que el fragmento de m/z 45 es de mayor intensidad (3,2) que en su homólogo N-metilo o en otros N-sustituidos ⁹².

En este caso del compuesto **CM5**, no se aprecia el pico fragmento a m/z 45. En la figura 52 se observa que la disposición espacial del protón en el carbono 14 del isómero B/C *trans*, no posibilita que se produzca la eliminación *cis*, responsable de la aparición de este fragmento (Fig. 53), lo que sugiere la presencia del isómero *trans*.

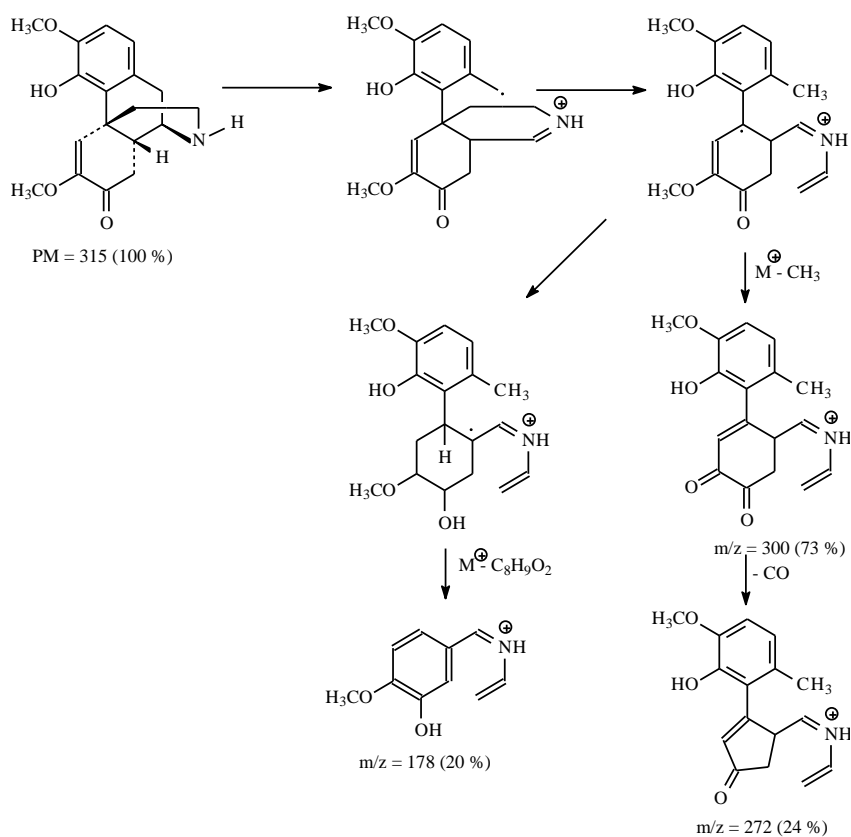


Fig. 51. Esquema de fragmentación del compuesto **CM5**.

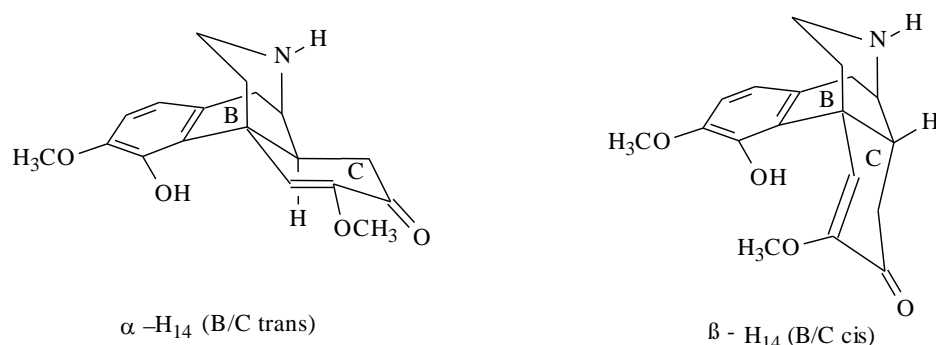


Fig. 52. Disposición espacial de los derivados morfinandienónicos de la serie B/C *trans* y la serie B/C *cis*.

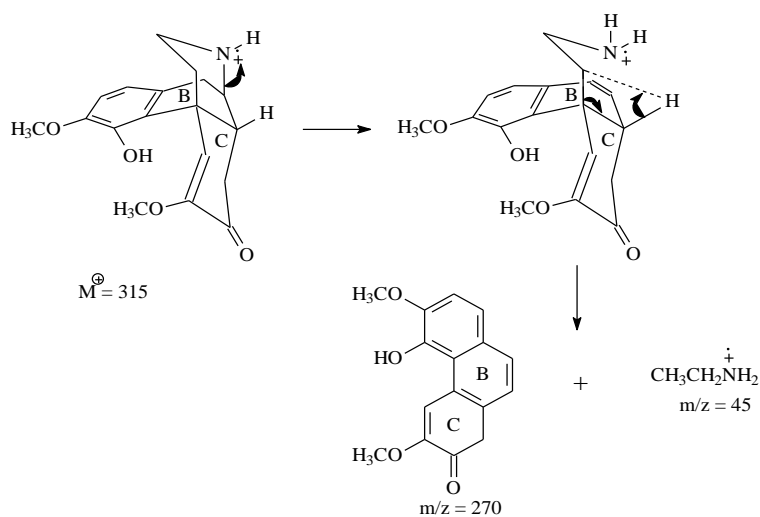


Fig. 53. Esquema de fragmentación de la eliminación *cis* para el caso de los nor-derivados.

Después de una búsqueda bibliográfica rigurosa para el compuesto **CM5**, de peso molecular 315 y fórmula general C₁₈H₂₁O₄N y al comparar los espectros y constantes físicas del compuesto **CM5** y del alcaloide ocobotrina (**CM1**), se puede establecer su identidad estructural. Se aprecian entre ambos analogías que permiten, teniendo en cuenta sus diferencias, asegurar que este compuesto es el N nor-derivado de **CM1** y que constituye una

estructura novedosa, la cual se nombra norocobotrina. (*trans* B/C-4-hidroxi-3,6-dimetoxi-5,6-didehidromorfinan-7-ona.) (Fig. 54).

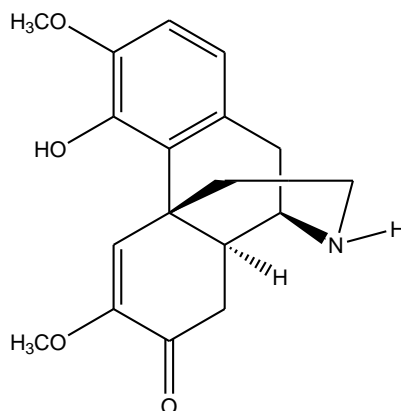


Figura 54. Estructura del alcaloide novedoso norocobotrina.

3.3.6. Alcaloide CM6

El compuesto **CM6** eluyó con CHCl₃/EtOH 10 % y cristalizó en CHCl₃, su rendimiento fue de 0,009 % con respecto al peso seco del material vegetal trabajado (peso 676,0 mg). La temperatura de fusión entre 201-205 °C y la rotación específica $[\alpha]^{25}_D = + 296,47^\circ$ (EtOH; c 0,43).

UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}(\log \epsilon)$: 237 (3,94). 270 (3,97).

Este compuesto presenta máximos de absorción característicos de un núcleo aromático sustituido (270 nm) y de un grupo cromóforo carbonilo α,β insaturado (237 nm), similares a los compuestos **CM1**, **CM2**, **CM4** y **CM5**³¹.

IR: $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}\text{cm}^{-1}$: 3410, 2940, 1699, 1630, 1590, 1499.

La presencia en el espectro IR de las bandas de absorción en 3410, 2940. 1699, 1630, 1590 y 1500 cm^{-1} indica la existencia de un grupo hidroxilo, vibraciones C-H olefínico, un grupo

carbonilo α,β insaturado y vibraciones de los dobles enlaces C-C olefínico y aromático, respectivamente, que ratifican la estructura propuesta.

RMN ^1H : (250 MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 6,75 (1H, d, $J = 8,2$ Hz); 6,71 (1H,s); 6,68(1H, d, $J = 8,2$ Hz); 3,87 (s, OCH_3); 3,69 (s, OCH_3); 3,30 (m, 1H); 3,18 (m, 1H); 2,90 (m, 2H); 2,71 (m, 1H); 2,54(m, 1H); 2,42 (m, 1H); 2,38 (m, 1H); 2,08 (m, 1H); 1,78 (m, 1H).

La zona alifática del espectro protónico muestra un total de once señales, de las cuales pueden ser asignadas las correspondientes a los dos grupos OCH_3 a δ 3,69 y 3,87 ppm. Se nota la ausencia de la señal del grupo NCH_3 , lo que indica la presencia de un N nor derivado, semejante al alcaloide **CM5**. La zona aromática muestra la presencia de tres señales correspondientes a igual número de protones ($\delta = 6,65$; 6,67 y 6,72 ppm), pertenecientes a H-1, H-5 y H-2, respectivamente (Fig. 55).

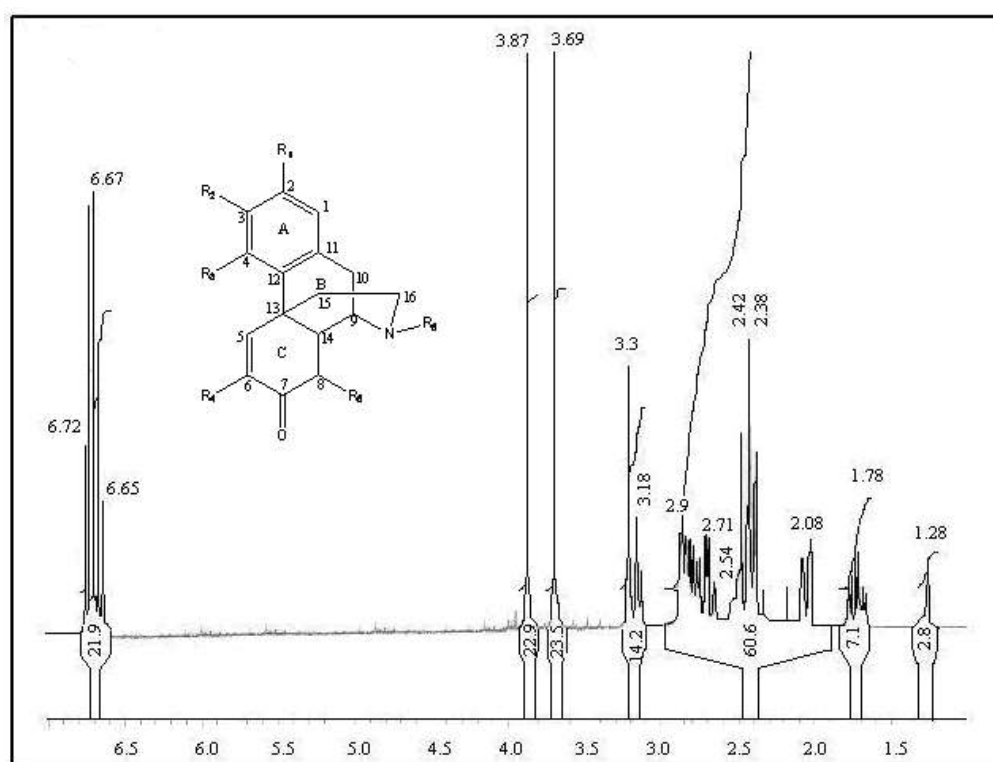


Fig. 55. Espectro de RMN ^1H del compuesto **CM6**.

La multiplicidad de las señales protónicas alifáticas y su cercanía en el espectro impide una asignación rápida y sencilla. Para dilucidar la estructura se registró y evaluó en primera instancia el espectro ^1H - ^1H -COSY (Fig. 56), que muestra las interacciones entre los protones alifáticos. La señal a δ 3,3 ppm muestra interacciones (picos "off resonance") con las señales que aparecen a δ 3,18; 2,90 y 2,54 ppm. La señal a δ 3,18 ppm muestra interacción con una de las señales que aparece a δ 2,90 ppm. Estas últimas, a su vez, muestran interacciones con las señales a δ 2,71, 2,08 y 1,78 ppm. La señal a δ 2,71 ppm muestra otras interacciones con las señales que aparecen a δ 2,08 y 1,78 ppm. El grupo de señales que aparecen entre δ 2,54 y 2,38 ppm presenta interacciones entre si, lo que indica que pertenecen a un mismo sistema de protones. Las señales a δ 2,08 y 1,78 ppm presentan acoplamiento a 3 σ 2 enlaces.

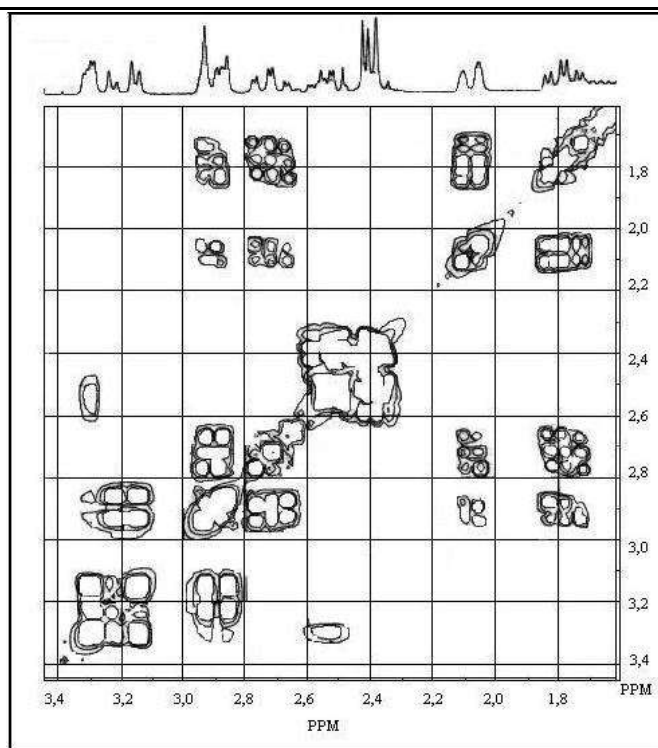


Fig. 56. Espectro HH COSY del compuesto **CM6**.

RMN ^{13}C : [22,5 MHz, CDC13, TMS, δ (ppm)]: 194,3 (C-7); 148,5 (C-6); 145,5 (C-3); 144,1 (C-4); 129,3 (C-11); 127,4 (C-5); 123,9 (C-12); 118,6 (C-1); 109,6 (C-2); 56,2 (OMe); 54,9 (OMe); 49,4 (C-9); 44,6 (C-14); 39,5 (C-16); 39,2 (C-15); 38,3 (C-13); 37,1 (C-8); 32,5 (C-10).

En el espectro RMN ^{13}C desacoplado (Fig. 57) se constató la presencia de un total de 18 átomos de carbono en la molécula, asignados con ayuda de la técnica DEPT 135° a 2 grupos metilos correspondientes a los dos sustituyentes OCH_3 . La ausencia del grupo NCH_3 refuerza la propuesta del N nor-derivado. Además, se nota la presencia de 4 grupos metilenos $[\text{CH}_2]$, 5 grupos metinos $[\text{CH}]$, 6 átomos de carbonos cuaternarios y un carbono carbonílico (C-7).

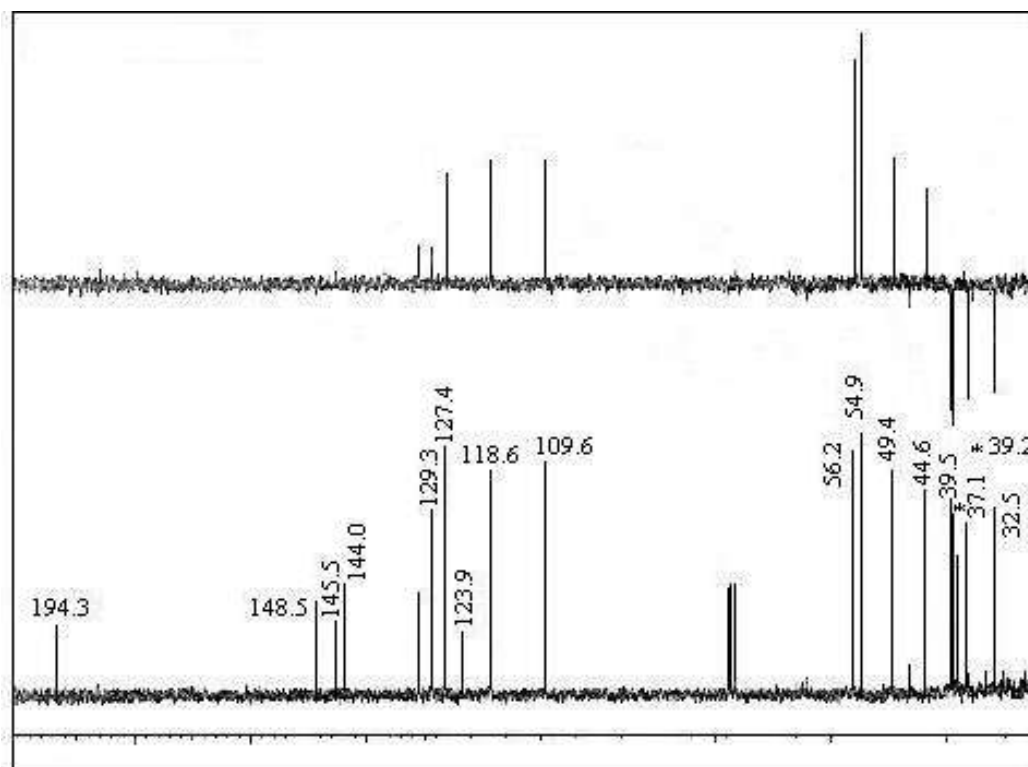


Fig. 57. Espectros de RMN ^{13}C desacoplado y DEPT 135° del compuesto **CM6**.

Cuando se analiza el espectro HC-COSY (Fig. 58), se comprueban las conectividades existentes entre los diferentes protones con su carbono de origen. Así, se determina que los protones alifáticos a δ 2,90 y 3,18 ppm pertenecen al carbono (C-10) a δ 32,5 ppm; los

protones a δ 1,78 y 2,08 ppm al carbono (C-8) a δ 37,1 ppm; los protones a δ 2,71 y 2,90 ppm al carbono (C-15) a δ 39,2 ppm; los protones a δ 2,38 y 2,42 ppm al carbono (C-16) a δ 39,5 ppm. Además, que el protón a δ 2,54 ppm corresponde al carbono (C-14) a δ 44,6 ppm; el protón a δ 3,30 ppm al carbono (C-9) a δ 49,4 ppm. En relación con los protones aromáticos las conectividades se presentan entre el protón a δ 6,68 ppm y el carbono (C-1) a δ 118,6 ppm; el protón a δ 6,71 ppm y el carbono (C-5) a δ 127,4 ppm y el protón a δ 6,75 ppm y el carbono (C-2) a δ 109,6 ppm.

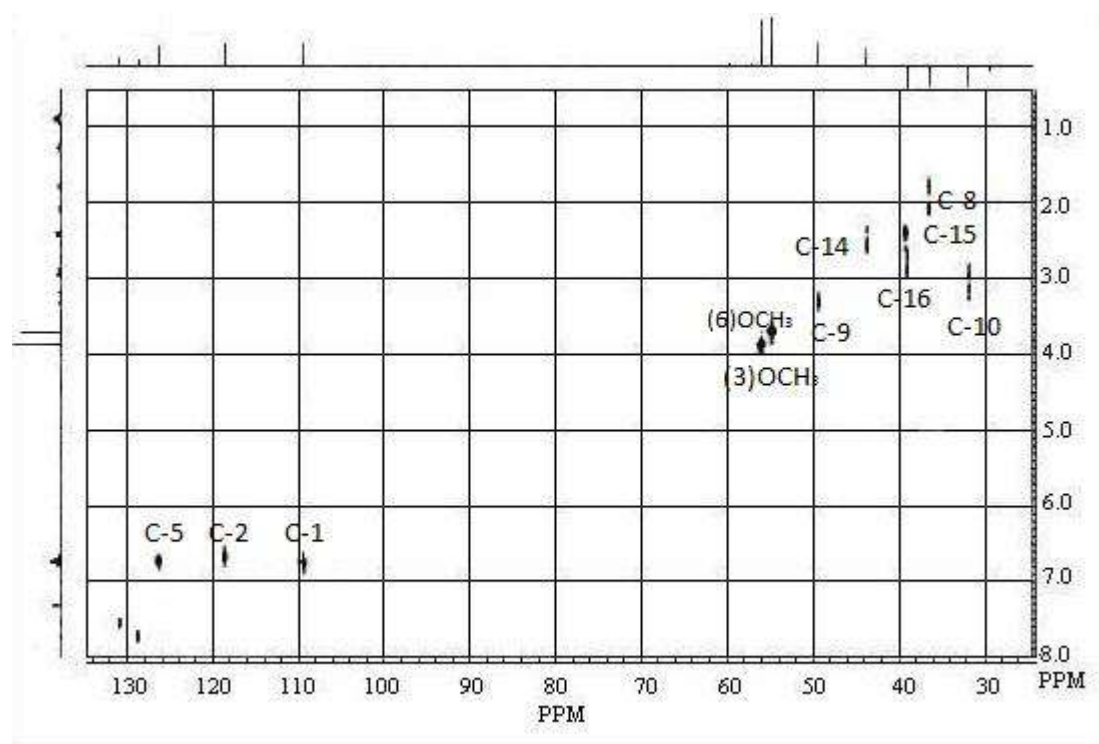


Fig. 58. Espectro HC COSY del compuesto **CM6**.

EM [m/z] (int. rel. %): 315 (56) $C_{18}H_{21}O_4N$, 300 (100), 287(30), 272 (45), 243 (72), 178 (14), 164(9), 132(20), 115(23), 91 (11), 77 (13), 45 (18).

El espectro de masas de CM6 (Fig. 59) muestra el pico ión molecular en M^+ 315 con una intensidad relativa de 56 %. A partir de este ión M^+ se aprecia la pérdida de un grupo CH_3 , que

constituye el pico base. A continuación 28 unidades de masa, correspondientes al grupo CO, se pierden conduciendo a la formación del fragmento de m/z 272. Otro ión fragmento de interés es el de m/z 178, consecuencia de la pérdida de 137 unidades de masa ($C_8H_9O_2$). Todas estas fragmentaciones son características de los alcaloides morfinandienónicos³¹.

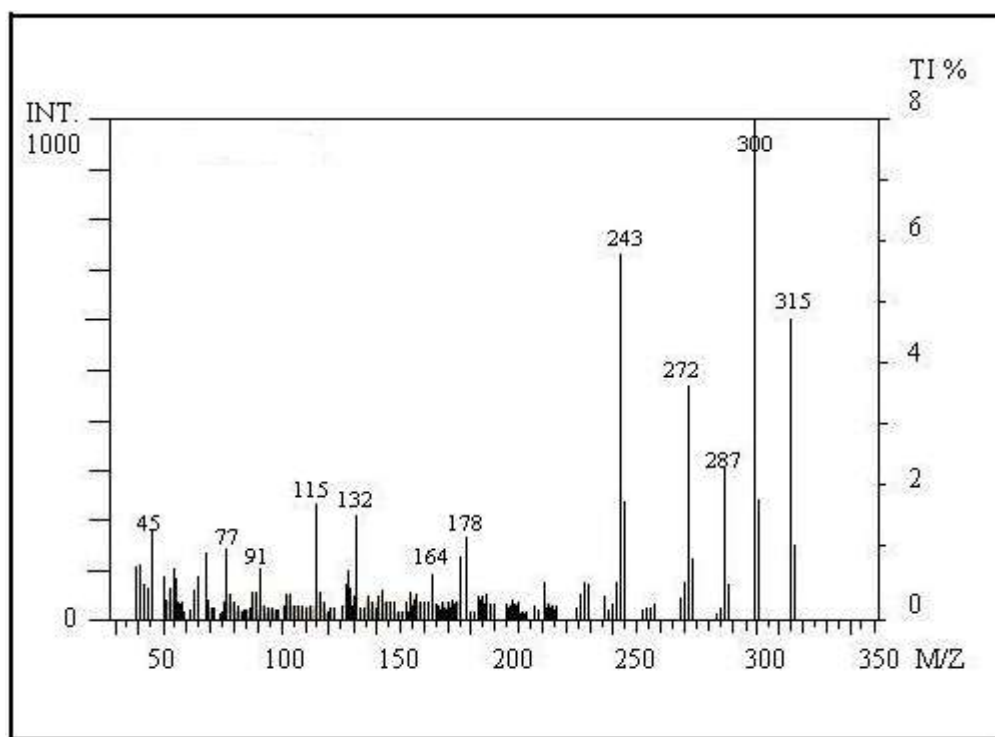
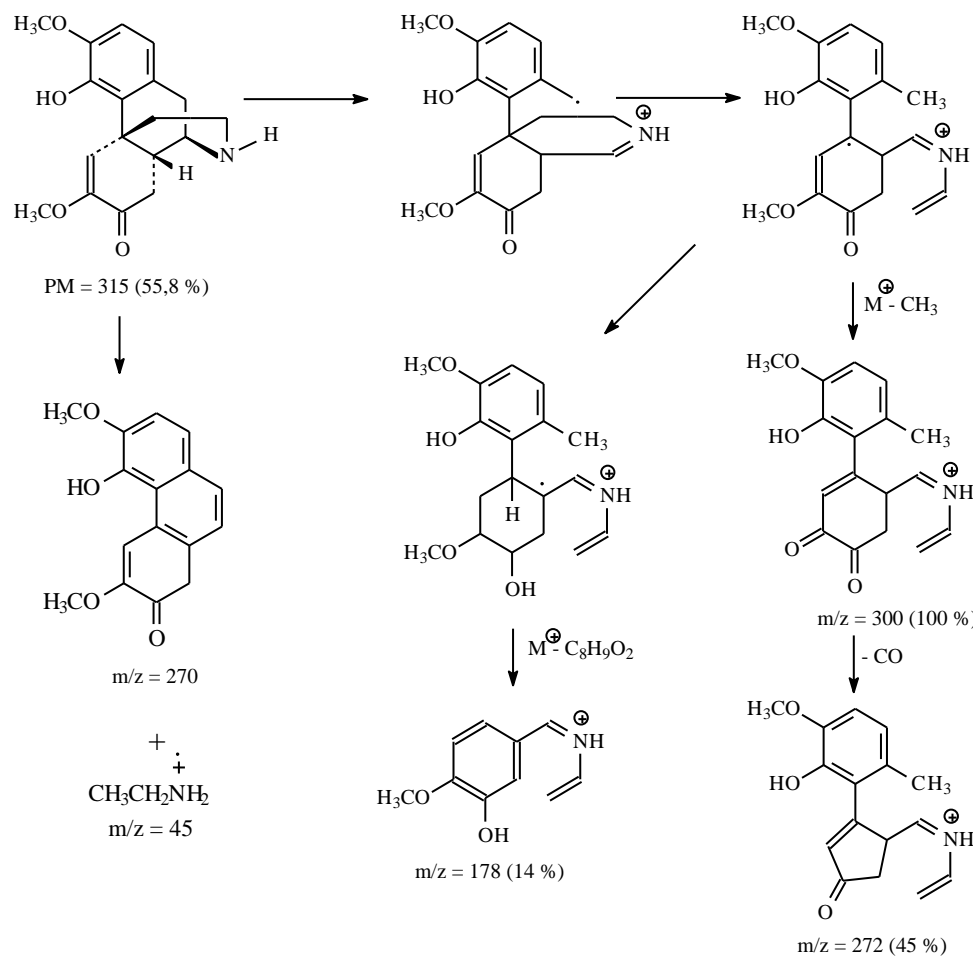


Fig. 59. Espectro de masas del compuesto **CM6**.

Al comparar los espectros de masas de los compuestos **CM5** y **CM6**, con el fin de determinar la estereoquímica de este último, se observa que en su espectro es apreciable el pico en m/z 45 con una intensidad relativa de 18 %, como se muestra en la figura 60, lo que sugiere la presencia del isómero *cis*.


 Figura 60. Esquema de fragmentación del compuesto **CM6**.

Al comparar los espectros y constantes físicas del compuesto **CM6** de peso molecular 315 y fórmula general $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$, con los del alcaloide norcobotrina (**CM5**), se pueden encontrar diferencias y similitudes entre ambas estructuras, que permiten asegurar que este compuesto es un N nor-derivado de estructura novedosa, la cual se nombra nildahillina. (*cis*-B/C-4-hidroxi-3,6-dimetoxi-5,6-didehidromorfinan-7-ona.). (Fig. 61)

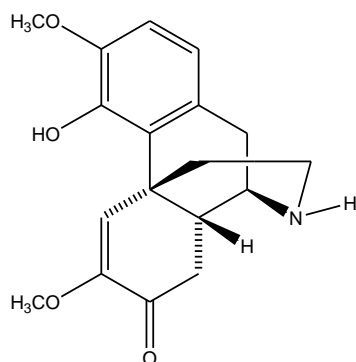


Figura 61. Estructura del alcaloide nildahillina.

3.3.7. Consideraciones generales

En los espectros UV de los compuestos **CM1**, **CM2**, **CM4**, **CM5** y **CM6** se aprecian máximos de absorción con valores cercanos a 275 nm, característico de los alcaloides morfinandienónicos sustituidos en las posiciones 3 y 4³¹. Las bandas entre los 231 y 243 nm son atribuibles a los grupos cromóforos carbonilos α,β insaturados para cada compuesto¹⁰⁵.

La presencia de bandas de absorción en la región de 1665, 1635 y 1615 cm^{-1} características del sistema ciclohexadienónico (**CM2**) y las observadas en zonas cercanas a 1690 y 1645 cm^{-1} propias de los dihidroderivados (**CM1**, **CM4**, **CM5** y **CM6**) de las morfinandienonas, en los espectros IR de estos cinco alcaloides, refuerza la hipótesis de la existencia de este tipo de esqueleto en estas bases naturales³¹.

En el espectro de RMN ^1H los protones que resuenan entre 2 y 5 ppm corresponden a los protones olefínicos unidos a Csp^3 con sustituyentes que presentan heteroátomos en α (O, N). En los compuestos **CM1**, **CM2** y **CM4**, estos sustituyentes son los grupos OCH_3 y NCH_3 , mientras que para el caso de los N-norderivados (**CM5** y **CM6**) no aparece la señal correspondiente al grupo NCH_3 .

Los protones aromáticos aparecen en los espectros de estos cinco alcaloides entre δ 6 y 8 ppm. En aquellos alcaloides pertenecientes a la serie B/C *trans* 8,14-dihidromorfinandienonas, como

son los casos de **CM1** y **CM5**, la aproximación espacial del grupo hidroxilo del C-4 y del protón olefínico en el C-5 provoca que este último resuene a frecuencias altas, a diferencia de los de la serie B/C *cis* (**CM4** y **CM6**) en los que esta cercanía no existe y por lo tanto, el protón en C-5 aparece a frecuencias más bajas.

Como se puede apreciar en la Tabla XXI, los desplazamientos de la mayoría de los átomos de carbono en las cuatro estructuras son muy similares.

Tabla XXI. Datos de RMN ^{13}C de cuatro de los alcaloides aislados

Carbono	CM1	CM5	CM4	CM6
1	119,5	119,5	118,5	118,6
2	109,2	109,3	109,3	109,6
3	144,8	144,7	145,2	145,5
4	143,2	143,1	144,0	144,1
5	123,7	124,2	126,3	127,4
6	150,9	150,8	148,8	148,5
7	194,5	194,4	193,7	194,3
8	39,4	38,6	39,5	37,1
9	56,7	49,4	56,1	49,4
10	27,8	28,5	23,5	32,5
11	131,3	131,3	129,4	129,3
12	126,3	126,1	124,1	123,9
13	37,9	37,9	37,5	38,3
14	41,1	39,0	43,8	44,6
15	32,2	31,2	36,8	39,2
16	46,8	39,2	47,5	39,5
NCH ₃	42,7	--	42,5	--
3-OCH ₃	56,3	56,2	56,1	56,2
6-OCH ₃	54,8	54,8	54,8	54,9

Las mayores diferencias existen en los carbonos C-5, C-6, C-8, C-9, C10, C-14, C-15 y C-16, que son los que se encuentran más cercanos a los centros estereogénicos principales. La desaparición del grupo metilo sobre el átomo de nitrógeno en los compuestos tipo N nor provoca el apantallamiento de las señales de C-9 y C-16, por pérdida de un sustituyente en posición β .

La diferencia en los valores de desplazamiento químico de los carbonos C-5 y C-6 en las estructuras **CM1** y **CM5** comparadas con las estructuras **CM4** y **CM6** muestra el cambio en la unión de los anillos B y C de *trans* a *cis*.

Por otra parte, las evidencias espectroscópicas en RMN ¹H y en masas, así como los datos físico-químicos del compuesto **CM3** corroboran la presencia de un alcaloide del tipo aporfínico.

3.3.8. Resultados de las pruebas biológicas

3.3.8.1. Ensayo como control de plagas

El extracto etanólico de *C. micradenus* dio un IFD de 78,5 %, valor que indica que se produjo una notable disminución de la alimentación de las larvas de *M. latipes*, coincidiendo con otros autores⁷⁸, lo que puede ser lógico si tenemos en cuenta que en este extracto se concentran los alcaloides presentes en esta especie, incluyendo a la isoboldina, base presente en las hojas de la especie *Cocculus trilobus* L., la cual se reporta con actividad antiapetitiva³⁰, por lo que pudiera ser ella la responsable de dicha acción.

3.4. Comparación de la composición de alcaloides aislados de *C. micradenus* 1 con el CAT de la muestra *C. micradenus* 2 e identificación de los alcaloides ocobotrina, isoboldina, nildahillina y 8,14-dihidrosalutaridina aislados de *C. micradenus* 1 en los crudos de alcaloides de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2

3.4.1. - Comparación de la composición de alcaloides aislados de *C. micradenus* 1 con el CAT de la muestra *C. micradenus* 2, mediante técnicas de CLAE y ESI-IT-MS/MS.

Para llevar a cabo la comparación entre los CAT obtenidos a partir de las hojas y los tallos de las dos muestras de la especie *C. micradenus*, se procedió a realizar los espectros de masas de ambas muestras mediante inyección directa (ESI-IT-MS/MS).

Las huellas espectrales (Fig. 62) obtenidas en modo positivo por esta técnica, muestran similitud en cuanto a los alcaloides con $[M+H]^+$ de m/z 330, 328 y 316 presentes en *C. micradenus* 1 (A) con los de *C. micradenus* 2 (B).

El análisis de los espectros MS^2 y MS^3 de estos iones fragmentos correspondientes al CAT de *C. micradenus* 1 (Fig. 63, 64 y 65), sugieren una correspondencia con los espectros de los patrones ocobotrina y 8,14 dihidrosalutaridina (m/z 330), isoboldina (m/z 328) y nildahillina (m/z 316) aislados previamente de *C. micradenus* por el autor⁷.

En el espectro MS^2 (A) de la figura 63 se observa que a pesar de la diferencia entre esta técnica y la de impacto electrónico, existe coincidencia en el camino de fragmentación de los picos a m/z 315 y 287 correspondientes a $[M+H-CH_3]^+$ y $[M+H-CH_3-CO]^+$, respectivamente. Sin embargo, hay diferencias marcadas en cuanto a la abundancia relativa de los mismos. El ión fragmento a m/z 241 y el pico base a m/z 223 se originan con la pérdida de 59 unidades de masas ($CH_2N^{\bullet+}C_2H_5$) seguido de la pérdida de $[M+H-CH_2N^{\bullet+}C_2H_5-30]^+$ y de $[M+H-CH_2N^{\bullet+}C_2H_5-48]^+$, respectivamente.

Los espectros MS^3 (B) y MS^3 (C) corresponden a la fragmentación de los iones a m/z 315 y 241, respectivamente. En el espectro MS^3 (B), la pérdida de 17 (OH^-) unidades de masas origina el ión fragmente a m/z 298, mientras que los iones a m/z 213 y 209 se originan por la pérdida de CO y CH_3OH a partir del ión fragmento a m/z 241 como se muestra en el espectro MS^3 (C).

El espectro MS^2 (A) de m/z 328 de la figura 64 se corresponde con el espectro obtenido para el patrón isoboldina. En el mismo, se origina el pico a m/z 297 por la pérdida de 31 ($-OCH_3$) unidades de masas a partir del $[M+H]^+$, mientras que a partir de un reordenamiento RDA en el

anillo B se pierde la molécula neutra (CH_2NCH_3) para dar lugar al pico a m/z 285, fragmentaciones que están descritas para esta molécula por impacto electrónico³⁰.

El espectro MS^3 (B) corresponde a la fragmentación del ión a m/z 297, donde el ión fragmento de mayor abundancia a m/z 265 se origina por la pérdida de 32 (CH_3OH) unidades de masas.

El espectro MS^2 (A) de m/z 316 de la figura 65, coincide con el espectro obtenido para el patrón nildahillina. El pico a m/z 298 corresponde a la pérdida de agua a partir del $[\text{M}+\text{H}]^+$; la pérdida sucesiva de 15 ($-\text{CH}_3$) y 17 ($-\text{OH}^-$) unidades de masas dan lugar al ión fragmento a m/z 284, este ión por pérdida de CO origina el pico a m/z 256. Característico de estos compuestos en sus espectros de impacto electrónico³¹ es el ión fragmento que se obtiene por pérdida de la molécula neutra $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$, el cual aparece en este espectro a m/z 178 ($[\text{M}+\text{H}-138]^+$).

Los espectros MS^3 (B) y MS^3 (C) corresponden a la fragmentación de los iones a m/z 284 y 178 respectivamente. En el espectro MS^3 (B), la pérdida de 18 (H_2O) unidades de masas origina el ión fragmento a m/z 266, mientras que los iones a m/z 163, 150 y 146 se originan por la pérdida de $-\text{CH}_3$, CO y CH_3OH , respectivamente a partir del ión fragmento a m/z 178, como se muestra en el espectro MS^3 (C).

Los espectros MS^2 y MS^3 perteneciente a $[\text{M}+\text{H}]^+ = 330, 328$ y 316, obtenidos del análisis del CAT de *C. micradenus 2* resultaron coincidentes con los obtenidos para el *C. micradenus 1*.

Teniendo en cuenta que el estudio de estos espectros no permite diferenciar por esta técnica los isómeros ocobotrina y 8,14 dihidrosalutaridina y que se desea conocer cuáles de los alcaloides identificados en la muestra *C. micradenus 1* están presentes en la muestra *C. micradenus 2*, se decidió recurrir a la técnica CLAE. Para ello se comenzó determinando los

tiempos de retención (Fig. 66) de los patrones de alcaloides obtenidos previamente de *C. micradenus* por el autor⁷.

La figura 67 muestra el cromatograma obtenido para el CAT de *C. micradenus* 1 y los cuatro patrones de alcaloides cuyos tiempos de retención, aparecen descritos anteriormente, observándose coincidencia para todos ellos.

Sin embargo la comparación del cromatograma de la muestra *C. micradenus* 1 con la muestra *C. micradenus* 2 (Fig. 68) a λ 250 nm muestra notables diferencias.

Estas se reflejan en el perfil de los alcaloides entre ambos cromatogramas, pues en la muestra *C. micradenus* 1 recolectada en Buenavista, San Antonio del Sur en 2002 aparecen los alcaloides isoboldina, nildahillina, ocobotrina y 8,14-dihidrosalutaridina, mientras que en la muestra *C. micradenus* 2 recolectada en Mina Yeso, Baitiquirí, San Antonio del Sur en 2012 solo aparecen isoboldina y nildahillina.

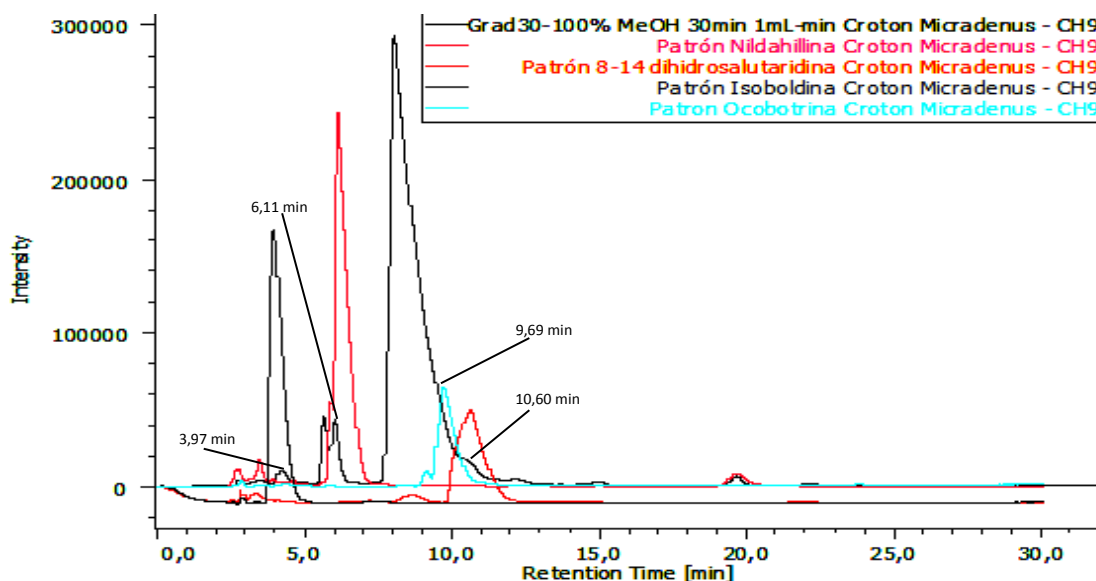
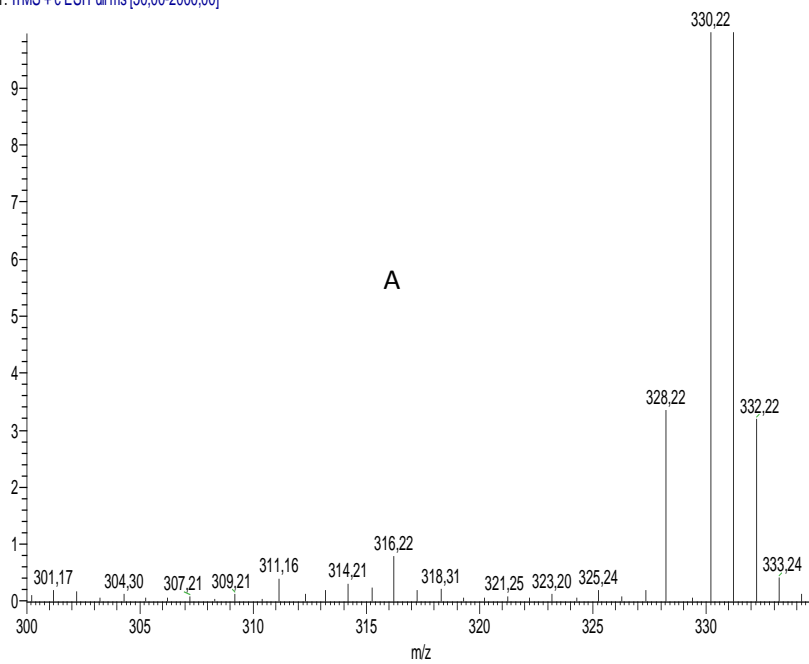


Figura 67. Cromatograma del CAT de *C. micradenus* 2 y los patrones de los alcaloides ocobotrina, isoboldina, nildahillina y 8,14-dihidrosalutaridina

C micradenus Iraida_130722104830 #18-9961 RT: 13,75-49,46 AV: 851 NL: 7,67E6
 T: ITMS + c ESI Full ms [50,00-2000,00]



C micradenus A Iraida_130722104830 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 4,64E6
 T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

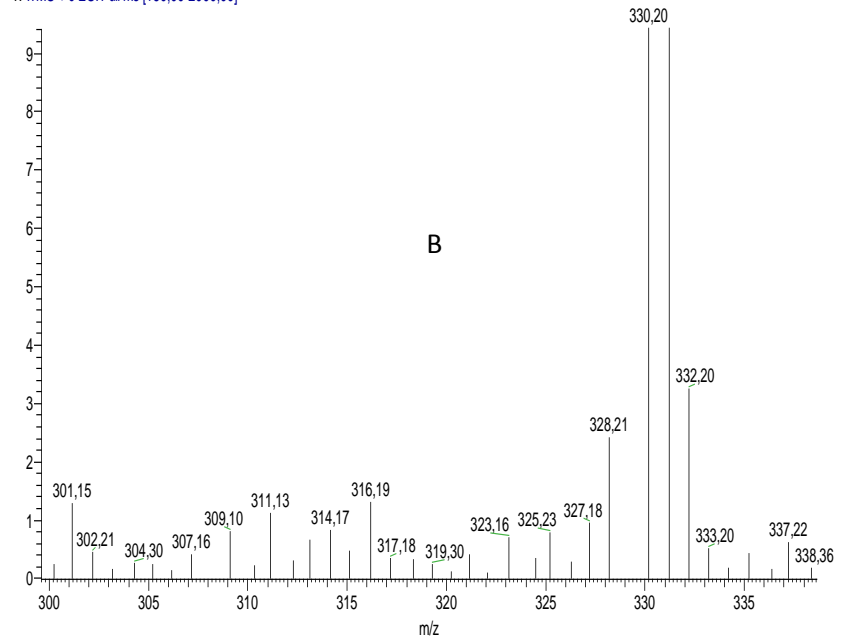
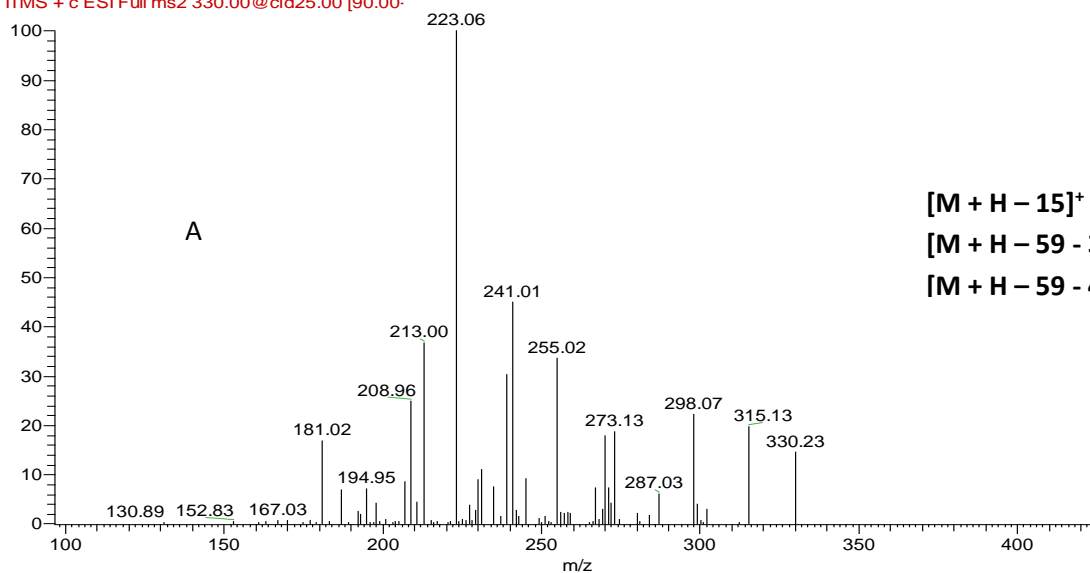


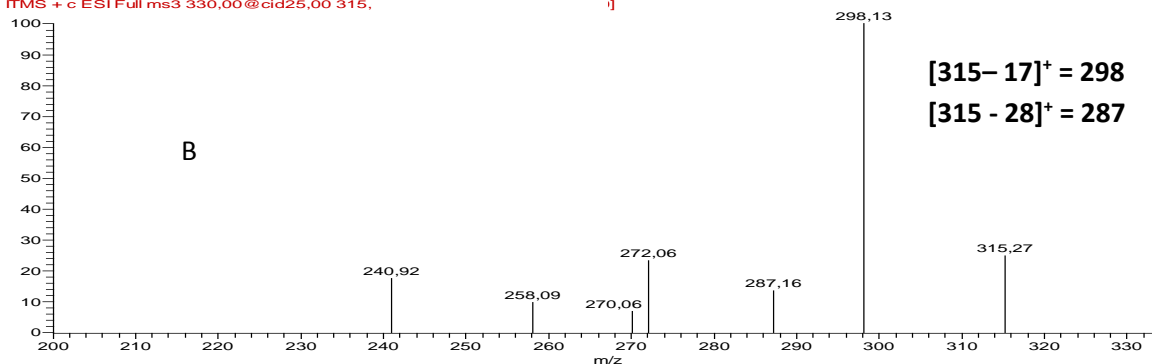
Fig. 62. Huellas espectrales en modo positivo obtenidas mediante inyección directa (ESI-IT-MS/MS) para los crudos de alcaloides de *C. micradenus* 1 (A) y *C. micradenus* 2 (B).

C micradenus Iraida_130722104830 #1756 RT: 9.15 AV: 1 NL: 8.84E5
 F: ITMS + c ESI Full ms2 330.00@cid25.00 [90.00-



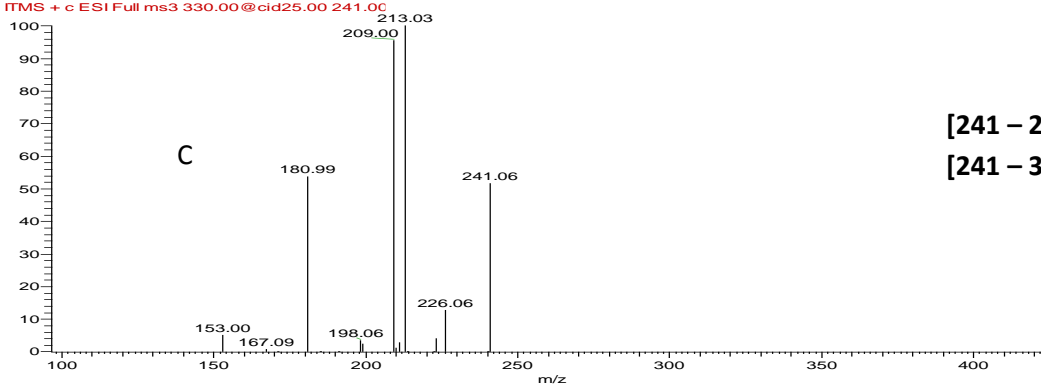
$[M + H - 15]^+ = 315$
 $[M + H - 59 - 30]^+ = 241$
 $[M + H - 59 - 48]^+ = 223$

C micradenus Iraida_130722104830 #1633 RT: 8.49 AV: 1 NL: 6.05E4
 F: ITMS + c ESI Full ms3 330.00@cid25.00 315,



$[315 - 17]^+ = 298$
 $[315 - 28]^+ = 287$

C micradenus Iraida_130722104830 #1108-1474 RT: 6.28-6.74 AV: 84 NL: 1.25E5
 F: ITMS + c ESI Full ms3 330.00@cid25.00 241.00



$[241 - 28]^+ = 213$
 $[241 - 32]^+ = 209$

Figura 63. Espectros MS² (A), MS³ (B) y MS³ (C) perteneciente al $[M+H]^+ = 330$ del CAT de *C. micradenus* 1.

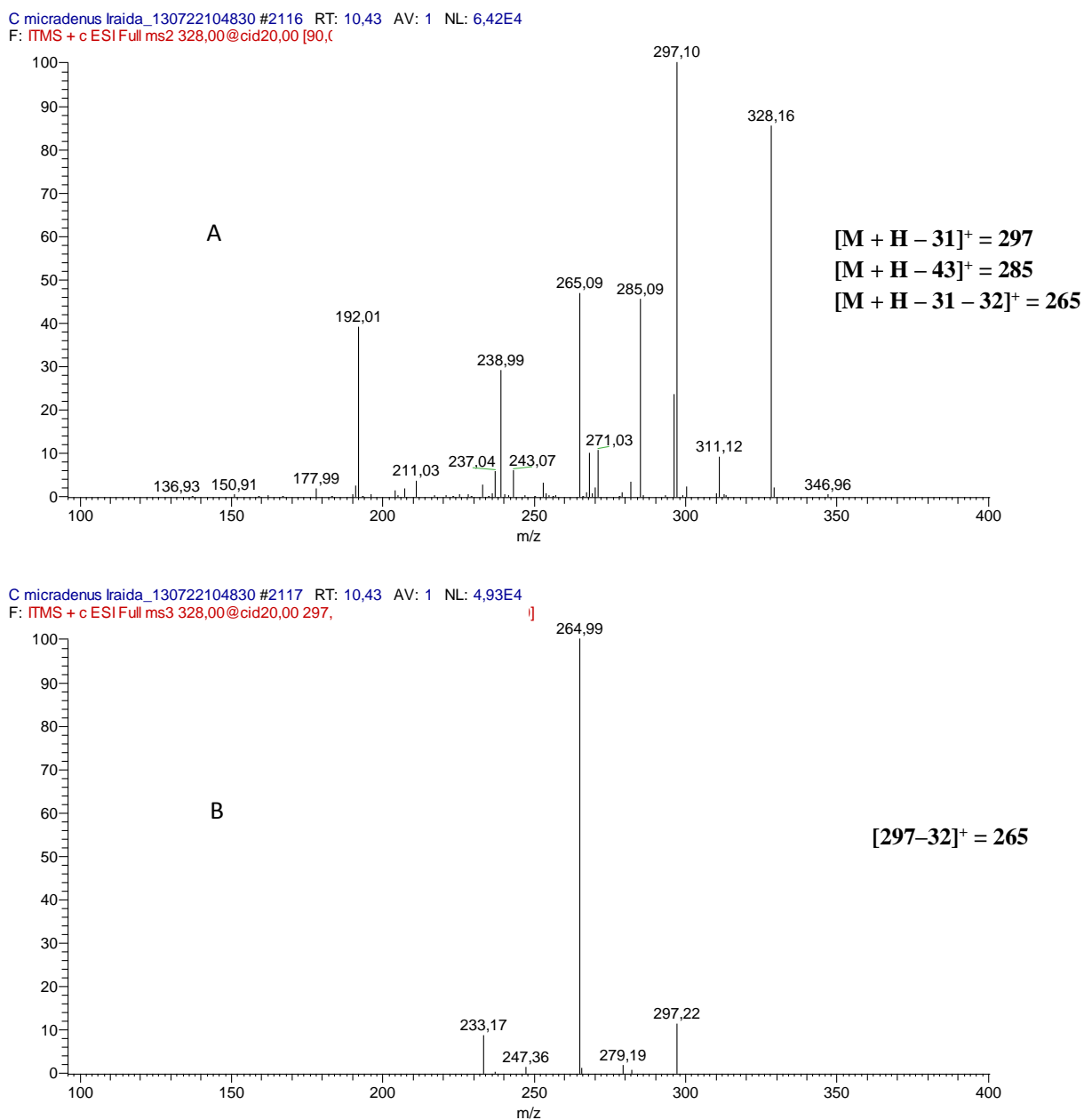
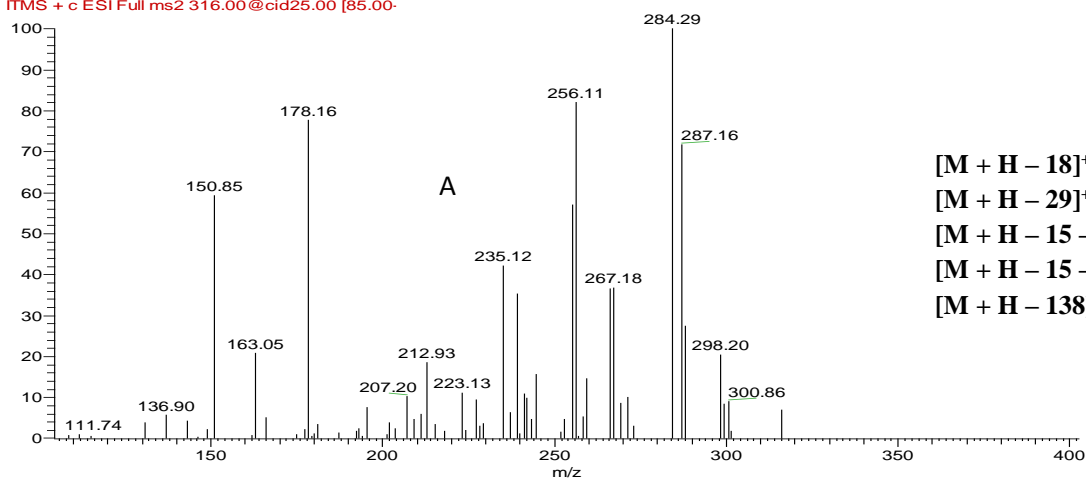


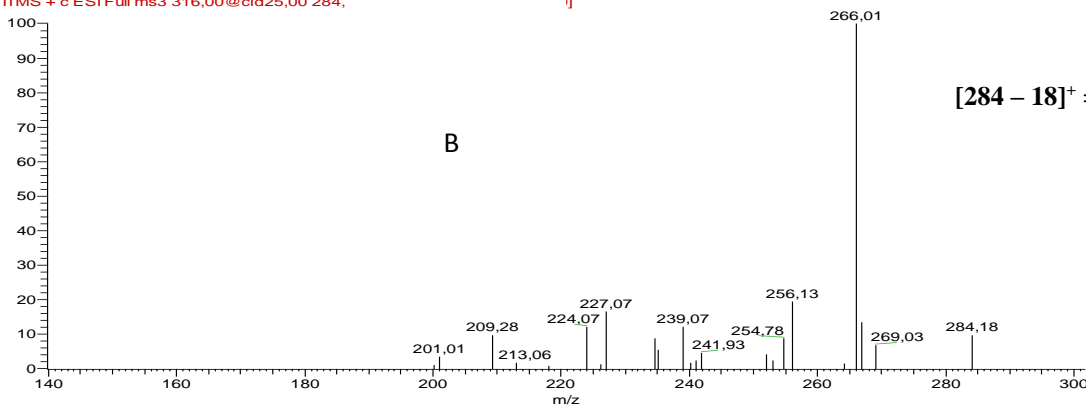
Figura 64. Espectros MS² (A) y MS³ (B) perteneciente al [M+H]⁺ = 328 del CAT de *C. micradenus* 1.

C micradenus Iraida_130722104830 #3945 RT: 19.40 AV: 1 NL: 2.38E3
 F: ITMS + c ESI Full ms2 316.00@cid25.00 [85.00-



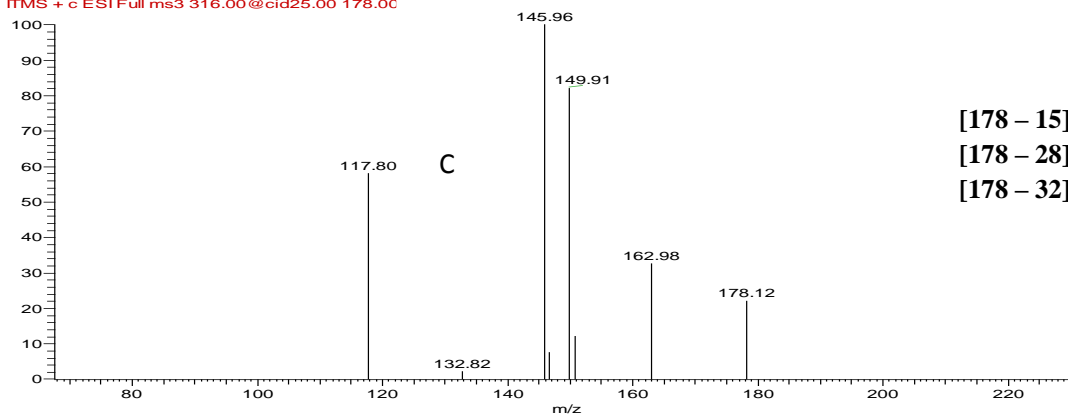
$[M + H - 18]^+ = 298$
 $[M + H - 29]^+ = 287$
 $[M + H - 15 - 17]^+ = 284$
 $[M + H - 15 - 17 - 28]^+ = 256$
 $[M + H - 138]^+ = 178$

C micradenus Iraida_130722104830 #4799 RT: 23.60 AV: 1 NL: 5.04E3
 F: ITMS + c ESI Full ms3 316.00@cid25.00 284,



$[284 - 18]^+ = 266$

C micradenus Iraida_130722104830 #5360 RT: 26.68 AV: 1 NL: 5.31E2
 F: ITMS + c ESI Full ms3 316.00@cid25.00 178.00



$[178 - 15]^+ = 163$
 $[178 - 28]^+ = 150$
 $[178 - 32]^+ = 146$

Figura 65. Espectros MS² (A), MS³ (B) y MS³ (C) perteneciente al [M+H]⁺ = 316 del CAT de *C. micradenus* 1.

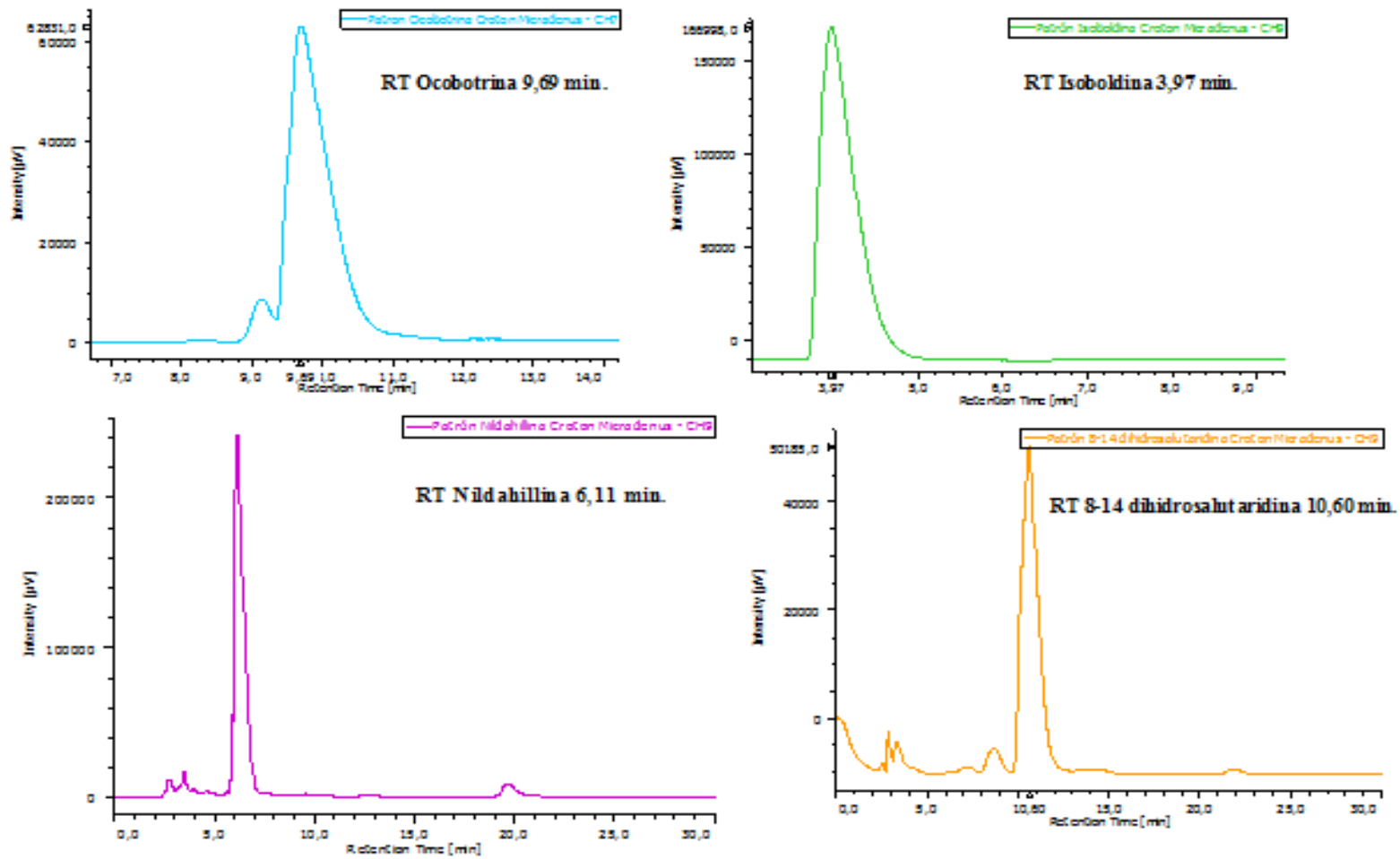


Figura 66. Tiempos de retención a λ 250 nm de los alcaloides patrones obtenidos previamente por el autor⁷.

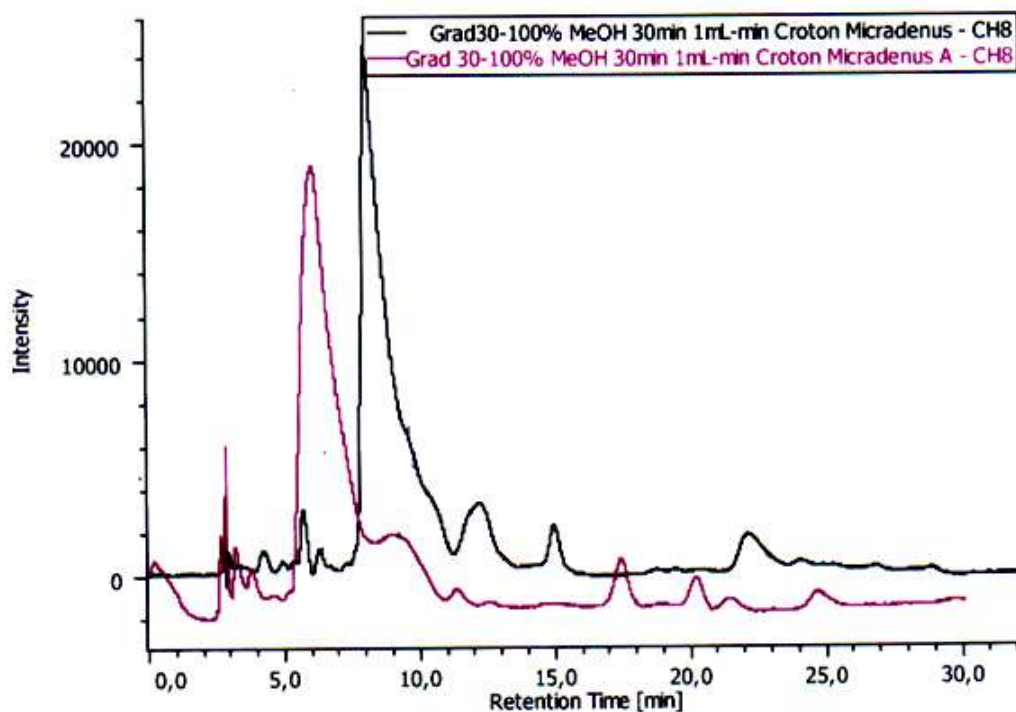


Figura 68. Comparación del cromatograma de *C. micradenus 1* con *C. micradenus 2*

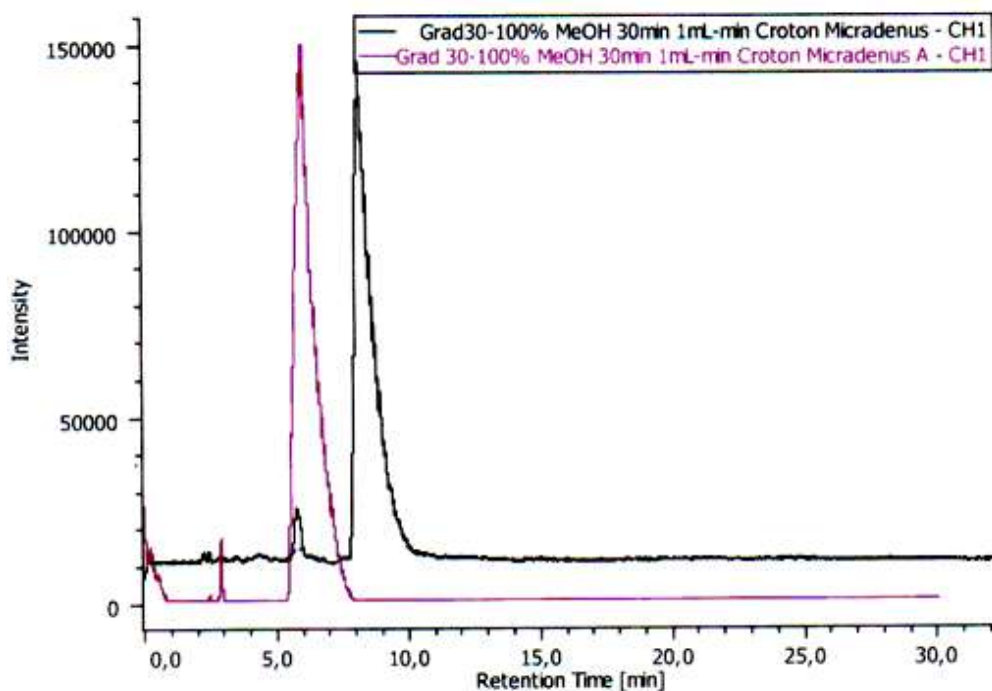


Figura 69. Cromatograma comparativo de *C. micradenus 1* y *C. micradenus 2*, utilizando como detector ELS

La figura 69 se corresponde con el cromatograma para ambas muestras de *Croton*, utilizando como detector ELS, donde se aprecia que en *C. micradenus 2* el alcaloide mayoritario es nildahillina, reportado por primera vez en este documento, a diferencia de la muestra de *C. micradenus 1* donde el mayoritario resulta ser ocobotrina, coincidiendo con lo reportado por el autor⁷ para una muestra de la especie recolectada en 1986 en Buenavista, San Antonio del Sur. Este comportamiento pudiera ser lógico si tenemos en cuenta que entre ambas muestras existen diferencias en cuanto a la zona y fecha de recolecta, además de factores ecológicos (Tabla. XXII) que afectan la composición cuantitativa y cualitativa de los metabolitos secundarios de la planta. Nehme y col.¹⁰⁶ encontraron variabilidad química en poblaciones de *Cryptocarya mandioccana* Meisner usando los perfiles cromatográficos de los flavonoides glicosidados y estilpironas presentes en las hojas de árboles de tres sitios en el bosque lluvioso del Atlántico en el Estado de Sao Paulo- Brasil. Los perfiles de flavonoides de las hojas de todos los árboles fueron similares. Sin embargo, reconocieron cuatro quimiotipos por las diferencias cualitativas y cuantitativas con relación a la presencia de estilpironal. Los quimiotipos con niveles más altos de estilpironas eran más frecuentes en las regiones del sur, con suelos con altos contenidos de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺. Por lo que plantean que el suelo y el clima podrían indicar una influencia genética o medioambiental en la presencia de estilpironas en las hojas de *C. mandioccana*.

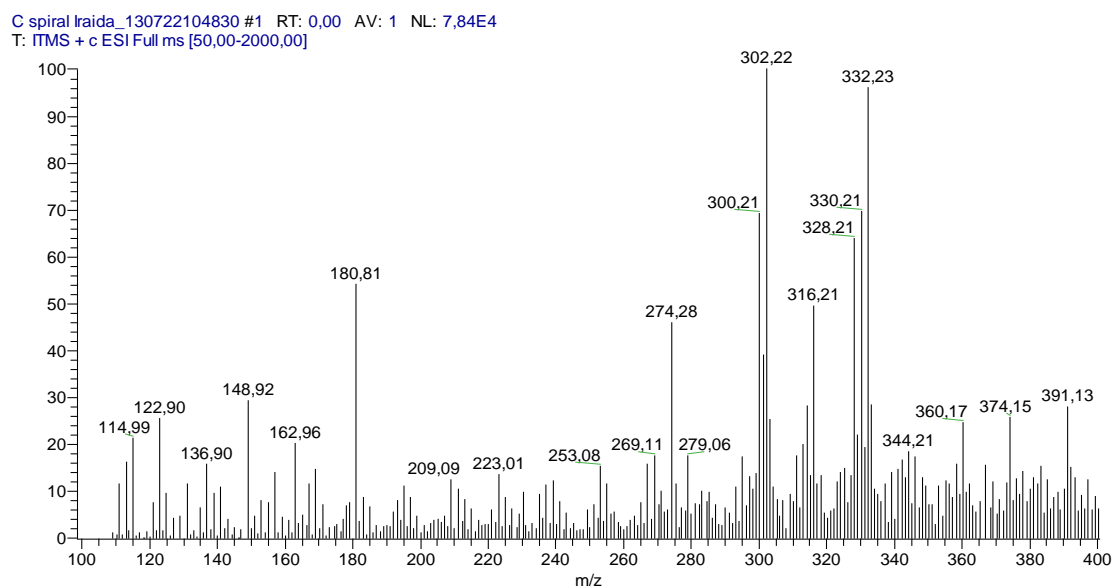
Tabla XXII.- Factores ecológicos de las localidades muestreadas en los dos años de recolectas

Factor	Buenavista 2002	Baitiquirí 2012
Estadio	Partes aéreas completas de plantas adultas	Ramas jóvenes mayormente, de plantas adultas
Sustrato	Suelo y roca	Cantera extracción de yeso
Exposición al sol	Totalmente expuestas	Totalmente expuestas
Influencia de la salinidad (distancia de la costa)	Entre 1,5 y 2 Km. Barlovento (Ladera norte)	Entre 3,5 y 4 Km. Sotavento (Ladera sur)

Temperatura	27.2 °C	27.7 °C
Influencias ambientales y antrópicas (fenómenos meteorológicos, extrema sequía, incendios, tala, chivos pastando, etc.)	Menos antropisado	Muy antropisado
Altura sobre el nivel del mar	Menos de 350 msnm	Entre 120 y 170 msnm

3.4.2. Identificación de los alcaloides ocobotrina, isoboldina, nildahillina y 8,14-dihidrosalutaridina aislados de *C. micradenus 1* en los CAT de *C. myricifolius 2* y *C. spiralis 2*, mediante técnicas de CLAE y ESI-IT-MS/MS.

La figura 70 representa los espectros de iones totales obtenidos para los CAT de *C. myricifolius* y *C. spiralis*. Las huellas espectrales indican que la diferencia en la composición cualitativa entre ambos crudos es alta en cuanto al contenido de metabolitos y también con las de los crudos del *C. micradenus 1* y *C. micradenus 2*.



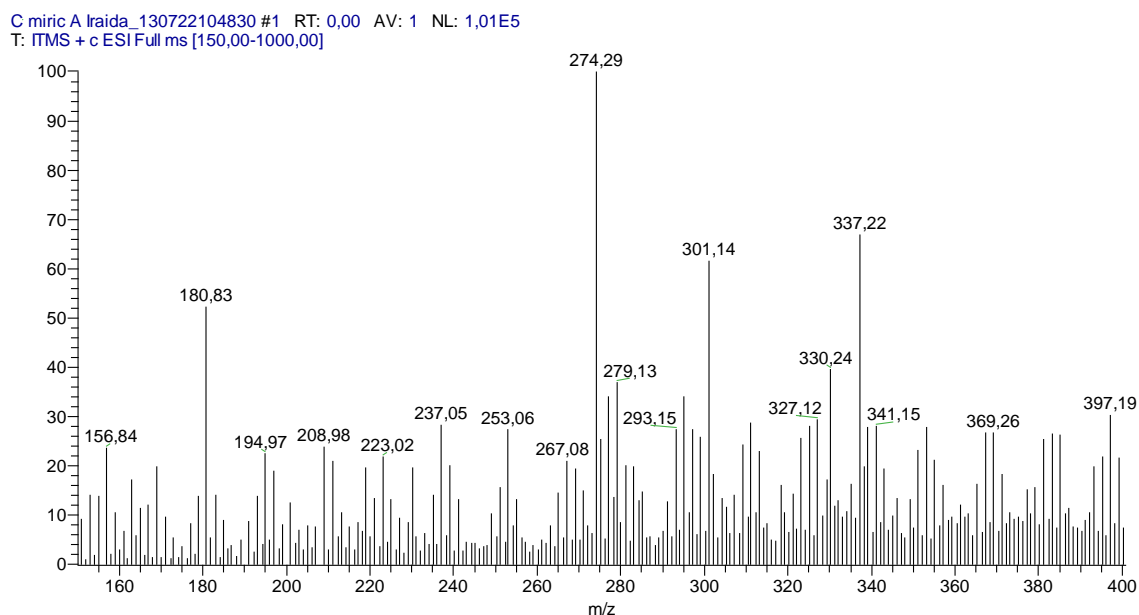


Figura 70. Huellas espectrales en modo positivo obtenidas mediante inyección directa (ESI-IT-MS/MS) para los CAT de *C. spiralis 2* y *C. myricifolius 2*.

Por tal motivo realizamos el análisis de los espectros MS^2 para los iones $[M+H]^+ = 330, 328$ y 316 unidades de masas para el CAT de *C. spiralis 2*, para determinar cuáles de los alcaloides aislados anteriormente de la especie de *C. micradenus* se encontraban en este crudo.

El espectro *tandem* del *C. spiralis 2* (Fig. 71) sugieren la presencia de los alcaloides ocobotrina y/o 8,14 dihidrosalutaridina (m/z 330), isoboldina (m/z 328) y nildahillina (m/z 316), mientras que el MS^2 del ión $[M+H]^+ = 330$ unidades de masas de *C. myricifolius 2* (Fig.72) no coincide ni con ocobotrina ni con 8, 14 dihidrosalutaridina.

C spiral traida_130722104830 #5569 RT: 27,26 AV: 1 NL: 2,40E1
 T: ITMS + c ESI Full ms2 330,00@cid20,00 [90,00-2000,00]

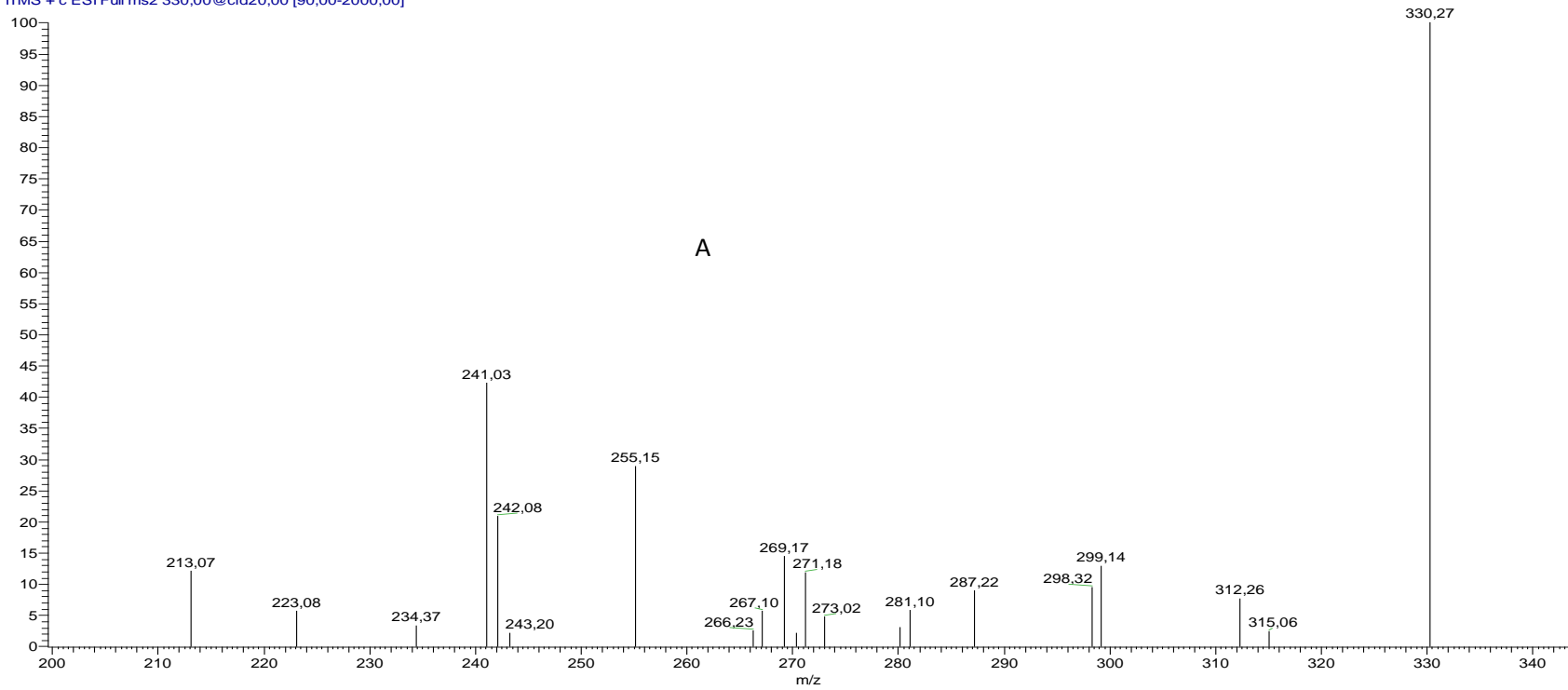


Figura 71 (A). Espectros MS² para los iones fragmentos m/z 330 (A) del espectro *tandem* del CAT de *C. spiralis*

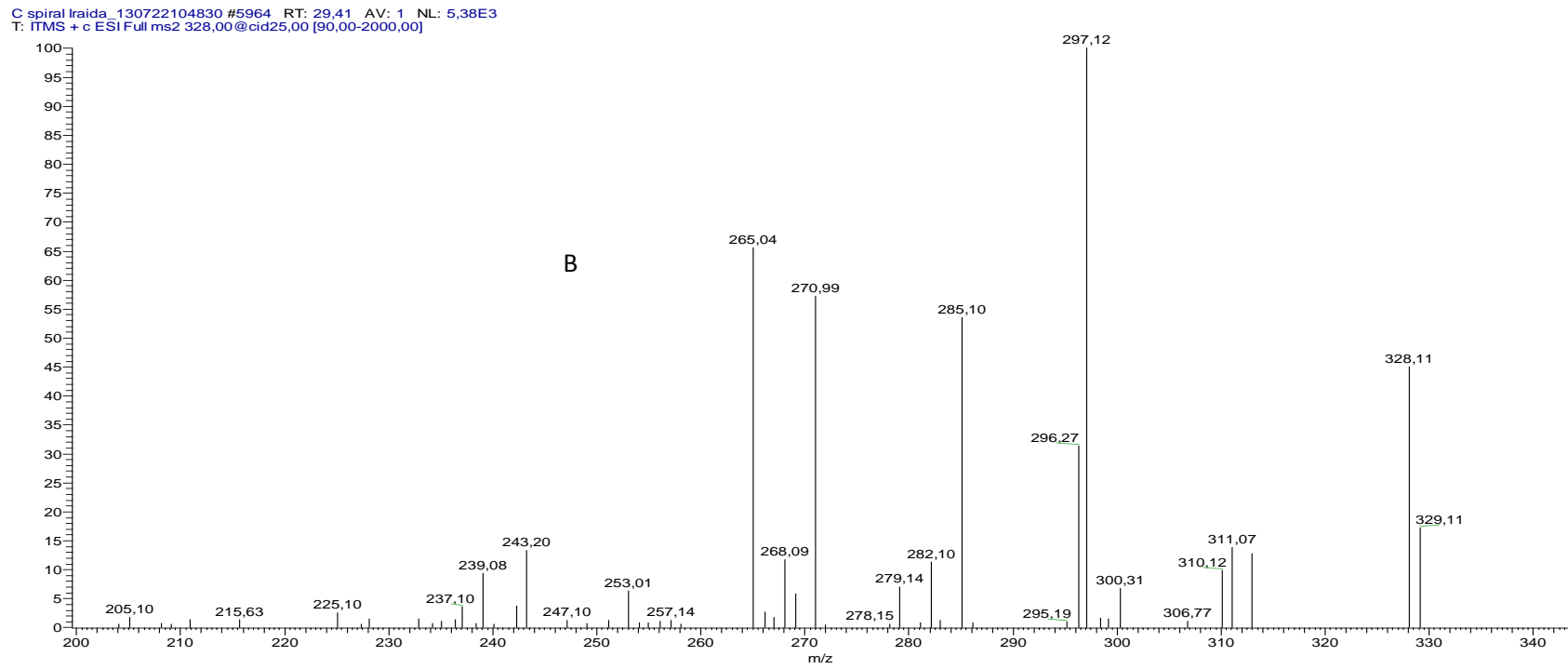


Figura 71 (B). Espectros MS² para los iones fragmentos m/z 328 (B) del espectro *tandem* del CAT de *C. spiralis*

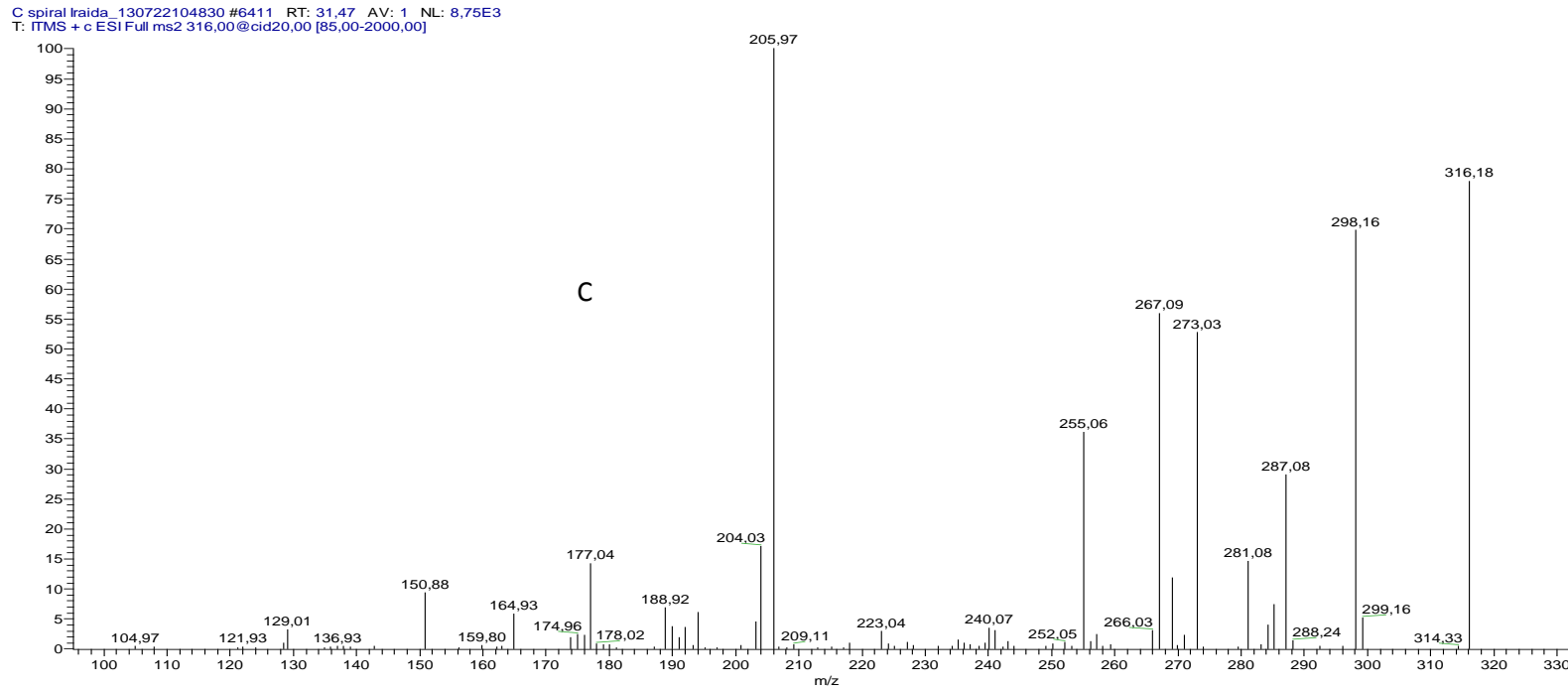


Figura 71 (C). Espectros MS² para los iones fragmentos m/z 316 (C) del espectro *tandem* del CAT de *C. spiralis*

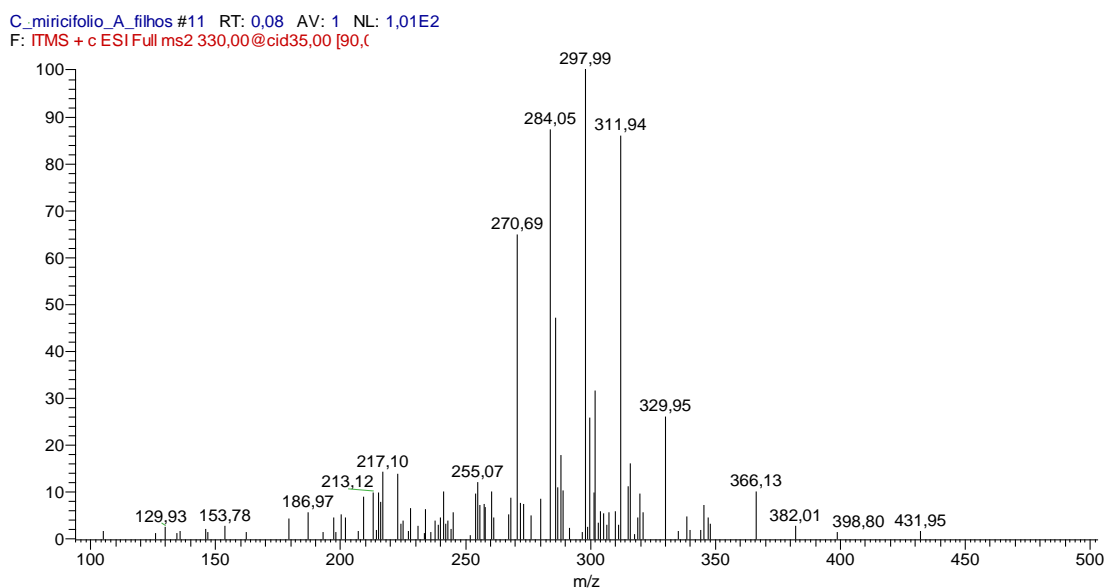
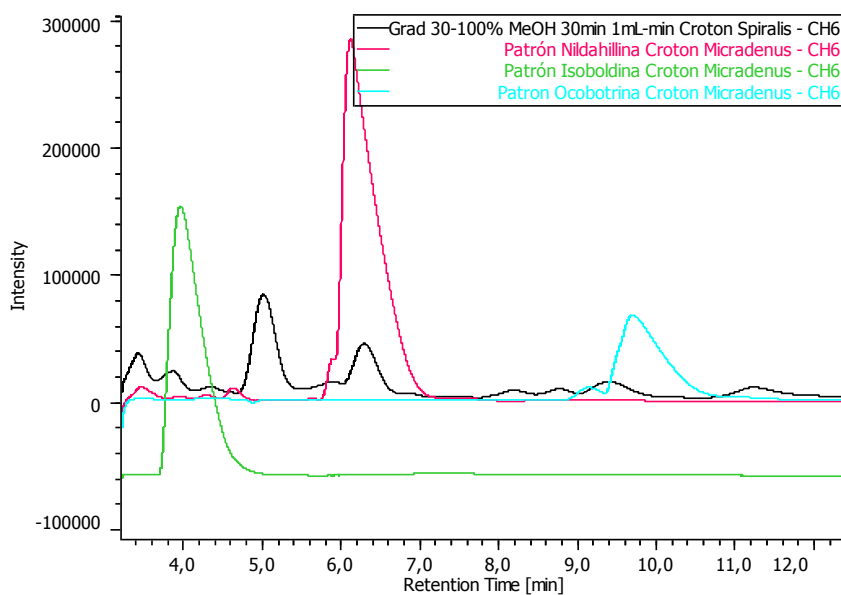


Figura 72. Espectro MS² del ión [M+H]⁺ = 330 unidades de masas de *C. myricifolius* 2.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos emplear la metodología CLAE para ambos crudos (*C. spiralis* 2 y *C. myricifolius* 2) y además comparar con patrones de los alcaloides aislados previamente⁷ (Fig. 73).



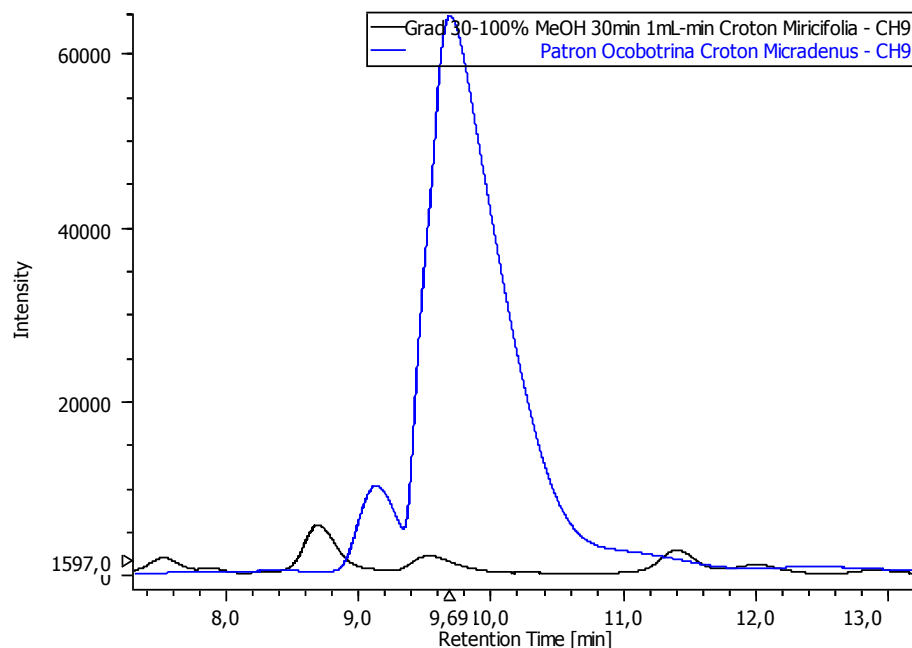
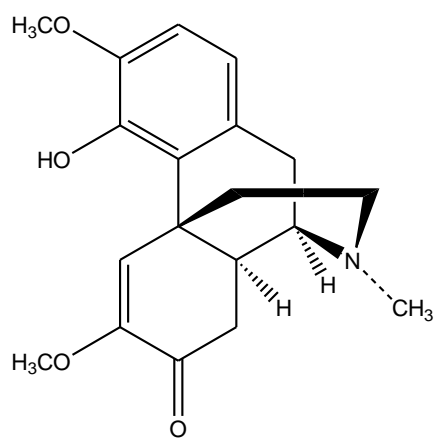


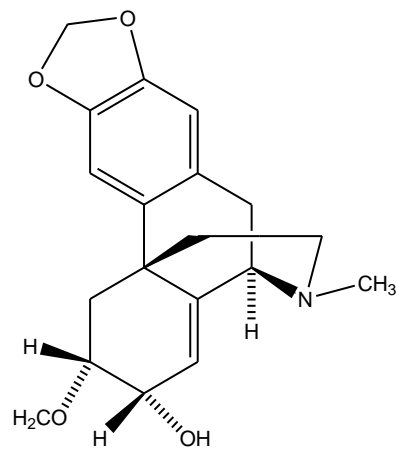
Figura 73. Comparación de los cromatogramas obtenidos a $\lambda = 250$ nm para los CAT de *C. spiralis 2* y *C. myricifolius 2* con patrones.

Estos resultados confirman la presencia de los alcaloides isoboldina y nildahillina en *C. spiralis 2* y demuestra que analizando los tR de los patrones en la especie *C. myricifolius 2* no están presentes ni la ocobotrina (tR = 9,69 min) ni la 8,14-dihidrosalutaridina (tR = 10,60 min).

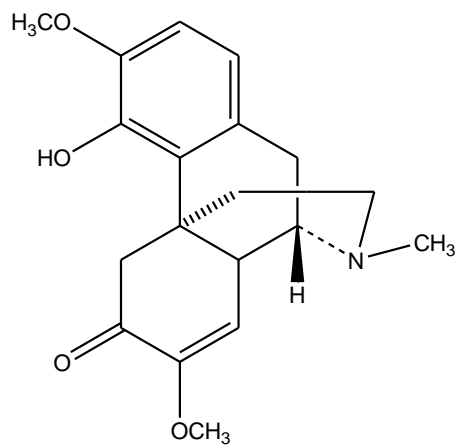
Teniendo en cuenta lo planteado, el alcaloide con $[M+H]^+ = 330$ unidades de masas de *C. myricifolius 2*, pudiera ser una de las estructuras que se presentan en la figura 74. Estos alcaloides han sido aislado de diferentes especies.



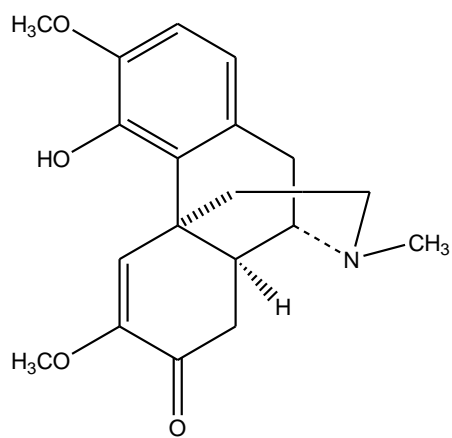
Milonina



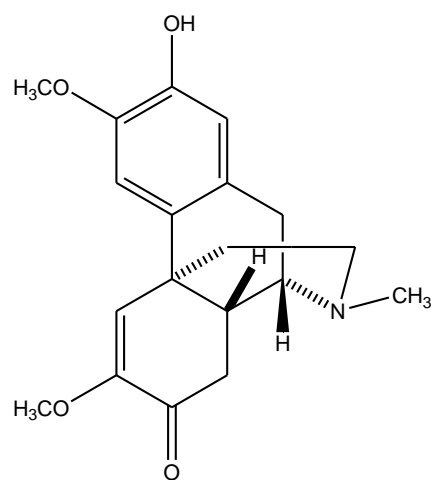
Dihidronudarina



Sinomenina



Isosinomenina



Pallidina

Figura 74. Ejemplos de alcaloide con $[M+H]^+ = 330$ unidades de masas

Dada la diversidad de estructuras de alcaloides con $[M+H]^+ = 330$ unidades de masas conocidas, en este caso particular del CAT de la especie *C. myricifolius 2*, pudieramos estar en presencia de algunos de estos alcaloides aislados de especies de varios géneros, incluido el género *Croton*. El alcaloide milonina, aislado de *Cissampelos sympodialis* L. de la familia Menispermaceae¹⁰⁵; dihidronudarina, aislado de tres especies del género *Papaver*³¹, pallidina de *Ocotea acutangula* Mez.³¹ y por último la sinomenina e isosinomenina aisladas de *Croton stenophyllus* Griseb.⁹⁴.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se determinó la composición de los aceites esenciales de las tres especies, identificando 153 compuestos de 160, linalol y α -pineno (*C. micradenus* 1), borneol, óxido de cariofileno y acetato de bornilo (*C. myricifolius* 1), así como α -bisabolol, (*E*)- γ -atlantona, espatulenol, β -pineno, 4-acetil-1-metilciclohexeno y β -cariofileno (*C. spiralis* 1) mayoritarios en ellas.
- Se determinó la composición química de PCMH I y los extractos hexánicos, identificando 64 compuestos de 81, entre ellos los alcoholes 1-octacosanol, 1-hexacosanol y triacontanol, los ácidos triacontanoico y palmítico, mayoritarios en las tres especies.
- Se destaca la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las tres especies y del PCMH I de *C. micradenus* 2, así como de los extractos hexánicos de *C. myricifolius* 2 y *C. spiralis* 2, frente a *S. aureus*.
- Se identificaron en la especie *C. micradenus* 1 dos alcaloides novedosos con esqueleto morfínandienónico (norocobotrina y nildahillina) y cuatro conocidos (ocobotrina, sinoacutina, 8,14 dihidrosalutaridina e isoboldina), mediante técnicas espectroscópicas.
- El extracto etanólico de las hojas y tallos de *C. micradenus* 2 posee actividad antialimentaria frente a *Mocis latipes* L., atribuido a la presencia de metabolitos bioactivos, fundamentalmente alcaloides.
- Se encontró diferencia en los perfiles de alcaloides entre *C. micradenus* 1 y *C. micradenus* 2, recolectadas en diferentes fechas y localidades, así como la presencia de los alcaloides isoboldina y nildahillina en *C. spiralis* 2, mientras que para *C. myricifolius* 2 no se detectan ocobotrina ni 8, 14 dihidrosalutaridina, al comparar mediante técnicas de CLAE y ESI-IT-MS/MS.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de dinámica de acumulación con el objetivo de conocer la composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales y diferentes extractos de las tres especies.
- Realizar ensayos biológicos, dirigidos a pruebas antitumorales, de los dos alcaloides novedosos para la ciencia: norocobotrina y nildahillina.
- Continuar los estudios de identificación de metabolitos secundarios en *C. micradenus*, *C. myricifolius* y *C. spiralis*, mediante técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) y de Inyección Directa con Ionización por Electronebulización Trampa de Iones y Análisis Espectral de Masas en *Tandem* (ESI-IT-MS/MS).

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CITMA (Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba (2014): V Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. La Habana. Cuba. 353 pp.
2. Jimenez, L. C. y Bernal, H. Y. (1992): “El Inchi”. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello (Programa de Recursos Vegetales del Convenio Andrés Bello: PREVECAB). SantaFé de Bogotá, D.C., 2^{da} ed., pp. 101-129.
3. Acevedo-Rodríguez, P. y Strong, M. T. (2012): Catalogue of Seed Plants of the West Indies. Smithsonian Institution Scholarly Press. Washington D.C., 1193 pp.
4. Greinge, M. y Ahmed, S. (1988): Handbook of Plants with Pest- Control Properties. John Wiley&Sons, New York, 470 pp.
5. NAPRALERT DATABASE. (2013).
6. Sánchez, V.; Sandoval, D.; Herrera, P. y Oquendo, M. (1982): Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* L. I. Estudio químico preliminar. Rev. Cub. Farm. 16: 39-44.
7. Payo, A.; Sandoval, D.; Vélez, H. y Oquendo, M. (2001): Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* L. III. Contribución al estudio químico de *C. micradenus* Urb. Rev. Cub. Farm. 35 (1):61-65.
8. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. e Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
9. Shaaban, H. A. E.; El-Ghorab, A. H. y Shibamoto, T. (2012): Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. J. Essent. Oil Res. 24 (2): 203-212.

10. Matias, E. F. F.; Santos, K. K. A.; Costa, J. G. M. H. y Coutinho, D. M. (2010): Light enhanced antibiotic activity of Brazilian medical plants (*Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. and *Cordia verbenaceae* DC.). *Asian Biom.* 4 (1): 183-186.
11. Sarojini, D. N.; Mani, J. and Venkata, R. R. R. (2011): In vitro antimicrobial activity and phytochemical constituents of *Croton scabiosus* Bedd. *Int. J. Pharm. Rem. Des.* 3 (6): 149-154.
12. Gudrum, U. M.; Panek, D.; Zeitler, H.; Vetter, H. y Wagner, H. (2010): Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J. Exp. Biol.* 48: 208-219.
13. Gobbo-Neto, L. y Lopes, N. P. (2007): Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* 30, 374-381.
14. Oviedo, R. (2014): Comunicación personal. Instituto de Ecología y Sistemática. La Habana.
15. Borhidi, A. (1996): *Phytogeography and Vegetation Ecology of Cuba*. Janus Pannonius University. Pécs, Hungary. Akademiai Kiado, Budapest, 543 pp.
16. Vales, M. A.; Álvarez, A.; Montes, L. y Ávila, A. (1998): *Estudio Nacional sobre la Diversidad Biológica de la República de Cuba*. Cesyta, Madrid, 1^{ra}ed., 488 pp.
17. Fuentes, V. (1987): *Las plantas medicinales en Cuba*. Tesis presentada en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas. La Habana, 159 pp.
18. Heywood, V. H. (1993): *Flowering plants of the World*. Oxford University Press, New York, pp. 185-187.
19. Webster, G.L. (1994): Sinopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Botanical Garden.* 81, 144 pp.

20. Liogier, A. H. (1953): Contribuciones Ocasionales del Museo de Historia Natural del “Colegio La Salle”. Instituto Cubano del Libro, La Habana, Vol. 3: 38-139.
21. Rizk, A.-F. M. (1987): The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. Bot. J. Linnean Soc. 94: 293-326.
22. Correa, J. E. y Bernal, H. Y. (1992): Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello (PREVEECAB). Tomo VII, SantaFé de Bogotá, D.C., pp. 314-332.
23. Roig, J. T. (1974): Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica, Instituto Cubano del Libro, La Habana. 2^{da} edición, 939 pp.
24. Seoane, J. (1984): El Folclor Médico de Cuba. Provincia Camagüey. Etnología. Editorial de Ciencias Sociales, La Habana, 896 pp.
25. Arenas, C. (1984): Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas: Una alternativa por explotar. Tesis presentada en opción al título de Biólogo. México, D. F., 161 pp.
26. Gomero, L. (1994): Plantas para Proteger Cultivos (Tecnología para controlar plagas y enfermedades). Lima, pp. 3-26.
27. Stoll, G. (1989): Protección natural de cultivos con recursos provenientes de las granjas en las zonas tropicales y subtropicales. Margraf. Alemania, 118 pp.
28. Salatino, A.; Faria Salatino, M. L. y Negri, G. (2007): Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Review. J. Braz. Chem. Soc. 18 (1).
29. Amaral, A.C. y Barnes, R.A. (1998): A tetrahydropyrorberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. Phytochem. 47 (7): 1445-1447.
30. Shamma, M. (1972): The Isoquinoline Alkaloids (Chemistry and Pharmacology). Academic Press, New York and London, pp. 195-225.

31. Blasko, G. y Cordell, G. (1988): Morphinandienone Alkaloids. *Heterocycles* 27 (5): 1269-1300.
32. Martínez A. (2003): Aceites Esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Medellín.
33. Magalhães, P. J. C.; Criddle, D. N.; Tavares, R. A.; Melo, E. M.; Mota, T. L. y Leal-Cardoso, J. H. (1998): Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Phytother. Res.*12: 172.
34. Oliveira, A. C.; Leal-Cardoso, J. H.; Santos, C. F.; Morais, S. M. y Coelho-de-Souza, A. N. (2001): Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. *Braz. J. Med. Biol. Res.*34: 1471.
35. Batatinha, M. J. M.; Souza-Spinosa, H. y Bernardi, M. M.. (1995): *Croton zehntneri*: Possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *J. Ethnopharmacology*, 45 (1): 53-57.
36. Ciccio, J. F. y Segnini, M. (2002): [Essential oil composition of four Croton species from Madagascar and their chemotaxonomy](#). *J. Essent. Oil Res.* 14: 357.
37. Heluani, C. S.; Catalan, C. A. N.; Hernandez, L. R.; Burgueno-Tapia, E. y Joseph-Nathan, P. (2000): Three new diterpenoids based on the novel sarcopetalane skeleton from *Croton sarcopetalus*. *J. Nat. Prod.* 63, 222.
38. Suárez, A. I.; Vasquez, L. J.; Manzano, M. A. y Compagnone, R. S. (2005): Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. *Flavour Fragr. J.* 20: 611–614.
39. Hiruma-Lima, C.A.; Gracioso, J.S.; Nunes, D.S. y Souza-Brito, A.R.M. (1999): Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 341-346.

40. Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Sá Sobrinho, A.F. y Pereira, M.V.G. (2000): Linalool-rich essential oil from leaves of *Croton cajucara* Benth. *J. Essent. Oil Res.* 12: 705-708.
41. Rosa, M. D. S.; Mendonca, R. R.; Bizzo, H. R.; Rodrigues, I. D.; Soares, R. M. A.; Souto-Padron, T.; Alviano, C. S. y Lopes, A. H. C. S. (2003): Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1895-1901.
42. Alviano, W.S.; Mendonça-Filho, R.R.; Alviano, D.S.; Bizzo, H.R.; Souto-Padrón, T.; Rodrigues, M.L.; Bolognese, A.M.; Alviano, C.S. y Souza, M.M.G. (2005): Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 20: 101-105.
43. Agnani, H.; Akagah, A.; Mounzeo, H.; Menut, C. y Bessiere, J.M. (2005): Aromatic plants of tropical central Africa XLI. Volatile constituents of *Croton oligandrum* Pierre ex Hutch growing in Gabon. *J. Essent. Oil Res.* 17: 201-205.
44. Martins, A. P.; Salgueiro, L. R.; Gonçalves, M. J.; Vila, R.; Tomi, F.; Adzet, T.; da Cunha, A. P.; Cañigüeral, S. y Casanova, J. (2000): Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*, an endemic species from S. Tomé e Príncipe. *Planta Med.* 66 (7): 647-50.
45. Lopes, D.; Bizzo, H. R.; Sobrinho, A. F. S. y Pereira, M. V. G. (2003): Essential Oil from Leaves of *Croton sacaquinha* Benth. *J. Essent. Oil Res.* 15: 48-49.
46. Dourado, R. C. M. y Silveira, E. R. (2005): Preliminary Investigation on the Volatile Constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, Plant Part and Harvest Time Variation. *J. Essent. Oil Res.* 17; 36–40.

47. Murillo, R. M.; Jakupovic, J.; Rivera, J. y Castro, V. H. (2001): Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 49: 259-264.
48. Catalán, C. A. N.; Heluani, C. S.; Kotowicz, C.; Gedris, T.E. y Herz, W. (2003): A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. *Phytochemistry* 64: 625-629.
49. Palmeira, S. F.; Moura, F. D.; Alves, V. D.; De Oliveira, F. M.; Bento, E. S.; Conserva, L. M. y Andrade, E. H. D. (2004): Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. *Flavour Fragr. J.* 19: 69-71.
50. Aguilar-Guadarrama A. B. y Rios, M. Y. (2004): Three new sesquiterpenes from *Croton arboreous*. *J Nat. Prod.* 67 (5): 914-7.
51. Meccia, G.; Rojas, L. B.; Rosquete, C. y San Feliciano, A. (2000): Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. *Flavour Fragr. J.* 15: 144–146.
52. Block, S., Flamini, G., Brkic, D., Morelli, I., Quetin–Leclercq, J. (2006): Analysis of the essential oil from leaves of *Croton zambesicus* Muell. Arg. growing in Benin. *Flavour Fragr. J.* 21: 222–226.
53. Murillo, R. M.; Jakupovic, J.; Rivera, V. y Castro, V. H. (2001): Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 49(1): 259-264.
54. Barbosa, P.R.; Fascio, M. y [Martins](#), D. (2003): Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 307.
55. Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Brabo, S. N.; Silva, M. N.; Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 1998, 49, 823.
56. Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Arruda, A. C.; Pamplona, S. G. S. R.; Vanderlinde, F. A.; Lapa, A. J.; Echevarria, A.; Grynberg, N. F.; Cólus, I. M. S.; Farias, R. A. F.; Costa, A.

- M. L. y Rao, V. S. N. (2000): Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. J. Ethnopharmacol. 70: 41.
57. Peres, M. T. L. P.; Delle Monache, F.; Bella Cruz, A.; Pizzolatti, M. G. y Yunes, R. A. (1997): Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol. 56: 223.
58. Peres, M. T. L. P.; Delle Monache, F.; Pizzolatti, M. G.; Santos, A. R. S.; Beirith, A.; Calixto, J. B. y Yunes, R. A. (1998): Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. Phytother. Res. 12 (3): 209-211.
59. Catalán, C. A. N.; Heluani, C. S.; Kotowicz, C.; Gedris, T. E. y Herz, W. (2003): A linear sesterterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. Phytochemistry. 64: 625-632.
60. Dos Santos Pereira, A.; Albero Carbonell, S.; De Aquino Neto, F. R.; Fernandes do Amaral, A. C. y Barnes, R. A. (2002): High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. J. Chromatogr. A. 947: 255-265.
61. Dos Santos Pereira, A.; Fernandes do Amaral, A. C.; Barnes, R. A.; Cardoso Jarí, N. y De Aquino Neto, F. R. (1999): Identification of isoquinoline alkaloids in crude extracts by high temperature gas chromatography-mass spectrometry. Phytochem. Anal. 10: 254-258.
62. Mukherjee, R. y Axt, E. M. (1984): Cyclitols from *Croton celtidifolius*. Phytochemistry. 23: 2682-2684.

63. Barbosa, P. R.; Fascio, M.; Martins, D. y Roque, N. F.; Arkivoc (2004): Benzoyl-methylpolyols from Croton species (Euphorbiaceae). Arkivoc. 6: 95-102.
64. Chlodwig, M. F. (2010): Essential oil research: past, present and future. Flav. Fragr. J.25: 112-113.
65. Rodríguez-Castillo, C. G.; Ramírez-González, I. J. y Rojas, L. (2012): Essential oil chemical composition of *Croton ovalifolius* Vahl. from Paraguaná. Venezuela. PharmacologyOnLine. Newsletter 3: 24-29.
66. Hamdy, A.E.; Shaabana, A. H.; El-Ghoraba y Shibamoto T. (2012): Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. J. Essent. Oil Res.24 (2): 203-212.
67. Angélico, E. C.; Rodrigues, O. G.; da Costa, J. M.; Lucena, M. F. A.; Neto, V. Q. y Severo de Medeiros, R. (2014): Chemical characterization and antimicrobial activity essential oils and Croton's varieties modulator in the Brazilian's northeast semiarid. Afr. J. Plant Sci. 8 (7): 392-397.
68. Marrero, D.; Rodríguez, E. A.; González, V. L. y Morales, C. L. (2013): Determinación de esteroides en la fracción insaponificable del aceite de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*). Rev. Cub. Farm. 47(1):110-116.
69. Gomathi, P.; Nair, J. R. y Sherief, P. M. (2010): Antibacterial activity in the accessory nidamental gland extracts of the Indian squid, *Loligo duvauceli* Orbigny. Indian J. Marine Sci. 39 (1): 100-104.
70. Abdelshafeek, K. A.; Daboob, A. M.; Abou-Setta, L. M. y Zarkon, A. M. (2011): Study of lipids, glucosinolate-derived isothiocyanates and their antimicrobial activity of *Erucaria pinnata*. JASMR 6(2): 135-142.

71. Pérez Gutiérrez, R. M. (2005): Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. Rev. Mex. Ciencias Farm. 36 (001): 5-10.
72. ISO 939 (1980): Spices and condiments. Determination of moisture content. Entrainment method.
73. ISO 6571 (1984): Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content.
74. Macek, K. (1972): Pharmaceutical Applications of Thin-layer and Paper Chromatography. 3^{ra} ed., Elsevier Publishing Company. Amsterdam: 743 pp.
75. Krishnaswamy, N. R. (2003): Chemistry of Natural Products: A Laboratory Handbook. Orient Blackswan. 87 pp.
76. Ripperger, H.; Schreiber, K.; Chajdav, C.; Satar, S.; Churelculuuny Knapp (1981): Phytochemische Untersuchungen an Pflanzen der mongolischen Flora. Pharmazie 36: 641-644.
77. Wayne, P. (2000): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 5th ed.
78. Ortiz, Y.; Avilés, R.; Spengler, I.; Rodríguez, Y.; Álvarez, M. E.; Lorenzo, Y.; Martínez, Y. y Ramos, N. (2008): Efecto antialimentario de *Melia azedarach* L. en dos especies de insectos fitófagos (Lepidoptera: Noctuidae). Fitosanidad. 12 (2): 20-23.
79. AOAC (2006): Official Methods of analysis. 18th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
80. Compagnone, R. S.; Chavez, K.; Mateu, E.; Orsini, G.; Arvelo, F. y Suárez, A. I. (2010): Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. Rec. Nat. Prod. 4 (2): 101-108.

81. Chau, L. T. M.;Thang, T. D. ;Diep, L. V. ; Tu, N. T. M. y Ogunwande I. A. (2014):Constituents of some essential oil bearing plants from Vietnam.Am. J. Plant Sci.5 (5): 760-765.
82. da Silva, F. R.; Wisniewski Junior, A.; Cechinel Filho,V. y Nunes,D. S. (2012): Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara*Bentham.Acta Sci. Technol.Maringá, 34 (3): 325-329.
83. [Neves, I. A.](#) y [da Camara, C. A.](#) (2011): Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and essential oil composition of four *Croton* species from Caatinga biome in northeastern Brazil. Nat. Prod. Comm. 6(6): 893-839.
84. Derwich, E.; Benziane, Z.y Boukir, A. (2010): Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity.Int. J. Agric. Biol. 12 (2): 115-118.
85. Bowes, N. M. y Zheljzakov, V. D. (2004): Factors affecting yields and essentials oils quality of *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L. cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 129 (6): 789-794.
86. Wogiatzi, E.;Papachatzis, A.;Kalorizou, H.;Chouliara, A. y Chouliaras, N. (2011): Evaluation of essential oil yield and chemical components of selected basil cultivars. Biotechnol. Biotechnol. Equipment 25 (3): 2525-2527.
87. Marrero, D.; Cora, M.; Laguna, A. y González, V. L. (2013): Caracterización espectroscópica del D-003 obtenido de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Rev. Cub. Farm. 47(3): 389-399.
88. Saxton, J.E. (1979): Review of the literature Published between July 1977 and June 1978.Vol. 9 The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.

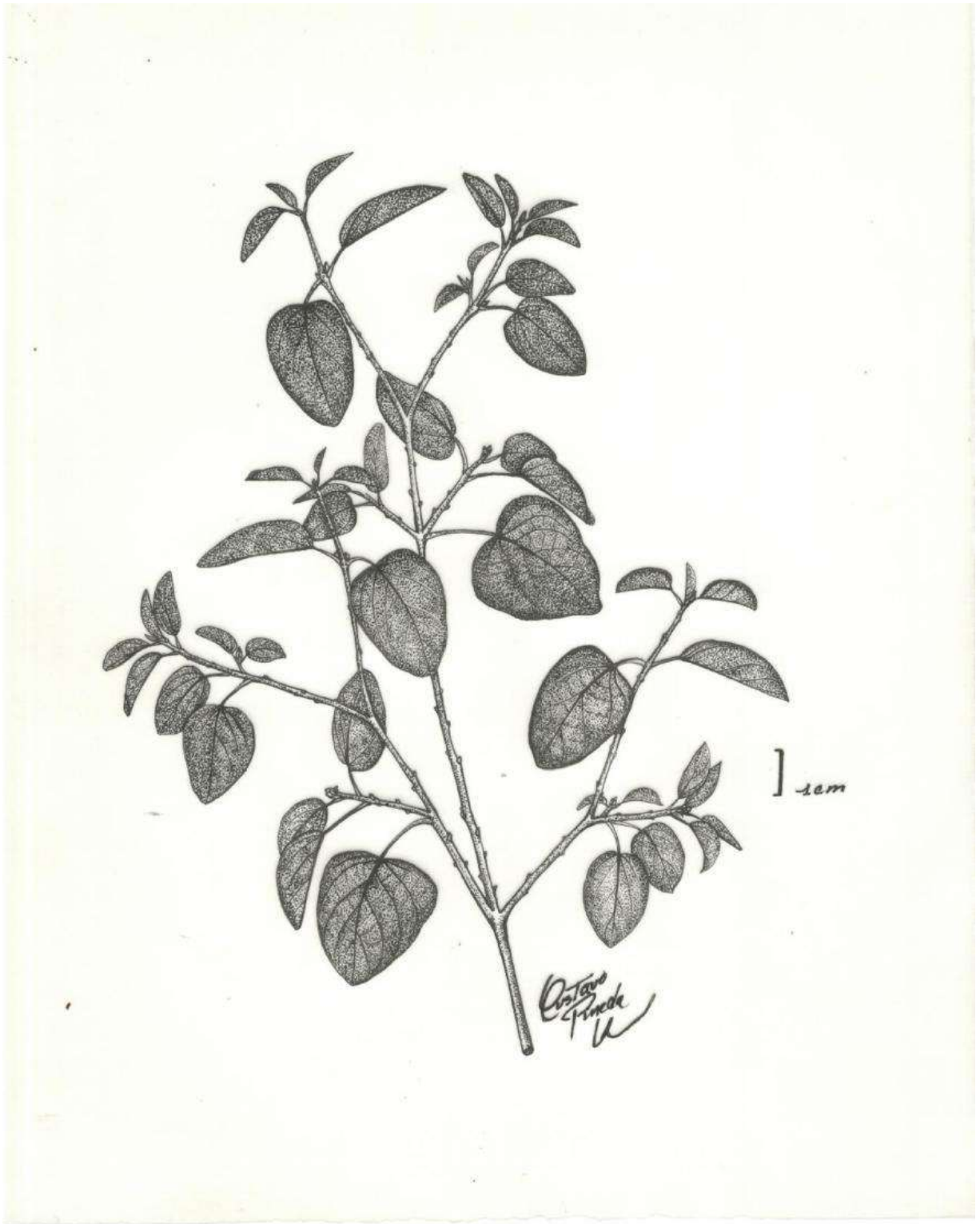
89. Fujii, I.; Masayuki, A.; Hayakawa, K. y Kanematsu, K. (1984): The syntheses of 3,4-Dimethoxy-6-morphinanone and isomorphinanone. Spectral inspection of the stereochemistry in *cis* and *trans* B/C ring fusion. Chem. Pharm. Bull. 32 (11): 4670-4673.
90. Webb, G.A. (1978): Annual Reports on NMR Spectroscopy. Vol. 8. Academic Press.
91. Webb, G.A. (1982): Annual Reports on NMR Spectroscopy. Vol 13. Academic Press.
92. Mandelbaum, A. y Ginsburg, D. (1965): Studies in mass spectrometry IV. Steric direction of fragmentation in *cis*- and *trans*-B: Cring-fused morphine derivatives. Tetrahedron Letters 29: 2479-2489.
93. Johns S. R. et al. (1966). *Cassytha* alkaloids II. Alkaloids of *Cassytha pubescens* R. Br. Aust. J. Chem.; 19 (12): 2331-2338.
94. Sánchez, V. y Sandoval, D. (1982): Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* L. II. Contribución al estudio químico del *C. stenophyllus* Griseb. Rev. Cub. Farm. (16): 45-55.
95. Grundon, M.F. (1972): Review of the literature Published between July 1970 and June 1971. Vol. 2. The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN
96. Stuart, K. L.; Chambers, C. y Byfield, D. (1969): Morphinandienone alkaloids from *Croton flavens* L. J. Chem. Soc. (C): 1681.
97. Saxton, J.E. (1975): Review of the literature Published between July 1973 and June 1974. Vol. 5 The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.
98. Saxton, J.E. (1977): Review of the literature Published between July 1975 and June 1976. Vol. 7 The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.
99. Saxton, J.E. (1980): Review of the literature Published between July 1978 and June 1979. Vol. 10. The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.

100. Saxton, J.E. (1981): Review of the literature Published between July 1979 and June 1980, Vol. 11. The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.
101. Saxton, J.E. (1983): Review of the literature Published between July 1981 and June 1982. Vol. 13. The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London W1V0BN.
102. Stuart, K.L. (1971): Morphinandienone alkaloids. Rev. Chem. 71(1): 77.
103. Haynes, L. J.; Husbands, G.E.M. y Stuart, K.L. (1968): Alkaloids from *Croton* species. Part VIII. Morphinandienine derivatives from *Croton linearis* Jacq. J. Chem. Soc. (C): 951-957.
104. Stuart K. L.; Byfield, D.; Chambers, C. y Husbands, G.E.M. (1970): Alkaloids from *Croton* species. Part X. Two new reduced proaporphine alkaloids. J. Chem. Soc. (C): 1228-1230.
105. De Freitas, M.R.; Lima de Alencar, J.; Da-Cunha, E.V.L.; Barbosa-Filho, J.M. y Gray, A.I. (1995): Milonine, an 8,14-dihidromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. Phytochem. 40 (5): 1553-1555.
106. Nehme, C. J.; de Moraes, P. L. R.; Tininis, A. G. y Cavalheiro, A. J. (2008): Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). Biochem. System. Ecol. 36: 602-611.

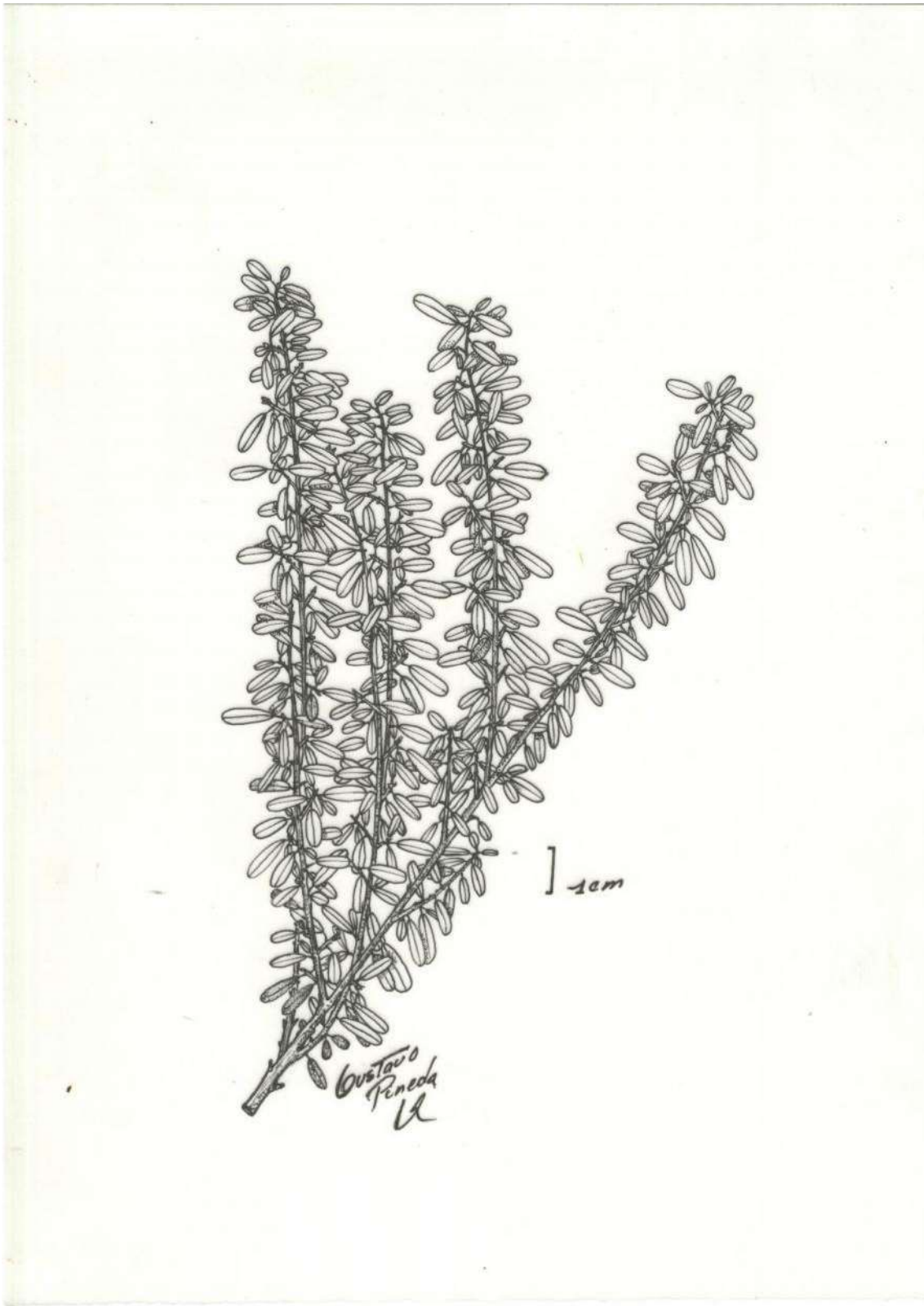
ANEXOS



Anexo 1. Ilustración de la especie *Croton micradenus* Urb.

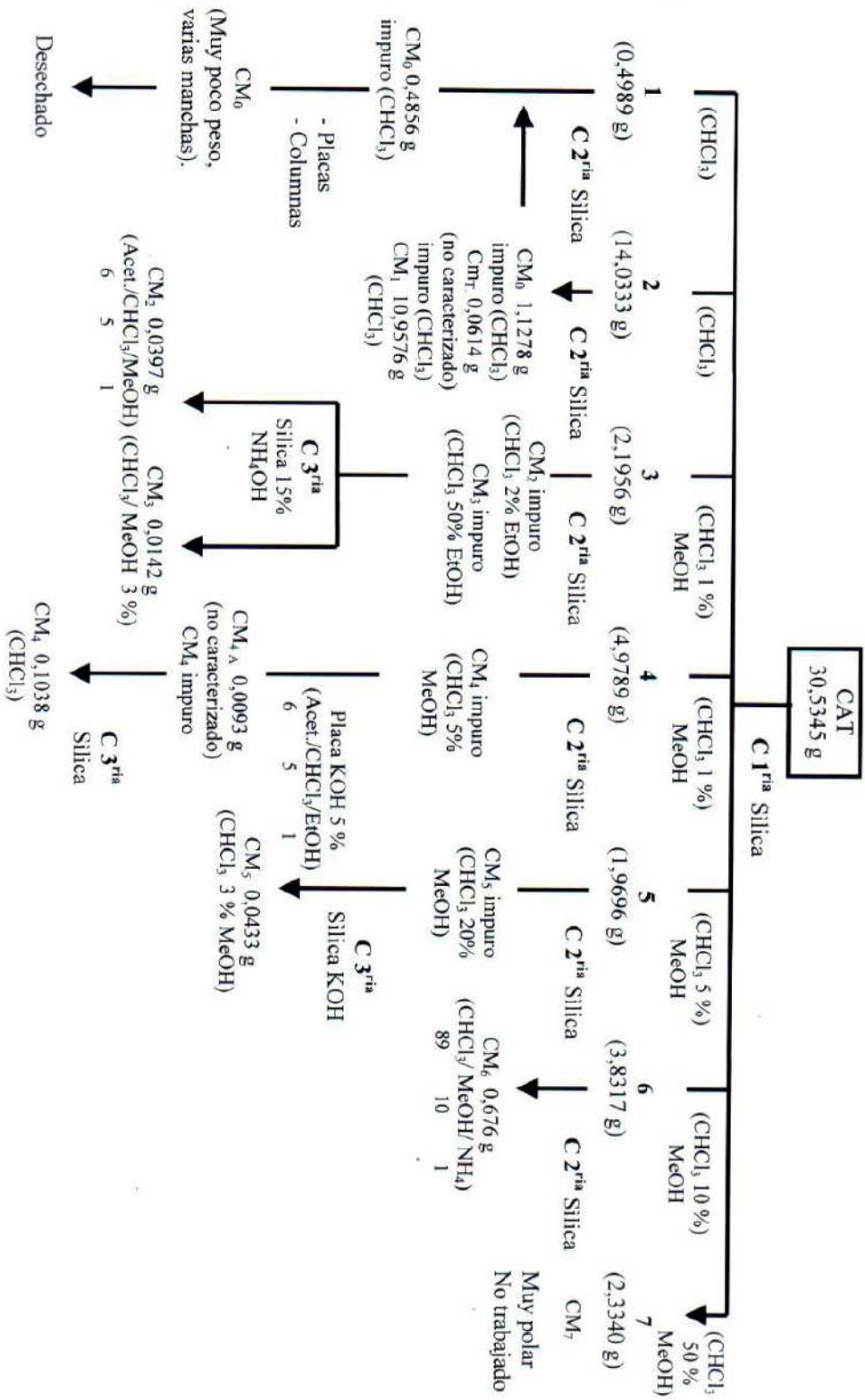


Anexo 2. Ilustración de la especie *Croton spiralis* Muell. Arg.



Anexo 3. Ilustración de la especie *Croton myricifolius* Griseb.

Anexo 4. Diagrama de flujo del proceso de purificación del crudo de alcaloides totales (CAT)



Anexo 5. Composición por grupos de compuestos de PCMH-I obtenido del extracto hexánico de las hojas y tallos de *C. micradenus* 2 y los extractos hexánicos de *C. spiralis* 2 y *C. myricifolius* 2

Alcanos

No.	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	tricosano (C23)	16,937	0,18	0.18	0.24
2	tetracosano (C24)	17,841	0,24	0.12	-
3	pentacosano (C25)	18,750	1,62	0.55	0.11
4	hexacosano (C26)	19,637	0,69	-	0.02
5	heptacosano (C27)	20,516	1,46	0.14	0.08
6	octacosano (C28)	21,367	1,75	-	-
7	nonacosano (C29)	22,205	3,46	0.30	0.24
8	triacontano (C30)	23,011	0,57	0.23	0.10
9	hentriacontano (C31)	23,811	1,84	0.19	0.19
10	dotriacontano (C32)	24,692	0,43	-	0.75
11	tritriacontano (C33)	25,321	0,24	0.53	0.40
Total			11	8	9

Aldehídos

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	pentacosanal (C25Al)	20,846	0,22	-	-
2	hexacosanal (C26Al)	21,711	1,43	-	-
3	heptacosanal (C27Al)	22,559	1,59	tr	tr
4	octacosanal (C28Al)	23,379	7,67	tr	tr
5	triacontanal (C30Al)	24,955	9,11	0.78	1.50
6	hentriacontanal (C31Al)	25,694	0,61	tr	tr
7	dotriacontanal (C32Al)	26,446	1,23	0.33	0.22
Total			7	5	5

Alcoholes

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	1-octadecanol (C18OH)	15,663	0,18	0.84	0.10
2	1-eicosanol (C20OH)	17,438	0,36	0.20	0.19
3	1-docosanol (C22OH)	19,216	0,32	0.60	0.23
4	1-tetracosanol (C24OH)	20,948	2,90	0.46	0.70
5	1-pentacosanol (C25OH)	21,776	0,67	0.23	0.26

6	1-hexacosanol (C26OH)	22,597	6,58	4.76	7.82
7	1-heptacosanol (C27OH)	23,394	0.10	1.60	2.82
8	1-octacosanol (C28OH)	24,171	12,5	14.54	16.7
9	1-nonacosanol (C29OH)	24,930	2,24	0.42	0.68
10	triacontanol (C30OH)	25,636	4,62	6.49	7.30
11	dotriacontanol (C32OH)	27,144	1,08	2.81	1.87
12	tetratriacontanol (C34OH)	29,050	0,57	0.79	0.60
Total			12	12	12

Ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular (alcanoicos)

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	ácido eicosanoico (C20:0)	18,247	0,14	0.68	0.19
2	ácido docosanoico (C22:0)	20,015	0,16	1.33	0.43
3	ácidotricosanoico (C23:0)	20.881	0.03	0.53	0.10
4	ácido tetracosanoico (C24:0)	21,726	0,30	1.81	1.89
5	ácido pentacosanoico (C25:0)	22.539	0.03	0.82	0.49
6	ácido hexacosanoico (C26:0)	23,336	0,57	3.96	3.05
7	ácido heptacosanoico (C27:0)	24.116	0.20	0.46	0.63
8	ácido octacosanoico (C28:0)	24,884	1,78	10.05	8.64
9	ácido nonacosanoico (C29:0)	25.592	0.20	0.20	0.11
10	ácido triacontanoico (C30:0)	26,337	3,44	8.50	7.43
11	ácido dotriacontanoico (C32:0)	28.017	0.05	2.98	0.92
Total			11	11	11

Esteroles

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	estigmasterol	25,525	0,65	0.07	0.44
2	β -sistosterol	25,928	0,97	0.79	2.42
3	β -amirina	26,067	0,33	0.15	0.66
4	Lup-20(2)-en-3-one	26.232	-	-	0.60
5	Lupeol	26,406	0,88	0.50	1.35
Total			4	4	5

Ácidos grasos

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	ácido 3-metil hexano dioico	9.849	-	0.16	-
2	ácido laúrico (C12:0)	11,754	1,29	0.63	0.92
3	ácido mirístico (C14:0)	13,123	1,05	1.85	0.87
4	ácido pentadecanoico (C15:0)	13.883	0.05	0.38	0.12

5	ácido palmítico (C16:0)	14,711	3,36	9.95	3.69
6	ácido margárico (C17:0)	15,564	0,11	0.52	0.13
7	ácido linoleico (C18:2)	16,189	0,34	0.13	0.17
8	ácido oleico (C18:1)	16,232	1,48	0.27	0.49
9	ácido esteárico (C18:0)+ NI	16,456	1,91	3.97	1.26
Total			8	9	8

Otros grupos

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	cis-verbenona	8,800	0,26	-	-
2	borneol	8,899	1,08	-	1.45
3	ácido benzoico	9,050	1,16	0.06	0.64
4	glicerol	9,264	0.10	0.10	-
5	acetato de bornilo	9,384	0,29	-	-
6	5,5-dimetil-1-etil 1,3-ciclopentadieno	9,679	5,70	-	0.57
7	cis-calameneno	11,062	0,55	-	1.25
8	fitol	11,232	1,32	0.35	3.46
9	ácido azelaico	12,758	0.10	1.34	2.06
10	bis (2-etilhexil) ftalato	19,259	2,74	1.26	0.83
Total			10	5	7

No identificados

No	Compuesto	Tr (min)	PCMH-I (%)	<i>C. spiralis</i> (%)	<i>C. myricifolius</i> (%)
1	NI	8.961	-	-	1.62
2	NI	9.481	-	0.16	0.82
3	NI	10.407	0.03	-	1.13
4	NI	10.526	tr	1.05	-
5	NI	11.324	-	-	1.23
6	NI	11.508	0,88	-	1.65
7	NI	12.386	-	-	2.11
8	NI	12.529	-	0.52	-
9	NI	13,462	0,68	0.52	-
10	NI	14.045	-	1.05	-
11	NI	14.360	-	0.63	-
12	NI	16.390	-	0.57	-
13	NI	17.000	-	1.61	-
14	NI	17.886	-	1.23	-
15	NI	19.660	-	0.84	-
16	NI	26.887	-	0.55	-
17	ester NI	32.153	-	-	1.14
Total			4	11	7