

Caracterización por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masa de un extracto etanólico de *Croton wagneri*

Characterization for Chromatographic Gas-spectrometric of Mass of an extract ethanoic - of *Croton wagneri*

Dr. C. José González Yaque*

<jgyaque@ucpejv.edu.cu>

<https://orcid.org/0000-0001-8658-6078>

Dr. C. Domitila Elizabeth Gómez Gilbert **

<domitila.gomez@nauta.cu>

<https://orcid.org/0000-0001-8997-6557>

* y ** Universidad de Ciencias Pedagógicas "Enrique Jose Varona", La Habana, Cuba

RESUMEN

Un extracto etanólico al 50 % obtenido por maceración de *Croton wagneri* se caracterizó por CG-EM utilizando un espectrómetro Shimadzu QP2010 y como agente sililante el *N,O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (**BSTFA**). Los compuestos fueron analizados utilizando las librerías (cartotecas) GC/MS NIST21 y NIST107, teniendo en cuenta los resultados obtenidos después del tamizaje fitoquímico y comparándolos con el software NISTDEMO. Después de 78 minutos de corrida la muestra, fueron identificados 859 componentes químicos, y entre ellos, fueron caracterizados tentativamente cinco aceites esenciales, seis triterpenos y/o esteroides, un derivado del antraceno, seis aminoácidos o sus derivados, y un flavonoide. La muestra también contiene una gran cantidad de azúcares reductores y sus derivados, hidrocarburos, y ácidos alifáticos y aromáticos (saturados e insaturados).

Palabras clave: CG-EM, *Croton wagneri*, extracto etanólico.

ABSTRACT

An ethanolic extract at 50% obtained by maceration process from *Croton wagneri* was characterized by GC-MS using a Shimadzu QP2010 spectrometer and the Silylation agent was *N, O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (**BSTFA**). The compounds were analyzed using GC/MS NIST21 and NIST107 libraries and having into account the results obtained after phytochemical screening and comparing the results with NISTDEMO Software. After 78 minutes of running 859 chemical components were identified from the sample, and among them, the presence of five essential oils, six triterpenes and/or steroids, an anthracene derivative, six aminoacids or their derivatives, and one flavonoid were tentatively characterized. The sample also contains a lot of amount of reductants sugars and their derivatives, hydrocarbons, and aromatic and/or aliphatic acids (unsaturated and saturated).

Keywords: GC-MS, *Croton wagneri*, ethanoic extract.



INTRODUCCION

Croton wagneri Müll. Arg. es una planta que pertenece a la familia de las Euphorbiaceas, cuyos nombres comunes son Mosquera blanca o Croton leñoso, y no presenta sinonimia ⁽¹⁾.

Es una especie endémica de los Andes interandinos ecuatorianos catalogada como casi amenazada y no se encuentra registrada dentro Sistema Nacional de Áreas Protegidas (NT*) de acuerdo al Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Se distribuyen desde el Norte hasta la Zona Austral del país entre 1000 hasta los 2500 m.s.n.m., en las provincias de Carchi, Azuay, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Entre sus principales amenazas están el fuego provocado por el hombre, la introducción de especies como el pino, el ciprés y el pastoreo ⁽²⁾.

Arbusto o arbolito muy ramificado de hasta 4 metros, espádice de 5 cm color crema, inflorescencia café verdosa erguidas, espiga color verde amarillento. Por sus características ecológicas se considera especie nodriza en el matorral seco; arbusto que provee de protección a sus plántulas y a otras especies en un ambiente hostil, mientras ellas crecen lo suficiente para enfrentar los embates del medio por si mismas ⁽³⁾ (Figura 1).



Figura 1. *Croton wagneri* Müll. Arg.

El objetivo del artículo es proponer una práctica de laboratorio para las carreras de Química Industrial y Agropecuaria de la FECT en la UCP "Enrique Jose Varona", La Habana, Cuba. Este material aborda un resumen de algunos métodos empleados para la extracción, aislamiento, identificación y caracterización estructural de los principales componentes químicos de la planta. Constituye una guía o material auxiliar para los estudiantes en el

desarrollo de las actividades prácticas de asignaturas como la Química Aplicada, Química Orgánica y el Análisis Químico.

DESARROLLO

La familia Euphorbiaceae, posee cerca de 300 géneros y 7 500 especies de amplia distribución en las regiones tropicales y templadas. Algunos de los géneros más importantes son *Euphorbia* (Euforbio o noche buena), *Phyllanthus* (600), *Hevea* (12) (Pará o árbol de hule en Brasil); *Aleurites* (2) Árbol de aceite de Tung; *Croton* (700) aceite de Croton; *Manihot* (150) cazabe, mandioca, yuca, tapioca; *Acalypha* (450); *Ricinus* (1) Higuera, ricino; *Hippomane* (5) (manzanillo); *Pedilanthus* (14); *Traiga* (100); *Sapium* (120) y *Jatropha* (175)⁽⁴⁾.

Una descripción general se presenta a continuación de acuerdo a las siguientes características:

- Hábito: hierbas o arbustos, algunas xerofíticas y con apariencia de cacto, a menudo con savia lechosa.
- Hojas: alternas simples o compuestas, a menudo reducidas o deciduas en las especies xerofíticas; con estipulas.
- Inflorescencias: variadas, a menudo condensadas, de ahí la apariencia de una sola flor, un ciatio, plantas monoicas o dioicas
- Flores: unisexuales, actinomorfas. Cáliz de 5 sépalos o ninguno Corola de 5 pétalos o ninguno. Androceo de 1 a muchos estambres, libres o unidos, a menudo presenta un ovario rudimentario en las flores masculinas. El gineceo está constituido por un pistilo compuesto de 3 carpelos unidos, con 3 lóculos, óvulos solitarios o pareados, placentación axilar, ovario supero estilos libres o unidos en la base.
- Fruto: esquizocarpo o una capsula.
- Semilla: a menudo con una carúncula conspicua.

El género *Croton* (Euphorbiaceae), del cual se reportan varios usos interesantes en la medicina tradicional, se destaca la presencia de diterpenos de tipo labdano, ciclitolos, triterpenos, esteroides, sustancias fenólicas y flavonoides, los cuales, se caracterizan porque poseen un amplio rango de actividades biológicas, lo que sin duda promueve la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas que puedan presentar algún tipo de interés terapéutico buscándose posibles usos farmacológicos posteriores. Varias de las especies que pertenecen a este género, se conocen con el nombre popular de "sangre de drago", "sangregao", "palo sangre", "huampo", "palo de grado", "zangrado", entre otros dependiendo de las zonas geográfica y los grupos étnicos⁽⁵⁾.

Este género, se encuentra distribuido en América tropical y subtropical desde el sur de México y América Central hasta países tropicales y subtropicales de América del Sur. En Colombia éste género se encuentra distribuido en Cundinamarca, Valle del Cauca y Antioquia. La variedad química que presenta este género ofrece un arsenal de compuestos con potencial uso farmacológico, lo que justifica la importancia de su estudio en cuanto a bioprospección y utilización alternativa a la que ya poseen⁽⁶⁾.

Parte experimental

Material vegetal

La muestra utilizada consiste en la planta completa cuando estaba floreciendo. La recolección se realiza entre las 10 y las 11 AM en días soleados, utilizando para ello machetes o tijeras de poda. Las plantas colectadas se introducen en recipientes apropiados para su conservación. El secado se realiza a la sombra a temperatura ambiente.

Elaboración de los extractos

Los extractos se preparan con el material vegetal molido, realizándose tres extracciones sucesivas con 60 g de droga y 675 mL de etanol al 50 % en un extractor Soxhlet durante 20 horas. Los diferentes extractos obtenidos se concentran en evaporador rotatorio hasta 200 mL para recuperar el disolvente utilizado, a 120 rpm, a 70 °C y una presión de 500 mbar.

Análisis por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La muestra se someterá a un análisis cromatográfico utilizándose para ello un equipo de CG-EM marca Shimadzu QP2010, equipado con spittler split/splitless, con una columna capilar BP5 (30 x 0,25 mm x 0,25 µ), bajo las siguientes condiciones cromatográficas: gas portador Helio, los fragmentos se obtendrán por la técnica de impacto electrónico a 70 eV, flujo 1,2 mL/min, flujo 1:50, y volumen de inyección de la muestra 1 µL. Temperatura del horno programada: inicial 70 °C, rampa de calentamiento 10 °C/min hasta 300 °C, permaneciendo estable esta temperatura por 10 minutos. Subsecuentemente la temperatura se incrementa a un rango de 10 °C/min hasta 300 °C. Tiempo de corrida 78 minutos. Temperatura del inyector 250 °C. Los compuestos serán analizados utilizando las cartotecas o librerías del propio equipo NIST21 y NIST 107. El agente sililante utilizado es el N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) CAS 25561-30-2 Lote: 0901-1 Macherey-Nagel GmbH & C. KG.

Cada extracto o muestra sólida se evapora a sequedad y se aplica el derivatizante. En caso de que las señales presentaran escasa visualización se redisuelven con acetonitrilo (ACN) más el derivatizante.

Nota: El modelo de equipo de CG-EM y la columna pueden variar de acuerdo a las posibilidades de cada centro. No es necesario cumplir con este requisito por razones obvias, pero si es imprescindible que se cumplan los parámetros que se relacionan para cada tipo de corrida. El derivatizante puede ser sustituido por otro de los reportados por la literatura para estos fines.

CG-EM del extracto etanólico al 50%

El extracto etanólico al 50 % se someterá a un análisis por CG-ME según se describió en la metodología utilizada en la Parte Experimental. La Figura 2 muestra el cromatograma con los tiempos de retención de los diferentes componentes químicos presentes en la muestra, indicando que la mayor cantidad de compuestos químicos que contiene el extracto se registran entre los 12,5 y los 44 minutos de tiempo de retención. Los picos más intensos se encuentran entre los 28 y los 32 minutos.

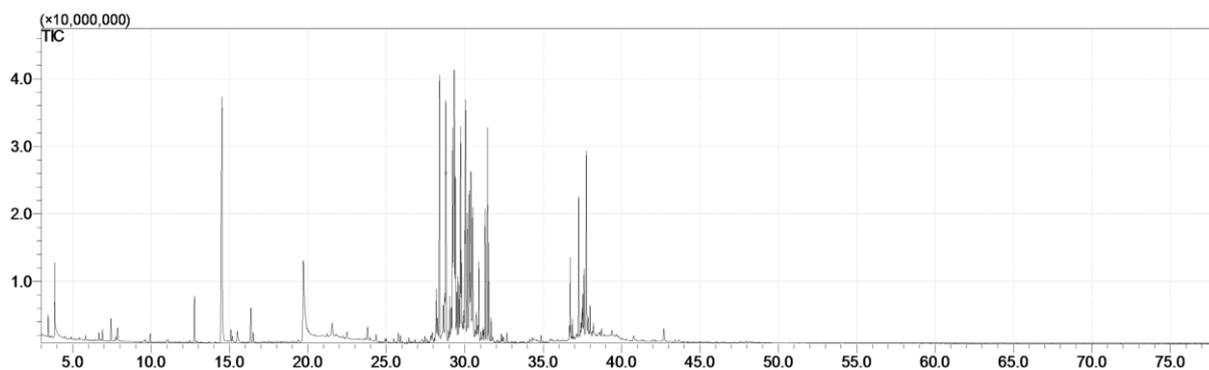


Figura 2. Cromatograma del extracto etanólico al 50 % de *Croton wagneri*

Después de correr la muestra durante 78 minutos, alrededor de 859 compuestos químicos deben ser identificados automáticamente en la muestra analizada, y entre ellos, la presencia de cinco aceites esenciales, seis triterpenos y/o esteroides, un derivado del antraceno, seis aminoácidos o sus derivados, y un flavonoide deben ser tentativamente caracterizados.

A los 3,265 y los 3,290 minutos deben aparecer dos derivados del exo-Norbornanol, de acuerdo a sus correspondientes masas moleculares: el exo-Norbornanol, dimetil (trimetilsililmetil) silil éter (256 u) y el exo-Norbornanol, pentametildisilil éter (242 u), respectivamente, sugiriendo la presencia del alcohol exo-Norbornanil en la muestra analizada como se aprecia en la Figura 3.

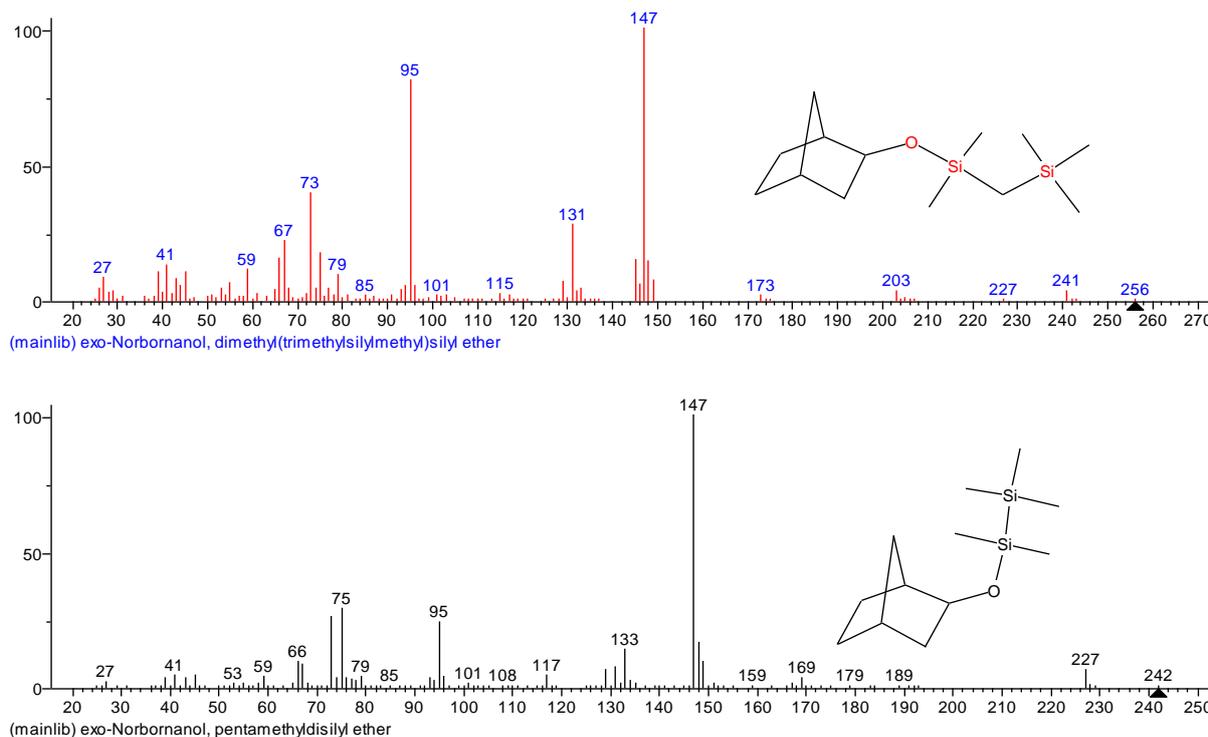


Figura 3. Espectros de masas de ambos derivados del exo-Norbornanol

Otro componente que se identifica en el extracto es el Borneol (8,570 min) con una masa molecular de 154 u (Figura 4) y un derivado glicosilado del Timol a los 37,615 min con una MM de 600 u, confirmando los resultados del tamizaje fitoquímico, que sugieren la presencia de aceites esenciales o volátiles en la muestra ⁽⁷⁾.

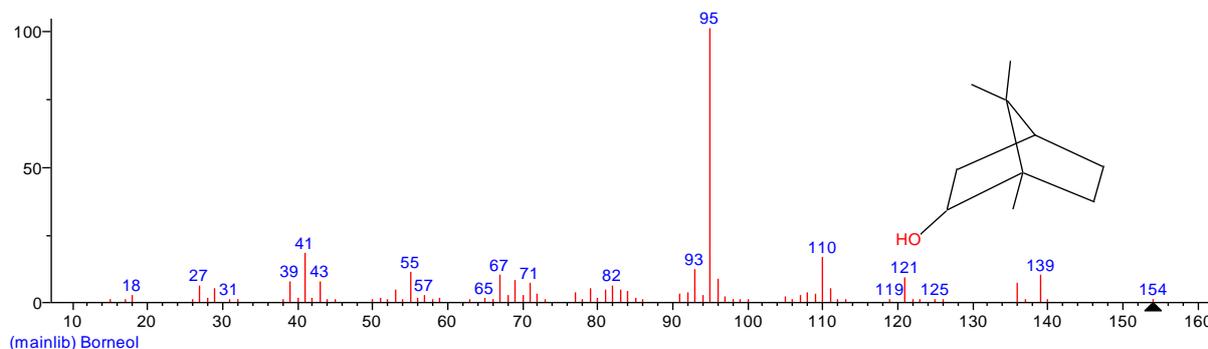


Figura 4. Espectro de masas del Borneol

Seis compuestos químicos que pertenecen al grupo de los aminoácidos: la L-Alanina (7,760 min), la Valina (8,065 min), un derivado de la L-Prolina (16,510 min), un derivado de la L-Lisina (19,485 min) y un derivado de la D-L-Alanina que se registra a los 20,705 min de tiempo de retención fueron también tentativamente identificados. El ácido L-Glutámico fue detectado a los 23,050 min, sugiriendo la presencia de varios aminoácidos en la muestra.

Varios derivados esteroidales deben ser identificados y caracterizados a partir de los 43,515 minutos de tiempo de retención. El primero debe ser el 5. beta.-Pregnan-20-ona, 17-hidroxi-3. alfa., 11. beta., 21-tris(trimetilsiloxy)-(m/z 582); el segundo debe ser el Colest-8(14)-en-3-ona, 7,15-bis(acetiloxy)-, (5. alfa., 7. alfa., 15. alfa (44,335 min y m/z 500) y el tercero el Estigmastano, 23,24-epoxi-, (5.alfa.) a los 49,950 min y una m/z 414, respectivamente.

Otros tres derivados relacionados con los compuestos esteroidales deben ser tentativamente identificados en el extracto de la planta. A los 50,150 minutos y con una m/z 671 se detecta el Pregnan-20-ona, 3,11,21-tris[(trimetilsilil)oxy]-, O-(fenilmetil) oxima, (3. alfa., 5. beta., 11. beta.); a los 51,190 min el 5.beta.-Pregnano-17,20. alfa. -diol, 3. alfa.-(trimetilsiloxy)-, metanaboronato ciclico (m/z 432) y finalmente, a los 52, 700 min con una m/z 724 el Ergostano-5,25-diol, 3,6,12-tris[(trimetilsilil)oxy]-, 25-acetato, (3. beta., 5. alfa., 6. beta., 12. beta.).

Se registra un derivado del antraceno a los 44,390 min de tiempo de retención, (antraceno, 9-etil-9,10-dihidro-9,10-dimetil) and a MM of 236 u. Finalmente, un flavonoide que pertenece al supgrupo de los rotenoides será identificado: la Rotenona, que es el único componente tipo flqyonoide que ha sido registrado por el cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas a los 57, 800 minutos de tiempo de retención con una masa molecular de 394 u (Figura 5).

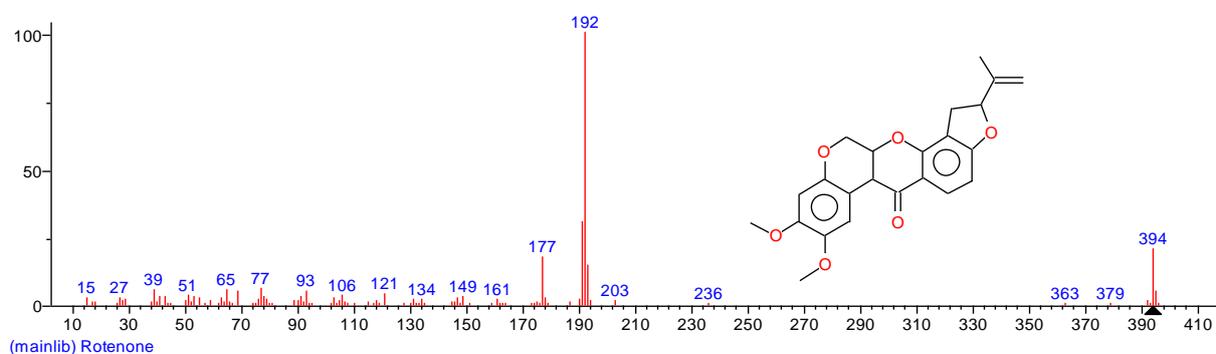


Figura 5. Espectro de masas de la Rotenona

Estos resultados en general concuerdan con lo reportado por Altamirano Pérez, 2015 ⁽⁸⁾ cuando la autora presentó sus resultados del tamizaje fitoquímico en *C. wagneri*. Nuestro grupo de trabajo encontró al menos la presencia de un compuesto químico que pertenece al grupo de las antraquinonas.

Pino y col., 2018 ⁽⁹⁾, evaluando la composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Croton wagneri* Müll. Arg. que crece en Ecuador reportó la presencia de 135 compuestos

volátiles, de los cuales los más prominentes fueron el cis-crisantenol (27,5 %) y el mirceno (19,2 %). Nuestros resultados concuerdan con este autor solamente con la presencia en el extracto de Borneol y Timol, existiendo diferencia con su reporte por la presencia de exo-Norbornanol en nuestro extracto.

CONCLUSIONES

La CG-EM permite la identificación de varios componentes químicos presentes en el extracto etanólico de *Croton wagneri*, entre ellos cinco aceites esenciales, seis triterpenos y/o esteroides, un derivado del antraceno, seis aminoácidos o sus derivados, y un flavonoide. Debido a la alta sensibilidad del método, otros constituyentes minoritarios pudieran ser también identificados tales como: azúcares reductores y sus derivados, hidrocarburos, y ácidos alifáticos y aromáticos (saturados e insaturados). Se hace necesaria la utilización de nuevos estudios tales como la CLAR-UV-IEEI-EM/EM con un gradiente y eluentes diferentes y la RMN de ^1H y ^{13}C para la detección y caracterización estructural de estos y de otros compuestos minoritarios aún sin definir para lograr su elucidación estructural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trópicos. Tropicos.org. Recuperado el 24 de marzo de 2015, de Missouri Botanical Garden: julio de 2013. <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx>.
2. León-Yáñez S. Libro Rojo de Las Plantas Endémicas del Ecuador (Segunda ed.). Quito: Missouri Botanical Garden; 2011.
3. Gutiérrez JR. Importancia de los arbustos leñosos en los ecosistemas de la IV Región. pp 253-260. En: Squeo FA, Arancio G & Gutiérrez JR. (eds). Libro Rojo de la Flora de la Región de Coquimbo y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo. Ediciones Universidad de La Serena; 2001.
4. De la Torre L, Navarrete HP, Muriel M, Macía MJ & Balslev H (eds.) Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus; 2008.
5. Aguirre Z & Kvist P. Floristic composition and conservation status of the dry forests in Ecuador. *Lyonia a journal of ecology and application*. 2005; 8(2): 2-7.
6. Arévalo Ojeda AC. Estructura y distribución espacial de *Croton wagneri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) en un gradiente del matorral seco del sur de Ecuador (Titulación de Ingeniería en Gestión Ambiental). Ecuador: Universidad Católica de Loja; 2012.

7. González J, Pérez J, Monan M and Rodríguez O. GC-MS Characterization of Ethanolic Extract from *Croton wagneri* Müll. Arg. Open Access Library Journal. 2020 ; 7: e6086. <https://doi.org/10.4236/oalib.1106086>
8. Altamirano Pérez IV. Evaluación de la actividad antioxidante de cuatro especies del género *Croton* (Tesis para optar por Título Profesional de Químico Farmacéutico). Quito : Universidad Central del Ecuador; 2015.
9. Pino JA, Terán-Portelles EC, Hernández I, Rodeiro I. and Fernández MD. Chemical Composition of the Essential Oil from *Croton wagneri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) Grown in Ecuador. Journal of Essential Oil Research. 2018 ; 30:347-352. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1470040>

BIBLIOGRAFÍA

- González Yaque J y Cuéllar Cuéllar A. Biological activities of Gossypitrin isolated from the flowers of *Talipariti elatum* S.W. NCSI Magazine. Biological Sciences 2010; 41(Special Edition)
- González Yaque J y Cuéllar Cuéllar A. Práctica de laboratorio: caracterización estructural de la gossypitrina. Pedagogía Profesional (En línea). 2016 ; 14(2) <http://www.pedagogiaprofesional.rimed.cu>
- Ortiz O, Villamizar R, and Rangel J. Applying life cycle management of colombian cocoa production. Food Science and Technology (Campinas). 2014; 34(1):62-68.
- Vázquez-Ovando A, Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Betancur-Ancona D, Salvador-Figueroa M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2016; 66(3): 239-254

Recibido: 14 de enero de 2021

Aceptado: 23 de mayo de 2021

El (los) autor(es) de este artículo declara(n) que:

Este trabajo es original e inédito, no ha sido enviado a otra revista o soporte para su publicación.

Está(n) conforme(s) con las prácticas de comunicación de Ciencia Abierta.

Ha(n) participado en la organización, diseño y realización, así como en la interpretación de los resultados. Luego de la revisión del trabajo, su publicación en la revista Pedagogía Profesional.

NO HAY NINGUN CONFLICTO DE INTERÉS con otras personas o entidades.