



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO, Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL LÁTEX DE
Euphorbia laurifolia EN PATÓGENOS DÉRMICOS”**

TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS

TUTOR:

BQF. Diego Vinueza T., M.Sc.

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

DEDICATORIA

A Dios y a mi padre, que desde algún lugar me dan la fortaleza y la sabiduría que he necesitado durante toda la trayectoria que he venido recorriendo.

A mis dos pilares fundamentales, mi madre y mi hermano, quienes me han apoyado moral, física y económicamente; son mi motor para seguir adelante.

A cada persona especial que ha llegado y ha creído en mí, gracias por su amistad, apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a mi padre, porque sé que nunca me abandonan.

A mi madre y a mi hermano, por ser mi apoyo incondicional en cualquier situación.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a sus docentes.

A mi tutor el BQF. Diego Vinueza Tapia, por toda su generosidad y paciencia, gracias por compartir sus conocimientos.

A la Lcda. Karen Acosta y al BQF. Víctor Guangasig, por su tiempo y apoyo brindado para la elaboración de este proyecto.

A todas las personas que de una u otra manera han colaborado para culminar mi carrera y mi tesis.

Yo, AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO FITOQUÍMICO, Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL LÁTEX DE *Euphorbia laurifolia* EN PATÓGENOS DÉRMICOS”**, de responsabilidad de la señorita egresada AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Veloz
**DECANA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS**

Dra. Ana Albuja L.
**DIRECTORA DE LA ESCUELA
DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

BQF. Diego Vinueza T., M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

BQF. Fausto Contero
MIEMBRO DE TRIBUNAL

**COORDINADOR
SISBIB - ESPOCH**

NOTA DE TESIS ESCRITA -----

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE DE ANEXOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO	1
1.1	<i>Euphorbiaceae</i>	1
1.1.1	Generalidades sobre la química y actividad biológica de <i>Euphorbiaceae</i> 2	
1.2	<i>Euphorbia</i>	4
1.3	<i>Euphorbia laurifolia</i>	5
1.4	Terpenos	7
2.	PARTE EXPERIMENTAL	11
2.1	Lugar de investigación	11
2.2	Materiales y reactivos	11
2.2.1	<i>Material vegetal</i>	11
2.2.2	<i>Recolección de la muestra</i>	11
2.2.3	<i>Materiales de laboratorio</i>	12
2.2.4	<i>Reactivos</i>	13
2.2.5	<i>Equipos</i>	13
2.3	Técnicas y métodos	14
2.3.1	Separación en fracciones del látex de <i>Euphorbia laurifolia</i>	14

2.3.2	Identificación de la fracción terpénica del látex de <i>Euphorbia laurifolia</i> mediante cromatografía de capa fina (TLC).....	15
2.3.3	Determinación de LC50 del latex de <i>Euphorbia laurifolia</i> en <i>Artemia salina</i>	15
2.3.4	Actividad Antimicrobiana	16
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1	Separación e Identificación de la fracción terpénica del látex de <i>E. laurifolia</i> mediante cromatografía de capa fina (TLC).....	20
3.2	Citotoxicidad en <i>A. salina</i>	25
3.3	Actividad antimicrobiana	27
4.	CONCLUSIONES.....	30
5.	RECOMENDACIONES.....	31
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	32
7.	ANEXOS	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

mL	Mililitros
μL	Microlitros
g	Gramos
°C	Grados Celsius
ppm	Partes por millón
C	Átomos de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
TLC	Cromatografía en Capa Fina
ATCC	American Type Culture Collection
mg/mL	Miligramo por mililitro
μg/mL	Microgramos por mililitros
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
TSA	Agar Soya Tréptica

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO Nº 1.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Euphorbia laurifolia</i>	5
CUADRO Nº 2.	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y ETÉREO DEL LÁTEX DE <i>Euphorbia laurifolia</i>	23
CUADRO Nº 3.	NÚMERO DE MUERTES DE LOS NAUPLIOS DE <i>A. salina</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES	25
CUADRO Nº 4.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>E. laurifolia</i> MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	27
CUADRO Nº 5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>E. laurifolia</i> MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	27
CUADRO Nº 6.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>E. laurifolia</i> MEDIANTE EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1.	DISTRIBUCIÓN DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE EN EL MUNDO	1
FIGURA N° 2.	<i>Euphorbia laurifolia</i> , UBICADA EN LA PARROQUIA DE CUBIJÍES EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO	6
FIGURA N° 3.	ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ISOPRENO	8
FIGURA N° 4.	CLASIFICACIÓN DE LOS TERPENOS	9
FIGURA N° 5.	ESQUEMA PARA LA SEPARACIÓN EN FRACCIONES DEL LÁTEX DE <i>Euphorbia Laurifolia</i>	14
FIGURA N° 6.	ESTRIADO DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS CAJA PETRI	18
FIGURA N° 7.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y DEL EXTRACTO MEOH:H ₂ O OBTENIDOS A PARTIR DEL FILTRADO METANÓLICO	20
FIGURA N° 8.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ETÉREO	20
FIGURA N° 9.	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y ACETÓNICO OBTENIDOS A PARTIR DEL SÓLIDO	21
FIGURA N° 10	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO	24
FIGURA N° 11	PORCENTAJE DE MORTALIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>E. laurifolia</i> EN <i>A. salina</i>	26

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFIA N° 1	<i>Euphorbia laurifolia</i>	34
FOTOGRAFIA N° 2	FRASCO HERMÉTICO CON LÁTEX EN METANOL	34
FOTOGRAFIA N° 3	CROMATOGRAFÍAS VISTAS EN LA CÁMARA UV DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i>	35
FOTOGRAFIA N° 4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO A PARTIR DEL FILTRADO METANÓLICO DEL LÁTEX	35
FOTOGRAFIA N° 5	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO A PARTIR DEL FILTRADO METANÓLICO DEL LÁTEX	36
FOTOGRAFIA N° 6	CONDICIONES PARA LA ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DE <i>A. salina</i>	36
FOTOGRAFIA N° 7	<i>A. salina</i> DESPUÉS DE LA ECLOSIÓN	36
FOTOGRAFIA N° 8	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. Laurifolia</i> SOBRE <i>E.</i> <i>coli</i> SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	37
FOTOGRAFIA N° 9	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>S.</i> <i>aureus</i> SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	37
FOTOGRAFIA N° 10	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	38
FOTOGRAFIA N° 11	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>C.</i> <i>albicans</i> SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	38
FOTOGRAFIA N° 12	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>E. coli</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	39
FOTOGRAFIA N° 13	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>S.</i> <i>aureus</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	39
FOTOGRAFIA N° 14	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	40
FOTOGRAFIA N° 15	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO	

	HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>C. albicans</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	40
FOTOGRAFIA N° 16	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	41
FOTOGRAFIA N° 17	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>E.coli</i> SEGÚN EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003	41

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	RECOLECCIÓN DE <i>Euphorbia laurifolia</i>	34
ANEXO N° 2	ADECUADA RECOLECCIÓN DEL LÁTEX DE <i>Euphorbia laurifolia</i>	34
ANEXO N° 3	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA MEJOR FRACCIÓN EXTRAÍDA DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i>	35
ANEXO N° 4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL <i>E. laurifolia</i>	36
ANEXO N° 5	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE <i>E. laurifolia</i>	36
ANEXO N° 6	ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DE <i>E. salina</i>	37
ANEXO N° 7	<i>Artemia salina</i>	36
ANEXO N° 8	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SOBRE <i>E. coli</i> SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	37
ANEXO N° 9	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER	39
ANEXO N° 10	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE <i>E. laurifolia</i> SEGÚN EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003	41

RESUMEN

Se realizó los estudios fitoquímico, antimicrobiano y de actividad citotóxica *in vitro* del látex de *Euphorbia laurifolia* sobre patógenos dérmicos en los Laboratorios de Productos Naturales y de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para determinar metabolitos con posibles aplicaciones futuras en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Se recolectó una muestra de la especie vegetal *E. laurifolia* en la parroquia de Cubijíes, ubicada en la provincia de Chimborazo. Para ello, se realizó el muestreo y la preparación del vegetal de forma adecuada con el fin de garantizar la calidad del análisis. Posteriormente, se realizó el estudio fitoquímico del látex de *E. laurifolia* mediante Cromatografía en Capa Fina, la evaluación de la actividad citotóxica en el modelo de *Artemia salina* de la fracción terpénica soluble mediante el empleo de dimetilsulfóxido y la comprobación de la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre patógenos dérmicos mediante diversos métodos.

Como resultados, se estableció fitoquímicamente la presencia de gran cantidad de compuestos terpénicos. Dentro de la citotoxicidad se determinó que la concentración letal media (LC50) de la fracción terpénica soluble mediante el empleo de dimetilsulfóxido fue de 214,50 ppm en *A. salina*. Por tanto, se puede realizar aplicaciones a nivel farmacológico. Además, se comprobó mediante diferentes métodos que el extracto hexánico del látex de *E. laurifolia* carece de actividad antimicrobiana al utilizarse sobre patógenos dérmicos a la concentración máxima de prueba de 5 mg/mL. Por lo que no es recomendable su aplicación en enfermedades infecciosas.

Se concluye que los terpenos identificados en el extracto hexánico del látex de *E. laurifolia* presentan actividad citotóxica sobre *A. salina*, pero carecen de actividad antimicrobiana *in vitro*. Por lo que se recomienda profundizar los estudios del látex de *E. laurifolia* para evidenciar otros posibles efectos sobre los organismos vivos.

SUMMARY

In the Laboratories of Natural Products and Microbiology (Faculty of Sciences, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo), the phytochemical, antimicrobial and cytotoxic activities *in vitro* of the latex from *Euphorbia laurifolia* on dermal pathogens were performed, to determine metabolites with potential future applications in the treatment of infectious diseases.

A sample of the latex from *E. laurifolia* was recollected in Cubijíes, located in the province of Chimborazo. Prior to use, sampling and preparation of the plant material was done appropriately in order to guarantee the quality of the analysis. Subsequently, the phytochemical study of this latex by thin layer chromatography was carried out and the evaluation of the cytotoxic activity in *Artemiasalina* with the terpene soluble fraction by using dimethyl sulfoxide was done. Finally, the testing for antimicrobial activity *in vitro* on dermal pathogens was realized by various methods.

As results of these analyzes, the presence of large amount of terpene compounds was determined qualitatively. The median lethal concentration (LC50) of the terpene soluble fraction by using dimethylsulfoxide was 214.50 ppm in *A. salina*, Therefore, it could have pharmaceutical applications. In addition, it was found that hexane extract of *E. laurifolia* latex lacks antimicrobial activity on dermal pathogens at maximum test concentration of 5 mg/mL. So, its use in infectious diseases is not recommended.

We conclude that the terpenes identified in the hexane extract of *E. laurifolia* latex have cytotoxic activity against *A. salina*, but lack antimicrobial activity *in vitro*. We recommend performing further studies about *E. laurifolia* latex to show other possible effects on living organisms.

INTRODUCCIÓN

Diversas plantas han desempeñado un papel dominante en el mantenimiento de la salud humana. Estas propiedades se explican por la presencia de sustancias activas capaces de combatir enfermedades que ponen en riesgo a la salud de la sociedad actual. Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de fármacos cuya finalidad siempre ha sido controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y disminuir los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos de síntesis química. (Vásquez, 2007)

Euphorbiaceae corresponde a la familia vegetal más extensa de las angiospermas, que contiene gran cantidad de géneros y especies. Está distribuida en todo el mundo, en especial en los trópicos, por tanto; desde la antigüedad ha sido utilizada para obtener beneficios con respecto a la salud de nuestros ancestros.

Euphorbia es un género de plantas perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, se presenta de diferentes formas, como árboles grandes y variables, o como simples arbustos pequeños. Esta variabilidad llama la atención a muchos científicos, por lo que realizan estudios en busca de la composición química para encontrar metabolitos químicamente activos. (Jijón, S.A)

Euphorbia laurifolia es una especie que habita en las regiones andinas de Ecuador y se presenta como arbustos o árboles que contienen un látex lechoso. Tiene hojas glabras, estípulas ausentes y numerosas flores masculinas rodeando una flor femenina central pedicelada. (Jijón, S.A)

En Ecuador, la madera de *E. laurifolia* se utiliza para la construcción de viviendas, los tallos sirven como postes en los linderos de cultivos en los campos, y debido a su crecimiento rápido, da lugar a la formación de grandes cercas. El látex es muy utilizado como pegamento, para el tratamiento de afecciones del hígado en forma de emplastos, formación de abscesos y verrugas en la piel. (Ulloa & Moller, S.A)

Según estudios fitoquímicos del látex de algunas especies del género *Euphorbia*, los compuestos biológicamente activos presentes en estas plantas podrían ser los terpenos, ya que son los compuestos mayoritarios.

Los terpenos son metabolitos secundarios derivados del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), que se sintetizan a partir de las plantas y algunos animales. Se clasifican

de acuerdo al número de unidades de isopreno acoplados en: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. (Macías, Álvarez, & Suarez, 2010)

Los efectos de los terpenos para la salud son beneficiosos. Una variedad de terpenoides han demostrado tener actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antihiper glucémica, antiinflamatoria y antiparasitaria. Por otra parte, las altas concentraciones de terpenos pueden ser tóxicas y por lo tanto son un arma importante contra herbívoros y patógenos. (Paduch, Kandefer, Trytek & Fiedurek, 2007)

Mediante esta investigación se pretende explorar los beneficios farmacológicos de la especie *E. laurifolia*, y encontrar una fuente de nuevos agentes activos, a partir de una materia prima un tanto más económica y natural. Hecho que podría recaer en un impulso a nivel investigativo y socioeconómico.

Además, este proyecto constituye un valor añadido para la conservación y cultivo de plantas medicinales como parte de la cadena de valor del uso sustentable de los recursos de la biodiversidad, lo que hace que forme parte de los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir para el desarrollo del Ecuador.

Con los antecedentes presentados se plantean los siguientes objetivos en la investigación:

General

Realizar el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana *in vitro* del látex de *E. laurifolia* en patógenos dérmicos.

Específicos

1. Aislar la fracción terpénica del látex de *E. laurifolia*.
2. Evaluar la actividad citotóxica de la fracción terpénica del látex de *E. laurifolia* sobre *Artemia salina*.
3. Comprobar la actividad antimicrobiana de la fracción terpénica del látex de *E. laurifolia* sobre microorganismos patógenos dérmicos *in vitro*.

CAPÍTULO I

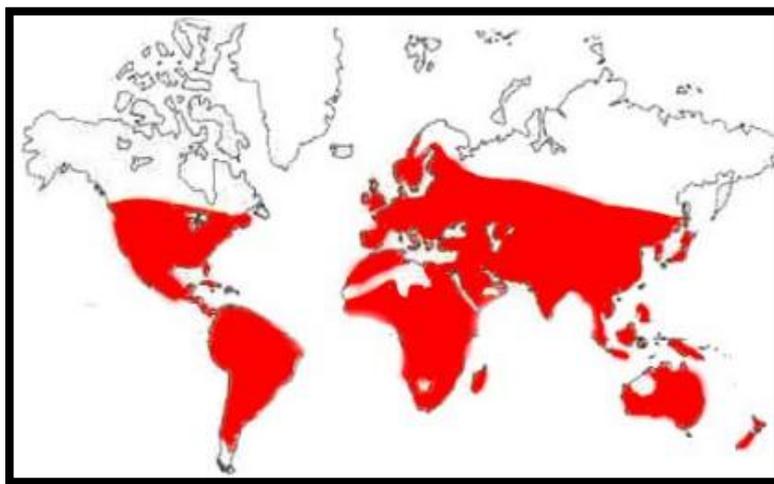
1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Euphorbiaceae*

La familia *Euphorbiaceae* ha sido identificada como una de las más numerosas, extensas y controvertidas de las Angiospermas, con más de 300 géneros y 5000 especies, se encuentran distribuidas la mayoría de ellas en América y África tropical. La morfología de la familia es enormemente variable y por lo tanto difícil de caracterizar, hecho que ha sugerido que las especies de ésta tengan un origen polifilético. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001).

Esta familia vegetal está presente en todo el mundo y es más diversa en los Trópicos. Existe una gran variedad genérica de *Euphorbiaceae* Neotropicales es en las tierras bajas de la selva Amazónica, por la existencia de varios géneros endémicos. Presentan una extensa cantidad de hábitats, está presente en los bosques lluviosos, en bosques estacionales y en desiertos. (Stevens, 2010)

FIGURA N°1. DISTRIBUCIÓN DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE EN EL MUNDO



FUENTE: Stevens, 2010

Desde la antigüedad se ha identificado efectos curativos a los géneros y especies pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, por ejemplo tradicionalmente *Euphorbia fischeriana* ha sido utilizada como droga anticancerígena en China. Asimismo otras plantas de esta familia se han usado en el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas desde el tiempo de Hipócrates. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001).

En América latina varias especies del género *Croton* han sido usadas como remedios locales para el tratamiento de numerosas enfermedades y dolores. Estas plantas son usadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos, ya que se usan como parte del acervo cultural de cada región. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001).

En Costa Rica la familia *Euphorbiaceae* se encuentra entre las 10 más importantes, debido a su gran abundancia en todo el territorio. Además es reconocida por una amplia gama de usos, que han sido marcados en tiempos pasados y en la actualidad. Los vegetales de esta familia son importantes en el área ornamental, alimenticio y medicinal. (Stevens, 2010)

La utilización de estos vegetales con fines curativos en cada región del mundo, exige un conocimiento profundo de los metabolitos que poseen. Esto ha sido motivo para que se realicen estudios; así poder conocer la composición química de estas plantas y evaluar si su uso tiene alguna base científica. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001)

1.1.1 Generalidades sobre la química y actividad biológica de *Euphorbiaceae*

La familia *Euphorbiaceae* posee látex que contiene caucho, aceites, taninos, resinas y sustancias gomosas. Sin embargo, en algunos casos el látex es venenoso e irritante. Dentro de estos vegetales se encuentra plantas como: el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), la yuca (*Manihot utilissima*), el ricino (*Ricinus communis*) y la patora, corona del Inca o rosa de Navidad (*Euphorbia pulcherrima*). Además se encuentran sustancias colorantes como en la kamala (*Mallotus philippensis*), gomas de especies de *Hevea*, *Manihot* y *Sapium*, fécula de *Manihot* o tapioca de *Manihot esculentus*. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001)

La savia y ciertas partes de la planta de muchas especies de euforbiáceas poseen sustancias irritantes y citotóxicas para la piel y las membranas mucosas. Como

ejemplo esta la fracción resinosa del aceite de *Croton*, utilizado como purgante y es obtenido a partir de las semillas de *Croton tiglium*. En su composición fitoquímica contiene ésteres forbólicos, altamente irritantes y formadores de tumores. (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001)

En el aceite de *Croton* se identificó al forbol como un alcohol polifuncional, y que es el precursor para la formación de tumores. El forbol es un polialcohol diterpénico originario de la estructura básica tetracíclica denominado tigliano. No es tóxico, cuando se encuentra en su forma libre. Sin embargo gran cantidad de sus poliésteres, presentan propiedades irritantes y son calificados como procarcinogénicos, específicamente los 12,13-disustituídos. Aunque varios de ellos, como el 12- tiglato-14-decanoato-forbol, muestra también actividad antileucémica. (Pacheco, Chiang, Marticorena & Silva, 1977)

En Perú se encuentra especies como *Croton lechleri*, *C. palanostigma* y *C. draconoides*, y de ellas se logró aislar taspina y unos tipos no comunes de diterpenos, los crotofolanos. Este compuesto presenta actividad citotóxica "*in vitro*" e "*in vivo*", además se ha identificado mediante estudios farmacológicos que muestra actividad cicatrizante y antiinflamatoria. (Pacheco, Chiang, Marticorena & Silva, 1977)

En las especies *Croton cajucara* y *Croton linearis*, se identificaron y aislaron diterpenos que poseen propiedades insecticidas. De *Croton cajucara* se aisló específicamente al *cis*-dehidro-crotonin. (Pacheco, Chiang, Marticorena & Silva, 1977)

La presencia de una gran cantidad de diterpenos biológicamente activos en el género *Euphorbia*, es lo que ha llamado la atención para realizar una gran cantidad de estudios. Según investigaciones de la distribución de estos diterpenos en aproximadamente 60 especies de este género demostró que un 90% de las especies analizadas contenían estos compuestos. (Evans & Kinghorn, 1977)

Se ha estudiado a unos 250 vegetales de estas especies, donde se han encontrado terpenoides, alcaloides, flavonoides, glicósidos cianogenéticos, cumarinas y taninos, entre otros (Rizk, 1987). Numerosas investigaciones han demostrado que la acción tóxica del látex puede deberse a una nueva clase de compuestos diterpénicos (tiglianos, ingenanos y dafnanos), que puede producir efectos irritantes, ser capaz de causar algunos tipos de cáncer y a su vez eliminar otros. (Pacheco, Chiang, Marticorena & Silva, 1977)

A partir de extractos polares de *Euphorbia micractina*, un vegetal que crece en China se aislaron cuatro nuevos diterpenos tricíclicos, aufactinas. Además dentro de las

especies brasileñas *E. milii* y *E. splendens* se aislaron ocho miliaminas, estas fueron estudiadas en ensayos de actividad molusquicidad. En algunas investigaciones previas de estas especies se habían identificado y aislado triterpenos, flavonoides, macrólidos que contienen actividad antileucémica. Asimismo se aisló ésteres derivados del forbol e ingenol. En Turquía crece *Euphorbia myrsinitis* y de ella se aislaron cuatro tetraésteres procedidos del myrisenol, adquiriendo dos de ellos actividad en el ensayo anti HIV-1 (inhibición de la transcriptasa reversa). (Bittner, Alarcón, Aqueveque, Hernández, Hoeneisen & Silva, 2001)

1.2 *Euphorbia*

Euphorbia es uno de los géneros más diversos perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*. Estas plantas son anuales o hierbas perennes, arbustos leñosos o árboles con un savia lechosa cáustica y venenosa (látex). (Bigoniya, 1, & Shekar Singh, 2010)

A los miembros de esta familia y género son conocidos como tabaibas. “Tabaibas son plantas grandes y variables, de más de 2.000 plantas que incluyen árboles pequeños, arbustos, enredaderas, plantas herbáceas y suculentas.” Contienen un látex por lo general blanco y algunas veces amarillo, que al contacto con el aire se solidifica en pocos minutos. (Bigoniya, 1, & Shekar Singh, 2010)

En el género *Euphorbia* se ha identificado la presencia de ésteres diterpenos policíclicos en el látex, y esto hace que sea altamente irritante, corrosivo, que en contacto con la piel causa ardor temporal, el dolor o la ceguera permanente a entrar en contacto con los ojos. (Stevens, 2010)

Según estudios demuestran que la ingestión del látex es potencialmente mortal, causa inflamación severa de las paredes del estómago y el intestino con perforación en algunos casos. Esta savia presenta una proteína citotóxica, euphorbon. (Bigoniya, 1, & Shekar Singh, 2010).

Las plantas que pertenecen al género *Euphorbia* se utilizan como materia prima para caucho, aceite de ricino y tapioca. Tradicionalmente, se utilizan como purgantes, analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas, antimicrobianas, antiparasitarias, en el tratamiento de la tos, el asma, el reumatismo, cáncer y otras enfermedades como remedio ancestral. Por otro lado, el látex de algunas especies de *Euphorbia* se utiliza

tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades de la piel, la gonorrea, las migrañas, parasitosis, verrugas, actividad antiinflamatoria y antiartrítica (Bigoniya, 1, & Shekar Singh, 2010).

1.3 *Euphorbia laurifolia*

Nombre común: Lechero, pinllo

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Euphorbia laurifolia*

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Malpighiales</i>
Familia:	<i>Euphorbiaceae</i>
Subfamilia:	<i>Euphorbioideae</i>
Tribu:	<i>Euphorbieae</i>
Subtribu:	<i>Euphorbiinae</i>
Género:	<i>Euphorbia</i>

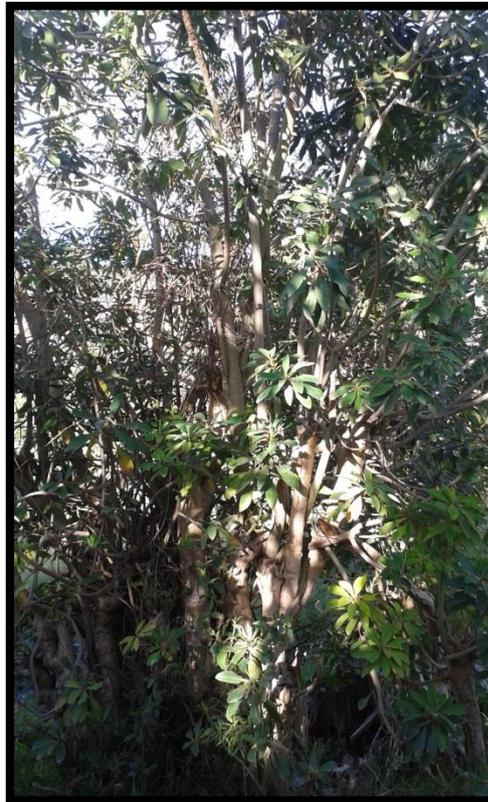
FUENTE: (Ulloa & Moller, S.A)

La *Euphorbia laurifolia* es ampliamente distribuida en diferentes países de Sudamérica como Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia. En Ecuador se encuentra en todas las provincias andinas, desde los 1500 hasta 3000 msnm. (Ulloa & Moller, S.A)

Son plantas en forma de arbustos o árboles, algunas veces suculentas, con látex lechoso, acre y hojas glabras. Presenta numerosas flores masculinas alrededor de una flor femenina central pedicelada y un fruto tricoco. (Ulloa & Moller, S.A)

La madera de la *Euphorbia laurifolia* se utiliza para la construcción de viviendas, los tallos y ramas se usan como postes en los linderos, ya que su crecimiento es rápido y formar una cerca.

FIGURA N°2. *Euphorbia laurifolia*, UBICADA EN LA PARROQUIA DE CUBIJÍES EN LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO



FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

El látex de esta especie se usa para tratar afecciones del hígado, infecciones en la piel, como las verrugas. Estas actividades biológicas se deben a la presencia de metabolitos secundarios propios de la familia Euphorbiaceae.

Algunas investigaciones demuestran que el látex presente en la familia Euphorbiaceae contiene gran cantidad de terpenos, seguidos por los flavonoides y alcaloides. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de sustancias como cumarinas, glucòsidoscianogénos y taninos.

Estudios demuestran que el 30% corresponde a compuestos terpénicos, hidrocarburos de cadena larga (C30 triterpenoides) que pueden ser procesados para obtener gasolina de alto octanaje. Algunos de estos compuestos se ha encontrado libres o

como sus ésteres. Sin embargo puede variar en dependencia de la especie. Esta composición hace que este látex sea cáustico, y produzca irritaciones en la piel e inflamaciones en contacto con las mucosas. (Ulloa & Moller, S.A)

1.4 Terpenos

Existen numerosos mecanismos que las plantas exteriorizan para poder sobrevivir a diversos cambios. Uno de los mecanismos que presentan es la producción de sustancias activas y protectoras, los terpenos. Estos son compuestos de peso molecular variable, de olor ligeramente intenso, que los vegetales producen de forma regular o únicamente bajo condiciones de estrés. Los terpenos brindan propiedades de protección a las plantas al evitar la depredación por los herbívoros y contrarrestar las condiciones oxidantes de las sequías o la contaminación. Por otro lado también afecta en la calidad del aire o el riesgo de incendio. (Ormeño & Fernández, 2012)

Los terpenos son hidrocarburos que corresponden a las familias de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas. Cuando estos compuestos contienen átomos de oxígeno se les llama terpenoides, aunque terpeno y terpenoide suelen utilizarse equitativamente. También se emplea el término isoprenoide, por ser derivados del isopreno. En la mayoría de los vegetales, los terpenos se localizan sobre todo en las hojas, las flores, los frutos y en menor cantidad en los tallos, troncos y raíces. (Ormeño & Fernández, 2012)

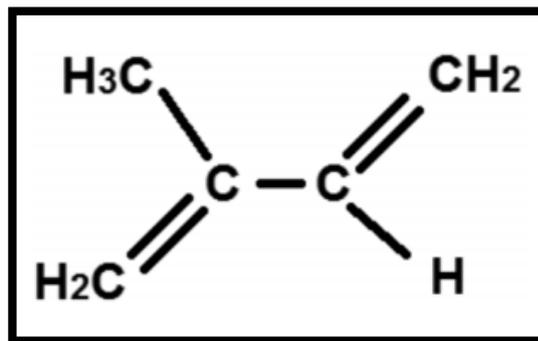
Otto Wallach fue quien separó e identificó por primera vez los terpenos, por ello obtuvo el premio Nobel de química orgánica en 1910. Actualmente se ha identificado números compuestos terpénicos, debido al desarrollo de nuevos métodos de investigación, en especial de modernas técnicas cromatográficas. Varios científicos, han calificado la investigación de los terpenos como de auténtica pesadilla, al verse enfrentados a una enorme diversidad de compuestos sin un significado aparente o difícil de interpretar. (Ormeño & Fernández, 2012)

Los terpenos constitutivos y los terpenos inducidos, presentan un papel defensivo. Estos dos grupos son sintetizados por la planta de forma continua y cuando la planta se ve agredida por un agente externo, respectivamente. La función de estos compuestos activos no es universal, ya que en numerosos estudios se ha demostrado que estas moléculas brindan protección a la planta que los produce. Sin embargo esta atribución puede resultar funcional en una especie y ser inactivo en otra. (Ormeño & Fernández, 2012)

Los terpenos presentan propiedades defensivas contra la herbivoría o las infecciones producidas por virus, bacterias y hongos. Además ayuda a nivel celular y tisular, dando protección contra el exceso de luz, la sequía y la contaminación atmosférica. Estas particularidades hacen que las plantas produzcan agentes oxidantes, que limiten su desarrollo. Por lo tanto, los terpenos actúan neutralizando radicales libres, actuando como un verdadero compuesto antioxidante. (Ormeño & Fernández, 2012)

Los terpenos son compuestos que conforman uno de los grupos fitoquímicos más abundantes. Aunque sus estructuras químicas son muy variables, tienen un origen biosintético común, ya que resultan de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). A pesar de su abundancia, los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales. (López, 2012)

FIGURA N°3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ISOPRENO



FUENTE: LÓPEZ N, 2012

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C₅) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C₅ y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C₅ y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos & Pérez, 2009).

FIGURA N°4. CLASIFICACIÓN DE LOS TERPENOS

N° DE ISOPRENOS	N° DE CARBONOS	NOMBRE
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos
X	5-x	Politerpenos

FUENTE: PRIMO E

Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos secundarios: la primera en la que tres moléculas de acetil-CoA se unen y forman ácido mevalónico, el cual reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), esta ruta se llama la del ácido mevalónico. La segunda es la ruta del metileritritol fosfato (MEP), y también forma isopentenil difosfato (IPP), pero realiza sus funciones en los cloroplastos. (Ávalos & Pérez, 2009)

Los precursores de la síntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas son el isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), y forma a los prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP), geranilgeranil difosfato (GGPP). Todos estos compuestos precursores de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, respectivamente. (Ávalos & Pérez, 2009)

Dentro de los compuestos terpénicos se encuentran las hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales. Estos últimos proporcionan el olor y el sabor de muchos vegetales. (Ávalos & Pérez, 2009).

Las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, pero presentan en su estructura química un terpeno como cadena lateral. Después de evidenciar una gran variedad de

compuestos terpénicos, se puede identificar la presencia de un significativo valor fisiológico y comercial. (Ávalos & Pérez, 2009).

Numerosos terpenoides llaman la atención por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su valor en la calidad de productos agrícolas. Por otro lado varios compuestos terpenoides tienen una elevada importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc. (Ávalos & Pérez, 2009)

Las plantas producen gran cantidad de mezclas de compuestos como alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales. Estos últimos como ya se mencionó son responsables de olores y sabores propios de cada vegetal. Los aceites esenciales son monoterpenos, varios de ellos actúan como repelentes de insectos o insecticidas. Dentro de estos tenemos el limoneno y el mentol. (Ávalos & Pérez, 2009)

La resina de ciertas coníferas también contiene monoterpenos con propiedades insecticidas. Dentro de los diterpenoides, se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas. (Ávalos & Pérez, 2009)

Los esteroides y esteroides derivados del escualeno son triterpenos, moléculas de 30 átomos de carbono. Los esteroides son esteroides que contienen un grupo alcohol, y en su mayoría se encuentra en el reino vegetal. (Ávalos & Pérez, 2009)

Los tetraterpenos y politerpenos son terpenos de mayor tamaño y peso molecular, dentro de ellos se encuentran los carotenoides, hidrocarburos de alto peso molecular caucho y gutapercha. (Ávalos & Pérez, 2009)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Materiales y reactivos

2.2.1 *Material vegetal*

La materia prima es el látex de *E. laurifolia*, especie presente en toda la región andina del Ecuador.

Para el estudio de investigación, el látex de *E. laurifolia*, se obtuvo en Cubijíes, una parroquia de la provincia de Chimborazo, latitud: -1.65 longitud: -78.5833. Dicha zona, presenta un clima generalmente frío, con temperatura que oscila entre de 12 °C a 16 °C y una altitud de 2503 m.s.n.m (Ilustre Municipio de Riobamba, 2012).

2.2.2 *Recolección de la muestra*

La recolección del látex de *E. laurifolia*, se realizó pasado el mediodía, fue recogido en metanol, las partes del vegetal que fueron aprovechadas para la investigación son sus tallos frescos, los cuales eran cortados. La muestra puede ser recolectada en cualquier época del año, ya que la cantidad de planta en la zona es favorable.

Se dejó en maceración mínimo por 24 horas en un lugar fresco y seco, protegidos de la luz.

2.2.3 Materiales de laboratorio

- Pipetas
- Probeta
- Termómetro
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Embudo simple
- Embudos de separación
- Varilla de agitación
- Papel filtro
- Guantes
- Mascarilla
- Reverbero
- Pera de succión
- Recipientes ámbar
- Balones de aforación
- Balones esmerilados
- Espátula
- Pinzas para tubos
- Papel aluminio
- Parafilm
- Aspersor
- Puntas amarillas y azules
- Pipetas automáticas
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Asa de platino
- Aplicadores
- Mangueras

2.2.4 Reactivos

- Agua destilada
- Metanol
- Hexano
- Acetato de etilo
- Éter etílico
- Acetona
- Revelador para terpenos: Ácido sulfúrico + vainillina
- Cloruro de sodio
- DMSO
- Agar mueller hinton (MERCK)
- Agar saboroud
- Caldo cerebro corazón (MERCK)
- Agar soya triptica (MERCK)

2.2.5 Equipos

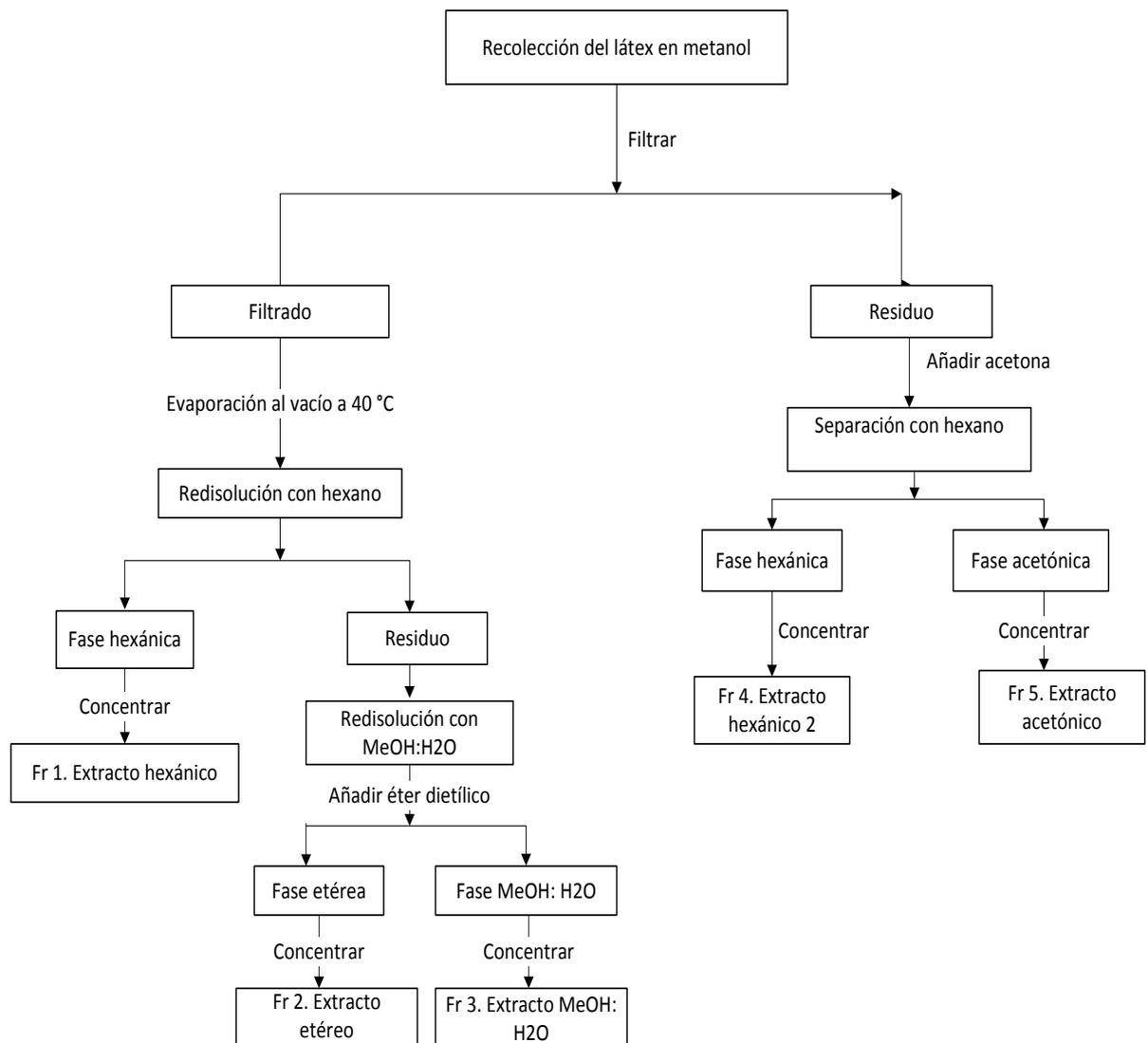
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Sonificador
- Estufa
- Equipo de destilación: rotavapor
- Autoclave
- Mechero
- Nevera
- Cámara de UV

2.3 Técnicas y métodos

2.3.1 Separación en fracciones del látex de *Euphorbia laurifolia*

El látex recolectado en metanol se filtró, el sólido fue extraído con acetona a 40 °C y disuelto con hexano. El filtrado metanólico fue evaporado a 40 °C hasta sequedad y se reconstituyó con hexano; la parte soluble se concentró a 40 °C, la parte insoluble se reconstituyó con MeOH: H₂O (1:1) y se extrajo con éter. (González, Basabe, Sexmero, & Sánchez, 1987)

FIGURA N°5. ESQUEMA PARA LA SEPARACIÓN EN FRACCIONES DEL LÁTEX DE *E. Laurifolia*



FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

2.3.2 Identificación de la fracción terpénica del látex de *Euphorbia laurifolia* mediante cromatografía de capa fina (TLC).

De cada uno de los extractos obtenidos anteriormente se realizó una cromatografía en capa fina (TLC), para lo cual se empleó placas de Sílice gel 60F 254 de 10 cm x 4 cm.

Se colocó con un capilar la cantidad suficiente de muestra de extracto a analizar, a 1 cm del borde inferior de la placa cromatográfica. Después de cada inyección de dejaron secar el tiempo suficiente. Posteriormente, luego de algunos minutos se realizó la elución

La fase móvil utilizada fue hexano y acetato de etilo, en una relación (7:3). Las placas se colocaron dentro de una cuba que contiene el sistema de solventes de la fase móvil y se dejó que el solvente alcance una altura de 0,5 cm antes del borde superior de la placa. Una vez que el solvente alcanzó la distancia adecuada se retiraron las placas de la cuba y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se observa en cada una de las placas las manchas obtenidas mediante una cámara UV. Para la observación de los componentes terpénicos las placas fueron reveladas con ácido sulfúrico y vainillina (50:50) y finalmente aplicó calor por dos minutos.

Para proponer una posible identificación de compuestos terpénicos, se llevó a cabo una cromatografía en capa fina, utilizando un sistema de solventes constituida por tolueno y acetato de etilo (7:3).

2.3.3 Determinación de LC₅₀ del latex de *Euphorbia laurifolia* en *Artemia salina*

➤ Eclosión de *A. salina*

Los huevos de *A. salina* se adquirieron de un proveedor adecuado y deben ser incubados durante 48 h en un recipiente de cultivo adecuado que contiene agua salada (1% de NaCl), preparada a partir de sal marina (exenta de nitrato, fosfato, y silicato) y agua destilada (35 g/L) a (26-30) °C, bajo iluminación constante con la ayuda de una lámpara de luz blanca. La solución de agua salada se aireó continuamente durante la incubación con una bomba de aire de acuario. Después de 48 h las larvas-nauplios deben ser recolectadas del recipiente de cultivo en uno nuevo que contenga agua salada.

➤ **Ensayo de letalidad**

Preparación de la solución madre: 0,025 g de Extracto hexánico se disolvieron en 0,25 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) y se aforó a 25 mL con agua marina. Se trabajó solamente con la parte soluble.

Preparación del control positivo (Blanco): Se disolvieron 0,25 mL de DMSO en 25 mL de agua marina.

Ensayo: Se prepararon concentraciones de 0; 31; 62; 125; 250; 500; 1000 ppm (partes por millón). Diez larvas de *A. salina* se colocaron en tubos de ensayo individuales usando una pipeta plástica con una punta de diámetro aproximado de 2 mm. Las larvas fueron liberadas bajo la superficie de la solución para evitar matarlas atrapando el aire bajo sus caparazones.

Las sobrevivientes se contabilizaron después de 24 h, y se determinó el porcentaje de muerte a cada concentración. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, evitando las pseudoréplicas.

2.3.4 Actividad Antimicrobiana

- ***Cepas utilizadas***

Escherichia coli ATCC 9637

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Pseudomona aeruginosa ATCC 27853

Candida albicans ATCC 10231

- ***Reactivación de los microorganismos***

Se suspendieron las cepas ATCC almacenadas en refrigeración y con ayuda de aplicadores estériles se tomó una cantidad adecuada. Se suspendieron a un ángulo de 45° en cada matraz Erlenmeyer (previamente codificado) que contiene los 25mL de caldo cerebro corazón. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Se verificó la turbidez de los matraces Erlenmeyer y sembraron en medios de cultivo adecuados como agar Mueller Hinton, agar MacConkey y Sabouraud, éste último en el caso de *Candida albicans*. Se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Al obtener y comprobar la existencia de las cepas reactivadas de los microorganismos ATCC, con un asa estéril se tomaron colonias y se sembraron por estriamiento en tubos codificados con agar soya tréptica, en pico de flauta, que se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente. Se incubaron por 18-24 horas a 37°C. Al día siguiente se almacenaron en gradillas y se realizó un sellado hermético para evitar la contaminación. (Mitscher, Leu, Bathala & Beal, 1971).

- ***Método de Difusión en disco***

Se utilizaron discos sin antibiótico. En estos se impregnaron alícuotas de 10, 20, 50, 100, 200 (µL) de extracto etanólico previamente preparado con 310 mg del extracto seco disuelto en 62 mL de disolvente (etanol). Todos los discos se dejaron en reposo hasta la completa evaporación del disolvente.

El inóculo de cada bacteria se preparó sembrando dos colonias de la cepa correspondiente en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) estéril en tubos de vidrio con tapón de rosca, ajustándose la turbidez a la escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Con un aplicador se sembró en cajas Petri con agar Müeller Hinton estéril y se distribuyó uniformemente sobre la superficie los discos de papel inoculado con el extracto correspondiente, empleando como controles positivos discos con tetraciclina y con etanol. Las cajas se incubaron a 37 °C, realizándose la medición de los halos de inhibición de crecimiento a las 24 h. (Mitscher, Leu, Bathala & Beal, 1971).

- ***Método de Mitscher***

Preparación de la muestra: se disolvieron 0,025 g de extracto hexánico en 250 µL de DMSO, y se aforó a 25 mL de agua destilada. Todo se realizó con la ayuda del ultrasonido.

Control positivo: 250 µL de DMSO disueltos en 25 mL de agua destilada.

Preparación de cajas Petri con el extracto:

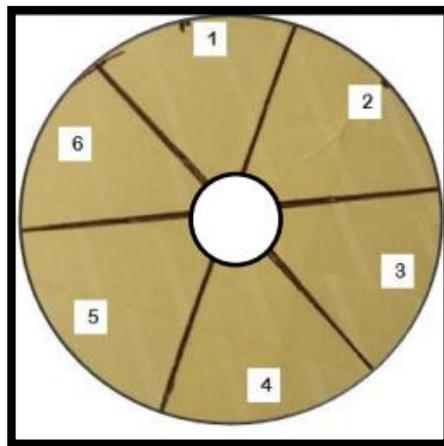
Se colocaron 1000, 500 y 100 (μL) de la muestra en cajas Petri vacías y codificadas. Luego se colocaron los agares correspondientes, agar Müeller Hinton para bacterias y Sabouraud para hongos. Se agitaron de forma cuidadosa y se dejaron solidificar. Así mismo se preparó el control positivo.

Estriado de los microorganismos

El inóculo de cada bacteria se preparó sembrando dos colonias de la cepa correspondiente en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) estéril en tubos de vidrio con tapón de rosca, ajustándose la turbidez a la escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Con un asa de platino estéril se inocularon los microorganismos en los medios de cultivo preparados. Se dejaron en incubación durante 18 a 24 horas (Mitscher, Leu, Bathala & Beal, 1971).

FIGURA N°6. ESTRIADO DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS CAJA PETRI



FUENTE: Mitscher, Leu, Bathala & Beal, 1971

- ***Determinación del efecto antimicrobiano del látex de E. laurifolia, según (Yan, J. y Cheng, J., 2003)***

Se preparó, tomando de dos a tres colonias, una suspensión en 5 mL caldo soya tríptica estéril y se ajustó la concentración hasta obtener una densidad equivalente al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL). De esta suspensión se tomaron 2 mL y se añadieron a tubos con 8 mL de caldo soya tríptica, se obtuvo una concentración de 3×10^7 células/mL. De esta nueva suspensión se tomaron 100 μ L y se añadieron a tubos con 10 mL de extracto disuelto con DMSO, como se indica en el método de Mitscher, y se obtuvo una concentración de 3×10^5 células/mL. Igual procedimiento se realizó para el control.

Se realizaron siembras por el método de vertido en placa de 1 mL de la suspensión 3×10^5 células/mL en los diferentes agares y a los tiempos de 5 minutos, 60 minutos, 120 minutos y 300 minutos. Finalmente se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas y se procedió a su lectura.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Separación e Identificación de la fracción terpénica del látex de *E. laurifolia* mediante cromatografía de capa fina (TLC).

En la FIGURA N° 7, 8, 9 se puede observar las cromatografías de cada fracción extraída del látex de *E. laurifolia*. A partir de éstas, se puede identificar que los extractos hexánico y etéreo, obtenidos a partir del filtrado, muestran mejor resolución de compuestos terpénicos. Con este resultado, se consideró continuar con estas fracciones para posteriores análisis.

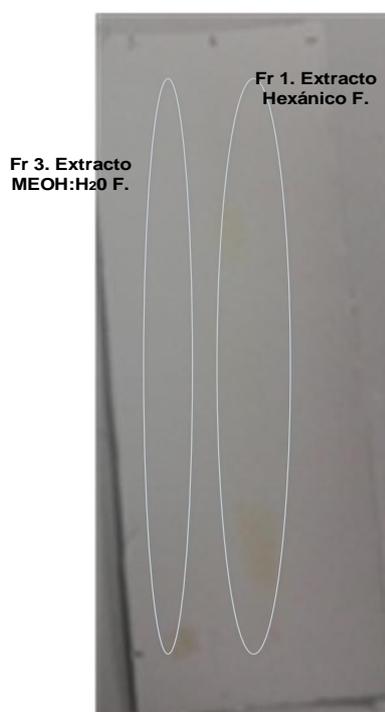
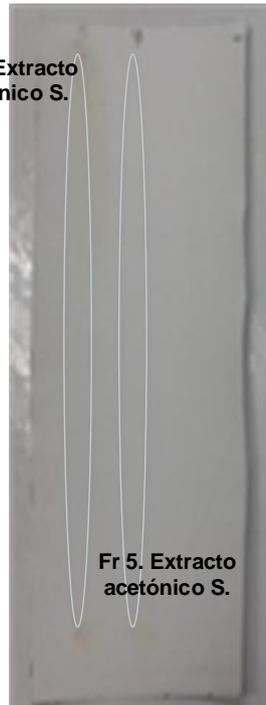


FIGURA N°7. CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y DEL EXTRACTO MEOH:H₂O OBTENIDOS A PARTIR DEL FILTRADO METANÓLICO.



FIGURA N°8. CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ETÉREO

Fr 4. Extracto
hexánico S.



Fr 5. Extracto
acetónico S.

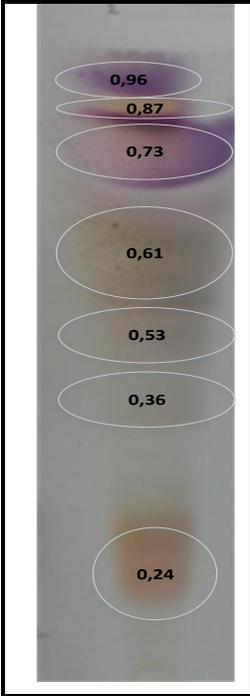
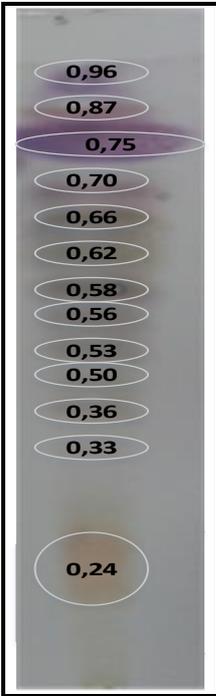
FIGURA N°9. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO
HEXÁNICO Y ACETÓNICO OBTENIDOS A PARTIR DEL SÓLIDO

FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

En la TABLA 2 se puede observar los resultados de la cromatografía en capa fina de los extractos hexánico y etéreo; obteniéndose 7 y 13 compuestos, respectivamente. Al compararon los R_f y el color de las manchas entre las cromatografías de los extractos, se pudieron observar que presentan 7 compuestos similares en ambos extractos del látex de *E. laurifolia*. Asimismo en una investigación realizada en la Universidad de Salamanca del latex de *E. broteri* encontraron que los compuestos químicos tanto del extracto hexánico como del etéreo son similares (González, Basabe, Sexmero, & Sánchez, 1987). Por lo que se podría decir que en general la composición del látex de la familia Euphorbiaceae y específicamente del género Euphorbia es similar en todas las especies. Por otro lado, en dicha investigación encontraron derivados del ingenol y otros compuestos terpénicos mediante espectros de RMN (Resonancia magnética nuclear), es así que la investigación del látex de *E. laurifolia* está abierta a numerosos estudios posteriores para identificar los compuestos presentes.

Después de observar el análisis por TLC y debido a que los extractos son similares respecto a la presencia de compuestos terpénicos, se decidió continuar con la investigación usando el extracto hexánico, ya que su rendimiento es mucho mayor que el etéreo. El factor del rendimiento es muy importante en este estudio, ya que el látex de *Euphorbia laurifolia* es de difícil recolección.

CUADRO 2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y ETÉREO DEL LÁTEX DE *Euphorbia laurifolia*

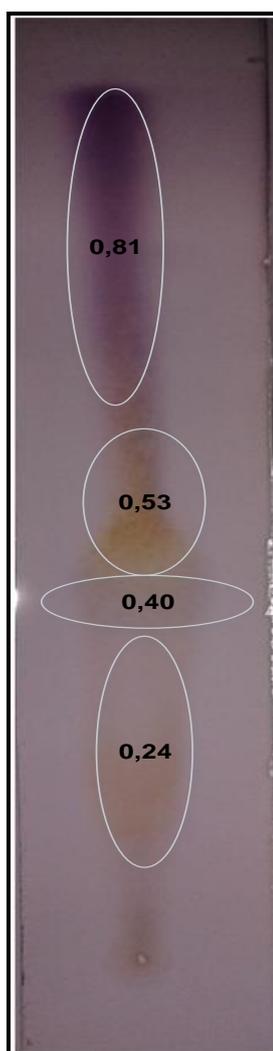
EXTRACTO HEXÁNICO			EXTRACTO ETÉREO		
Rf de los componentes					
					
°N de manchas	Rf	Color de la mancha	°N de manchas	Rf	Color de la mancha
1	0,24	Anaranjado	1	0,24	Anaranjado
2	0,36	Café	2	0,33	Café
3	0,53	Café	3	0,36	Café
4	0,61	Café	4	0,50	Café
5	0,73	Morado	5	0,53	Café
6	0,87	Amarillo	6	0,56	Café
7	0,96	Morado	7	0,58	Café
			8	0,62	Café
			9	0,66	Café
			10	0,70	Café
			11	0,75	Morado
			12	0,87	Amarillo
			13	0,96	Morado

FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

Al realizar una cromatografía en capa fina del extracto hexánico del látex (FIGURA N°10), utilizando como sistema de solvente tolueno: acetato de etilo (7:3), se determinó la presencia de cuatro posibles compuestos terpénicos. Presentan Rf de: 0,24; 0,40; 0,53; 0,81.

Se utilizó esta fase móvil, ya que al comparar con bibliografía se pudo determinar la posible presencia de dos compuestos: borneol (Rf: 0,24), cineol (Rf: 0,40) (Wagner & Blandt, 1996). Los mismos que son estructuras cíclicas complejas. Sin embargo en estudios posteriores se puede realizar el aislamiento de las fracciones de todos los posibles compuestos presentes y determinar sus estructuras.

FIGURA N°10. CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO HEXÁNICO



FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

3.2 Citotoxicidad en *A. salina*

En el TABLA N° 5 se presenta las diferentes concentraciones a la que se utilizó el extracto hexánico y el porcentaje de mortalidad en *Artemia salina*. Los resultados promedio se representaron utilizando la herramienta de Análisis Probit del software estadístico TSK de la que la concentración letal media (CL50). Por lo que se determinó que la concentración a la que el 50% de las larvas mueren dentro de las 24 h de contacto con las diluciones es de 214,5 ppm con un intervalo de confianza de (149,49 – 307,19) ppm, y un porcentaje de error del 29,03 %.

CUADRO N° 3. NÚMERO DE MUERTES DE LOS NAUPLIOS DE *A. salina* A DIFERENTES CONCENTRACIONES

```
DATE: 10/11/20          TEST NUMBER: 001          DURATION: 1 D
TOXICANT : Extracto hexánico Euphorbia laurifolia
SPECIES: Artemia salina

RAW DATA: Concentration      Number      Mortalities
--- ---- (ppm)      Exposed
      .00              100         7
      31.00             100        17
      62.00             100        33
      125.00            100        50
      500.00            100        63
      1000.00           100        73

SPEARMAN-KARBER TRIM:                29.03%

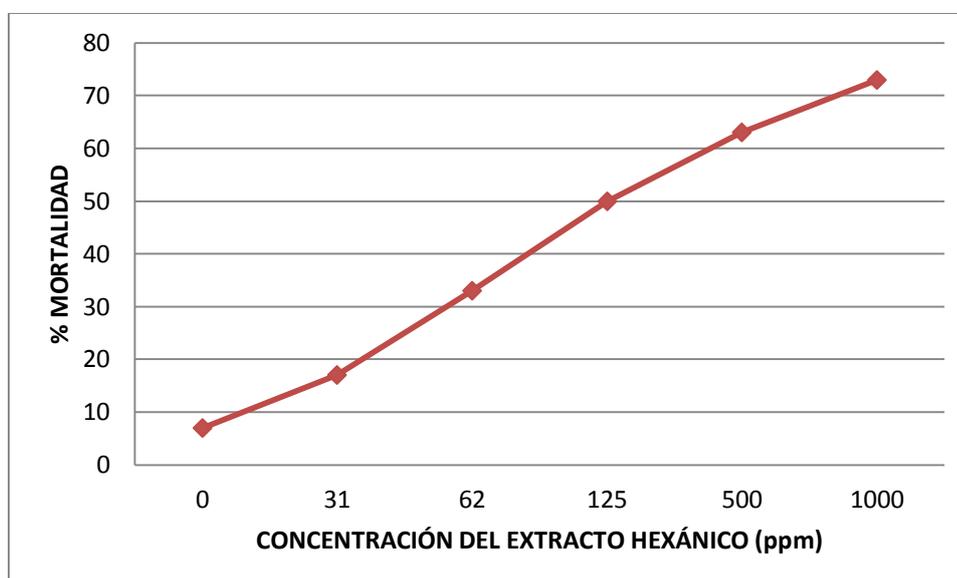
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:   LC50:        214.50
                             95% LOWER CONFIDENCE: 149.49
                             95% UPPER CONFIDENCE: 307.79

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

Mediante la extrapolación de resultados (FIGURA N°5) se pudieron determinar que existe una relación proporcional entre la concentración del extracto hexánico de *Euphorbia laurifolia* y el porcentaje de mortalidad en *Artemia salina*. Es así que al extracto se le consideró tóxico.

FIGURA Nº 11. PORCENTAJE DE MORTALIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *E. laurifolia* EN *A. salina*



FUENTE: MIRANDA A, 2015 ESPOCH

Un estudio demuestra que el látex de *Euphorbia conspicua* de la Universidad Federal de Alagoas en Brasil es muy tóxico, ya que presenta un LC50 de 15,356 ppm (Aldenir, et. al, 2006). En relación a la LC50 del látex de *E. laurifolia* (214,50 ppm), es evidente que la especie estudiada tiene una menor actividad citotóxica. Estos resultados contribuyen y fortalecen a esta investigación, determinando la presencia de compuestos tóxicos que producen la muerte de los nauplios.

Esto sería posible a que estos crustáceos ingieren el extracto hénxanico de *E. laurifolia*, produciendo severas irritaciones con posibles perforaciones en el sistema digestivo. Los compuestos químicos citotóxicos del látex según estudios serían los diterpenos policíclicos y una proteína característica llamada euphorbon (Stevens, 2010).

3.3 Actividad antimicrobiana

- **Difusión en disco**

Después de 18 a 24 horas de incubación a 37 °C, se observa que el extracto hexánico del látex de *E. laurifolia* carece de actividad antimicrobiana frente a microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, debido a que no se observa halos de inhibición, al utilizar concentraciones de 1000, 500, 250, 100 y 50 µg del extracto hexánico del látex de *E. laurifolia*.

CUADRO Nº 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *E. laurifolia* MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

MICROORGANISMOS	18-24 HORAS				
	1000 µg	500 µg	250 µg	100 µg	50 µg
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Pseudomona aeruginosa</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Candida albicans</i>					

A: Activo P: Parcialmente Activo I: Inactivo

- **Método de Mitscher**

Mediante el método de Mitscher se observa que el extracto hexánico de *Euphorbia laurifolia* carece de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*,, a partir de una concentración de 1000 µg/mL. Después de 18 a 24 se observó crecimiento bacteriano en los estriados realizados.

CUADRO Nº 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *E. laurifolia* MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

MICROORGANISMOS	18-24 HORAS		
	1000 µg	500 µg	100 µg
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Pseudomona aeruginosa</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Candida albicans</i>			

A: Activo P: Parcialmente Activo I: Inactivo

- Inhibición antimicrobiana Yan, J. y Cheng, J., 2003***

Se observó ausencia de la actividad antimicrobiana del extracto hexánico del látex de *Euphorbia laurifolia*, al ver crecimiento bacteriano a los 5, 60, 120 y 300 minutos de estar en contacto el extracto con los microorganismos. Se observa el crecimiento de colonias por el método de vertido en placa.

CUADRO Nº 6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *E. laurifolia* MEDIANTE EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003

MICROORGANISMOS	18-24 HORAS			
	5 minutos	60 minutos	120 minutos	300 minutos
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Pseudomona aeruginosa</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Candida albicans</i>				

A: Activo P: Parcialmente Activo I: Inactivo

La actividad antimicrobiana realizada de la *E. hirta* en la Universidad Sains Malaysia de Tailandia dio positivo (Shanmugapriya, 2012), ya que para el estudio se utilizó las partes aéreas del vegetal, en donde existe mayor cantidad de compuestos solubles que favorecen la entrada a través de las paredes y membranas celulares de los microorganismos.

Mientras que la composición química del látex es muy compleja, es así que investigaciones realizadas de la familia Euphorbiaceae demuestra, que esta savia lechosa presenta gran cantidad de resinas, sustancias gomosas y terpenos con estructuras grandes y variables. Esto hace que dificulte la entrada a las células de los microorganismos, debido a su elevado peso molecular y por ende su liposolubilidad.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un perfil cromatográfico de la presencia de posibles compuestos terpénicos en la fracción hexánica del látex de *E. laurifolia*. Mediante la aplicación de cromatografía en capa fina se identificó que en el extracto hexánico se encuentra compuestos con Rf: 0,24; 0,36; 0,53; 0,61; 0,73; 0,87; 0,96. En el extracto etéreo se visualizó mayor cantidad de componentes con Rf: 0,24; 0,33; 0,36; 0,50; 0,53; 0,56; 0,58; 0,62; 0,66; 0,70; 0,75; 0,87; 0,96. Por otro lado, al utilizar como fase móvil tolueno y acetato de etilo, se reveló compuestos con Rf: 0,24; 0,40; 0,53; 0,81.
2. El extracto hexánico del látex de *E. laurifolia* presenta actividad citotóxica sobre *A. salina*, ya que se determinó que la concentración a la que el 50% de las larvas mueren dentro de las 24 h de contacto con las diluciones utilizadas es de 214,5 ppm.
3. El extracto hexánico del látex de *E. laurifolia* carece de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*; al emplear el método de difusión en disco, método de mitscher, y el método de Inhibición antibacteriana según Yan, J. y Cheng, J., 2003.

5. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere la realización de más investigaciones de los compuestos presentes en el látex de *Euphorbia laurifolia* mediante TLC, ya que la bibliografía existente es escasa.
2. Evaluar mediante otras técnicas de análisis los compuestos terpénicos presentes en el látex.
3. Realizar la separación de los compuestos encontrados por TLC y hacer un estudio que determine sus estructuras
4. Realizar la actividad antimicrobiana de las otras fracciones extraídas del látex de *E. laurifolia*.
5. Buscar otros metabolitos y evaluar su actividad antimicrobiana.
6. Plantear métodos de recolección del látex para facilitar sus estudios.
7. Realizar actividades como antimicótica y antiviral del extracto hexánico de *E. laurifolia*

6. BIBLIOGRAFÍA

ANTIMICROBIANOS, E. P. Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales. 2001, pp. 1-6

http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/comprobacion_de_la_actividad_terapeutica_de_las_plantas.pdf

2014-10-12

ÁVALOS, A., & PÉREZ, E. Metabolitos secundarios de plantas. Madrid-España. Reduca. 2009, Pp. 122-129.

<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>

2014-10-12

BITTNER, M., et. al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. Santiago de Chile-Chile. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. 2001, pp. 419-431

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442001000400006&lng=es&tlng=es.10.4067/S0366-16442001000400006.

2014-11-26

EVANS, F., & KINGHORN D. A comparative phytochemical study of the diterpenes of some species of the genera *Euphorbia* and *Elaeophorbium* (Euphorbiaceae). China. 1999, pp. 74, 93

GEWELI, M., et. al. Constituents of the latex of *Euphorbia antiquorum*. Phytochemistry. Salamanca-España. 1987, pp. 207-2012

GESTAL, J. Enfermedades infecciosas emergentes. (Revista Española de Salud Pública). Vol., N°71. Mayo 1997, Madrid-España, pp. 225-229

JIJÓN, Carolina. *Euphorbia laurifolia*. Quito-Ecuador. Copyright. 2014, pp. 1-7
http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php?option=com_content&view=article&id=13:euphorbia-laurifolia&catid=14:siglo-xviii-coleccion-de-joseph-de-jussieu&Itemid=108

2014-10-12

LÓPEZ, Brea., & DOMINGO, D. Plantas con acción antimicrobiana. España. Revista Española de Quimioterapia. 2003, pp. 385-393

- LÓPEZ, N., et. al.** Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Madrid. Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria. 2012, pp. 1-11
<http://digital.csic.es/bitstream/10261/101431/1/terpenos%20iridoides.pdf>
2014-11-26
- MACÍAS, V. et. al.** Terpenos con actividad biológica anti-VIH. Imbiomed. México. 2010, pp. 257-273
http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=68842&id_seccion=2052&id_ejemplar=6887&id_revista=127
2014-10-15
- MITSCHER, L., et. al.** Agentes antibióticos de plantas superiores. Hillsboro-Estados Unidos. Lloydia. 1971, pp. 157-166
- ORMEÑO, E., & FERNÁNDEZ, C.** Los terpenos de las plantas. Investigación y Ciencia. México. 2012, pp. 62-69
<http://www.thcterapeutico.com/wp-content/uploads/2013/05/terpenos.pdf>
2014-11-26
- PACHECO, P., et. al.** Química de las plantas chilenas usadas en Medicina Popular. Universidad de Concepción. Santiago de Chile-Chile. 1977, pp. 1-287
- PADUCH, R., et. al.** Terpenos: sustancias útiles en la asistencia sanitaria humana. Lublin-Polonia. Immunologia y Tratamientos Experimentales. 2007, pp. 315-327
- RIZK, A.** Los componentes químicos y plantas económicas de la *Euphorbiaceae*. Hillsboro-Estados Unidos. Botanical Journal of the Linnean Society. 2008, pp. 293–326
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.1987.tb01052.x/abstract>
2014-11-26
- SAAVEDRA, Tirza.** Infecciones bacterianas y micóticas. Santiago-Chile. Medwave. Chile. 2007, pp. 1-8
<http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/1904>
2014-11-02
- STEVENS, P.** Euphorbiaceae. Estados Unidos. Angiosperm Phylogeny Website. 2010, pp. 1-20
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/orders/malpighialesweb.htm#Euphorbiaceae>
2014-11-22

ULLOA, C., & MOLLER, P. *Arboles y Arbustos de los Andes*. Quito-Ecuador.

Efloras.org. 2009, pp. 3-15

http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=112355

2014-11-02

VÁZQUEZ, Antonio. Desarrollo endógeno, Teorías y políticas de desarrollo territorial.

Madrid-España. Investigaciones Regionales. 2007, pp. 183-210

WAGNER, H., & BLADT, S. Análisis de Medicamentos de Plantas. 2.ed. Munich-

Alemania. Atlas de Cromatografía en capa fina. Springer. 1996, Pp. 315-350

7. ANEXOS

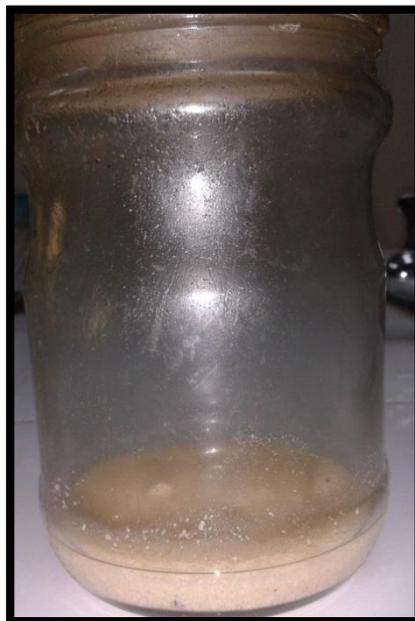
EVIDENCIAS FOTOGRAFIAS

ANEXO 1. RECOLECCIÓN DE *Euphorbia laurifolia*



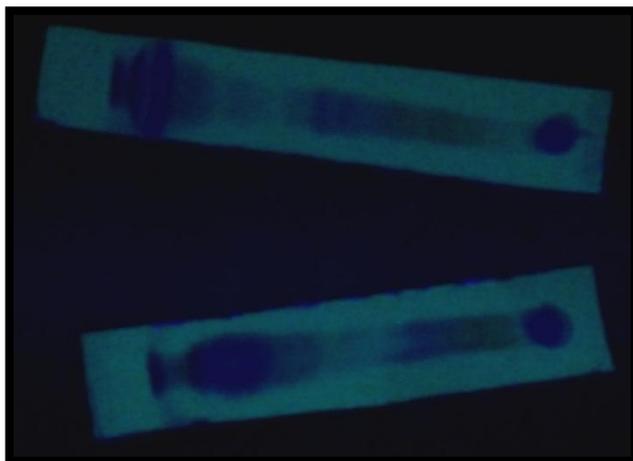
FOTOGRAFIA 1. *Euphorbia laurifolia*

ANEXO 2. ADECUADA RECOLECCIÓN DEL LÁTEX DE *Euphorbia laurifolia*



FOTOGRAFIA 2. FRASCO HERMÉTICO CON LÁTEX EN METANOL

**ANEXO 3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA MEJOR FRACCIÓN
EXTRAÍDA DEL LÁTEX DE *E. laurifolia***



**FOTOGRAFIA 3. CROMATOGRFÍAS VISTAS EN LA CÁMARA UV DEL
EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia***

ANEXO 4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL *E. laurifolia*



**FOTOGRAFIA 4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO A PARTIR DEL
FILTRADO METANÓLICO**

ANEXO 5. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *E. laurifolia*



FOTOGRAFIA 5. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO A PARTIR DEL FILTRADO METANÓLICO DEL LÁTEX

ANEXO 6. ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DE *E. salina*



FOTOGRAFIA 6. CONDICIONES PARA LA ECLOSIÓN DE LOS HUEVOS DE *A. salina*

ANEXO 7. *Artemia salina*

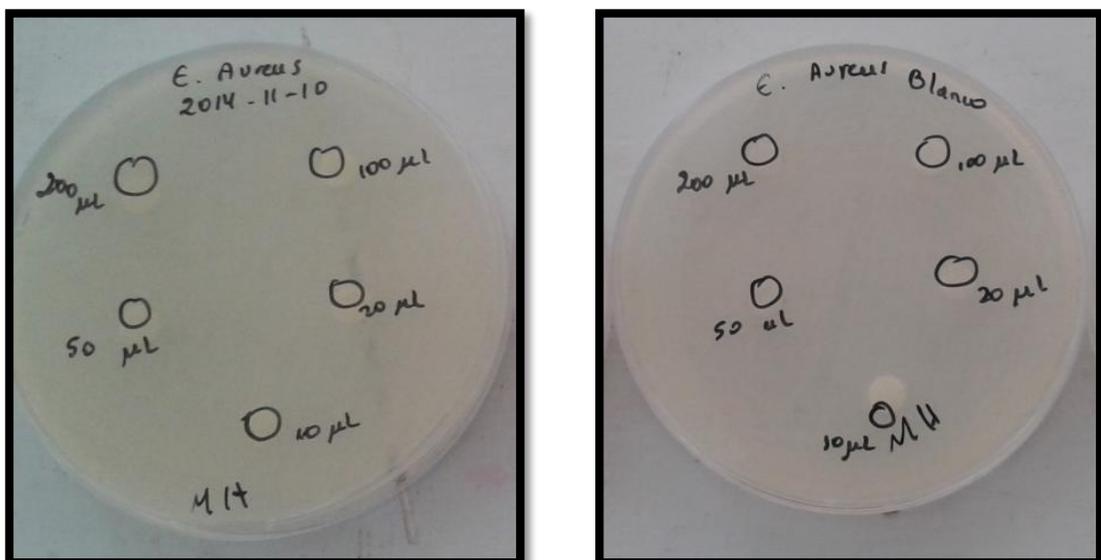


FOTOGRAFIA 7. *A. salina* DESPUÉS DE LA ECLOSIÓN

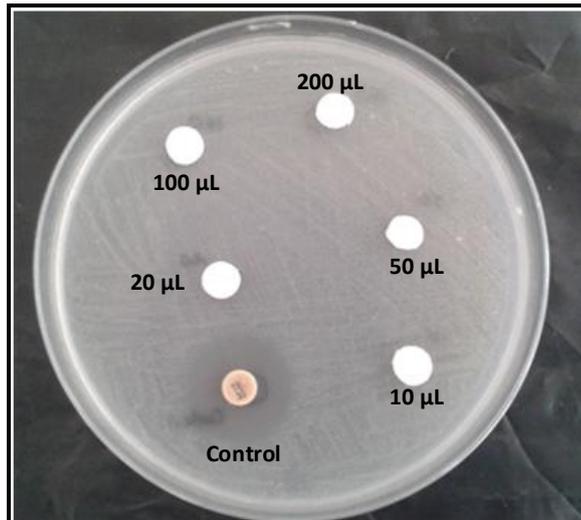
ANEXO 8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *E. coli* SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



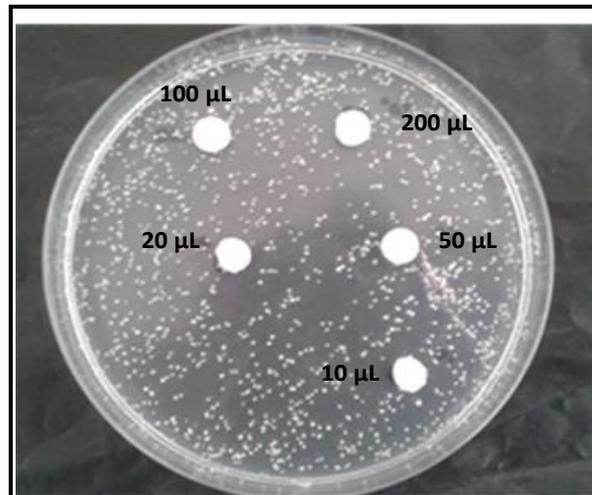
FOTOGRAFIA 8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. Laurifolia* SOBRE *E. coli* SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



FOTOGRAFÍA N°9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *S. aureus* SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



FOTOGRAFÍA N°10. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *P. aeruginosa* SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



FOTOGRAFÍA N°11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *C. albicans* SEGÚN EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

ANEXO 9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER

Control

1000 μ L DMSO

1000 μ L Extracto



FOTOGRAFÍA N°12. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *E. coli* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER

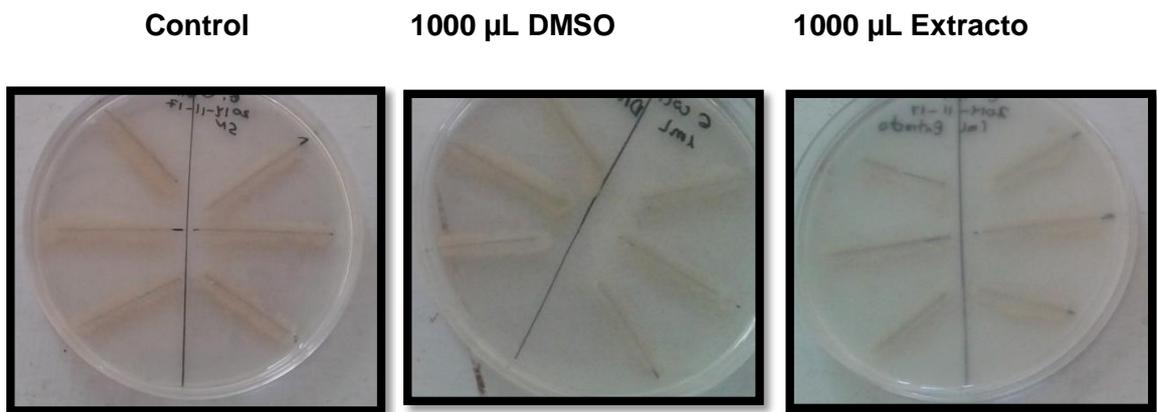
Control

1000 μ L DMSO

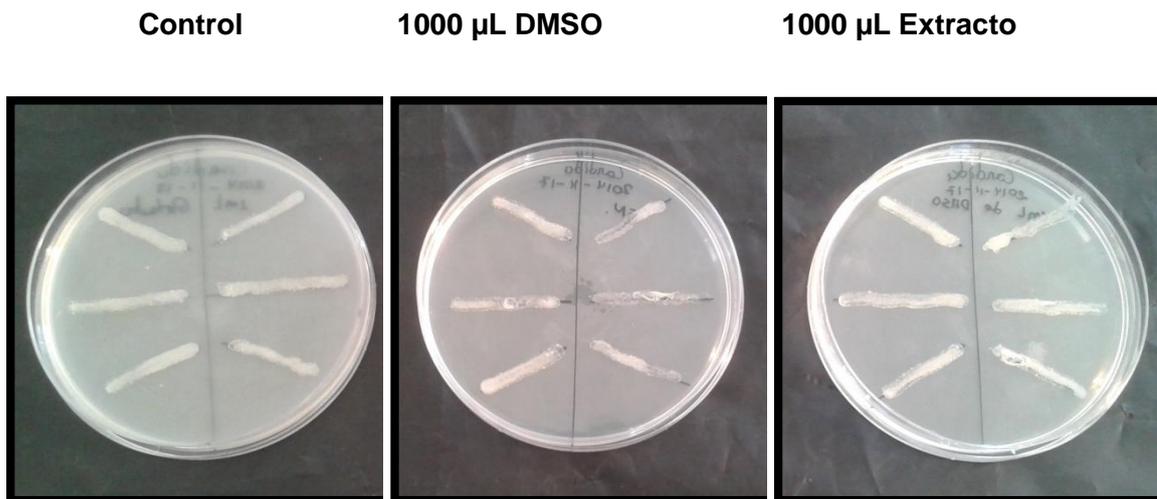
1000 μ L Extracto



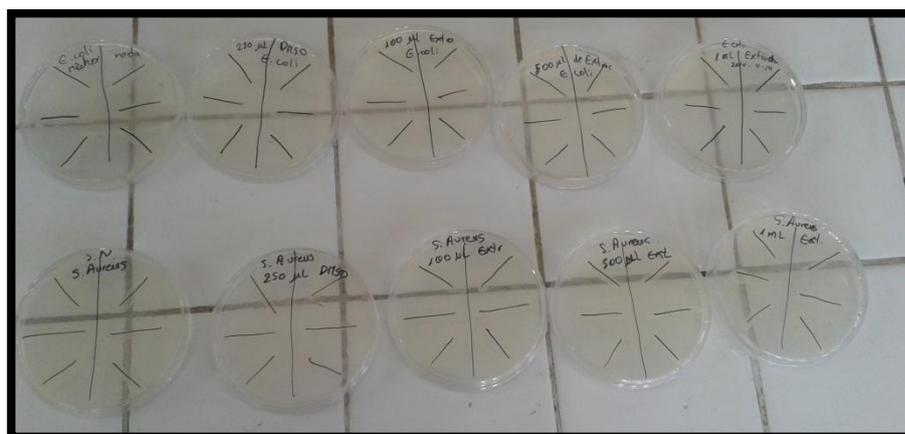
FOTOGRAFÍA N°13. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *S. aureus* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER



FOTOGRAFÍA N°14. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *P. aeruginosa* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER

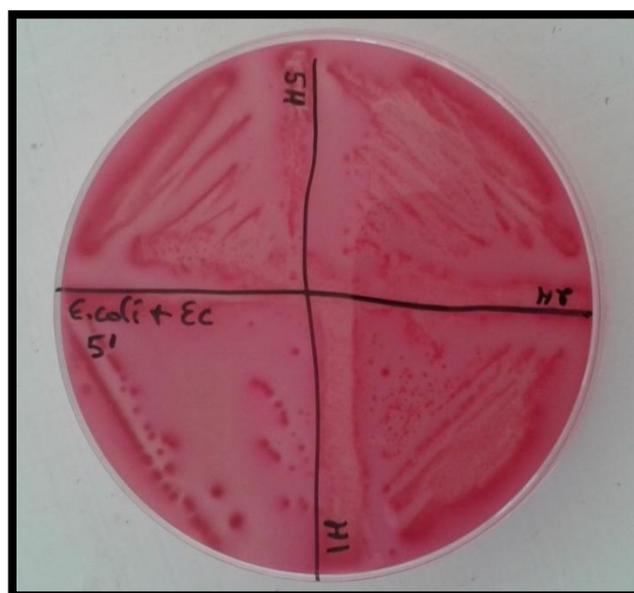


FOTOGRAFÍA N°15. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *C. albicans* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER



FOTOGRAFÍA N°16. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SEGÚN EL MÉTODO DE MITSCHER

ANEXO 10. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SEGÚN EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003



FOTOGRAFÍA N°17. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DEL LÁTEX DE *E. laurifolia* SOBRE *E. coli* SEGÚN EL MÉTODO DE Yan, J. y Cheng, J., 2003