



Boletín Latinoamericano y del Caribe de  
Plantas Medicinales y Aromáticas

ISSN: 0717-7917

editor.blacpma@usach.cl

Universidad de Santiago de Chile  
Chile

MUÑOZ-ACEVEDO, Amner; PUERTO, Carlos E.; RODRÍGUEZ, Juan D.; ARISTIZÁBAL -CÓRDOBA,  
Solangel; KOUZNETSOV, Vladimir V.

Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente  
mayoritario, metileugenol

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 13, núm. 4, 2014, pp.  
336-343

Universidad de Santiago de Chile  
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85631435003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol

[Chemical-biological study of the essential oils from *Croton malambo* H. Karst. and their major component, methyleugenol]

Amner MUÑOZ-ACEVEDO<sup>1</sup>, Carlos E. PUERTO<sup>2</sup>, Juan D. RODRÍGUEZ<sup>1</sup>,  
Solangel ARISTIZÁBAL-CÓRDOBA<sup>1</sup> y Vladimir V. KOUZNETSOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Química y Biología, Departamento de Química y Biología, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup>Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Contactos / Contacts: Amner MUÑOZ-ACEVEDO - E-mail address: [amnerm@uinorte.edu.co](mailto:amnerm@uinorte.edu.co)

Contactos / Contacts: Vladimir V. KOUZNETSOV - E-mail address: [vkuznecnik@gmail.com](mailto:vkuznecnik@gmail.com)

**Abstract:** *Croton malambo* is a plant used in traditional medicine, in Colombia. The aim of this research was to characterize the essential oils (EO) from leaves and branches by GC-MS, NMR and determine the antiradical capacities and the *in vitro* and *in vivo* cytotoxic properties of the EO, methyleugenol (ME) and eugenol (EU). The EO of leaves and branches of *C. malambo* presented to ME as the main constituent (68.5% and 85.1%, respectively) and their structure was confirmed by NMR. On the other hands, the antiradical capacities (ABTS<sup>+</sup> method) of the EO and ME were very low, obtaining only inhibition values at a fixed concentration: to 2045 µg/mL – 50 ± 2% (leaves EO) and 28 ± 1% (branches EO); and, 2218 µg/mL - 2.0 ± 0.2% (ME). While EU had the highest value of TAA (14003 ± 719 mmol Trolox®/kg SE). According to lymphocytes cytotoxicity test, all tested substances were classified as “moderately toxic”, with values of LC<sub>50</sub> between 310 ± 17 – 897 ± 11 µg/mL, being the EO the most toxic. The assessment of the toxicity in Zebra fish embryos indicated that LC<sub>50</sub> of the branches EO, ME and EU were between 16 ± 9 – 43 ± 9 µg/mL, being the EU the most toxic.

**Keywords:** Essential oil, *Croton malambo* H. Karst., phenylpropanoids, methyleugenol, eugenol, cytotoxicity in lymphocytes.

**Resumen:** *Croton malambo* es una planta empleada en medicina tradicional, en Colombia. El objetivo de esta investigación fue caracterizar los aceites esenciales (AE) de hojas y ramas por GC-MS, RMN y determinar las capacidades antiradicalarias y las propiedades citotóxicas *in vitro* e *in vivo* de los AE, metileugenol (ME) y eugenol (EU). Los AE de hojas y ramas de *Croton malambo* presentaron a ME como el constituyente principal (68.5% y 85.1%, respectivamente) y su estructura fue confirmada por RMN. Por otro lado, las capacidades antiradicalarias (método ABTS<sup>+</sup>) de los AE y ME fueron muy bajas, obteniéndose sólo valores de inhibición a una concentración fija: a 2045 µg/mL – 50 ± 2% (AE de hojas) y 28 ± 1% (AE de ramas); y, 2218 µg/mL - 2.0 ± 0.2% (ME). Mientras que, EU tuvo el mayor valor de TAA (14003 ± 719 mmol Trolox®/kg SE). Según el ensayo de citotoxicidad en linfocitos, todas las sustancias evaluadas se catalogaron como “moderadamente tóxicas”, con valores de CL<sub>50</sub> entre 310 ± 17 – 897 ± 11 µg/mL, siendo los AE los más tóxicos. La estimación de la toxicidad en embriones del pez Cebra indicó que las CL<sub>50</sub> del AE ramas, ME y EU estuvieron entre 16 ± 9 – 43 ± 9 µg/mL, siendo el EU el más tóxico.

**Palabras clave:** Aceite esencial, *Croton malambo* H. Karst., fenilpropanoides, metileugenol, eugenol, citotoxicidad en linfocitos.

Recibido | Received: 10 de Abril de 2014

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 14 de Julio de 2014.

Publicado en línea | Published online: 30 de Julio de 2014

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** AM-A agradece a la Universidad del Norte, por el apoyo financiero a través del proyecto “Bioprospección y Diversidad Genética de Especies Vegetales Promisorias del Bosque Seco Tropical del Caribe Colombiano” (Código 2013-DI0024) que forma parte del Área Estratégica en Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y Bienestar Humano. Adicionalmente, AM-A agradece a Colciencias por su apoyo a través de beca doctoral 2004. CEPG y VVK agradecen respectivamente a Colciencias (RC-0346-2013) y a la UIS y UniNorte por la realización del año sabático 2014 (Contrato 4/2013).

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** A Muñoz-Acevedo, CE Puerto, JD Rodríguez, S Aristizabal-Cordoba, VV Kouznetsov. 2014. Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst. y su componente mayoritario, metileugenol **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 13(4): 336 – 343.

## LISTA DE ABREVIACIONES

GC-MS – cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; ca. – aproximadamente; @ – gradiente de temperatura; IR – índice de retención con programación lineal de temperatura; RMN – resonancia magnética nuclear; CL50 – Concentración letal al 50%; ME – Metileugenol; AE – Aceite esencial; ABTS<sup>+</sup> – catión-radical del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; BHA – Butilhidroxianisol; FBS – Suero fetal bovino; EU – Eugenol; CDCl<sub>3</sub> – cloroformo deuterado; TAA – Total Antioxidant Capacity.

## INTRODUCCIÓN

*Croton malambo* H. Karsten es una especie interesante de la familia Euphorbiaceae que ha sido empleada en la medicina tradicional del departamento del Atlántico y Bolívar, Colombia (Pérez-Arbeláez, 1996) y en otros países como Venezuela. Es un árbol de 3-8 m de alto, ramoso, con hojas alternas y glándulas oleíferas en todas sus partes. Recibe el nombre común de Malambo, palo Matías, palomitas, carnapire y torco (Pollak-Eltz, 2001). Las hojas y corteza de esta especie se han utilizado tradicionalmente en forma de emplastos para tratar cólicos y en infusiones o alcoholaturos para diarrea, colitis y reumatismo (García-Barriga, 1992). También, como antinociceptivo, sedativo, analgésico y anti-inflamatorio (Suárez *et al.*, 2003; Quattrocchini, 2012).

Los AE de la corteza y hojas de *C. malambo* se han estudiado mediante caracterización química por GC-MS y se han determinado algunas bioactividades, *e.g.*, actividad antioxidante, toxicidad, antibacteriana y citotoxicidad. (Jaramillo *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2008). Algunos componentes menores de la corteza (diterpenos tetracíclicos) mostraron efectos citotóxicos y proapoptóticos contra células de carcinoma mamario, MCF-7 (Morales *et al.*, 2005).

El análisis composicional reportado de todos los AE registra al metileugenol (ME) como componente mayoritario, en cantidades relativas entre 55-94%. (Suárez *et al.*, 2005; Jaramillo *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2008; Jaramillo *et al.*, 2010). El ME es de gran interés y aplicación para la industria alimenticia, cosmética/perfumista (Burdock, 2010). Sin embargo, su importancia no se limita sólo a aplicaciones industriales sino ecológicas, puesto que cuando es emitido por las plantas en un ecosistema, éste actúa como agente repelente y regula las interacciones planta – herbívoro (Tan & Nishida, 2012). Además, este fenilpropanoide es valioso como

material para la construcción de nuevos agentes terapéuticos.

Con base en la información anterior, en este trabajo se realizó un nuevo estudio de química biológica sobre el ME y los AEs aislados de las hojas y ramas de *C. malambo*, desarrollado en las siguientes fases: (1) aislamiento de los AE por hidrodestilación; (2) determinación de la composición química por GC-MS y RMN, (3) valoración de la capacidad antioxidante (ABTS<sup>+</sup>), (4) estudio de la citotoxicidad *in vitro* (ensayo en linfocitos) y (5) estudio de la toxicidad *in vivo* (modelo pez cebra). Todo esto, con el fin de adquirir la más completa información química-biológica de los AE de *C. malambo* y el ME, y tratar de relacionar los resultados de (cito) toxicidad *in-vitro* e *in-vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Los reactivos utilizados fueron diclorometano (grado analítico, J.T. Baker), etanol (grado analítico, J.T. Baker), metanol (grado analítico, J.T. Baker), Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, 97%, Sigma),  $\alpha$ -tocoferol (97%, Sigma), butilhidroxianisol (BHA, 99%, Sigma), ABTS (sal de di-amonio del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, 99%, Sigma), persulfato de potasio (97%, Merck), medio RPMI 1640, [+] L-glutamina (Gibco®) Suero fetal bovino (FBS Certificado, Gibco®), Trypan Blue (C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>, Sigma), Penicilina-Estreptomina (Gibco®).

### Material vegetal

Las muestras (en estado fresco) de ramas y hojas de *C. malambo* H. Karst. Se recolectaron en septiembre de 2011 en el municipio de Malambo (Atlántico), a una altura de 10 m.s.n.m., longitud: 74° 46' 44" Oeste y latitud: 10° 51' 37" Norte. La identificación taxonómica (N° COL560965) fue realizada en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia por C.A. Vargas.

### Hidrodestilación

El aislamiento de los AEs se llevó a cabo por el método de hidrodestilación convencional, utilizando un equipo tipo Clevenger modificado con reservorio *Dean-Stark*; el material vegetal (200 g) se introdujo en un balón de 1 L con agua (400 mL) y se realizó el proceso durante 2 h. El AE se separó por

decantación, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y una alícuota del AE recolectado (50 µL) se diluyó con 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para su análisis cromatográfico.

#### **Cromatografía de gases-espectrometría de masas**

Los AEs de ramas y hojas de *C. malambo* se analizaron en un equipo Shimadzu GC-MS QP2010 Plus, con inyector *split/splitless* (relación *split* 1:10) y columna Shimadzu SHRX1-5MS (30 m x 0.25 mm D.I. x 0.25 µm df) con fase estacionaria 5%-fenilpoli(dimetilsiloxano). La rampa de calentamiento utilizada en el horno cromatográfico fue: 50 °C (5 min) @ 5 °C/min hasta 200 °C (5 min) y @ 10 °C/min hasta 260 °C (20 min). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (EI, 70 eV) en un analizador másico cuadrupolar con rango de masas *m/z* 40-350, en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). Los datos cromatográficos y espectroscópicos se procesaron con el software *LabSolutions GCMS solution* (Versión 2.50 SU3).

Los índices de retención fueron obtenidos usando los datos de hidrocarburos alifáticos saturados entre C<sub>7</sub>-C<sub>35</sub>. La identificación de los metabolitos secundarios fue realizada por comparación de los espectros de masas con las bases de datos NIST 02, Wiley 8 y Adams 2004 y por comparación de los índices de retención reportados en la literatura (Joulian & König, 1998; Adams, 2004; NIST, 2012).

#### **Resonancia magnética nuclear**

La adquisición de los espectros de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN de los objetos principales del estudio actual (AE y ME) se realizó en el espectrómetro Bruker avance-400 (400 MHz). Los desplazamientos químicos están reportados en ppm empleando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente y referencia interna (<sup>1</sup>H: δ 7.26 ppm; <sup>13</sup>C: δ 77.00 ppm).

#### **Capacidad antioxidante - catión-radical ABTS<sup>•+</sup>**

La estimación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox<sup>®</sup>, expresada como capacidad antioxidante total (TAA, mmol Trolox<sup>®</sup>/kg SE - Sustancia evaluada) de los aceites, su componente mayoritario, el eugenol y los antioxidantes “control” se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Muñoz-Acevedo *et al.* (2011). Para estas mediciones se utilizó un lector multipozo multimodal FLUOStar omega (BMG LABTECH). Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

#### **Citotoxicidad in-vitro (linfocitos)**

El aislamiento de los linfocitos se realizó de acuerdo con los procedimientos de Márquez *et al.* (2008) y Calderón-Segura *et al.* (2012) utilizando sangre periférica de donantes sanos (18-30 años). De este tipo de sangre se separaron las células monocitos y se re-suspendieron en medio RPMI 1640, enriquecido con suero fetal bovino (15%) y antibiótico (penicilina- estreptomycin 1%). La suspensión celular fue ajustada a *ca.* 3000 células/µL y se sometieron a diferentes concentraciones de las sustancias a evaluar (AE de *C. malambo* y sustancias puras) entre 100-1000 µg/mL, durante 30 minutos a 37° C. Después de la incubación una alícuota de la muestra se mezcló con una solución de Azul tripán 0.4% (1:1). La viabilidad celular porcentual se determinó utilizando la cámara de Neubauer en un microscopio de contraste ZEIS (Microscopio Nikon, 40 X), discriminando células vivas (blancas) y células muertas (azules). Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado. Los donantes voluntarios firmaron el permiso de consentimiento ético.

#### **Toxicidad in-vivo (embriones del pez cebra)**

Los estudios de toxicidad en embriones del pez cebra (*Danio rerio*, tipo salvaje) se realizaron con base en el protocolo desarrollado y adaptado en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular-UIS (Puerto & Kouznetsov, 2013): Especímenes adultos del pez cebra (*Danio rerio*), de ambos sexos fueron criados dos semanas, bajo fotoperiodos naturales de luz y oscuridad (26 ± 2 °C), antes de iniciar los experimentos. Seguidamente, para la fase de reproducción de los peces adultos, tres machos y una hembra fueron colocados juntos. Después del apareamiento natural, los embriones se recolectaron y se lavaron con medio E3 (*buffer* de Holtfreter) y se transfirieron a una caja de Petri para la verificación de la calidad morfológica de los embriones (por microscopía). Los embriones seleccionados a 24 horas posteriores a la fertilización (hpf) fueron transferidos a una micro placa de 96 pozos, ubicando un embrión y 200 µL de medio E3 por pozo, donde se realizó la evaluación de la toxicidad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La determinación de la CL<sub>50</sub> (mg de sustancia/mL de solución) se basó en la mortalidad acumulada, la cual fue monitoreada en un microscopio de disección a 72 horas después de la exposición química (96 hpf) y el tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el análisis

Probit con el *software* SPSS para Windows versión 19.0. Los datos se expresan con el error estándar de la media.

El comité de ética e investigación del Instituto del Corazón de Bucaramanga, aprobó este protocolo en su reunión extraordinaria del 26 de Mayo de 2012 en el acta 050.

#### **Análisis de los cambios fenotípicos usando el modelo embrionario del pez cebra**

Cada sustancia a evaluar se disolvió en el medio E3 con un 2% v/v de DMSO a partir del cual se prepararon soluciones de 200  $\mu$ L a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1, 1.6, 0.8 y 0.4  $\mu$ g/mL. Cada solución preparada sustituyó el medio de cultivo de los embriones. Para el “control” se utilizaron cuatro embriones (sin sustancia a evaluar).

La placa embrionaria fue incubada a  $28 \pm 2$  °C bajo fotoperiodos naturales de luz y oscuridad, y los embriones fueron examinados a 48, 72 y 96 hpf utilizando un estéreo microscopio trinocular OPTIKA (versión del modelo: SZM-1). Cada uno de estos experimentos fue realizado por duplicado.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis composicional por GC-MS de los AE**

En los AE de las hojas y ramas de *C. malambo* se identificaron positivamente por GC-MS, 36-43 compuestos (cantidades relativas > 0.1%). Éstos correspondieron ca. 90-93% del total. En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis composicional de los AE de las partes estudiadas, los  $I_R$  calculados y los reportados en la literatura, sus cantidades relativas y rendimientos porcentuales.

**Tabla 1**  
**Análisis composicional de los AE de hojas y ramas de *Croton malambo* H. Karst.**

Constituyentes	$I_{R-Calc}$	$I_{R-Lit}$	Cantidad relativa, %	
			Hojas	Ramas
Limoneno	1033	1029	1.0	0.5
Linalol	1103	1097	0.6	2.3
<b>Metileugenol</b>	<b>1419</b>	<b>1404</b>	<b>68.5</b>	<b>85.1</b>
$\beta$ -Cariofileno	1419	1419	1.1	0.3
<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	1433	1435	2.1	0.4
$\gamma$ -Curcumeno	1482	1483	6.1	0.4
$\beta$ -Bisaboleno	1508	1506	1.8	0.05
$\alpha$ -Bulneseno	1511	1510	---	1.0
<i>cis</i> - $\gamma$ -Bisaboleno	1517	1515	1.2	0.1
Elemicina	1548	1557	0.4	2.1
<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisaboleno	1558	1531	7.3	0.5
<b>Total, %</b>			<b>90.1</b>	<b>93.1</b>
<b>Rendimiento AE, %</b>			<b>1.6</b>	<b>2.7</b>

Calc. – Calculado; Lit. – Literatura

De acuerdo con la literatura científica revisada se encontraron sólo dos publicaciones (Suárez *et al.*, 2005; Jaramillo *et al.*, 2010) sobre la composición química del AE de corteza de *C. malambo*, que ha sido la parte más estudiada de esta planta. El componente mayoritario reportado en ellas fue el metileugenol en cantidades relativas entre 63.5-65.4%.

Suárez *et al.* (2008) realizaron otro estudio sobre las hojas y de igual forma, el metileugenol fue el componente mayoritario (94.2%). Por otro lado, el rendimiento del AE de hojas no fue reportado y los

de los AE de la corteza fueron 0.65% y 1.2% para la especie de Venezuela y Colombia, respectivamente.

La comparación del contenido del metileugenol en el AE de las hojas bajo estudio, fue inferior en un 27.3% y 19.5%, con lo reportado en la literatura por Suárez *et al.* (2008) y con lo determinado en las ramas en este mismo trabajo, respectivamente. La composición química del AE de las ramas de *C. malambo* se reporta por primera vez y los rendimientos obtenidos de los dos AE fueron más altos que lo registrado para la corteza (Suárez *et al.*, 2005; Jaramillo *et al.*, 2010).

Entre los dos aceites caracterizados por GC-MS se seleccionó el AE de las ramas como objeto principal del estudio actual, por tener el mayor contenido de metileugenol (Tabla 1).

#### **Análisis por RMN del AE de ramas de *C. malambo***

La confirmación estructural del metileugenol, componente principal del AE de ramas, se realizó mediante el análisis por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obteniéndose los siguientes datos:

**AE Ramas *C. malambo*.** Componente mayoritario (85%), metileugenol -  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$ . GC-MS (EI, 70 eV),  $m/z$  (%): 178 ( $\text{M}^+$ , 100).  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.80 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, 3- $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.76-6.69 (2H, m, 5 y 6- $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.95 (1H, m,  $\text{H-C}=\text{C}$ ), 5.09 (1H, dq,  $J = 12.8, 2.4$  Hz,  $=\text{CH}_2$ ), 5.05 (1H, dq,  $J = 10.0, 1.6$  Hz,  $=\text{CH}_2$ ), 3.87 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.86 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.34 (2H, d,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  148.9 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{O}-$ ), 147.4 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{O}-$ ), 137.8 ( $-\text{CH}=\text{C}$ ), 132.7 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}-$ ), 120.4 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-$ ), 115.7 ( $=\text{CH}_2$ ), 111.8 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-$ ),

111.5 ( $-\text{C}_{\text{Ar}}-$ ), 56.0 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 55.8 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 39.9 ( $-\text{CH}_2-$ ) ppm.

#### **Actividades biológicas *in vitro* e *in vivo***

Caracterizados espectralmente el aceite volátil de *C. malambo*, ME y EU (Figura 1), se sometieron a varios bioensayos: capacidad antioxidante, toxicidad en embriones del pez Cebra ( $\text{CL}_{50}$ ) y citotoxicidad en linfocitos ( $\text{CL}_{50}$ ) (Tabla 2). El EU fue usado como análogo estructural cercano. En los ensayos de capacidad antioxidante y de citotoxicidad en linfocitos se emplearon como controles positivos a  $\alpha$ -tocoferol, BHA y metanol, respectivamente.

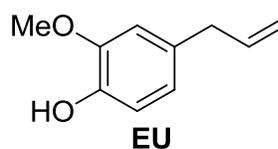
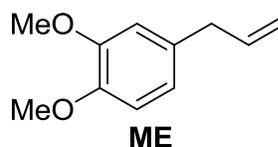
Se realizaron ensayos de capacidad antioxidante porque los procesos inflamatorios posiblemente están asociados al ataque de radicales hacia dianas biológicas (Blake *et al.*, 1987). Por otro lado, se realizaron los estudios de cito(toxicidad) porque ellos aportarían información sobre la seguridad en la ingesta de extractos asociados a *C. malambo*, por su uso en medicina tradicional y por otras posibles aplicaciones, como antitumoral/anticancerígeno.

**Figura 1**

**Imagen de la especie de *C. malambo* y las estructuras del componente mayoritario de su AE y del EU.**



***Croton malambo***



#### **Capacidad antioxidante equivalente al Trolox®**

En este trabajo se reporta por primera vez la capacidad anti-radicalaria frente  $\text{ABTS}^+$  de los AE de las hojas y ramas de *C. malambo*. Los valores de capacidad anti-radicalaria frente  $\text{ABTS}^+$  de los AE, ME y EU junto con las sustancias control se encuentran en la Tabla 2.

Las reactividades de los AE hacia el catión radical  $\text{ABTS}^+$ , como una medida de su capacidad antioxidante, fueron muy bajas, puesto que no lograron inhibir significativamente al catión-radical. Esto es, que a una concentración de 2045  $\mu\text{g/mL}$ ,

respectivamente los AE de hojas y ramas sólo inhibieron  $50 \pm 2\%$  y  $28 \pm 1\%$ , que desde el punto de vista estructural es irrefutable puesto que los compuestos presentes en el AE no tienen alta capacidad para donar electrones y protones simultáneamente. Lo mismo sucedió con el ME, el cual tampoco inhibió significativamente al catión-radical  $\text{ABTS}^+$ . Al contrario, el EU siendo un fenol (grupo OH) es un potente antioxidante exhibiendo el máximo valor TAA y superando sustancias de control, hecho reportado por Muñoz-Acevedo *et al.* (2011).

Cabe anotar que el valor de TAA (2.28 mmol/kg AE) para el AE de corteza de *C. malambo* reportado por Jaramillo *et al.* (2010) difiere significativamente de los determinados en la presente investigación, a pesar de que la composición química

de la corteza es parecida a la de las hojas estudiadas.

Además, los resultados obtenidos en este trabajo lo que indican es que los AE de *C. malambo* no resultaron con buena capacidad antiradicalaria, según el mecanismo de acción del método empleado.

**Tabla 2**  
**Capacidades anti-radicalarias y (cito)toxicidades de los AE de *Croton malambo* H. Karst y de metileugenol junto con las sustancias “control”**

Sustancia	TAA (mmol Trolox <sup>®</sup> /kg SE)	Citotoxicidad linfocitos, CL <sub>50</sub> (µg/mL)	Citotoxicidad embriones pez cebra, CL <sub>50</sub> (µg/mL)
α-Tocoferol	2157 ± 63	ND	ND
BHA	7162 ± 147	ND	ND
Metanol	ND	(30 ± 2%, 20%)	ND
AE Hojas	(50 ± 2%, 2045 µg/mL)	310 ± 17	ND
AE Ramas	(28 ± 1%, 2045 µg/mL)	311 ± 5	28 ± 6
EU	11171±467	897 ± 11	43 ± 9
ME	(2.0 ± 0.2%, 2218 µg/mL)	584 ± 34	16 ± 9

ND – No determinado

#### Citotoxicidad en linfocitos

En este trabajo se reporta por primera vez la toxicidad *in vitro* de los AE de hojas y ramas de *C. malambo* junto con los productos comerciales, sobre linfocitos humanos. La estimación de la citotoxicidad en linfocitos mostró que los AE estuvieron catalogados como moderadamente tóxicos puesto que sus CL<sub>50</sub> fueron mayores que 100 µg/mL, pero menores que 1000 µg/mL. No obstante, Suárez *et al.* (2008) determinaron la citotoxicidad del AE de hojas de *C. malambo* sobre diferentes líneas celulares de cáncer (MCF-7, PC3, LoVo); este AE sólo mostró moderada actividad sobre las células MCF-7 (CL<sub>50</sub>= 72.8%) al evaluar concentraciones entre 5-100 µg/mL lo que contradice a los datos del trabajo publicado por Morales *et al.* (2005).

Asimismo, las sustancias comerciales mostraron el mismo rango de toxicidad que los AE; sin embargo, el valor de CL<sub>50</sub> del ME fue mayor que el de los AE, pero menor que el de EU. Esto significa que ME es menos tóxico que los AE de *C. malambo* y que posiblemente, parte de la toxicidad de estos AE está relacionada con los otros constituyentes presentes en la mezcla (terpenos y sesquiterpenos).

#### Toxicidad en embriones de pez cebra

Los ensayos de toxicidad *in vivo* se realizaron con el modelo de embriones del pez cebra, el cual es un modelo importante en el proceso de desarrollo de agentes farmacológicos y se considera como la

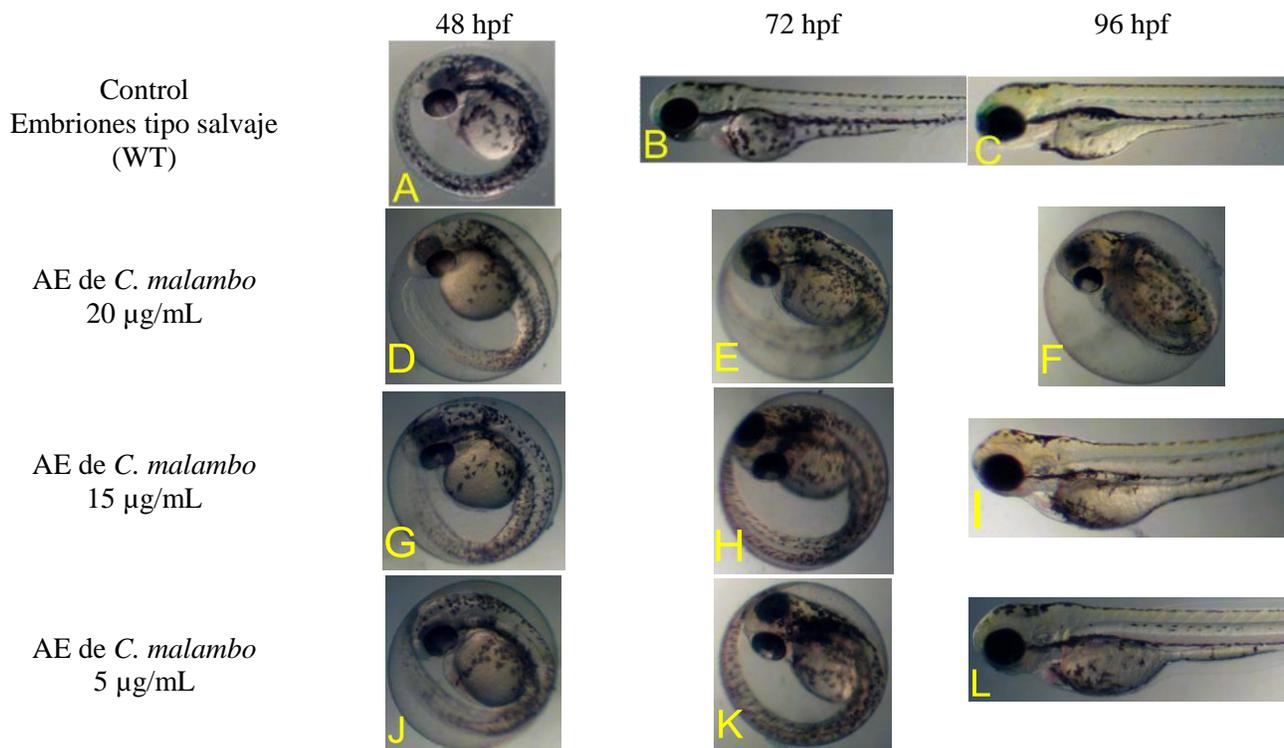
“unión perfecta” entre los ensayos *in-vivo* e *in-vitro* (Rubinstein, 2003; Stern & Zon, 2003). Así, examinando el AE de ramas de *C. malambo*, su componente mayoritario ME y EU con este modelo, se determinó la concentración letal (CL<sub>50</sub>, µg/mL) de estas sustancias en los embriones. De acuerdo con los datos obtenidos, el ME (CL<sub>50</sub>: 43 ± 9 µg/mL) resultó ser el compuesto menos tóxico en comparación al AE de ramas de *C. malambo* (CL<sub>50</sub>: 28 ± 6 µg/mL); mientras que, la toxicidad del EU, un fenilpropanoide estructuralmente relacionado y precursor del ME, fue el compuesto más tóxico de toda la serie de compuestos evaluados, con una CL<sub>50</sub> de 16 ± 9 µg/mL (Tabla 2). Su alta toxicidad *in vivo* en organismos en desarrollo (embriones) se debe posiblemente a que la reactividad química del EU y su inestabilidad metabólica (estructura fenólica se convierte en una de *orto*-benzoquinona) influyen en los procesos metabólicos iniciales del embrión.

Finalmente, el análisis de los cambios fenotípicos se realizó a tres concentraciones menores (20 µg/mL, 15 µg/mL y 5 µg/mL) que la CL<sub>50</sub> del AE de ramas. Las dos primeras evidenciaron retraso en el desarrollo de los embriones del pez cebra. A la concentración 20 µg/mL se observó un severo retraso en el desarrollo embrionario a 96 horas después de la fecundación (hpf) donde el embrión aún se encuentra dentro de su yema (Figura 2, fotografía F). A la concentración 15 µg/mL se percibió solo un leve retraso en el desarrollo de los embriones (Figura 2,

fotografía I). Sin embargo, los embriones tratados con la concentración restante (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del AE no mostraron cambios fenotípicos (Figura 2, fotografía

L) al compararse con los embriones “control” (Figura 2, fotografía C).

**Figura 2**  
Fenotipos visuales inducidos por el AE de ramas de *C. malambo* a concentraciones menores que su  $\text{CL}_{50}$ <sup>a</sup>



<sup>a</sup> (A-C) Fotografías de los embriones de pez Cebra utilizados como control a 48, 72, 96 hpf. (D-F) Fotografías de los embriones de pez Cebra tratados con el AE de *C. malambo* a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (G-I) Fotografías de los embriones de pez Cebra tratados con el AE de *C. malambo* a 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (J-L) Fotografías de los embriones de pez Cebra tratados con el AE de *C. malambo* a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## CONCLUSIONES

Se reportó por primera vez el estudio químico-biológico comparativo del AE de las ramas y sus componentes principales valorando las capacidades antioxidantes, citotoxicidades en linfocitos y toxicidades en embriones del pez cebra del AE de hojas, del AE de ramas y productos comerciales. Adicionalmente, se observó que en general existe una buena correlación entre la citotoxicidad *in vitro* y la toxicidad *in vivo* del AE de hojas, del AE de ramas y de su componente mayoritario, ME.

## AGRADECIMIENTOS

AM-A agradece a la Universidad del Norte, por el apoyo financiero a través del proyecto “Bioprospección y Diversidad Genética de Especies

Vegetales Promisorias del Bosque Seco Tropical del Caribe Colombiano” (Código 2013-DI0024) que forma parte del Área Estratégica en Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y Bienestar Humano. Adicionalmente, AM-A agradece a Colciencias por su apoyo a través de beca doctoral 2004. CEPG y VVK agradecen respectivamente a Colciencias (RC-0346-2013) y a la UIS y UniNorte por la realización del año sabático 2014 (Contrato 4/2013).

## REFERENCIAS

Adams RP. 2004. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

- Blake DR, Allen RE, Lunec J. 1987. Free radicals in biological systems - a review orientated to inflammatory processes. **Br Med Bull** 43: 371 - 385
- Burdock GA. 2010. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. Sixth edition. CRC Press - Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-López Y, Calderón-Ezquerro M del C, Cortés-Eslava J, García-Martínez R, Flores-Ramírez D, Rodríguez-Romero MI, Méndez-Pérez M, Bañuelos-Ruíz E. 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. **J Toxicol** 2012: 612 - 647.
- García-Barriga H. 1992. **Flora medicinal de Colombia. Botánica médica**. Volumen II. Segunda edición. Tercer Mundo, Bogotá, Colombia.
- Jaramillo BE, Duarte E, Muñoz K, Stashenko E. 2010. Composición química volátil del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. **Rev Cubana Plant Med** 15: 133 - 142.
- Jaramillo BE, Olivero JT, Muñoz K. 2007. Composición química volátil y toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) frente a *Artemia salina* del aceite esencial del *Croton malambo* colectado en la costa norte Colombiana. **Sci Tech** 33: 299 - 302.
- Joulain D, König WA. 1998. **The atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons**. Ed. E.B.-Verlag, Hamburg, Germany.
- Márquez F, Pareja A, Márquez F, Martínez M. 2008. Evaluación citotóxica y clastogénica en linfocitos humanos de un 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxisterol. **Vitae** 15: 274 - 278.
- Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suarez A, Arvelo F, Ramirez J.L., Galindo-Castro I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cancer Lett** 218: 109 - 116.
- Muñoz-Acevedo A, Vargas LY, Stashenko EE, Kouznetsov VV. 2011. Improved Trolox® equivalent antioxidant capacity assay for efficient and fast search of new antioxidant agents. **Anal Chem Lett** 1: 86 - 102.
- NIST. 2010. National Institute of Standards and Technology. [En línea] <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [Consultado 15 de Mayo de 2014].
- Pérez-Arbeláez E. 1996. **Plantas útiles de Colombia**. Quinta edición. Fondo FEN Colombia, Bogotá, Colombia.
- Pollak-Eltz A. 2001. **La medicina tradicional venezolana**. Primera edición. Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, Venezuela.
- Puerto CE, Kouznetsov VV. 2013. Regio- and stereoselective synthesis of spirooxindole 1'-nitro pyrrolizidines with five concurrent stereocenters under aqueous medium and their bioprospection using the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. **Org Biol Chem** 11: 7372 - 7386.
- Quattrocchini U. 2012. **CRC World Dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology**. CRC Press - Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA.
- Rubinstein AL. 2003. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. **Curr Opin Drug Discov Devel** 6: 218 - 223.
- Stern H, Zon LI. 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Cancer** 3: 533 - 539.
- Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Tillett A, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **J Ethnopharmacol** 88: 11 - 14.
- Suárez AI, Vásquez LJ, Manzano MA, Compagnone RS. 2005. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Flavour Frag J** 20: 611 - 614.
- Suárez AI, Vásquez LJ, Taddei A, Arvelo F, Compagnone RS. 2008. Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. **J Essent Oil Bear PI** 11: 208 - 213.
- Tan KH, Nishida R. 2012. Methyl eugenol: its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **J Insect Sc** 12:1-74.