

Diterpenos bioactivos de *Croton malambo* H. Karst

Bioactives diterpenes from *Croton malambo* H. Karst

ALÍRICA I SUÁREZ^{1*}, ANTONIETA TADDEI², FELIPE SOJO^{3,4}, FRANCISCO ARVELO^{3,4}

Resumen

Croton malambo H. Karst. (Euphorbiaceae) es una planta de amplio uso en la medicina tradicional venezolana, especialmente en la zona occidental de nuestro país. En un amplio estudio que se lleva a cabo en nuestros laboratorios, hemos confirmado farmacológicamente muchas de las propiedades medicinales que le son atribuidas, por la población que la utiliza. La acción de sus extractos acuosos como agente antiinflamatorio, analgésico e hipoglucemiante ha sido validada en nuestra investigación; igualmente han sido determinadas las propiedades citotóxicas y el mecanismo de acción por el cual actúan algunos metabolitos secundarios aislados en el estudio fitoquímico que paralelamente al farmacológico se ha realizado. Una nueva revisión fitoquímica de la corteza y hojas de la planta permitió el aislamiento y caracterización de una serie de metabolitos de los cuales tres diterpenos: el neo-clerodano *ent*-15,16-dihidroxi-cleroda-3,14-dieno (1), el *ent*-15,16-kauren-17-ol (2) y 5-hidroxi-*cis*-dehidrocrotónina (3), mostraron poseer interesantes acciones farmacológicas. En este artículo presentamos el aislamiento y elucidación de las estructuras de estos compuestos así como la evaluación antibacteriana en bacterias Gram (+) y Gram (-) y su citotoxicidad sobre células cancerígenas humanas.

Palabras clave: *Croton malambo*, diterpenos, citotoxicidad, antibacterianos.

Abstract

Croton malambo H. Karst. (Euphorbiaceae), is a widely used plant in traditional Venezuelan medicine, especially in the west part of our country. In a comprehensive study realized in our labs, we confirmed pharmacologically some of the medicinal properties that are attributed by the people who use them. The actions as anti-inflammatory, antinociceptive and hypoglycemic of the aqueous extracts have been validated in our research, as well the cytotoxic properties, and mechanism of action of the secondary metabolites isolated from phytochemical and pharmacological studies. A new phytochemical revision yielded the isolation and characterization of a series of metabolites, between them three diterpenes: the neo-clerodane 15,16-dihydroxy-*ent*-cleroda-3,14-diene (1), *ent*-15,16-kauren-17-ol (2) and, 5-hydroxy-*cis*-dehydrocrotinin (3), which showed interesting pharmacological actions. In this paper we demonstrate the isolation and elucidation of the structure of these compounds together with antibacterial evaluation Gram (+) and Gram (-) bacteria and the cytotoxic activity on human cancer cells.

Key words: *Croton malambo*, diterpenes, cytotoxicity, antibacterial.

Introducción

Croton es el género más grande de la subfamilia Crotonoideae (Euphorbiaceae) (Webster y col., 1999) con unas 1.300 especies a nivel mundial (Berry y col., 2005) y unas 80 especies endémicas en Venezuela (Berry, 1999). Muchas plantas de *Croton* son utilizadas en América, África y Asia con diferentes propiedades terapéuticas: antiinflamatoria (Perazzo y col., 2007), antinociceptiva (Campos y col., 2002;

Nardi y col., 2006), antineoplásica (Motta y col., 2011), hipoglucemiante (Okokon y col., 2006) y para el tratamiento de problemas gastrointestinales (Hiruma-Lima y col., 2000). Sus aceites esenciales son también de uso común para tratar trastornos de salud (Salatino y col., 2007). La química y la farmacología de especies venezolanas pertenecientes al género han sido informadas (Suárez y col., 2003, 2006, 2009), demostrando que muchas de ellas tienen las propiedades que la población le atribuye: de *C. cune-*

¹ Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela,

² Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar

³ Fundación Instituto de Estudios Avanzados, IDEA

⁴ Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
E-mail: alirica1@yahoo.es

atus, una especie utilizada por los indígenas del Amazonas para tratar problemas gastrointestinales e inflamación, se comprobaron sus propiedades antiinflamatorias (Suárez y col., 2003) y antidiabéticas en animales de experimentación (Torrice y col., 2007). Igualmente, la respuesta antiinflamatoria de alcaloides glutarimídicos extraídos de sus hojas ha sido confirmada en estudios *in vitro* (Mijares y col., 2012) De la especie *C. micans* se aislaron 3,4-*seco-ent*-kauranos, los cuales mostraron una muy buena citotoxicidad sobre nueve tipos diferentes de células tumorales humanas (Suárez y col., 2008; Mateu y col., 2012) y un extracto acuoso de sus hojas mostró actividad antihistamínica (Suárez y col., 2012).

La savia de color rojo y consistencia viscosa que exudan muchas especies de *Croton* es conocida como sangre de drago (Dragon's blood), y es utilizada ampliamente en la medicina tradicional de Sudamérica para el tratamiento de heridas, inflamación, infecciones, diarreas y cáncer (Gupta y col., 2008). La savia de la especie *C. palanostigma* contiene un alcaloide llamado *taspinina*, responsable de las propiedades antiinflamatorias, así como de sanar heridas y de su actividad biológica como agente antitumoral (Sandoval y col., 2002).

C. gossypifolius se encuentra dentro de esas especies conocidas como sangre de drago, debido al color rojo de su látex. Es utilizada en la medicina tradicional de Venezuela para curar heridas y como antiinflamatoria. De especies de esta planta, colectadas en otras latitudes, se han aislado péptidos cíclicos (Quintine-Walcott, 2007), alcaloides, lignanos y flavonoides (Rodríguez, 1946) y de la especie colectada en Venezuela, se ha reportado la composición de sus aceites esenciales (Suárez y col., 2010) y la caracterización de sus metabolitos mayoritarios (Suárez y col., 2013). La química del género *Croton* ha sido bastante explorada; se ha informado del aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas y una gran variedad de diterpenos con esqueleto de labdano, kaurano, cleistanano, crotofalano y clerodano.

Croton malambo H. Karst., es una planta de amplio uso en la medicina tradicional venezolana, especialmente en la zona occidental de nuestro país. Es conocida como *palomatias*, *torco* y *cáscara de lombrices*. Se utiliza para tratar enfermedades tales como: diabetes, diarrea, reumatismo, úlceras gástricas, adicionalmente, como antiinflamatorio y analgésico. Un extracto acuoso de su corteza mostró actividad antinociceptiva en ratas (Suárez y col., 2003). Estudios realizados en nuestros laboratorios, han confirmado farmacológicamente muchas de las propiedades medicinales atribuidas a esta planta por la

población que la utiliza. La acción de sus extractos acuosos como agente antiinflamatorio, analgésico e hipoglucemiante (resultados aún sin publicar) ha sido validada en esas investigaciones, igualmente han sido determinadas las propiedades citotóxicas y el mecanismo de acción por el cual actúan algunos metabolitos secundarios aislados en el estudio fitoquímico que se ha realizado paralelamente al farmacológico (Morales y col., 2005). Dados los interesantes resultados logrados con los compuestos aislados, se planteó revisar nuevamente la fitoquímica de la corteza y hojas de la planta y, como parte de esos resultados se presenta en este artículo el aislamiento y la caracterización de un diterpeno de tipo *ent*-kaurano y dos con esqueleto clerodano, reportados por primera vez para esta especie.

Materiales y métodos

PROCEDIMIENTO GENERAL

Los puntos de fusión fueron determinados utilizando un instrumento Kofler *hot-stage* y se reportan sin corregir. Los espectros de IR fueron tomados en un espectrómetro Perkin-Elmer 1320. Los espectros de ^1H y ^{13}C NMR se tomaron en CDCl_3 y MeOD en un equipo JEOL 270 MHz y las resonancias están referenciadas con respecto a la señal residual del disolvente utilizado. Los espectros de masa se tomaron en un equipo Varian modelo Saturno 2000. Los procedimientos de aislamiento por cromatografía de columna se evaluaron empleando cromatografía de capa fina sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄). En el proceso de revelado se utilizó una lámpara de UV y como reactivo revelador una disolución de *p*-anisaldehído en MeOH.

MATERIAL BOTÁNICO

La corteza y hojas de *C. malambo* fueron colectadas en Santa Bárbara del Zulia, Venezuela, y la planta identificada por el Dr. Stephen Tillett. Un ejemplar de la muestra, representativo de la colección registrada con el código MYF 17824, ha sido depositado en el Herbario «Dr. Víctor Manuel Ovalles» de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

El material vegetal, secado a temperatura ambiente, fue sometido a maceración utilizando metanol por 72 h, el disolvente fue evaporado a presión reducida y el material resultante re-disuelto en una

mezcla MeOH/H₂O (50:50) y sometido a partición sucesivamente con hexano, diclorometano y acetato de etilo; la mezcla hidro-metanólica fue liofilizada previa evaporación del metanol. El extracto y las diferentes fracciones se evaluaron por cromatografía en capa fina y sus componentes se separaron por cromatografía preparativa y de columna en fase normal o reversa, utilizando las mejores condiciones de separación obtenidas por CCF. Utilizando estos procedimientos se realizó una cromatografía de columna en fase normal a la fracción de CH₂Cl₂ (600 mg). Se utilizó gel de sílice como soporte y se eluyó con una mezcla CHCl₃/Hex de polaridad creciente (7:3) hasta 100% CHCl₃. De esta columna se colectaron 25 eluatos, los cuales al ser unidos de acuerdo a criterios de R_f que señalaban similar composición, permitieron obtener diez fracciones. De los compuestos 1, 2 y 3 se obtuvo lo siguiente: 1 (105 mg), 2 (43 mg), y 3 (52 mg). Otros compuestos previamente aislados como *t*-dehidrocrotónina, cajucarínolido, isocajucarínolido, 16 α , 17 β -dihidroxi-ent-kaurano se aislaron igualmente en esta separación.

La evaporación de la sub-fracción 22 de la cromatografía realizada a la fracción de diclorometano, ofreció un residuo aceitoso que fue recromatografiado en columna de gel de sílice, usando como eluyente acetato de etilo:hexano (7:3), las fracciones que se visualizaron por CCF con un solo compuesto fueron unidas y evaporadas para ofrecer un sólido color miel de punto de fusión 119-121 °C, que resultó ser el compuesto 1.

La sub-fracción 8 (70 mg) de la columna previamente mencionada, se sometió a una nueva cromatografía en columna de gel de sílice, usando para su elución una mezcla cloroformo-hexano (9:1); los eluatos se analizaron por cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a criterios de similitud en R_f. De la reunión de las fracciones mayoritarias se obtuvo un sólido blanco que posteriormente se recrystalizó en CHCl₃/Hex, para ofrecer 43 mg del compuesto 2.

El compuesto 3 se obtuvo de la sub-fracción 15 (70 mg) como un residuo de color marrón, el cual mostraba pocas impurezas al ser visualizado por CCF, se lavó varias veces con mezclas de diclorometano:hexano (2:8), obteniéndose un sólido amorfo de color marrón claro, que al ser caracterizado resultó ser el compuesto 3.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA LÍNEAS CELULARES HUMANAS

Se emplearon las líneas celulares MCF-7 (carcinoma de mama sin sobre-expresión del gen HER2/c-erb-2), SKBR3 (carcinoma de mama en el cual el gen HER2/c-erb-2 está sobre-expresado), PC3 (prós-

ta), HeLa (cáncer cervical) y PANC-1 (páncreas). Las líneas celulares de cáncer de mama se hicieron crecer con medio Dulbecco modificado (DMEM; Gibco) suplementado con suero fetal bovino inactivado (FBS; Gibco) 10% (v/v), 2 mM glutamax (Gibco), 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las líneas de carcinoma de próstata (PC3), carcinoma cervical (HeLa) y carcinoma epitelial de páncreas (PANC-1), se hicieron crecer en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS; Gibco), 2 mM glutamax (Gibco), 100 unids/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Se utilizaron fibroblastos dérmicos humanos como células control, se obtuvieron de un cultivo primario y se hicieron crecer en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v) (FBS; Gibco), 2 mM glutamax (Gibco), 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las células fueron incubadas con humedad controlada con 5% CO₂, a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Para los tratamientos, las células se colectaron, contaron y se re-suspendieron en medio de cultivo fresco e incubaron en platos esterilizados de 96 pozos.

El mantenimiento de las líneas celulares adherentes de carcinoma mamario MCF-7, de próstata PC-3 y de cultivos primarios (fibroblastos dérmicos), se realizó en frascos de cultivo con medio Dulbecco modificado (DMEM) para garantizar su proliferación y crecimiento. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina y 50 µg/uL de estreptomina. Las células fueron incubadas con humedad controlada con 5% CO₂, a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

MEDICIÓN DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la proliferación celular, se construyeron curvas de viabilidad que permitieron determinar las CI₅₀ de cada uno de ellos, tanto en las líneas celulares tumorales como en la no tumoral (fibroblastos), obteniendo así la concentración de cada compuesto que origina la muerte de la mitad de la población celular. Posteriormente, 5.000 células fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos (grado cultivo de tejidos) por 24 horas. Seguidamente, las células se trataron con diversas concentraciones de 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 15; 25; 100 µg/ml respectivamente de cada uno de los diterpenos durante 72 horas, evaluando posteriormente la viabilidad de las mismas mediante el método de MTT. En este método se utiliza el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio

(MTT), el cual es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenasas presentes en mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de formazan de color azul oscuro insolubles en medio acuoso. Este método permite cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después de la aplicación del compuesto, lo que indica que a mayor cantidad de células vivas mayor densidad óptica y menor citotoxicidad. Para ello, las células fueron incubadas con MTT (0,2 mg/mL) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se colocaron en cada pozo 100 µL de DMSO para detener la reacción colorimétrica y se realizó la lectura de la absorbancia $\lambda = 570$ nm en un lector de placas de ELISA. La CI_{50} se definió como el valor de concentración de cada compuesto que produjo una reducción del 50% de la absorbancia con respecto a las células control (cada línea celular sin compuesto). Estos valores permitieron obtener mediante el programa Origin versión 6.0, gráficas dosis-respuesta y el valor de CI_{50} de cada compuesto en cada una de las líneas celulares mencionadas.

ENSAYOS ANTIBACTERIANOS

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de difusión sobre placas de agar (Janssen y col., 1987). Se preparó una suspensión de cada compuesto en la mezcla de solventes $CHCl_3$ /Acetona/ EtOH/ H_2O 15:15:20:50 (C = 1-4 mg/ml, 5 µl). Las referidas suspensiones fueron colocadas en discos de papel absorbente ($\Phi = 5$ mm). La actividad biológica se evaluó contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). *P. aeruginosa* y *B. cereus* fueron incubados a 30°C, mientras que *E. coli* y *S. aureus* fueron incubados a 37°C. Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: Amikacina, Ampicilina y Ofloxacina, como control negativo se empleó la mezcla de solventes utilizada para suspender los derivados preparados. Para la realización de los bioensayos 0,1 ml de los cultivos microbianos crecidos en placas LB preparado en el laboratorio (Sambrook y col., 1989), y ajustados en solución salina (0,85% v/v) a la concentración correspondiente al Standard de McFarland N° 1, fueron sembrados en superficie en agar Mueller-Hinton (Merck 1.05437). Sobre el césped bacteriano se colocaron los discos de papel de filtro con las diferentes muestras.

Discusión de resultados

La caracterización estructural de los compuestos puros fue obtenida utilizando técnicas espectroscópi-

cas como resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM). Los datos obtenidos se compararon con los informados previamente en la literatura.

El compuesto **1**, fue aislado como un sólido pegajoso de p.f. 119-121 °C. Su fórmula molecular se estableció sobre la base de la información de su espectro de masas, combinado con la data obtenida por experimentos de RMN de ^{13}C y DEPT 135. El espectro de IR, mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (3305 cm^{-1}) y, para enlaces olefinicos (1665 cm^{-1}), como las señales más importantes a ser consideradas.

Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C mostraron similitudes con diterpenos de tipo neo-clerodano aislados de algunas especies de *Croton* (Siems y col., 1992), resultando de especial utilidad la comparación con la data espectroscópica de *t*-dehidrocrotononina, aislado de *C. cajucara* (Kubo y col., 1991), y también por nosotros de la especie en estudio. La presencia de tres metilos terciarios se detectó a δ_H 1,05, δ_C 15,4 correspondientes a C-20 en el sistema decalina, δ_H 1,05; δ_C 19,2 (C-19), un metilo vinílico se visualizó a δ_H 1,01; δ_C 16,9 característico del metilo C-18 en la estructura de clerodanos. La búsqueda en la literatura permitió comparar nuestros datos con portulide aislado de *Portulaca grandiflora* (Ohasaki y col., 1984), con kolavenol, aislado de *Croton oblongifolius* (Youngsa-ad y col., 2007) y de algunas especies *Solidago* (Sawabe y col., 2000) y con bincatriol aislado de *Bacharis incarum* (San-Martín y col., 1986). Sin embargo, se encontraron diferencias y similitudes en la comparación con cada uno de ellos. Las señales de la subestructura de decalina encontradas en kolavenol fueron idénticas a las del compuesto analizado, igualmente la *z*-olefina que posee los dos hidroximetilenos evidenciadas en **1**, está presente en las estructuras de portulide y de bincatriol. La combinación de los datos obtenidos con los experimentos HMQC y HMBC, claramente nos permitieron proponer la estructura del clerodano **1**. Finalmente toda la data espectroscópica coincidió con la estructura del *ent*-15,16-dihidroxi-cleroda-3,14-dieno (**1**), aislado de *Cipadessa fruticosa* (Rojatkar y Nagasampagi, 1994).

El compuesto **2** fue obtenido como un sólido blanco amorfo de p.f. 135-137°C. Su espectro de masas (EI-EM) dio un ion molecular de m/z 288. Este dato, junto con la información provista por RMN de carbono, indicó una fórmula molecular de $C_{20}H_{32}O$ contentiva de 5 grados de insaturación, la señal característica de H-13 a δ 2,53, sugirió un diterpeno de tipo kaurano. El espectro de RMN de ^{13}C (Tabla II) analizado conjuntamente con un experimento DEPT

mostró la presencia de tres grupos metilos terciarios a δ_C 33,6; 21,6 y 17,7. Se evidenciaron señales pertenecientes a una olefina trisustituida a δ_C 146,1 (s) y 136,2 (d). Igualmente nueve metilenos, incluyendo uno oxigenado a δ_C 61,4; tres metinos y tres carbonos cuaternarios no-oxigenados se encontraron presentes en la estructura de este compuesto. Todos los protones y carbonos fueron asignados por combinación de las técnicas de RMN en 2D, HMQC, HMBC y COSY. Las correlaciones observadas entre el grupo hidroxil-metileno y los carbonos olefinicos con el C-13, claramente ubicaron la olefina entre C-15 y C-16 y al grupo hidroxilo en el C-17. Toda la data acumulada coincidió con la reportada para *ent*-kauren-15-en-17-ol (**2**) (Bandara y col., 1988).

El compuesto **3**, se aisló como un aceite incoloro, su espectro IR mostró bandas de absorción atribuidas a grupos hidroxilo a 3400 cm^{-1} , para γ -lactona a 1765 cm^{-1} , carbonilo α,β -insaturado a 1668 cm^{-1} y grupos olefinicos a 1645 cm^{-1} . El espectro de RMN de ^1H , mostró señales atribuibles a un grupo metilo terciario (δ_H 1,95; s), uno secundario a δ_H 1,21; d, $J = 7,2\text{ Hz}$. Un anillo furánico se evidenció con las resonancias de protones a δ_H 6,45; 7,43 y 7,47 todas como señales de tipo singletes anchos; se distinguió un protón olefinico a δ_H 5,80 (s). El espectro de RMN de ^{13}C corroboró la cetona α,β -insaturada a δ_C 198,4, y la γ -lactona a δ_C 176,7. El anillo furánico se corroboró por las señales a δ_C 144,0; 139,9; 124,4; 108,3 y un carbono cuaternario oxigenado se presentó a 72,5 ppm. Los espectros de RMN de ^{13}C y DEPT junto con el espectro de masas, el cual mostró un ion molecular de 330 m/z , permitieron deducir la estructura de un diterpeno tetracíclico con una formula molecular de $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5$, señalando nueve grados de insaturación en la molécula. Con la ayuda de los experimentos HMQC, HMBC, y COSY, todas las señales de carbonos

y protones fueron asignadas. La data acumulada mostró una similitud muy cercana a *t*-dehidrocrotolina (**5**) excepto por la ausencia del grupo metilo C-19. Los experimentos de RMN en 2D ubicaron al grupo hidroxilo sobre el carbono C-5. La identificación del compuesto **3** como 5-hidroxi-*cis*-dehidrocrotolina fue confirmada por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura respecto a *C. shiedeanus* (Puebla y col., 2005). Todos los compuestos descritos **1**, **2** y **3**, se reportan por primera vez para la especie (Figura 1).

Los diterpenos obtenidos se evaluaron utilizando el método de MTT (Mossman, 1983), en 5 diferentes líneas celulares de cáncer humano y fibroblastos epidérmicos humanos, obteniéndose valores de IC_{50} entre 0,017- 0.20 μM (Tabla I). Los resultados mos-

Tabla I
Datos de RMN de ^{13}C (δ en ppm)

Carbono	1	2	3
1	18,4	42,2	37,7
2	26,6	18,7	198,4
3	120,2	43,8	127,3
4	142,6	33,4	154,3
5	38,1	48,6	72,5
6	37,1	19,3	25,0
7	27,4	39,4	29,7
8	36,9	49,1	33,2
9	38,6	56,1	50,8
10	47,1	39,4	49,0
11	37,5	18,7	45,6
12	28,0	25,8	71,2
13	144,0	41,4	124,4
14	126,0	40,6	108,3
15	57,6	136,2	144,0
16	60,2	146,1	139,9
17	15,1	61,4	17,2
18	16,9	33,6	18,7
19	19,2	21,6	176,7
20	18,1	17,7	—

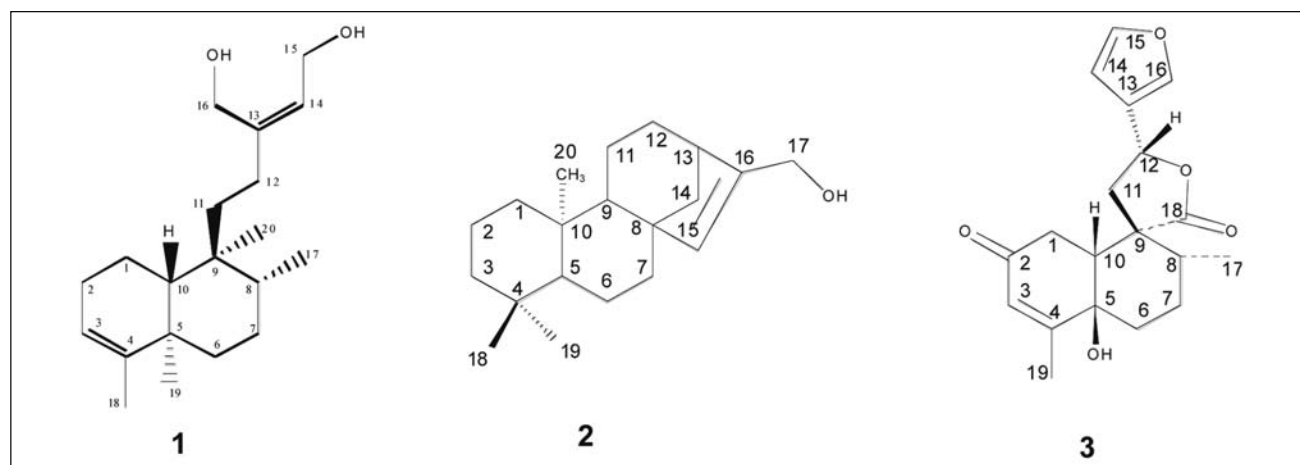


Figura 1. Estructuras de los diterpenos caracterizados

traron que los compuestos obtenidos presentan actividad sobre las líneas tumorales, siendo uno de los más prominentes el compuesto **3**, ya que reporta una citotoxicidad amplia sobre las MCF-7, PC3 y páncreas; afectando en menor proporción a las células control, mostrando así una alta selectividad por las células tumorales MCF-7 y de páncreas. De igual manera, el compuesto **2** es activo para las dos líneas evaluadas con muy baja actividad sobre las células control. Por otra parte, el compuesto **1** mostró mayor acción por las células de páncreas con respecto a las otras líneas tumorales pero con una igual incidencia sobre las células control, este compuesto fue previamente evaluado sobre cinco líneas de cáncer humano, diferentes a las ensayadas en nuestros experimentos, mostrando valores entre 3,56 - 6,58 µg/mL (Pudhom y Sommit, 2011).

Tabla II
Datos de RMN de ^1H δ (mult, J in Hz)

Hidrógeno	1(MeOD)	2(CDCl ₃)	3(CDCl ₃)
1	1,58 (m) 1,72 (m)	1,36 (m)	2,58(dd, 9,54; 16,8) 3,34 (dd, 5,6; 16,8)
2	2,02 (sa)	1,55 (m)	---
3	5,17 (sa)	1,40 (d, 5,94) 2,08 (d, 5,94)	5,88 (s)
5	-	1,75 (s)	---
6	1,17 (m)		
7	1,71 (m) 1,44 (m) 1,50 (m)	1,50 (sa) 1,66 (m)	1,09 (m) 1,54 (m)
8	1,19 (m)	---	---
9	---	1,00 (sa)	---
11	1,14 (m) 1,24 (m)	1,57 (m)	2,30 (dd, 9,3; 13,5) 2,85 (dd, 7,3; 13,8)
12	1,42	1,36 (m)	5,33 (dd, 7,2)
13	---	2,53 (sa) 1,75 (d, 2,70)	---
14	5,46 (t, 6,94)	1,01 (d, 2,72)	6,42 (s)
15	4,13 (d, 6,94)	5,33 (sa)	7,43 (s)
16	4,08 (sa)	---	7,47 (s)
17	0,84 (d, 4,95)	4,16 (sa)	1,21 (d, 7,2)
19	1,01 (s)	0,81 (s)	---
20	1,05 (s)	1,07 (s)	---

Tabla III
Citotoxicidad de los diterpenos
sobre líneas celulares de cáncer humano
Cl₅₀ (mM) sobre líneas de células tumorales

Compuestos	MCF-7	SKBr3	PC3	HeLa	Páncreas	Fibroblastos
1	0,213	0,182	0,109	0,135	0,058	0,060
2	0,187	0,165	---	---	---	0,417
3	0,017	0,154	0,074	0,131	0,020	0,151
Taxol	0,0002	0,0012	0,00005	0,0005	0,0001	0,0009

Los resultados son expresados como valores de Cl₅₀ (mM), promedio de tres determinaciones.

Tabla IV
Índice de selectividad (S)

Compuestos	MCF-7	SKBr3	PC3	HeLa	Páncreas
1	0,3	0,3	0,6	0,4	1,0
2	2,2	2,5	---	---	---
3	8,8	0,9	2,0	1,2	7,5

Tabla V
Actividad antibacteriana de los diterpenos
1, 2 y 3, expresada como diámetros del halo
de inhibición (mm)

Microorganismo	Compuestos			Controles			
	1	2	3	AN	AM	O	S
Bacterias Gram (+)							
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	18	13	25	18	25	---
<i>Bacillus cereus</i>	12	18	10	25	15	25	---
Bacterias Gram (-)							
<i>Escherichia coli</i>	---	16	---	20	15	25	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	17	---	20	28	25	---

Concentración de los compuestos = 1-2 mg/ml

--- = No inhibición

Controles positivos= AN: amikacina, AM: ampicilina, O: ofloxacina.

Control negativo= S: solvente/mezcla de solventes

Los resultados de la evaluación antibacteriana muestran una acción específica contra los organismos evaluados. El diterpeno de tipo kaurano **2**, resultó ser el más potente de los tres evaluados, produciendo halos de inhibición de dimensiones comparables a los de controles positivos como la ampicilina. El compuesto **3** resultó activo contra las bacterias Gram (+), *S. aureus* y *B. cereus*. El clerodano **1** presentó una actividad moderada contra las bacterias Gram (+) y contra *P. aeruginosa*, una bacteria particularmente resistente a diferentes antibióticos.

Conclusiones

Los resultados antes expuestos, donde se demuestra la actividad sobre células tumorales humanas de los diterpenos 1, 2 y 3 así como su acción antibacteriana, se suman a los previamente reportados con esta planta, los cuales demuestran que *Croton malambo* puede ser considerada una planta medicinal con gran potencial terapéutico, y convierte a estos diterpenos en estructuras promisorias para continuar investigando en diferentes blancos farmacológicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del FONACIT a través de los Proyectos PEII-705 y P-2013000385; al Consejo de Desarrollo Científico y

Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH) por la Ayuda Institucional 41-2012, y al Dr. Antonio S. Suárez por sus recomendaciones en el estudio de esta planta.

Referencias bibliográficas

- Bandara BMR, Wimalasiri WR, Macleod JK. 1988. Ent-kauranes and oleananes from *Croton lacciferus*. *Phytochem* 27: 869-871.
- Berry EP. *Croton*. In: Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Eds: Berry P, Yatskievich K, Holst B. Missouri Botanical Garden Press. USA, 1999. pp. 111-133.
- Berry P, Hipp AL, Kenneth J, Wurdack KJ, van Ee B, Riina R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS AND TRNL-TRNF DNA sequence data. *Am J Botany* 92: 1520-1534.
- Campos AR, Albuquerque FAA, Rao VSN, Maciel MAM, Pinto AC. 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia* 73(14): 116-120.
- Gupta D, Bleakey B, Gupta RK. 2008. Dragon's blood: Botany, Chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol* 115: 361-380.
- Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodríguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza Brito ARM. 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 69: 229-234.
- Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Review. *Aspects of Tests Methods. Planta Médica* 53: 395-398.
- Kubo I, Asaka Y, Shibata K. 1991. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, *cis*-dehidrocrotónin and *trans*-dehidrocrotónin from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 30: 2545-2546
- Mateu E, Chávez K, Riina R, Compagnone RS, Delle Monache F, Suárez AI. 2012. New 3,4-seco-ent-kaurane dimmers from *Croton micans*. *Natural Product Comm* 7: 5-8.
- Mijares MR, Martínez GP, Chirinos P, Suárez AI, Compagnone RS, Blanco Z, De Sanctis JB. 2012. Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotóna sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato. *Rev Fac Farm* 75: 28-34.
- Morales A, Perez P, Mendoza R, Compagnone RS, Suárez AI, Arvelo F, Ramírez JL, Galindo-Castro I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 α -17 β -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters* 218: 109-116.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Motta LB, Furlan CM, Santos DYAC, Salatino MLF, Duarte-Almeida JM, Negri G, De Carvalho JE, Ruiz ALTG, Cordeiro I, Salatino A. 2011. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Braz J Pharmacog* 21: 972-977.
- Nardi GM, Dalbó S, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Ribeyrodo-Valle RM. 2006. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 107: 73-78.
- Okokon JE, Basse AL, Obot J. 2006. Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* Müll. Arg. (Thunder plant) in alloxan diabetic rats. *African J Traditional CAM* 3: 21-26.
- Ohsaki A, Matsumoto K, Shibata K, Tokoroyama T, Miura I. 1984. Portulide, a clerodane diterpenoid from *Portulaca grandiflora* Hook. *Chem Letters* 1521-1522.
- Perazzo FF, Carvalho JC, Rodrigues M, Morais EKL, Aparecida M, Maciel M. 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Braz J Pharmacog* 17: 521-528.
- Pudhom K, Sommit D. 2011. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius*. *Phytochem Letters* 4: 147-150.
- Puebla P, Correa SX, Guerrero M, Carron R, San Feliciano A. 2005. New *cis*-clerodanes diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Chem Pharmac Bull* 53: 178-179.
- Quintyne-Walcott S, Maxwell AR, Reynolds WF. 2007. Croto-gossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *J Natural Products* 70: 1374-1376.
- Rodríguez Caballero RL. 1946. Contribución al estudio de targuá (*Croton gossypifolius* Vahl). Tesis. Universidad de Costa Rica, Fac de Ciencias, San José, Costa Rica.
- Rojatkar SR, Nagasampagi BA. 1994. Diterpenes from *Cipadessa fruticosa*. *Phytochemistry* 17: 505-507.
- Salatino A, Faria-Salatino ML, Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc* 18: 11-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3, Appendix A. 2nd. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. pp A.1.
- Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Ángeles FM, Lao J, Bustamante S, Millar M. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol* 80: 121-129.
- San-Martin A, Givovich A, Castillo M. 1986. Neo-clerodane diterpenoids from *Baccharis incarum*. *Phytochemistry* 25: 264-266.
- Sawabe A, Minemoto K, Minematsu T, Morita M, Ouchi S, Okamoto T. 2000. Characterization of acetylenes and terpenoids isolated from *Solidago altissima* L. *Bull Inst Compr Agr Sci Kinki Uni.* 8: 81-88.
- Siems K, Domínguez A, Jakupovic J. 1992. Diterpenes and other constituents from *Croton cortesianus*. *Phytochemistry* 31: 4363-4365.
- Suárez AI, Salazar-Bookaman MM, Compagnone RS, Tillett S, Delle Monache F, Digulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malmbo* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 88: 11-14.

- Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 105: 99-101.
- Suárez AI, Chávez K, Delle Monache F, Vasquez L, Orsini G, Compagnone RS. 2008. New 3,4-seco-entkaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Natural Product Comm* 3: 319-322.
- Suárez AI, Chávez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis JB. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Natural Product Comm* 4: 1547-1550.
- Suárez AI, Oropeza M, Vásquez L, Tillett S, Compagnone RS. Chemical composition of essential oil of *Croton gossypifolius* Vahl from Venezuela. 2010. *Natural Product Comm* 69: 97-99.
- Suárez AI, Chávez K, Blanco Z, Tillett S, Torrico F, Compagnone RS. 2013. Estudio fotoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* Vahl colectada en Venezuela. *Rev Latinoam Química* 3: 163-170.
- Suárez AI, Mateu E, Chávez K, Compagnone RS, Orsini G, Tillett S, Riina R, Alcázar W, Salazar-Bookaman M, Arvelo F, Israel A. 2012. Perfil fitoquímico y farmacológico de *Croton micans* Sw. Una visión general. *Rev Fac Farmacia* 75: 1-13.
- Torrico F, Cepeda M, Guerrero G, Meléndez F, Blanco Z, Canelon DJ, Díaz B, Compagnone RS, Suárez AI. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Pharmacog* 17: 166-169.
- Webster G, Berry P, Armbruster W, Esser H, Gillespie L, Hayden J, Levin G, Secco R, Heald S. Euphorbiaceae. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Eds: Berry P, Yatskievich K, Holst B. Missouri Botanical Garden Press. USA, 1999. pp. 72-228.
- Youngsa-ad W, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, Ruchirawat S, Prawat H, Kittakoop P. 2007. Diterpenoids from the roots of *Croton oblongifolius*. *Planta Médica* 73: 1491-1494.