



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANA,
ANTIPARASITARIA, DIURETICA Y CITOTÓXICA DE ESPECIES
MEDICINALES NATIVAS DEL GÉNERO *EUPHORBIA*. *E. SERPENS* KUNTH,
E. SCHICKENDANTZII HIERON Y *E. COLLINA* PHIL., CARACTERIZACIÓN
DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS**

HEBE LINA ALVAREZ

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

Año 2023

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 1-3-2015 y el 1-3-2023, bajo la dirección de Doctor César Atilio N. Catalán, Profesor Emérito de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT); y la co-dirección del Doctor Ricardo Toso, Profesor titular de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Pampa.



Hebe Lina Alvarez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mercedo
la calificación de (.....)

AGRADECIMIENTOS

Al Director de Tesis Dr. César Atilio Nazareno Catalán.

Al CoDirector de Tesis Dr. Ricardo Enrique Toso.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Al departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS.

A la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT.

A la Mg. Delia Susana Oriani.

Al Mg. Alejandro Bucciarelli.

A Román y mis padres.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar tres especies vegetales empleadas por la medicina tradicional: *Euphorbia serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, para evaluar la presencia de actividad, diurética, antiparasitaria, citotóxica y antimicrobiana, e identificar y aislar el/los principio/s activo/s. Del material vegetal desecado se realizaron extracciones seriadas con solventes de polaridad creciente, hexano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos respectivamente. Además, a partir del material desecado se obtuvieron extractos hidroalcolicos por maceración y extractos acuosos por infusión.

En el **Capítulo 1** se evaluó la actividad diurética de *E. serpens*, debido a su uso como diurética en la medicina tradicional. Utilizando modelos *in vivo* se ensayaron los extractos hexánico, metanólico y de acetato de etilo de *E. serpens*, y acuosos e hidroalcolicos de las tres especies vegetales estudiadas. No se encontró actividad diurética, para ninguna de las plantas.

En el **Capítulo 2** se evaluó la actividad antihelmíntica de las tres especies vegetales, exponiendo larvas de *Ancylostoma caninum* a extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos; y huevos de *Haemonchus contortus* a extractos hidroalcolicos. Los extractos metanólicos obtenidos de las tres especies tuvieron efecto inhibitorio sobre la motilidad larval. El extracto metanólico de *E. collina*, además, inhibió la eclosión de huevos. Los ensayos confirmaron el efecto antihelmíntico de *E. collina*.

En el **Capítulo 3** se evaluó la actividad citotóxica de las tres especies de *Euphorbia* utilizando el test de letalidad de *Artemia salina*, exponiendo larvas a diferentes concentraciones de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos. Todos los extractos mostraron actividad citotóxica al menos en una de las dosis empleadas. El extracto hexánico de *E. collina* fue el que presentó la mayor actividad. Además, se realizaron ensayos de toxicidad *in vivo* de extractos metanólico, hidroalcolico y hexánico de *E. collina*, los cuales no mostraron toxicidad en ratones.

En el **Capítulo 4** se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*,

contra *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Fusarium verticillioides*, en métodos *in vitro*. Se determinó que los extractos de acetato de etilo y metanólico de *E. collina*, y metanólico de *E. schickendantzii*, tuvieron actividad antimicrobiana. Los extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina* crudos, se reunieron y se fraccionaron mediante una cromatografía en columna. De las fracciones obtenidas, una de ellas, denominada G10-11 inhibió el 50 % del crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

En el **Capítulo 5** se realizó una marcha fitoquímica con extractos etanólicos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, determinando la presencia de compuestos esteroidales, triterpenos, flavonoides, taninos, fenoles, saponinas, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. De la fracción G10-11 se aisló una mezcla de 51 % de cicloartenol y un 49 % de 24-metilenocicloartenol.

Palabras clave: *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii*, *Euphorbia collina*, actividad antimicrobiana, actividad antiparasitaria, actividad citotóxica, etnofarmacología.

ABSTRACT

The aim of this work was to study three species used by traditional medicine: *E. serpens*, *E. schickendantzii* and *E. collina*, to evaluate the presence of diuretic, antiparasitic, cytotoxic and antimicrobial activity; identify and isolate their active principles. Sequential extractions were carried out on dry plant with solvents of growing polarity, hexane, ethyl acetate and methanol, obtaining hexane, ethyl acetate and methanolic extracts, respectively. Also, hydroalcoholic extracts by maceration and aqueous extracts by infusion from the dry material were obtained.

In **Chapter 1**, the diuretic activity of *E. serpens* was evaluated due to its use as a diuretic in traditional medicine. Using *in vivo* models, the hexane, methanolic and ethyl acetate extracts of *E. serpens* and aqueous and hydroalcoholic extracts of the three species were tested. No diuretic activity was found for any of the plants.

In **Chapter 2**, the anthelmintic activity of the three plant species was evaluated, exposing *Ancylostoma caninum* larvae to hexanic, ethyl acetate and methanolic extracts; and *Haemonchus contortus* eggs to hydroalcoholic extracts. The methanolic extracts obtained from the three species had an inhibitory effect on larval motility. The methanolic extract of *E. collina* also inhibited the hatching of eggs. The tests confirmed the anthelmintic effect of *E. collina*.

In **Chapter 3**, the cytotoxic activity of the three Euphorbia species was evaluated using the *Artemia salina* lethality test, exposing larvae to different concentrations of hexane, ethyl acetate and methanolic extracts. All the extracts showed cytotoxic activity at least in one of the doses used. The hexane extract of *E. collina* was the one that presented the highest activity. In addition, *in vivo* toxicity tests of methanolic, hydroalcoholic and hexanic extracts of *E. collina* were carried out, which did not show toxicity in mice.

In **Chapter 4**, the *in vitro* antimicrobial activity of the hexane, ethyl acetate and methanolic extracts of *E. serpens*, *E. schickendantzii* and *E. collina* was evaluated against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Fusarium verticillioides*. It was determined that the ethyl acetate and methanolic extracts from *E. collina*, and methanolic extracts from *E. schickendantzii*, had antimicrobial activity. The crude *E. collina* hexane and ethyl acetate extracts were combined and fractionated by column chromatography. Of the fractions obtained, one of them, called G10-11, inhibited 50 % of the growth of *Fusarium verticillioides*.

In **Chapter 5** a phytochemical screening was carried out with ethanolic extracts of *E. serpens*, *E. schickendantzii* and *E. collina*, determining the presence of steroidal compounds, triterpenes, flavonoids, tannins, phenols, saponins, lipids, proteins

and carbohydrates. In the fraction G10-11, a mixture of 51 % cycloartenol and 49 % 24-methylenecycloartenol was isolated.

Keywords: *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii*, *Euphorbia collina*, antimicrobial activity, antiparasitic activity, cytotoxic activity, ethnopharmacology.

En la versión final incluir:

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bach', written over a horizontal line.

Firma del Director

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Marco teórico.....	1
Familia <i>Euphorbiaceae</i>	3
Género <i>Euphorbia</i>	9
Antecedentes de uso en medicina tradicional del género <i>Euphorbia</i> . Etnofarmacología	20
Euphorbias de Argentina	23
<i>Euphorbia serpens</i> Kunth. Antecedentes y estudio fitoquímico. Estructura de los metabolitos identificados.....	27
Descripción Botánica.....	27
Efectos farmacológicos probados	28
Composición química	29
<i>Euphorbia schickendantzii</i> Hieron. Antecedentes y estudio fitoquímico. Estructura de los metabolitos identificados	31
Descripción botánica.....	31
Efectos farmacológicos probados	33
Composición química	33
<i>Euphorbia collina</i> . Antecedentes y estudio fitoquímico. Estructura de los metabolitos identificados.....	33
Descripción botánica.....	33
Efectos farmacológicos probados	36
Composición química	36
BIBLIOGRAFÍA.....	39
Objetivos	50
Objetivo general.....	50
Objetivos específicos	50
CAPÍTULO 1	51
Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad diurética de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	51
INTRODUCCIÓN.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Recolección y preparación del material vegetal	53
Obtención de extractos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	54

Evaluación de la actividad diurética de extractos acuosos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	57
Evaluación de la actividad diurética de extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	59
Evaluación de la actividad diurética de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de <i>Euphorbia serpens</i>	60
Análisis estadístico	61
RESULTADOS	61
Resultados de la evaluación de la actividad diurética de extractos acuosos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	61
Resultados de la evaluación de la actividad diurética de extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	64
Resultados de la evaluación de la actividad diurética de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i>	66
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
Capítulo 2	72
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiparasitaria de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	72
INTRODUCCIÓN.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	74
Obtención e identificación de huevos de <i>Ancylostoma caninum</i>	74
Obtención de larvas III de <i>Ancylostoma caninum</i>	74
Evaluación de la actividad larvicida	76
Determinación de la migración larval	77
Evaluación del efecto inhibitor de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> de extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	80
RESULTADOS	82
Resultados de la evaluación de la actividad larvicida	82
Resultados del test de inhibición de la migración larval.....	83
Resultados de la actividad de Inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	83
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	89
Capítulo 3	92

Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i> y toxicidad aguda en ratones	92
INTRODUCCIÓN.....	93
MATERIALES Y MÉTODOS	94
Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	94
Ensayos de toxicidad aguda en ratones.....	97
RESULTADOS	98
Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i>	98
Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia schickendatzii</i>	99
Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia collina</i>	100
Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los extractos activos a 1 ppm.	101
Ensayo de toxicidad aguda en ratones, de extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico de <i>Euphorbia collina</i> en ratones	102
DISCUSIÓN	103
Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	103
Ensayos de toxicidad aguda en ratones.....	105
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107
Capítulo 4	110
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana	110
INTRODUCCIÓN.....	111
MATERIALES Y MÉTODOS	112
Evaluación de la actividad antibacteriana	112
Evaluación de la Actividad antifúngica.....	116
RESULTADOS	121
Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana	121
Resultados de la evaluación de la actividad antifúngica.....	122
DISCUSIÓN	129
Actividad Antibacteriana.....	129
Actividad antifúngica	131
CONCLUSIONES:.....	133
BIBLIOGRAFÍA:.....	134

Capítulo 5	138
Identificación de grupos químicos y metabolitos secundarios responsables de las acciones farmacológicas.....	138
INTRODUCCIÓN.....	139
MATERIALES Y MÉTODOS	143
Reacciones de caracterización de familias químicas de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendanzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	143
Separación por cromatografía en columna de extractos hexánicos y acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i> y <i>Euphorbia schickendanzii</i>	153
Separación por cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i>	157
Separación por cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de <i>Euphorbia schickendanzii</i>	159
Aislamiento e identificación de compuestos antifúngicos provenientes de los extractos hexano y acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i>	159
RESULTADOS	162
Elucidación de moléculas bioactivas provenientes del extracto hexánico y de acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i>	169
DISCUSIÓN	174
CONCLUSIONES.....	177
BIBLIOGRAFÍA.....	179
CONCLUSIONES GENERALES	184

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Distribución geográfica de la Familia <i>Euphorbiaceae</i>	4
Figura I.2: Ciatios de <i>Euphorbia collina</i> L.....	6
Figura I.3: Latex exudando desde tallos de <i>Euphorbia dentata</i>	7
Figura I.4: Ejemplar de <i>Euphorbia pulcherrima</i>	8
Figura I.5: Ejemplar de <i>Euphorbia serpens</i>	28
Figura I.6: Características morfológicas de <i>Euphorbia serpens</i>	29
Figura I.7: Características morfológicas de <i>Euphorbia schickendanzii</i>	32

Figura I.8: Ejemplar de <i>Euphorbia schickendantzii</i>	32
Figura I.9: Características morfológicas de <i>Euphorbia collina</i>	35
Figura I.10: Ejemplares de <i>Euphorbia collina</i>	36
Figura I.11: Compuestos fenólicos y diterpénicos aislados de <i>Euphorbia portulacoides</i>	38
Figura 1.1: Recolección de orina por embudos modificados.....	58
Figura 1.2: Recolección de orina de ratones con papel de filtro.....	59
Figura 1.3: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h en los diferentes tratamientos.....	62
Figura 1.4: Excreción urinaria medida como el volumen excretado cada 10 g de peso en 6 h en los diferentes tratamientos.....	64
Figura 1.5: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso durante 5 h en animales tratados con extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	65
Figura 1.6: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 5 h en los diferentes tratamientos.....	67
Figura 2.1: Método de obtención de larvas III de <i>Ancylostoma caninum</i>	75
Figura 2.2: Placas de 24 pocillos y filtros de 23 µm.....	78
Figura 2.3: Placas con extractos metanólicos de las tres especies estudiadas y dos utilizadas como controles.....	79
Figura 2.4: Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	81
Figura 3.1: Diseño de cuba de eclosión de huevos de <i>Artemia salina</i>	95
Figura 4.1: Antibiogramas realizados para elección de antibióticos en las diferentes cepas bacterianas.....	113
Figura 4.2: Actividad antimicrobiana. Método de pocillo.....	115
Figura 4.3: Actividad antimicrobiana. Método de dilución en placa.....	116
Figura 4.4: Actividad antifúngica. Esquema de cromatofolio de sílica gel con puntos de siembra.....	118
Figura 4.5: Actividad antifúngica. Cromatofolios de sílica gel sembrados con 1.000 µg de cada uno de los extractos a ensayar.....	118
Figura 4.6: Actividad antifúngica. Bioautografía de siembra puntual de extractos de <i>Euphorbia</i> ensayada sobre <i>Fusarium verticillioides</i>	123
Figura 4.7: Cromatogramas y bioautograma obtenidos a partir del extracto metanólico de <i>Euphorbia collina</i> con cloroformo: metanol: ácido fórmico (73:20:7).....	124
Figura 4.8: Cromatogramas y bioautograma obtenidos para el extracto metanólico de <i>Euphorbia collina</i> con cloroformo: acetato de etilo: metanol: ácido fórmico (35:42:20:3).....	125
Figura 4.9: Cromatogramas y bioautogramas obtenidos para el extracto metanólico de <i>Euphorbia schickendantzii</i> , con cloroformo: metanol: ác. fórmico (73:20:7).....	125
Figura 4.10: Cromatogramas y bioautogramas obtenidos para el extracto metanólico de	

<i>Euphorbia schickendantzii</i> , con cloroformo: acetato de etilo: metanol: ác. fórmico (35:42:20:3).	126
Figura 4.11: Bioautografía de siembra puntual de grupos de fracciones de columna de extractos de <i>Euphorbia collina</i> ensayados sobre <i>Fusarium verticillioides</i>	127
Figura 4.12: Cromatografías en capa fina de las fracciones extraídas de la cromatografía en columna de extractos hexánicos y de acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i>	127
Figura 5.1: Principales diterpenoides de la familia <i>Euphorbiaceae</i>	141
Figura 5.2: Algunos de los flavonoides presentes en plantas del género <i>Euphorbia</i>	142
Figura 5.3: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos y de acetato de etilo (AcOEt) de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	154
Figura 5.4: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> , con solvente de corrida hexano: acetato de etilo (4:1).	155
Figura 5.5: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> , con solvente de corrida hex-AcOEt (85:15).	156
Figura 5.6: Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de <i>Euphorbia collina</i> , con solvente de corrida hexano- AcOEt (88:12).	157
Figura 5.7: Cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de extractos hexánico y acetato de etilo reunidos de <i>Euphorbia collina</i>	158
Figura 5.8: Cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de extractos hexánicos y de acetato de etilo reunidos de <i>Euphorbia schickendantzii</i>	160
Figura 5.9: Ensayo de taninos en Fracciones A.	164
Figura 5.10: Ensayo de flavonoides en Fracciones A.	164
Figura 5.11: Ensayo de carbohidratos en Fracciones A.	165
Figura 5.12: Ensayo de lípidos en Fracción A y Fracciones clorofórmicas G.	165
Figura 5.13: Ensayo de flavonoides en Fracción acuosa D de <i>Euphorbia collina</i>	166
Figura 5.14: Ensayo de fenoles en fracciones acuosas D.	166
Figura 5.15: Ensayo de flavonoides sobre el Residuo E de <i>Euphorbia serpens</i>	166
Figura 5.16: Ensayo de flavonoides en Fracción acuosa F de <i>Euphorbia collina</i>	167
Figura 5.17: Ensayo de esteroides y triterpenos en Fracciones clorofórmicas G.	167
Figura 5.18: Ensayo directo de Saponinas, poder afrógeno.	167
Figura 5.19: Investigación directa de saponinas, poder emulsificante.	168
Figura 5.20: Ensayo directo de proteínas-aminogrupos.	168
Figura 5.21: Cromatograma de GC-MS de fracciones G10-11.	170
Figura 5.22. Espectro de masas de impacto electrónico de la señal a 14,708 min (arriba), y la comparación con el espectro de librería de mayor similitud (abajo). Identificado como	

cicloartenol.	171
Figura 5.23. Espectro de masas de impacto electrónico de la señal a 15,283 min (arriba), y la comparación con el espectro de librería de mayor similitud (abajo). Identificado como 24-metilencicloartenol.	172
Figura 5.24. Espectro IR de fracciones G10-11 de <i>Euphorbia collina</i>	173
Figura 5.25. Estructuras de los triterpenos identificados en <i>Euphorbia collina</i>	173

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Distribución geográfica de especies presentes en Argentinas del género <i>Euphorbia</i>	10
Tabla 1.2: Sinonimias aceptadas de la especie <i>Euphorbia collina</i>	34
Tabla 1.1: Datos de recolección del material vegetal estudiado.	53
Tabla 1.2: Rendimientos de extractos expresados como porcentajes de peso seco.	57
Tabla 1.3: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h e índice diurético de animales tratados con extractos acuosos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> . ..	62
Tabla 1.4: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h e índice diurético de animales tratados con extractos acuosos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> . ..	63
Tabla 1.5: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso durante 5 h e índice diurético de animales tratados con extractos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	65
Tabla 1.6: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 5 h e índice diurético de animales tratados con extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de <i>Euphorbia serpens</i>	66
Tabla 2.1: $\bar{x} \pm DE$, de los porcentajes de larvas III de <i>Ancylostoma caninum</i> muertas después de la incubación con extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> expuestas a concentraciones de 30, 15 y 7,5 mg/ml.	82
Tabla 2.2: Medias del número de larvas no migradas $\pm DE$ de <i>Ancylostoma caninum</i> con extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	83
Tabla 2.3: Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> expuestos a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	84
Tabla 3.1: Grupos y tratamientos utilizados en ensayos de letalidad sobre <i>Artemia salina</i> de extractos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	100
Tabla 3.2: Efecto de extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i> sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	99
Tabla 3.3: Efecto de extracto hexánico, de acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia schickendantzii</i> sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	100

Tabla 3.4: Efecto de extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia collina</i> sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i>	101
Tabla 3.5: Efecto de extractos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> sobre larvas nauplio de <i>Artemia salina</i> en concentración de 0,1 ppm	102
Tabla 4.1: Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	122
Tabla 5.1: Resultados de las reacciones de caracterización realizadas a la fracción alcohólica al 70% de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	162
Tabla 5.2: Fracciones, agrupadas según perfiles cromatográficos, provenientes de la columna madre realizada sobre los extractos hexano y acetato de etilo de <i>Euphorbia collina</i>	168
Tabla 5.3: Fracciones, agrupadas según perfiles cromatográficos, provenientes de la columna madre realizada sobre los extractos hexano y acetato de etilo de <i>Euphorbia schickendantzii</i>	169
Tabla 5.4. Análisis de la agrupación de fracciones G10-11 mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.....	170

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Obtención de los extractos acuosos, hidroalcohólicos, hexánico, de acetato de etilo y metanólico de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i>	56
Esquema 5.1: Fraccionamiento de extractos hidroalcohólicos de <i>Euphorbia serpens</i> , <i>Euphorbia schickendantzii</i> y <i>Euphorbia collina</i> , para identificar grupos químicos.	144

INTRODUCCIÓN GENERAL

Marco teórico

La etnofarmacología ha sido una importante fuente de fármacos. Muchas de las drogas que se utilizan en la actualidad han sido aisladas de plantas con antecedentes de uso en medicina tradicional y por ello, preservar los acervos culturales de cada región es sumamente importante para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Muchos metabolitos secundarios bioactivos presentes en plantas han sido aislados y sus estructuras químicas copiadas y modificadas dando origen a más del 50 % de las drogas modernas. Estos antecedentes fundamentan el desarrollo de programas de investigación con el objeto de encontrar nuevas drogas para tratar las enfermedades emergentes (Nair *et al.* 2004). El número creciente de modelos disponibles para detectar compuestos bioactivos en extractos de plantas, el interés en descubrir nuevos mecanismos de acción y las transformaciones biotecnológicas que pueden llevarse a cabo en productos con estructuras potencialmente activas, hacen de la etnofarmacología un área fértil para la investigación. Estos productos naturales podrían reemplazar el uso de los químicos sintéticos usados habitualmente y cada vez más resistidos, y pueden proveer métodos ambientalmente más seguros y amigables para el tratamiento de las distintas enfermedades.

En países menos desarrollados o condicionados culturalmente, se alternan los tratamientos modernos con el uso de plantas medicinales. Este hecho ha provocado, desde hace varias décadas, un interés creciente por validar

científicamente la presencia de actividad farmacológica en las especies vegetales empleadas empíricamente, e investigar sus principios activos, efectos colaterales, toxicidad, etc. (Astudillo Vázquez *et al.* 2009).

Los miembros de la familia *Euphorbiaceae* en general y el género *Euphorbia* en particular, por ser el más numeroso de la familia, han sido utilizados desde hace siglos por la medicina tradicional en todo el mundo. Se las utiliza para: a) desórdenes en el sistema digestivo, 48 especies reportadas; b) tratamientos de la piel o tejido celular subcutáneo, 44 especies; c) tratamiento de infecciones, 33 especies; d) lesiones, 27 especies; e) desórdenes del sistema respiratorio, 17 especies; f) para dolores, 24 especies; g) anormalidades, 20 especies; h) inflamaciones, 19 especies; i) desórdenes en el sistema génito-urinario, 18 especies; j) desórdenes en el sistema respiratorio, 17 especies; k) trastornos del embarazo, parto o puerperio, 11 especies; l) envenenamiento, 11 especies; m) desórdenes del sistema sensorial, 10 especies; n) nutricionales, 10 especies; ñ) neoplasma, 9 especies; o) desórdenes en el sistema esqueleto-muscular, 9 especies; p) desórdenes en el sistema metabólico, 9 especies; q) desórdenes del sistema nervioso, 7 especies; r) en problemas circulatorio, 7 especies; s) problemas mentales, 5 especies; t) desórdenes en el sistema sanguíneo, 4 especies; y u) para el sistema endócrino, 3 especies (Ernst *et al.* 2015).

Se seleccionaron tres especies de este género, a saber; *Euphorbia serpens*, *E. collina* y *E. schickendantzii*. La primera de ellas es muy abundante y ampliamente utilizada, mientras que las otras dos, son muy similares fenotípicamente y presentan escasa y ninguna investigación previa respectivamente. La búsqueda de metabolitos con propiedades antimicrobianas, diuréticas, antiparasitarias y citotóxicas aparece

como un objetivo relevante y atractivo en la búsqueda de estructuras líderes con potencial uso en farmacología.

Familia *Euphorbiaceae*

Taxonomía

Taxonómicamente la Familia se encuentra dentro de:

- Reino *Plantae*
- Filum *Magnoliophita*
- Clase *Magnoliopsida*
- Orden *Euphorbiales*
- Familia *Euphorbiaceae*

Distribución

Es una familia cosmopolita de gran variabilidad morfológica y reconocida por ser una de las más abundantes y diversas de las Angiospermas. Presenta aproximadamente 7.300 especies, agrupadas en 280 géneros, distribuidas en las regiones tropicales de todo el mundo, aunque la mayoría de ellas se encuentran en América y África tropical (**Figura I.1**). En Argentina viven 29 géneros con 216 especies (Bacigalupo y Múlgura 1999). En la provincia de La Pampa se encuentra representada por 8 géneros con 23 especies (Steibel 1995).

Figura I.1: Distribución geográfica de la Familia *Euphorbiaceae*.

Ref: Extraído de Heywood (1985).

Características morfológicas

El rango de variación morfológica de la familia es enorme y por lo tanto difícil de caracterizar. Este hecho sugiere un origen polifilético. Así, se presentan plantas suculentas o no, pueden ser árboles, arbustos o hierbas. Las **flores** son diclinas, actinomorfas o zigomorfas, aperiantadas, en *Euphorbia* el perianto generalmente está ausente, o periantadas, con nectarios florales o sin ellos, en *Euphorbia*, *Acalypha* y *Ricinus*. Flores estaminadas con corola, en *Croton*, *Aonikena* y *Argythamnia*, o más frecuentemente apétalas, con androceo de 1 a 10 estambres libres o connados, monadelfos a poliadelfos, *Ricinus*, y anteras ditécicas de dehiscencia longitudinal. Flores pistiladas con corola, *Croton* y *Argythamnia*, o más frecuentemente apétalas, con ovario sésil o pedicelado, glabro o piloso, 3-carpelar, 3-locular con 1 ó 2 óvulos epítropos de placentación axilar; con tres estilos libres o soldados en la base y generalmente partidos en el ápice. Los **frutos** son generalmente una cápsula tricoca de mericarpos caducos, dehiscentes y bivalvos

con dehiscencia elástica. Las **semillas** son endospermadas, frecuentemente con carúncula, con episperma liso o escultrado. Pueden presentarse Inflorescencias o flores solitarias. Las inflorescencias pueden ser racimosas con las flores estaminadas en el ápice y las pistiladas en la base, o un ciatio, característico de *Euphorbia*. El ciatio es una inflorescencia constituida por una única flor central, reducida a un ovario tricoco, rodeada por cinco grupos de flores masculinas y el conjunto rodeado por brácteas (**Figura I.2**). Las flores solitarias se presentan opuestas a las hojas, *Phyllanthus*. Las **hojas** pueden encontrarse opuestas o alternas, a veces verticiladas, pecioladas o sésiles, simples o diversamente partidas o lobuladas, estípulas membranosas glandulares o ausentes; frecuentemente con nectarios extraflorales y látex (Steibel 1995).

El látex característico de esta familia es una sustancia de aspecto lechoso y composición compleja, formada principalmente por agua, gránulos de almidón, proteínas, alcaloides, terpenoides, cardenólidos, resinas, etc. Se encuentra almacenado en células laticíferas y es liberado cuando los tejidos vegetales se dañan, ya que su principal función biológica es de defensa ante la herbivoría y agentes patógenos. Por esta razón, muchos de los compuestos encontrados en el látex muestran toxicidad contra insectos y patógenos (Hua *et al.* 2017; Konnor 2011; Agrawal y Konnor 2009), (**Figura I.3**).

Figura I.2: Ciatios de *Euphorbia collina* L.



Ref: Extraído de base de datos de SIB-AYSEN.

Algunas *Euforbiáceas* son tóxicas, principalmente para animales de sangre caliente, debido a la presencia de látex y otras producen reacciones alérgicas.

Usos

Las especies de esta familia presentan usos variados, algunas son forrajeras y otras son utilizadas en la industria, *Ricinus communis*, *Hevea brasiliensis*, *Aleurites fordii*. A modo de ejemplo, *Manihot sculenta*, mandioca, es una planta alimenticia de primera magnitud, y *E. pulcherrima* y *E. splendens* tienen valor ornamental (Seteibel 1995), (**Figura I.4**).

Desde la antigüedad se han atribuido efectos curativos a especies de la familia *Euphorbiaceae*. Algunas especies de esta familia son usadas ampliamente en medicina popular por sus múltiples efectos. Tal variedad de propiedades

farmacológicas se atribuye, entre otras cosas, a la presencia de látex. Estas plantas son utilizadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos. Las aplicaciones específicas forman parte del acervo cultural de cada región (Bittner *et al.* 2001).

Figura I.3: Latex exudando desde tallos de *Euphorbia dentata*.



Ref: Fotografía tomada por la autora.

Figura I.4: Ejemplar de *Euphorbia pulcherrima*.



Ref: Se observan sus vistosas hojas modificadas. Extraído de ArgentiNat.

En Argentina hay 49 géneros de *Euphorbiaceae* descritas con usos medicinales, siendo de este modo la cuarta familia más utilizada en etnofarmacología. El género *Acalypha spp.* se utiliza como detergente, en el tratamiento exterior de heridas y como cicatrizante. *Astraea spp.* para esterilizar hembras, curar la malaria, en problemas de embarazo, disentería y como purgante. *Cnidocolus spp.* antiinflamatorio, para moretones, forúnculos, anestésico. *Colliguaja spp.* contra el dolor de muelas. *Croton spp.* como digestivo, contra la cefalalgia, antiséptico, vermífugo, antidiarreico, hepático, para el dolor de estómago, antiinflamatorio en cataplasmas, anticancerígeno, purgante, para tratar infecciones del tracto urinario, antidiarreico, expectorante, cicatrizante, analgésico, estomacal, anti-úlceras, astringente, resolutive, para úlceras bucales en lactantes. *Euphorbia spp.* drástico, diurético, antiasmático, expectorante, tóxico, cáustico, contra las verrugas cutáneas, anticancerígeno, contra la bronquitis crónica, laxante, emoliente,

para eccemas, hemostática, purgativa, emética, para inducir la lactancia, antimicrobiano, cicatrizante, contra la gonorrea, contra la fatiga, antidiarreico, febrífugo, contra la conjuntivitis, artritis y reuma, antilítico, anticonceptivo, anti-herpético, antiemético, vulnerario, purgativo, para inducir la menstruación, contra inflamación hipoglucémica y renal, para curar mordeduras de serpientes, para purificar la sangre, contra dolor de oído, para enfermedades oculares y de la piel. *Jatropha spp.* purgativo, para piorrea, antiinflamatorio, febrífuga, contra las infecciones del tracto urinario, anti-ulceroso, para tratar el pie de atletas, purgante drástico, emético, anti-hemorroidal, antihelmíntico, contra el dolor de muelas, para la regulación de la fertilidad, antisifilítica, abortivo, anti-disentérica y contra la malaria. *Manihot spp.* drástico, emético, tóxico, contra erupciones de la piel. *Sapium spp.* vulnerario, para dolores gastrointestinales, febrífugo, para dolor de muelas. *Sebastiania spp.* galactógeno, antiséptico para heridas, analgésico para caries, contra las verrugas cutáneas, para mordeduras de araña y antimicrobiano. *Stillingia spp.* actividad proteolítica. *Tragia spp.* emoliente, rubefaciente, diurético y antirreumático (Barboza *et al.* 2009).

Género *Euphorbia*.

Taxonomía

El género se encuentra dentro de:

- Subfamilia: *Euphorbioideae*
- Tribu: *Euphorbieae*
- Subtribu: *Euphorbiinae*
- Género: *Euphorbia*

Siendo de este modo el género tipo.

Distribución

Euphorbia L. es un género cosmopolita ampliamente distribuido en las regiones templadas y tropicales del mundo (Govaerts *et al.* 2000).

Tabla I.1: Distribución geográfica de especies presentes en Argentinas del género *Euphorbia* (Instituto Darwinión 2017).

Nombre científico	Estatus	Distribución geográfica	Provincias Argentinas donde se encuentra
<i>Euphorbia acerensis</i> Boiss.	Nativa	Bolivia y noroeste y centro de Argentina	Catamarca, Córdoba, Jujuy, Salta y Sgo. del estero
<i>Euphorbia adenoptera</i> Bertol.	Nativa	Desde México hasta el noreste de Argentina.	Chaco, Córdoba, Formosa, Misiones y Santa Fé
<i>Euphorbia amandi</i> Oudejans	Nativa	Chile y noroeste de Argentina	Catamarca, Jujuy, La Rioja, Salta y San Juan
<i>Euphorbia berteriana</i> Balb. ex Spreng.	Nativa	Estados Unidos, México, Caribe, Venezuela, Bolivia, Paraguay, Brazil y norte y centro de Argentina	Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes y Entre Ríos
<i>Euphorbia burkartii</i> Bacigalupo	Endémica	Argentina	Corrientes y Entre Ríos
<i>Euphorbia caespitosa</i> Lam. var. <i>caespitosa</i>	Nativa	Uruguay y centro de Argentina	Buenos Aires y Mendoza
<i>Euphorbia caespitosa</i> Lam. var. <i>ventanicola</i>	Endémica	Sudeste de la provincia de Buenos Aires	Buenos Aires

<i>Euphorbia catamarcensis</i> (Croizat) Subils	Endémica	Oeste de Argentina	Catamarca, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan y San Luis
<i>Euphorbia characias</i> L.	Adventicia	Nativa del mediterráneo	Buenos Aires
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>andina</i>	Endémica	Chile y Argentina	Mendoza, Neuquen, Santa Cruz
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>chrysophylla</i>	Nativa	Brazil, Bolivia y noroeste de Argentina	Jujuy, Salta y Tucumán
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>collina</i>	Endémica	Chile y Patagonia Argentina	La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz, Santa Fé, San Juan y San Luis
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>glaucescens</i>	Endémica	Patagonia y oeste de Argentina	Chubut, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y San Juan
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>minor</i>	Endémica	Mendoza y Patagonia	Mendoza, Neuquén y Santa Cruz
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>nahuelhuapina</i>	Endémica	Mendoza y Patagonia	Mendoza, Neuquen, Santa Cruz, Río Negro y Chubut
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>patagónica</i>	Endémica	Patagonia y centro oeste y este de Argentina	Buenos Aires, Chubut, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz, San Juan y Tierra del Fuego
<i>Euphorbia collina</i> Phil. var. <i>spathulata</i>	Endémica	Chile, Mendoza y Patagonia	Mendoza, Chubut, Neuquén, Río Negro y Santa Cruz
<i>Euphorbia cyathophora</i> Murray	Adventicia	Desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina	Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, Misiones y Salta
<i>Euphorbia davidii</i> Subils	Endémica	Centro de Argentina	Buenos Aires, Córdoba y San Luis
<i>Euphorbia dentata</i> Michx.	Endémica	Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras, Bolivia, Paraguay, Uruguay, China y	Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Salta, Santa Fé, San Luis y Tucumán

		Norte y Centro de Argentina	
<i>Euphorbia eichleri</i> Müll. Arg	Endémica	Paraguay y Norte y Centro de Argentina	Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, La Rioja, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia graminea</i> Jacq.	Nativa	Argentina	Jujuy
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	Adventicia	Europa, Asia, África, Oceanía y América. En Argentina en el centro y noreste.	Buenos Aires, Córdoba, La Pampa y Misiones
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Nativa	Distribuida en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo. En Argentina e encuentra en el norte y centro	Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fé, Tucumán y Buenos Aires
<i>Euphorbia hieronymi</i> Subils	Endémica	Centro y sur de Argentina	Catamarca, Chubut, Córdoba, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Juan y San Luis
<i>Euphorbia hinkleyorum</i> I.M. Johnst	Nativa	Perú, Bolivia y Norte Argentino	Salta y Jujuy
<i>Euphorbia hirta</i> L. var. <i>hirta</i>	Adventicia	Distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Citada para Etiopia, Ghana, India, Madagascar, Vietnam. En	Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones y Salta

		América desde Estados Unidos hasta norte de Argentina, también en Brasil, Chile y Paraguay.	
<i>Euphorbia hirta</i> L. var. <i>ophthalmica</i>	Adventicia	Originaria de Florida, difundida en regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Argentina se encuentra en zona centro y Norte.	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, Tucumán
<i>Euphorbia hirtella</i> Boiss.	Nativa	Brasil, Uruguay y Noreste de Argentina	Corrientes
<i>Euphorbia huanchalana</i> (Klotzsch & Garcke) Boiss.	Nativa	Perú, Bolivia y Noroeste Argentino	Catamarca y Tucumán
<i>Euphorbia hunzikeri</i> Subils	Endémica	Norte Argentino	Salta y Tucumán
<i>Euphorbia hypericifolia</i> L.	Nativa	Desde Jamaica y Martinica hasta el norte de Argentina	Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Río Negro, Salta, Santa Fé y Tucumán
<i>Euphorbia hyssopifolia</i> L.	Nativa	Norte de África, China, India y Australia. Regiones tropicales y subtropicales del nuevo mundo. En Argentina se extiende por el oeste y	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Mendoza, Misiones, Salta, Santiago del Estero, San Juan y Tucumán

		centro hasta Mendoza y Córdoba	
<i>Euphorbia insulana</i> Vell.	Nativa	Desde Río de Janeiro hasta el norte de Argentina	Chaco, Corrientes, Formosa, Misiones y Salta
<i>Euphorbia klotzschii</i> Oudejans var. <i>argentina</i>	Endémica	Argentina y Chile	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia klotzschii</i> Oudejans var. <i>klotzschii</i>	Endémica	Chile, Argentina y Uruguay	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia klotzschii</i> Oudejans var. <i>schizosepala</i>	Endémica	Chile, Uruguay y norte y centro Argentino	Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Entre Ríos, La Rioja, Mendoza, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan y San Luis
<i>Euphorbia kurtzii</i> Subils	Endémica	Norte y centro Argentino	Córdoba, La Rioja, Misiones, Salta, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia lasiocarpa</i> Klotzsch	Nativa	Desde centro América hasta noreste y centro de Argentina	Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Luis y Tucumán

<i>Euphorbia lathyris</i> L.	Adventicia	Europea y ampliamente difundida en América	Buenos Aires, Chubut, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Santa Fé y Tucumán
<i>Euphorbia lorentzii</i> Müll. Arg.	Nativa	Uruguay y Norte y centro de Argentina	Buenos Aires, Catamarca, Entre Rios, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia maculata</i> L.	Adventicia	Oriunda de Norteamérica, se encuentra naturalizada en Europa, Asia, norte de África, Australia y en toda América	Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Rios, Formosa, Jujuy, Misiones, La Rioja, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia marayensis</i> Subils	Endémica	Norte de Argentina	Catamarca, Salta y San Juan
<i>Euphorbia marginata</i> Pursh	Introducida	De Norteamérica, en Argentina cultivada.	Buenos Aires, Córdoba, Entre Rios, La Pampa y Mendoza
<i>Euphorbia nutans</i> Lag.	Adventicia	Norte de África, sur de Europa, Asia, Oceanía, California, y en el Continente americano desde Canadá hasta el norte de Sudamérica.	Córdoba y Jujuy
<i>Euphorbia oranensis</i> (Croizat) Subils	Nativa	Paraguay y bosques Chaqueños de Argentina	Salta

<i>Euphorbia pampeana</i> Speg.	Nativa	Uruguay, Brasil y en Argentina en Provincia de Buenos Aires	Buenos Aires
<i>Euphorbia papillosa</i> A. St.-Hil. var. <i>cabreræ</i>	Nativa	Uruguay, Brasil y Región Mesopotámica de Argentina	Corrientes, Entre Ríos y Misiones
<i>Euphorbia papillosa</i> A. St.-Hil. var. <i>papillosa</i>	Nativa	Paraguay, sur de Brasil, Uruguay y Mesopotamia Argentina	Corrientes, Entre Ríos y Misiones
<i>Euphorbia pedersenii</i> Subils	Endémica	Corrientes	Corrientes
<i>Euphorbia pentadactyla</i> Griseb.	Nativa	Paraguay y centro norte de Argentina	Catamarca, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero, San Juan y San Luis
<i>Euphorbia peplus</i> L.	Adventicia	Originaria de Europa. En Argentina se encuentra en el oeste y centro del país	Buenos Aires, Catamarca, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, Santa Fé, San Juan, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia platyphyllos</i> L.	Adventicia	Europa, norte de África, Norteamérica, Sudáfrica, Oceanía y Sudamérica	Buenos Aires y Río Negro
<i>Euphorbia portucasadiana</i> (Croizat) Subils	Endémica	Paraguay y noreste Argentino	Corrientes y Formosa
<i>Euphorbia portulacoides</i> L. var. <i>acutifolia</i>	Nativa	Norte y centro Argentino	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Salta, San Luis y Tucumán

<i>Euphorbia portulacoides</i> L. var. <i>major</i>	Endémica	Norte y centro Argentino	Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, Salta, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia portulacoides</i> L. var. <i>portulacoides</i>	Nativa	Chile, Uruguay y Norte y centro Argentino	Buenos Aires, Catamarca, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Salta, Santa Fé, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia potentilloides</i> Boiss.	Nativa	Sureste de Brasil y de Bolivia. Uruguay y noreste de Paraguay y de Argentina.	Corrientes y Misiones
<i>Euphorbia prostrata</i> Aiton	Nativa	Ampliamente difundida en las regiones cálidas de todo el mundo, es originaria de América tropical. En Argentina se encuentra en el norte y centro del país.	Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Salta, Santa Fé y Tucumán
<i>Euphorbia ruizlealii</i> Subils	Endémica	Norte Argentino	Catamarca, La Rioja, Mendoza, Salta y San Juan
<i>Euphorbia schickendantzii</i> Hieron.	Endémica	Patagonia y centro de Argentina	Catamarca, Chubut, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz y San Juan
<i>Euphorbia sciadophila</i> Boiss.	Nativa	Desde Brasil hasta el centro Argentino	Catamarca, Córdoba, Corrientes, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero, San Luis y Tucumán

<i>Euphorbia selloi</i> (Klotzsch & Garcke) Boiss.	Nativa	Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y noreste de Argentina	Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Santa Fé
<i>Euphorbia serpens</i> Kunth var. <i>microphylla</i>	Endémica	Desde Canadá hasta Argentina	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia serpens</i> Kunth var. <i>serpens</i>	Nativa	Desde Estados Unidos hasta Argentina	Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan y Tucumán
<i>Euphorbia serpyllifolia</i> Pers.	Nativa	Desde Centroamérica hasta el Norte Argentino	Catamarca, Córdoba, La Rioja, Mendoza, San Luis y Tucumán
<i>Euphorbia spathulata</i> Lam.	Adventicia	Originaria de Europa. Se distribuye por toda América	Buenos Aires, Chubut, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Misiones y Río Negro
<i>Euphorbia stenophylla</i> (Klotzsch & Garcke) Boiss.	Endémica	Brasil, Uruguay, Paraguay y noreste de Argentina	Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones y Santa Fé
<i>Euphorbia thymifolia</i> L.	Introducida	Habita la zona cálida del nuevos y viejo mundo. En Argentina se encuentra en el noreste	Corrientes, Misiones y Salta
<i>Euphorbia vervoorstii</i> Subils	Endémica	Norte Argentino	Catamarca y Salta

Ref: Se resaltaron en negrita los nombres de las especies estudiadas en esta tesis.

Características morfológicas

Las especies varían desde pequeñas efímeras a diversas formas de plantas anuales o herbáceas perennes, arbustos en cojín, grandes arbustos, pequeños árboles y formas suculentas. Son plantas de **flores** desnudas, agrupadas en pseudanto. El ciatio tiene una flor carpelada, pedicelada; desnuda o con tres pequeños segmentos periánticos y varias flores estaminadas monandras, aperiántadas y reunidas en cimas, protegidas por un receptáculo cupuliforme con 4 o 5 lóbulos que alternan con 1 o 4 o 5 glándulas nectaríferas. Las **hojas** son alternas u opuestas, a veces decusadas, con látex (Steibel 1995).

Euphorbia L. es el tercer género más grande de las plantas con flores, luego de *Astragalus*, *Fabaceae*, y *Psychotria*, *Rubiaceae* (Govaerts *et al.* 2000). Con cerca de 2.000 especies, el género es uno de los más abundantes dentro de la familia, por ejemplo en Chile representa el 66% de la flora del territorio siendo además el taxón con mayor número de especies en este territorio. En Argentina está representado por 53 especies, de las cuales 11 especies y 9 variedades son endémicas (Zuloaga y Morrone 1999), y es el género mejor representado en La Pampa (Steibel 1995).

El género *Euphorbia* se presentan a menudo como maleza en pastizales y campos cultivados y pueden ser huéspedes de ciertas plagas y enfermedades (Tanveer *et al.* 2010). Algunas son malezas invasoras y nocivas en muchas regiones del mundo (Pahlevani 2007). Como plantas tóxicas, pueden dañar el ganado de pastoreo e incluso a seres humanos cuando se ingieren por error o se mezclan con el forraje y con los productos cosechados (Zayed *et al.* 1998).

Hábitat

Crece en una amplia gama de hábitats, incluyendo las arenas costeras, laderas rocosas, cultivos, suelos salinos, colinas de yeso, dunas, desiertos pedregosos, riberas y bosques, desde el nivel del mar hasta 4000 msnm (Pahlevani y Akhani 2011).

Usos

Además de los usos medicinales se presentan algunas ornamentales, *E. pulcherrima*, *E. mili*, *E. tirucalli* y *E. lactea* (Rizk 1987). *E. antisiphilitica* por ej. tiene una gran importancia económica ya que de ésta se extrae la cera de candelilla. La producción de dicha cera es una de las fuentes económicas más importantes para la zona norte de México en el desierto de Chihuahua (Rizk 1987). El euforbio, látex de *E. resinifera*, se usaba en las pinturas para el casco de los barcos, ya que su fuerte toxicidad evitaba el crecimiento de especies sésiles, aunque también presenta propiedades farmacológicas descritas desde la época de Hipócrates (Halleux-Opsomer 1982). *E. helioscopia* por ej. fue usada antiguamente como potente veneno (Levey 1966).

Antecedentes de uso en medicina tradicional del género *Euphorbia*. Etnofarmacología

En el siglo XVIII Carl Linnaeus describió el género *Euphorbia* y varios de sus usos medicinales, incluyendo los tratamientos tópicos y la purga del tracto gastrointestinal (Nambudiri y Nambudiri 2013). El interés en productos naturales de especies de *Euphorbia* que presentan actividad biológica tales como propiedades promotoras de tumores, proinflamatorias y antitumorales, se inició con el aislamiento

y la elucidación de la estructura de un principio cocarcinogénico de *Croton tiglium* L. en 1968 (Hecker 1968) y la descripción de la actividad antitumoral de un diterpeno aislado de *E. esula* L. en 1976 (Evans y Taylor 1983; Kupchan *et al.* 1976). Recientemente, un diterpeno aislado de *E. peplus* L. utilizado para el tratamiento tópico de la queratosis actínica (Berman 2012) estimuló el interés por los productos naturales de las especies de *Euphorbia*. Esto se vio reflejado en los años 2012 y 2013 con un aumento de casi 40 % en el número de publicaciones referidas al tema. Además, en los últimos años se publicaron una serie de revisiones sobre la química y farmacológica del género (Shi *et al.* 2008; Vasas y Hohmann 2014; Vasas *et al.* 2012; Kemboi *et al.* 2020). En general, el látex de ciertas especies de este género es utilizado externamente en medicina popular para tratar anomalías de la piel, como las verrugas e infecciones dérmicas, mientras que las hojas son consumidas para tratar el estreñimiento (Ghorbani 2005). Al ser el tercer género más abundante del reino vegetal, la cantidad de especies y usos que se han reportado es enorme. Se detallan a continuación las especies más relevantes para la medicina popular a nivel mundial.

- ***Euphorbia antiquorum***: especie asiática cuyo látex tiene propiedades insecticidas y tóxicas. Se utiliza como emético, purgante y diurético y externamente para el tratamiento de hinchazones (Colley 1978). También se aplica externamente a los dientes para el tratamiento del dolor de muelas (Van Sam *et al.* 2008).
- ***Euphorbia chilensis***: purgante (Gusinde 1936).
- ***Euphorbia corollata***: especie americana, se utiliza para el tratamiento de hemorragias (Krochmal 1952) y en la cura de hidropesía (Feest 1975).

- ***Euphorbia duseimata***: de origen africano, se utiliza para los enfermos mentales y para el tratamiento del alcoholismo (Hargreaves 1991).
- ***Euphorbia fischeriana***: asiática. Ha sido usada en la medicina tradicional China por más de 2000 años como una droga anticancerígena (Schroeder *et al.* 1980).
- ***Euphorbia ingens***: africana. Se usa como alucinógena (Hargreaves 1981). Su látex y su corteza fueron descritas para el tratamiento de lesiones cancerosas y tumores oculares en África (Hargreaves 1991; Giarelli *et al.* 2003).
- ***Euphorbia ipecacuanhae***: Las raíces se usan como purgantes (Feest 1975).
- ***Euphorbia maculata***: la savia se aplica externamente para tratar las verrugas y lesiones, erupciones, eczemas y contra el dolor de pezón. También es usada como laxante y emético (Dunn 1983), para tratamientos de hemorragias, leucorreas y diarreas (Krochmal 1952). En decocción se utiliza para lavar las heridas y ojos; la infusión se bebe para purificar la sangre (Bocek 1984). En China, tanto ***E. thymifolia*** como ***E. maculata*** se utilizan para el tratamiento de diarreas, hemoptisis, hematuria, hemafecia, hematemesis, epistaxis y sangrado vaginal. También son usadas para el tratamiento de heridas y carbúnculos (Lai *et al.* 2004).
- ***Euphorbia nivulia***: asiática. El látex es usado para tratar heridas en el ganado (Jain 1965).
- ***Euphorbia thymifolia***: americana. Además de los usos anteriormente nombrados en ***E. maculata***, es utilizada para tratar lesiones, en trastornos del embarazo, parto y puerperio (Ernst 2015). En decocción presenta propiedades abortivas, antifebrífugas y lactogogas (Wong 1976).

- ***Euphorbia tirucalli***: africana. Es usada para el tratamiento de mordeduras de serpiente, como purgativa, para la gonorrea y aumento de senos. El látex es emético y antisifilítico además de tener propiedades insecticidas (Hargreaves 1978; Hargreaves 1991).
- ***Euphorbia kansui***: se conoce como 'Kan Sui' en el folklore chino y se usa para el tratamiento de edema, ascitis y cáncer. Se encontró que el extracto etanólico de las raíces de *E. kansui* posee significativa citotoxicidad *in vitro* (P-388) y actividad antileucémica *in vivo* contra la leucemia linfocítica P-388 en ratones (De-Ji *et al.* 1991).

Euphorbias de Argentina

- ***Euphorbia caespitosa* Lam. var. *caespitosa***: el tallo se utiliza como drástico, diurético, antiasmático y expectorante (Barboza *et al.* 2009).
- ***Euphorbia collina* var. *andina* (Phil.)**: planta caustica. Se usa contra las verrugas cutáneas; su látex es tóxico (Barboza *et al.* 2009).
- ***Euphorbia heterophylla* L.**: Hargreaver 1991 describe al látex y la raíz como tóxico. La planta entera seca se toma en infusión como hemostática y purgativa. La raíz presenta propiedades eméticas. La hoja se usa para inducir la lactancia. Las flores y las hojas son usadas como expectorante, antimicrobiana y purgativa (Hargreaver 1991; Barboza *et al.* 2009).
- ***Euphorbia lasiocarpa* Klotzsch**: la planta entera es usada como anticonceptivo y el látex fresco para tratar el herpes circinado. Las hojas frescas y el tallo presentaron actividad hipotensora (Barboza *et al.* 2009). También se usa para tratar las verrugas y como antimicótico (Martinez 2008).

- ***Euphorbia papillosa* A. St. Hil. var. *papillosa*:** es utilizada como galactogogo (Barboza *et al.* 2009).
- ***Euphorbia portulacoides* L. var. *portulacoides*:** Jain 1965 la describe como galactogogo. Su raíz se usa como antiemético, la hoja como vulnerario, dermatológico y el látex más la raíz como purgativo. También es descripta para tratar las verrugas de la piel (Martinez 2008).
- ***Euphorbia prostrata* Aiton:** la planta entera en decocción sirve para provocar la menstruación; en Infusión, para el asma bronquial, la inflamación hipoglucémica y renal, y como remedio para la mordedura de serpiente. Las partes aéreas frescas en infusión, para purificar la sangre, como diurético y contra las verrugas cutáneas. La hoja seca en infusión para el reumatismo (Barboza *et al.* 2009). Las hojas se usan contra la disentería amebiana (Noumi y Yomi 2001).
- ***Euphorbia sciadophilla* Boiss.:** contra el dolor de oídos (Barboza *et al.* 2009).

Euphorbias de La Pampa

En la Provincia de La Pampa varias especies de *Euphorbia* son utilizadas en medicina tradicional.

Se han informado a:

- ***Euphorbia collina* var. *collina*:** especie autóctona de Argentina, vulgarmente conocida como “Pichoa”. Citada como planta tóxica (Roig 2001).

Posee propiedades antihelmínticas y su látex es errugativo (Conticello *et al.* 1997).

- ***Euphorbia helioscopia L.*** Se utiliza la planta entera para curar el cáncer. La parte aérea seca en infusión, es usada para el tratamiento de bronquitis crónica. La raíz seca es utilizada como laxante. El látex fresco es usado para eczemas, como emoliente, tóxico, cáustico y contra las verrugas cutáneas (Barboza *et al.* 2009). Se ha informado que las hojas y tallos se usan como febrífugo y vermífugo (Khan *et al.* 2008).
- ***Euphorbia hirta***, vulgarmente llamada “Tasi de la golondrina” es una de las *Euphorbia* más utilizadas en el mundo. Posee propiedades antiinflamatorios y es usada para trastornos del sistema respiratorio, intoxicaciones, trastornos del sistema circulatorio, trastornos del sistema digestivo, trastornos del sistema genitourinario, infecciones, infestaciones, dolor, trastornos cutáneos o subcutáneos, lesiones, trastornos nutricionales, trastornos del sistema sensorial, trastornos del sistema endocrino hasta trastornos del embarazo, parto y puerperio (Ernst 2015). También se usa como oftálmico, purgante (Hargreaver 1991) y antiasmático (Jain 1965). En decocción se usa para el tratamiento de la disentería (Van Sam *et al.* 2008). También sirve como diurético, cicatrizante, laxante y para la gonorrea. La raíz en infusión para la fatiga general. La hoja en infusión se usa para tratar la diarrea, como colagogo, febrífugo y, en decocción, para tratar el asma. El látex se usa para curar la conjuntivitis, para eliminar las verrugas de la piel, para la artritis y el reumatismo (Barboza *et al.* 2009).

- ***Euphorbia lathyris L.***: originaria de Europa, en la provincia crece en jardines. Utilizada en problemas del sistema digestivo y como emético. Las semillas se usan como purgante y abortivas (Wong 1976; Ernst *et al.* 2015).
- ***Euphorbia marginata***: originaria de Estados Unidos, cultivada en la provincia en parques y jardines. Se usa como galactogogo y la infusión de sus hojas trituradas como linimento para aliviar la hinchazón (Munson 1981).
- ***Euphorbia ovalifolia var. ovalifolia***: especie sudamericana. “Yerba meona”, es diurética, antilitiásica (Hieronymus 1881; Del Vitto *et al.* 1997), errugativa y el látex es usado contra callos, verrugas y herpes (Hieronymus 1881).
- ***Euphorbia peplus***: originaria de Europa. “Lechetres”, es tóxico (Ragonese 1955), irritante, drástico (Marzocca 1997), antiasmático y anticatarral (Marzocca 1997; Roig 2001). Recientemente se aisló un diterpeno de esta planta utilizado para el tratamiento tópico de la queratosis actínica (Berman 2012).
- ***Euphorbia portulacoides var. acutifolia***: especie autóctona del norte y centro de Argentina. La raíz se usa como anticonceptivo y el látex para el tratamiento de verrugas (Barboza *et al.* 2009). Tóxica (Del Vitto *et al.* 1997)
- ***Euphorbia schickendantzii***: especie endémica del centro y oeste de Argentina, vulgarmente llamada “Pichoa”, es tóxica, errugativa (Steibel 1997), cáustica (Barboza *et al.* 2009); su látex se utiliza para el tratamiento de odontalgias (Muiño y Fernandez 2015) y se aplica en las verrugas (Steibel 1997; Barboza *et al.* 2009; Muiño y Fernandez 2015).
- ***Euphorbia serpens***: se distribuye en toda América. “Yerba de la golondrina”, “yerba meona”, diurética (Hieronymus 1881; Soraru y Bandoni 1978; Xifreda 1982; Del Vitto *et al.* 1997; Barboza *et al.* 2009), errugativa (Hieronymus

1881), emenagoga, antitumoral, vulneraria, drástica (Soraru y Bandoni 1978) y antilíticas (Del Vitto *et al.* 1997; Barboza *et al.* 2009). Se utiliza para enfermedades de la piel. Las hojas secas junto con el tallo en infusión se usa para enfermedades oculares. El látex es cáustico, contra las verrugas cutáneas y para herpes circinado (Barboza *et al.* 2009).

Euphorbia serpens Kunth. Antecedentes y estudio fitoquímico.

Estructura de los metabolitos identificados

Descripción Botánica

La especie fue descrita por primera vez por Humboldt, Bonpland y Kunth en 1817. Habita en sitios modificados, en jardines, césped y carreteras (Pahlevani y Riina 2011), muy común en veredas y como especie “r” estratega en campos cosechados. Es una hierba anual o perenne, postrada y reptante, con ramificaciones alternas por la base con ramas radicales, glabra (**Figura I.5**). Hojas simples, opuestas, con peciolo de hasta 0,3 mm, ovado-orbicular u oblongas con ápice retuso o emarginado, de bordes lisos, de 4-6 mm de longitud, por 3-4 mm de ancho, levemente asimétricas en la base. Estípulas membranosas triangulares, soldadas, lanceoladas, o enteras. Ciatios solitarios terminales, con 4 nectarios oblongos o circulares, cóncavos, con apéndices lobulados, lóbulos triangulares enteros. 5 a 10 flores estaminadas. Bracteolas laminares, laciniadas. Flores femeninas sin perianto, estilos bifidos hasta 1,7 mm de alto por 1,3 a 1,5 mm de diámetro. Semillas ovoides de 1mm de longitud por 0,5 a 0,7 mm de diámetro lisas (**Figura I.6**) (Steibel 1995; Pahlevani y Riina 2011; Instituto de botánica Darwinion 2017).

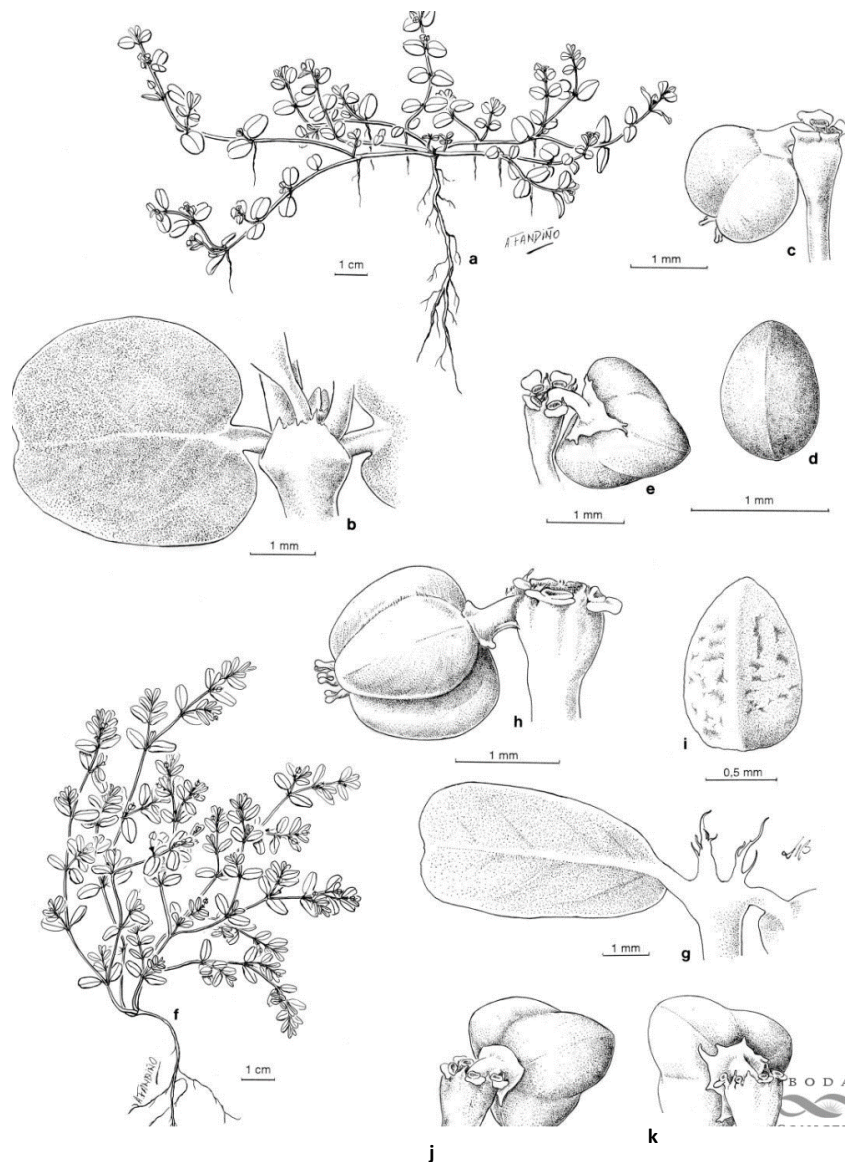
Figura I.5: Ejemplar de *Euphorbia serpens*.



Ref: Fotografía tomada por la autora.

Efectos farmacológicos probados

Algunos trabajos han demostrado el efecto antibacteriano de los extractos de *E. serpens*, por ej. Brittner *et al.* (2001) demostraron el efecto antimicrobiano que los extractos de partes aéreas tienen contra *Staphylococcus lutea*, *S. aureus* y *Escherichia coli*. Payne *et al.* (2015) comprobaron el efecto de los extractos acuosos, metanólicos y hexánicos contra cepas de *Vibrio cholerae*. En este mismo trabajo también se observó el efecto antioxidante de dicha planta. Además, en un estudio realizado por Cheruse, Baldini y Blanch (1983) se mostró el efecto diurético de los extractos metanólicos.

Figura I.6: Características morfológicas de *Euphorbia serpens*.

Ref: a, f: planta entera; b y g: hojas y estípulas; c, e, h, j y k: ciatios. Extraído del Instituto de botánica Darwinión.

Composición química

Son escasos los estudios químicos sobre esta especie. Se sabe que la parte aérea contiene fenoles, flavonoides, cianidinas, taninos y saponinas. En el látex se encontraron diterpenos como tiglianos, ingenanos y dafnanos; resinas; caucho y taninos (Alonso y Desmarchelier 2006). Además se estudió el porcentaje de *n*-

alcanos, donde C₃₁ con un 42,9% fue el más representado, seguido por C₃₃ con un 20,9%, luego C₂₉ con 6,9 %, C₃₂ con 3,4 % y finalmente C₂₇ con 1,6% (Bittner *et al.* 2001).

En un estudio quimiotaxonómico del género *Euphorbia* L. basado en los patrones de sus flavonoides se determinó la presencia de:

- Flavonoles, como quercetina (3',4', 5,7- tetrahidroxiflavonol) y derivados: 3',4',5-trihidroxi-7-O-ramnosilflavonol; 3',4'-dihidroxi-7-O-glucosilflavonol; 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-glicosilflavonol; 3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-diglucosilflavonol; 3',4',7-tetrahidroxi-3-O-ramnoglucosilflavonol. También se identificaron derivados del kaempferol, como 4,5,7-trihidroxi-3-O-glucosilflavonol y 4',5,7-trihidroxi-3-O-diglucosilflavonol.

-Flavonas, como luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) y derivados: 3',4',7-trihidroxiflavona; 3',4',5-trihidroxi-7-O-glucosilflavona; 3',4',5-trihidroxi-7-O-ramnoglucosilflavona; apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona) y sus derivados: 4',5-dihidroxi-7-O-glucosilflavona y 4',5-dihidroxi-7-O-galactosilflavona (Aqueveque *et al.* 1999).

Se han realizados algunos estudios sobre la var. *microphylla*, sin embargo el conocimiento fitoquímico de la var. *serpens* es casi nulo. En la var. *microphylla* se determinó la presencia de hidrocarburos saturados lineales C₂₄ y C₃₆, flavonoides como luteolina 7-O-glucósido, quercetina 3-O-galactósido, vitexina, isovitexina, luteolina y apigenina, y antocianinas como cianidina 3-O-glucosido (Galazar *et al.* 1983) y ácido tánico (Barboza *et al.* 2009). Gratti, Ricco y Gurni (2007), no encontraron taninos totales para *E. serpens* var. *microphylla* y sugieren que la falta de estos compuestos en las especies de la Sección *Anisophyllum* resulta un

carácter fitoquímico distintivo para la separación del resto de las especies del género.

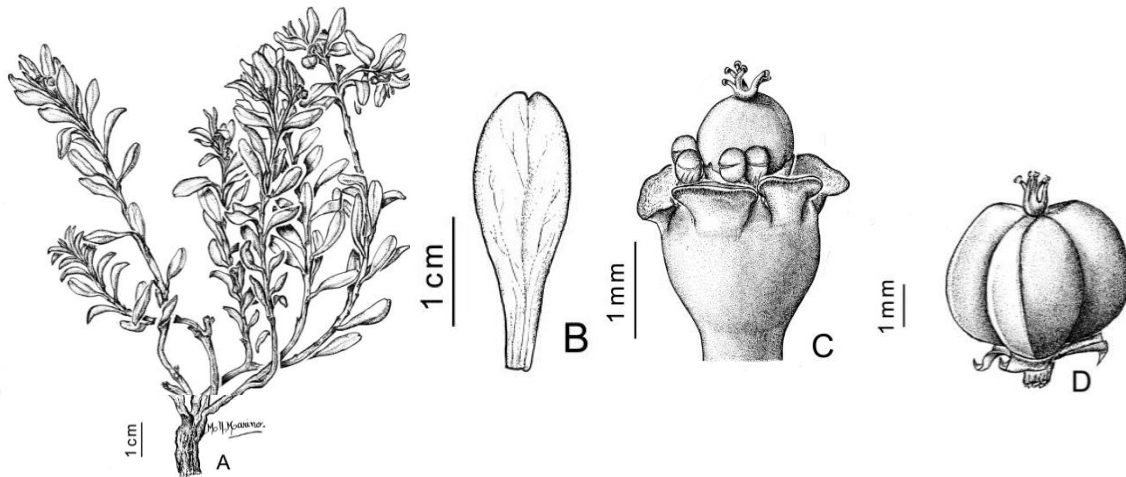
***Euphorbia schickendantzii* Hieron. Antecedentes y estudio fitoquímico. Estructura de los metabolitos identificados**

Descripción botánica

La especie fue descrita por primera vez por Hieronymus en 1881, y posteriormente por Chodat y Wilczek en 1902 con el nombre de *Euphorbia evonymocarpa*, siendo este nombre considerado como sinónimo. Son plantas de 10 a 40 cm de altura (**Figura I.7 a**), glabras; raíz no tuberosa, de hasta 20 cm de longitud por 0,3 a 1,8 cm de diámetro; tallos de 20 cm de alto, entrenudos de 0,4 a 1,5 cm. Hojas inferiores obovadas, alternas, de 10 a 40 mm de longitud, por 5 a 15 mm de ancho; hojas superiores elípticas u obovadas, alternas u opuestas, de 15 a 30 mm de longitud por 5 a 10 mm de ancho, bordes enteros, raramente dentado, y con pelos axilares (**Figura I.7 b**). Estípulas glandulíferas, rápidamente caedizas. Ciatios en pseudopleocasios 3-ramificados, terminales (**Figura I.7 d**). Involucro cilíndrico o ligeramente acopado, de 2 a 5 mm de altura, por 0,5 a 2 mm de diámetro; 4 nectarios erguidos, verdes, planos; lóbulos tridentados, con pelos (**Figura I.7 c**). De 8 a 15 flores masculinas; bractéolas generalmente cilíndricas. Flores femeninas con perianto generalmente corto y craso; estilos cortos, adpresos, bífidos hasta el tercio basal. Cápsula subcónica, triqueta, de 3 a 5 mm de alto por 4 a 5 mm de diámetro. Semillas lisas, ovoides, ligeramente subprismáticas, de 2 a 2,5 mm de altura por 1,8 a 2 mm de diámetro (Instituto de Botánica Darwinión; Subils 1977).

En la Pampa, en la región del bosque de caldén, es la especie más común (**Figura I.8**), donde abunda en sitios modificados especialmente en suelos cultivados (Steibel 1995).

Figura I.7: Características morfológicas de *Euphorbia schickendantzii*.



Ref: A: Planta entera; B: Hoja; C: Involucro; D: Ciatio. Extraído del instituto de Botánica Darwinión.

Figura I.8: Ejemplar de *Euphorbia schickendantzii*.



Ref: Ejemplar recolectado por la autora para esta tesis. Fotografía tomada por la autora.

Efectos farmacológicos probados

Euphorbia schickendantzii tuvo efectos como aumentador de la permeabilidad en piel de sapo, facilitando la administración de fármacos por vía transdérmica; este efecto tuvo correlación con su poder irritante (Alvarez y Borkowski 2007). El moderado efecto irritante de su infusión fue probado previamente en otro estudio de la misma autora (Alvarez *et al.* 2004). Además, se ha mostrado la actividad antioxidante de sus extractos acuosos, metanólicos y de acetona (Alvarez *et al.* 2007). En un estudio realizado por Lamberti *et al.* (2009), donde se analiza el efecto larvicida de 53 extractos hidroalcohólicos de especies vegetales, se observó que *E. schickendantzii* tenía inhibió la motilidad de larvas III de *Haemonchus spp.*

Composición química

Muy poco se conoce sobre la química de esta especie. Se han encontrado flavonoides del tipo quercetina y antocianos basados en cianidinas. El contenido de fenoles totales, expresado en mg de ácido tánico por g de material vegetal seco fue de 107,87 mg/g \pm 21,02 mg/g y los taninos totales fueron 42, 05 (Gratti, Ricco y Gurni 2007).

Euphorbia collina. Antecedentes y estudio fitoquímico. Estructura de los metabolitos identificados

Descripción botánica

Euphorbia collina fue descrita por Phillipi en 1857. Es una especie polimorfa constituida por 8 variedades y muy relacionada taxonómicamente con *E. portulacoides*. De hecho 6 de sus variedades son también consideradas como

subespecies o variedades de *E. portulacoides*. En la **tabla I.2** se muestran las subespecies y sus sinónimos aceptados.

En esta tesis se trabajó con *Euphorbia collina* Phil. var. *collina* sinónimo de *Euphorbia portulacoides* subsp. *collina* (Phil.) Croizat.

Tabla I.2: Sinonimias aceptadas de la especie *Euphorbia collina*.

Variedades de <i>Euphorbia collina</i>	Sinonimias aceptadas
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>collina</i>	<i>E. portulacoides</i> L. subsp. <i>collina</i> (Phill.)
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>andina</i> (Phil.) Subils.	<i>E. portulacoides</i> L. subsp. <i>major</i> var. <i>andensis</i> Croizat. <i>E. andina</i> Phil. <i>E. dasyclada</i> Dusén.
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>chrysophylla</i> (Klotzsch et Garcke) Subils	<i>Tithymalus chrysophyllus</i> Klotzsch et Garcke. <i>E. chrysophylla</i> (Klotzsch et Garcke) Boiss.
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>glaucescens</i> (Chod. et Wilczek) Subils	<i>E. portulacoides</i> L. var. <i>glaucescens</i> Chodat et Wilczek
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>minor</i> (Hicken) Subils	<i>E. portulacoides</i> L. var. <i>minor</i> Hicken
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>nahuelhuapina</i> (Croizat) Subils	<i>E. portulacoides</i> L. subsp. <i>nahuelhuapina</i> L.
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>patagónica</i> (Hieron.) Subils	<i>E. patagónica</i> Hieron.
<i>E. collina</i> Phil. var. <i>sphatulata</i> (Chodat et Wilczek) Subils	<i>E. portulacoides</i> L. var. <i>sphatulata</i> Chodar et Wilczek

Es una planta glabra; de raíz no ramificada, de hasta 12 cm de longitud y 2 cm de diámetro; tallos crasos, de 8 a 30 cm de altura, entrenudos de 1 a 3,5 cm. Hojas inferiores elípticas, u obovadas, de 5 a 25 mm de longitud por 5 a 10 mm de ancho; hojas superiores elípticas, o rómbicas, de 7 a 27 mm de longitud por 8 a 15 mm de ancho; ambas de bordes lisos (**Figura I.9 b y Figura I.10 a**). Sin estípulas. Ciatios en pseudopleocasios; radios florales de 2 ó 3 veces dicótomos. Involucros acoplados, de 2 a 3 mm de altura por 2,3 a 3,5 mm de diámetro; 5 nectarios verdes, deltoides, horizontales o reflexos, con el borde externo revoluto; lóbulos rectangulares, laciniados (**Figura I.9 c y Figura I.10 b**). Flores masculinas en número de 25 a 30; bractéolas anchas, laciniadas. Flores femeninas con perianto corto; estilos cortos, unidos en el tercio basal, bífidos en el tercio apical; estigma capitado. Cápsulas subcónicas, de 3 a 4 mm de altura por 4 a 5 mm de diámetro. Semillas subprismáticas, lisas, blancas, de 2 a 3 mm de altura por 1,8 a 2,2 mm de diámetro (Subils 1977), (**Figura I.9 a**).

Figura I.9: Características morfológicas de *Euphorbia collina*.



Ref: **A:** semilla; **B:** Planta entera; **C:** Ciatio. Extraído de Subils (1977).

Figura I.10: Ejemplares de *Euphorbia collina*.



a

b

Ref: **a:** Planta entera; **b:** Ciatio. Ejemplares recolectados para esta tesis por la autora.

Efectos farmacológicos probados

Seuqueiros *et al.* (2003) demostraron la actividad proteolítica de *E. collina*, la cual estaría dada por peptidasas de tipo serina.

Composición química

Se han encontrado flavonoides del tipo quercetina y antocianos basados en cianidinas. La composición de fenoles totales, expresado en mg de ácido tánico por g de material vegetal seco cambia entre las variedades, siendo de 188,8 mg/g a 56,11 mg/g. Los autores especulan que estas variaciones se deben a factores ambientales. En particular para *E. collina* var. *collina* fue de 92,2 mg/g \pm 36,09 mg/g. Los taninos totales oscilaron en un rango de 83 a 4,6 según la variedad, para *E. collina* var *collina* fueron de 27,59 (Gratti, Ricco y Gurni 2007). En un screening

para la identificación de alcaloides, se observó la ausencia de los mismos, tanto en *E. collina* como en *E. portulacoides* (Niemeyer 2014).

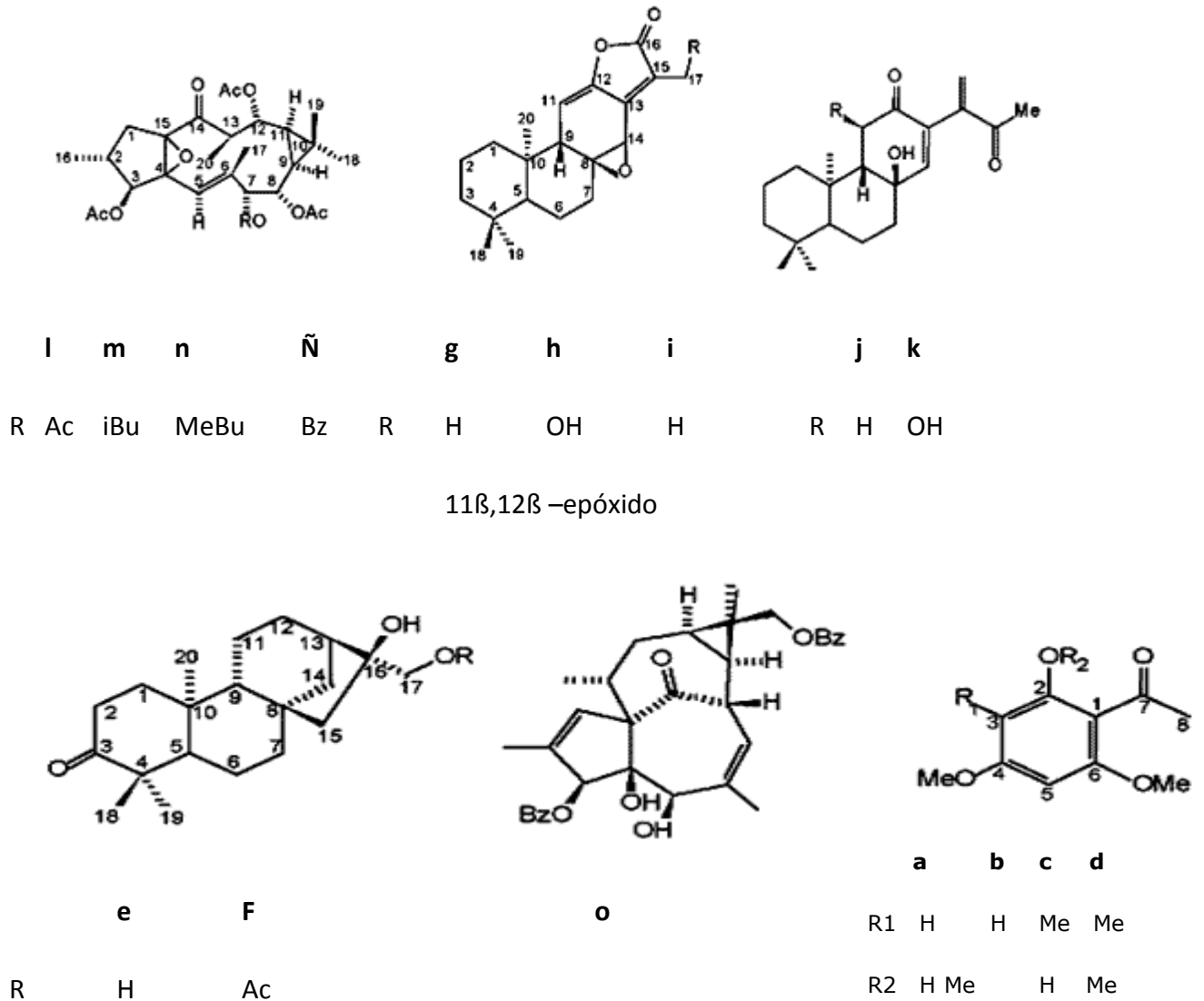
Debido a sus sinonimias, a continuación se describen los antecedentes estudiados para *E. portulacoides*.

Composición química descrita para Euphorbia portulacoides

En los estudios realizados por Bittner *et al.* 2001 y Morgenstern *et al.* 1996, se encontraron fenoles del tipo floroacetofenonas (**Figura I.11, a, b, c y d**) y diterpenos: dos del tipo kaurano (**Figura I.11, e y f**), tres derivados de abietano (**Figura I.11, g, h, i, j y k**), cuatro derivados de latiranos (**Figura I.11, l, m, n y ñ**) y uno derivado de ingenano (**Figura I.11, o**).

En cuanto a sus flavonoides se sabe que contiene flavonoles y flavonas. Dentro de los flavonoles se han descrito quercetina y sus derivados, a saber: 3',4',5'-trihidroxi-7-O-ramnosilflavonol; 3',4'-dihidroxi-7-O-glucosilflavonol; 3',4', 5,7-tetrahidroxi-3-O-ramnosilflavonol; 3',4', 5,7-tetrahidroxi-3-O-glucosilflavonol; 3',4', 5,7-tetrahidroxi-3-O-diglucosilflavonol; y derivados del kamferol: 4, 5,7-trihidroxi-3-O-diglucosilflavonol. Dentro de las flavonas se encontraron derivadas de la luteolina: 3',4',7-trihidroxi-7-O-glucosilflavona y 3',4',5-trihidroxi-7-O-glucosilflavona (Aqueveque *et al.* 1999). También se estudió el porcentaje de n-alcenos, donde C₃₁ con un 45,7% fue el más representado, seguido por C₂₉ con un 17,4%, luego C₃₃ con 13,6 %, C₂₇ con 6,4 %, C₃₀ con 3,8% y finalmente C₃₂ con 1,5 % (Bittner *et al.* 2001).

Figura I.11: Compuestos fenólicos y diterpénicos aislados de *Euphorbia portulacoides*.



Ref: l, m, n y ñ derivados de latirano, g, h, i, j y k derivados de abietano, e y f derivados del kaurano, o derivado de ingenano, a, b, c y d floroacetofenonas. Extraído de Bittner *et al.* 2001.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 2009, vol. 40, p. 311-331.
- ALONSO, J.; DESMARCHELIER, C. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases Científicas para su Aplicación en Atención Primaria de la Salud. *Editorial Lola, Buenos Aires*, 2006, p. 625-627.
- ALVAREZ M. E., *et al.* Irritant activity of *Euphorbia schickendantzii* and *Colliguaja integerrima* (Euphorbiaceae): a histology study. *Biocell*, 2004, vol. 28, no. 3, p. 350.
- ALVAREZ, M. E., *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of extracts from aerial parts of *Colliguaja integerrima* and *Euphorbia schickendantzii* (Euphorbiaceae). *Biocell*, 2007, vol. 31, no 1, p. 154.
- ALVAREZ, M. E. y BORKOWSKI, E. Efecto de infusiones de *Euphorbia schickendantzii* y *Colliguaja integerrima*, en la permeabilidad de piel de sapo. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2007, vol. 6, no 6, p. 321-322.
- AQUEVEQUE, P., *et al.* Quimiotaxonomía de las especies chilenas del género *Euphorbia* L. basada en los patrones de flavonoides. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 1999, no 44, p. 061-065.
- ARGENTINAT. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Secretaría de Articulación Científico Tecnológica, Ciencia Ciudadana. Disponible en <https://www.argentinat.org/taxa/162845-Euphorbia-pulcherrima> [consultado el 10 de noviembre de 2022].

- ASTUDILLO-VÁZQUEZ, A.; MATA, R.; NAVARRETE, A. El reino vegetal, fuente de agentes antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 2009, vol. 37, no 1, p. 7-43.
- BACIGALUPO, N. M., *et al.* Acalypha. *Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina*, 1999, vol. 2, p. 590-592.
- BARBOZA, G. E., *et al.* Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 2009, vol. 34, no 1-2, p. 7-365.
- BARD, C. L. A contribution to the history of medicine in Southern California. *Journal of California and Great Basin Anthropology*, 2006, vol. 26, p. 95-108.
- BERMAN, B. New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenolmebutate gel. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2012, vol. 5, p. 111.
- BITTNER, M., *et al.* Estudio Químico de especies de la Familia *Euphorbiaceae* en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 2001, vol. 46, no 4, p. 419-431.
- CHERUSE, J. J.; BALDINI, O.; BRUNO BLANCH, L. E. Ensayo farmacodinámico preliminar de *Euphorbia serpens* HBK (*Euphorbiaceae*). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 1983, vol. 2.
- CHODAT, R. H. Y WILCZEK E. *Bulletin L'Herbier Boissier*, 1902, vol 2, no 2, p. 532.
- COLLEY, F. C. Traditional Indian medicine in Malaysia. *Journal of the Malaysian Branch of the Royal Asiatic Society*, 1978, vol. 51, no 1, 233, p. 77-109.

- CONTICELLO, L., *et al.* El uso plantas medicinales por la comunidad mapuche de San Martin de los Andes, Provincia de Neuquen (Argentina). [Use of medicinal plants by the Mapuche community at San Martin de los Andes, Province of Neuquen]. *Parodiana*, 1997, vol. 10, no 1, p. 2.
- DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. *Multequina*, 1997, no 6.
- DE-JI, P., *et al.* Kansuiphorin-C and-D, cytotoxic diterpenos from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, 1991, vol. 30, no 3, p. 1018-1020.
- DU TOIT, B. M. Religion, ritual, and healing among urban black South Africans. *Urban Anthropology*, 1980, p. 21-49.
- DUNN, M. E. Coquille Flora (Louisiana): an ethnobotanical reconstruction. *Economic Botany*, 1983, vol. 37, no 3, p. 349-359.
- ERNST, M., *et al.* Global medicinal uses of *Euphorbia L.* (*Euphorbiaceae*). *Journal of ethnopharmacology*, 2015, vol. 176, p. 90-101.
- EVANS, F. J.; TAYLOR, S. E. Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. En *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Vienna, 1983. p. 1-99.
- FEEST, C. F. Another French account of Virginia Indians by John Lederer. *The Virginia Magazine of History and Biography*, 1975, vol. 83, no 2, p. 150-159.

- GALAZAR, S. *et al.* Componentes de *Euphorbiaceas* argentinas. *Anales Asoc. Química Argentina*, 1983, no. 71, p. 505-508.
- GHORBANI, A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran:(Part 1): General results. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 102, no 1, p. 58-68.
- GIARELLI, E.; JACOBS, L. A. Traditional Healing and HIV–AIDS in KwaZulu-Natal, South Africa: To curb the epidemic, South African nurses, physicians, and traditional healers are learning to collaborate. *AJN The American Journal of Nursing*, 2003, vol. 103, no 10, p. 36-46.
- GRATTI, A.; RICCO, R.; GURNI, A. Estudio fitoquímico preliminar en especies patagónicas del género *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2007, vol. 6, no 5, p. 248-249.
- GOVAERTS, R, *et al.* World checklist and bibliography of *Euphorbiaceae* (with *Pandaceae*). *Royal Botanic Gardens, Kew*, 2000.
- GUSINDE, M. Plantas medicinales que los indios Araucanos recomiendan. *Anthropos*, 1936, no 5, p. 850-873.
- HALLEUX-OPSOMER, C. Un herbier médicinal du haut Moyen Âge: l'Alfabetum Galieni. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 1982, vol. 4, no 1, p. 65-97.
- HARGREAVES, B. J. Killing and curing. *The Society of Malawi Journal*, 1978, vol. 31, no 2, p. 21-30.
- HARGREAVES, B. J. Parallels in plant use in Africa and North America. *The Society of Malawi Journal*, 1981, vol. 34, no 1, p. 56-71.

- HARGREAVES, B. J. The spurges of Botswana. *Botswana Notes and Records*, 1991, vol. 23, p. 115-158.
- HEYWOOD, V. H. Flowering plants of the world. 2nd ed. New Jersey, Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1985. p. 335.
- HECKER, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other *Euphorbiaceae*. *Cancer Research*, 1968, vol. 28, no 11, p. 2338-2348.
- HUA, J., *et al.* Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry*, 2017, vol. 136, p. 56-64
- HIERONYMUS, J. Plantae Diaphoricae Florae Argentinae. *Boletín Académico Nacional de Ciencias de Córdoba*. 1881, vol.4, no 2, p. 199-598.
- HIERONYMUS, G. *Boletín Académico Nacional de Ciencia Córdoba*, 1881, no. 4, p. 17.
- INSTITUTO DARWINIÓN. Flora Argentina. [en línea]. Argentina. Disponible en <http://www.floraargentina.edu.ar/>. [Consulta 21/07/17]
- JAIN, S. K. Medicinal plant lore of the tribals of Bastar. *Economic Botany*, 1965, vol. 19, no 3, p. 236-250.
- KEMBOI, Douglas, *et al.* A review of the ethnomedicinal uses, biological activities, and triterpenoids of *Euphorbia* species. *Molecules*, 2020, vol. 25, no 17, p. 4019.
- KHAN, S. A., *et al.* Comparative assessment of heavy metals in *Euphorbia helioscopia* L. *Pakistan Journal of Medical Sciences. Res*, 2008, vol. 14, no 1-2, p. 91-100.

- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, 2011, vol. 72, no 13, p. 1510-1530.
- KROCHMAL, A. Seeds of weedy *Euphorbia* species and their identification. *Weeds*, 1952, p. 243-255.
- KUNTS, C. Sigismund; Bonpland, Amat y Humboldt Alex. *Nova genera et especies plantarum*. Francia, 1817, 2° ed., p. 52.
- KUPCHAN, S. M., *et al.* Antileukemic principles isolated from *Euphorbiaceae* plants. *Science*, 1976, vol. 191, no 4227, p. 571-572.
- LAI, X. Z.; YANG, Y. B.; SHAN, X. The investigation of Euphorbiaceous medicinal plants in Southern China. *Economic Botany*, 2004, vol. 58, no 1, p. 307-320.
- LAMBERTI, R. O., *et al.* Cribado antihelmíntico de plantas recolectadas en la Provincia de La Pampa. *Revista de la Facultad de Veterinaria*, 2009, vol. 11, p. 26-31.
- LEVEY, M. Medieval Arabic Toxicology: The Book on Poisons of Ibn Wahshīya and its Relation to Early Indian and Greek Texts. *Transactions of the American Philosophical Society*, 1966, p. 1-130.
- MARTICORENA, C. Contribucion a la estadística de la flora vascular de Chile (Contribution to the statistics of the vascular flora of Chile.). *Gayana, Botanical* 1990, vol. 47, no 3-4, p. 85-113.

- MARTÍNEZ, G. J. Farmacopea natural y tratamiento de afecciones de la piel en la medicina tradicional de los campesinos de las sierras de Córdoba (República Argentina). *Dominguezia*, 2008, vol. 24, no 1, p. 27-46.
- MARZOCCA, A., *et al.* Vademécum de malezas medicinales de la Argentina: indígenas y exóticas. *Orientación Gráfica*, 1997.
- MORGENSTERN, T., *et al.* Diterpenes and phloracetophenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochemistry*, 1996, vol. 41, no 4, p. 1149-1153.
- MUIÑO, W. A.; FERNÁNDEZ, L. Plantas, dolencias y actores sociales vinculados con la medicina tradicional de Agua Escondida y las serranías del Nevado, Mendoza (Argentina). *Lilloa*, 2015, p. 46-61.
- MUNSON, P. J. Contributions to Osage and Lakota ethnobotany. *The Plains Anthropologist*, 1981, p. 229-240.
- NAIR, R.; KALARIYA, T.; CHANDA, S. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. *Turkish Journal of Biology*, 2005, vol. 29, no 1, p. 41-47.
- NAMBUDIRI, N. S.; NAMBUDIRI, V. E. *Euphorbia peplus*: 18th-century insights on a 21st-century therapy. *JAMA dermatology*, 2013, vol. 149, no 9, p. 1081-1081.
- NIEMEYER, H. M. Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2014, vol. 13, no 1.
- NITTA, T., *et al.* Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Health Science*, 2002, vol. 48, no 3, p. 273-276.

- NOUMI, E.; YOMI, A. Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. *Fitoterapia*, 2001, vol. 72, no 3, p. 246-254.
- PAHLEVANI, A. H., *et al.* Notes on some species of the genus *Euphorbia* in Iran. *Rostaniha*, 2007, vol. 8, no 2, p. 89-103.
- PAHLEVANI, A. H.; AKHANI, H. Seed morphology of Iranian annual species of *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2011, vol. 167, no 2, p. 212-234.
- PAHLEVANI, A. H.; RIINA, R. A synopsis of *Euphorbia* subgen. *Chamaesyce* (*Euphorbiaceae*) in Iran. En *Annales Botanici Fennici*. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, 2011. p. 304-316.
- PAYNE, A, *et al.* Anti-Vibrio and Antioxidant Properties of Two Weeds: *Euphorbia serpens* and *Amaranthus viridis*. Asish, Kumar Mukhopadhyay, Subhajyoti Deka, Lahari Saikia y Shoma Paul Nandi. *Research Journal of Medicinal Plant*, 2015, vol. 9, no 4, p 170-178.
- RAGANESE, A. E. Plantas tóxicas para el ganado en la Región Central Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. La Plata, 1955, vol. 31, no 2, p. 133-338.
- RAUF, A., *et al.* Preliminary phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia milli*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 2014, vol. 27, no 4.
- RIZK, A. F. M. The chemical constituents and economic plants of the *Euphorbiaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1987, vol. 94, no 1, p. 293-326.

- ROIG, F. A. Flora medicinal mendocina: las plantas medicinales y aromáticas, de la provincia de Mendoza (Argentina); (aborígenes, exóticas espontáneas o naturalizadas y cultivadas). *Ediunc*, 2001.
- SCHROEDER, G., *et al.* 7-Oxo-, 7 α -hydroxy-and 7 β -hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*, 1980, vol. 19, no 10, p. 2213-2215.
- SEQUEIROS, C., *et al.* Proteolytic activity in some Patagonian plants from Argentina. *Fitoterapia*, 2003, vol. 74, no 6, p. 570-577.
- SHI, Q.-W.; SU, Xiao-Hui; KIYOTA, Hiromasa. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical reviews*, 2008, vol. 108, no 10, p. 4295-4327.
- SIB-AYSÉN. UNIVERSIDAD DE MAGALLANES. SISTEMA DE INFORMACIÓN EN BIODIVERSIDAD PARA AYSÉN. Catálogo de especies [en línea]. Chile. Disponible en https://kataix.umag.cl/sib-aysen/catalog/taxon/euphorbia_collina/gallery/ [Consulta 1/07/2017].
- STEIBEL, P. Las *Euphorbiaceas* (*Euphorbiaceae* Juss.) nativas, naturalizadas y adventicias de la provincia de La Pampa, República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1995, vol. 8, p. 69-99.
- STEIBEL, P. E. Nombres y usos de las plantas aplicados por los indios Ranqueles de La Pampa (Argentina). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1997, vol. 9, no 2, p. 1-40.
- SORARU, S. B., *et al.* Plantas de la medicina popular Argentina. *Ed. Albatros*. Buenos Aires. 1978. P. 163.

- SUBIL, R. Las especies de *Euphorbia* de la República Argentina. *Kurtziana*, 1977, vol. 10, p. 83-248.
- TANVEER, A., *et al.* Allelopathic potential of *Euphorbia helioscopia* L. against wheat (*Triticum aestivum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medic.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2010, vol. 34, no 1, p. 75-81.
- VAN SAM, H.; BAAS, P.; KEBLER, P. Traditional medicinal plants in Ben En national park, Vietnam. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 2008, vol. 53, no 3, p. 569-601.
- VASAS, A., *et al.* Diterpenes from European *Euphorbia* Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery. *European journal of organic chemistry*, 2012, vol. 2012, no 27, p. 5115-5130.
- VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). *Chemical reviews*, 2014, vol. 114, no 17, p. 8579-8612.
- WONG, W. Some folk medicinal plants from Trinidad. *Economic Botany*, 1976, vol. 30, no 2, p. 103-142.
- KUPCHAN, S. Morris, *et al.* Antileukemic principles isolated from *Euphorbiaceae* plants. *Science*, 1976, vol. 191, no 4227, p. 571-572.
- XIFREDA, C. C. Plantas útiles de la flora de la Provincia de Buenos Aires. 1992.
- YERIEN, C. A., *et al.* Las especies de *Euphorbia* sección *Anisophyllum* (*Euphorbiaceae*) del Parque Nacional Mburucuyá. *Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas*, 2005, Resumen: B-053.

-ZAYED, Salah M., *et al.* Dietary cancer risk conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (*Euphorbiaceae*). *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1998, vol. 124, no 3, p. 131-140.

-ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; RODRIGUEZ, D. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. Biodiversity analysis of the vascular plants of Argentina). *Kurtziana*, 1999, vol. 27, no 1, p. 17-167.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar tres especies del género *Euphorbia* que se desarrollan en la provincia de La Pampa empleadas por la medicina tradicional: *E. serpens* Kunth., *E. schickendantzii* Hieron. y *E. collina* Phil., para evaluar la posible presencia de actividad antimicrobiana, antiparasitaria, diurética y citotóxica, empleando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Realizar estudios fitoquímicos para identificar los grupos químicos presentes y aislar e identificar compuestos con actividad farmacológica.

Objetivos específicos

- ✓ Recolectar partes aéreas de *E. serpens* Kunth., *E. schickendantzii* Hieron. y *E. collina* Phil.
- ✓ Realizar extracciones del material vegetal con solventes de diferente polaridad.
- ✓ Evaluar mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* la presencia de actividad antimicrobiana, antiparasitaria, diurética y citotóxica de los extractos obtenidos.
- ✓ Aislar componentes bioactivos mediante fraccionamiento bioquímico, empleando métodos cromatográficos, especialmente cromatografía en columna (Silica gel, sephadex LH-20), y cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase normal y fase reversa.



CAPÍTULO 1

Evaluación *in vivo* de la actividad diurética de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Capítulo 1

Evaluación *in vivo* de la actividad diurética de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

INTRODUCCIÓN

Durante miles de años, la humanidad ha utilizado diuréticos para reducir la retención de líquido causada por algunas enfermedades tales como, hipertensión arterial, enfermedades cardíacas o síndrome premenstrual, entre otros. Aunque hay un amplio stock de drogas sintéticas utilizadas como diuréticos, las mismas pueden presentar contraindicaciones y efectos secundarios como alteraciones en el equilibrio electrolítico, alcalosis, hipocalcemia, somnolencia, trastornos hepáticos, etc. Estos efectos colaterales fundamentan la búsqueda de diuréticos naturales nuevos y más seguros para el paciente.

En la medicina tradicional, un gran número de infusiones y decocciones de plantas son utilizados empíricamente para reducir la retención de líquidos. Pero el efecto diurético atribuido a estas plantas debe ser demostrado científicamente, ya que la diuresis observada podría ser resultado del aumento de ingesta de líquidos en forma de infusiones.

Euphorbia serpens, como su nombre vulgar lo indica, “yerba meona”, es una planta ampliamente distribuida a nivel mundial, utilizada por la medicina popular por sus propiedades diuréticas (Steibel *et al.* 2009). Sin embargo, se reportan escasos estudios sobre esta propiedad (Cheruse *et al.* 1983).

En este Capítulo se describen los ensayos realizados para evaluar la actividad diurética de *E. serpens*, junto a dos especies adicionales del mismo género, *E. schickendantzii* y *E. collina*, recolectadas en la Provincia de La Pampa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación del material vegetal

Se realizaron expediciones durante los meses de enero y febrero de 2014 para recolectar ejemplares de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*. El material recolectado fue identificado en la Facultad de Agronomía de la UNLPam por la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía de la UNLPam según Steibel (1995) y Subils (1977). Un ejemplar de cada especie fue depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía (SRFA).

Las muestras recolectadas fueron secadas a la sombra y examinadas para verificar que estuvieran libres de contaminantes. Fueron conservadas en bolsas individuales hasta el momento de la preparación de los extractos.

Tabla 1.1: Datos de recolección del material vegetal estudiado.

Nombre científico	Lugar de recolección	Fecha de recolección	Peso seco recolectado en kg.	N° referencia de herbario
<i>Euphorbia serpens</i>	Vivero Forestal en Trenel. Acceso Pte. Perón. Trenel. La Pampa. -35°41'16'' -64°07'58''	28 y 29 de enero de 2014.	2,660	H. Álvarez 1, 2 y 3 SRFA.
<i>Euphorbia schickendant</i>	Extremo Norte de Reserva Provincial Parque Luro.	1 y 2 de Febrero de	0,875	H. Álvarez 5, 6 y 7 SRFA.

<i>zii</i>	-36°90'003'' -64°28'082''	2014		
<i>Euphorbia collina</i> var. <i>collina</i>	Ruta prov. 10. Camino de entrada a Colonia Emilio Mitre. La Pampa. Coordenadas: -36° 20'277'' -66° 27' 898'' 2°	Fecha 8 y 17 de febrero de 2014	1,2	H. Álvarez 8, 9 y 10. SRFA

Obtención de extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Obtención de extractos acuosos de Euphorbia serpens, Euphorbia schickendantzii y Euphorbia collina

Los extractos acuosos se obtuvieron por infusión, utilizando 10 g de partes aéreas desecadas en 1.0 L de agua destilada a 80 °C y se dejó reposar durante 15 min (Valeta 1955). Después de filtrar se llevó a sequedad en rotavapor a 60 °C y se liofilizó en tubos falcon de 50 ml (**Esquema 1.1**). Los tubos falcon fueron rotulados y pesados para calcular el rendimiento. Los extractos se mantuvieron en frezeer a -18 °C hasta el momento de su utilización.

Obtención de los extractos hidroalcohólicos de Euphorbia serpens, Euphorbia schickendantzii y Euphorbia collina

Los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron a partir de 10 g de material vegetal, parte aérea, desecado y molido. El material vegetal se colocó en un Erlenmeyer de 250 ml y se extrajo con 200 ml de una solución de agua-alcohol (1:1,

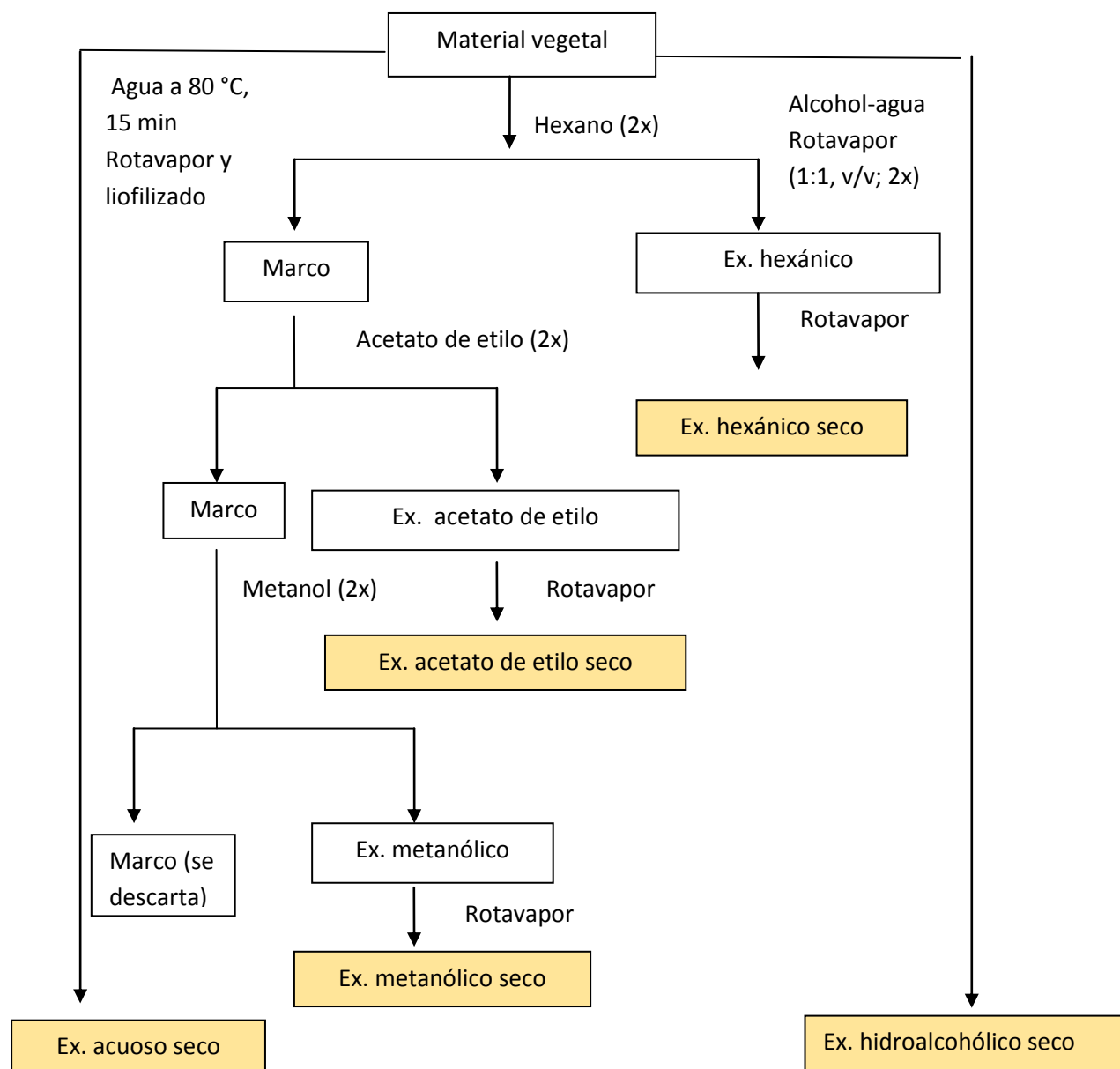
v/v) a temperatura ambiente durante 24 h con agitación ocasional (2x). Los extractos se juntaron y filtraron con papel de filtro y fueron llevados a sequedad en rotavapor a 60 °C.

Obtención de los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de Euphorbia serpens, Euphorbia schickendantzii y Euphorbia collina

Se colocaron 10 g de partes aéreas molidas en un Erlenmeyer de 250 ml y se extrajo por maceración con 100 ml de hexano a temperatura ambiente durante 48 h con agitación ocasional (2x). Se filtró con papel de filtro, se reunieron los extractos hexánicos y se llevaron a sequedad en rotavapor a 60 °C. Los restos de solvente de extracción se eliminaron totalmente en estufa a 40 °C durante 48 h. Se calculó el rendimiento del extracto obtenido y se conservó en freezer a -18 °C hasta el momento de los ensayos.

El marco residual de la extracción con hexano se extrajo a continuación con acetato de etilo (2x) y luego con metanol (2x), utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose así los extractos de acetato de etilo y metanol respectivamente (**Esquema1.1**).

Esquema 1.1: Obtención de los extractos acuosos, hidroalcohólicos, hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.



Se calculó el rendimiento de cada extracto para las tres especies analizadas, expresado como porcentaje de materia seca, con la fórmula: $(\text{Peso de extracto} \times 100) / \text{g de material vegetal seco}$.

Tabla 1.2: Rendimientos de extractos expresados como porcentajes de peso seco.

Especie vegetal	% de extracto acuoso	% de extracto hidroalcohólico	% de extracto hexánico	% de extracto de acetato de etilo	% de extracto metanólico
<i>Euphorbia serpens</i>	25,8	23,8	1,9	1,9	1,1
<i>Euphorbia schickendantzii</i>	30,3	19	4	2,7	6,4
<i>Euphorbia collina</i>	24	19	5,9	3,3	7,9

Evaluación de la actividad diurética de extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Lahiette *et al.* (1998) y Marzocca (1997) informan que la “yerba meona”, *E. serpens*, se administra en forma de infusión. Teniendo en cuenta estos antecedentes se evaluó la presencia de efectos diuréticos administrando infusiones de las tres plantas estudiadas. Los extractos acuosos fueron obtenidos como se indicó previamente.

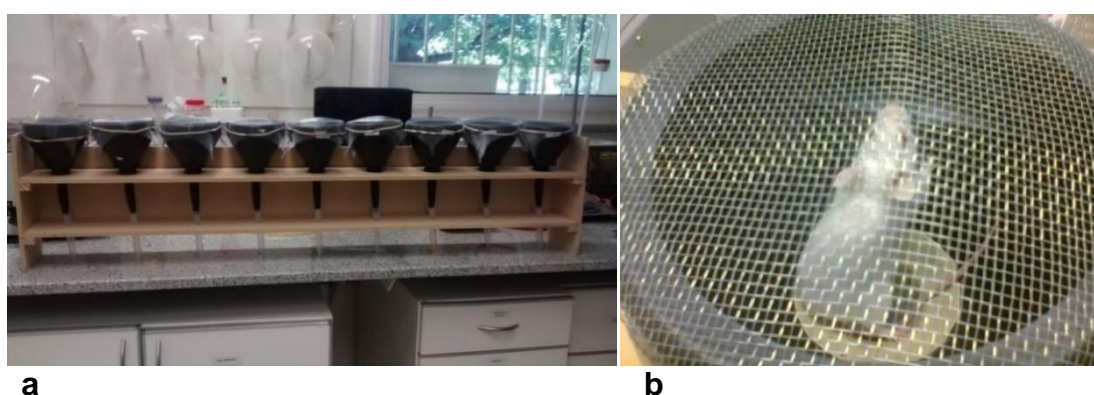
Se utilizaron dos métodos empleando ratones *Mus musculus*, hembras, BALB/c, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa:

Método de recolección de orina empleando embudos modificados

Se siguió la metodología utilizada por Chen *et al.* (2014). Se utilizaron 5 grupos de cinco ratones pertenecientes al mismo grupo etario, de 28-30 g de peso corporal. Los animales fueron privados de alimento 12 h antes del ensayo y tuvieron acceso al agua *Ad libitum*. Media hora antes de iniciar el ensayo se administró a todos los animales por vía oral (VO), con una sonda gástrica, 0,3 ml del excipiente compuesto por solución fisiológica (ExSF). Los extractos fueron disueltos en un

volumen final de 0,70 ml de ExSF y administrados por VO. El grupo control (GC) recibió ExSF. El grupo control positivo (GCP) recibió una dosis de furosemida de 20 mg/kg resuspendida en ExSF. A los grupos tratados se les administró una dosis de 1.000 mg/kg de extractos acuosos de, *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina* resuspendidos en ExSF, conformando los grupos tratados GTs, GTsh y GTc respectivamente.

Figura 1.1: Recolección de orina por embudos modificados.



Ref: a: Se observa el colector de orina fabricado con embudos en tándem. La orina se recolecta en tubos graduados ubicados debajo de cada embudo. b: Vista superior de uno de los embudos modificados donde se observa en la parte inferior una rejilla para retener la materia fecal, permitiendo el paso de la orina. La rejilla superior contiene al animal en el receptáculo.

Cada animal fue colocado en los embudos modificados para recolectar la orina separada de las heces (**Figura 1.1**). Se midió el volumen y densidad cada 1 h durante 6 h. La densidad de la orina fue medida utilizando un refractómetro de Abbe E- Labshop RHC-200 (Rodríguez 2018).

Método de recolección de orina utilizando papeles de filtro

Los animales se agruparon y administraron como se explicó en el punto anterior. Los ratones fueron colocados en recipientes de vidrio para evitar que se movilizan fuera del papel de filtro colocado como piso para que absorban la orina

(Figura 1.2). Los papeles de filtro fueron pesados antes de colocarlos y luego de retirarlos, después de cada micción. Las diferencias de peso medidas en los papeles de filtro, se utilizaron para estimar el volumen de orina excretado por cada animal. La conversión del peso en volumen se realizó empleando como referencia las densidades obtenidas en el ensayo descrito en el punto anterior, utilizando la fórmula $v = m / d$; donde v es el volumen de orina; m , el peso de la orina excretada; y d , la densidad media de orina.

Figura 1.2: Recolección de orina de ratones con papel de filtro.



a

b

Ref: **a:** Acondicionamiento de los animales para medir el volumen de orina excretado utilizando papeles de filtro. **b:** Se observa un ratón contenido sobre el papel de filtro que ha absorbido la emisión de orina.

Evaluación de la actividad diurética de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Para medir el efecto diurético de los extractos hidroalcohólicos se siguió la metodología utilizada por Chen *et al.* (2014), con modificaciones, empleando ratones *Mus musculus*, hembras, BALB/c, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. Los extractos hidroalcohólicos fueron obtenidos como se indicó previamente.

Se utilizaron 5 grupos. Cada grupo se conformó por 5 ratones pertenecientes al mismo grupo etario, de 28-30 g de peso corporal. Los animales fueron privados

de alimento 12 h antes del ensayo y tuvieron acceso al agua *Ad libitum*. Todos los animales recibieron los tratamientos en un volumen final de 0,75 ml VO utilizando una sonda gástrica.

El grupo control (GC), fue administrado con una solución del excipiente compuesto por carboximetilcelulosa al 0,5 % en solución fisiológica y Tween 80 (T80) al 0,05% en solución fisiológica (1:1, v/v) (ExCT). El grupo control positivo (GCP) recibió una dosis de 20 mg/kg de furosemida resuspendida en ExCT. Los grupos tratados recibieron dosis de extractos hidroalcohólicos provenientes de 1 g de planta entera de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, resuspendidos en el ExCT, conformando los grupos tratados GTs, GTsh y GTc respectivamente.

Cada animal se colocó individualmente en embudos modificados (**Figura 1.1**) para coleccionar la orina, separada de las heces, en tubos graduados de 15 ml. Se midió el volumen excretado cada 1 h durante 5 h. A cada colecta de orina se le midió la densidad.

Evaluación de la actividad diurética de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos *Euphorbia serpens*

Para medir el efecto diurético se siguió la metodología utilizada por Chen *et al.* (2014), con modificaciones. Los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos fueron obtenidos como se indicó anteriormente.

Se conformaron grupos de 5 ratones *Mus musculus*, hembras, BALB/c, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa pertenecientes al mismo grupo etario, de 28-30 g de peso corporal. Los animales fueron privados de alimento 12 h antes del ensayo y tuvieron acceso al agua *Ad libitum*. Todos los animales recibieron los tratamientos disueltos

en un volumen final de 0,75 ml VO. Al grupo control (GC) se le administró el excipiente compuesto por una solución de Tween 80 al 0,05 % en solución fisiológica (ExT). El grupo control positivo (GCP) recibió una dosis de 20 mg/kg de furosemida resuspendida en ExT. Los grupos tratados recibieron una dosis de 500 mg/kg de extractos hexánicos (GTh), de acetato de etilo (GTa) y metanólico (GTm) de *E. serpens* resuspendidos con el ExT. El ensayo se desarrolló utilizando la metodología descrita para evaluar los extractos hidroalcohólicos.

Análisis estadístico

En todos los casos la excreción urinaria fue determinada en función del peso corporal y relativizado a 10 g de peso, empleando la fórmula $(10 \times \text{Volumen Excretado} / \text{Peso corporal})$. Además, se determinó el índice diurético utilizando la fórmula $(\text{Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en el grupo tratado} / \text{media del volumen excretado de orina cada 10 g de peso en el grupo control negativo})$ (Abdala *et al.* 2012). Los datos son expresados como la $\bar{x} \pm D.S.$ Los resultados entre los Grupos fueron analizados empleando ANOVA con el software Infostat.

RESULTADOS

Resultados de la evaluación de la actividad diurética de extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Método de recolección de orina empleando embudos modificados

En la **Tabla 1.3** y **Figura 1.3** se muestran las medias y los desvíos estándar del volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h y el índice diurético de

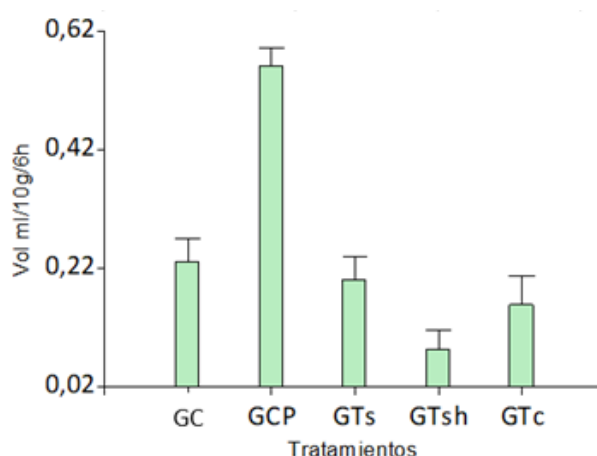
ratones tratados con dosis de 1.000 ppm de extractos acuosos de las tres especies vegetales estudiadas. No se encontró efecto diurético de los extractos acuosos (Duncan $p \leq 0,05$) ni aumento en el índice diurético respecto al GC, con el método de embudos modificados. Se observa en la Tabla 1.3 que el extracto de *E. schickendantzii* produjo una disminución significativa del volumen de orina excretado con respecto al GC.

Tabla 1.3: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h e índice diurético de animales tratados con extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Tratamientos	$\bar{X} \pm D.E$	Índice diurético
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i>	0,2 \pm 0,09 AB	0,87
Grupo tratado <i>Euphorbia schickendantzii</i>	0,08 \pm 0,08 A	0,34
Grupo tratado <i>Euphorbia collina</i>	0,16 \pm 0,11 AB	0,69
Grupo control	0,23 \pm 0,09 B	1
Grupo control positivo	0,56 \pm 0,07 C	2,43

Ref: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) test de Duncan.

Figura 1.3: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h en los diferentes tratamientos.



Ref: GC: grupo control; GCP: grupo control positivo tratado con furosemida; GTs, GTsh, GTc: grupos tratado con extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* respectivamente.

Método de recolección de orina utilizando papeles de filtro

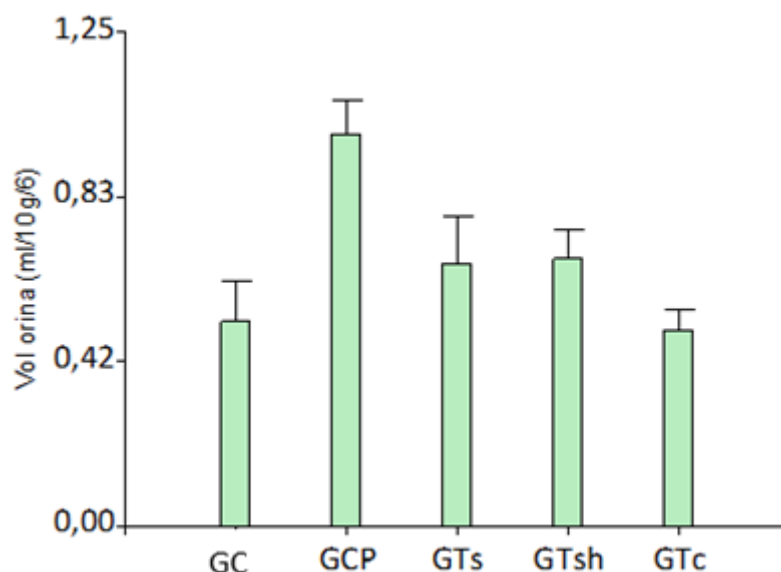
En la **Tabla 1.4** y **Figura 1.4** se muestran las medias y los desvios estándar del volumen excretado de orina cada 10 g de animal en 6 h, y el índice diurético de ratones tratados con dosis de 1.000 ppm de extractos acuosos de las tres especies vegetales estudiadas. No se encontraron diferencias significativas en el volumen excretado por los animales tratados con los extractos (Duncan $p \leq 0,05$) respecto al grupo control.

Tabla 1.4: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 6 h e índice diurético de animales tratados con extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Tratamientos	$\bar{X} \pm DE$	Índice diurético
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i>	0,66 \pm 0,27 A	1,27
Grupo tratado <i>Euphorbia schickendantzii</i>	0,67 \pm 0,17 A	1,29
Grupo tratado <i>Euphorbia collina</i>	0,49 \pm 0,12 A	0,94
Grupo control	0,52 \pm 0,22 A	1,00
Grupo control positivo	0,99 \pm 0,18 B	1,90

Ref: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con test de Duncan.

Figura 1.4: Excreción urinaria medida como el volumen excretado cada 10 g de peso en 6 h en los diferentes tratamientos.



Ref: GC: grupo control; GCP: grupo control positivo tratado con furosemida; GTs, GTsh, GTc: grupos tratado con extractos acuosos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* respectivamente.

Resultados de la evaluación de la actividad diurética de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

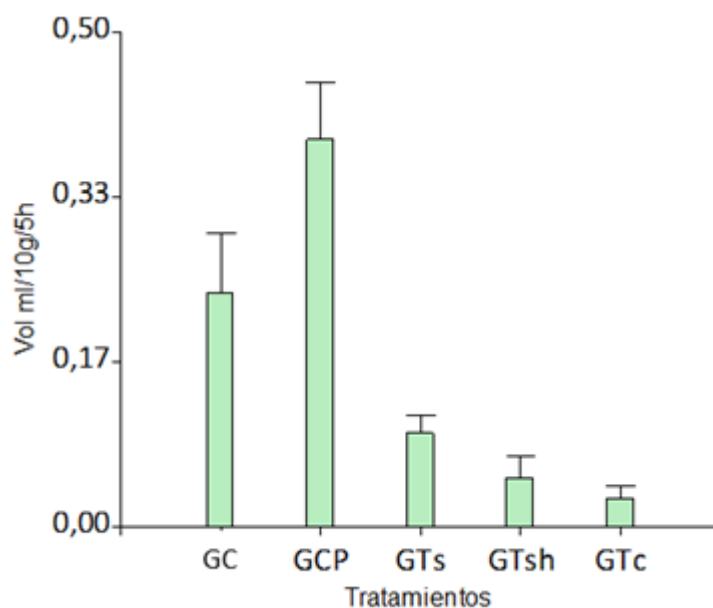
En la **Tabla 1.5** y **Figura 1.5** se muestran las medias y los desvios estándar del volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 5 h y el índice diurético de ratones tratados con extractos hidroalcohólicos proveniente de 1 g de partes aéreas de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*. No se encontró efecto diurético (Duncan $p \leq 0,05$) ni aumento en el índice diurético respecto al grupo control.

Tabla 1.5: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso durante 5 h e índice diurético de animales tratados con extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Tratamientos	$\bar{X} \pm D.E$	Índice diurético
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i>	0,09 \pm 0,04 A	0,4
Grupo tratado <i>Euphorbia schickendantzii</i>	0,05 \pm 0,05 A	0,2
Grupo tratado <i>Euphorbia collina</i>	0,03 \pm 0,03 A	0,12
Grupo control	0,24 \pm 0,14 B	1
Grupo control positivo (furosemida)	0,39 \pm 0,13 C	1,6

Ref: Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Figura 1.5: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso durante 5 h en animales tratados con extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.



Ref: GC: grupo control; GCP: grupo control positivo (furosemida); GTs, GTsh, GTc: grupos tratado con extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* respectivamente.

Resultados de la evaluación de la actividad diurética de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*

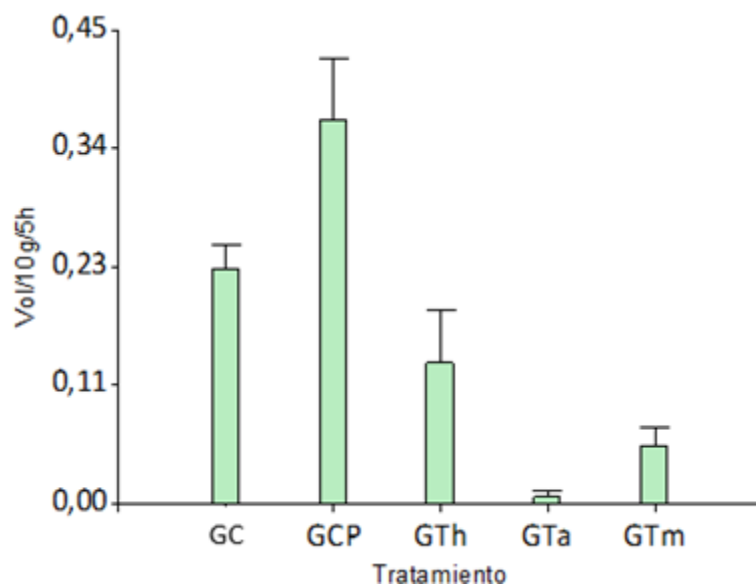
En la **Tabla 1.6** y **Figura 1.6** se muestran las medias y los desvios estándar del volumen excretado de orina cada 10 g de animal en 5 h, y el índice diurético, de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *E. serpens*. No se encontró efecto diurético para los extractos ensayados (Duncan $p \leq 0,05$), ni aumento en el índice diurético respecto al grupo control.

Tabla 1.6: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 5 h e índice diurético de animales tratados con extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*

Tratamientos	$\bar{X} \pm D.E$	Índice diurético
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i> hexano	0,13 \pm 0,11 BC	0,59
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i> acetato de etilo	0,01 \pm 0,1 A	0,04
Grupo tratado <i>Euphorbia serpens</i> metanol	0,06 \pm 0,04 AB	0,27
Grupo control negativo	0,22 \pm 0,05 C	1
Grupo control positivo	0,36 \pm 0,13 D	1,64

Ref: Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$) con test de Duncan

Figura 1.6: Volumen excretado de orina cada 10 g de peso en 5 h en los diferentes tratamientos.



Ref: GC: grupo control; GCP: grupo control positivo tratado con furosemida. GTh, GTa, GTm: grupo tratado con extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*.

DISCUSIÓN

En las condiciones experimentales y dosis ensayadas no se observó la actividad diurética de *E. serpens* descrita por Cheruse *et al.* (1983). Tampoco en las especies *E. schickendantzii* y *E. collina*.

Aunque el uso etnobotánico de *E. serpens* es ampliamente citado, son muy escasos los estudios científicos que confirman esta actividad. Cheruse *et al.* (1983), demostraron la presencia de efecto diurético de extractos acuosos y metanólicos en esta planta empleando ratas blancas Wistar. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo en este trabajo de tesis, utilizando ratones *Mus musculus* BALB/c, no evidenciaron efecto diurético. Si bien en este ensayo se utilizaron animales diferentes al del trabajo citado, y furosemida como droga de referencia, los ratones tratados con furosemida mostraron un aumento significativo del volumen de orina excretado con respecto al grupo control en todos los ensayos, evidenciando la sensibilidad del modelo experimental. Podría especularse que el efecto diurético se expresa en ratas y no en ratones, pero también debe considerarse que las características edafológicas que prevalecen en los lugares de recolección, podrían ser la causa de los diferentes resultados (Bruneton 2001). Las plantas empleadas por Cheruse *et al.* (1983) se recolectaron en inmediaciones de la ciudad de La Plata, área que posee notables discrepancias con el Departamento Maracó de la Provincia de La Pampa.

Los animales del grupo tratado con extracto hidroalcohólico de *E. schickendantzii* y el tratado con extracto de acetato de etilo de *E. serpens* murieron luego de los ensayos, evidenciando la presencia de compuestos tóxicos en dichos extractos.

CONCLUSIONES

- Los ensayos llevados a cabo empleando ratones *Mus musculus* BALB/c con extractos de *E. serpens* (yerba meona), no permitieron confirmar el efecto diurético que le atribuye la medicina tradicional.
- Los ensayos realizados con las especies *E. schickendantzii* y *E. collina* tampoco exhibieron efectos diuréticos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDALA, S., *et al.* Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. *Journal of ethnopharmacology*, 2012, vol. 140, no 2, p. 277-281.
- BRUNETON, J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales, 2001, no. RS 164. B7818. 5 ed. Zaragoza, *Editorial Acribia S.A.*
- CHEN, D. Q., *et al.* Diuretic and anti-diuretic activities of fractions of *Alismatis rhizoma*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, vol. 157, p. 114-118.
- CHERUSE, J.; BALDINI, O.; BRUNO BLANCH, L. Ensayo farmacodinámico preliminar de *Euphorbia serpens* HBK (*Euphorbiaceae*). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 1983, vol. 2.
- LAHITTE, H. B., *et al.* Plantas medicinales rioplatenses: plantas nativas y naturalizadas utilizadas en medicina popular en la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense. 1998. p. 50-53.
- MARZOCCA, A. Vademécum de malezas medicinales de la Argentina indígenas y exóticas. Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora, 1997. P. 282.
- RODRÍGUEZ, J. V., *et al.* El uso del refractómetro en el Laboratorio Clínico Veterinario. 1a ed, *El Manual*, Rosario: UNR Editora. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario, 2018, pág. 15 y 33. Disponible en <https://rehip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/17232/El%20uso%20del%20refract%C3%B3metro.%20Cl%C3%ADnico%20Veterinario%20MANUAL%20%20JOAQU%C3%8DN%20V.%20RODR%C3%8DGUEZ.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

-
- STEIBEL, P. Las *Euphorbiaceas* (*Euphorbiaceae* Juss.) nativas, naturalizadas y adventicias de la provincia de La Pampa, República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Pampa*, 1995, vol. 8, p. 69-99.
 - STEIBEL, P.; TOSO, R.; TROIANI, H. Plantas medicinales de la región pampeana. *Laboratorios LAFITAR S.R.L.*, 2009, 100 p.116.
 - SUBIL, R. Las especies de *Euphorbia* de la República Argentina. *Kurtziana*, 1977, vol. 10, p. 83-248.
 - VALETA A. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales, 2001. *Editorial Higiene y Salud*. 1955. 2° ed. p. 74.



Capítulo 2

Evaluación *in vitro* de la Actividad antiparasitaria de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Capítulo 2

Evaluación *in vitro* de la Actividad antiparasitaria de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

INTRODUCCIÓN

Los ensayos desarrollados en el Capítulo 1 para verificar el efecto diurético reportado por Cheruse *et al.* (1983), dieron resultados negativos en *Euphorbia serpens*, como así también en las otras dos especies de Euphorbias, *E. schickendantzii* y *E. collina*, recolectadas en la Provincia de La Pampa. En el presente Capítulo se describen los ensayos realizados para determinar la presencia de los efectos antihelmínticos mencionados por Steibel *et al.* (2009) en *E. collina*. Estos autores señalan que esta planta es utilizada por la medicina tradicional como antihelmíntica. Por otro lado, *E. schickendantzii*, en un estudio realizado por Lamberti *et al.* (2009), tuvo efecto inhibitorio sobre la motilidad de las larvas de *Haemonchus contortus*.

Varios trabajos han reportado el efecto antihelmíntico de otras especies del género, por ej. Lone *et al.* (2012), mostraron que el extracto metanólico de *E. helioscopia* tuvo efecto antihelmíntico contra larvas III y huevos de *H. contortus*. Adedapo *et al.* (2005) demostraron la actividad de *E. hirta* contra parásitos intestinales caninos, entre ellos *Ancylostoma caninum*. *E. huanchahana* también tuvo efecto antihelmíntico sobre oxiuros patógenos en humanos (Salazar *et al.* 2007).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se llevaron a cabo ensayos para evaluar *in vitro* la posible presencia de actividad antihelmíntica de *E. serpens*, *E.*

schickendantzii y *E. collina*, utilizando larvas de *A. caninum*. El efecto ovicida se ensayó empleando huevos de *H. contortus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención e identificación de huevos de *Ancylostoma caninum*

El modelo biológico utilizado para determinar la actividad antiparasitaria consistió en exponer larvas III de *A. caninum* a distintos extractos *in vitro*.

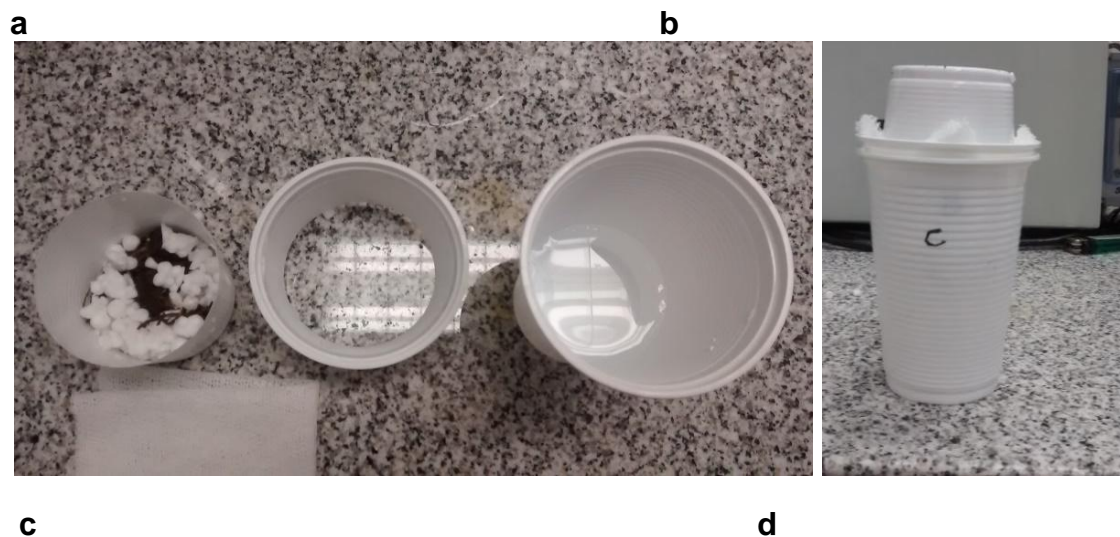
Se recolectaron heces frescas de perros domésticos y se determinó la presencia de huevos de *A. caninum* empleando la técnica de Willis (Willis 1921). Se colocó 1 g de materia fecal en 10 ml de solución sobresaturada de cloruro de sodio de una densidad de 1,2 g/ml, se filtró la mezcla con una gasa y se colocó el líquido en un tubo de ensayo con un portaobjetos en la parte superior. Se dejó reposar 15 min para que los huevos y larvas flotantes puedan ser recuperados e identificados en el microscopio óptico. Los huevos fueron identificados por la Cátedra de Parasitología de La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

Obtención de larvas III de *Ancylostoma caninum*

Las heces infectadas con huevos de *A. caninum* se cultivaron permitiendo la maduración y eclosión de los huevos y posterior desarrollo de larvas III (Fiel y Steffan 1994). Se tomaron de 2 a 3 g de heces infectadas y se mezclaron en un recipiente con telgopor granulado. Luego se tomó un vaso de plástico y se cortó a la mitad quedando dos partes, A y B. La mitad inferior (A), fue perforada en el fondo para permitir la entrada de aire y se colocaron la muestra de heces a cultivar cubiertas por una gasa. Se tapó empleando la mitad superior del vaso (B). La

cámara de incubación se colocó dentro de otro vaso (C) con agua, quedando constituida una cámara húmeda (**Figura 2.1**).

Figura 2.1: Método de obtención de larvas III de *Ancylostoma caninum*.



Ref: a: Vista frontal de los vasos mostrando los cortes realizados. Un vaso cortado por la mitad y otro vaso no cortado. b: Vista frontal de los vasos mostrando el encastre de la parte inferior y la superior del vaso cortado que contiene las heces. c: Vista superior de los vasos mostrando las heces con Telgopor en la parte inferior del vaso cortado por la mitad, y el agua en el vaso no cortado. d: Cámara húmeda. A: Parte inferior del vaso cortado por la mitad, conteniendo las heces; B: Parte superior del vaso cortado por la mitad conteniendo la gasa; C: Vaso no cortado, conteniendo agua para mantener la humedad en el proceso de incubación.

Las muestras se mantuvieron a 24 - 28 °C durante 10 días. Una vez realizada la incubación, se colocó la muestra en una gasa, formando una bolsa. Y se sumergió en un embudo con agua tibia donde permanecieron por 1 - 2 h con una

manguera de goma en su extremo, obturando la salida de agua con un broche. Pasado el tiempo de decantación se liberó el broche y se extrajeron los 3-4 cm de líquido de la parte inferior que contenían la mayor concentración de larvas infectivas (Henriksen y Korssholm 1983). Las larvas se mantuvieron a 5 °C hasta el momento de los ensayos.

Evaluación de la actividad larvicida de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

El ensayo se realizó siguiendo la metodología utilizada por Kotze *et al.* (2004) con modificaciones, las cuales consistieron en utilizar placas de 4 pocillos y agua destilada como medio de cultivo. Los recipientes que contenían las larvas se llevaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron suavemente. En los grupos tratados se expusieron larvas III de *A. caninum* a una concentración de 30 mg/ml de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólico de las tres especies vegetales y obtenidos según se explicó en el Capítulo 1. En los grupos control se expusieron larvas III a los excipientes utilizados para cada extracto, a saber, una solución de alcohol al 10 % para extractos hexánicos y de acetato de etilo; y agua destilada para extractos metanólicos. Las larvas se mantuvieron en estufa a 25 °C durante 48 h en oscuridad.

Se realizaron 10 repeticiones, y se determinó el número de larvas móviles antes y después del ensayo, siendo estimuladas con agua caliente a 50 °C antes del conteo, para asegurar que las mismas no estén en latencia. El efecto larvicida fue determinado por observación directa contando el número de larvas muertas durante el ensayo, tanto en los grupos tratados como en los grupos controles.

Con los extractos que mostraron actividad larvicida se repitieron los ensayos siguiendo la metodología descrita anteriormente. Las dosis utilizadas fueron de 15 mg/ml y 7,5 mg/ml con 5 repeticiones.

Se realizó un test “t de Student” o un test de Wilcoxon, según la normalidad de los datos, para comparar cada grupo tratado con su grupo control.

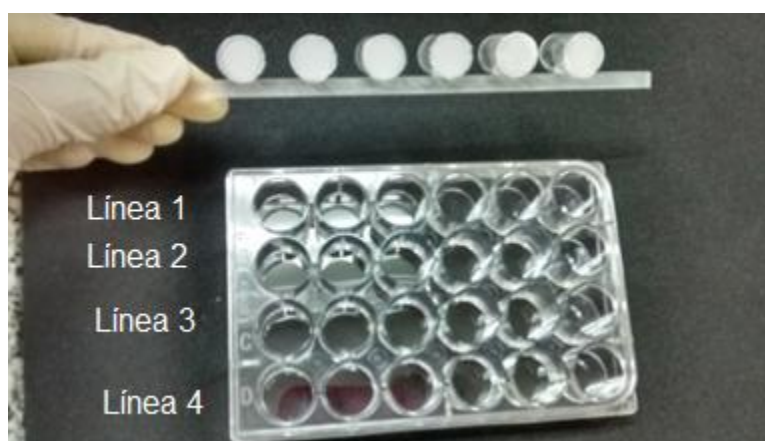
Determinación de la inhibición de la migración larval de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

La inhibición de la motilidad en los ensayos de actividad larvicida fundamentó continuar con ensayos de inhibición de la migración larval.

Para determinar el efecto inhibitorio de la motilidad larval contra larvas infectantes de *A. caninum*, se siguió la metodología de Moreno *et al.* (2010), con algunas modificaciones.

Se construyeron filtros con tubos de acrílico transparente de 20 mm de largo y 9 mm de diámetro interno a los que se les colocó una malla de nylon de 23 μ m en uno de sus extremos. Se utilizaron placas de 24 pocillos (**Figura 2.2**). Se probaron los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*

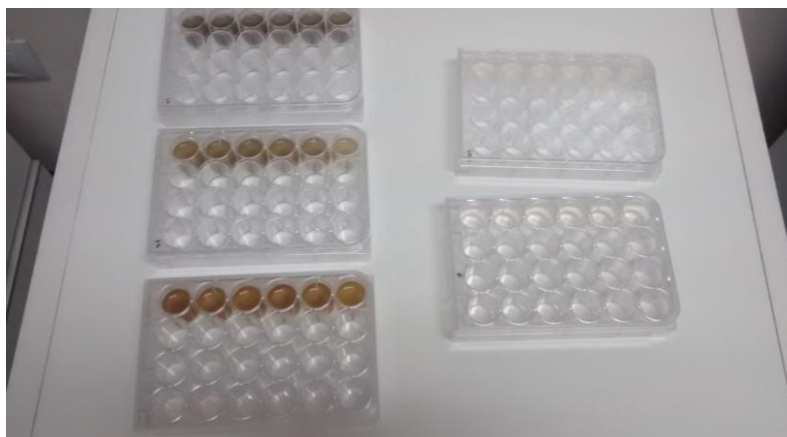
Figura 2.2: Se muestran las placas de 24 pocillos y los filtros de 23 μm .



Ref: Línea 1: Primera línea de pocillos donde se colocan las larvas expuestas a los diferentes tratamientos. Línea 2: segunda línea de pocillos donde se colocan los filtros de 23 μm . Línea 3: tercera línea de pocillos donde se colocan las larvas no migradas para ser contabilizadas. Línea 4: Cuarta línea de pocillos.

Los extractos hexánicos y de acetato de etilo se diluyeron en etanol al 5 % y los extractos metanólicos en agua destilada, para obtener una solución final de 7,5 mg/ml. En cada pocillo de la primera línea (**Figura 2.2**) se agregó 1 ml de extracto diluido y 1 ml de agua destilada con aproximadamente 100 larvas III (L3) suspendidas. Se realizaron seis repeticiones para cada extracto; un grupo control (L3 expuestas a la solución utilizada para disolver los extractos) y un grupo control positivo (L3 expuestas a una solución de ivermectina al 0,05 %, Meltra-Endectocida®), (**Figura 2.3**).

Figura 2.3: Se muestran tres placas con extractos metanólicos de las tres especies estudiadas y dos utilizadas como controles.



Las larvas fueron incubadas a 25 °C por 16 h, en contacto con los extractos. Luego el contenido total de los pocillos (2 ml) se transfirió a los filtros localizados dentro de los pocillos de la segunda fila de la placa. Las placas con los filtros fueron incubadas a 25 °C por 18 h, para permitir la migración a través de las mallas dentro de la cámara. Los filtros fueron removidos de las placas y se lavó su contenido utilizando una piseta con agua destilada. Se contaron el número total de larvas determinando el número de larvas no migradas, tanto en los grupos tratados como en los grupos controles.

Los datos se expresaron como número de larvas no migradas, y fueron analizados utilizando ANOVA y comparados con un test de Duncan ($p < 0,05$) con el software InfoStat.

Evaluación del efecto inhibitor de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Recolección y preparación de huevos de Haemonchus contortus

Tanto la recolección y el acondicionamiento de los huevos, así como el ensayo de eclosión fue realizado siguiendo el método utilizado por Lone *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Las heces fueron colectadas de corderos infectados y lavadas de manera cuidadosa, agregando agua hasta obtener una mezcla relativamente húmeda. Esta mezcla fue filtrada a través de tamices de poros decrecientes siendo el último de 25 μm . Los huevos retenidos en el tamiz de 25 μm fueron transferidos a un tubo falcon de 15 ml utilizando agua destilada. La muestra se centrifugó durante 10 min a 3.500 rpm. El sobrenadante se eliminó y se resuspendieron los huevos en solución sobresaturada de cloruro de sodio (CINa) compuesta por 400 g de CINa en 1 L de agua. Se centrifugaron nuevamente y se filtraron con el tamiz de 25 μm , para luego recuperar los huevos limpios. La concentración de huevos se determinó contando la cantidad en 4 alícuotas de 20 μl , realizando el procedimiento por cuadruplicado.

Inhibición de la eclosión de huevos de Haemonchus contortus

Para el ensayo de eclosión de huevos, se utilizaron placas multipocillos de 12 wells. Se colocaron aproximadamente 100 huevos por pocillo en un ml de agua destilada, y se agregó 1 ml de concentraciones crecientes de los extractos hidroalcohólicos de las tres especies vegetales, a saber: 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm y 250 ppm. Los huevos fueron incubados en estufa a 24,5 °C en oscuridad

durante 24 h, posteriormente se determinó el número de larvas en su primer estadio (L1) y el número de huevos no eclosionados presentes en el pocillo. Además, se incluyó un grupo control, en el cual los huevos fueron incubados con agua destilada. Cada concentración fue replicada 6 veces (**Figura 2.4**). Los datos fueron expresados como porcentaje de inhibición de la eclosión para cada concentración de cada extracto vegetal, con la fórmula: $(N^{\circ} \text{ de huevos no eclosionados} \times 100) / (N^{\circ} \text{ de huevos no eclosionados} + \text{número de larvas L1})$, y analizados utilizando ANOVA, comparados con un test de Duncan ($p < 0,05$) con el software InfoStat.

Figura 2.4: Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*.



Ref: Se muestran las placas empleadas para el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* en presencia de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendatzii* y *Euphorbia collina*.

RESULTADOS

Resultados de la evaluación de la actividad larvicida de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

La **Tabla 2.1** muestra el porcentaje de larvas III de *A. caninum* muertas luego de ser expuestas a los extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólicos de las tres especies investigadas. Los datos mostraron diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0,01$) en todos los extractos a una dosis de 30 mg/ml, con excepción del extracto metanólico de *E. serpens*. Mientras que dosis menores no mostraron efectos.

Tabla 2.1: $\bar{x} \pm DE$, de los porcentajes de larvas III de *Ancylostoma caninum* muertas después de la incubación con extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* expuestas a concentraciones de 30, 15 y 7,5 mg/ml.

Especie	Extracto	Concentración		
		30 mg/ml	15 mg/ml	7,5 mg/ml
<i>Euphorbia serpens</i>	Hexano	52,7 ± 30,8 *	6,6 ± 14,7	6 ± 13,4
	Acetato de etilo	66,6 ± 30,0 *	9,6 ± 9,0	0,8 ± 1,7
	Metanol	44,2 ± 37,8	-	-
<i>Euphorbia schickendantzii</i>	Hexano	60,4 ± 28,0 *	3 ± 6,7	0,2 ± 0,4
	Acetato de etilo	65,2 ± 27,5 *	3 ± 6,7	2,4 ± 5,3
	Metanol	63,5 ± 19,6 *	35 ± 37,4	39,2 ± 35,4
<i>Euphorbia collina</i>	Hexano	64,7 ± 25,4 *	24,2 ± 23,5	5,4 ± 5,8
	Acetato de etilo	61,0 ± 38,8 *	5 ± 11,2	7,6 ± 16,9
	Metanol	46,8 ± 20,6 *	35,6 ± 24,7	31,2 ± 23

Ref: *Test t de Student ($p \leq 0, 01$). Nota: Las concentraciones de 15 y 7,5 mg/ml de extracto metanólico de *Euphorbia serpens* no se ensayaron porque no se encontraron efectos con 30 mg/ml.

Resultados del test de inhibición de la migración larval de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

En la **Tabla 2.2** se muestran las medias y los desvíos estándar del número de larvas no migradas de cada extracto ensayado. Puede observarse la actividad inhibitoria en los grupos expuestos a extracto hexánico de *E. schickendantzii* y a los extractos metanólicos de las tres especies vegetales (Duncan $p \leq 0,05$).

Tabla 2.2: Medias del número de larvas no migradas \pm DE de *Ancylostoma caninum* con extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Extracto Especie	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
<i>Euphorbia serpens</i>	28,67 \pm 4,41 A	15,66 \pm 2,65 A	62,67 \pm 14,57 AB
<i>Euphorbia schickendantzii</i>	66,67 \pm 27,21 B	14,33 \pm 2,58 A	46,5 \pm 7,58 A
<i>Euphorbia collina</i>	48,17 \pm 19,81 AB	17,5 \pm 3,33 A	69,83 \pm 19,65 B
Grupo control	30,33 \pm 9,52 A	12,5 \pm 2,73 A	3,5 \pm 2,59 C
Grupo control positivo	101 \pm 17,48 C	59,33 \pm 7,31 B	99,17 \pm 23,06 D

Ref: Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Resultados de la actividad de Inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*

La **Tabla 2.3** muestra las medias de los porcentajes y los desvíos estándar de la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* luego de ser expuestos a extractos hidroalcohólicos de las tres especies vegetales. El grupo control evidenció diferencias significativas con los grupos tratados con extractos hidroalcohólicos de *E. collina* a dosis de 1.000 ppm y 2.000 ppm.

Tabla 2.3: Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* expuestos a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Tratamientos	Media \pm DE			
GC	3,19 \pm 1,99	A		
GTser 250	5,29 \pm 3,37	A	B	C
GTser 500	3,86 \pm 0,96	A		
GTser 1.000	7,18 \pm 3,45	A	B	C
GTser 2.000	8,43 \pm 4,95	A	B	C
GTschi 250	4,76 \pm 4,21	A	B	
GTschi 500	6,80 \pm 2,47	A	B	C
GTschi 1.000	7,48 \pm 4,94	A	B	C
GTschi 2.000	5,44 \pm 3,33	A	B	C
GTcoll 250	5,25 \pm 3,50	A	B	C
GTcoll 500	6,21 \pm 2,84	A	B	C
GTcoll 1.000	10,55 \pm 4,88			C
GTcoll 2.000	9,98 \pm 7,93		B	C

Ref: GC: Grupo control. GTser 250, GTser 500, GTser 1.000, GTser 2.000, GTschi 250, GTschi 500, GTschi 1.000, GTschi 2.000, GTcoll 250, GTcoll 500, GTcoll 1.000, GTcoll 2.000; corresponden a los grupos tratados con extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* a 250 ppm, 500 ppm, 1.000 ppm y 2.000 ppm respectivamente. Nota: Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Para determinar la presencia de efecto antiparasitario se ensayaron extractos obtenidos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*. Esta última especie ha sido reportada por su empleo como antiparasitaria (Steibel *et. al* 2009), mientras que no se hallaron antecedentes de uso tradicional de las otras dos especies ensayadas en este trabajo. Sin embargo, un estudio *in vitro* realizado por Lamberti *et al.* (2009) contra larvas III de *H. contortus* demostró que el extracto hidroalcohólico de *E. schickendantzii* inhibió la motilidad de las larvas. Este efecto antiparasitario hallado sobre la motilidad larval es consistente con el efecto hallado contra larvas de *A. caninum* y sugieren realizar otros ensayos para determinar el espectro antihelmíntico de esta especie vegetal.

Los estudios realizados *in vitro* empleando el test de motilidad larval y eclosión de huevos con larvas III de *A. caninum* y *H. contortus* respectivamente, permitieron confirmar el efecto antihelmíntico de *E. collina* atribuido por la medicina tradicional. Esta especie exhibió el mayor efecto antiparasitario, ya que mostró actividad inhibitoria sobre la motilidad y la eclosión de huevos.

Aunque las reseñas bibliográfica sobre el efecto antiparasitario de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina* son escasas, como se describió en la introducción de este Capítulo, se encontraron trabajos que determinaron la presencia de efecto antihelmíntico en otras especies del género *Euphorbia* (Adedapo *et al.* 2005; Salazar *et al.* 2007; Lone *et al.* 2012), sin embargo distintas especies de un género no necesariamente comparten los mismos metabolitos en cantidad y calidad. Por esta razón tampoco expresan las mismas propiedades farmacológicas (Evans 1995).

Los extractos metanólicos obtenidos de las tres especies vegetales tuvieron efectos contra helmintos, que podrían deberse a la presencia de taninos, fenoles, flavonoides y saponinas (Capítulo 5), ya que otras especies vegetales con metabolitos secundarios pertenecientes a estos grupos químicos mostraron propiedades antihelmínticas (Egualé *et al.* 2011; Hernández Villegas *et al.* 2012).

Debido a que el parásito adulto es el blanco principal de los metabolitos secundarios de las plantas, sería deseable realizar los ensayos utilizando parásitos adultos. Sin embargo, éstos no pueden ser mantenidos vivos fuera del hospedador por más de 24 h, lo cual es inadecuado para los test *in vitro*. Por ello, los test *in vitro* se realizan usualmente con los estadios infectantes (Athanasiadou y Kyriazakis 2004). En este trabajo de tesis, se utilizó, como modelo biológico para determinar el efecto larvicida e inhibidor de la motilidad larval, a larvas infectantes (larvas III) de *A. caninum*, a las cuales no se les quitó la cutícula externa, es decir no fueron desvainadas. En varios estudios en donde se ha utilizado el test de inhibición de la motilidad para comprobar efectos antiparasitarios, se utilizan larvas III desvainadas artificialmente utilizando hipoclorito de sodio. Este procedimiento se realiza para asemejar las condiciones en las cuales se encuentran las larvas en el intestino del hospedador. En la mayoría de los estudios que realizan este procedimiento se trabaja con larvas de *H. contortus*, porque la vaina externa de esta especie es fácilmente observable en el microscopio óptico. Sin embargo, la morfología de *A. caninum* hace difícil la determinación de la presencia o ausencia de vaina, y la exposición prolongada al hipoclorito de sodio afectar notablemente los resultados de los ensayos (González *et al.* 2010).

Por otro lado, el empleo de larvas envainadas en los ensayos podría determinar una mayor potencialidad del compuesto con propiedades

antihelmínticas, ya que las larvas envainadas son más resistentes al medio externo porque la cutícula es una estructura de protección. Alonso Díaz *et al.* (2011), demostraron que en larvas de *H. contortus* desenvainadas, la inhibición de la motilidad luego de ser expuestas a extractos vegetales era mayor respecto a larvas envainadas sometidas a los mismos tratamientos. Resultados similares fueron reportados por VonSon de Fernex *et al.* (2012). Es por ello que en este estudio se utilizaron larvas III sin desenvainar. La sensibilidad del modelo experimental se corroboró mediante el empleo de dos grupos controles. Para determinar la concentración de ivermectina a utilizar en nuestros ensayos como control positivo, se realizaron varios ensayos cuyos datos no fueron mostrados en esta tesis. Se usó como trabajo de referencia a (Kotze *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

- Los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, y los extractos hexánico y de acetato de etilo de *Euphorbia serpens*, mostraron efecto larvicida contra larvas III de *Ancylostoma caninum* a dosis de 30 mg/ml.
- Los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, no mostraron efecto larvicida contra larvas III de *Ancylostoma caninum* a dosis de 15 mg/ml y 7,5 mg/ml.
- El extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii* y los extractos metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* inhibieron la motilidad de larvas III de *Ancylostoma caninum*.
- El extracto hidroalcohólico de *Euphorbia collina* inhibió la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* a dosis de 2.000 y 1.000 ppm.
- Los efectos antihelmínticos de *Euphorbia collina* sobre la motilidad larval e inhibición de la eclosión de huevos de *Ancylostoma caninum* y *Haemonchus contortus* respectivamente, mostrados en estos ensayos, son consistentes con el uso como antiparasitario de la medicina popular.

BIBLIOGRAFIA

- ADEDAPPO, A. A.; SHABI, O. O; ADEDOKUN, O. A. Anthelmintic efficacy of the aqueous crude extract of *Euphorbia hirta* Linn in Nigerian dogs. *Vet Arhiv*, 2005, vol. 75, no 1, p. 39-47.
- ALONSO DÍAZ, M. A. *et al.* Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 2011, vol. 181, no 2-4, p.360– 364.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2004, vol. 63, no 4, p. 631-639.
- CHERUSE, J. J.; BALDINI, O.; BRUNO BLANCH, L. E. Ensayo farmacodinámico preliminar de *Euphorbia serpens* HBK (Euphorbiaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 1983, vol. 2.
- EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, vol. 137, no 1, p. 108-113.
- EVANS, W. C. Farmacognosia. *Trease y Evans*. 13ª edición. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México D. F., México, 1995 p. 743-746.
- FIEL, C. A. y STEFFAN, P. E. Guía de procedimientos para el diagnóstico de nematodos en bovinos. *Hoechst Argentina, Buenos Aires*, 1994, p. 1-13.

- GONZÁLEZ GARDUÑO, R., *et al.* Efecto del hipoclorito de sodio y extracto de cítricos en la reducción de la infestación con nematodos gastrointestinales resistentes a antihelmínticos en ovinos de pelo. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2010, vol. 1, no 2, p. 179-187.
- HENRIKSEN, S. V; KORSHOLM, H.A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Norwegian Medical Veterinary*, 1983, vol. 35, no 11, p. 429-430.
- HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M., *et al.* In vivo anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology*, 2012, vol. 189, no 2-4, p. 284-290.
- KOTZE, A. C., *et al.* An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2004, vol. 71, no 5, p. 608-616.
- LAMBERTI, R. O., *et al.* Cribado antihelmíntico de plantas recolectadas en la Provincia de La Pampa. *Revista de la Facultad de Veterinaria*, 2009, vol. 11, p. 26-31.
- LONE, B. A., *et al.* In vitro and in vivo anthelmintic activity of *Euphorbia helioscopia* L. *Veterinary parasitology*, 2012, vol. 189, no 2-4, p. 317-321.
- MORENO, F. C., *et al.* Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de medicina veterinaria*, 2010, vol. 42, no 3, p. 155-163.

-
- SALAZAR, W., *et al.* Estudio fitoquímico y de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Euphorbia huanchahana* y *Baccharis salicifolia*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2007, vol. 73, no 3, p. 150-157.
- STEIBEL, P.; TOSO, R.; TROIANI, H. Plantas medicinales de la región pampeana. *Laboratorios LAFITAR S.R.L.*, 2009, p 115.
- VON SON-DE FERNEX, Elke, *et al.* In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental parasitology*, 2012, vol. 131, no 4, p. 413-418.
- WILLIS, H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*, 1921, vol. 2, p. 375-376.



Capítulo 3

Ensayos de citotoxicidad *in vitro* y toxicidad aguda en ratones

Capítulo 3

Ensayos de citotoxicidad *in vitro* y toxicidad aguda en ratones

INTRODUCCIÓN

En el Capítulo 2 se demostró el efecto antihelmíntico contra larvas de *Ancylostoma caninum* y huevos de *Haemonchus contortus*, que avalan el uso de *Euphorbia collina* como antiparasitario en medicina tradicional. Esta especie también se utiliza como errugativa (Conticello *et al.* 1997). *E. schickendantzii* y *E. serpens*, además de aplicarse a las verrugas (Hieronymus 1881; Steibel 1997; Barboza *et al.* 2009; Muiño y Fernandez 2015) son cáusticas (Barboza *et al.* 2009), y *E. serpens*, es utilizada específicamente como antitumoral (Soraru y Bandoni 1978). Estos antecedentes expuestos por la medicina tradicional justifican evaluar la posible presencia de efecto citotóxico.

La evidencia emergente ha demostrado que las especies de *Euphorbia* exhiben propiedades anticancerígenas *in vitro* debido a la rica producción de constituyentes bioactivos. Esto respalda su utilización en la medicina tradicional como anticancerígenos (Kemboi *et al.* 2020).

Los diterpenos presentes en varias especies de este género, como ser *E. kansui*, *E. ficheriana*, *E. nivulia*, *E. esula* y *E. poisonii*, han demostrado fuerte actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares (Kupchan *et al.* 1976; De-Ji *et al.* 1991; Fatope *et al.* 1996; Ravikanth *et al.* 2003; Wang *et al.* 2006).

El test de letalidad de *Artemia salina* es un método ampliamente utilizado para determinar citotoxicidad. Los autores de este método, McLaughlin *et al.* 1998, realizaron estudios de toxicidad que demostraron que muchas especies de

Euphorbiaceas tenían efectos antitumorales y concluyen que existe una correlación positiva entre el test de *A. salina* y el efecto antitumoral. Luego, utilizaron dicho test en forma sistemática para la búsqueda de sustancias con probable efecto antitumoral en su laboratorio. Este método, por ser rápido, confiable y económico, se empleó en esta tesis para detectar compuestos citotóxicos y/o antitumorales en *E. serpens*, *E. schickendatzii* y *E. collina*.

Se llevaron a cabo estudios de toxicidad *in vivo* con extractos metanólicos, hidroalcolícos y hexánicos de *E. collina* con el objetivo de demostrar su inocuidad en eventuales usos como fitofármacos, ya que resultaron activos en ensayos anteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

Obtención de larvas nauplio de Artemia salina

Para la obtención de larvas en el segundo estadio de desarrollo, se colocaron los huevos en cubas de eclosión (**Figura 3.1**), las cuales poseen dos cámaras, una oscura en donde se colocaron los huevos y la otra con luz donde se recolectaron las larvas. Ambas cámaras se separaron por medio de un tabique con agujeros de 2 mm de diámetro. En las cubas se colocó agua de mar artificial compuesta por una solución de 38 g/L de sal marina en agua destilada. Se incubó a 28 °C durante 48 h con luz, hasta que las larvas alcanzaron el segundo estadio larval, larva nauplio.

Figura 3.1: Diseño de la cuba de eclosión de huevos de *Artemia salina*.



a

b

Ref: a. Vista superior de la cuba de eclosión de huevos de *Artemia salina*. b. Separación de las cámaras por medio de un tabique con perforaciones.

Test de letalidad de Artemia salina

Se empleó el Test de letalidad de *Artemia salina* siguiendo el modelo de McLaughlin *et al.* (1998).

El ensayo consistió en exponer 10 larvas en estadio nauplio en placas de Petri de 3,5 cm de diámetro a extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *E. serpens*, *E. schickendatzii* y *E. collina*. Cada extracto (Ex) se ensayó en concentraciones de 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm y 1.000 ppm. Éstos fueron obtenidos como se indicó en el Capítulo 1. Los extractos hexánicos y de acetato de etilo se diluyeron en una solución de DMSO en concentración de 50 μ l/5 ml (ExD) y los metanólicos fueron disueltos con agua de mar artificial, compuesta por sal marina en agua destilada a 38 g/L (ExAM). Se emplearon dos grupos controles: uno expuesto a ExD (GCD) utilizado como grupo control para los tratamientos de extractos hexánicos y de acetato de etilo, y un segundo grupo control expuesto a ExAM (GCAM), utilizado como grupo control para los tratamientos de extractos metanólicos. El grupo control positivo (GCPP), fue expuesto a podofilotoxina

(PODOXIN Solución Tópica 0,5 %, Lab. Pablo Cassara S.R.L. Av. Gral. Paz 14310 14400, Buenos Aires) a concentración de 32 µg/ml (Krishnaraju *et al.* 2006). Los grupos tratados se expusieron a los extractos de las tres especies disueltos en los excipientes indicados anteriormente en concentraciones de 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm y 1.000 ppm, quedando conformados los grupos indicados en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1: Grupos y tratamientos utilizados en ensayos de letalidad sobre *Artemia salina* de extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Grupos Tratamiento	GC D	GC AM	GC PP	GT h1	GT h2	GT h3	GT h4	GT a1	GT a2	GT a3	GT a4	GT m1	GT m2	GT m3	GT m4
DMSO 50 µl/5 ml	*			*	*	*	*	*	*	*	*				
Agua marina artificial		*										*	*	*	*
Podofilotoxin a 32 µg/ml			*												
Extracto a 1 ppm				*				*				*			
Extracto a 10 ppm					*				*				*		
Extracto a 100 ppm						*				*				*	
Extracto a 1.000 ppm							*				*				*

Ref: GCD, grupo control DMSO50 µl/5 ml; GCAM, grupo control agua marina; GTh1, GTh2, GTh3 y GTh4 grupos tratados con extracto hexánico a 1ppm, 10 ppm, 100 ppm y 1.000 ppm respectivamente; GTa1, GTa2, GTa3 y GTa4 grupos tratados con extracto de acetato de etilo a 1ppm, 10 ppm, 100 ppm y 1.000 ppm respectivamente; GTm1, GTm2, GTm3 y GTm4 grupos tratados con extracto metanólicos 1ppm, 10 ppm, 100 ppm y 1.000 ppm respectivamente. Nota: El Test de Letalidad indicado en la Tabla se repitió 6 veces con 3 réplicas para cada una de las especies vegetales.

Se realizaron 6 ensayos con tres réplicas cada uno. Las larvas expuestas a las diferentes drogas se mantuvieron a 27 °C, durante 48 h con luz. Luego de los ensayos se contaron el número de larvas muertas, y se compararon los grupos controles con los grupos tratados, se utilizó ANOVA o el test de Wilcoxon, dependiendo la normalidad de los datos.

Los grupos que exhibieron diferencias significativas respecto los grupos controles fueron expuestos a concentración de 0,1 ppm.

Ensayos de toxicidad aguda en ratones

Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron empleando ratones *Mus musculus* hembras, BALB/c de 28-30 g de peso corporal, los cuales fueron aclimatados en el laboratorio 7 días antes de los ensayos. Todos los animales recibieron alimento balanceado comercial y agua *Ad libitum*. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLPam.

Se utilizaron 60 ratones (OECD 2001) distribuidos en 12 grupos de 5 animales cada uno. Los animales se dejaron en ayunas de alimento sólido 3 horas previas al ensayo con acceso al agua *Ad libitum*. Los grupos tratados fueron administrados con una dosis oral única de los extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico desecado de *E. collina*. El extracto hexánico fue reconstituido con aceite de girasol. Los extractos metanólico e hidroalcohólico con agua destilada. Se administró un volumen final de 0,3 ml a cada animal utilizando una sonda bucoesofágica.

Dosis: cada extracto fue administrado en concentraciones de 625 mg/kg, 1.250 mg/kg, 2.500 mg/kg y 5.000 mg/kg. Los ratones fueron observados a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos pos-administración de los extractos para determinar si se producían síntomas tóxicos y durante los 14 días siguientes cada 24 h con el fin de evaluar el carácter reversible o irreversible de los efectos (Souza Brito 1994). Al finalizar el estudio, se sacrificaron los animales administrados con la mayor dosis,

5.000 mg/kg, utilizando dióxido de carbono e inmediatamente se realizaron las necropsias para la extracción de corazón, pulmón, bazo, hígado y riñón. Las muestras fueron remitidas en formol al 10 % al Laboratorio de Histopatología perteneciente a la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*

En la **Tabla 3.2** se indica el número de larvas nauplio que murieron al ser expuestas a los diferentes extractos de *E. serpens* en concentraciones de 1, 10, 100 y 1.000 ppm.

No se encontraron diferencias significativas entre larvas expuestas al extracto hexánico en concentraciones de 1, 10 y 100 ppm con respecto a los grupos controles. Por su parte, la concentración de 1.000 ppm no mostró diferencias respecto al grupo tratado con podofilotoxina (Duncan $p \leq 0,05$).

El extracto acetato de etilo de *E. serpens* mostró en todas las concentraciones diferencias significativas con respecto al grupo control (Kruskal Wallis $p \leq 0,05$) y no hubo diferencias con el grupo control positivo.

El extracto metanólico de *E. serpens* no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control a la concentración de 1 ppm mientras que a 100 y 1.000 ppm mostraron una citotoxicidad similar a podofilotoxina (Duncan $p \leq 0,05$).

Tabla 3.2: Efecto de extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens* sobre larvas nauplio de *Artemia salina*.

Tratamientos	Grupos tratados con Ex. Hexánico		Grupos Tratados con Ex. de AcOET		Grupos Tratados con Ex. MeOH			
	$\bar{X} \pm D.E$	(D)	$\bar{X} \pm D.E$	(K)	$\bar{X} \pm D.E$	(D)		
GCAM	3 ± 1,1	A	2,57 ± 0,79	A	3,50 ± 1,64	A		
GCD	3,33 ± 1,37	A	2,14 ± 1,07	A	-			
GCPP	8,17 ± 1,72		7,67 ± 2,42		8,50 ± 1,87			D
GT1	4 ± 0,99	A	6,22 ± 1,36		4,83 ± 1,54	A	B	
GT10	4,39 ± 1,51	A	6,17 ± 1,95		6,33 ± 1,51		B	C
GT100	4,67 ± 2,65	A	7,5 ± 1,31		7,39 ± 1,71			C D
GT1.000	6,83 ± 1,71		8,78 ± 0,58		7,61 ± 1,22			C D

Ref: GCD: grupo control DMSO, GCAM: grupo control agua marina, GCPP: grupo control positivo podofilotoxina, GT1, GT10, GT100 y GT1000: grupos tratados con extracto a 1, 10, 100 y 1.000 ppm respectivamente, AcOET: acetato de etilo, MeOH: metanol. $\bar{X} \pm D.E$: media \pm desvíos estándar de larvas nauplio muertas. Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan (D) o Kruskal Wallis (K) ($p < 0,05$).

Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia schickendantzii*

En la **Tabla 3.3** se indica el número de larvas nauplio que murieron al ser expuestas a extractos de *E. schickendantzii* en concentraciones 1, 10, 100 y 1.000 ppm.

Los extractos hexánico y acetato de etilo de *E. schickendantzii*, mostraron en todas las concentraciones, diferencias significativas con respecto a los grupos controles (Duncan $p \leq 0,05$). Al compararlos con el grupo control positivo no se observaron diferencias significativas, siendo ambos extractos, aún en su concentración mas baja (1 ppm), tan activos como la podofilotoxina.

El extracto metanólico de *E. schickendantzii* mostró efecto en todas las concentraciones ensayadas, salvo a 1 ppm. El efecto a 1.000 ppm fue comparable con el de la podofilotoxina (Duncan $p \leq 0,05$).

Tabla 3.3: Efecto de extracto hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia schickendantzii* sobre larvas nauplio de *Artemia salina*.

Tratamientos	Grupos tratados con Ex. Hexánico		Grupos tratados con Ex. AcOET		Grupos tratados con Ex. MeOH	
	$\bar{X} \pm D.E$	(D)	$\bar{X} \pm D.E$	(D)	$\bar{X} \pm D.E$	(D)
GCAM	3,11 ± 1,45	A	2,83 ± 1,94	A	3,71 ± 1,59	A
GCD	3,67 ± 1,73	A	3,33 ± 1,86	A	-	
GCPP	7,83 ± 2,99	B	9 ± 1,73	B	9,67 ± 0,52	C
GT1	7,39 ± 1,02	B	8 ± 0,73	B	5,84 ± 1,07	A
GT10	8,33 ± 1,49	B	8,61 ± 0,88	B	8,00 ± 1,23	B
GT100	8,55 ± 0,81	B	9,17 ± 0,62	B	7,76 ± 1,63	B
GT1.000	9 ± 1,1	B	9,44 ± 0,46	B	9,76 ± 0,42	C

Ref: GCD: grupo control DMSO, GCAM: grupo control agua marina, GCPP: grupo control positivo podofilotoxina, GT1, GT10, GT100 y GT1000: grupos tratados con extracto a 1, 10, 100 y 1.000 ppm respectivamente, AcOET: acetato de etilo, MeOH: metanol, $\bar{X} \pm D.E$: media \pm desvíos estándar de larvas nauplio muertas. Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan (D), ($p < 0,05$).

Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia collina*

En la **Tabla 3.4** se muestra el número de larvas nauplio que murieron al ser expuestas a los diferentes extractos de *E. collina* en concentraciones de 1, 10, 100 y 1.000 ppm.

Todos los grupos tratados con extracto hexánico de *E. collina* mostraron efecto citotóxico comparable con la podofilotoxina (Duncan $p \leq 0,05$).

El extracto de acetato de etilo no mostró diferencias significativas respecto a los grupos controles a concentraciones de 1 ppm, pero en las demás concentraciones tuvo efectos comparables a la podofilotoxina (Duncan $p \leq 0,05$).

El extracto metanólico tampoco mostró diferencias significativas con respecto al grupo control en concentración de 1 ppm, pero sí en las concentraciones mayores (Kruskal Wallis $p \leq 0,05$).

Tabla 3.4: Efecto de extracto hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia collina* sobre larvas nauplio de *Artemia salina*.

Tratamientos	Grupos tratados con Ex. Hexánico		Grupos tratados con Ex. AcOET			Grupos tratados con Ex. MeOH		
	$\bar{X} \pm D.E$	(D)	$\bar{X} \pm D.E$	(D)		$\bar{X} \pm D.E$	(K)	
GCAM	3,83 ± 1,17	A	4,13 ± 0,64	A		4 ± 1,1	A	
GCD	3,00 ± 1,79	A	3,13 ± 1,13	A		-		
GCPP	8,40 ± 1,14	B	8,60 ± 1,34		C	9,6 ± 0,89		C
GT1	8,17 ± 1,68	B	7,39 ± 1,39	B		5,5 ± 1,11	A B	
GT10	8,78 ± 1,19	B	8,78 ± 1,03		C	7,72 ± 1,26	B	C
GT100	8,78 ± 0,86	B	9,33 ± 0,63		C	8,17 ± 0,81		C
GT1.000	9,39 ± 0,65	B	9,34 ± 0,67		C	9,11 ± 1		C

Ref: GCD: grupo control DMSO, GCAM: grupo control agua marina, GCPP: grupo control positivo podofilotoxina, GT1, GT10, GT100 y GT1000: grupos tratados con extracto a 1, 10, 100 y 1.000 ppm respectivamente, AcOET: acetato de etilo, MeOH: metanol, $\bar{X} \pm D.E$: media \pm desvíos estándar de larvas nauplio muertas. Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan (D) o Kruskal Wallis (K) ($p < 0,05$).

Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos activos a concentraciones de 1 ppm

El extracto acetato de etilo de *E. serpens*, los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *E. schickendantzii*, y los extractos hexánico y acetato de etilo de *E. collina*, mostraron diferencias significativas respecto a los grupos controles, por ello fueron ensayados a concentración de 0,1 ppm.

El extracto de acetato de etilo de *E. serpens*, no mostró efecto citotóxico en concentración de 0,1 ppm (Kruskal Wallis $p \leq 0,05$), (**Tabla 3.5**).

El extracto hexánico de *E. schickendantzii* en concentración de 0,1 ppm, mostró diferencias significativas con respecto a los grupos controles (Duncan $p \leq$

0,05). El extracto de acetato de etilo no tuvo efecto (Kruskal Wallis $p \leq 0,05$), al igual que el extracto metanólico (Duncan $p \leq 0,05$), (**Tabla 3.5**).

Tanto el extracto hexánico como el extracto acetato de etilo de *E. collina* en concentraciones de 0,1 ppm mostraron diferencias significativas respecto a los grupos controles (Duncan $p \leq 0,05$), (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5: Efecto de extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina* sobre larvas nauplio de *Artemia salina* en concentración de 0,1 ppm

Tratamientos	<i>Euphorbia serpens</i>		<i>Euphorbia schickendantzii</i>				<i>Euphorbia collina</i>					
	Grupos tratados con AcOET		Grupos tratados con Ex. Hexánico		Grupos tratados con Ex. AcOET		Grupos tratados con Ex. MeOH		Grupos tratados con Ex. Hexánico		Grupos tratados con Ex. AcOET	
	$\bar{X} \pm D.E$	K	$\bar{X} \pm D.E$	D	$\bar{X} \pm D.E$	K	$\bar{X} \pm D.E$	D	$\bar{X} \pm D.E$	D	$\bar{X} \pm D.E$	D
GCMA	3,50 ± 2,35	A	2,00 ± 1,37	A	3,5 ± 2,35	A	4,40 ± 1,71	A	5,33 ± 1,63	A	3,5 ± 2,35	A
GCD	2,33 ± 1,51	A	1,83 ± 1,47	A	2,33 ± 1,51	A	-		3,83 ± 2,14	A	2,33 ± 1,51	A
GCPP	9,83 ± 0,41	B	9,83 ± 0,41	C	9,83 ± 0,41	B	9,90 ± 0,32	B	9,83 ± 0,41	C	9,83 ± 0,41	C
GT0,1	2,33 ± 1,21	A	6,50 ± 1,64	B	4,33 ± 0,63	A	4,9 ± 1,40	A	7,00 ± 1,1	B	6,33 ± 1,72	B

Ref: GCD: grupo control DMSO, GCAM: grupo control agua marina, GCPP: grupo control positivo podofilotoxina, GT0, 1: grupos tratados con extracto a 0,1 ppm. $\bar{X} \pm D.E$: media \pm desvíos estándar de larvas nauplio muertas, AcOET: acetato de etilo, MeOH: metanol. Las letras comparan las medias en las columnas. Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas con el test de Duncan (D) o Kruskal Wallis (K), ($p < 0,05$).

Ensayo de toxicidad aguda en ratones, de extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico de *Euphorbia collina* en ratones

Todos los animales tratados con las distintas dosis de los extractos sobrevivieron el ensayo. No se observaron alteración en el comportamiento y aspecto de los animales.

Durante las necropsias no se observaron alteraciones en el aspecto ni tamaño de los órganos internos. En los estudios histopatológicos de bazo, riñón, pulmón, corazón e hígado no se hallaron anomalías microscópicas, mostrando los tejidos aspecto normal.

DISCUSIÓN

Ensayos de citotoxicidad *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Todos los extractos demostraron diferencias significativas con respecto a los grupos controles en los ensayos *in vitro*, indicando la presencia de actividad citotóxica, que podría corresponderse con la actividad errugativa, cáustica y antitumoral descrita en la medicina tradicional para *E. collina*, *E. schickendantzii* y *E. serpens* respectivamente. Al igual que en los ensayos de actividad antihelmíntica, *E. collina* resultó la especie más promisorio como citotóxica, ya que evidenció la mayor actividad incluso a la menor concentración (0,1 ppm). El grado de letalidad fue directamente proporcional a la concentración de los extractos.

Los extractos hexánicos y de acetato de etilo de las especies ensayadas tuvieron mayor citotoxicidad, esto podría deberse a la presencia de compuestos isoprenoides hallados en los estudios fitoquímicos descritos en el Capítulo 5. Estos compuestos son comunes en las especies de la Familia *Euphorbiaceas* (Shi *et al.* 2008). Otros autores demostraron efectos citotóxico y/o antitumoral de terpenos extraídos de diferentes especies de *Euphorbias* (Kupchan *et al.* 1976; DE-JI *et al.* 1991; Fatope *et al.* 1996; Valente *et al.* 2003; Ravikanth *et al.* 2003; Wang *et al.* 2006).

Varios de los extractos ensayados tuvieron efectos comparables al grupo control positivo incluso en dosis muy bajas (1 ppm). En este trabajo se utilizó como grupo control positivo una solución de podofilotoxina, este compuesto es un lignano extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. Es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina, empleado como tratamiento tópico para verrugas

genitales causadas por algunos tipos de virus del papiloma humano (VPH) y otras verrugas externas (Xu, Lv y Tian 2009).

Se utilizaron dos grupos controles, uno con DMSO disuelto en agua de mar artificial, y otro sólo con agua de mar, y fueron comparados entre sí, ya que el DMSO puede llegar a ser tóxico para los sistemas vivos e influir en los resultados de los ensayos (McLaughlin *et al.* 1998). Esta situación, frecuentemente es ignorada en estudios donde utilizan *A. salina* como modelo biológico.

Si bien este método fue desarrollado para determinar el LC_{50} a partir del análisis Probit, haciendo una regresión entre las dosis de los diferentes compuestos y el número de organismos muertos, dicho análisis no utiliza los grupos controles para sus estimaciones, con lo cual el número de organismos muertos por diferentes factores que pueden darse en cualquier ensayo biológico, no son considerados. Además, para el correcto uso del análisis Probit, los datos deben seguir una distribución Normal. Es por ello, que en este trabajo de tesis se optó por un ANOVA o su análogo test de Wilcoxon, comparando los grupos controles entre sí y con los grupos tratados (Milhem *et al.* 2008).

En base a el trabajo realizados por McLaughlin *et al.* 1998, podrían profundizarse los estudios orientados a determinar la presencia de compuestos activos contra células tumorales, ya que el ensayo de letalidad de *A. salina*, es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos.

Ensayos de toxicidad aguda en ratones

Los ensayos realizados no mostraron cambios histopatológicos en bazo, riñón, corazón, pulmón e hígado de ratón, lo cual indicaría que los extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico desecado de *E. collina* administrado en una dosis única de 5.000 mg/kg, no son tóxicos.

El ensayo de toxicidad en ratones con extractos de *E. collina*, fue realizado teniendo en cuenta que varias especies del género han sido reportadas por presentar toxicidad, por ej. extractos acuosos de *E. prostrata* produjeron daños hepáticos (Tala *et al.* 2015) y el extracto etanólico de *E. bibona* mostró actividad citotóxica y hepatotóxica (Athmouni *et al.* 2018).

Cada medicamento posee efectos no deseados, pero un compuesto farmacológicamente activo valioso debe tener un equilibrio aceptable entre los efectos terapéuticos y los efectos tóxicos o adversos (Munari *et al.* 2010). Dosis de 5.000 mg/kg de extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico de *E. collina*, no produjeron toxicidad en ratones, estos resultados apoyan el uso de extractos de *E. collina* como antiparasitario y citotóxico. Aunque deben realizarse otros estudios para asegurar la inocuidad en animales superiores.

CONCLUSIONES

- El extracto hexánico de *E. serpens* evidenció citotoxicidad sólo a dosis de 1.000 ppm, mientras que el extracto metanólico lo hizo a dosis de 100 ppm y 1.000 ppm. El extracto de acetato de etilo mostró citotoxicidad a 1, 10, 100 y 1.000 ppm.
- Los extractos hexánico y de acetato de etilo a 1, 10, 100 y 1.000 ppm de *E. schickendatzii* mostraron efecto citotóxico. El extracto metanólico a dosis de 10, 100 y 1.000 ppm.
- El extracto hexánico de *E. collina* mostró efecto citotóxico a 1, 10, 100 y 1.000 ppm, mientras que los extractos de acetato de etilo y metanólicos lo hicieron a dosis de 10, 100 y 1.000 ppm.
- El extracto de acetato de etilo de *E. serpens*, no mostró efecto citotóxico en concentración de 0,1 ppm.
- El extracto hexánico de *E. schickendantzii* en concentración de 0,1 ppm evidenció efecto citotóxico, pero los extractos de acetato de etilo y metanólico a la misma concentración no tuvieron efecto.
- El extracto hexánico y el extracto acetato de etilo de *E. collina* en concentraciones de 0,1 ppm mostraron efecto citotóxico.
- Los extractos hexánico, metanólico e hidroalcohólico desecado de *E. collina* administrados en una dosis única 5.000 mg/kg no resultaron tóxicos en ratones en las condiciones de estos ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

- ATHMOUNI, K.; EL FEKI, A.; AYADI, H. Hepatotoxic effects of Euphol-rich fractions from *Euphorbia bivonae*—Relevance to cytotoxic and anti-tumor activities. *Pathophysiology*, 2019, vol. 26, no 1, p. 69-76.
- BARBOZA, G. E., *et al.* Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 2009, vol. 34, no 1-2, p. 7-365.
- CONTICELLO, L., *et al.* El uso plantas medicinales por la comunidad mapuche de San Martin de los Andes, Provincia de Neuquén (Argentina). [Use of medicinal plants by the Mapuche community at San Martin de los Andes, Province of Neuquén]. *Parodiana*, 1997, vol. 10, no 1, p. 2.
- DE-JI, P., *et al.* Kansuiphorin-C and-D, cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, 1991, vol. 30, no 3, p. 1018-1020.
- FATOPE, M. O., *et al.* Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poissonii*. *Journal of medicinal chemistry*, 1996, vol. 39, no 4, p. 1005-1008.
- HIERONYMUS, J. *Plantae Diaphoricae Florae Argentinae*. Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba. 1881, vol. 4, no 2, p. 199-598.
- KEMBOI, D., *et al.* A review of the ethnomedicinal uses, biological activities, and triterpenoids of *Euphorbia* species. *Molecules*, 2020, vol. 25, no 17, p. 4019.
- KRISHNARAJU, A. V., *et al.* Biological screening of medicinal plants collected from Eastern Ghats of India using *Artemia salina* (brine shrimp test). *International Journal of Applied and Engineering*, 2006, vol. 4, no 2, p. 115-125.

- KUPCHAN, S. M., *et al.* Antileukemic principles isolated from *Euphorbiaceae* plants. *Science*, 1976, vol. 191, no 4227, p. 571-572.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, 1998, vol. 32, no 2, p. 513-524.
- MILHEM, M. M.; AL-HIYASAT, A. S.; DARMANI, H-. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Journal of Applied Oral Science*, 2008, vol. 16, p. 297-301.
- MUNARI, C. C., *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 2010, vol. 30, no 1, p. 22-28.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure*. OECD Publishing, 2008.
- MUIÑO, W.; FERNÁNDEZ, L. Plantas, dolencias y actores sociales vinculados con la medicina tradicional de Agua Escondida y las serranías del Nevado, Mendoza (Argentina). *Lilloa*, 2015, vol. 52, p. 46-61.
- RAVIKANTH, V., *et al.* Three new ingoldi terpenes from *Euphorbia nivulia*: evaluation of cytotoxic activity. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2003, vol. 51, no 4, p. 431-434.
- SHI, Q.W.; SU, X.H; KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical reviews*, 2008, vol. 108, no 10, p. 4295-4327.

- SORARU, S. B.; BANDONI, A. L. Plantas de la medicina popular argentina. *Albatros, Buenos Aires*, 1978, p. 41.
- SOUSA BRITO, A. Manual de ensayos toxicológicos in vivo. Campinas. *Universidad de Campinas*, 1994, p. 15-30.
- STEIBEL, P. E. Nombres y usos de las plantas aplicados por los indios Ranqueles de La Pampa (Argentina). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1997, vol. 9, no 2, p. 1-40.
- TALA, D. *et al.* In vivo anti-salmonella activity of aqueous extract of *Euphorbia prostrata* Aiton (*Euphorbiaceae*) and its toxicological evaluation. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, vol. 5, no 4, p. 310-318.
- VALENTE, C., *et al.* Three new jatrophone-type diterpenes from *Euphorbia pubescens*. *Plantamedica*, 2003, vol. 69, no 04, p. 361-366.
- WANG, Y. B., *et al.* Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia fischeriana*. *Journal of natural products*, 2006, vol. 69, no 6, p. 967-970.
- XU, H.; LV, M.; TIAN, X. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003-2007. *Current medicinal chemistry*, 2009, vol. 16, no 3, p. 327-349.



Capítulo 4

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Capítulo 4

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendanzii* y *Euphorbia collina*

INTRODUCCIÓN

Considerando que *Euphorbia serpens* y *E. schickendanzii* se utilizan en la medicina popular para cicatrizar y cauterizar heridas (Steibel *et al.* 2009 y Barboza *et al.* 2009), se evaluó la presencia del posible efecto antimicrobiano.

Especies del género *Euphorbia* evidenciaron efecto contra algunas cepas bacterianas en ensayos *in vitro*, por ej. *E. serpens* contra *Staphylococcus lutea*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Bhakuni *et al.* 1974; Bittner *et al.* 2001), y sus extractos etanólico, acuoso y hexánico contra *Vibrio cholerae* (Payne *et al.* 2015). Los extractos acuosos y metanólicos de *E. hirta* contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*; el extracto metanólico de *E. tirucalli* contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogene*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Parekh y Chanda 2006); y fracciones del extracto metanólico de *E. mili* contra *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae* (Rauf *et al.* 2014).

Hasta el momento se encuentran escasos registros de la actividad antifúngica de *E. serpens* (Ahmad 2009), y nula de *E. schickendanzii* y *E. collina*. Sin embargo, se ha demostrado la capacidad fungicida de algunas especies de este género. El extracto etanólico de hojas de *E. hirta*, por ej., tuvo efecto contra fitopatógenos (Rao *et al.* 2010). El extracto hidroalcohólico de *E. tirucalli* fue activo, específicamente, contra *Fusarium sp.* (Sartori *et al.* 2013). El trabajo de Hua *et al.* (2017) demostró la

actividad antifúngica del peplusol (terpeno aislado de *E. peplus*) contra hongos fitopatógenos. Otro ejemplo es el agitanino, compuesto aislado de *E. antisiphilitica*, con actividad contra varias cepas fúngicas, entre ellas *Fusarium oxysporum* (Ascacio-Valdes *et al.* 2013). Y los extractos hidroalcohólicos de *E. heterophylla* exhibió escasa actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* (Fred-Jaiyesimi y Abo 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes en especies del género *Euphorbia*, en este Capítulo se describen los ensayos realizados para evaluar la capacidad antibacteriana y antifúngica de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se ensayaron los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, los cuales se obtuvieron como se indicó en el Capítulo 1. De los extractos hexánicos y de acetato de etilo se tomaron 20 mg y se diluyeron en 2 ml de etanol. De esta solución se tomó 1 ml y se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril. Del extracto metanólico, se tomaron 10 mg y se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril. Se obtuvieron así diluciones de 1.000 ppm de cada extracto que fueron utilizadas para realizar los bioensayos.

Preparación de cepas bacterianas

Se trabajó con 6 cepas, cuatro Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible a β -lactámicos); *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistente a β -lactámicos); *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC

700603, y dos Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis*, aislado de un caso clínico.

Previo a los ensayos se realizó un antibiograma para seleccionar el antibiótico de referencia. Para las bacterias Gram negativas se probó penicilina, estreptomina, amikacina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprima, sulfametoxazol y norfloxacina, de los cuales se utilizó norfloxacina (Britania S.A 136-5239, 10 µg) para *E. coli* (**Figura 4.1a**) y estreptomina (Britania S.A 064-5239, 300 µg) para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (**Figura 4.1b**). Para Gram positivas se probó penicilina, eritromicina, bacitracina y ampicilina, de los cuales se escogió eritromicina (Britania S.A 153-5239, 15µg), (**Figura 4.1c**).

Figura 4.1: Antibiogramas realizados para elección de antibióticos en las diferentes cepas bacterianas.



a

b

c

Ref: a. *Escherichia coli* resistente a b-lactámicos; b. *Pseudomona aeruginosa*; c. *Staphylococcus epidermidis*.

Se realizó un cultivo de cada cepa para disponer de organismos en fase de crecimiento 24 horas antes de cada ensayo.

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizaron dos métodos:

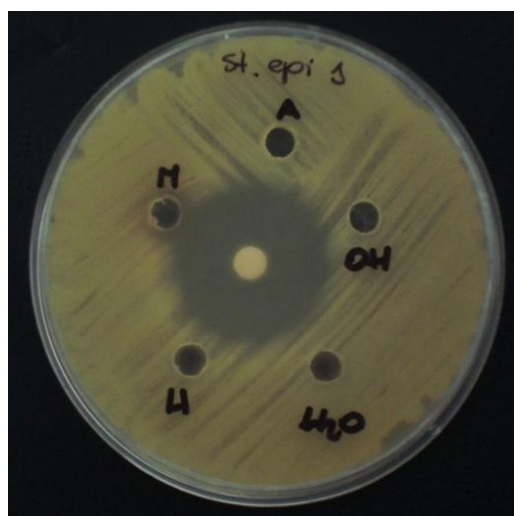
Método de difusión en pocillos

La actividad antimicrobiana se evaluó empleando el método de Kirby Bauer modificado. La modificación consistió en reemplazar los discos de papel por pocillos

perforados en el agar, en los cuales se depositó el extracto a ensayar, de acuerdo con la metodología descrita por Ahmad *et al.* (1998). Los medios de cultivos fueron preparados colocando 25 ml de agar Müller Hinton (Britania S.A B02-137-06) en cada placa de Petri de 100 mm de diámetro. Las placas fueron sembradas con una suspensión bacteriana de cada una de las especies a ensayar en solución fisiológica estéril correspondiente al 0,5 en la escala de Mc Farland (Perrilla 2004). En cada placa de agar se perforaron 5 pocillos periféricos de 5 mm de diámetro. En cada pocillo se colocaron 100 μ l, ya sea de extracto a ensayar o de solvente, utilizado como control. Por cada especie vegetal se probaron los tres extractos, y los solventes utilizados (agua y etanol-agua 1/10). En la parte central de la placa se colocó un disco del antibiótico previamente definido en el antibiograma como control positivo (**Figura 4.2**).

Las placas se cultivaron en estufa por 24 h a 37 °C, y se realizó la lectura de los halos de inhibición midiendo el diámetro, incluyendo el pocillo. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

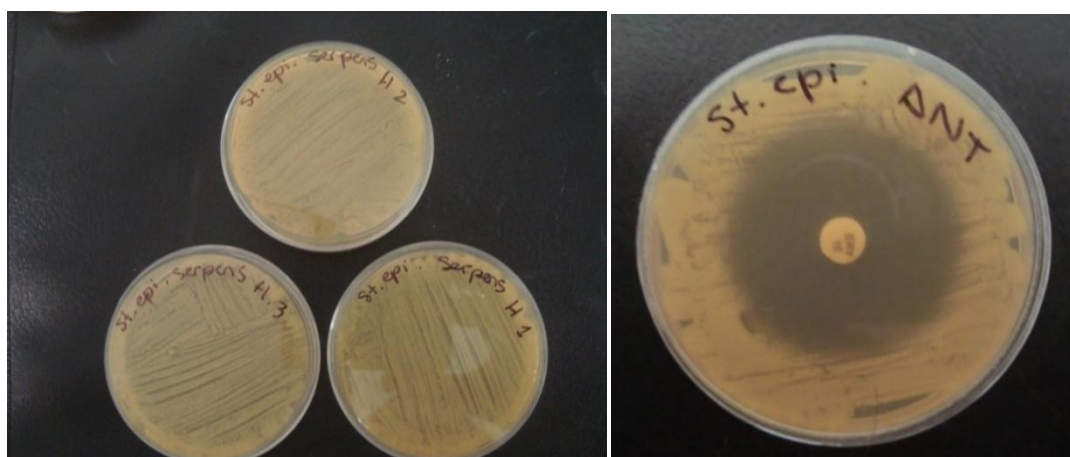
Figura 4.2: Actividad antimicrobiana. Método de pocillo.



Ref: Ensayo realizado con extractos de *Euphorbia schickendantzii* contra *Staphylococcus epidermidis*.

Método de dilución en placa

Este método se realizó según la metodología utilizada por Ardoino (2014). Se le adicionaron 200 μ l de extractos a una concentración de 1.000 ppm, a placas de Petri de 60 mm de diámetro con 10 ml de agar Müller Hilton. Seguidamente se inoculó el medio, utilizando una suspensión bacteriana en solución fisiológica correspondiente a 0,5 en la escala de Mc farland (**Figura 4.3 a**). Además, se sembró una placa control sin extracto para verificar crecimiento con cada cepa y una placa control positiva con el antibiótico de referencia para cada cepa, para verificar inhibición del crecimiento (**Figura 4.3 b**). Los experimentos se realizaron por triplicado. Las placas fueron cultivadas durante 24 h a 37 °C, para luego observar la presencia o no de crecimiento bacteriano.

Figura 4.3: Actividad antimicrobiana. Método de dilución en placa.**a****b**

Ref: a. Ensayo realizado con extractos de *Euphorbia serpens* contra *Staphylococcus epidermidis*; b. Placa control positivo con antibiótico de referencia.

Evaluación de la Actividad antifúngica

Preparación del inóculo fúngico

El inóculo empleado en los ensayos de actividad antifúngica estuvo constituido por microconidios recuperados de un cultivo de *Fusarium verticillioides* (LABI6). La cepa mencionada se conserva en la colección del Laboratorio de Biología de Agentes Bioactivos y Fitopatógenos (LABIFITO – FBQF - UNT). Los microconidios se extrajeron de cajas de Petri que contenían colonias de 7 días de edad crecidas en medio agar extracto de malta peptona modificado (EPm), el cual consistió en 2 % de agar, 2 % de sacarosa, 1,5 % de extracto de malta y 0,5 % de peptona. Para la extracción se lavó las cajas de Petri con 2 ml de solución salina, compuesta por NaCl al 0.9 % p/v, disuelta en agua destilada estéril. Se determinó la densidad de esporas en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico, y se preparó una suspensión de 2 a 5×10^5 microconidios/ml en solución salina. Se tomó una alícuota de 0,5 ml de la suspensión y se diluyó con 5,5 ml de medio EPm conteniendo 0,8 % de agar a 40 °C. La suspensión resultante con una concentración

de 2 a 5 × 10⁴ microconidios/ml se denomina de aquí en adelante como: “suspensión de trabajo”.

Bioautografía por siembra puntual de extractos de Euphorbia serpens, Euphorbia schickendantzii y Euphorbia collina

Extractos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina* se obtuvieron por extracción secuencial con solventes de polaridad creciente de acuerdo a lo mencionado en Capítulo 1. De esta manera se recuperaron tres extractos (hexano, acetato de etilo y metanólico) procedentes de cada especie vegetal investigada. Posteriormente, la actividad antifúngica de los mismos se ensayó mediante bioautografía de siembra puntual en cromatofolios de sílica gel 60 F254 (Merck), de 4 cm x 7,5 cm, contra *F. verticillioides*. Para ello se marcaron 5 puntos en la superficie de cada cromatofolio (**Figura 4.4**). En dos puntos se sembraron los controles; uno con 150 µl solvente (C), sea hexano, acetato de etilo o metanol, y otro control con 20 µg de Ketoconazol (CP). Tres puntos se destinaron a la siembra de extractos vegetales de igual polaridad (sean hexánicos, acetato de etilo o metanólicos) procedentes de las tres especies vegetales. La cantidad de materia seca sembrada por extracto fue la misma para todos ellos al ser ensayados en un mismo cromatofolio. Las cantidades ensayadas fueron de 500 y 1.000 µg. Previo a la siembra, los cromatofolios se esterilizaron sumergiéndolos en alcohol al 96 %, y posteriormente se secaron bajo flujo laminar. Se necesitaron 6 cromatofolios para ensayar los extractos sembrados en las cantidades mencionadas. Una vez sembrados los cromatofolios, se vertió sobre el mismo 6 ml de la suspensión de trabajo. Las placas inoculadas se incubaron en cajas de Petri a 30 °C durante 72 h. La presencia de compuestos bioactivos se evidenció por la aparición de zonas sin crecimiento fúngico. Cada

ensayo de bioautografía se realizó por triplicado.

Figura 4.4: Actividad antifúngica. Esquema de cromatofolio de sílica gel con puntos de siembra.

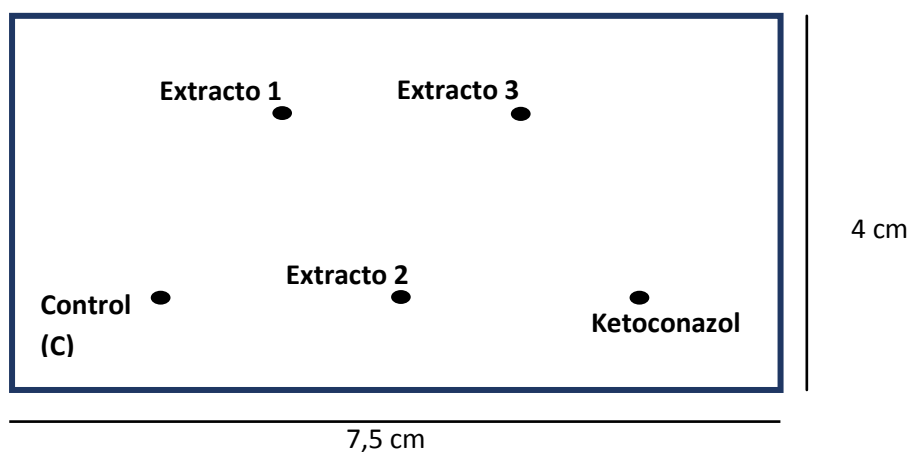
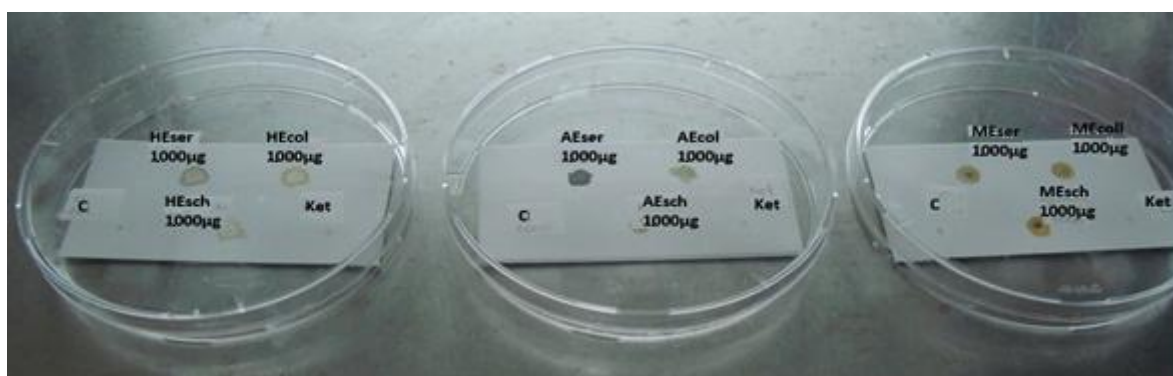


Figura 4.5: Actividad antifúngica. Cromatofolios de sílica gel sembrados con 1.000 µg de cada uno de los extractos a ensayar.



Ref: **HEser:** extracto hexánico de *Euphorbia serpens*; **HEsch:** extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*; **HEcol:** extracto hexánico de *Euphorbia collina*; **AEser:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia serpens*; **AEsch:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia schickendantzii*; **AEcol:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia collina*; **MEser:** extracto metanólico de *Euphorbia serpens*; **MEsch:** extracto metanólico de *Euphorbia schickendantzii*; **MEcol:** extracto metanólico de *Euphorbia collina*. **C:** Control. **Ket:** ketoconazol.

Bioautografía de cromatogramas en capa fina de extractos metanólicos de *Euphorbia collina* y *Euphorbia schickendantzii*

Los extractos metanólicos de *E. schickendantzii* y *E. collina* se ensayaron contra *F. verticillioides* mediante bioautografía de cromatogramas de capa fina. En cada cromatofolio se sembraron 2.000 µg de los extractos metanólicos a evaluar. Dos cromatofolios fueron sembrados con extracto de *E. schickendantzii* y dos con extractos de *E. collina*, en una línea de 1,5 cm. Los cromatofolios se desarrollaron utilizando como fases móviles:

- 1) Cloroformo: metanol: ácido fórmico (73:20:7).
- 2) Cloroformo: acetato de etilo: metanol: ácido fórmico (35:42:20:3)

El remanente de solventes presente en los cromatogramas se evaporó completamente en asepsia dentro de una campana de flujo laminar durante 12 h. Luego, 5,5 ml de medio EPm, conteniendo 0,8 % de agar y 500 µl de la suspensión de trabajo, se distribuyeron uniformemente sobre cada placa. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. La aparición de zonas sin crecimiento fúngico indicó la presencia de compuestos antifúngicos.

Bioautografía por siembra puntual de grupos de fracciones obtenidas por cromatografía en columna de *Euphorbia collina*

El extracto seco de acetato de etilo se disolvió en 2 ml del mismo solvente, la solución se transfirió al recipiente donde se encontraba el extracto hexánico seco, al cual finalmente se le agregó 18 ml de hexano. Los 20 ml finales de extracto hexánico y de acetato de etilo juntos de *E. collina* se utilizaron para ser fraccionados por cromatografía en columna de sílica gel 60 de 230-400 mesh (Capítulo 5). La composición de las fracciones se monitoreó mediante cromatografía de capa fina.

Las mismas se agruparon según el patrón de manchas que presentaron, en los grupos: G10-11, G12-17, G18-23, G24-29, G30-36 y G37-46. Estos últimos se ensayaron mediante bioautografía por siembra puntual contra *F. verticillioides*, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para extractos vegetales, ensayándose 1.000 µg de materia seca por punto de siembra (**Figura 4.4**). Cada ensayo bioautográfico se realizó por triplicado.

Ensayos de microdilución contra Fusarium verticillioides

Los extractos metanólicos de *E. schickendantzii* y *E. collina*, el extracto acetato de etilo de *E. collina* y la fracción G10-11 se sometieron a ensayos de microdilución en medio líquido contra *F. verticillioides*. El ensayo se llevó a cabo utilizando la suspensión de trabajo preparada en medio YES (20 g/L de extracto de levadura, 150 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de sulfato de magnesio). Los ensayos se realizaron en policubetas de fondo plano de 96 celdas. En cada celda, se adicionó 100 µl de la suspensión de trabajo y 100 µl de una dilución de extracto, fracción o fungicida sintético preparada en medio YES. El volumen final en cada pocillo fue de 200 µl. Los extractos y la fracción G10-11 se ensayaron en series de diluciones a la mitad comprendidas entre 2.000 a 62,5 µg/ml. También se realizaron controles de crecimiento y esterilidad. Cada tratamiento, extractos, fracción G10-11 y controles se ensayaron por triplicado en cada microplaca. Las microplacas se incubaron 72 h a 25-26 °C. Luego, se midió la absorbancia de los pocillos a 630 nm. Las lecturas de absorbancia se convirtieron a porcentajes de inhibición de crecimiento fúngico. Posteriormente, estos valores se sometieron a análisis de Probit, interpolándose las concentraciones necesarias para inhibir el 30 % y 50 %, CI_{30} y CI_{50} ,

respectivamente, del crecimiento de *F. verticillioides*. El análisis de Probit se realizó empleando el programa XLSTAT.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Método de difusión en pocillos

Los extractos de *E. serpens* ensayados por el método de difusión en pocillos no provocaron halos de inhibición contra ninguna de las cepas. Los extractos metanólicos de *E. schickendantzii* y *E. collina* mostraron halos de inhibición contra *S. epidermidis*. El extracto de acetato de etilo de *E. collina* presentó halos de inhibición contra *S. aureus*. Todos los antibióticos empleados produjeron halos de inhibición contra las cepas empleadas (**Tabla 4.1**).

Método de dilución en placa

No se observó inhibición del crecimiento en ninguno de los tratamientos.

Tabla 4.1: Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

Microorganismo	<i>Euphorbia Serpens</i>			<i>Euphorbia schickendantzii</i>			<i>Euphorbia collina</i>			Antibiótico de referencia
	Ext. Hex	Ext. AcO Et	Ext. MeO H	Ext. Hex	Ext. Ac OEt	Ext. MeO H	Ext. Hex	Ext. AcO Et	Ext. MeOH	
Gram negativas										
<i>Escherichia coli</i> sensible a β -lactámicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,5 \pm 1,3
<i>Escherichia coli</i> resistente a β -lactámicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34 \pm 0,5
										Estreptomici na
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,25 \pm 1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,25 \pm 2,5
Gram positivas										Eritromicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	8,6 \pm 0,47	-	30 \pm 1,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	10,2 \pm 1,5	-	-	12,7 \pm 1,7	28,5 \pm 1,3

Ref: Los números corresponden a la $\bar{x} \pm DE$ de los diámetros de los halos de inhibición de las 4 repeticiones, expresados en milímetros; -: Sin actividad; Ext. Hex: extracto hexánico; Ext. AcOEt: extracto acetato de etilo; Ext. MeOH: extracto metanólico.

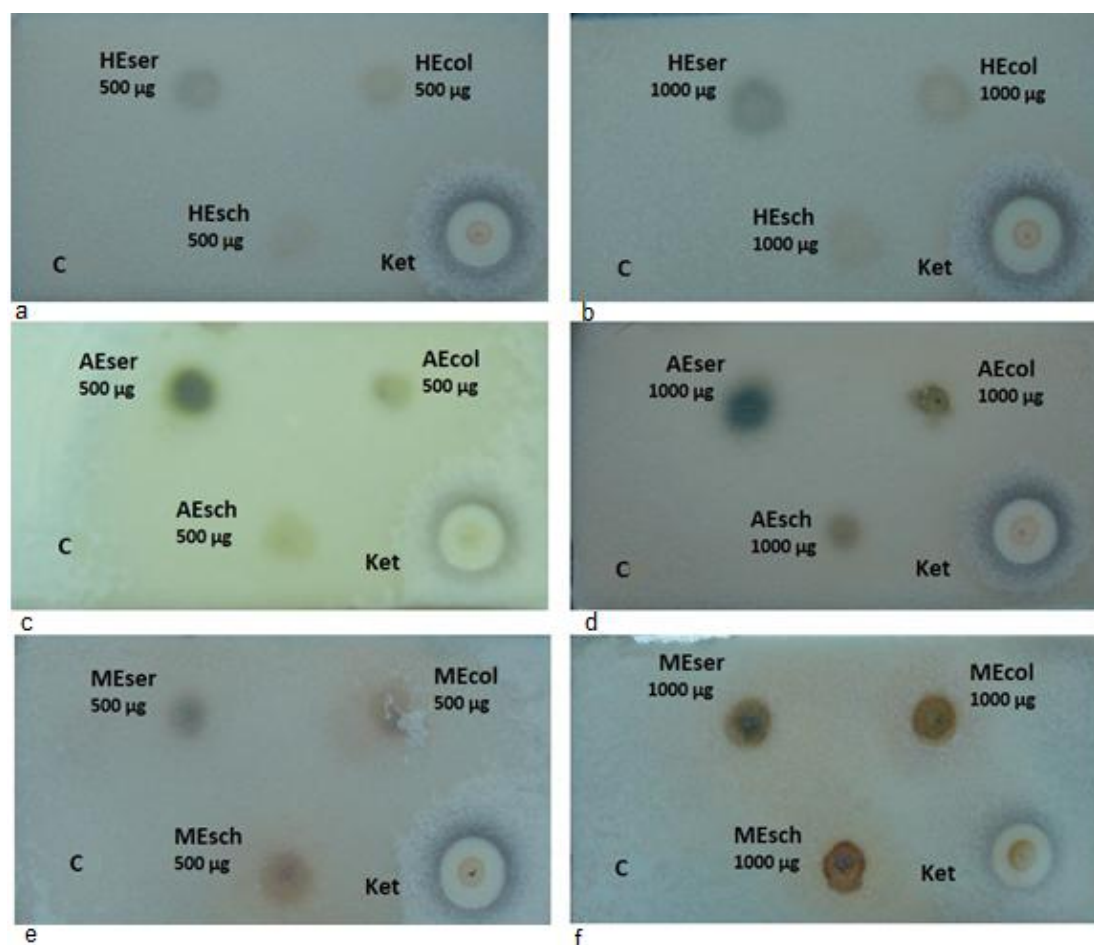
Evaluación de la actividad antifúngica de extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Bioautografía por siembra puntual de extractos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Las bioautografías en siembra puntual de los extractos de *Euphorbia* indicaron que solamente los constituyentes extraídos con acetato de etilo y metanol de *E. collina*, y los extraídos con metanol de *E. schickendantzii* presentaron

actividad antifúngica sobre *F. verticillioides*. En todos los casos, la actividad antifúngica se manifestó en las siembras efectuadas con 1.000 µg de extracto seco (Figura 4.6).

Figura 4.6: Actividad antifúngica. Bioautografía de siembra puntual de extractos de *Euphorbia* ensayada sobre *Fusarium verticillioides*.

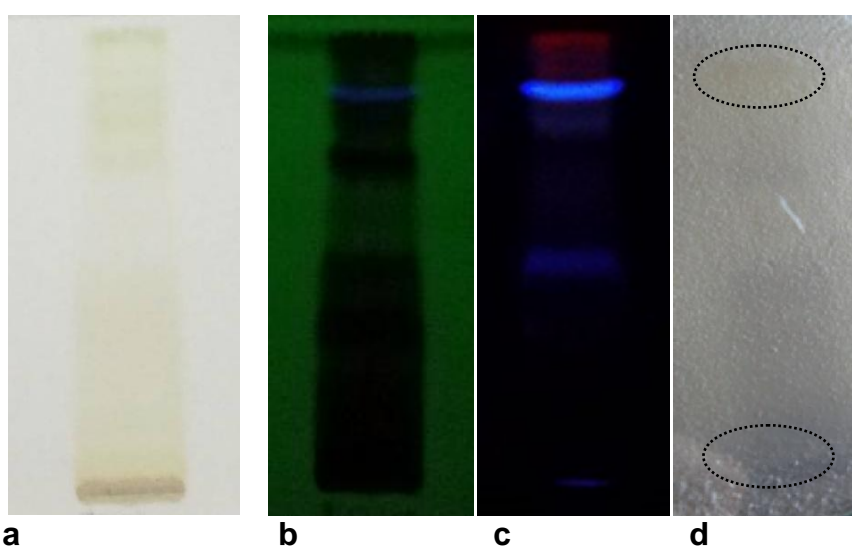


Ref: **a y b:** Bioautografías sembradas con 500 µg y 1.000 µg respectivamente de extracto hexánico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*. **c y d:** bioautografías sembradas con 500 µg y 1.000 µg respectivamente de extracto de acetato de etilo de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*. **e y f:** bioautografías sembradas con 500 µg y 1.000 µg respectivamente de extracto metanólico de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*. **HEser:** extracto hexánico de *Euphorbia serpens*; **HEsch:** extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*; **HEcol:** extracto hexánico de *Euphorbia collina*; **AEser:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia serpens*; **AEsch:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia schickendantzii*; **AEcol:** extracto de acetato de etilo de *Euphorbia collina*; **MEser:** extracto metanólico de *Euphorbia serpens*; **MEsch:** extracto metanólico de *Euphorbia schickendantzii*; **MEcol:** extracto metanólico de *Euphorbia collina*; **C:** control; **ket:** ketoconazon.

Bioautografía de cromatogramas en capa fina de extractos metanólicos de Euphorbia collina y Euphorbia schickendantzii

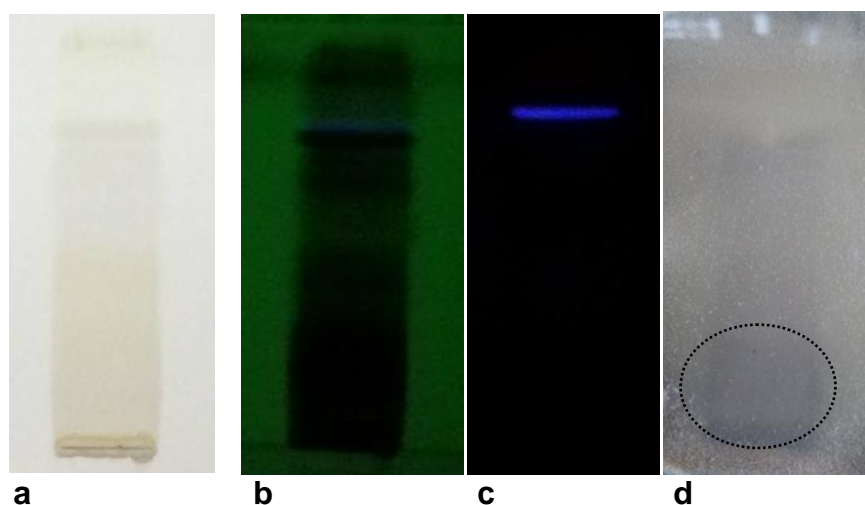
Las bioautografías de cromatogramas de capa fina del extracto de *E. collina* indicaron actividad antifúngica contra *F. verticillioides*. Las zonas de supresión de crecimiento microbiano se ubicaron en $R_f = 0,95$ en el sistema de corrida clorofomo: metanol: ácido fórmico (73:20:7); y $R_f = 0,3$, en el sistema de corrida clorofomo: acetato de etilo: metanol: ácido fórmico (35:42:20:3). Los cromatogramas con ambos sistemas de solventes también evidenciaron inhibición en el origen cromatográfico (**Figura 4.7 y 4.8 d**). Los extractos metanólicos de *E. schickendantzii* no manifestaron actividad antifúngica (**Figuras 4.9 d y 4.10 d**).

Figura 4.7: Cromatogramas y bioautograma obtenidos a partir del extracto metanólico de *Euphorbia collina* con cloroformo: metanol: ácido fórmico (73:20:7).



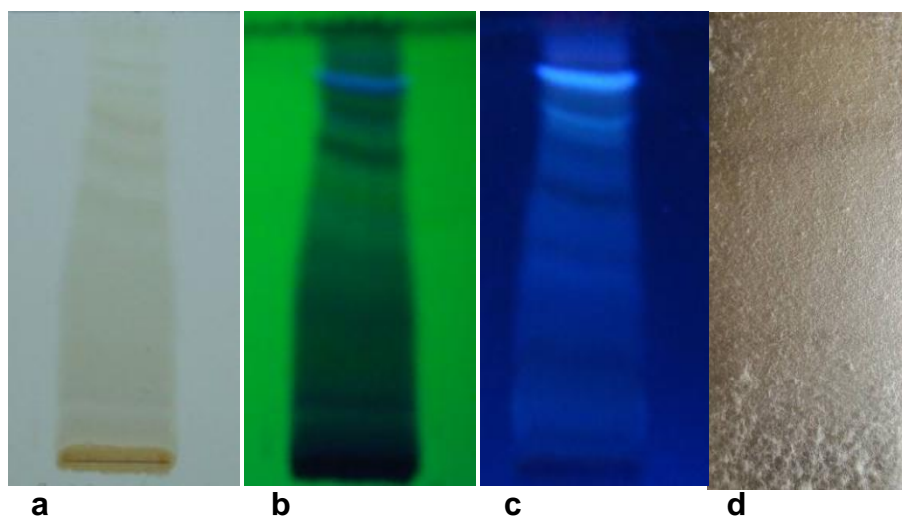
Ref: Los cromatogramas se observaron **a:** a simple vista, y bajo luz ultravioleta de **b:** 254 nm y **c:** 365 nm. **d:** Bioautograma mostrando inhibición de crecimiento en $R_f=0,95$ y el origen. Con círculos punteados se indican las zonas de menor crecimiento fúngico.

Figura 4.8: Cromatogramas y bioautograma obtenidos para el extracto metanólico de *Euphorbia collina* con cloroformo: acetato de etilo: metanol: ácido fórmico (35:42:20:3).



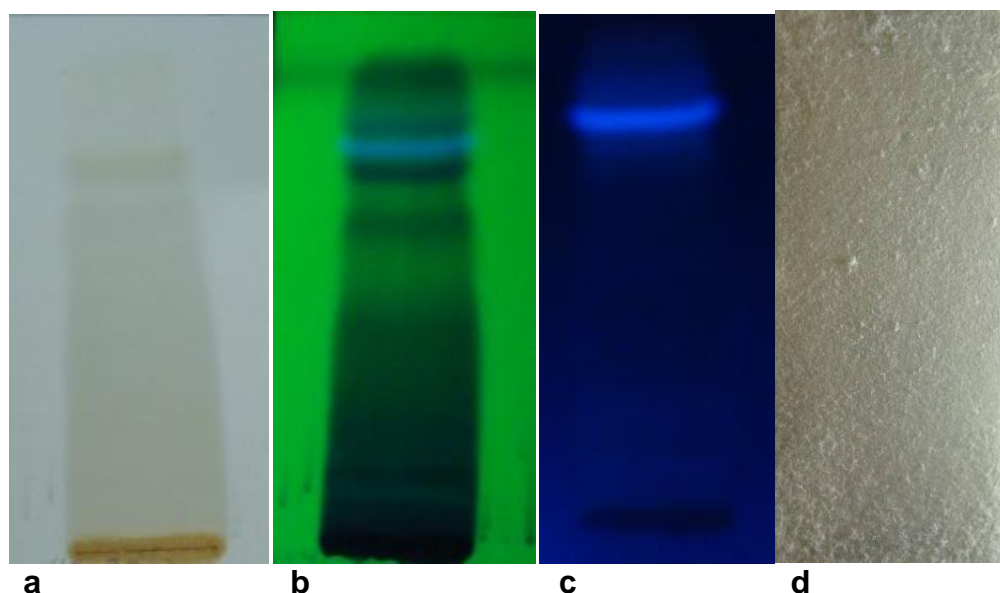
Ref: Los cromatogramas se observaron **a:** a simple vista, bajo luz ultravioleta de **b:** 254 nm y **c:** 365 nm. **d:** Bioautograma mostrando inhibición de crecimiento desde el origen hasta $R_f = 0,3$. Con círculos punteados se indican las zonas de menor crecimiento fúngico.

Figura 4.9: Cromatogramas y bioautogramas obtenidos para el extracto metanólico de *Euphorbia schickendantzii*, con cloroformo: metanol: ác. fórmico (73:20:7).



Ref: Los cromatogramas se observaron **a:** a simple vista, y bajo luz ultravioleta de **b:** 254 nm y **c:** 365 nm. **d:** Bioautograma sin inhibición de crecimiento fúngico.

Figura 4.10: Cromatogramas y bioautogramas obtenidos para el extracto metanólico de *Euphorbia schickendantzii*, con cloroformo: acetato de etilo: metanol: ác. fórmico (35:42:20:3).

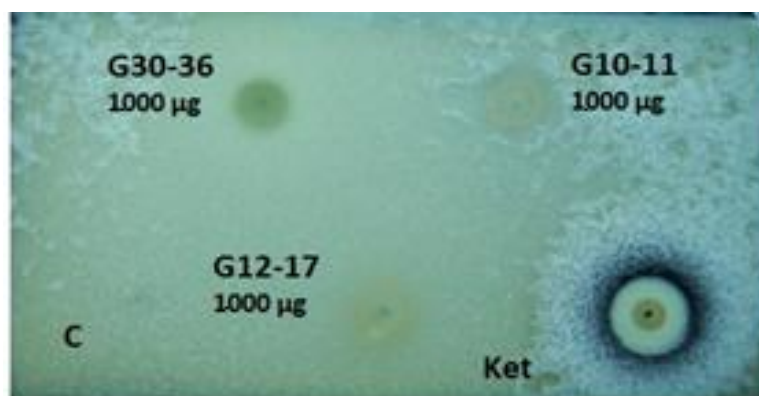


Ref: Los cromatogramas se observaron **a:** a simple vista, y bajo luz ultravioleta de **b:** 254 nm y **c:** 365 nm. **d:** Bioautograma sin inhibición de crecimiento fúngico.

Bioautografía de siembra puntual de grupos de fracciones de cromatografía de columna de Euphorbia collina

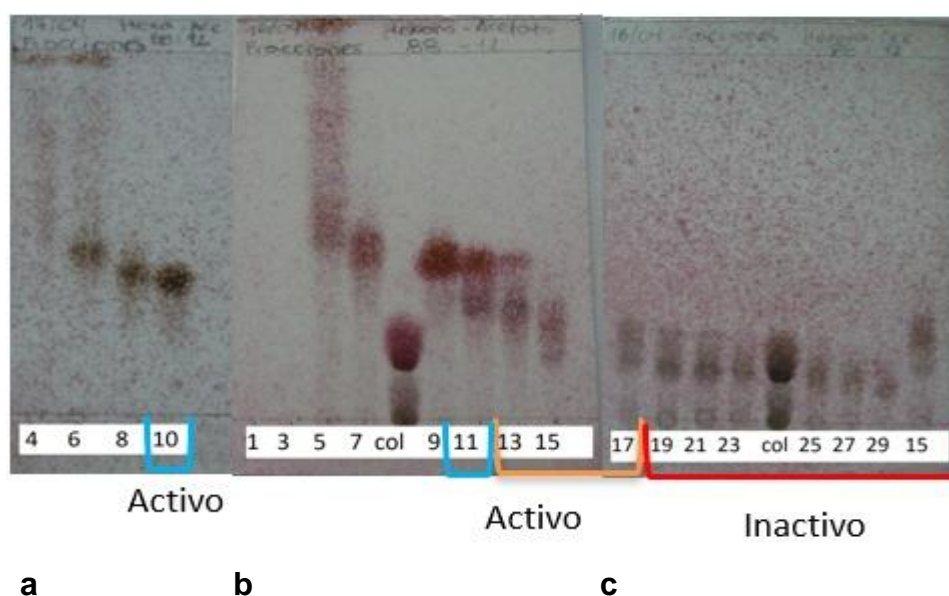
Las bioautografías en siembra puntual de los grupos de fracciones recuperados de la cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de *E. collina* analizados indicaron que solamente G10-11 y G12-17 contenían constituyentes antifúngicos sobre *F. verticillioides* (**Figura 4.11**). El grupo G10-11 presentó una mancha con Rf similar al del lupeol. Los constituyentes del grupo G12-17 presentaron Rf menores a este triterpeno (**Figura 4.12**). A ambas fracciones se les realizó cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masa y fueron analizadas por HPLC (ver Capítulo 5).

Figura 4.11: Bioautografía de siembra puntual de grupos de fracciones de columna de extractos de *Euphorbia collina* ensayados sobre *Fusarium verticillioides*.



Ref: **C:** control; **Ket:** ketoconazol; **G10-11, G12-17 y G30-36:** grupos de fracciones de columna de mezcla de extractos hexánico y de acetato de etilo de *Euphorbia collina*. Nota: Se observa inhibición del crecimiento fúngico en las zonas de siembra de las fracciones G10-11 y G12-17.

Figura 4.12: Cromatografías en capa fina de las fracciones extraídas de la cromatografía en columna de extractos hexánicos y de acetato de etilo de *Euphorbia collina*.



Ref: **a:** TLC (cromatografía de capa fina) de las fracciones (Frs) 4; 6; 8; 10, con solvente de corrida hexano: acetato de etilo (88:12). **b:** TLC de las Frs. 1; 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15, con solvente de corrida hexano:acetato de etilo (88:12). **c:** TLC de las Fr. 15; 17; 19; 21; 23; 27; 29. Con solvente de corrida hexano-acetato de etilo (88:12). Col: colesterol.

Ensayos de microdilución de extractos de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*; y fracción G10-11 contra *Fusarium verticillioides*

En la **Tabla 4.2** se presentan los valores de CI_{30} y CI_{50} de los extractos metanólicos y de acetato de etilo de *E. collina*, *E. schickendantzii* y *E. serpens*, y el grupo G10-11 proveniente del extracto de acetato de etilo de *E. collina*, al ser ensayados contra *F. verticillioides*. La fracción G10-11 fue el único capaz de alcanzar 50% de inhibición de crecimiento fúngico.

Tabla 4.2. Valores de concentraciones inhibitorias del 30% (CI_{30}) y 50% (CI_{50}) de crecimiento fúngico obtenidos para extractos metanólicos y acetato de etilo de las especies de *Euphorbia*, al ser ensayados contra *Fusarium verticillioides*. Se incluye también la fracción G10-11 procedente de extracto acetato de etilo de *Euphorbia collina*.

		$CI_{30}(\mu\text{g/ml})^1$	$CI_{50}(\mu\text{g/ml})$
Extractos metanólicos			
	<i>E. collina</i>	834 (734-889)	> 2000
	<i>E. schickendantzii</i>	675 (523-790)	> 2000
	<i>E. serpens</i>	> 2000	> 2000
Extractos acetato de etilo			
	<i>E. collina</i>	951 (780-1120)	> 2000
	<i>E. schickendantzii</i>	> 2000	> 2000
	<i>E. serpens</i>	> 2000	> 2000
Fracciones de extracto acetato de etilo (<i>E. collina</i>)			
	G10-11	233 (215-247)	898 (750-998)
	Tebuconazol	0,03 (0,01-0,05)	0,06 (0,04-0,07)

¹ Los límites de confianza superior e inferior correspondientes a las concentraciones inhibitorias (CI) se indican entre paréntesis.

DISCUSIÓN

Actividad Antibacteriana

Mediante el método de difusión en pocillo, el extracto de acetato de etilo de *E. collina* mostró halos de inhibición contra *S. aureus*, y los extractos metanólicos de *E. collina* y *E. schickendantzii*, contra *S. epidermidis*. Si bien, estos halos fueron menores a los producidos por los antibióticos de referencia, el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos, la capacidad de difusión del compuesto y cantidad de inóculo. Es por ello que existe una mala correlación entre el tamaño de los mismos y la eficacia clínica de las sustancias, siendo necesarios estudios *in vivo* para determinar el poder antibacteriano de estos extractos (Ramírez y Castaño 2009).

El mayor halo de inhibición fue producido por el extracto metanólico de *E. collina* contra *S. epidermidis*. Los extractos metanólicos de otras especies de *Euphorbia* han mostrado inhibición del crecimiento bacteriano contra algunas de las cepas probadas en este trabajo de tesis. Por ej. extractos metanólicos *E. hirta* y *E. tirucalli*, mostraron actividad contra *S. epidermidis* (Parekh y Chanda 2006) y extractos metanólico y alcohólicos de *E. milii* mostraron halos de inhibición contra *K. pneumoniae* y *S. epidermidis* (Rauf *et al.* 2014). Se cree que estos efectos son debido a la presencia de taninos y flavonoides los cuales han demostrado actividad antibacteriana en estudios previos (Daglia 2012; Singh 2003). Tanto en nuestro trabajo como en el de Rauf las fracciones que mostraron efecto antibacteriano contienen taninos y flavonoides (Capítulo 5), ya que ambos tipos de compuestos son solubles en solventes orgánicos polares. Además, el agar agar es muy soluble

en agua y por lo tanto los compuestos solubilizados en metanol podrían llegar a tener mayor tasa de difusión en este medio que los hexánicos y de acetato de etilo.

De las especies estudiadas en este trabajo, sólo se encontraron antecedentes de *E. serpens*. El extracto metanólico de partes aéreas de *E. serpens*, no produjo halos de inhibición contra las cepas ensayadas en este trabajo, sin embargo, inhibió el crecimiento de *S. lutea*, *S. aureus* y *E. coli* con dosis de 10 mg/ml en pruebas de difusión por disco, y de *Vibrio cholerae* en concentraciones comprendidas entre 3,9 y 12,3 mg/ml en ensayos de microdilución (Bhakuni *et al.* 1974; Payen *et al.* 2015).

El método de Kirby Bauer utiliza variables conocidas, permitiendo la interpretación de resultados mediante la comparación con una tabla patrón. Entre las variables pueden mencionarse, la concentración de la droga en el disco, la sensibilidad de la bacteria, la composición y volumen del medio, el tiempo y la temperatura de incubación, el coeficiente de difusión de la droga en el agar y la concentración del inóculo bacteriano (Bauer *et al.* 1966). En estos ensayos fue posible controlar las variables referidas al medio de cultivo, mientras que resultaron desconocidas algunas propiedades del extracto, como por ejemplo, el coeficiente de difusión.

Se generaron interrogantes acerca de la influencia de la composición química del extracto sobre la difusión en agar, ya que podría interferir en la interpretación del tamaño del halo. Los ensayos de difusión son semicualitativos debido a que indican actividad antibacteriana en la medida en que las sustancias involucradas sean capaces de difundir en el medio hidrofílico. Esta circunstancia podría llevar a interpretaciones de resultados erróneas al medir solamente el halo de inhibición, por

este motivo se evaluaron los extractos por dos métodos; método de difusión en pocillos y método de dilución en placa.

Ninguno de los extractos que mostraron halos de inhibición en el método de difusión en pocillos, mostraron inhibición del crecimiento en el método de dilución en placa. Estas discrepancias entre los resultados obtenidos por diferentes métodos para evaluar la actividad antibacteriana de un mismo extracto, fue observada por otros autores (Boya nova 2005; Ardoino 2014).

Actividad antifúngica

Al igual que lo observado en los ensayos para determinar actividad antibacteriana de extractos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, las extracciones realizadas con acetato de etilo y metanol en *E. collina* y metanol en *E. schickendantzii* permitieron recuperar compuestos antifúngicos, aunque en bajas cantidades.

Los valores de MIC100 de extractos entre 0,05 y 0,5 mg/ml indican una fuerte actividad antimicrobiana, mientras que los valores de MIC100 entre 0,6 y 1,5 mg/ml o superiores a 1,5 mg/ml revelan una actividad de moderada a débil (Sartoratto *et al.* 2004). Es decir, un IC50 mayor a 0,75 mg/ml indica una leve actividad antimicrobiana. En este contexto tanto los extractos como la fracción G10-11 muestran leve actividad contra *F. verticillioides*.

De los extractos bioactivos, se seleccionó el extracto de acetato de etilo de *E. collina* para continuar con un fraccionamiento bioguiado en busca de los compuestos antifúngicos, debido a la menor complejidad demostrada en las cromatografías de capa fina previas a los ensayos, y, por lo tanto, mayor

probabilidad de elucidar el compuesto responsable de la actividad, quedando los extractos metanólicos para futuras investigaciones.

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto de hexano y acetato de etilo de *E. collina*, fueron puestas a prueba mediante siembra puntual, y se observó actividad en la fracción G10-11, la cual presenta mayor actividad incluso que el extracto del cual procede, siendo la única que alcanzó la inhibición del 50 % del crecimiento fúngico. La fracción G10-11 fue estudiada para analizar sus componentes principales (ver Capítulo 5), resultando ser una mezcla de 51% ciclartenol (CA) y 49% 24-metilenocicloartanol (24MCA), concluyendo que estos triterpenos pentacíclicos son los responsables de la actividad antifúngica.

Estos triterpenoides pentacíclicos son intermediarios en la biosíntesis vegetal de fitoesteroles y se encuentran en mayor cantidad en las partes aéreas de varias especies de *Euphorbia* (De Pascual *et al.* 1987; Zare *et al.* 2015). Aceites de CA y 24MCA poseen propiedades farmacéuticas como antiinflamatoria y antioxidante (Abidi 2001; Zhang *et al.* 2017), pero su efecto sobre *F. verticilloides* es informado por primera vez en este trabajo. Otros autores demostraron que CA posee actividad moderada a débil contra aislados clínicos de *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* (Ragasa *et al.* 2004), y fue inactivo sobre las bacterias *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, mientras que 24MCA mostró una fuerte actividad contra *Plasmodium falciparum* (Bickiia *et al.* 2007).

Se ha descrito el efecto antifúngico de extractos diclorometánicos de *E. serpens* contra *A. flavus* y *Microsporum canis* (Ahmad 2009), siendo este trabajo la primera vez que se reporta a *E. schickendantzii* y *E. collina* con actividad antifúngica.

CONCLUSIONES:

- Los extractos metanólicos de *E. collina* y *E. schickendantzii*, y el extracto de acetato de etilo de *E. collina*, mostraron actividad contra *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente, confirmando la presencia de efecto antimicrobiano en estas especies de Euphorbias.
- Los extractos metanólicos de *E. collina* y *E. schickendantzii* y el extracto de acetato de etilo de *E. collina* mostraron actividad antifúngica contra *Fusarium verticillioides*.
- El extracto metanólico de *E. collina* mostró dos zonas de inhibición del crecimiento fúngico en cada uno de los sistemas de solventes utilizados en los ensayos de Bioautografía. Con sistema de solvente cloroformo: metanol: ácido fórmico (73: 20: 7); se observó una zona a un $R_f = 0,95$ y otra en el origen de siembra y con sistema de solvente cloroformo: acetato de etilo: metanol: ácido fórmico (35:42:20:3); se observó una zona a un $R_f = 0,3$ y otra en el origen de siembra.
- Las fracciones G10-11 y G12-17 recuperadas de la cromatografía en columna de los extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina*, mostraron actividad fungicida contra *Fusarium verticillioides*.
- La fracción G10-11 alcanzó la inhibición del 50% del cultivo de *Fusarium verticillioides*, siendo incluso más efectivo que el extracto del cual se recuperó.

BIBLIOGRAFÍA:

-ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of chromatography*, 2001, vol. 935, no 1-2, p. 173-201.

-AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of ethnopharmacology*, 1998, vol. 62, no 2, p. 183-193.

-AHMAD, I. Phytochemical and biological studies of *Euphorbia serpens*, *Euphorbia granulata* (*Euphorbiaceae*) and *Vernonia cinerascens* (*Compositae*). Tesis doctoral. *Digital repository of Indigenous Literatura of Pakistan. Bahauddinzakariya university multan, pakistan, 2009, Disponible en: //173.208.131.244:9060/xmlui/handle/123456789/2783*

-ARDOINO, S. M. Estudio fitoquímico de extractos con actividad antimicrobiana contra *Brucella canis* obtenidos a partir de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, Argentina. *Tesis Doctoral. Repositorio digital de acceso abierto de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa, 2014. Disponible en <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/915>.*

-ASCACIO-VALDÉS, J., *et al.* Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2013, vol. 3, no 1, p. 41-46.

-BARBOZA, G.E., *et al.* Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 2009, vol. 34, no 1-2, p. 7-365.

- BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966, vol. 45, p. 149-158.
- BHAKUNI, D. S., *et al.* Screening of Chilean plants for antimicrobial activity. *Departamento de Botánica, Universidad de Concepción*, 1974, vol. 37, p. 621-632.
- BICKIIA, J., *et al.* The antiplasmodial agents of the stem bark of *Entandrophragma angolense* (Meliaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2007, vol. 4, no 2, p. 135-139.
- BITTNER, M., *et al.* Estudio químico de especies de la familia *Euphorbiaceae* en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 2001, vol. 46, no 4, p. 419-431.
- BOYANOVA, L., *et al.* Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of medical microbiology*, 2005, vol. 54, no 5, p. 481-483.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 2012, vol. 23, no 2, p. 174-181.
- DE, Pascual T., *et al.* Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*, 1987, vol. 26, no 6, p. 1767-1776.
- FRED-JAIYESIMI, A. A.; ABO, K. A. Phytochemical and Antimicrobial analysis of the crude extract, petroleum ether and chloroform fractions of *Euphorbia heterophylla* Linn Whole Plant. *Pharmacognos y Journal*, 2010, vol. 2, no 16, p. 1-4.
- HUA, J., *et al.* Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry*, 2017, vol. 136, p. 56-64.

- PAREKH, J.; CHANDA, S. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 2006, vol. 31, no 1, p. 53-58.
- PAYNE, A., *et al.* Anti-Vibrio and Antioxidant Properties of Two Weeds: *Euphorbia serpens* and *Amaranthus viridis*. Asish, Kumar Mukhopadhyay, Subhajyoti Deka, Lahari Saikia y Shoma Paul Nandi. *Research Journal of Medicinal Plant*, 2015, vol. 9, no 4, p 170-178.
- PERILLA, Mindy J., *et al.* Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella serotipo Typhi y Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgia: OMS, 2004, p. 49-67.
- RAGASA, C. Y.; JORVINA, K.; RIDEOUT, John A. Antimicrobial compounds from *Artocarpus heterophyllus*. *Philippine Journal of Science*, 2004, vol. 133, no 2, p. 97.
- RAMIREZ, L. S.; CASTAÑO, D. M. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2009, vol. 15, no 42, p. 263-268.
- RAO, K. V. B., *et al.* Antibacterial and antifungal activity of *Euphorbia hirta* L. Leaves: A comparative study. *Journal of Pharmacy Research*, 2010, vol. 3, no 3, p. 548.
- RAUF, A., *et al.* Preliminary phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia milli*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 27, no. 4, p. 947-951.

-SARTORATTO, A., *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004, vol. 35, p. 275-280.

-SARTORI, V. C., *et al.* Atividade biológica de aveloz (*Euphorbia tirucalli*), boldo (*Pneumusboldus*) e cãnfora (*Cinnamomun camphora*) sobre *Alternaría* sp. e *Fusarium* sp. *Cadernos de Agroecologia*, 2013, vol. 8, no 2, p. 1-5. Disponible en: <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/13871/9466>

-SINGH B; Bhat T. K; Singh B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, no. 51, p. 5579-5597.

-STEIBEL, P.; TOSO, R.; TROIANI, H. Plantas medicinales de la región pampeana. *Laboratorios LAFITAR S.R.L*, 2009, p. 115-116.

-ZARE, S., *et al.* Phytochemical Investigation on *Euphorbia macrostegia* (Persian wood spurge). *Iranian journal of pharmaceutical research: International Journal of Production Research*, 2015, vol. 14, no 1, p. 243.

-ZHANG, Z. L., *et al.* Research advance of functional plant pharmaceutical cycloartenol about pharmacological and physiological activity. *Zhongguo Zhong yao za zhi*

hongguo zhongyaozazhi. China journal of Chinese materia medica, 2017, vol. 42, no 3, p. 433-437.



Capítulo 5

Identificación de grupos químicos y metabolitos secundarios de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, responsables de las acciones farmacológicas

Capítulo 5

Identificación de grupos químicos y metabolitos secundarios de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, responsables de las acciones farmacológicas

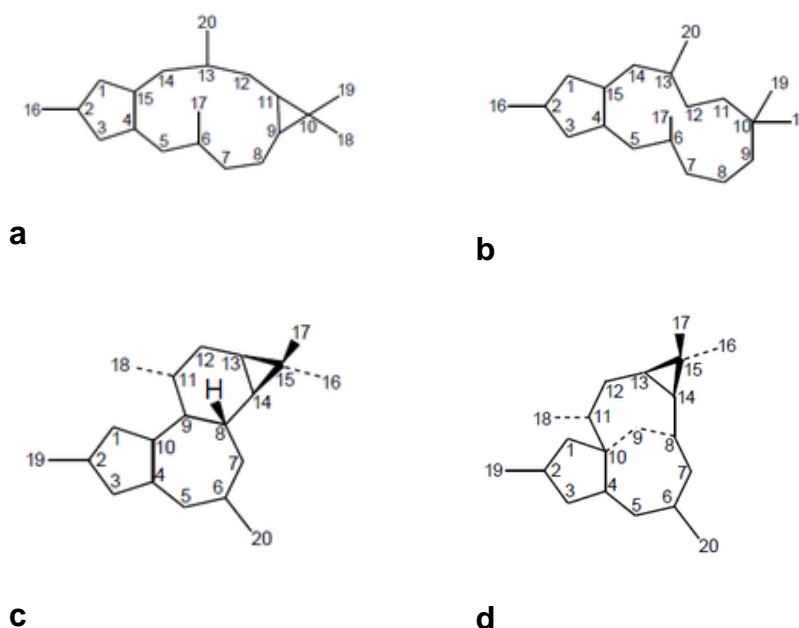
INTRODUCCIÓN

En el metabolismo de las plantas hay una variedad de moléculas orgánicas que no tienen una función directa en procesos específicos como respiración, fotosíntesis o transporte de nutrientes, se denominan metabolitos secundarios (Ávalos García y Pérez-Urria Carril 2009). Estos metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por las plantas como defensa ante agentes patógenos, del ataque por insectos y animales herbívoros, o bien para atraer insectos polinizadores. Se agrupan en tres grupos químicos principales, de acuerdo a las rutas mediante las cuales son sintetizados: compuestos nitrogenados, terpenoides y compuestos fenólicos (Brusotti *et al.* 2013). Los metabolitos secundarios no están todos presentes en todas las especies vegetales. Ya que no se sintetizan en forma generalizada, su producción suele estar acotada a un grupo taxonómico en particular (Pérez Alonso y Jiménez 2011). Hay además variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, originadas por diferentes reacciones químicas, lo que lleva a que aparezcan diferentes concentraciones de los mismos entre especies diferentes y entre distintos órganos de una misma planta e incluso entre individuos de una misma población (Sepúlveda Jiménez *et al.* 2003).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios cuya acción en las plantas es la defensa frente a patógenos vegetales, animales e insectos herbívoros

y distintos factores de estrés medioambientales (Singh *et al.* 2003; Daglia 2012). De acuerdo a su estructura química se los puede dividir en flavonoides y no flavonoides. A los flavonoides se los divide en flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, flavanoles e isoflavonas. En el grupo de los no flavonoides los más importantes son los ácidos fenólicos, los estilbenos y los lignanos. Los terpenoides incluyen como compuestos de interés a los aceites esenciales, las saponinas y cardenólidos (Ávalos García y Pérez-Urria Carril 2009). Los compuestos nitrogenados incluyen a los alcaloides y glucósidos cianogenéticos. Estos últimos son los metabolitos secundarios considerados más importantes en cuanto a sus funciones de defensa de las plantas (Pérez Alonso y Jiménez 2011).

Las plantas de la familia *Euphorbiaceae* son bien conocidas por la diversidad química de sus constituyentes isoprenoides (Jury *et al.* 1987). Dentro de este grupo, diterpenos con esqueleto jatrofano, latirano, tigliano o ingenano (**Figura 5.1**) con diferentes grupos funcionales como hidroxilos libres o esterificados, grupos carbonilo, dobles enlaces, epóxido, etc., son frecuentes en los miembros del género *Euphorbia* (Vasas y Hohmann 2014).

Figura 5.1: Principales diterpenoides de la familia *Euphorbiaceae*.

Ref: a. latiranos, b. tiglianos, c. ingenanos y d. jatrofanos. Extraído de Wright (1961).

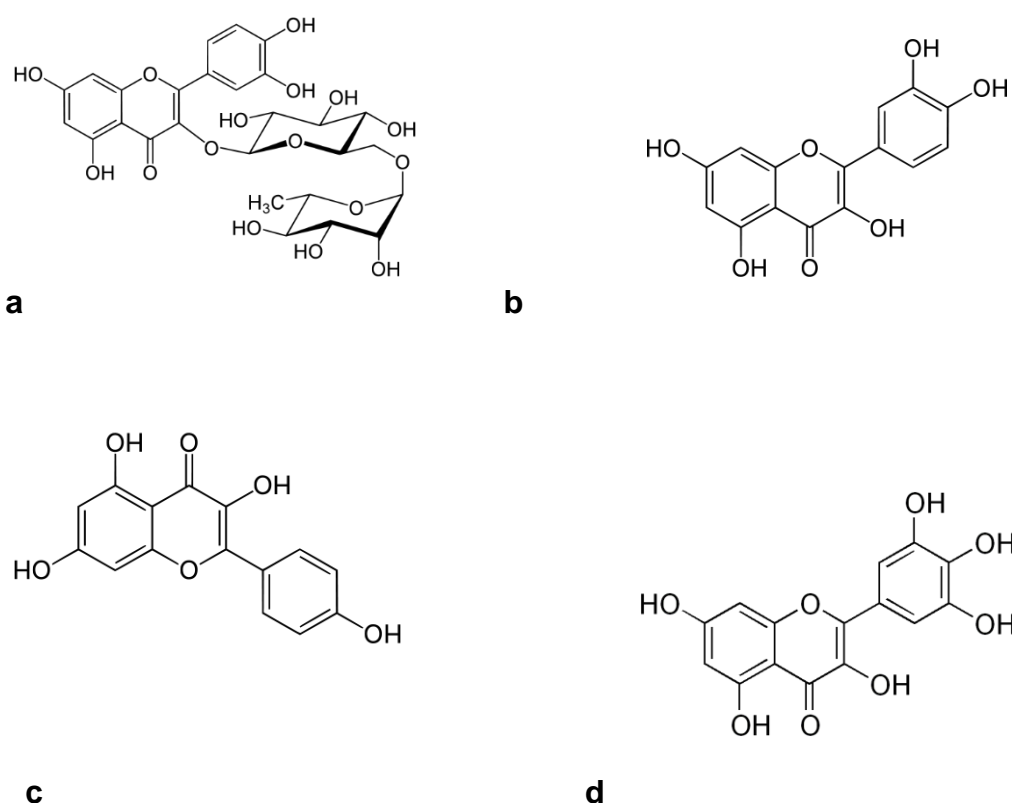
Otros compuestos característicos son los alcoholes triterpénicos que se encuentran en el látex, y han sido utilizados como marcadores quimiotaxonómicos (Rahman 2016). Se aislaron también otros compuestos como sesquiterpenoides, floracetofenonas, cerebrósidos, gliceroles, esteroides y flavonoides (Shi *et al.* 2008).

Los extractos o compuestos puros aislados de *Euphorbia* spp. se han utilizado para el estudio de diversas actividades, incluyendo la antiproliferación, modulabilidad de la resistencia a múltiples fármacos, actividad citotóxica, actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, etc. La conocida actividad irritativa de la piel, proinflamatoria y promotora de tumores de los extractos de muchas especies de *Euphorbia* y géneros relacionados se atribuye a la presencia de diterpenos macro y policíclicos del tipo mostrado e la **Figura 5.1** (Cateni *et al.* 2003).

Son también componentes relevantes de *Euphorbia* los diterpenoides policíclicos con un anillo común 6,6,6-tricíclico. Estos compuestos mostraron inhibición del crecimiento de microorganismos (Sutthivaiyakit *et al.* 2000).

Noori *et al.* (2008) identificaron varios flavonoides, entre ellos rutina, quercetina, kaempferol y miricetina, de 17 especies de *Euphorbias* (**Figura 5.2**).

Figura 5.2: Algunos de los flavonoides presentes en plantas del género *Euphorbia*.



Ref: a. rutina (flavonoide glicosilado), b. quercetina, c. kaempferol y d. miricetina.

Se han encontrado metabolitos secundarios como quercetina, flavonol y ácido tánico en especies de *Euphorbias* presentes en Argentina como *E. collina* var. *andina*, *E. schickendantzii*, *E. serpens* var. *serpens* y *E. serpens* var. *microphylla*. Estos compuestos presentaron actividad diurética, antilítica, antibacteriana y contra verrugas cutáneas y herpes (Barboza *et al.* 2009; Mali y Panchal 2013).

Con el objetivo de determinar los grupos químicos presentes en un extracto se realiza una marcha fitoquímica. Este procedimiento incluye una serie de métodos de detección de los diferentes grupos químicos de la especie vegetal a estudiar basados en extracciones con solventes y la posterior aplicación de pruebas de coloración para determinar la posible presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas entre otros (Lock de Ugaz 2001).

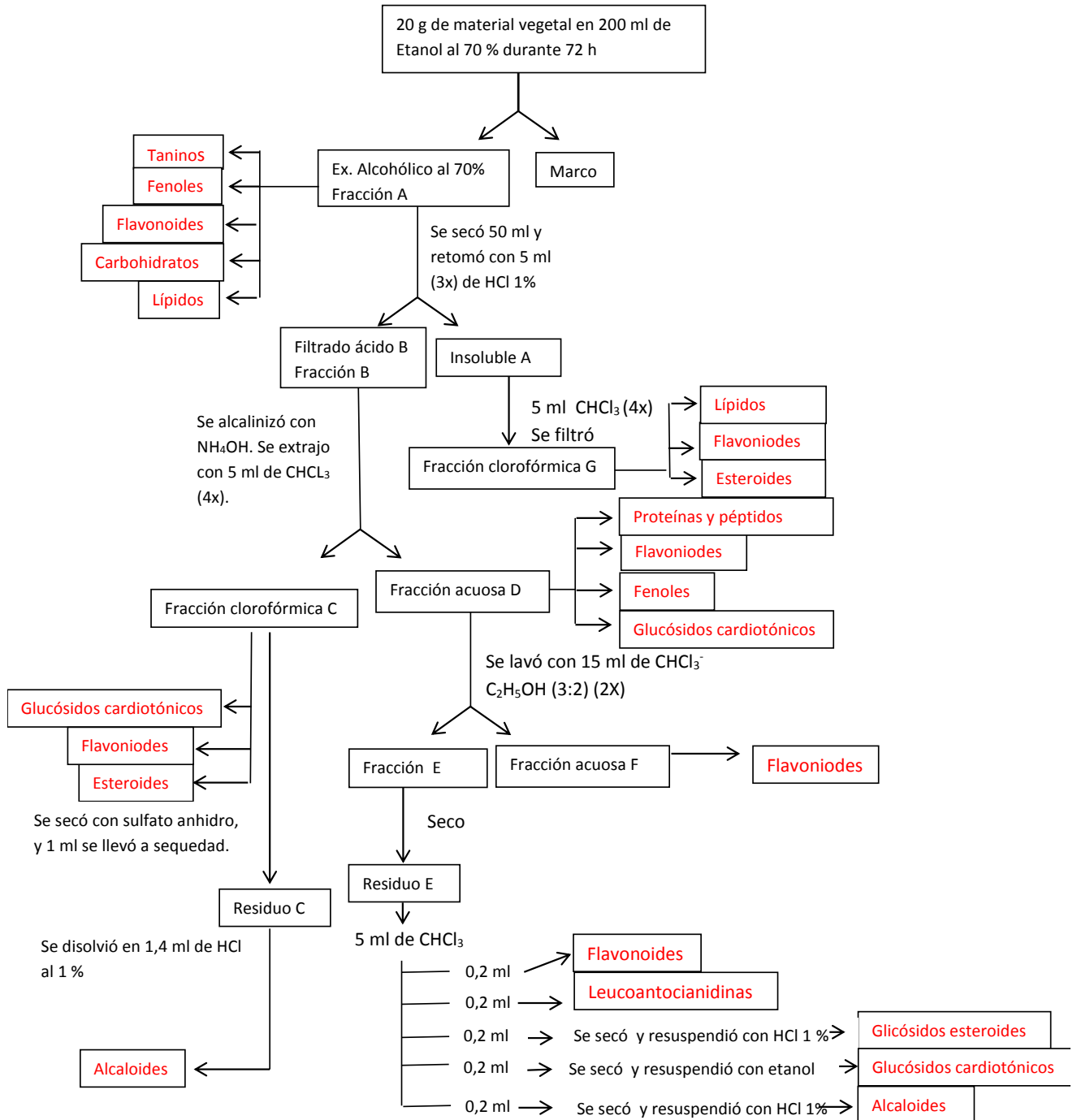
En este Capítulo se describe la marcha fitoquímica realizada para caracterizar los grupos químicos presentes en extractos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*, y la identificación de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reacciones de caracterización de familias químicas de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*

Las reacciones de caracterización de familias químicas presentes en partes aéreas de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo indicado en el **esquema 5.1**. Se obtuvieron las Fracciones A; B; cloroformica C; acuosa D; E; acuosa F; cloroformica G, y los Residuo C y E. A las Fracciones y Residuos obtenidos se les realizaron las reacciones de caracterización que se detallan a continuación:

Esquema 5.1: Fraccionamiento de extractos hidroalcohólicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, para identificar grupos químicos.



FRACCIÓN A

Taninos y OH fenólicos

Se desecaron calentando a baño María 2 ml de la Fracción A y 2 ml de tintura madre de *Hamamelis sp.* utilizada como control positivo. El residuo seco se disolvió en 0,5 ml de agua destilada y se le realizaron las siguientes reacciones:

Reacción de FeCl₃

A 0,2 ml de las soluciones anteriores y de la Fracción D se le agregaron 2 gotas de FeCl₃ al 1% acuoso. La aparición de coloración varía de acuerdo a la cantidad y posición de los oxhidrilos fenólicos presentes: amarilla, indica la presencia de 1 -OH, verde grisáceo indica 2 -OH adyacentes y azul negro 3 -OH adyacentes.

Reacción con gelatina

A 0,2 ml de las soluciones se le agregaron 0,2 ml de una solución de gelatina al 1,5 % en solución acuosa de NaCl al 10 %. La aparición de turbidez hasta precipitado abundante indica la presencia de taninos.

Flavonoides

Reacción de Shinoda

Se tomaron 0,5 ml de las Fracciones A, clorofórmica C, acuosa D, acuosa F, clorofórmica G y 0,2 ml del Residuo E resuspendido en etanol. Se utilizó rutina al 0,1; 0,25 y 0,5 % en etanol como control positivo. Se agregó una granalla de Mg, más 4 gotas de ácido clorhídrico concentrado a cada una de las soluciones, y se

esperó la disolución de la granalla. Se observó la aparición de coloración marrón, pardo rojiza o rosada. La aparición de una tonalidad desde rosado tenue hasta guinda indica la presencia de flavonoides.

Hidratos de carbono

Reacción con fenol

Se adicionaron 0,125 ml de una solución acuosa de fenol al 5% a: 0,5 ml de la Fracción A (seca retomada con agua) y; 0,5 ml de una decocción realizada con 0,5 g de material vegetal en 10 ml de agua, llevada a ebullición durante 2 minutos y luego filtrada. Se agregó 0,6 ml de H_2SO_4 concentrado y se observó la aparición de coloración. La presencia de color naranja-pardo indica la presencia de azúcares. Se utilizó dextrosa al 0,5 % como control positivo.

Lípidos

Exposición a vapores de Iodo

Se sembró una alícuota de la Fracción A, la Fracción clorofórmica G y aceite vegetal como control positivo en papel de filtro. Se dejó secar y se expuso a vapores de I_2 . Se observó la aparición de coloración. La presencia de coloración marrón-naranja indica la presencia de lípidos.

FRACCIÓN CLOROFÓRMICA C

Glucósidos cardiotónicos

Reacción de Kedde

La reacción se llevó a cabo mediante dos métodos:

- 1- A 0,2 ml de la Fracción C, Fracción D y Residuo seco E (resuspendido en 0,2 ml de etanol al 50%) se le añadió 0,1 ml de una solución ácido 3,5-dinitrobenzoico preparada disolviendo un gramo del mismo, en 100 ml de una solución 0,5 N de hidrato de potasio en metanol acuoso (50 % v/v). Cuando la reacción es positiva, aparece una coloración purpura estable.
- 2- Se prepararon dos soluciones por separado:
 - A. Solución I: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol.
 - B. Solución II: KOH al 5,7 % en agua destilada.

Sobre 0,2 ml de la Fracción C (llevado previamente a seco y retomado con 0,2 ml de etanol), y la Fracción D, se agregó 0,1 ml del reactivo (preparado con volúmenes iguales de las soluciones I y II). La aparición de coloración púrpura o violeta persistente indica la presencia de cardenólidos.

Flavonoides

Se evaluaron mediante la reacción de Shinoda como se indicó anteriormente.

Esteroides y triterpenos

Reacción de Liebermann- Burchard

Se mezclaron 18 ml de anhídrido acético con 2 ml de ácido sulfúrico concentrado en medio anhidro. Se tomaron 0,5 ml de la Fracción clorofórmica C, el Residuo seco E resuspendido en 0,2 de ácido clorhídrico, y la Fracción clorofórmica G. En paralelo se corrieron cuatro controles positivos, extractos diclorometánicos de *Crataegus sp.*; extractos butanólico de *Crataegus sp.*; extracto diclorometánico de *Aesculus hippocastanum* y extracto butanólico de *Aesculus hippocastanum*. Se agregaron 0,5 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. La reacción se considera positiva si aparece una coloración verde oscura que al poco tiempo del agregado del reactivo, pasa a negra. La formación de colores azul-verdoso indica la presencia de esteroides; la coloración rosada a púrpura evidencia compuestos triterpénicos.

RESIDUO C

Alcaloides

Se tomó 1 ml del Residuo C, se llevó a sequedad, y se resuspendió en 1, 4 ml de HCl al 1 %, de esta solución se extrajo 0,2 ml para la reacción de Mayer, 0,2 ml para la reacción de Dragendorff y 0,2 ml para la reacción con ácido pícrico. Además, se extrajo 1 ml de residuo E, se llevó a sequedad, y se resuspendió en 1 ml de HCl al 1 %, de la misma forma se extrajo 0, 2 ml para la reacción de Mayer, 0, 2 ml para la Dragendorff y 0,2 ml para la reacción con ácido pícrico.

A- **Reactivo de Mayer.** Se prepara una solución de 13,6 g de cloruro mercúrico en 600 ml de agua y otra de 50 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua. Se mezclan ambas con agitación y se completan a 1.000 ml con agua.

B- **Reactivo de Dragendorff.** Se suspenden 0.8 g de subnitrito de bismuto en 40 ml de agua y se añaden 10 ml de ácido acético glacial. Al mismo tiempo se prepara otra solución de 20 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones anteriores, se añaden 200 ml de ácido acético glacial y se lleva a 1.000 ml con agua.

C- **Acido pícrico.** Se disuelven en caliente 20 g de ácido pícrico en 1.000 ml de agua, se deja enfriar y se emplea la solución sobrenadante.

La reacción de Mayer sobre el Residuo C se repitió a la gota en portaobjeto, y las reacciones de Dragendorff y ácido pícrico en este residuo se confirmaron en placa de toque, donde se colocó 50 μ l del extracto y una gota del reactivo correspondiente.

Se utilizó como control positivo quinina al 5,0 %, 0,25 % y 0,1 % en solución de HCl al 1 %.

La reacción se considera positiva cuando se observa un precipitado o turbidez en el tubo.

FRACCIÓN ACUOSA D

Proteínas y péptidos

Reacción de Biuret

Se tomó 1 ml de la Fracción acuosa D y se le agregó 1 ml del reactivo de Biuret. El mismo se preparó mezclando partes iguales de una solución acuosa de CuSO_4 al 0,25 % (0,25 g en 100 ml de agua caliente) y una solución acuosa de NaOH al 10%.

La aparición de coloración violeta-púrpura o violeta-rosada indica la presencia de péptidos y/o proteínas.

Flavonoides, Fenoles y Glucósidos Cardiotónicos

Se evaluaron mediante las reacciones de Shinoda, FeCl_3 y Kedde respectivamente, como se indicó arriba.

RESIDUO E

Leucoantocianidinas

Se colocó 0,2 ml del Residuo E resuspendido en etanol en un tubo de ensayo, y se agregaron 2-3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó a ebullición. La reacción es positiva si la solución toma coloración rojiza.

Flavonoides, Glicósidos esteroides, Glucósidos cardiotónicos y Alcaloides

Se evaluaron mediante las reacciones de Shinoda, Liebermann-Burchard, Kedde y con los reactivos de Mayer, Dragendorff y ácido pícrico, respectivamente.

FRACCIÓN F

Flavonoides

Se evaluaron mediante la reacción de Shinoda como se indicó anteriormente.

FRACCIÓN CLOROFORMICA G

Lípidos, flavonoides, esteroides y triterpenos

Se llevó a cabo por medio de la exposición a vapores de Iodo, la reacción de Shinoda y la reacción de Liebermann- Burchard respectivamente.

REACCIONES DIRECTAS

Glucósidos cianogénicos

Reacción de Guignard

Se tomaron 0,5 g de cada especie vegetal, se pulverizaron y colocaron en tubos de ensayo. Se agregó agua destilada hasta cubrir el material vegetal y 5-6 gotas de cloroformo. Se colocó una tira de papel picrosódico en la porción superior del tubo, sin que toque los bordes o tapa. El papel picrosódico fue preparado previamente embebiendo un papel de filtro con carbonato de sodio al 5% y ácido pícrico al 0,5 % en agua. Paralelamente se corrió un control positivo con semillas de manzana. El ensayo se considera positivo cuando el papel cambia a rojo luego de 24 h.

Saponinas

Poder afrógeno

Se humectó 0,5 g pulverizados de las tres especies vegetales en estudio con 10 ml de agua destilada durante toda la noche, más dos controles positivos: *Aesculus hippocastanum* y *Solidago chilensis*. Luego se calentaron las muestras a baño María durante 30 minutos, y se filtraron en caliente con papel de filtro. Se tomó

1 ml de estas soluciones y se colocó en un tubo de hemólisis. Se tapó y agitó fuertemente durante 15 segundos. Se midió la espuma producida al inicio, a los 5 min y a los 15 min.

Poder emulsificante

Se humectaron 0,5 g pulverizados de las tres especies vegetales en estudio con 10 ml de agua destilada durante toda la noche, más dos controles positivos: *Aesculus hippocastanum* y *Solidago chilensis*. Luego se calentaron las muestras a baño María durante 30 minutos y se filtraron en caliente con papel de filtro. Se añadió 1 ml de cloroformo a 1 ml de la muestra. Se agitó y se procedió de igual manera en otro tubo, sustituyendo la muestra por agua. Luego de agitar por 15 segundos se dejó en reposo, y se midió el tiempo en que ambas fases tardan en separarse.

Proteínas - aminogrupos

Reacción de Ninhidrina

Se agregaron a 0,5 g de cada especie vegetal, 10 ml de agua destilada, y se llevaron a ebullición durante dos minutos. Se filtraron las muestras en caliente y se concentraron a 5 ml finales. Se agregó una gota de las soluciones anteriores sobre papel de filtro y se dejó secar. Luego se agregó una gota de solución etanólica de ninhidrina al 2 %. Además, se hizo en paralelo un blanco de reactivo, y un control positivo con triptófano en etanol al 50 %. La reacción se considera positiva con una coloración violeta de mayor intensidad que el blanco de reactivo.

Alcaloides

Extracción ácida

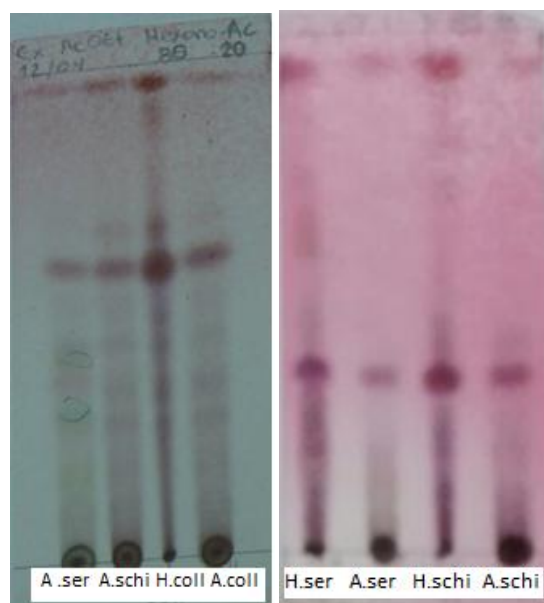
Se colocaron 0,5 g del material vegetal con 10 ml de una solución de HCl al 1%, se calentó la suspensión una hora a 70 °C en baño María. Luego se enfrió, filtró y redujo la solución a 2,5 ml finales. De la solución resultante se extrajo 0,2 ml de cada planta y para cada reactivo: Mayer; Dragendorff y ácido pícrico. La reacción se considera positiva si se observa precipitado.

Separación por cromatografía en columna de extractos hexánicos y acetato de etilo de *Euphorbia collina* y *Euphorbia schickendantzii*

Determinación de las condiciones cromatográficas

Se realizaron cromatografías en capa fina (TLC) para determinar las condiciones apropiadas para la separación de los compuestos presentes en los extractos estudiados utilizando cromatografía en columna. Se compararon los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos y de acetato de etilo de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*. Como solvente de corrida se utilizó una mezcla de hexano (hex): acetato de etilo (AcOEt) en relación 80:20 (**Figura 5.3-a**) y 85:15 (**Figura 5.3-b**). Para las tres especies se observó que tanto el extracto hexánico como el extracto de AcOEt tenían un perfil muy similar, y por ello, se reunieron ambos extractos de cada especie para realizar el fraccionamiento por cromatografía en columna (**Figura 5.3**).

Figura 5.3: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos y de acetato de etilo (AcOEt) de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.



a

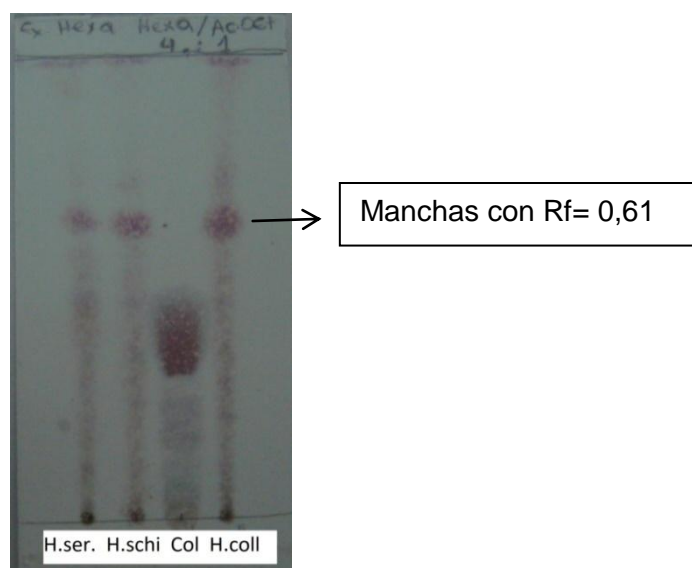
b

Ref: a. Se observa la similitud en los perfiles cromatográficos del extracto hexánico y de acetato de etilo (AcOEt) de *Euphorbia collina*. Solvente de corrida hexano: AcOEt 80:20. b. Se observa la similitud en los perfiles cromatográficos de los extractos hexánicos y de AcOEt de *Euphorbia serpens* y *Euphorbia schickendantzii*. Solvente de corrida hexano: AcOEt 85:15. A.ser: extracto AcOEt de *Euphorbia serpens*; A.schi: extracto de AcOEt de *Euphorbia schickendantzii*; A.coll: extracto AcOEt de *Euphorbia collina*; H.ser: extracto hexánico de *Euphorbia serpens*; H.schi: extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*; H.coll: extracto hexánico de *Euphorbia collina*.

Se ensayaron varias proporciones de los solventes hex y AcOEt para obtener el Rf (Relación de frente = distancia recorrida por el compuesto/ distancia recorrida por el solvente) de los compuestos de interés y luego utilizar esta información para realizar la cromatografía en columna.

Se inició con una mezcla de solventes hex: AcOET (4:1), obteniéndose un Rf= 0,61 para la mancha más destacada del extracto hexánico de las tres especies (**Figura 5.4**).

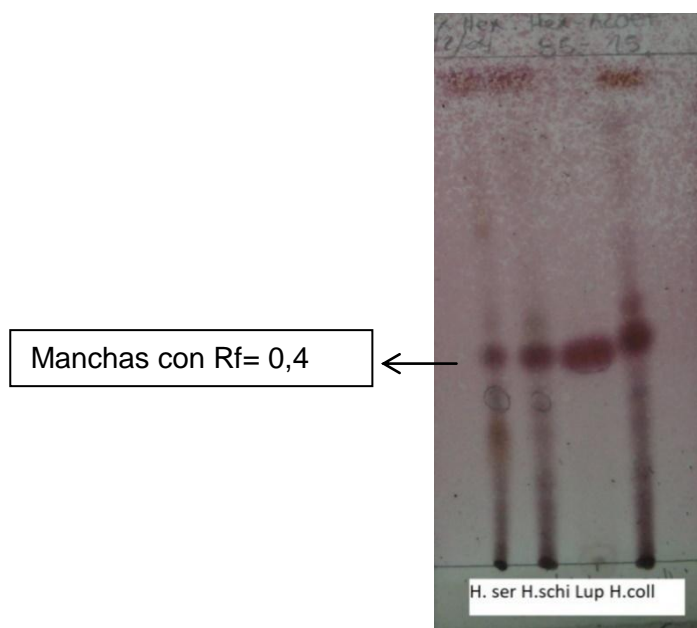
Figura 5.4: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, con solvente de corrida hexano: acetato de etilo (4:1).



Ref: H.ser: extracto hexánico de *Euphorbia serpens*; H.schi: extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*; Col: colesterol (compuesto de referencia); H.coll: extracto hexánico de *Euphorbia collina*.

Se disminuyó la polaridad de la mezcla a hex: AcOEt (85:15), obteniéndose ahora un $R_f = 0,40$ para el compuesto mayoritario (**Figura 5.5**). Se observa que la mancha mayoritaria de los tres extractos analizados tiene idéntico R_f al lupeol, un triterpeno pentacíclico que junto al colesterol se utilizan en nuestro laboratorio como referencias de polaridad.

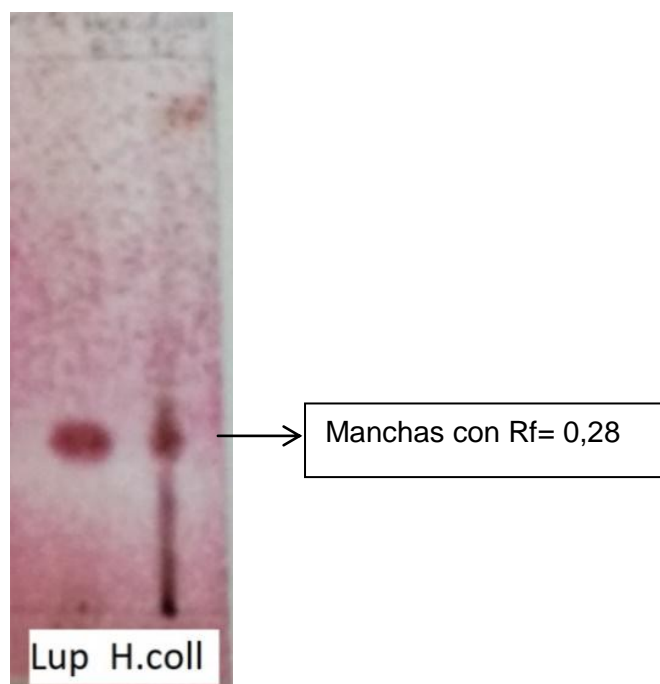
Figura 5.5: Cromatografía en capa fina de extractos hexánicos de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, con solvente de corrida hexano: acetato de etilo (85:15).



Ref: H.ser: extracto hexánico de *Euphorbia serpens*; H.schi: extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*; Lup: Lupeol (compuesto de referencia); H.coll: extracto hexánico de *Euphorbia collina*.

Finalmente se ensayó con una mezcla hex: AcOET (88:12), obteniéndose un $R_f = 0,28$ para la mancha mayoritaria de los extractos hexánicos analizados (**Figura 5.6**). Un valor de $R_f = 0,3$ se considera adecuado para realizar cromatografía en columna.

Figura 5.6: Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de *Euphorbia collina*, con solvente de corrida hexano: acetato de etilo (88:12).



Ref: Lup: Lupeol; H.coll: extracto hexánico de *Euphorbia collina*.

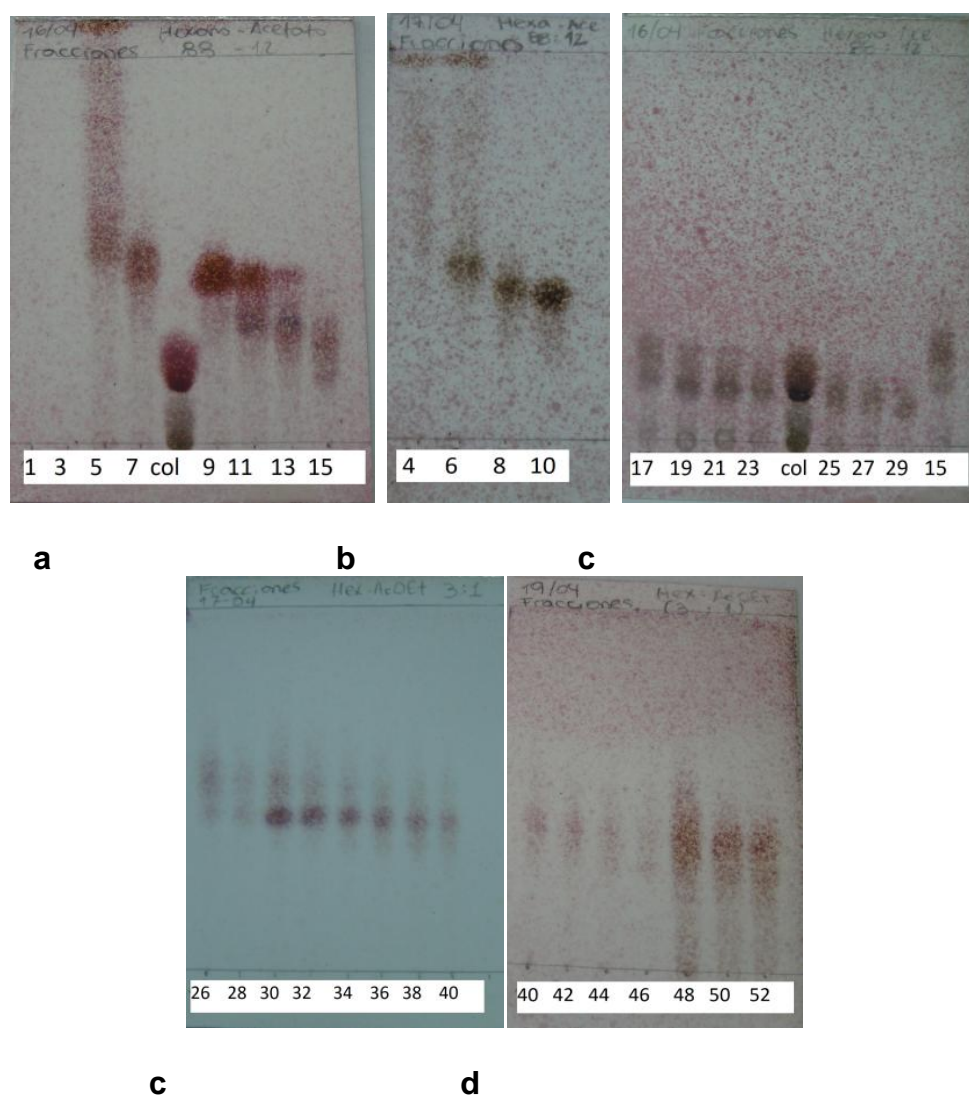
Separación por cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *Euphorbia collina*

Se realizó una cromatografía en columna con sílica gel Merck 230-400 mesh (75 g), previamente activado en estufa a 150 °C durante 1 h. La columna fue empaquetada con hex.

Se sembraron 1,07 g de extracto hexánico y 1,03 g de extracto de AcOEt de *E. collina*, que fueron disueltos en 20 ml de una mezcla hex: AcOEt (90:10).

Se inició el desarrollo de la columna con una mezcla inicial de hex: AcOEt (88:12), se recogieron 42 fracciones de 20 ml cada una y luego se aumentó gradualmente la polaridad del solvente de elución hasta 80:20 hasta finalizar la recolección de las fracciones. Todas las fracciones fueron monitoreadas por TLC para visualizar el proceso de separación y para agrupar las fracciones según similitud de sus perfiles cromatográficos (**Figura 5.7**).

Figura 5.7: Cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de extractos hexánico y acetato de etilo reunidos de *Euphorbia collina*.



Ref: **a:** Cromatografía de capa fina (TLC) de las fracciones (Frs). 1; 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15; solvente de corrida hexano (hex): acetato de etilo (AcOEt) (88:12). **b:** TLC de las Frs. 4; 6; 8; 10; solvente de corrida hex: AcOEt (88:12). **c:** TLC de las Frs. 15; 17; 19; 21; 23; 27; 29; solvente de corrida hex: AcOEt (88:12). **d:** TLC de las Frs. 26; 28; 30; 32; 34; 36; 38; 40; solvente de corrida hex: AcOEt (3:1). TLC de las Frs. 40; 42; 44; 46; 48; 50; 52; solvente de corrida hex: AcOEt (3:1). Col: colesterol (referencia).

Separación por cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *Euphorbia schickendantzii*

Se realizó una cromatografía en columna con sílica gel Merck 230-400 mesh (75 g), previamente activada en estufa a 150 °C durante 1 h. La columna fue empaquetada con hex.

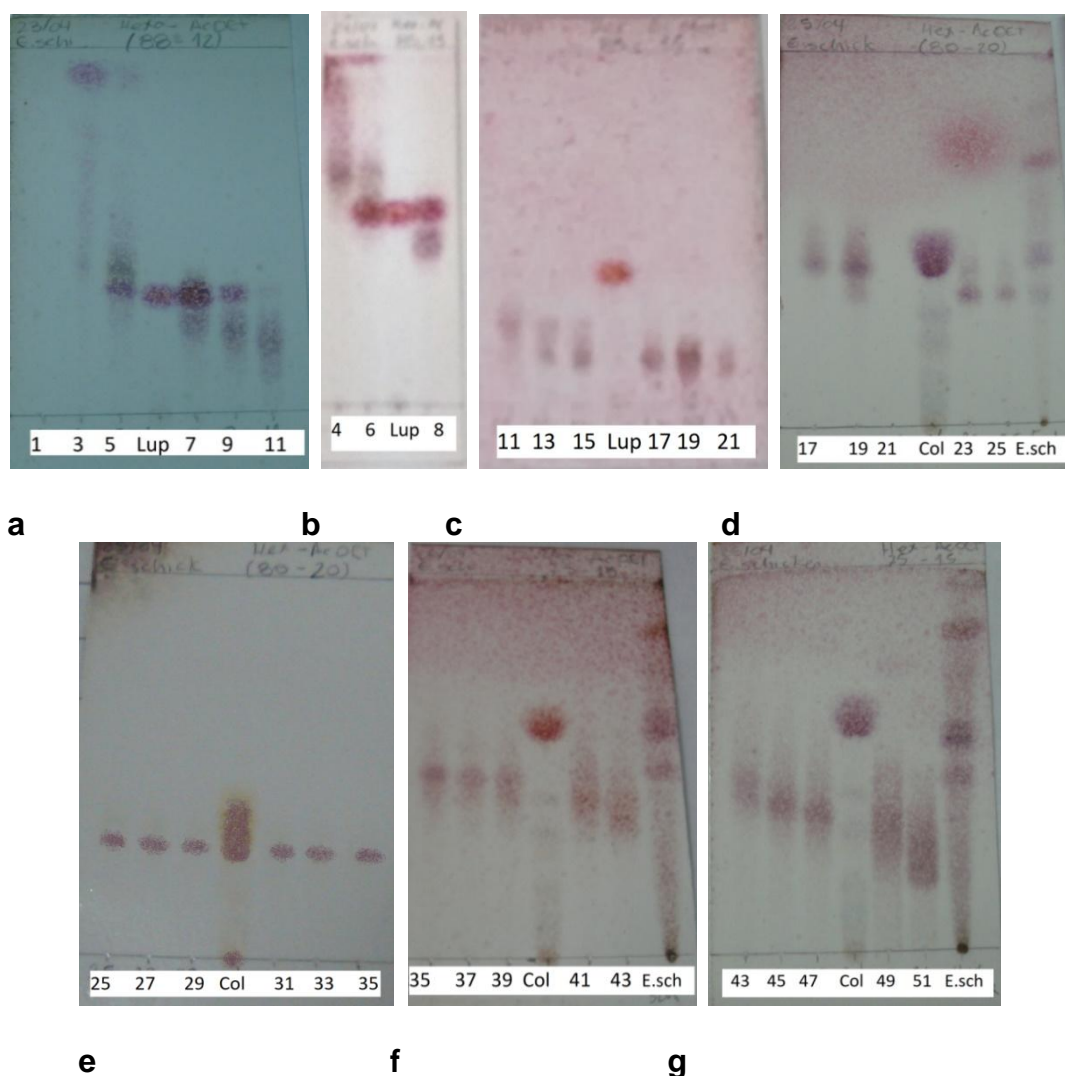
Se sembraron 0.84 g de extracto hexánico y 0.63 g de extracto de AcOEt de *E. schickendantzii* reunidos, que fueron disueltos en 20 ml de una mezcla hex: AcOEt (90:10).

Se inició la corrida cromatográfica con una mezcla hex: AcOEt (88:12), y se recogieron 25 fracciones, luego se aumentó la polaridad a 85:15 hasta la fracción 33, finalmente se utilizó hex: AcOEt (80:20) hasta finalizar la separación de los compuestos. Todas las fracciones fueron monitoreadas por TLC para visualizar el proceso de separación y para agrupar las fracciones según similitud de sus perfiles cromatográficos (**Figura 5.8**).

Aislamiento e identificación de compuestos antifúngicos provenientes de los extractos hexano y acetato de etilo de *Euphorbia collina*

La fracción G10-11 proveniente de la columna madre de *E. collina* fue testeada en ensayos de microdilución contra *Fusarium verticillioides* (ver Capítulo 4).

Figura 5.8: Cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de extractos hexánicos y de acetato de etilo reunidos de *Euphorbia schickendantzii*.



Ref: **a:** Cromatografía de capa fina (TLC) de las fracciones (Frs) 1; 3; 5; 7; 9; 11; solvente de corrida hexano (hex): acetato de etilo (AcOEt) (88:12). **b:** TLC de las Frs. 4; 6; 8; solvente de corrida hex: AcOEt (85:15). **c:** TLC de las Frs. 11; 13; 15; 17; 19; 21; solvente de corrida hex: AcOEt (85:15). **d:** TLC de las Frs. 17; 19; 21; 23; 25; solvente de corrida hex: AcOEt (80:20). **e:** TLC de las Frs. 25; 27; 29; 31; 33; 35; solvente de corrida hex: AcOEt (80:20). **f:** TLC de las Frs. 35; 37; 39; 41; 43; solvente de corrida hex: AcOEt (80:20). **g:** TLC de las Frs. 43; 45; 47; 49; 51 solvente de corrida hex: AcOEt (75:15). Lup: Lupeol (referencia); Col: colesterol (referencia) E.schi: Extracto hexánico de *Euphorbia schickendantzii*.

La fracción G10-11 fue evaporada bajo presión reducida a 60 °C, el residuo seco se solubilizó en diclorometano y luego inyectada en un cromatógrafo gaseoso

Thermo Electron Model trace GC ultra (Thermo Electron Corp, Madison, WI) acoplado a columna DB-5 (fenil metil siloxano; con una película de 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm de espesor, utilizada como fase estacionaria), y acoplado a un espectrómetro de masa ThermoElectron Model Polaris Q (Thermo Electron Corp, Madison, WI). Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 1 ml/min; relación de separación: 10:1; volumen de inyección: 1 µl; temperatura programada: 100 °C durante 4 min, 100-280 °C (con aumento de 10 °C/min), 300 °C (12 min); análisis de masa: trampa de iones; tipo de ionización: impacto de electrones a 70 eV; método de adquisición: análisis completo: 50-500 a.m.u; tiempo de ionización: 0.25 min. Los constituyentes del grupo G10-11 se identificaron mediante la comparación de sus patrones de fragmentación de masas de espectros con los almacenados en la base de datos de Wiley/NIST y los datos previamente publicados (Zare *et al.* 2015). El índice de retención de cada compuesto identificado se calculó en relación a los alcanos (Aristimuño Ficoseco *et al.* 2014).

El residuo seco de G10-11 se disolvió en una solución de isopropanol en acetonitrilo al 4 % y luego se filtró con una membrana PTFE de 0,22 µm. El filtrado se utilizó en múltiples inyecciones de HPLC acoplado a un detector ultravioleta fijado en 210 nm (Masohan y Bhatia, 1996) y equipado con una columna IB-SIL 5 C18 (250 × 10 mm, 5 µm) de Phenomenex. Las inyecciones se realizaron a través de un inyector Rheodyne equipado con un bucle de 500 µl. El flujo fue de 2,8 ml/min. Las fracciones F1 y F2 correspondientes a los picos se recogieron y secaron a presión reducida. Una pequeña alícuota de las fracciones F1 y F2 se disolvieron en diclorometano y se inyectaron en un GC-MS para verificar su composición.

La fracción G10-11 fue analizada con espectroscopía infrarroja (IR), el espectro FTIR (Fourier Transformed Infrared Spectra) fue obtenidos en un

espectrómetro Perkin Elmer GX21 en la región de 4000-400 cm^{-1} (espectral resolución: 4 cm^{-1}) en película (film) usando ventanas de NaCl (cloruro de sodio) o de ZnSe (seleniuro de zinc).

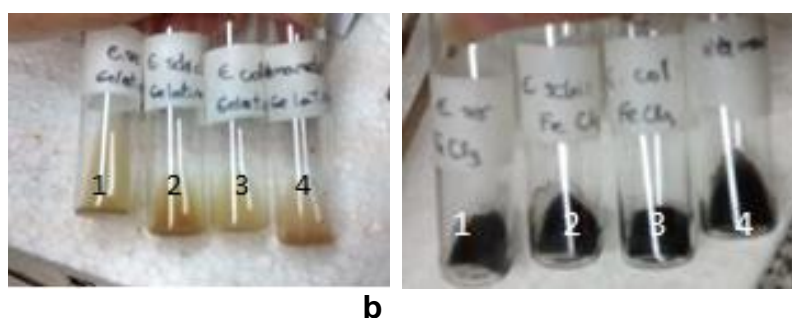
RESULTADOS

Tabla 5.1: Resultados de las reacciones de caracterización realizadas a la fracción alcohólica al 70 % de *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*.

	<i>Euphorbia serpens</i>	<i>Euphorbia schickendantzii</i>	<i>Euphorbia collina</i>
Fracción A			
Taninos (Fig. 5.9 a y b)	+	+	+
Hidroxiilos Fenólicos (Fig. 5.9 b)	+	+	+
Flavonoides (Fig. 5.10)	+++	++	+++
Hidratos de carbono (Fig. 5.11)	+	+	+
Lípidos (Fig. 5.12)	++	++	++
Fracción C			
Glucósidos cardiotónicos	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Esteroidales y triterpenos	-	-	-
Residuo C			
Alcaloides	-	-	-
Fracción acuosa D			
Proteínas y péptidos	-	-	-
Flavonoides (Fig. 5.13)	-	-	++
Glucósidos cardiotónicos	-	-	-
Hidroxiilos Fenólicos (Fig. 5.14)	+	+	+
Residuo E			
Glucósidos Flavonoides (Fig. 5.15)	+	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-
Esteroidales y triterpenos	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos	-	-	-
Alcaloides	-	-	-

Fracción F			
Flavonoides (Fig. 5.16)	-	-	+
Fracción clorofórmica G			
Flavonoides	-	-	-
Esteroidales y triterpenos (Fig. 5.17)	+	+	+
Lípidos (Fig. 5.12)	+++	++	+
Reacciones directas			
Glucósidos cianogenéticos	-	-	-
Saponinas (poder afrógeno) (Fig. 5.18)			
Tiempo 0 (<i>Aesculus hippocastanum</i> 4 mm de altura y <i>Solidago chilensis</i> 15 mm de altura)	5 mm	4 mm	4 mm
Tiempo 5 min (<i>Aesculus hippocastanum</i> 4 mm de altura y <i>Solidago chilensis</i> 10 mm de altura)	3 mm	2 mm	3 mm
Tiempo 15 min (<i>Aesculus hippocastanum</i> 4 mm de altura y <i>Solidago chilensis</i> 6 mm de altura)	2,5 mm	1 mm	2 mm
Saponinas (poder emulsificante) (Fig. 5.19)	+	+	+
Proteínas- aminogrupos (Fig. 5.20)	++	++	+
Alcaloides	-	-	-

Ref: -: negativo; +: positivo leve; ++: positivo moderado; +++: positivo alto.

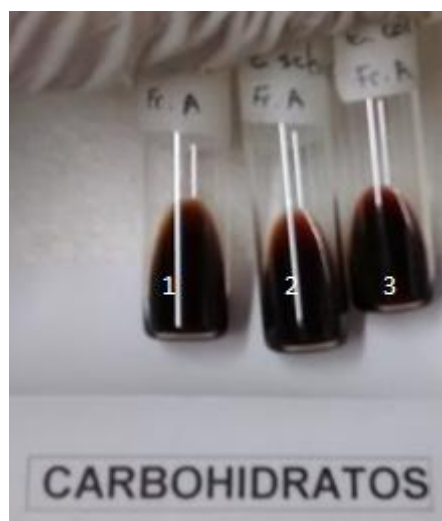
Figura 5.9: Ensayo de taninos en Fracciones A.

Ref: a: Reacción de gelatina, la aparición de turbidez indica la presencia de taninos. a-1: Reacción en Fracción A de *Euphorbia serpens*; a-2: Reacción en Fracción A de *Euphorbia schickendanzii*; a-3: Reacción en Fracción A de *Euphorbia collina* y a-4: Reacción en Fracción A de *Hamamelis sp.* **b:** Reacción de $FeCl_3$, la aparición de color (junto con la turbidez en A) indica la presencia de taninos. b-1: Reacción en fracción A de *Euphorbia serpens*; b-2: Reacción en Fracción A de *Euphorbia schickendanzii*; b-3: Reacción en Fracción A de *Euphorbia collina* y b-4: Reacción en Fracción A de *Hamamelis sp.*

Figura 5.10: Ensayo de flavonoides en Fracciones A.

Ref: En la foto se observa el ensayo de flavonoides mediante la reacción de Shinoda sobre las Fracciones A de: 1: *Euphorbia serpens*; 2: *Euphorbia schickendanzii*; 3: *Euphorbia collina*; 4: Rutina 0,5%; 5: Rutina 0,25 % y 6: Rutina 0,1%. La coloración rojiza indica la presencia de flavonoides.

Figura 5.11: Ensayo de carbohidratos en Fracciones A.



Ref: En la foto se muestra el ensayo de carbohidratos sobre la Fracción A mediante la reacción de fenol, la reacción es positiva si se observa coloración rojiza parda. 1: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia serpens*; 2: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia schickendantzii* y 3: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia collina*.

Figura 5.12: Ensayo de lípidos en Fracción A y Fracciones clorofórmicas G.



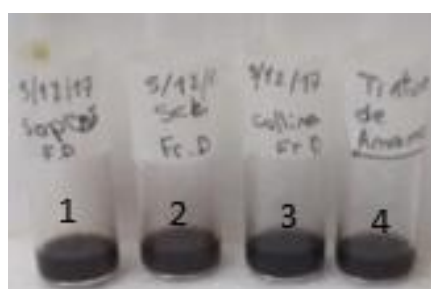
Ref: La coloración marrón luego de la exposición a Iodo, indica la presencia de lípidos. 1: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia serpens*; 2: Reacción sobre Fracción clorofórmica G de *Euphorbia serpens*; 3: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia schickendantzii*; 4: Reacción sobre Fracción clorofórmica G de *Euphorbia schickendantzii*; 5: Reacción sobre Fracción A de *Euphorbia collina*; 6: Reacción sobre fracción clorofórmica G de *Euphorbia collina*; 7: Control positivo.

Figura 5.13: Ensayo de flavonoides en Fracción acuosa D de *Euphorbia collina*.



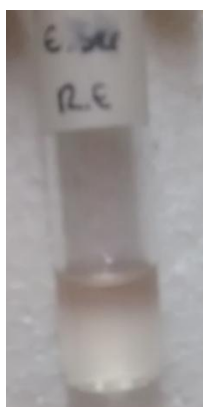
Ref: Ensayo realizado mediante la reacción de Shinoda, la reacción es positiva con la aparición de coloración rojiza. 1: Reacción sobre Fracción D de *Euphorbia collina*; 2: Reacción sobre rutina 0,25 %.

Figura 5.14: Ensayo de fenoles en fracciones acuosas D.



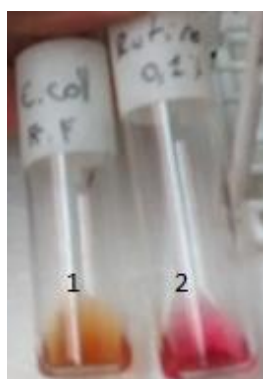
Ref: Ensayo realizado mediante la reacción de FeCl_3 , la presencia de coloración marrón-negruzca indica tres OH adyacentes. 1: Reacción sobre Fracción acuosa D de *Euphorbia serpens*; 2: Reacción sobre Fracción acuosa D de *Euphorbia schickendantzii*; 3: Reacción sobre Fracción acuosa D de *Euphorbia collina* y 4: Reacción sobre tintura de *Hamamelis sp.*

Figura 5.15: Ensayo de flavonoides sobre el Residuo E de *Euphorbia serpens*.



Ref: En la reacción de Shinoda, la presencia de coloración rosada indica la presencia de flavonoides.

Figura 5.16: Ensayo de flavonoides en Fracción acuosa F de *Euphorbia collina*.



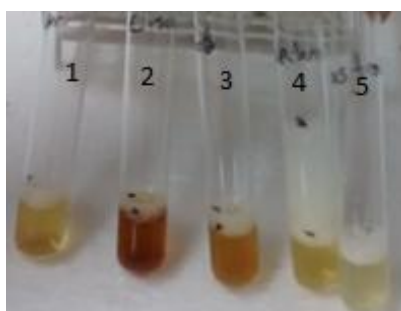
Ref: Reacción de Shinoda sobre: 1: Fracción acuosa F de *Euphorbia collina*; 2: Rutina al 0,1 %. La presencia de coloración rosada indica la presencia de flavonoides.

Figura 5.17: Ensayo de esteroides y triterpenos en Fracciones clorofórmicas G.



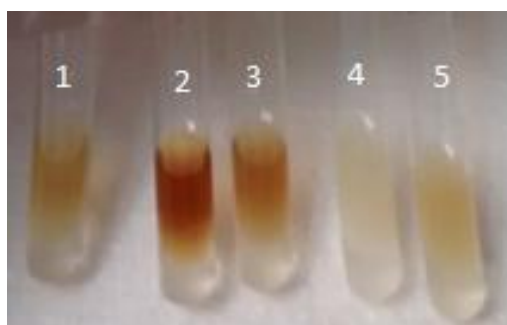
Ref: En la reacción de Liebermann-Burchard, la presencia de coloración verde azulada indica la presencia de grupos esteroides. 1: Reacción sobre la Fracción clorofórmica G de *Euphorbia serpens*; 2: Reacción sobre la Fracción clorofórmica G de *Euphorbia schickendantzii*; 3: Reacción sobre la Fracción clorofórmica G de *Euphorbia collina*.

Figura 5.18: Ensayo directo de Saponinas, poder afrógeno.



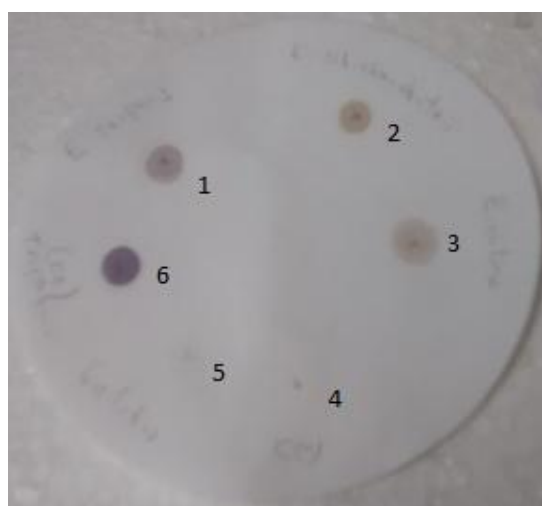
Ref: Ensayo realizado en 1: *Euphorbia serpens*; 2: *Euphorbia schickendantzii*; 3: *Euphorbia collina*; 4: *Solidago chilensis*; 5: *Aesculus hippocastanum*.

Figura 5.19: Investigación directa de saponinas, poder emulsificante.



Ref: Ensayo realizado sobre 1: *Euphorbia serpens*; 2: *Euphorbia schickendantzii*, 3: *Euphorbia collina*; 4: *Solidago chilensis* y 5: *Aesculus hippocastanum*.

Figura 5.20: Ensayo directo de proteínas-aminogrupos.



Ref: La coloración violeta indica la presencia de proteínas o aminogrupos. 1: reacción sobre *Euphorbia serpens*; 2: reacción sobre *Euphorbia schickendantzii*; 3: reacción sobre *Euphorbia collina*; 4: reacción sobre el control negativo; 5 reacción sobre gelatina y 6: reacción sobre triptófano.

Tabla 5.2: Fracciones agrupadas según perfiles cromatográficos, provenientes de la columna madre realizada sobre los extractos hexano y acetato de etilo de *Euphorbia collina*.

Fracciones	Peso en mg	Observaciones
4-5	76	
6-8	60	Manchas con Rf similar al lupeol.
9	47	Mancha con Rf similar al lupeol.
10-11	74	Manchas con Rf similar al lupeol. Enviada a IR
12-17	60	

18-23	28	Manchas a la altura del colesterol.
24-29	16	
30-36	21,5	Manchas debajo del Colesterol. Se formaron cristales.
37-46	20,1	
47-52	47,7	
53-58	35,6	

Tabla 5.3: Fracciones agrupadas según perfiles cromatográficos, provenientes de la columna madre realizada sobre los extractos hexano y acetato de etilo de *Euphorbia schickendantzii*.

Fracciones	Peso en mg	Observaciones
2-3	48,6	
4-5	117,9	
6-8	132	Manchas con Rf similar al Lupeol.
9-14	53,6	
15-20	38,1	Manchas a la altura del colesterol.
21-39	40,2	
40-47	27,5	
48-55	42,5	

Elucidación de moléculas bioactivas provenientes del extracto hexánico y de acetato de etilo de *Euphorbia collina*

El análisis de GC-MS mostró que la fracción G10-11 era una mezcla de 51 % de cicloartenol (CA) y un 49 % de 24-metilenocicloartanol (24MCA), (**Figura 5.21 y Tabla 5.4**). Estos compuestos fueron recuperados por HPLC en las fracciones F1 y F2. El análisis GC-MS de F1 y F2 indicó que estaban constituidas por un 98 % de cicloartenol y un 97 % de 24-metilenocicloartanol respectivamente (**Figura 5.22, Figura 5.23 y Figura 5.25**).

El espectro IR (**Figura 5.24**) muestra la presencia de grupos –OH (alcohol), enlaces olefínicos (C=C) con hidrógenos vinílicos y grupo carbonilo de cetona saturada, esta última posiblemente como producto minoritario. Las estructuras son coincidentes con triterpenos tipo cycloeucalenol y análogos.

Figura 5.21: Cromatograma de GC-MS de fracciones G10-11.

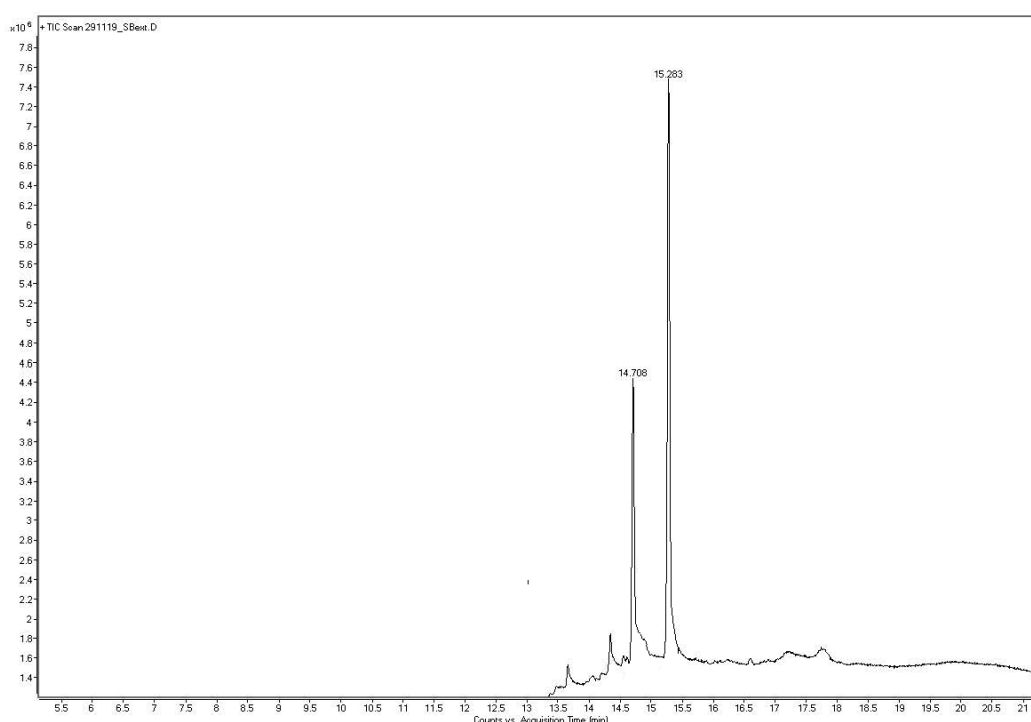


Tabla 5.4: Análisis de la agrupación de la fracción G10-11 mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

Índice aritmético	Coincidencia	[M ⁺] m/z (%)	Principales iones de fragmentación, m/z (%)	Compuesto
2816	96%	426 (11)	55 (45), 69 (100), 81 (42), 95 (60), 107 (44), 109 (45), 121 (37), 135 (34), 147 (32), 161 (25), 173 (29), 187 (14), 203 (15), 217 (6), 231 (9), 243 (6), 259 (4), 271 (14), 286 (25), 297 (5), 315 (5), 339 (11), 365 (14), 393 (27), 408 (19), 426 (7)	Cicloartenol
3108	93%	440 (10)	55 (92), 69 (100), 81 (66), 95 (96), 107 (79), 121 (63), 135 (54), 161 (39), 175 (51), 203 (42), 216 (21), 229 (9), 245 (8), 285 (9), 300 (31), 353 (8), 379 (24), 407 (43), 422 (28), 440 (10), 339 (3), 397 (2)	24-metilen cicloartanol

Figura 5.22: Espectro de masas de impacto electrónico de la señal a 14,708 min (arriba), y la comparación con el espectro de librería de mayor similitud (abajo). Identificado como cicloartenol.

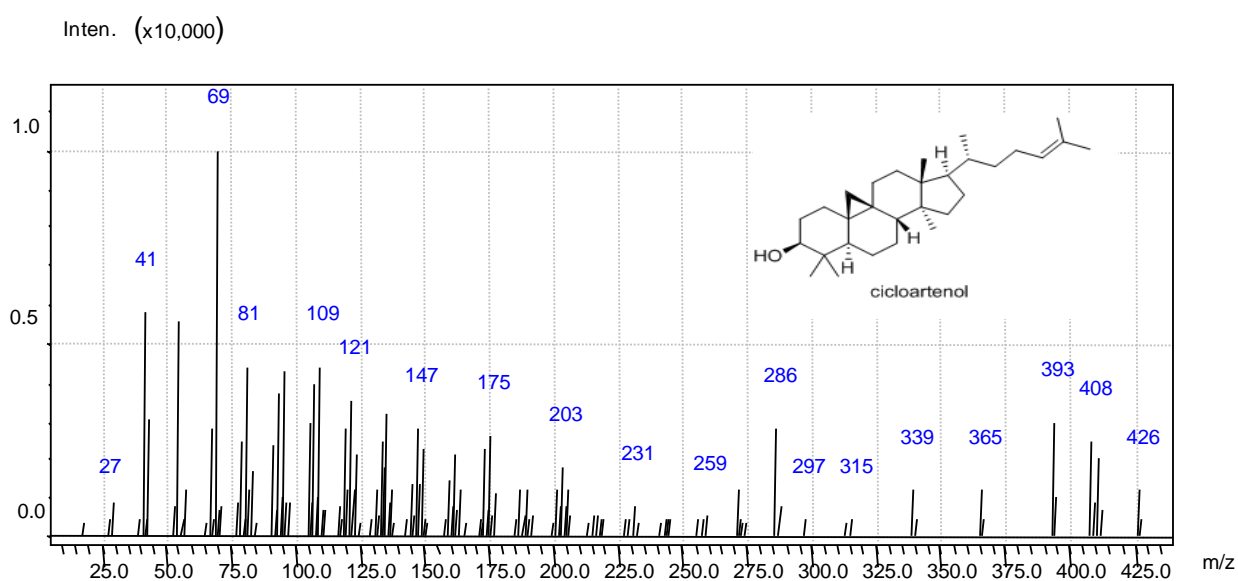
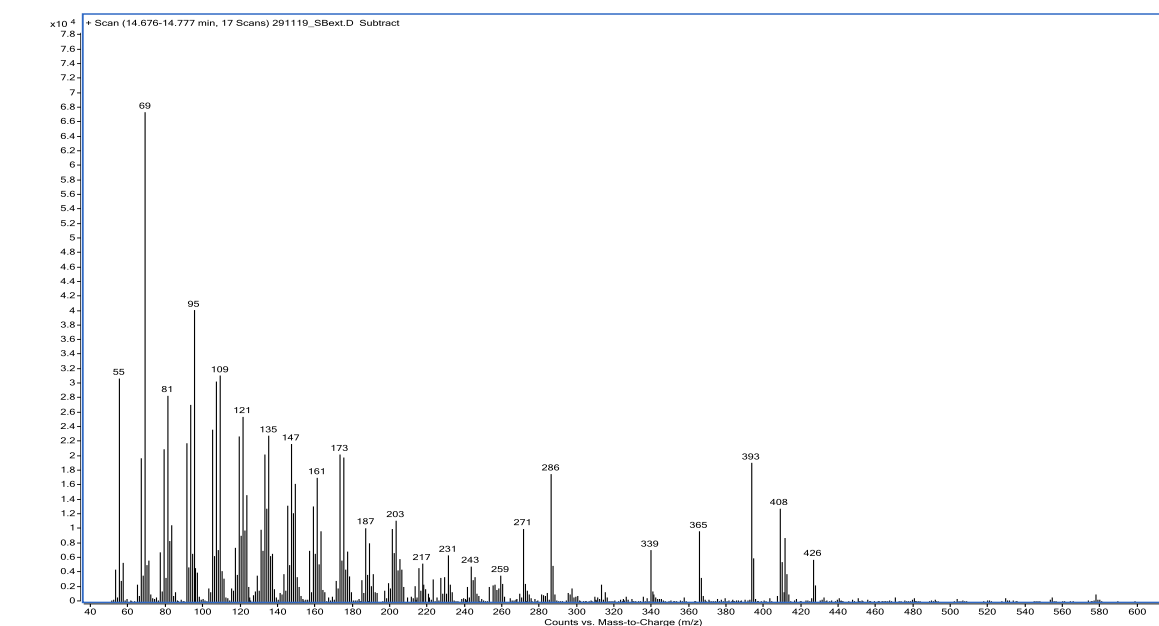


Figura 5.23: Espectro de masas de impacto electrónico de la señal a 15,283 min (arriba), y la comparación con el espectro de librería de mayor similitud (abajo). Identificado como 24-metilencicloartanol.

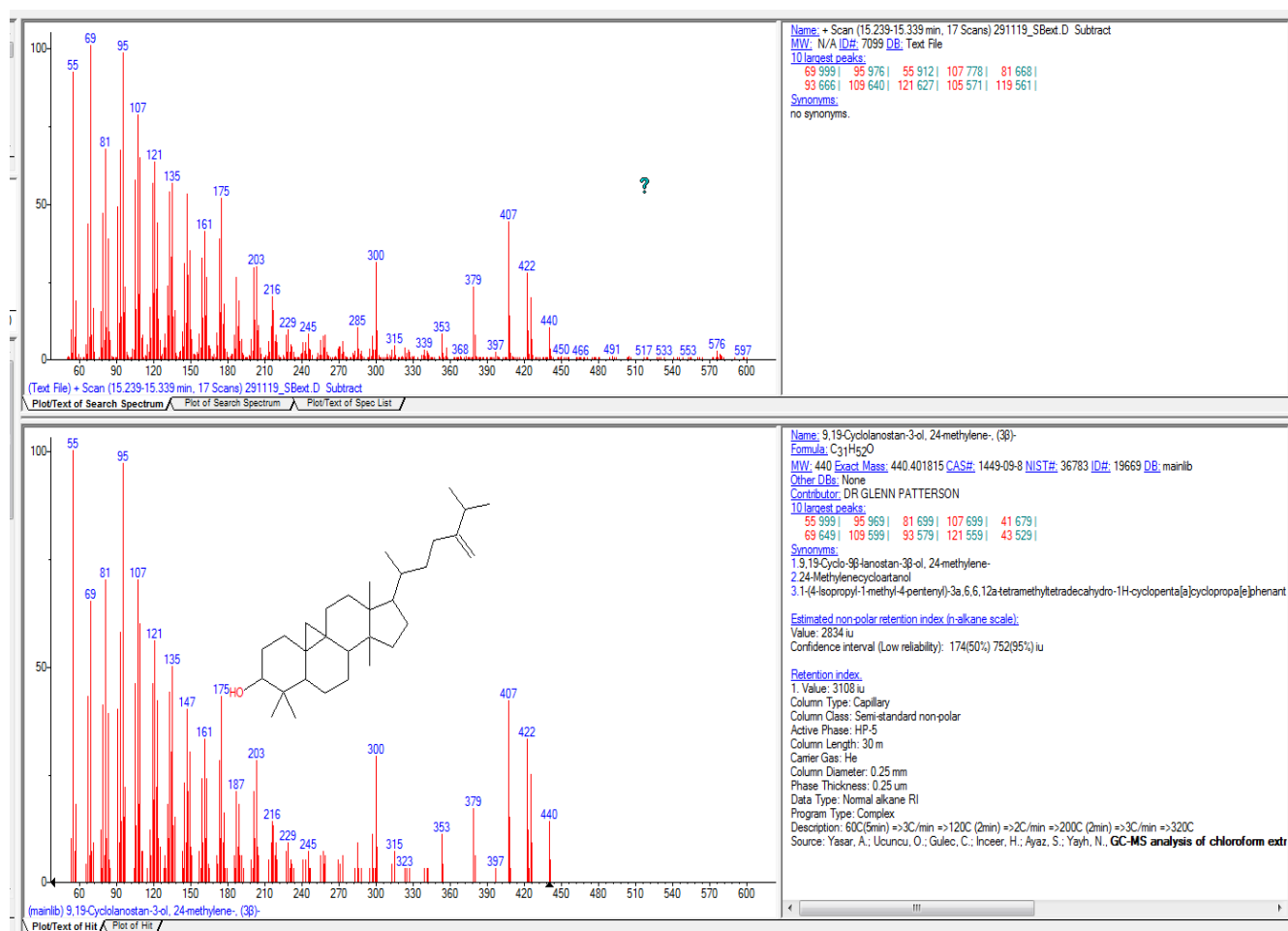


Figura 5.24: Espectro IR de fracciones G10-11 de *Euphorbia collina*.

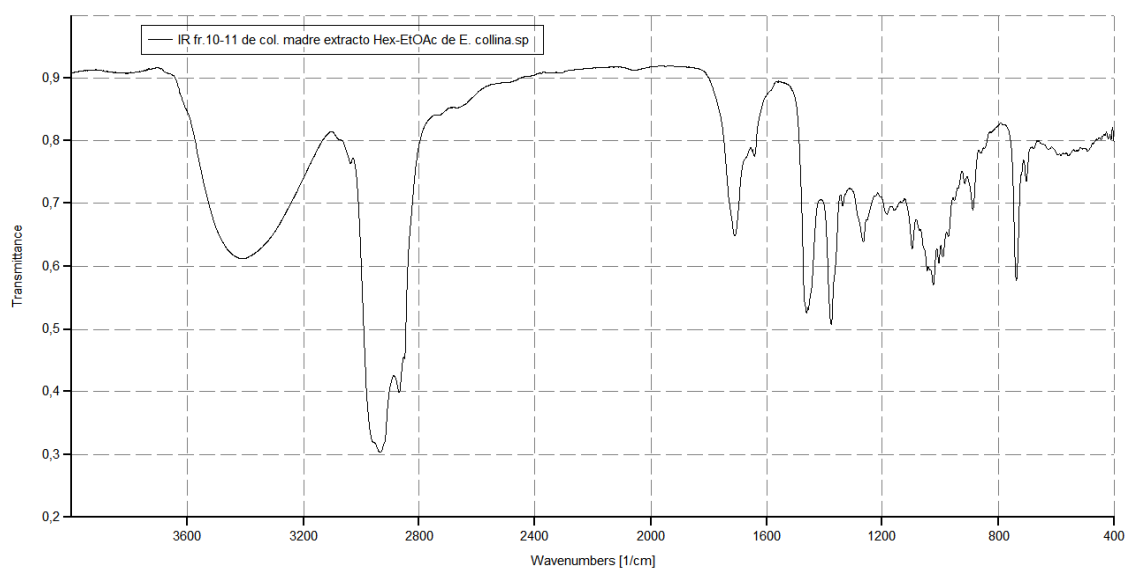
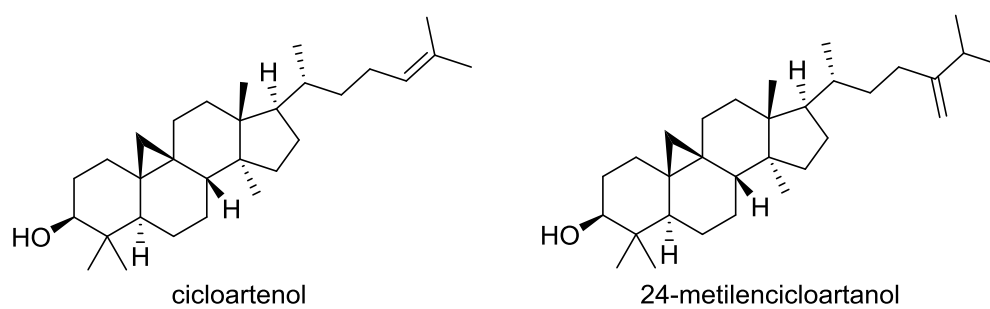


Figura 5.25: Estructuras de los triterpenos identificados en *Euphorbia collina*.



DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó la presencia de metabolitos secundarios tales como: compuestos esteroidales, triterpenos, flavonoides, taninos, fenoles y saponinas, en partes aéreas de las tres especies vegetales estudiadas. Además, se hallaron lípidos, proteínas e hidratos de carbono.

En concordancia con nuestro trabajo, se ha reportado la presencia en *E. serpens* de: flavonoides (cianidinas); terpenos (diterpenos y derivados del lupeol) (Alonso y Desmarchelier 2006; Bittner *et al.* 2001); taninos; fenoles y saponinas (Alonso y Desmarchelier 2006). En esta tesis se estudió *E. serpens* var. *serpens*, que a diferencia de los estudios realizados por Gratti, Ricco y Gurni (2007), en la variedad *microphylla*, sí se hallaron taninos.

Muy poco se conoce sobre la composición química de *E. schickendantzii*. Otros autores también han encontrado, flavonoides (quercetina y antocianos basados en cianidinas), fenoles y taninos (Gratti, Ricco y Gurni 2007).

En concordancia con este trabajo, para *E. collina* var. *collina*, Gratti, Ricco y Gurni (2007), describen la presencia de flavonoides (del tipo quercetina y antocianos basados en cianidinas), fenoles y taninos. Bittner *et al.* (2001) y Morgenstern *et al.* (1996), describen para *E. portulacoides* (sinónimo de *E. collina*, ver introducción general), fenoles (tipo floroacetofenonas) y diterpenos (kauranos, abietanos, latiranos e ingenanos). El mismo grupo de trabajo, en un estudio realizado por Aqueveque *et al.* (1999), informan flavonoides (quercetina y derivados; y derivados del canferol) y flavonas (derivados de luteolina).

Por último, en un screening para la identificación de alcaloides, se observó la ausencia de los mismos, tanto en *E. collina* como en *E. portulacoides* (Niemeyer 2014). Aunque en estos trabajos no se especifica la variedad ni subespecie, los

metabolitos encontrados coinciden con los hallados en esta tesis para *E. collina* var. *collina*.

En el Capítulo 2 se informa el efecto antiparasitario de los extractos metanólicos de las tres especies estudiadas, y hexánico de *E. schickendatzii*. Otras familias vegetales con metabolitos secundarios similares mostraron actividad antiparasitaria. Los extractos acuosos e hidroalcohólicos de plantas como *Laucas martinicensis* y *Albizia gummifera*, las cuales presentan polifenoles, taninos, triterpenos y saponinas en sus partes aéreas han tenido actividad antihelmíntica, ya sea como larvicidas u ovicida (Eguale *et al.* 2011). Otras especies como *Phytolacca icosandra* conteniendo flavonoides, esteroides, terpenos y saponinas, presentaron gran actividad antihelmíntica contra *H. contortus* (Hernández Villegas *et al.* 2012).

En el Capítulo 3 se observó que los extractos hexánicos y de acetato de etilo de las tres plantas en estudio, mostraron citotoxicidad, esto podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios de baja polaridad tales como triterpenos y compuestos esteroidales hallados en las especies estudiadas. Otros estudios han demostrado el poder citotóxico de esteroides y triterpenos pertenecientes a *Euphorbias*. En el trabajo de Zhang *et al.* (2013), esteroides aislados, tres de tipo colestano y tres de tipo ergostano, de partes aéreas de *E. altotibetic* tuvieron efecto contra dos líneas celulares cancerosas. Wei *et al.* (2021), aislaron 6 triterpenos de la raíz de *E. fischeriana* con moderada actividad citotóxica, entre ellos, un triterpeno ya identificado; dos nuevos cicloartanos; un nuevo lanostano; un nuevo tirucalleno; un nuevo damareno. Y cinco triterpenos de tipo cicloartano obtenidos de partes aéreas de *E. dendroide*, tuvieron de alta a moderada actividad contra diferentes líneas celulares cancerosas (Hassan *et al.* 2020).

En el Capítulo 4 se informó el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de *E. collina* y *E. schickendantzii*, y extracto de acetato de etilo de *E. collina*. De los compuestos polares hallados en la marcha fitoquímica preliminar tienen reconocida acción antimicrobiana los fenoles sencillos, flavonoides y taninos, que podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana hallada en los extractos metanólicos (Cowan 1999). Los taninos tienen una reconocida acción antiséptica por su acción bactericida, bacteriostática y antifúngica (Kuklinski 2000). En cuanto a los compuestos no polares presentes, los terpenoides alteran la estructura de la membrana celular, lo que lleva a la lisis y muerte celular (Cowan 1999). Los triterpenoides pentacíclicos aislados de la fracción G10-11, la cual mostró la actividad antifúngica más potente, son intermediarios en la biosíntesis vegetal de fitoesteroles y fueron reportadas en altos contenidos en la parte aérea de varias especies de *Euphorbia* (De Pascual *et al.* 1987; Zare *et al.* 2015). En cuanto a su mecanismo de acción, CA y 24MCA podrían actuar como otros triterpenos pentacíclicos, interactuando con los constituyentes de la membrana plasmática, aumentando su permeabilidad y favoreciendo la entrada de sustancias extracelulares y la fuga de solutos celulares (Haraguchi *et al.* 1999).

CONCLUSIONES

- Se identificaron taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, compuestos esteroidales, saponinas, carbohidratos, lípidos y proteínas en los extractos etanólicos de *E. serpens*, *E. schickendantzii* y *E. collina*.
- De la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina* resultaron 58 fracciones en total, que se agruparon en según similitud de perfiles cromatográficos.
- Las fracciones 6 a 11 provenientes de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina*, presentaron manchas con Rf y color de revelado similar al lupeol lo que sugiere la presencia de triterpenos.
- Las fracciones 18 a 23 provenientes de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina*, presentaron manchas con Rf y color de revelado similar al colesterol indicando la presencia de fitosteroles.
- Las fracciones 30 a 36 provenientes de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina*, presentaron manchas con Rf por debajo del colesterol y formaron cristales.
- De la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. schickendantzii* resultaron 55 fracciones en total, que se agruparon en según similitud de perfiles cromatográficos.
- Las fracciones 6 a 11 provenientes de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. schickendantzii*, presentaron manchas con Rf y revelado similar al lupeol indicando que son triterpenos.

-
- Las fracciones 15 a 20 provenientes de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. schickendantzii*, presentaron manchas con Rf y revelado similar al colesterol indicando la presencia de fitosteroles.
 - En la fracción 10-11 proveniente de la cromatografía en columna de extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina* se identificaron dos compuestos mayoritarios: cicloartenol y 24-metilenocicloartanol.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, J. R.; DESMARCHELIER, C.; GOLBERG, H. Proyecto de atención primaria de la salud a base de fitomedicamentos en las provincias argentinas de Misiones, Santa Fe y Buenos Aires "Cultivando la Salud". *Revista de fitoterapia*, 2006, vol. 6, no 1, p. 76-76.
- AQUEVEQUE, P., *et al.* Quimiotaxonomía de las especies chilenas del género *Euphorbia* L. basadas en los patrones de flavonoides. *Boletín Sociedad Chilena de Química*, 1999, vol. 44, p. 61-65.
- ARISTIMUÑO FICOSECO, M. E., *et al.* Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in *Anacardiaceae* species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Fusarium* species. *Journal of applied microbiology*, 2014, vol. 116, no 5, p. 1262-1273.
- AVALOS GARCÍA, A.; PÉREZ-URRIA CARRIL, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2009, vol. 2, no 3, p. 119-145.
- BARBOZA, G. E., *et al.* Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 2009, vol. 34, no 1-2, p. 7-365.
- BITTNER, M., *et al.* Estudio químico de especies de la familia *Euphorbiaceae* en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 2001, vol. 46, no 4, p. 419-431.
- BRUSOTTI, G., *et al.* Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, vol. 87, p. 218-228.

- CATENI, F.; FALSONE, G.; ZILIC, J. Terpenoids and glycolipids from *Euphorbiaceae*. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2003, vol. 3, no 5, p. 425-437.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999, vol. 12, no 4, p. 564-582.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 2012, vol. 23, no 2, p. 174-181.
- DE, Pascual, T., *et al.* Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*, 1987, vol. 26, no 6, p. 1767-1776.
- EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, vol. 137, no 1, p. 108-113.
- GRATTI, A.; RICCO, R.; GURNI, A. Estudio fitoquímico preliminar en especies patagónicas del género *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2007, vol. 6, no 5, p. 248-249.
- HARAGUCHI, H., *et al.* Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 1999, vol. 13, no 2, p. 151-156.
- HASSAN, A. R., *et al.* A new cycloartane triterpene and other phytoconstituents from the aerial parts of *Euphorbia dendroides*. *Natural Product Research*, 2020, p. 1-9.

- HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M., *et al.* *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology*, 2012, vol. 189, no 2-4, p. 284-290.
- JURY, S. L. *The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and Economic Botany. Proceedings of a Joint Symposium Organized by the Linnean Society of London and the Phytochemical Society of Europe in Celebration of the Linnean Society Bicentenary.* Academic Press, 1987.
- KUKLINSKI, C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *OMEGA*, 2000, p. 116.
- LOCK DE UGAZ O. Cap. 4: Análisis fotoquímico y metabolitos secundarios. En: *Manual de Fitoterapia*, 2001, vol. 11. p. 41-43.
- MALI, P. Y.; PANCHAL, S. S. A review on phyto-pharmacological potentials of *Euphorbia thymifolia* L. *Ancient science of life*, 2013, vol. 32, no 3, p. 165.
- MASOHAN, A.; BHATIA, V. K.; TONDON, M. HPLC in the analysis of steroidal compound mixtures as applied to biocrudes. *Journal of chromatographic science*, 1996, vol. 34, no 12, p. 550-555.
- MORGENSTERN, T., *et al.* Diterpenes and phloracetophenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochemistry*, 1996, vol. 41, no 4, p. 1149-1153.
- NIEMEYER, H. M. Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 2014, vol. 13, no 1, p. 109-116.

- PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 2011, vol. 11, no 4, p. 195-211.
- RAHMAN, A. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2016, vol. 51, p. 1-535.
- SEPÚLVEDA JIMÉNEZ, G.; DUCOING, H. P.; SOSA, M. R. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 2003, vol. 21, no 3, p. 355-363.
- SHI, Q.; SU, X.; KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical reviews*, 2008, vol. 108, no 10, p. 4295-4327.
- SINGH, B.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no 19, p. 5579-5597.
- SUTTHIVAIYAKIT, S.; THAPSUT, M.; PRACHAYASITTIKUL, V. Constituents and bioactivity of the tubers of *Euphorbia sessiliflora*. *Phytochemistry*, 2000, vol. 53, no 8, p. 947-950.
- VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). *Chemical reviews*, 2014, vol. 114, no 17, p. 8579-8612.
- WEI, J., *et al.* Euphorfistrines AG, cytotoxic and AChE inhibiting triterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. *Bioorganic Chemistry*, 2021, vol. 116, p. 105395.
- WRIGHT, L. Biosynthesis of isoprenoid compounds. *Annual Review of Biochemistry*, 1961, vol. 30, no 1, p. 525-548.

-ZARE, S., *et al.* Phytochemical Investigation on *Euphorbia macrostegia* (Persian wood spurge). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2015, vol. 14, no 1, p. 243.

-ZHANG, B., *et al.* Cytotoxic cholestane-type and ergostane-type steroids from the aerial parts of *Euphorbia altotibetic*. *Steroids*, 2013, vol. 78, no 1, p. 38-43.

CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis se estudiaron efectos farmacológicos atribuidos por la medicina tradicional a *Euphorbia serpens*, *Euphorbia schickendantzii* y *Euphorbia collina*, recolectadas en la Provincia de La Pampa. Los resultados de los ensayos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- No se pudo demostrar la presencia de efecto diurético en ratones tratados con extractos acuosos, hidroalcohólicos, hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de *Euphorbia serpens*, especie utilizada como diurética por la medicina tradicional. También se investigó la presencia de este efecto en extractos acuosos e hidroalcohólicos de *E. schickendantzii* y *E. collina* con resultado negativo. Se concluye que ninguna de estas especies produce efecto diurético en ratones.
- Los extractos metanólico e hidroalcohólico de *E. collina* inhibieron la motilidad de larvas III de *Ancylostoma caninum*, y la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* respectivamente. Estos resultados son consistentes con el efecto antiparasitario atribuido por la medicina tradicional y con la presencia de triterpenos, taninos, fenoles, flavonoides y saponinas identificadas en estudios fitoquímicos.
- Utilizando larvas nauplio de *Artemia salina* como modelo biológico se determinó que las tres especies estudiadas mostraron efecto citotóxico. El mayor efecto lo evidenció el extracto hexánico de *E. collina*. La citotoxicidad podría relacionarse con el uso tradicional de estas plantas como antiverrucoso y cáustico.
- Se aislaron dos compuestos terpénicos; cicloartenol y 24-metilenocicloartanol de los extractos hexánico y de acetato de etilo de *E. collina* que poseen actividad

antifúngica. Ensayos *in vitro* determinaron que estos extractos inhiben el crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

- Los extractos hidroalcolicos de *E. schickendantzii* y de acetato de etilo de *E. serpens* que se utilizaron en los ensayos para evaluar el efecto diurético, resultaron tóxicos en las dosis empleadas, causando la muerte en los ratones tratados.

- *E. collina* fue la especie que mostró la mayor actividad biológica en los ensayos realizados para determinar el efecto antiparasitario, antimicrobiano y citotóxico sin evidenciar toxicidad en ratones.