



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

“ESTUDIO QUÍMICO DE Croton suberosus Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE SUS EXTRACTOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Georgina Bustamante Macías

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hie li shan ching yui tung sin ni pien kin.

Versión literal:

Mediante el esfuerzo combinado, una montaña se convierte en piedras preciosas.

La unión de corazones transforma el barro en oro.

Con todo mi amor y agradecimiento.

A mi madre:

Martha Macías Vicente

Gracias por darme una gran fortaleza, por tu amor, dedicación y paciencia que han sido bendiciones a través de mi vida y han servido para que este sea mi primer triunfo realizado.

Mil gracias.

A mis hermanos:

Elizabeth Macías Vicente y

Jorge Bustamante Macías.

Por sus grandes virtudes,
por su forma de ver la vida,
y por transmitirme sus experiencias.

A mis sobrinitas:

Elizabeth Velazquez Gómez

Paola Velazquez Gómez

A las que tanto quiero.

Con mi más profunda admiración y agradecimiento a la Dra. Maria Cristina Pérez Amador, por su inmejorable guía, paciencia, comprensión y estímulo para la elaboración de este trabajo.

Esta tesis representa la culminación de una pequeña parte de mi preparación tanto académica como personal, así como la obra desarrollada con la participación de todas las personas que han estado a mi lado hasta ahora.

Agradezco a todas las personas, su valiosa ayuda - que para mi significó mucho.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Química del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Pérez - Amador y la asesoría técnica de la Química Aida N. García Argaez.

I N D I C E

		Página
I.	INTRODUCCION	1
	- Objetivos	2
II.	ANTECEDENTES	3-5
	1.- Composición química	
	a) Alcaloides	5-16
	b) Diterpenos	17-22
	c) Aceites esenciales	23-27
	d) Aceite de Croton	
	- Agentes carcinogénicos	28
	- Propiedades del aceite de Croton	28-31
	- Capacidad anticancerígena del aceite de Croton .	31
	2.- Actividad biológica	31-32
III.	GENERALIDADES SOBRE LOS DERMATOFITOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA BIOLÓGICA.	33-34
	a) Ubicación taxonómica	34
	- Características de la Subdivisión Deuteromycotina	34-36
	b) Descripción específica de las especies	37-42
	1.- Trichophyton mentagrophytes	37
	2.- Trichophyton rubrum	38-39
	3.- Trichophyton concentricum	39
	c) Pruebas micológicas	43-44
IV.	UBICACION TAXONOMICA DE Croton suberosus	
	a) Clasificación	45
	b) Descripción del género	45
	c) Descripción específica	46-47
	Localidad geográfica	
	d) Distribución	47
	e) Lugar de colecta	47-49

V. MATERIAL Y METODOS

1. PARTE QUIMICA	50-71
1.- Preparación del material	
1.1. Colecta	53
1.2. Secado	53
1.3. Molienda	53
2.- Extracciones	
2.1. Selectiva por el método de Soxhlet	54
2.2. Extracción con etanol para determinar presencia de alcaloides (Bettolo y - Scarpati, 1979)	54-55
2.3. Extracción ácida en frío, con ácido acético al 10%, para determinar presencia de alcaloides (Tiwari, 1981).	55
2.4. Extracción con éter, en frío, para - la obtención de aceites esenciales	55-56
3.- Análisis de los extractos	
3.1. Determinación del número de componentes de los extractos mediante cromatografía en capa fina.	56
3.2. Identificación de familias de compuestos.	56-59
3.3. Aislamiento de sustancias	
3.3.1 Por cromatografía en columna de gel de sílice.	
3.3. Extracto hexánico	62-64
1.a.	
3.3. Extracto etéreo	64-65
1.b.	
3.3.2 Aislamiento de sustancias por precipitación	
3.3. Extracto de acetato de etilo	66
2.a.	
3.3. Extracto metanólico	66
2.b.	
3.4. Purificación por cristalización de compuestos aislados.	
Extracto hexánico	69

	Página (s)
4.0 Análisis de las fracciones F-32 y F-33 (cera)	
- Saponificación	70
- Obtención de los ésteres metílicos	71
- Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.	71
II. PARTE BIOLÓGICA	
1.- Material	
a) Extractos probados	72
b) Organismos empleados	72
2.- Desarrollo	
a) Metodología aplicada para los extractos hexánico, etéreo y de acetato de etilo.	72-73
b) Metodología aplicada para los extractos metanólico y acuoso.	73-76
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	
1.- Parte química	77-100
II.- Parte biológica	101-151
VII. CONCLUSIONES	
Parte química	152
Parte biológica	153
VIII. BIBLIOGRAFIA	154-160

I. INTRODUCCION

En el transcurso de los siglos y desde tiempos prehistóricos el hombre ha adquirido información del medio ambiente que le rodea, principalmente de las plantas propias de su región. Dicha información la va pasando de generación en generación, ya sea a sus descendientes o a determinadas - personas (sacerdotes, hechiceros, curanderos etc.).

Es esta tradición herbolaria la que ha despertado gran interés por el estudio de los productos naturales obtenidos de plantas y más aún, de aquéllas en las cuales se detectan principios activos.

Croton suberosus H.B.K. (Euphorbiaceae) es una planta interesante para su estudio por sus propiedades curativas. Del género existen muchos trabajos que van desde el punto de vista médico hasta el químico sin embargo, de esta especie no hay antecedentes en la literatura.

El presente estudio aporta un conocimiento preliminar sobre la composición química de **Croton suberosus** H.B.K., y comprueba la actividad antifúngica de sus extractos (hexánico, etéreo, de acetato de etilo, metanólico y acuoso) por estimación de la sobrevivencia de los dermatofitos humanos: **Trichophyton mentagrophytes**, **Trichophyton rubrum** y **Trichophyton concentricum**.

OBJETIVOS

- 1.- Obtener extractos de la hoja de **Croton suberosus** con:
 - a) Eter etílico
 - b) Hexano
 - c) Acetato de etilo
 - d) Metanol

- 2.- Aislar y caracterizar algunas de las sustancias que los constituyen.

- 3.- Probar la actividad antifúngica de cada uno de los extractos, **in vitro**, frente a los hongos:
 - a) **Trichophyton mentagrophytes**
 - b) **Trichophyton rubrum**
 - c) **Trichophyton concentricum**

II. ANTECEDENTES

La medicina alopática moderna cuenta con un conjunto de medicamentos, con frecuencia sintéticos, que surten efectos impresionantemente rápidos y eficaces, pero que, también con frecuencia, son fármacos que originan como resultados secundarios nuevos padecimientos. En contraste, la medicina homeopática efectúa sus tratamientos a base de extractos, tinturas y polvos provenientes de plantas, además de muchas otras sustancias naturales de diversa índole, administradas de modo que no causen trastornos, aunque en general no curan de inmediato, sino a plazo más o menos largo; se emplean de manera preventiva y curativa (Martín del Campo , 1976).

Haciendo en forma breve un poco de historia revisaremos algunos hechos.

La primera clasificación sistemática de plantas nocivas o de sus extractos tóxicos fue elaborada por Hipócrates (460-357 A.C.), observando su comportamiento y los efectos tóxicos al ser ingeridos por el hombre. De tal forma, las plantas nocivas quedaron incluidas en dos grupos: Primer grupo, plantas que al ser ingeridas causan síntomas "similares" a los manifestados por algunas enfermedades conocidas, dándoseles el nombre de plantas homeopáticas. Segundo grupo, plantas que hacen desaparecer síntomas específicos de algunas enfermedades descritas, nombrándolas plantas alopáticas y dándosele importancia prioritaria a este grupo. Galeno (130-200 D.C.), desarrolló la farmacia galénica en la que incluyó plantas alopáticas y homeopáticas. Efectuó un control en el uso de

medicamentos (extracto, infusión y polvo) y estableció el término dosis.

En el Renacimiento el desarrollo de la Química, Física y Biología da lugar al crecimiento de la Farmacia Galénica que con el tiempo dió origen a la industria farmacéutica, en la que se emplean tanto productos naturales como sintéticos (Domínguez, 1976).

En México existen pocos estudios en terapia homeopática aunque hay médicos interesados en la investigación clínica homeopática, tal es el caso del Dr. Alfonso Jiménez Gómez y colaboradores. En el transcurso de su práctica profesional en el Sanatorio de Jesús, San Jerónimo, Gro., de donde él es Director, tuvo conocimiento de las propiedades curativas de la planta sometida a estudio en esta tesis. Para corroborar estas propiedades ha venido haciendo observaciones además de estudios experimentales, durante ocho años. Emplea un unguento, el cual prepara hirviendo medio kilo de planta aproximadamente (tallo, hojas, flor), en un litro de agua hasta reducir el líquido a la mitad de su volumen. Este preparado lo coloca en un frasco de suero de medio litro, procediendo a su esterilización, para después mezclar el concentrado con vaselina o lanolina.

La aplicación de este unguento se hace en voluntarios que tengan padecimientos de índole dérmico, como micosis cutánea a lo que cual se enfoca nuestro estudio, soriasis, liquen plano y cáncer. Al paciente se le indica que debe aplicarse el preparado tres veces al día, durante una semana. Como resultado de este tratamiento, en todos los casos se logró que el padecimiento desapareciera.

El Dr. Jiménez, proporcionó al laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM la planta y el concentrado acuoso de la hoja para -

hacer el análisis químico de la parte aérea de *Croton suberosus* (Sangre de toro) y un ensayo biológico para determinar actividad antifúngica del concentrado acuoso.

A continuación daremos un panorama general de los estudios que se han efectuado en torno al género *Croton*, agrupando esta información en 2 divisiones: Estudios químicos y actividad biológica.

1.- COMPOSICION QUIMICA

En el género *Croton* se han encontrado principalmente alcaloides, diterpenos, se ha determinado la composición de los aceites esenciales, así como el estudio en profundidad del aceite de *Croton*.

a) Alcaloides

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica más o menos intensa y diversa sobre los animales y el hombre.

En el reino vegetal, la aparición de los alcaloides no es constante. Se han encontrado en varias familias de plantas, aproximadamente en 256, en hongos, algas y otros vegetales inferiores, y en alrededor de 3 600, en dicotiledóneas. En la familia Euphorbiaceae, a la que pertenece nuestra especie, se conocen 104 alcaloides.

FAMILIA EUPHORBIACEAE

No. de alcaloides	Géneros de alcaloides	Géneros conocidos	Especies conocidas
104	22	220	4 000

Se ha tratado de conocer la función de éstos en las plantas, llegando a suponer que son productos del metabolismo del nitrógeno,

asi como de protección vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros. Existen, sin embargo, alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores pero no para los insectos.

En lo concerniente a su distribución en la planta, en ocasiones se encuentran restringidos a un cierto órgano, o a ciertas partes de la planta, o bien en toda ella. A veces se les encuentra sólo en alguna etapa de crecimiento o época del año (Domínguez, 1973).

Existen numerosos trabajos sobre alcaloides en la familia, sin embargo, solo mencionaremos aquéllos que se refieren al género *Croton*, al cual pertenece nuestra especie en estudio, y de la que no hay trabajos hasta hoy reportados sobre estos metabolitos.

En las especies de *Croton* estudiadas hasta ahora se han encontrado alcaloides del tipo morfinandienónico de importancia biogénica, como son los proaporfínicos; crotonosina y L (-)-N-metilcrotonosina, en *Croton linearis*, el precursor de la morfina, la salutaridina, en *C. salutaris* (Chambers, 1966).

Haynes y Stuart (1963) evaluaron las plantas usadas en la medicina tradicional jamaicana, efectuando pruebas preliminares de índole químico y farmacológico con *C. linearis* Jacq., y detectaron alcaloides en *C. sparsiflorus*, *C. flavens*, *C. glabellus* y *C. humilis*. De *C. linearis* obtuvieron homolinarisina, linearisina, y crotonosina como el componente principal.

Siguiendo con sus investigaciones, en 1966 estos mismos autores reportan la presencia de salutaridina y de un nuevo alcaloide, la norsinoacutina, en *C. balsamifera* Jacq. En 1967 aislan de *C. linearis* Jac., dos nuevos alcaloides, la 8,14-dihidrosalutaridina y la 8, 14-dihidronorsalutaridina y en 1968 establecen las estructuras de estos derivados morfinandiernónicos y reportan algunos estudios sobre la biosíntesis de la 8,14-dihidronorsalutaridina.

Barton y Kirby (1965) demostraron que la reticulina y algunos de sus precursores son intermediarios importantes del patrón de biosíntesis de alcaloides morfinandiernónicos. También se ha demostrado que aminoácidos aromáticos, como la fenilalanina, tirosina y dopa, son precursores primarios del esquema biosintético. Pero Haynes (1968) es el primero en demostrar que las bencilisoquinolinas oxigenadas, como la coclaurina, son también precursores, al incorporarse este compuesto tritiado en la 8,14-dihidronorsalutaridina biosintetizada en *Croton linearis*.

Dentro del grupo de los alcaloides morfinandiernónicos, se encuentran los proaporfínicos reducidos, como la linearisina y la jacularina, aislada por Stuart et al en 1968, también de *C. linearis*.

C. sparsiflorus es una especie nativa de América del Sur, que se introdujo en la India. De esta planta se han aislado alcaloides (Bhakuni y Dar, 1968-1969) de hoja y tallos, tales como la -

crotsparina. Es interesante hacer mención que los ejemplares colectados alrededor de Calcuta (Este de la India) dan crotsparina con rotación negativa, en tanto que la planta colectada en Lucknov (Norte Central de la India), da crotsparina con rotación positiva. Se encontró también en esta planta N-metilcrotsparina, crotsparinina, N-metilcrotsparinina, sparsiflorina y N-metilspar-siflorina.

La N-metilcrotsparina es un potente agente hipotensor, la - N-metilcrotsparinina produce un marcado descenso inicial de la presión arterial, seguido de una hipotensión gradual sostenida, y la N,O-dimetilcrotsparina y la N,O,O-trimetilspar-siflorina yodo metilada también tienen una marcada actividad hipotensora (Bhaku-ni y Jain, 1981). Presentan, además, un esquema de biosíntesis de alcaloides de *Croton*.

Efectuando trabajos con *Croton flavens* L., en hojas serradas y enteras, de plantas del área de Port Henderson, Jamaica, Cham-bers y Stuart (1968) encontraron que en la especie no existe homo-geneidad. La variedad de hoja serrada tuvo flavinina y norsinoacu-tina y la hoja entera, flavinantina, sinoacutina y norsinoacuti-na.

Por otra parte, en *C. flavens* del área de Mona, tanto las hojas serradas como las enteras producen flavinantina, sinoacuti-na y norsinoacutina. Estas diferencias pueden deberse a cambios estacionales o a los distintos suelos (Stuart y Woo-Ming, 1969).

Croton plumieri, colectado también en Port-Henderson y considerado como un híbrido de **C. linearis** y **C. flavens**, tiene crotonosina, L-N-metilcrotonosina, 8,14-dihidrosalutaridina y salutaridina, como alcaloides principales solubles en cloroformo y Stuart (1969) hace una comparación con los alcaloides que tienen - - - **C. linearis** y **C. flavens**.

En un estudio de **C. discolor**, Stuart et al (1970) encontraron alcaloides conocidos, la crotonosina, la 8,14-dihidrosalutaridina, la L-N-metilcrotonosina, y la linearisina, y un alcaloide nuevo la discolorina.

Dentro del género, **C. draconoides** es una planta de importancia entre los indígenas de las selvas de América del Sur. Esta planta produce un látex rojo sangre, de ahí su nombre vulgar, "Sangre de Draco". Usada como una medicina popular para curar heridas, su interés se extendió y se efectuaron estudios sobre los extractos de hojas y látex y confirmar su actividad curativa. Las hojas y ramas tienen dos aporfinas que no se habían encontrado en el género, la thaliporfina y la glaucina (Bettolo y Scarpati, 1979). En el látex, Bettolo y Scarpati (1979) encuentran un solo alcaloide, la taspina, de estructura poco común, encontrando también en **Croton lechlery**, que se considera como agente antiinflamatorio.

Más recientemente, de **C. bonplandianum** (Tiwari y col 1981) se aisló un alcaloide nuevo, la 3-metoxi-4,6-dihidroxi-morfinandi-7-ona y norsinoacutina. En el mismo año Barnes y Soeiro aislaron salutaridina, salutarina, y N-norsalutaridina de las hojas y tallos de **C. salutaris**.

En la tabla 1 se encuentran resumidas las especies de **Croton** estudiadas y sus respectivos alcaloides.

El punto de mayor interés que presentan los alcaloides aislados de **Croton**, además del farmacológico, ha sido la posibilidad que han brindado para seguir su biosíntesis, pudiendo establecerse relaciones biogenéticas entre los diversos compuestos. También se han hecho comparaciones entre los alcaloides en híbridos y en las especies parentales, con fines taxonómicos.

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
<i>C. balsamifera</i>	Salutaridina		Haynes, 1966
	Norsinoacutina		Chambers, 1966.
<i>C. bonplandianum</i>	Norsinoacutina		Chambers, 1966.
	3-metoxi-4,6-dihidroxi-morfinandien-7-uno-N-O-trimetilmetiodina.		Tiwari, 1981.
<i>C. discolor</i>	8,14-dihidronorsalutaridina		Haynes, 1967
	Crotonosina		Haynes, 1966
	8,14-dihidrosalutarina		Haynes, 1967
	Linearisina		Haynes, 1963
	Discolorina		Stuart, 1970

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

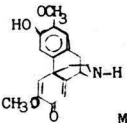
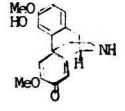
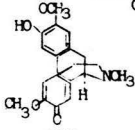
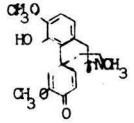
NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
C. draconoides	Thaliporfina		Wehmer, 1929 y Bettolo, 1979.
	Glaucina		Fischer, 1901 y Bettolo, 1979.
	Taspina		Platanova, 1954 y Bettolo, 1979.
C. flavens	Flavinina		Stuart, 1967.
	Norsinoacutina		Chambers, 1966.
	Flavinantina		Chambers, 1968.
	Sinoacutina		Chambers, 1968.

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

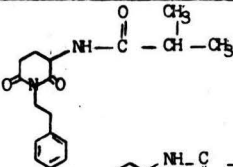
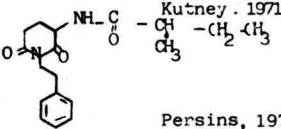

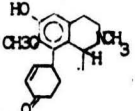
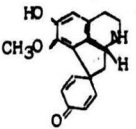
NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
C. hamilis	N-[N-(2metilpropanol) glutaminoil]-2 fenil etilamina		Kutney, 1971
	N-[N-(2metilbutanol) glutaminoil]-2 fenil etilamina		Kutney, 1971.
C. lechleri	Taspina		Persins, 1973
C. linearis	Homolinearisina		Haynes, 1963
	Linearisina		Haynes, 1966
	Crotonosina		Haynes, 1966
	Crotosina		Chambers C. 1966.

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
<i>C. linearis</i>	L-(-)-N-metilcrotonosina		Haynes, 1966
	8,14-dihidrosalutaridina.		Haynes, 1967.
	8,14-dihidronorsalutaridina.		Haynes, 1967
	Jacularina		Stuart, 1968
	N-O-diacetiljacularina		Stuart, 1968.
	Pronuciferina		Haynes, 1966.

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

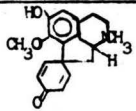
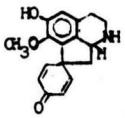
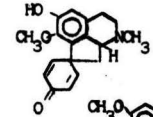
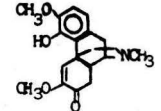
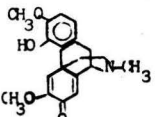
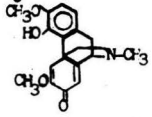
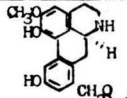
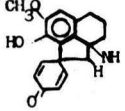
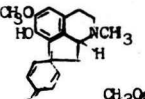
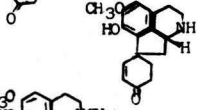
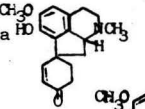
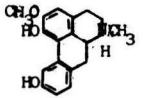
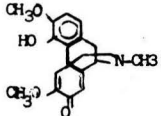
NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
C. linearis	L-N-metilcrotonosina		Haynes, 1966.
	Crotonosina		Haynes, 1966.
C. plumieri	L-N-metilcrotonosina		Haynes, 1966.
	8,14-dihidrosalutaridina.		Haynes, 1967.
	Salutaridina		Haynes, 1968
C. salutaris	Salutaridina		Haynes, 1968.
	Salutarina		Barnes, 1981.

TABLA 1. ALCALOIDES EN ESPECIES DE CROTON

NOMBRE DE LA ESPECIE	ALCALOIDES	FORMULAS	INVESTIGADORES
C. sparsiflorus	Sparsiflorina		Chatterjee, 1965
	Crotsparina		Bhakuni, 1968 y 1970
	N-metilcrotsparina		Bhakuni, 1970.
	Crotsparinina		Bhakuni, 1969.
	N-metilcrotsparinina		Bhakuni, 1969.
	N-metilsparsiflorina		Bhakuni, 1970.
C. stenophyllus	Salutaridina		Haynes, 1968.

b) Diterpenos

Los diterpenos son metabolitos secundarios que están constituidos por cuatro unidades de isopreno (C_{20}). Tienen estructuras muy diversas y son de gran interés tanto por su comportamiento químico como por sus propiedades biológicas entre las que destacan la actividad reguladora del crecimiento vegetal que tienen las giberelinas, la actividad antiúlcera péptica, la actividad antihelmíntica, dermatológica, propiedades co-carcinogénicas, antileucémicas, etc (Romo de Vivar, 1985).

En el curso de la búsqueda para encontrar sustancias de origen vegetal anti úlcera péptica, Ogiso y col., en 1978, investigan una medicina tradicional de Thailandia llamada Plau-noi. Esta medicina se prepara con tallos de *Croton sublyratus* y se usa como agente antihelmíntico y dermatológico. Los extractos de esta planta tienen actividad inhibitoria de la úlcera Shay en ratas y la úlcera inducida con reserpina en ratón.

Mediante una extracción selectiva estos mismos autores lograron aislar e identificar 18-hidroxigeranilgeraniol, con actividad contra la úlcera inducida con reserpina, y 5 nuevos furanoditerpenos, del tipo ent-clerodano, que denominaron plaunoles, con fuerte actividad anti úlcera Shay. Las pruebas farmacológicas demostraron que la actividad es debida a una disminución de la secreción gástrica en ratas Shay (Kitazawa et al, 1980).

Posteriormente, de la misma planta aislaron dos alcoholes diterpénicos, el ent-3,4-hidroxi-13-epimanol y el ent-16p, - - -

17, dihidroxi-kaurano (Kitazawa y Ogiso 1981), y un furanoditerpeno, el plaunólido (Takahashi et al, 1983).

Rojas y Rodríguez-Hahn establecieron en 1978 la estructura de una nueva lactona diterpénica con esqueleto del labdano, nombrada nivenólida, y aislada de *Croton niveus* proveniente de la Región de los Tuxtlas, Ver. En el mismo año, Chatterjee et al, publican la estructura de un nuevo furanoditerpeno (tipo norclerodano), -- aislado de la corteza del árbol de *C. caudatus* y al que denominan isocrotocaudina. En estudios anteriores ya habían reportado dos -- lactonas más, la crotocaudina y la teucvidina (Uchida y col, 1975).

De *C. diasii*, especie arbórea, se aisló un diterpeno labdánico con transposición en su esqueleto, la diasina, para la cual se propone una probable ruta biogenética (De Alvarenga, 1978).

Los diterpenos cembreno y casbano se consideran como precursores de una gran variedad de productos naturales. Entre los más importantes se encuentran los diterpenos derivados del casbano por ciclización transanular, que han demostrado ser responsables de las propiedades co-carcinógenicas, antileucémicas e irritantes que tienen ciertos miembros de la familia Euphorbiaceae. Ejemplos de estos son los ésteres del forbol (co-carcinogénicos) y la jantrofona (antileucémico).

Burke y Pascoe (1981) aislaron un diterpeno casbánico, la crotonitena, de hojas secas y tallos de *C. nitens*, siendo el primer derivado oxigenado del casbano que se encuentra como producto natural.

De *Croton sonderianus* se han aislado furanoditerpenos. En 1981, se encontró, en el extracto benzénico de la madera, un derivado del clerodano, la sonderianina (Craveiro et al), y en 1982 se aislaron dos nuevos diterpenos, derivados del cleistanano, sonderianol y 3,4-secosonderianol (Craveiro y Silveira, 1982).

TABLA 2. DITERPENOS EN ESPECIES DE CROTON

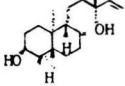
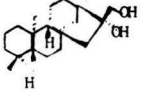

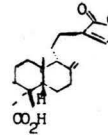
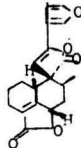
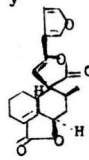
NOMBRE DE LA ESPECIE	DITERPENOS	FORMULAS	INVESTIGADORES
Croton sublyratus	18-hidroxigeranilgeraniol y 5 furano diterpenos		Ogiso, 1978.
	Ent-3 α -hidroxi-13 epimanol. Ent-16 β , 17-dihidroxi-aurano		Kitazawa y Ogiso 1981.
	Plaunólido		Takahashi, 1983.
Croton niveus	Nivenólida		Rojas y Rodriguez-Hahn, 1978.
	Isocrotocaudina		Chatterjee, 1978.
	Crotocaudina y		Uchida, 1975

TABLA 2. DITERPENOS EN ESPECIES DE CROTON

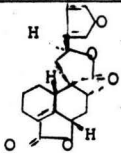
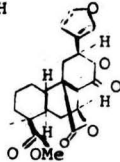

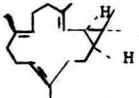
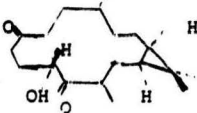
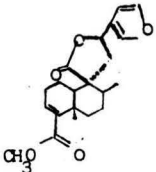
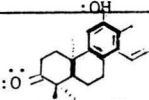
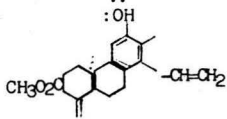
NOMBRE DE LA ESPECIE	DITERPENOS	FORMULAS	INVESTIGADORES
Croton niveus	Teucvidina		Uchida, 1975.
Croton diasii	Diasina		De Alvarenga, 1978.
Croton nitens	Cembreno		Dauben, 1975.
	Casbeno		Robinson 1970.
	Crotonitenona		Burke, 1981.
Croton sonderianus	Sonderianina		Craveiro, 1981.

TABLA. 2 DITERPENOS EN ESPECIES DE CROTON

NOMBRE DE LA ESPECIE	DITERPENOS	FORMULAS	INVESTIGADORES
C. sonderianus	Sonderianol y		Craveiro, 1982.
	3,4-secosonderianol		Craveiro, 1982.

c) Aceites Esenciales

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas. En un aceite pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos así como sus derivados oxigenados, v.gr., alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres, etc, sustancias azufradas y nitrogenadas.

Las esencias se producen en glándulas especiales formadas por células secretoras arregladas para formar una bolsa donde se acumula el aceite esencial (Domínguez, 1973). En cuanto a su distribución pueden encontrarse en cualquier órgano de la planta.

Su papel biológico en los vegetales es especulativo, algunas intervienen como hormonas de polinización; como atrayentes de insectos poleníferos; regulan la transpiración; son productos de desecho metabólico.

Craveiro y col. efectuaron, en 1981, un análisis de aceites esenciales de varias especies de la familia Euphorbiaceae, como parte de un programa de investigación química, basada en cromatografía de gases y espectrometría de masas, de la flora aromática del noroeste de Brasil, entre las que se encuentran nueve especies de **Croton**. Este trabajo se realizó debido a la alta incidencia y dispersión de las especies. En la tabla 3 se encuentra la composición química de aceites esenciales de las nueve especies de **Croton** que estudiaron.

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES DE CROTON

1. *Croton argyrophylloides*

Monoterpenoides

α-pineno	27.4
sabineno	41.1
Total	68.5

Sesquiterpenoides

β-cariofileno	4.5
β-elemeno	2.3
γ-elemeno	7.6
γ-humuleno	1.4
Total	15.8

No identificados 15.7

2. *Croton essequibensis*

Monoterpenoides

α-pineno	18.4
β-pineno	14.1
Total	32.5

Fenilpropanoides

t-anetolo	1.2
estragolo	0.6
Total	1.8

Sesquiterpenoides

α-humuleno	5.2
β-cariofileno	19.6
α-copaeno	0.6
α-cubebeno	0.4
β-elemeno	1.2
Total	27.0

No identificados 38.70

3. *Croton jacobinensis*

Monoterpenoides

α-terpinoleno	1.0
Total	1.0

Fenilpropanoides

t-anetolo	1.2
estragolo	0.6
Total	1.8

Sesquiterpenoides

aromadendreno	0.5
β-cariofileno	4.0
β-elemeno	28.0
γ-elemeno	33.8
δ-elemeno	2.8
α-farneseno	2.3
β-farneseno	0.5
α-humuleno	2.4
Total	74.3

No identifica do. 24.7

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES DE CROTON

4. <i>Croton micans</i>	5. <i>C. affinis mucronifolius</i>	6. <i>C. nepetaefolius</i>
<u>Monoterpenoides</u>	<u>Monoterpenoides</u>	<u>Monoterpenoides</u>
α-felandreno 1.1	car-3eno 1.6	α-pineno 1.5
mirreno 1.3	α-felandreno 1.2	β-pineno 1.5
α-pineno 7.9	α-pineno 1.2	sabineno 3.0
β-pineno 2.3	γ-terpinéno 2.0	1.8 cineolo 37.5
sabineno 0.6	β-cimeno 32.4	α-terpineol 4.0
α-thujeno 0.8	borneol 1.6	Total 47.5
Total 14.0	alcanfor 6.2	
<u>Sesquiterpenoides</u>	1.8-cineolo 2.7	<u>Fenilpropanoides</u>
β-cariofileno 19.0	ascaridolo 1.2	metileugenol 0.5
α-elemeno 14.2	iso-ascaridolo 28.9	n-propil-ca- 1.0
β-elemeno 6.8	Total 79.0	tecol
δ-elemeno 5.2		elemicina 4.0
α-farneseno 17.1		Total 5.5
α-humuleno 2.1		<u>Sesquiterpenoides</u>
Total 64.4		β-cariofi_ 23.0
		leno
		β-elemeno 1.0
		γ-elemeno 12.0
		δ-elemeno 4.5
		α-humuleno 2.0
		Total 42.5
No identificado 21.6	No identificado 21.0	No identifi_ 4.5
		cado

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES DE CROTON

7. *Croton rhamnifolius*

Monoterpenoides

car-3-eno	0.6
α -felandreno	9.9
sabineno	6.5
p-cimeno	20.3
1.8-cineolo	11.0
linalool	2.8
Total	53.80

Sesquiterpenoides

aromadendreno	3.3
β -cadineno	6.3
β -cariofileno	5.3
α -copaeno	0.8
α -cubebeno	1.1
γ -elemeno	3.6
α -humuleno	2.4
Total	22.8

No identifica- 23.4
do

8. *Croton sonderianus*

Monoterpenoides

car-3-eno	0.7
α -felandreno	2.9
mirreno	1.5
α -pineno	6.6
sabineno	1.5
α -terpinoleno	2.1
α -thujeno	0.7
p-cimeno	14.3
Total	30.3

Sesquiterpenoides

aromadendreno	3.2
γ -cadineno	2.2
β -cariofileno	24.4
β -elemeno	3.3
α -humuleno	2.7
Total	35.8

No identificado 33.9

9. *C. zehntneri* var. *anethole*

Monoterpenoides

mirreno	1.1
α -pineno	2.7
Total	3.8

Fenilpropanoides

t-aneloto	32.3
estragolo	52.4
Total	84.7

Sesquiterpenoides

β -cariofileno	1.1
γ -elemeno	5.9
γ -muroleno	1.6
Total	8.6

No identificado 2.9

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES DE CROTON

9b. *Croton zehntneri* var. eugenol

Monoterpenoides

γ-cimeno	2.9
geraniol	23.1
linalool	0.5
heral	13.7
Total	40.2

Fenilpropanoides

estragolo	0.5
eugenol	47.2
Total	47.7

Sesquiterpenoides

α-bergamopteno	6.1
β-cariofileno	1.7
γ-farneseno	0.9
δ-guayeno	0.9
Total	9.6
No identificado	2.5

d) Aceite de Croton

- Agentes carcinogénicos

Ya han transcurrido unos doscientos años desde que el cirujano londinense Percival Pott (Miller J.A., 1970) indicó que el cáncer escrotal de la piel en deshollinadores era debido a la exposición constante al hollín. Esta observación pasó inadvertida durante más de una centuria, hasta que Yamagiwa e Ichikawa, en 1915, hicieron renacer el interés en la observación de Pott al provocar cáncer en la oreja del conejo por aplicaciones repetidas de alquitrán de hulla. Después, Kennaway y Cook (Miller J.A., 1970) en una proeza monumental, extranjeron 50 g de un carcinógeno químicamente puro, el 3,4-benzopireno, de dos toneladas de alquitrán de hulla. Estos resultados indicaron la carcinogenicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Desde entonces, se ha comprobado que son carcinogénicos centenares de sustancias químicas.

Los hidrocarburos policíclicos se encuentran entre los carcinógenos más potentes; producen *in vitro* transformación neoplásica de diversos tipos celulares animales.

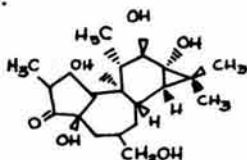
En este grupo los más importantes son : el 3-metilcolantreno, el 7,12-dimetil-bezantraceno, el dibenz-(a,h)-antraceno y el 3,4-benzopireno (Robbins y Angell, 1985).

- Propiedades del Aceite de Croton

El aceite de Croton es una sustancia que posee una actividad oncológica muy particular. El de *Croton tiglium* o sus constituyen-

tes activos (Crombie, 1968), fomenta el desarrollo de tumores después de la aplicación de una dosis, a bajos niveles, de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno.

Los componentes activos resinosos del aceite de **Croton** están constituidos por ésteres de ácidos grasos del forbol. El forbol es un sólido cristalino, no tóxico y fue aislado por primera vez por Böhm y Flaschentriger (1934). Estos autores hacen notar que el principio inflamatorio no es el forbol libre, sino sus ésteres de ácidos grasos. Información adicional Batsch et al. (1966) propone que el agente co-carcinogénico debe ser el 11,12 diester, con ácidos grasos de cadena larga como el decanoico, láurico, mirístico y palmítico. En 1981, Cairnes y col., sostienen que el principio activo es el 12-O-tetradecanoil-13 acetato de forbol que se obtiene por biosíntesis parcial a partir del forbol que ha sido inyectado intraperitonealmente en ratones y ratas, induciendo varios carcinomas y leucemias.



ESTRUCTURA DEL FORBOL

Debemos a Berenblum (1941) la observación fundamental de que los fomentadores, que por sí mismos no tienen carcinogenicidad - importante, pueden actuar como co-carcinogénicos. Demostró que dosis no oncógenas de un carcinógeno producen tumores cuando van seguidas de aplicación de aceite de **Croton** (principio activo, éster

del forbol) o de fenol, que prácticamente no son carcinógenos - (Robbins y col., 1985).

Frei y Ritchie, en 1962, mencionan dos alternativas para la acción del aceite de **Croton**;

- 1) La aplicación inicial del carcinógeno produce diferentes - clases de células iniciadoras. El aceite de **Croton** hace al gunas de éstas más fácilmente visibles como tumores, que otras (Hipótesis propuesta por Shubik, Baserga y Ritchie, 1953).
- 2) El aceite de **Croton** puede ser capaz de llevar a las células iniciadoras por varios caminos. Puede permitir el crecimiento de células iniciadoras a papilomas, o bien, puede impedir su crecimiento, Una concentración elevada del - aceite de **Croton** favorece la oportunidad de cambios tumora les, sin embargo, una concentración baja incrementa la posibilidad de bloquear el crecimiento (hipótesis propuesta por Friedewald y Rous, 1944). Frei y Ritchie, 1962, aceptan estas dos hipótesis, aunque el aceite de **Croton** no hace visibles a todas las células iniciadoras, como papilomas.

Hoy en día el carcinógeno se llama iniciador y el aceite de **Croton** fomentador. Es patente que la acción principal del fo mentador es estimular la duplicación celular. De manera análoga, la lesión y la reparación tisulares, la hiperplasia no neoplásica y otros procesos de replicación celular brindan terreno para

la acción de los carcinógenos químicos.

Capacidad anticancerígena del aceite de Croton

Yarkoni y col., en 1979. administraron intralesionalmente aceite de **Croton** o 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) dentro de trasplantes sinérgicos de fibrosarcoma murino 1023, causando completa regresión de los tumores provocados en ratones C_3H , sin recurrencia durante el período de observación. El tratamiento con aceite de **Croton** sólo retarda el desarrollo de la enfermedad metastásica, aunque en los tumores de piel no recurre.

Varios experimentos demostraron que el TPA (principio activo del aceite de **Croton**) necesita de aceite para causar una regresión del tumor. Esto explica porqué el TPA, en solución de acetona, cuando se aplica sobre la piel del ratón, causa, regresión del tumor, en menor orden. La actividad de regresión del tumor en emulsión con aceite mineral es cerca de 60 veces más alto que la actividad del aceite de **Croton**. Dosis de 0.3 mg de aceite de **Croton** cura similar número de ratones que 0.005 mg de TPA en emulsión con aceites minerales. La potencia del TPA radica, pues, en el vehículo en el cual está incorporado.

2.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Además de la actividad antifúngica que presenta **Croton suberosus**, mencionada en los antecedentes, y de la co- y anticarcinogénica, se ha visto que dentro del género hay especies que tienen actividades diversas.

En 1981, Craveiro y col., efectuaron pruebas de actividad anti-tibiótica frente a *Micobacterium smegmatis* y *Staphylococcus aureus* con el extracto benzénico de *Croton sonderianus*, y obtuvieron resultados positivos.

Continuando con los trabajos de extractos con actividad anti-biótica, Monte (1984), investigó *C. argyrophyloides*. De esta planta se trabajaron las raíces, y no se reportan resultados.

En 1977, Deshmukh y Borle evaluaron la actividad insecticida de suspensiones de extractos etéreos de varias plantas, entre ellas mencionan a *C. tiglium*, sobre las larvas de *Spodoptera litura*, - *Prodenia litura*, hembras de *Uroleucon carthami* y *Dactynotus carthami*, y encontraron que estos extractos fueron más activos frente a - - - *U. carthami* que frente a *S. litura*.

Stillmark reportó en 1888, la presencia de una lectina en semillas de *C. tiglium*, la crotina, que posee propiedades tóxicas, hemolíticas y hemaglutinantes.

III. GENERALIDADES SOBRE LOS DERMATOFITOS EMPLEADOS EN LA PRUEBA BIOLÓGICA

Los hongos, a diferencia en mayor o en menor grado de las bacterias y de los virus, no tienen un medicamento totalmente eficaz y no tóxico, aún en la actualidad, y siempre es necesario hacer un tratamiento de varios meses y aún proseguirlo largo tiempo después de la cura clínica.

La dificultad para el tratamiento radica en la propia naturaleza del hongo y en el ambiente que forma cuando parasita al organismo. Si bien los hongos están constituidos por una membrana celular, a veces quitinosa, gruesa y resistente, en ocasiones tienen una envoltura mucilaginosa, prácticamente impenetrable a la acción de cualquier medicamento.

Las micosis se vienen sufriendo y combatiendo desde la antigüedad. En la Edad Media, las tiñas se combatían mediante unguentos y electuarios, pero el procedimiento más eficaz era un método consistente en un casquete de pez, que se atribuyó a Heliodoro y que fue ampliamente preconizado en el siglo XVIII.

Existe una gran variedad de métodos antifúngicos, y éstos pueden ser físicos, químicos y antibióticos.

El tratamiento de los dermatofitos, y especialmente el de las tiñas, se facilitó gracias a la aplicación médica de la griseofulvina, descubierta en 1938 en cultivos de *Penicillium griseofulvin*. Otros investigadores hallaron que los filtrados de *Penicillium janczewskii* también modificaba las extremidades de muchas especies de hongos, produciendo formas espiraladas (factor rizante) (Ulloa y col, 1978). Posteriormente se aislaron dos

sustancias antifúngicas de cepas de **Streptomyces**, la lucensomisina y la anfotericina B.

Conforme han pasado los años, la información sobre plantas con propiedades antifúngicas se ha ido acumulando. Sin embargo, los estudios científicos acerca de este tema son escasos. El campo sobre estos conocimientos está restringido a la medicina popular, tal es el caso de **Croton suberosus**, - que posee propiedades antifúngicas.

a) Ubicación taxonómica

Reino	Fungi
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	Trichophyton
Especies	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum

(Ulloa y Hanlin, 1978).

- Características de la Subdivisión Deuteromycotina

En los deuteromicetes (hongos imperfectos), el desarrollo completo se realiza sin cambiar sus fases nucleares, siendo las más de las veces haploides. Se desconocen en ellos formas reproductoras sexuales, "carencia de la fase reproductora principal". Sin embargo, existe correspondencia entre determinados Deuteromicetes y ~~Ascom~~micetes, que sí tienen reproducción sexual. Tal relación se manifiesta en tipos de hifas y de -

septos , composición química de las paredes celulares y constitución del DNA.

Recientemente se ha encontrado que algunos Deuteromicetes producen estados sexuales en el suelo. El estado sexual de **Trichophyton** es --- **Arthroderma** (Deacon, 1980).

Un organismo puede desarrollar varias formas de reproducción:

- **Conidios.**- Los conidios son formas asexuadas, sin movimiento propio, que pueden servir para la propagación de los hongos. Cada conidio se forma mediante germinación celular típica o por fragmentación de hifas (exosporos).

En los dermatofitos aparecen frecuentemente pequeños conidios unicelulares (microconidios), paralelamente con otros conidios mayores y tabicados (macroconidios), que dan aspecto característico a los aleuroconidios (forman masas y las colonias parecen estar recubiertas por harina; aleuron). (Fig. 1).

Los conidióforos son los portadores de los conidios.

Los conidios no suelen formarse directamente sobre los conidióforos sino que surgen de células especiales formadoras de conidios (fialides, anelides). (Müller y Loeffler, 1976).

- **Hifas.**- Son los filamentos que constituyen el talo pluricelular o micelio (Fig. 2).
- **Blastosporos.**- Son los esporos asexuados originados por brotación o germación (Fig. 3).
- **Artrosporos.**- Esporos asexuados originados por fragmentación de un talo o una hifa (Fig. 4).

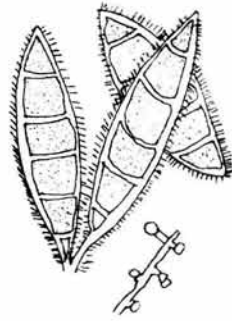


Fig. 1 Macroconidias y Microconidias

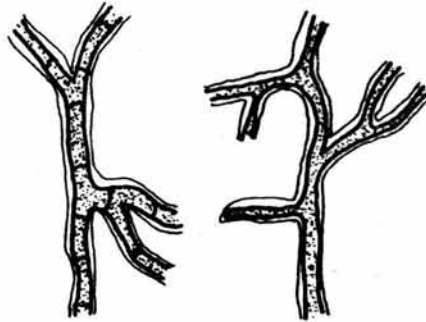


Fig. 2 Hifas



Fig. 3 Blastosporos

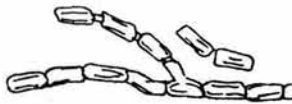


Fig. 4 Artrosporos

b) Descripción específica de las especies

- 1.- **Trichophyton mentagrophytes** = (**Arthroderma benhamiae**)
(Ajello y Cheng, 1967).

Aparición de talos:

Blancos, yesosos o algodonosos, con o sin pigmento en su reverso.

Microscopía:

Se observan abundantes microconidias redondeadas y escasas microconidias piriformes; abundantes espirales y escasas macroconidias rudimentarias.

Medios:

Agar Sabouraud Dextrosa.

Enfermedades que produce:

Este hongo produce la **Tinea barbae**, **Tinea corporis**, **Tinea cruris** y **Tinea pedis**.

Localización geográfica:

Es el más comúnmente aislado en Argentina, Chile, Uruguay y Brasil.

Sinonimias:

Trichophyton gypseum

Trichophyton granulosum

Trichophyton quinckeanum

2.- *Trichophyton rubrum* = (*Arthroderma simii*) (Young, 1968)

Aparición de talos:

Blancos, algodonosos, con un pigmento rojo vinoso en su reverso, que aparece después de 15 a 20 días de incubación.

Microscopía:

Abundantes microconidias piriformes, agrupadas en racimos sobre las hifas; a veces se originan macroconidias en forma de lápiz con 8 a 10 células.

Medios:

Agar Sabouraud Dextrosa con o sin antibióticos.

Enfermedades que produce:

Este hongo produce la *Tinea cruris*, siendo un intertigo dermatofítico de la zona crural que se extiende en la cara interna de los muslos; aparecen placas escamosas, rojizas, con bordes de un rojo más intenso y con vesículas. Produce también *Tinea pedis*, comúnmente denominada pie de atleta crónico, presentando lesiones de tipo dermatitis exfoliativa descamativa, faltando el componente inflamatorio.

Localización geográfica:

En todo el mundo.

(D'alessandro, 1976).

Sinonimias:

Trichophyton purpureum

Trichophyton rubidum

Trichophyton megnini

Trichophyton rosaceum

3. **Trichophyton concentricum**

Aparición de talos:

Blancos, café, café naranja; el crecimiento es lento.

Microscopía:

Ramas de hifas enredadas, sin microconidios o macroconidios, los brazos terminales usualmente sin el hinchamiento de las cabezas. No se conoce estado perfecto.

Medios:

Agar Sabouraud Dextrosa. Esta variedad es usualmente estimulada por la tiamina.

Enfermedades que produce:

Este hongo produce la **Tinea corporis** y la **Tinea imbricata**

Localización geográfica:

La enfermedad que este hongo produce sólo aparece en la gente nativa de las Islas del Pacífico Sur y lugares adyacentes, así como en los aborígenes del Sur de Asia, siendo una enfermedad endémica. Se han reportado casos en Guatemala, Sureste de México y Brasil Central. Raramente aparece en Europeos.



Fig. 5 Macroconidias

Trichophyton mentagrophytes

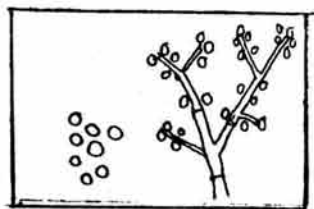


Fig. 6 Microconidias

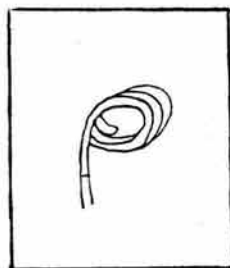


Fig. 7 Hifas espiraladas

Esquemas de órganos de fructificación ; Macro y microconidias e hifas espiraladas

Trichophyton rubrum

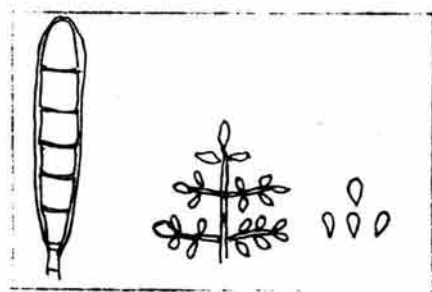


Fig. 8.

Esquema de los órganos de fructificación: Macro y microconidias piriformes.

TABLA 4. CARACTERISTICAS GENERALES DE *Trichophyton mentagrophytes*

Hongo	Animales Afectados	Examen con la Lampara Wood	Raspados de Piel	Pelo
T. mentagrophytes	Perros, conejos, gatos, chinchilla, cobayos y ratones	No hay fluorescencia	Micelio y cadenas de artrosporas.	Vainas o cadena aisladas de esporas, 3-5 en la superficie del pelo. Micelio dentro del pelo.
Enfermedad en el Hombre	Colonia Agar-Sabouraud con y sin antibióticos	Características Microscópicas		

La causa más común de dermatofitosis intertriginosa del pie, tinea de la piel lisa, foliculitis supurativa en cuero cabelludo y barba y onicomicosis.

Crecimiento rápido, colonias planas y juntas e irregularmente plegadas. Superficie gruesa granular a pulverulenta o vellosa o de aspecto de algodón, blanco a crema, algunas veces amarillo o rosa. El reverso de la colonia, café rosado, ocasionalmente naranja amarillento o rojo intenso.

Microconidias pequeñas, numerosas, globulares a delgadas y alargadas (Fig.6). Situadas individualmente a lo largo de las hifas o en cúmulos terminales en forma de pino. Macroconidias raras o abundantes en algunas cepas, ligeramente en forma de clava huso o largas y casi en forma de lápiz (Fig 5). Espirales estrechamente enrolladas. Los cuerpos nodulares pueden ser numerosos. (Fig 7).

(Jungerman y Schwartzman, 1977).

TABLA 5. CARACTERISTICAS GENERALES DE *Trichophyton rubrum*.

Hongo	Animales Afectados	Examen con la Lampara Wood	Raspados de Piel	Pelo
T. rubrum	Perros y bovinos	No hay fluorescencia	Micelio ramificado	La invasión de pelo es rara. En los animales de experimentación, se han observado cadenas de esporas fuera del pelo y micelio dentro de él.
Enfermedad en el Hombre	Colonia Agar-Sabouraud con y sin antibióticos	Características microscópicas		
Lesiones de tipo psoriasis de la piel lisa, onicomosis, foliculitis supurativa, leve en la barba, y -- Tinea manuum . Este hongo -- también produce pie de -- atleta crónico, presentando lesiones tipo dermatitis exfoliativa descamativa, faltando el componente inflamatorio.	Crecimiento lento, colonias planas o agrupadas, con una superficie blanca o plumosa, cepas ocasionalmente con una superficie pulverulenta, -- aterciopelada, que se vuelve plegada; tales cepas son al principio color blanco o crema, pero después se vuelven rosa intenso. El lado inverso de la mayor parte de los aislamientos muestran una -- pigmentación roja o roja pura intensa. Esta desaparece en los subcultivos, pero puede ser naranja amarillento.	Microconidias raras en la mayor parte de las cepas plumosas, delgadas y delicadas, presentándose sólo a los lados de las hifas. Microconidias comunes en cepas aterciopeladas o granulares, más globosas y -- presentándose a lo largo del micelio y en grupos parecidos a pinos. Macroconidios raros en la mayoría de las cepas, pero comunes en cultivos granulares, generalmente alargadas y -- delgadas, con lados paralelos y extremos redondeados, de tres a ocho células (Fig 8).		

(Jungerman y Schwartzman, 1977).

c) Pruebas micológicas

Muchos autores han publicado el uso de drogas citotóxicas, corticosteroides y antibióticos, en contra de infecciones sistemáticas de dermatofitos. Así, tenemos un estudio de diecinueve 1,4-naftoquinonas, efectuado por Oster y Golden (1948), en el que encuentran 8 derivados que inhiben a *Trichophyton mentagrophytes*, siendo la 2-metil-1,4-naftoquinonas la mas efectiva. Ambrogi y col, (1970) demuestran que en una serie de 2,3-alkil-cloro-1,4-naftoquinonas, el orden de toxicidad es el siguiente: isopropil > ter-butyl > etil > metil > propil > isobutil (insoluble) = pentil (insoluble, al cual *T. mentagrophytes* mostró mucha sensibilidad.

Gershon y Shanks (1975) citan que muchos ácidos grasos poseen - también propiedades antifúngicas y señalan que varios factores afectan la fungotoxicidad, entre los cuales se encuentran, la cadena larga, el pH del medio, y la presencia o ausencia del absorbente, como suero de albúmina.

Un año más tarde estos autores mencionan que existen escasos estudios sobre ácidos α -alcanodicarboxílicos y sus ésteres metílicos que pueden ser de interés para determinar el efecto de la esterificación sobre la fungotoxicidad del ácido dicarboxílico y para hacer una comparación de su actividad con la de ácidos monocarboxílicos y sus respectivos ésteres metílicos. Treinta ácidos α -alcanodicarboxílicos - (C_2 - C_{12} , C_{14} y C_{16}) y sus ésteres metílicos se probaron en presencia de *T. mentagrophytes*. La fungotoxicidad de estos ácidos fue la siguiente: C_9 C_{10} C_{11} C_{12} = C_8 C_7 C_6 C_5 C_4 C_3 y se vió influida por la longitud de

la cadena y no por el pH (Gershon y Shanks, 1976).

Todos los fármacos que aparecen en la literatura inhiben el crecimiento del hongo pero las esporas permanecen viables, apareciendo una recurrencia de la enfermedad, cuando la administración es discontinua (Hashimoto y Blumenthal, 1978).

En la literatura tradicional existen muchos estudios sobre ensayos microbiológicos para probar múltiples agentes antifúngicos, incluidos dentro del medio de crecimiento (caldo o agar) (Gentles, 1967; Gershon, 1975; Simon, 1977).

IV. UBICACION TAXONOMICA DE Croton suberosus

a) Clasificación

Reino	Plantae
División	Embryophyta Siphonógama
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Geraniales
Familia	Euphorbiaceae
Género	Croton
Especie	Croton suberosus H. B.K.

Sinonimia

Oxydectes suberosa O. Ktze Rev. Gen. 2:613, 1891.
según Gray Herbarium Card Index.

b) Descripción del género

Croton.— Flores unisexuales, monoicas, o dioicas frecuentemente con corola. Flores masculinas con cáliz, 5-partido o 5-lobulado; pétalos del largo del cáliz o más cortos, a veces suprimidos. Estambres indefinidos libres, con los filamentos inflexos con el botón, luego erectos. Flores femeninas con los sépalos muy angostos, los pétalos menores, a veces ausentes. Ovario trilobular, con un óvulo en cada lóculo, estilos 3, bífidos o multífidos. La cápsula se deshace en 3 cocos bivalvos. Plantas sufruticosas, arbustos cubiertos de pelos estrellados (Sánchez, 1980).

Este género es uno de los más típicos y abundantes en la vegetación secundaria de las regiones cálidas mexicanas y, por lo mismo, se encuentra ampliamente distribuido (Gómez Pompa, 1966).

c) Descripción específica

Croton suberosus es un arbusto que puede llegar a medir hasta tres metros, aproximadamente. Su distribución no es homogénea. Humbolt y Bonpland (1817) citan esta planta, que es propia de Acapulco y litorales del Océano Pacífico, floreciendo en abril. Domínguez (1985) menciona que es más abundante en sitios con fuerte perturbación ecológica, encontrándose que existen diferencias muy marcadas entre las plantas que se establecen en la selva y las de los claros.

C. suberosus es un arbusto que se ramifica a partir de cierta altura del tronco principal; la intensidad de la ramificación depende, al parecer, de factores ambientales que afectan también la altura en que la planta comienza a ramificarse. Sus ramillas son blanquecinas, con tomento caidizo, de pelos rectos, elongados y dendríticos, hasta de 2 mm de largo; hojas tomentosas por debajo, conspicuamente bicoloreadas; estípulas persistentes, linear subuladas, de 1-2 cm de largo, peciolo de 2 - 3.5 cm de largo o brotes vigorosos de 6 - 9 cm (McVaugh, 1961) (Fig. 9).

Son individuos monoicos, observándose que algunos producen flores terminales de las ramas, y conforme éstas crecen se producen más inflorescencias. Todas las inflorescencias presentan los dos tipos de flor, aunque las flores femeninas se localizan sólo en la parte inferior, mientras que en los rangos superiores de la inflorescencia se producen sólo flores masculinas. El desarrollo de las flores ocurre de abajo hacia la parte superior, por lo que las flores femeninas maduran antes que las masculinas.

Las flores femeninas son poco vistosas, de color verde; su rasgo más característico son los estilos, que se originan en forma radial sobre el ovario y dan la impresión de tentáculos (Fig. 10a). Esta apariencia resulta de la existencia de tres pistilos, cada uno de ellos con los estilos divididos dos o tres veces; la longitud de los estilos es aproximadamente de 0.75 cm. La longitud de la flor, desde la inserción de los tépalos hasta la inser-

ción de los estilos, es , en promedio , de 0.5 cm. El ovario representa, después de los estilos, la parte más sobresaliente de la flor, en todos los casos con tres carpelos unilobulados, como es característica de la familia Euphorbiaceae.

Las flores masculinas son más vistosas, de color blanco y característicamente tienen 15 estambres. La longitud de la flor, desde la inserción de los sépalos hasta el extremo de los estambres, es de 0.5 cm (Fig 10b). pag. 49.

LOCALIDAD GEOGRAFICA

d) Distribución

Esta especie ha sido reportada en México , en la costa suroeste del Estado de Jalisco, a la altura del del Km 59 de la carretera Barra de Navidad - Puerto Vallarta, dentro del Municipio de la Huerta, (Domínguez, 1985), en Michoacán (Caleta de Campos, Municipio Lázaro Cárdenas), así como en el Estado de Guerrero (San Jerónimo). Se describe como un arbusto que puede llegar a medir hasta tres metros, aproximadamente, flor blanca, - fruto verde, látex rojo, que crece cerca de la playa en suelo rocoso. Se ha encontrado que su distribución no es homogénea . De esta manera es - más abundante en sitios con fuerte perturbación (Domínguez, 1985).

El tipo de vegetación del área es secundaria, de Selva Mediana Subcaducifolia.

e) Lugar de Colecta

La colecta del material se efectuó en San Jerónimo , entre Atoyac de Alvarez y Tecpan, en el Estado de Guerrero, con vegetación circundante Selva Baja Caducifolia (Carta del uso de suelo y vegetación. Escala 1:1 000 000, México. SPP. DGGTN: 1981), encontrándose a 100° 30' de -

longitud Norte y 17° 10' de latitud Norte .

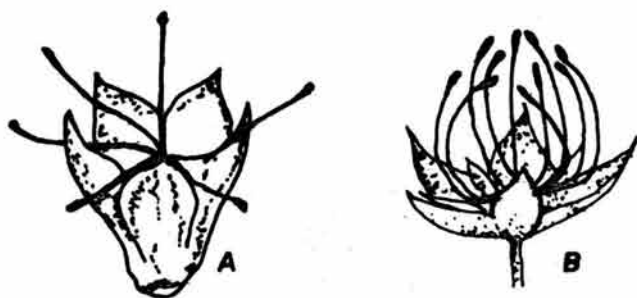
El tipo de clima es AW o (w) ig. Cálido subhúmedo, con una isoterma de 26°C y una isoyeta de 1200 mppa (Carta de clima 1: 500 000, México Acapulco 14 Q-VII; SPP DGGTN, 1970).

Su precipitación media anual es de 1 000 mm durante 15 años.

El tipo de suelo que encontramos en San Jerónimo pertenece al tipo Hh + Be/2.



Fig. 9. Ramificación del tronco y hojas lineares-subuladas de *Croton suberosus*.



Características morfológicas de las flores de *Croton suberosus*
A-Flores femeninas, B-Flores masculinas

Fig. 10a

y

Fig. 10b.

V. MATERIAL Y METODOS

I.- PARTE QUINICA

1.- Preparación del material

1.1 Colecta

1.2 Secado

1.3 Molienda

2.- Extracciones:

2.1.- Selectiva por el Método de Soxhlet con:

- Hexano

- Acetato de etilo

- Metanol

2.2.- Con etanol, para alcaloides

2.3.- Acida en frío, con ácido acético al 2%, para alcaloides.

2.4.- Con éter en frío, para aceites esenciales.

3.- Análisis de los extractos

3.1.- Determinación del número de componentes de los extractos mediante cromatografía en capa fina.

3.2.- Identificación de familias de compuestos.

- Presencia de glucósidos con la prueba de Mölich.

- Presencia de alcaloides con la prueba de Dragendorff y la Prueba de ácido silicotúngstico.

- Presencia de flavonoides con la prueba de Shinoda.

- Presencia de fenoles con la prueba de FeCl_3 etanólico.

- Presencia de terpenos y esteroides con la Prueba de Liebermann-Buchard.

- 3.3.- Aislamiento de sustancias
 - Por cromatografía en columna de gel de sílice.
 - Por precipitación.

- 3.4.- Purificación de los compuestos aislados por:
 - Cristalización.

- 4.- Caracterización de los compuestos aislados.

- 4.1.- Propiedades físicas
 - Solubilidad en diferentes disolventes
 - Punto de fusión

- 4.2.- Análisis espectrométricos
 - Espectros en el Ultravioleta
 - Espectros en el Infrarrojo
 - Espectros de Resonancia Magnética Nuclear

- 4.3.- Análisis por cromatografía de gases del aceite esencial, obtenido del extracto etéreo , y de algunas fracciones de la cromatografía del mismo.

- 4.4.- Análisis de la cera del extracto hexánico.
 - Saponificación
 - Obtención de los ésteres metílicos
 - Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

II. - PARTE BIOLÓGICA

1.- Material

- a) Extractos probados
- b) Organismos empleados

2.- Desarrollo

- a) Metodología para los extractos hexánico, etéreo y de acetato de etilo.
- b) Metodología para los extractos metanólico y acuoso

M E T O D O L O G I A

I. PARTE QUINICA

1.- PREPARACION DEL MATERIAL

1.1.- Colecta

El material utilizado se obtuvo de dos colectas: La primera se efectuó en el mes de julio de 1984, en los alrededores del poblado de San Jerónimo, Gro.,. Los ejemplares se cortaron en secciones, incluyendo tallos, hojas y flores. Cada una de las secciones se envolvió en papel periódico para que se conservaran durante el trayecto de regreso a la Ciudad de México. La segunda colecta se hizo en el Ciruelar, en el Km 77 de la carretera Acapulco-Zihuatanejo, en el mes de febrero de 1985. Esta colecta se efectuó con el propósito de obtener ejemplares frescos (hojas) para su inmediata extracción etérea. El ejemplar de herbario se encuentra depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) y fue identificado por el Biol. Jaime Jiménez.

1.2.- Secado

En la primera colecta el secado del material se hizo atando cada rama, con sus respectivas hojas, a una cuerda hasta formar una larga hilera, y sujetando cada uno de los extremos de la cuerda a la pared, de tal forma que las ramas colgaran. El secado se hizo a temperatura ambiente. Una vez secas las ramas, se separaron las hojas del tallo. En la segunda colecta, no hubo necesidad de secar las hojas, puesto que procedimos a trabajarlas frescas para su extracción etérea.

1.3.- Molienda

Se introdujeron las hojas en un molino de manivela para pulverizarlas.

2.- EXTRACCIONES

2.1.- Selectiva por el Método de Soxhlet

La hoja molida (70.8g), se extrajo por el método de Soxhlet (500 ml. 3 veces, 8 hs) con tres disolventes de polaridad creciente: hexáno, acetato de etilo y metanol. Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida, en un rotavapor, para obtener los extractos secos, sus rendimientos se anotan a continuación.

TABLA 5

Extracción con :	Cantidad de hoja extraída (g)	Cantidad de Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	1a 70.8	4.8349	3.8865
	2a 53.8		
Acetato de etilo	70.8	1.608	2.2711
Metanol	70.8	9.8571	13.9224

2.2.- Extracción con etanol para determinar presencia de alcaloides (Bettolo y Scarpati, 1979).

La hoja seca (22.1 g) se extrajo con etanol en aparato de Soxhlet (500 ml, 3 veces, 8 hs). El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, sin llegar a sequedad. Del extracto etanólico, concentrado a 100 ml, se tomaron dos alicuotas de 20 ml cada uno. El primero se alcalinizó con 5 ml de NaOH al 10%, pH 11, formándose un precipitado color café, el cual se extrajo de la solución etanólica con éter etílico. El éter se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en agua clorhídrica para efectuar la prueba de alcaloides con ácido silico-

túngstico y reactivo de Dragendorff . Ambas resultaron positivas. Se hizo también una cromatografía en placa delgada, eluyendo con CHCl_3 -MeOH 9:1 y revelando con reactivo de Dragendorff, en la que se apreciaron tres manchas. El segundo volumen se alcalinizó con 10 ml de NH_4OH al 10% y se extrajo igualmente con éter etílico. El extracto etéreo se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con Na_2SO_4 y el éter se evaporó a sequedad. Sobre este extracto se efectuaron las pruebas de alcaloides con ácido silicotúngstico (+) y reactivo de Dragendorff (-). Se hizo también una cromatografía en placa delgada, eluida con CHCl_3 - MeOH 9:1 y revelada con reactivo de Dragendorff, en la que se apreciaron 10 manchas , correspondientes a alcaloides.

- 2.3.- Extracción ácida en frío, con ácido acético al 10%, para determinar presencia de alcaloides (Tiwari, 1981).

A la hoja de *Croton suberosus* (1g), finamente molida, se le añadieron 50 ml de ácido acético al 2%, dejándose la mezcla con agitación durante 24 horas. Posteriormente se filtró, separando la hoja extraída de la solución ácida. El extracto se alcalinizó con NH_4OH al 25%, a pH 9, se dividió en dos partes iguales. La primera parte se extrajo con CHCl_3 (25 ml, tres veces). El extracto, constituido por una mezcla de alcaloides, mostró cuatro manchas en cromatografía en capa delgada, eluida con acetato de etilo y revelada con reactivo de Dragendorff. La segunda parte se extrajo con éter etílico (25 ml, 3 veces). El extracto mostró 4 manchas en cromatografía en capa delgada, eluida con acetato de etilo y revelada con reactivo de Dragendorff.

- 2.4.- Extracción con éter, en frío, para la obtención de aceites esenciales.

El material fresco (20.5 g de hojas cortadas en cuadros pequeños)

--- se extrajo con éter etílico, en frío (2 litros, 2 veces, 48 hs).
 El volúmen del extracto se redujo a 300 ml, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente hasta sequedad.

Extracción con:	Peso de la hoja (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Eter etílico	20.5	2.98	1.45

3.- ANALISIS DE LOS EXTRACTOS

3.1. Determinación del número aproximado de componentes de los cuatro extractos analizados mediante cromatografía en capa fina.

Las determinaciones se hicieron en placa delgada de gel de sílice, Merck G-60, con el objeto de determinar la complejidad de los extractos. Se emplearon los siguientes eluyentes:

- Para el extracto hexánico
 Hexano-Acetato de etilo 8:2 (Fig. 11 a).
- Para el extracto etéreo
 Hexano-Acetato de etilo 8:2 (Fig. 11 b).
- Para el extracto de acetato de etilo
 Cloroformo (Fig. 12 a).
- Para el extracto metanólico
 Metanol-Acetato de etilo 7:3 (Fig. 12 b).

3.2 Identificación de familias de compuestos

A los extractos hexánico, etéreo, de acetato de etilo y metanólico, les fueron practicadas las pruebas de coloración y de precipitación para la caracterización de familias de compuestos.

- Prueba de Mölisch (presencia de glucósidos)

Se disolvieron 0.5 mg del extracto en prueba en 1 ml de etanol, procediendo en seguida a agregar dos gotas de solución de α -naftol al 5%, en etanol, y 1 ml de H_2SO_4 concentrado, dejándolo resbalar poco a poco por las paredes, de tal manera que el ácido y la solución se estratificaron. En la prueba positiva hubo formación de un anillo violeta en la interfase (Tabla 6), pag. 59.

- Prueba de Dragendorff (presencia de alcaloides)

A 0.5 mg de extracto, disueltos en 1 ml de metanol, se le adicionaron 1 ml de HCl al 10% y dos gotas de reactivo de Dragendorff. La formación de precipitado color marrón indica la presencia de alcaloides (Tabla 6), pag 59.

- Prueba con ácido silicotúngstico (presencia de alcaloides)

A 0.5 mg de extracto, disueltos en 1 ml de metanol, se le adicionó 1 ml de HCl al 10% más dos gotas de reactivo de ácido silicotúngstico. La prueba es positiva si se forma un precipitado (Tabla 6), pag 59.

- Prueba de Shinoda (presencia de flavonoides)

A 0.5 mg de extracto, disueltos en 1 ml de etanol, se le adicionaron una limadura de Mg y unas gotas de HCl concentrado. El desarrollo de una coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta indicará que la prueba es positiva (Tabla 6), pag 59.

- Prueba de $FeCl_3$ (presencia de oxhidrilos fenólicos)

A 0.5 mg de extracto, disueltos en 1 ml de etanol, se le agregaron tres gotas de $FeCl_3$ al 3% en etanol. La aparición de una coloración verde indica reacción positiva (Tabla 6), pag 59.

- Prueba de Liebermann-Buchard (presencia de terpenos y esteroides).

Se mezcló 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrió a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. Un mililitro de este reactivo se adicionó a la solución clorofórmica problema (0.5 mg del extracto + 1 ml de CHCl_3). En una reacción positiva hay desarrollo de una coloración azul o azul verdoso si son esteroides y rojo, rosa o violeta si son terpenos (Tabla 6).

TABLA 6.

E X T R A C T O S

P R U E B A S P A R A :	HEXANICO	ETEREO	ACETATO DE ETILO	METANOLICO
GLUCOSIDOS	N/E	-	N/E	+ Anillo violeta
ALCALOIDES DRAGENDORFF ACIDO SILICOTUNGSTICO	N/E	-	N/E	- + precipitado café obscuro
FLAVONOIDES	+ Verde	-	+ Verde	-
OXHIDRILOS FENOLICOS	+ Verde claro	+ Verde Claro	+ Verde Oscuro	+ Verde Oscuro
TERPENOS	+ Verde	+ Verde Oscuro casi azul	+ Azul fuerte	-

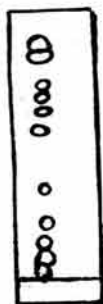
+ REACCION POSITIVA

- REACCION NEGATIVA

N/E NO SE EFECTUO

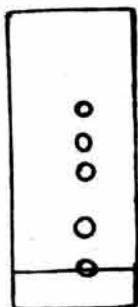
CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO



12 a) Eluyente: Cloroformo

EXTRACTO METANOLICO



12 b) Eluyente: Metanol-Acetato
de etilo

7 : 3

FIG. 12

3.3.- AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS

3.3.1.- Por cromatografía en columna de gel de sílice

3.3.1a.- Extracto hexánico

La separación de sus componentes se hizo por medio de cromatografía en columna de gel de sílice, Merck G-60, en proporción de 80:1. Se cromatografiaron 4.63 g, recogiendo fracciones de 45 ml y reuniéndose las que en placa delgada tuvieron manchas con Rf similar. La columna se principió a eluir con hexano y se continuó con mezclas de hexano-acetato de etilo, con gradientes de polaridad creciente, para terminar con acetato de etilo. Se colectaron 394 fracciones, reunidas de la siguiente manera:

TABLA 7

FRACCION	ELUYENTE	PESO	CLAVE	OBSERVACIONES
			F	
6 - 15	Hexano	112.7 mg	32	Cera
16 - 21	Hexano	14.5 mg	33	Cera
22 - 26	Hexano	10.4 mg	34	Aceite incoloro
27 - 31	Hexano	7.3 mg	35	Aceite incoloro
32 - 41	Hexano	9.6 mg	36	Aceite incoloro
42 - 70	Hex-Aceot 9:1	12.2 mg	37	Sólido amarillo pálido.
71 - 72	Hex-Aceot 9:1	3.2 mg	38	Sólido anaranjado
73 - 79	Hex-Aceot 9:1	837.9 mg	39	Sólido anaranjado amarillento con aroma.
80 - 85	Hex-Aceot 9:1	177.1 mg	40	Sólido amarillo ocre con aroma.
86 - 89	Hex-Aceot 9:1	118.6 mg	41	Sólido amarillo ocre con aroma dulce.
90 - 94	Hex-Aceot 9:1	102.3 mg	42	Sólido amarillo con aroma dulce.
95 - 122	Hex-Aceot 9:1	254.0 mg	43	Sólido anaranjado con aroma dulce.

Acceot = Acetato de etilo

Hex = Hexano

cont. tabla 7

FRACCION	ELUYENTE	PESO	CLAVE	OBSERVACIONES
123 - 128	Hex-Aceot 9:1	27.1 mg	44	Sólido anaranjado con poco aroma .
129 - 163	Hex-Aceot 8:2	253.0 mg	45	Sólido amarillo ver- doso con aroma pi- cante.
164 - 175	Hex-Aceot 8:2	43.3 mg	46	Sólido verde olivo con aroma picante.
176 - 189	Hex-Aceot 8:2	48.1 mg	47	Sólido verde obscu- ro con aroma picante
190 - 210	Hex-Aceot 8:2	466.8 mg	48	Sólido verde azulado con aroma.
211 - 230	Hex-Aceot 7:3	98.2 mg	49	Sólido verde ceniza con aroma.
231 - 233	Hex-Aceot 7:3	16.5 mg	50	Sólido verde olivo con aroma.
234 - 242	Hex-Aceot 7:3	49.6 mg	51	Sólido verde olivo .
243 - 252	Hex-Aceot 7:3	97.5 mg	52	Sólido verde olivo con aroma.
258 - 272	Hex-Aceot 7:3	129.0 mg	53	Sólido verde olivo con aroma.
253 - 257	Hex-Aceot 7:3	17.7 mg	54	Sólido verde olivo .
273 - 283	Hex-Aceot 7:3	73.1 mg	55	Sólido verde obscu- ro con aroma.
284 - 301	Hex-Aceot 6:4	119.8 mg	56	Sólido verde olivo con aroma dulce.
302 - 305	Hex-Aceot 6:4	25.1 mg	57	Sólido verde olivo .
306 - 310	Hex-Aceot 6:4	57.0 mg	58	Sólido verde olivo .
311 - 338	Hex-Aceot 6:4	404.8 mg	59	Sólido verde obscu- ro con aroma.
339 - 348	Hex-Aceot 6:4	65.4 mg	60	Sólido verde olivo con aroma dulce.
349 - 366	Acetato de etilo	116.8 mg	61	Sólido verde obscu- ro con aroma dulce.
367 - 371	Acetato de etilo	186.3 mg	62	Sólido verde olivo con aroma dulce.

cont. tabla 7

FRACCION	ELUYENTE	PESO	CLAVE	OBSERVACIONES
372 - 379	Acetato de etilo	57.4 mg	63	Sólido verde amarillo con aroma.
380 - 385	Acetato de etilo	13.8 mg	64	Sólido amarillo con aroma.
386 - 392	Acetato de etilo	7.8 mg	65	Sólido amarillo con aroma.
393 - 394	Acetato de etilo		66	Sólido amarillo

3.3.1b.-Extracto etéreo

De este extracto precipitó un sólido amarillo (F-86) con un punto de fusión de 175-178°C, peso 61.5 mg, soluble en acetato de etilo (placa, fig. 13 a). A este compuesto se le determinaron espectros en el infrarrojo, en el ultravioleta y de resonancia magnética nuclear.

Una pequeña parte del extracto seco (0.1 g) se analizó por cromatografía de gases para determinar los componentes principales del aceite esencial (tabla 11). Se empleó una columna con 3% de OV 101 Chrom. G 80/100 M, tamaño: 6 pies, de vidrio.

El resto del extracto se disolvió en hexano y hubo formación de un segundo precipitado (F-85), de color negro, punto de fusión 84-110°C, peso 683.9 mg, soluble en acetato de etilo, que dió 4 manchas en placa delgada eluida con Acetato-Acetona 7:3 y que se separó por filtración.

El líquido filtrado se evaporó para eliminar el disolvente y obtener nuevamente el extracto seco. Este extracto (2.985 g) se cromatografió en columna de gel de sílice Merck G-60, en proporción de 80:1. Se recogieron fracciones de 45 ml y se reunieron las que en placa delgada tuvieron un Rf similar. La columna se principió a eluir con hexano y se continuó con gradientes de polaridad creciente para terminar con Hexano-Acetato de etilo 7:3. Se colectaron 424 fracciones, reunidas de la siguiente manera.

TABLA 8

FRACCION	ELUYENTE	PESO	CLAVE	OBSERVACIONES
1 - 5	Hexano	1.5 mg	1	Aceite incoloro
7 - 12	Hexano	19.7 mg	2	Aceite incoloro
13 - 15	Hexano	8.0 mg	3	Aceite incoloro
16 - 22	Hexano	23.7 mg	4	Sólido amarillo con dulce aroma
45 - 77	Hexano	15.2 mg	5	Sólido amarillo
23 - 29	Hexano	3.5 mg	6	Sólido amarillo con ligero aroma
30 - 44	Hexano	5.9 mg	7	Sólido blanco con dulce aroma
78 - 91	Hex:Acetol 9:1	4.0 mg	8	Sólido blanco
93 - 94	Hex:Acetol 9:1	136.1 mg	9	Sólido amarillo con dulce aroma
113	Hex:Acetol 9:1	3.5 mg	10	Sólido amarillo
95	Hex:Acetol 9:1	97.2 mg	11	Sólido amarillo con dulce aroma
96 - 98	Hex:Acetol 9:1	170.4 mg	12	Sólido amarillo con dulce aroma
99 - 106	Hex:Acetol 9:1	33.8 mg	13	Sólido amarillo con dulce aroma
107 - 112	Hex:Acetol 9:1	24.1 mg	14	Sólido amarillo con dulce aroma
114 - 117	Hex:Acetol 9:1	20.8 mg	15	Sólido amarillo pálido con dulce aroma
118 - 128	Hex:Acetol 9:1	40.9 mg	16	Sólido amarillo pálido con dulce aroma
129 - 160	Hex:Acetol 9:1	26.5 mg	17	Sólido amarillo cristalino con dulce aroma
161 - 172	Hex:Acetol 9:1	9.9 mg	18	Sólido amarillo pálido con dulce aroma
173 - 184	Hex:Acetol 85:15	6.9 mg	19	Sólido blanco con dulce aroma
185 - 205	Hex:Acetol 85:15	10.7 mg	20	Sólido amarillo cristalino
206 - 237	Hex:Acetol 8:2	17.7 mg	21	Sólido amarillo verdoso
238 - 244	Hex:Acetol 8:2	5.0 mg	22	Sólido verde
245 - 260	Hex:Acetol 8:2	17.1 mg	23	Sólido verde oscuro
261 - 275	Hex:Acetol 8:2	17.8 mg	24	Sólido verde oscuro
276 - 290	Hex:Acetol 8:2	22.1 mg	25	Sólido amarillo verdoso
291 - 391	Hex:Acetol 8:2	114.4 mg	26	Sólido verde
392 - 398	Hex:Acetol 8:2	7.2 mg	27	Sólido verde
399 - 420	Hex:Acetol 8:2	53.7 mg	28	Sólido verde olivo

Las fracciones F-2, F-9, F-11 y 12, F-13, F-14 y F-15 se analizaron por cromatografía de gases .

3.3.2.- Aislamiento de sustancias por precipitación.

3.3.2a.- Extracto de acetato de etilo

De este extracto precipitó, por adición de acetato de etilo, un sólido amarillo (F-105) (569.3 mg) de punto de fusión 174-176°C, soluble en etanol (placa, fig. 13 b). El resto del extracto se evaporó a sequedad dando un peso de 1.079 g. De este extracto no se hizo posterior separación de componentes.

3.3.2b.- Extracto metanólico

De este extracto, al reducir el volumen, se separó un precipitado color café claro (F-83), no cristalino, con un peso de 1.1225 g, con punto de fusión de 215-248°C soluble en agua. La placa cromatográfica presenta 8 manchas (Fig. 14 a).

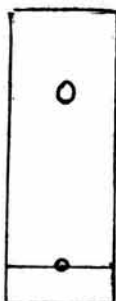
El extracto seco se disolvió en metanol, obteniéndose tres precipitados consecutivos. Primer precipitado (F-100): color café, soluble en etanol-agua 1:1, con un punto de fusión 174-209°C (d) y peso de 837.0 mg. Segundo precipitado (F-108): color café, con un peso de 86.4 mg, punto de fusión de 224-236 °C, soluble en etanol-agua 1:1 Tercer precipitado (F-104): color café oscuro, con un peso de 510.2 mg y punto de fusión de 200-210°C, soluble en agua. Las placas presentan varias manchas (Fig. 14 b).

CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DEL SOLIDO AMARILLO (F-86) DEL EXTRACTO ETereo



13 a) Eluyente: Acetato de etilo-Metanol
8 : 2

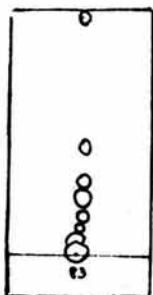
SOLIDO AMARILLO (F-105) DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO



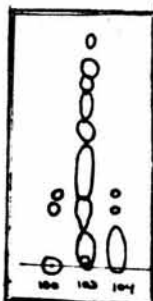
13 b) Eluyente: Acetato de etilo-Metanol
8 : 2

FIG. 13

CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE LOS F-83, F-100, F-103 y F-104 DEL EXTRACTO METANOLICO.



14 a) Eluyente: Butanol-ácido
acético-agua
5 : 1 : 4



14 b) Eluyente: Butanol-ácido
acético-agua
5 : 1 : 4

FIG. 14

3.4.- PURIFICACION POR CRISTALIZACION DE COMPUESTOS AISLADOS

Extracto hexánico

La fracción F-43 se recrystalizó de acetato de etilo, obteniéndose un sólido blanco, con punto de fusión de 78-79°C y un peso de 50.0 mg. A este compuesto se le determinaron espectros en el infrarrojo y de resonancia magnética nuclear.

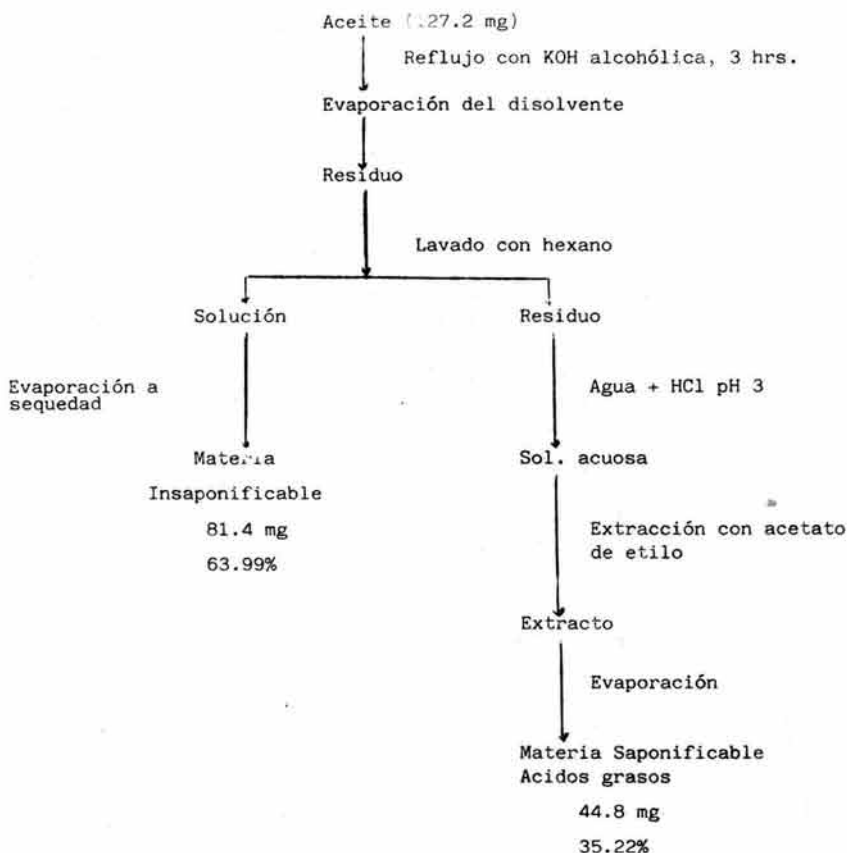
La fracción F-45, con un peso de 253.0 mg, se recrystalizó dos veces de metanol, obteniéndose cristales blancos, con un peso de 134.0 mg y un punto de fusión de 128-130°C, soluble en acetato de etilo. A este producto se le determinaron espectros en el infrarrojo y de resonancia magnética nuclear.

A las fracciones F-51 y F-52, con un peso de 156.5 mg, se le añadió hexano caliente. La parte soluble se separó y al enfriarse precipitó un sólido blanco, cuyo punto de fusión fué de 81-82°C, soluble en acetato de etilo, con un peso de 10 mg.

4.0.- ANALISIS DE LAS FRACCIONES F-32 y F-33 (cera).

- Saponificación

De las fracciones F-32 y F-33 del extracto hexánico, eluidas con hexano, se obtuvo una cera (127.2 mg) que se saponificó con 7.6 ml de KOH alcohólica (250 mg de KOH en 15 ml de etanol al 96%) y se reflujo durante tres horas. El disolvente se evaporó y el residuo se lavó tres veces con hexano para separar la materia insaponificable, la cual se obtuvo, por evaporación del disolvente - - (81.4 mg), con un rendimiento de 63.99%. El residuo, después de lavado con hexano, se disolvió en agua y se ajustó a pH 3 con HCl concentrado. La solución se extrajo tres veces con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua, se secó con Na_2SO_4 anhidro y, finalmente, se eliminó el disolvente. Se obtuvieron 44.8 mg de ácidos grasos libres, con un rendimiento de 35.22%.



- Obtención de los ésteres metílicos

Para la obtención de los ésteres metílicos se disolvieron los 44.8 mg de ácidos grasos libres en 50 ml de cloruro de metileno y se añadió una solución etérea saturada de diazometano (50 ml), agitando durante 12 hs. Terminada la reacción, los disolventes se evaporaron, obteniéndose así los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

- Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

Esta se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Sigma 2B, con una columna de Chromosorb WAW DMCS DEGS 20%, de 2 m x 3 mm. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 12 pag 83.

II. PARTE BIOLÓGICA

1.- Material

a) Extractos probados

Para las pruebas micológicas utilizamos los extractos hexánico, de acetato de etilo, etéreo, metanólico y acuoso y como agentes testigo griseofulvina y ketoconazol.

b) Organismos empleados

- **Trichophyton mentagrophytes**
- **Trichophyton rubrum**
- **Trichophyton concentricum**

De las cepas originales de **Trichophyton mentagrophytes**, **Trichophyton concentricum** y **Trichophyton rubrum**, se tomó un trozo pequeño y se sembró en forma de extría en una placa de Agar Sabouraud Dextrosa. La incubación para **T. mentagrophytes** fue de una semana y para **T. rubrum** y **T. concentricum**, de dos semanas. La temperatura de incubación fue de 28°C para todas las cepas y se las dejó crecer hasta que el hongo ocupó todo el espacio.

Las cantidades de los extractos utilizados se encuentran en la tabla 9 y 10 y los resultados en la tabla 24.

2.- Desarrollo

a) Metodología aplicada para los extractos hexánico, etéreo y de acetato de etilo.

- El extracto a ensayar se adicionó al Agar Sabouraud Dextrosa ASD; una vez mezclado se esterilizó y después se colocaron 3 ml de ASD, con el extracto correspondiente, a cada uno de los frascos (4.5 x 2.25 cm) empleados.
- Inmediatamente se sellaron con parafilm y se inclinaron, esperando has-

ta su solidificación.

- En cada uno de los frascos que contenían el medio se colocaron trozos de hongos de la resiembra antes descrita, tapando otra vez la boca de los frascos con parafilm.
- Los hongos se dejaron crecer a temperatura ambiente y durante dos semanas se tomaron muestras diarias para preparaciones con lugol.
- Al final de las dos semanas, se observó el crecimiento de los hongos con tratamiento, anotando los resultados con la clave siguiente:

0	No hubo crecimiento
+	Creció ligeramente
++	Creció lo doble, respecto a lo sembrado
+++	Creció lo triple, respecto a lo sembrado
++++	Creció lo cuádruple, respecto a lo sembrado
+++++	El crecimiento del hongo ocupa toda el área del medio.
Cont	Contaminado

Para cada extracto se sembraron 10 frascos por hongo más dos con los testigos. Las cantidades de los extractos utilizados se encuentran en la tabla 9 y los resultados en la tabla 24.

b) Metodología aplicada para los extractos metanólico y acuoso.

De los extractos acuoso y metanólico se dispuso de mayor cantidad, por lo que los ensayos se hicieron en cajas Petri de la siguiente manera:

- De igual forma que en la metodología a), antes de la esterilización el extracto se mezcló con el Agar Sabouraud Dextrosa.
- Posteriormente se colocaron 20 ml de ASD + extracto en cada caja Petri.

- La placa de resiembra, con el hongo, se cuadrículó con una espátula caliente, con cuadros de 1 cm^2 .
- 4 cuadritos de la resiembra se inocularon a las cajas con el ASD + extracto y se sellaron con masking-tape.
- A las dos semanas se observó su crecimiento.
- También se tomaron muestras diarias para preparaciones.
- Para cada extracto se sembraron 4 cajas por hongo más los dos testigos. El ensayo se hizo por triplicado.
- Las cantidades de los extractos utilizados se encuentran en la tabla 10 y los resultados en la tabla 24.

TABLA 9

TRATAMIENTO	HONGOS
Ext. Hexánico 0.235 g en 90 ml de ASD	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum
Ext. etéreo 0.45 g en 90 ml de ASD	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum
Ext. acetato de etilo 0.45 g en 90 ml de ASD	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum
Griseofulvina 0.45 g en 90 ml de ASD	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum
Ketoconazol 0.45 g en 90 ml de ASD	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum
Agar Sabouraud Dextrosa	T. mentagrophytes T. rubrum T. concentricum

TABLA 10.

TRATAMIENTO	HONGOS
1.- ASD + 50% de Extracto Acuoso.	<p>T. mentagrophytes</p> <p>T. rubrum</p> <p>T. concentricum</p>
2.- ASD + 0.5% de Extracto Metanólico.	<p>T. mentagrophytes</p> <p>T. rubrum</p> <p>T. concentricum</p>

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

I. PARTE QUIMICA

2.1.- De los tres extractos obtenidos con fines de separación de compuestos, el extracto metanólico se obtuvo en mayor cantidad (13.9%) - que los otros. El extracto hexánico se obtuvo con un rendimiento - de 3.88% y el de acetato de etilo con uno de 2.27%.

2.2. y 2.3. - Las extracciones que se hicieron para alcaloides tuvieron por objeto solamente establecer la presencia de estos compuestos en la hoja de Croton. Se emplearon dos métodos diferentes de extracción, - uno con etanol en caliente (Bettolo y Scarpati, 1979) y otro con ácido acético al 10% en frío (Tiwari y col., 1981). La extracción etanólica se trabajó a dos pH diferentes. Una parte se alcalinizó con sosa y la otra con amoníaco, extrayéndose ambas con éter. El primer extracto dió prueba positiva de alcaloides con reactivo de Dragendorff y con ácido silicotúngstico y en placa delgada, eluida con CHCl_3 -MeOH 9:1, se pudieron apreciar tres manchas. El segundo extracto solamente dió la prueba positiva con ácido silicotúngstico. En placa delgada, con el mismo sistema de eluyentes, se pudieron apreciar 3 manchas, dos con polaridad diferente a la de la placa anterior (Fig. 15 a y 15 b), pag 78.

La extracción ácida se alcalinizó solamente con amoníaco y se extrajo con dos disolventes diferentes, eter y cloroformo. Ambos extractos, etéreo y clorofórmico dieron prueba positiva de alcaloides sólo con el reactivo de ácido silicotúngstico. En placa delgada, eluida con acetato de etilo, el extracto clorofórmico mostró tres manchas, en tanto que el etéreo mostró solamente una mancha y

producto en el punto de aplicación (Fig. 16 a y 16 b), por lo que se corrió una segunda placa, empleando como eluyente acetato de etilo-metanol 9:1, y en la que se pudieron apreciar cuatro manchas - (Fig. 16 c), pag 79.

Estos resultados demuestran la presencia de alcaloides en la hoja de Croton.

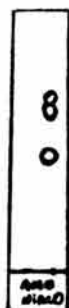
CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE LAS EXTRACCIONES DE LOS ALCALOIDES CON ETANOL CALIENTE .

Extracción etanólica con sosa



15 a) Eluyente: CHCl_3 -MeOH
9 : 1

Extracción etanólica con amoníaco



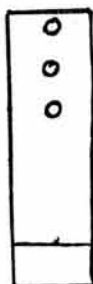
15 b) Eluyente: CHCl_3 -MeOH
9 : 1

78..

FIG. 15

CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE LAS EXTRACCIONES DE LOS ALCALOIDES
CON ACIDO ACETICO AL 10% EN FFIÓ .

Extracción clorofórmico



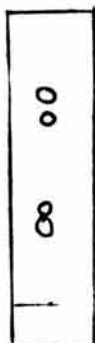
16 a) Eluyente: Acetato de etilo

Extracción etérea



16 b) Eluyente: Acetato de etilo

Extracción etérea 2da. placa



16 c) Eluyente: Acetato de etilo-
Metanol.

9 : 1

FIG. 16

2.4.- El análisis de la extracción etérea, efectuado en frío, para la determinación de los componentes del aceite esencial, se llevó a cabo por cromatografía de gases, con el resultado que se anota en la siguiente tabla.

TABLA 11.

COMPUESTO	%	Tiempo de Retención (minutos)
A	20.23	2.58
B	18.00	3.11
Canfeno	1.56	4.79
C	4.43	5.30
α-felandreno	0.61	6.20
Limoneno	0.26	7.25
D	3.29	9.28
E	6.26	10.13
Acetato de Bencilo	21.15	12.70
Dimicetal	16.71	14.31

En esta tabla no se encuentran todos los componentes que aparecen en el cromatograma, sino solamente aquellos que tienen mayor porcentaje y los que se pudieron identificar con el patrón de que se dispone.

3.1.- Las placas delgadas corridas para analizar el número de componentes factibles de separar en cada extracto, arrojaron los siguientes resultados:

- a) En la placa del extracto hexánico se aprecian 5 manchas correspondientes a otros tantos compuestos, con una buena separación; el compuesto menos y el más polar se encuentran en mayor proporción que los otros tres de mediana polaridad (Fig. 11a).
- b) El extracto etéreo presenta en la placa un perfil complejo. En la zona de compuestos de mayor polaridad hay cuatro manchas muy próximas o sea de compuestos muy difíciles de separar. En la zona de mediana polaridad hay 4 manchas con una mejor separación y, finalmente, hacia el frente del disolvente están otras dos manchas muy próximas una de la otra (Fig. 11b).
- c) El perfil de la placa del extracto de acetato de etilo es también complejo, como el del extracto etéreo. En la zona de alta polaridad presenta cuatro manchas, tres de ellas tan próximas que no están resueltas, enseguida viene una mancha con buena separación y en la zona de menor polaridad hay seis manchas con muy poca resolución (Fig. 12 a).

Tomando en cuenta el análisis de las placas de los extractos, se consideró para cromatografía en columna el extracto hexánico por presentar las manchas de su perfil una buena separación.

El extracto de acetato de etilo no se cromatografió en columna, - por ser una mezcla compleja de compuestos, difíciles de separar - por este método, como lo indica su perfil en placa delgada.

El extracto metanólico se consideró para cromatografía en columna por tener un buen perfil para la separación de sus componentes (Fig. 12 b).

El extracto etéreo, a pesar de que su perfil es complejo se consideró para cromatografía en columna, con la idea de separar algunos grupos de componentes que en el cromatograma de gases no se pudieron caracterizar por tener muy poca resolución y encontrarse en muy pequeñas cantidades.

3.2.- Los resultados de las pruebas de coloración y precipitación para la caracterización de familias de compuestos se encuentran en la tabla 6 , pag 59.

Con el extracto hexánico no se hicieron pruebas ni para glucósidos ni para alcaloides , por ser compuestos polares que no se extraen con este disolvente. Las pruebas para flavonoides, terpenos y compuestos fenólicos resultaron positivas.

En el extracto etéreo tampoco hay probabilidad de encontrar compuestos muy polares por lo que se hicieron las mismas pruebas que con el hexánico. En este extracto resultaron positivas las pruebas para oxhidrilos fenólicos y terpenos.

El extracto de acetato de etilo se trabajó en la misma forma que los dos anteriores, resultando positivas las pruebas para flavonoides, oxhidrilos fenólicos y terpenos.

En el extracto metanólico hubo prueba positiva para glucósidos, para alcaloides con el reactivo de ácido silicotúngstico y para oxhidrilos fenólicos.

3.3.1a.- De la cromatografía en columna del extracto hexánico se obtuvieron 324 fracciones que se agruparon, de acuerdo con los resultados del control en placa delgada, en 34 fracciones (F-33 a F-66). De estas fracciones se analizaron la F-32 y F-33, la F-43, F-45, F-51 y F-52, que fueron las que registraron mayor pureza en el

control en placa delgada. Los perfiles de las fracciones restantes indicaron que seguían siendo mezclas de compuestos.

Fracciones 32 y 33.— Estas dos fracciones estuvieron constituidas por una cera (127.2 mg). Esta, después de haber sido saponificada y esterificada con diazometano, se analizó por cromatografía de gases para determinar su composición en ácidos grasos (Tabla , 12), con los siguientes resultados .

Tabla 12.

Acido Graso		%
Acido láurico	(C ₁₂)	4.586
Acido mirístico	(C ₁₄)	8.736
Acido palmítico	(C ₁₆)	33.667
Acido palmitoleico	(C _{16:1})	4.278
Acido esteárico	(C ₁₈)	15.702
Acido oleico	(C _{18:1})	22.300
Acido linoleico	(C _{18:2})	10.731

El análisis es congruente con el de una cera, puesto que predominan los ácidos saturados (62.69%) sobre los insaturados (37.31%).

Fracción 43

Es sólido blanco, con un punto de fusión de 78-79°C y peso de 50 mg, que constituyó esta fracción, se analizó por espectrometría, determinándose sus espectros en el infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (Tablas 13 y 14)

Tabla 13

ESPECTRO EN EL INFRARROJO

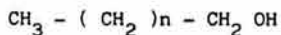
GRUPO FUNCIONAL	BANDA a:
-OH	3600 cm^{-1}
-CH-	2928 2854
-CH ₂ -	1465
CH ₃ -	1375
C-O (Alcohol primario)	1048

Tabla 14

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (Pag. 89)

GRUPO FUNCIONAL	SEÑAL a:
CH ₃ -	0.85 ppm (señal triple)
-CH ₂ -	1.25 ppm (simple intensa)
-CH ₂ - OH	3.6 ppm (triple)

Tanto el espectro en el infrarrojo como el de resonancia magnética nuclear indican que se trata de un alcohol graso de cadena larga.

Fracción 45

La fracción 45, sólido cristalino con un punto de fusión de 116-130°C, se recristalizó dos veces de metanol, obteniéndose 134 mg de cristales blancos, con punto de fusión 128-130°C. Este punto

de fusión fue constante en las dos recristalizaciones. El producto se analizó espectrométricamente, determinándose sus espectros en el infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (Tablas 15 y 16).

Tabla 15

ESPECTRO EN EL INFRARROJO (Pag. 90)

GRUPO FUNCIONAL

BANDA a:

-OH	$\left[\begin{array}{l} 3609 \\ 3650 \end{array} \right] \text{ cm}^{-1}$
C-H	$\left[\begin{array}{l} 2936 \\ 2870 \end{array} \right]$
=CH ₂	1624
-CH ₂ -	1464
CH ₃ -	1388
$\begin{array}{c} \text{C-O} \\ \text{H} \quad \text{R} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C}=\text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{R} \quad \text{H} \end{array}$	1044
	957
=CH ₂	890

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (pag 91)

Tabla 16

GRUPO FUNCIONAL

SEÑAL a:

$\overset{\text{H}}{\curvearrowright}\text{C-OH}$		3.5 ppm (señal múltiple)
$\begin{array}{l} \diagdown \\ \text{=CH}_2- \\ \diagup \end{array}$		5.30 ppm
RCH_3-	entre	0.65 ppm y 1.25 ppm

Las 8 señales de metilos, con diferentes intensidades, en el espectro de resonancia magnética nuclear, permiten suponer que se trata de una mezcla de 2 triterpenos.

Las fracciones 51 y 52 se recrystalizaron de hexano caliente. Se obtuvo un sólido blanco con un punto de fusión de 81-82°C y con un peso de 10.0 mg. Esta cantidad no fue suficiente para hacer el análisis espectrométrico.

3.3.1b.- Del extracto etéreo precipitó un polvo amarillo (F-86) que tuvo un punto de fusión de 175-178°C y un peso de 61.5 mg. Este compuesto se analizó por espectrometría, determinandose - sus espectros en el ultravioleta, el infrarrojo y de resonancia magnética nuclear, (tablas 17, 18 y 19)

Tabla 17

ESPECTRO EN EL ULTRAVIOLETA (Pag. 92)

λ max	348, 254, 207
---------------	---------------

Tabla 18

ESPECTRO EN EL INFRARROJO (Pag. 93)

GRUPO FUNCIONAL BANDA a:

OH (Banda ancha)	3380 cm ⁻¹
C-H	2950 2915 2840
>C=O	1652
= Heterocíclico	1600
Sistema aromático	1565
Sistema heterocíclico	1500 1450

continua Tabla 18

GRUPO FUNCIONAL	BANDA a:			
C-O (azucares)	<table border="1"> <tr><td>1298</td></tr> <tr><td>1265</td></tr> <tr><td>1120</td></tr> </table>	1298	1265	1120
1298				
1265				
1120				
C-H	<table border="1"> <tr><td>960</td></tr> <tr><td>810</td></tr> </table>	960	810	
960				
810				

Tabla 19

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (Pag. 94).

GRUPO FUNCIONAL	BANDA a: ppm											
CH ₃	0.90											
-H ⁺ - 6	6.20											
-H ⁺ - 8	6.35											
-H ⁺ - 5'	6.90											
-H ⁺ - 2'	7.35											
-H ⁺ - 6'	7.72											
<table border="1"> <tr> <td rowspan="5"> $\text{H} - \text{C} - \text{OH}$ </td> <td>en C₅</td> <td>2.60</td> </tr> <tr> <td>en C₄</td> <td>3.35</td> </tr> <tr> <td>en C₃</td> <td>3.65</td> </tr> <tr> <td>en C₂</td> <td>4.15</td> </tr> <tr> <td>en C₁</td> <td>5.40</td> </tr> </table>	$\text{H} - \text{C} - \text{OH}$	en C ₅	2.60	en C ₄	3.35	en C ₃	3.65	en C ₂	4.15	en C ₁	5.40	
		$\text{H} - \text{C} - \text{OH}$	en C ₅	2.60								
			en C ₄	3.35								
			en C ₃	3.65								
			en C ₂	4.15								
en C ₁	5.40											

Además del análisis espectrométrico se corrió la sustancia en placa delgada, empleando como eluyente Butano-Acido Acético-Agua - 4:1:5. Se obtuvo una mancha con fluorescencia amarilla brillante y un Rf de 7.3 .

Tanto los análisis espectrométricos como la determinación en placa delgada indican que el producto es la **quercitrina (3 β -L-rhamnósido de quercetina)** (Fig. 17).

El punto de fusión y los máximos en el ultravioleta corresponden a los reportados por el Merck Index (1983). El espectro de resonancia magnética nuclear se comparó con el reportado por Mabry (1970) y finalmente el Rf en placa delgada se comparó con el dado por Harborne (1973).

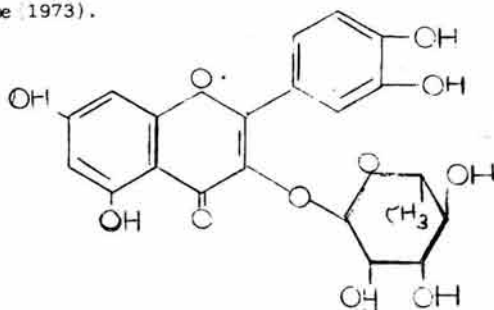
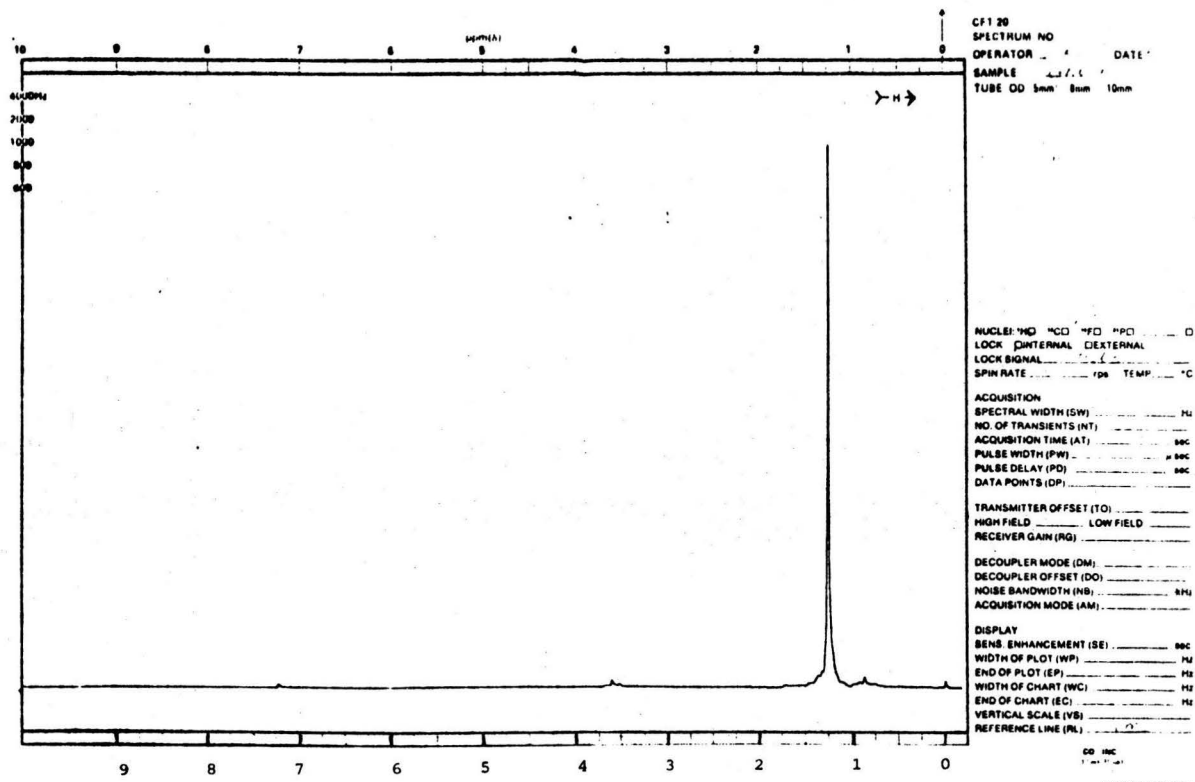


Fig. 17

TABLA 14,

ALCOHOL GRASO DE CADENA LARGA



89.

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

TABLA 15. ESPECTRO EN EL INFRARROJO
MEZCLA DE TRITERPENOS

DR.F.GARCIA CROTON 4 SOL/CHCl 3 12/2/86 TORRES

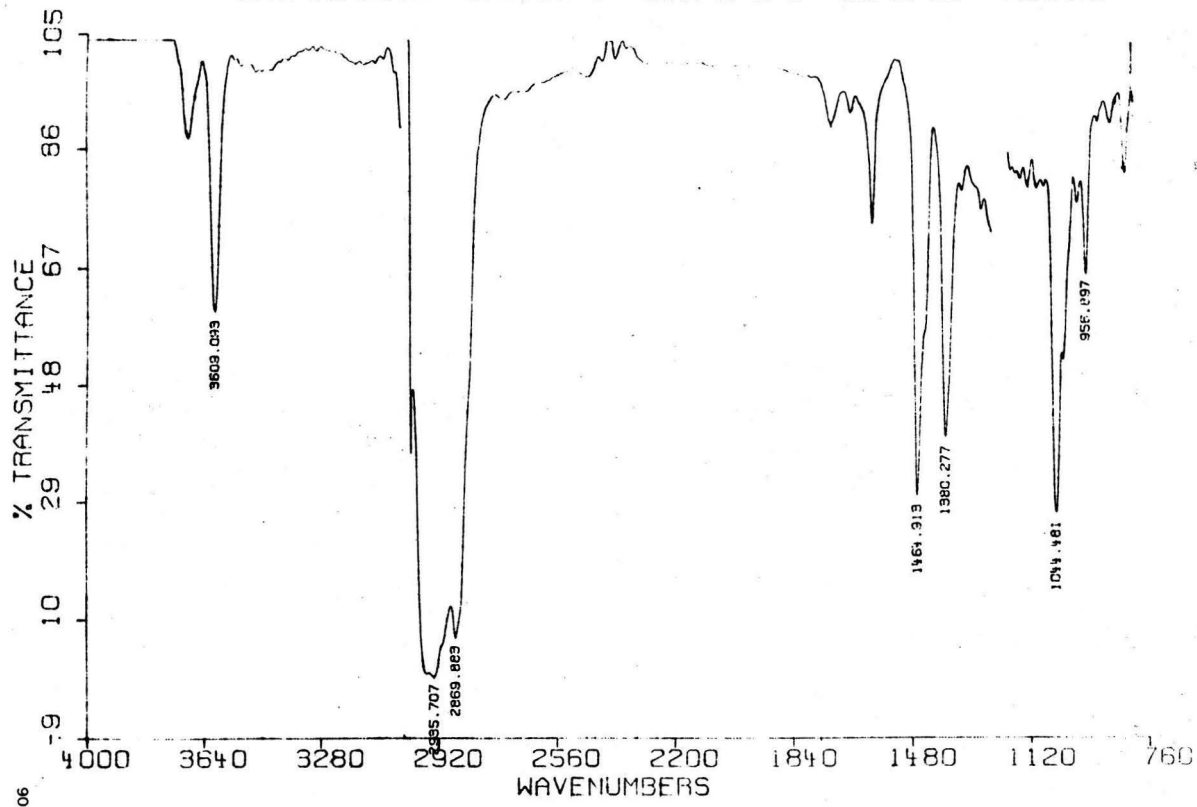
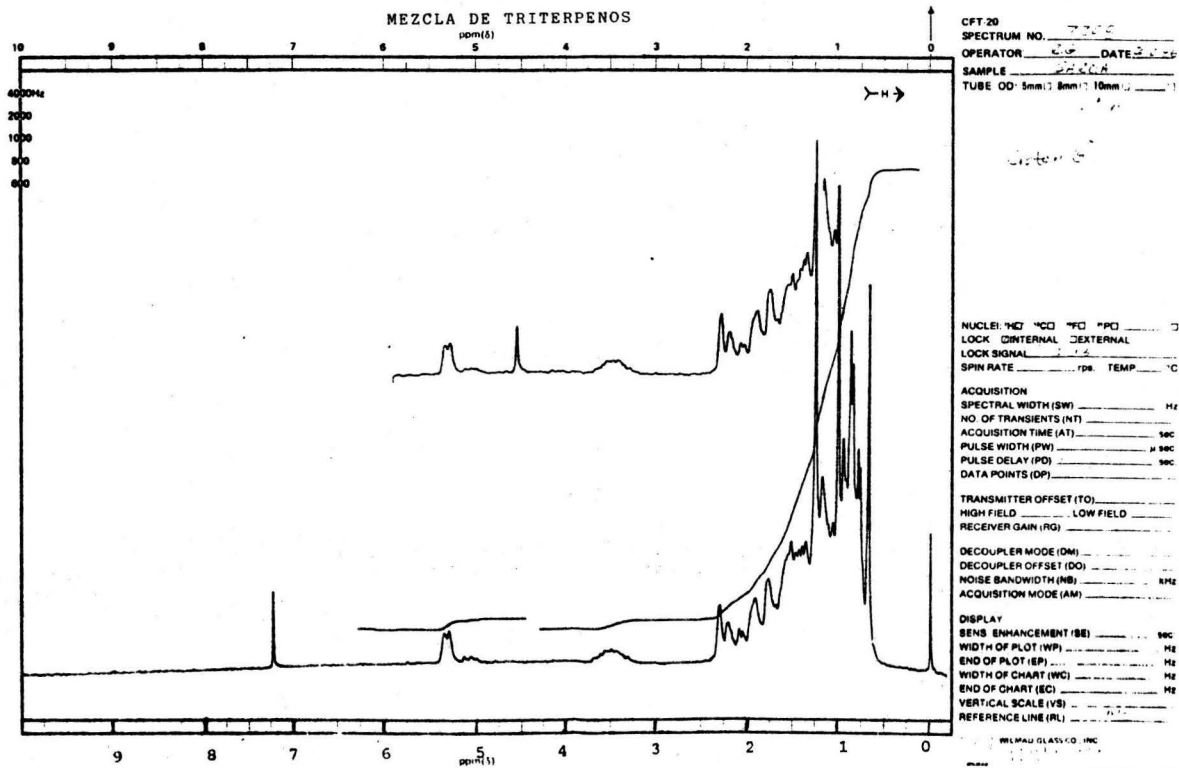
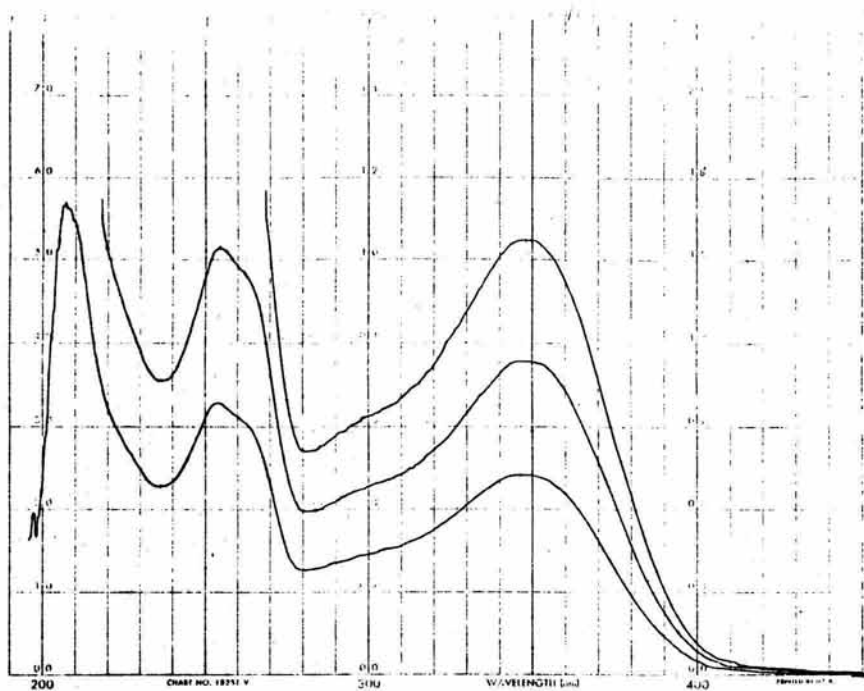


TABLA 16. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR





NAME: *Quercitrin*
 REFERENCE: *Quercitrin*
 ANALYST: *Quercitrin*

PREPARED BY: *[Signature]*
 CHECKED BY: *[Signature]*
 DATE: *2-9-57*

TABLA 17. ESPECTRO EN EL ULTRAVIOLETA DEL COMPUESTO F-86
 (QUERCITRINA)

TABLA 18..

ESPECTRO EN EL INFRARROJO QUERCITRINA
DEL COMPUESTO F-86

DR.F.GARCIA CROTON 3 SOL/CHCL3 12/2/86 TORRES

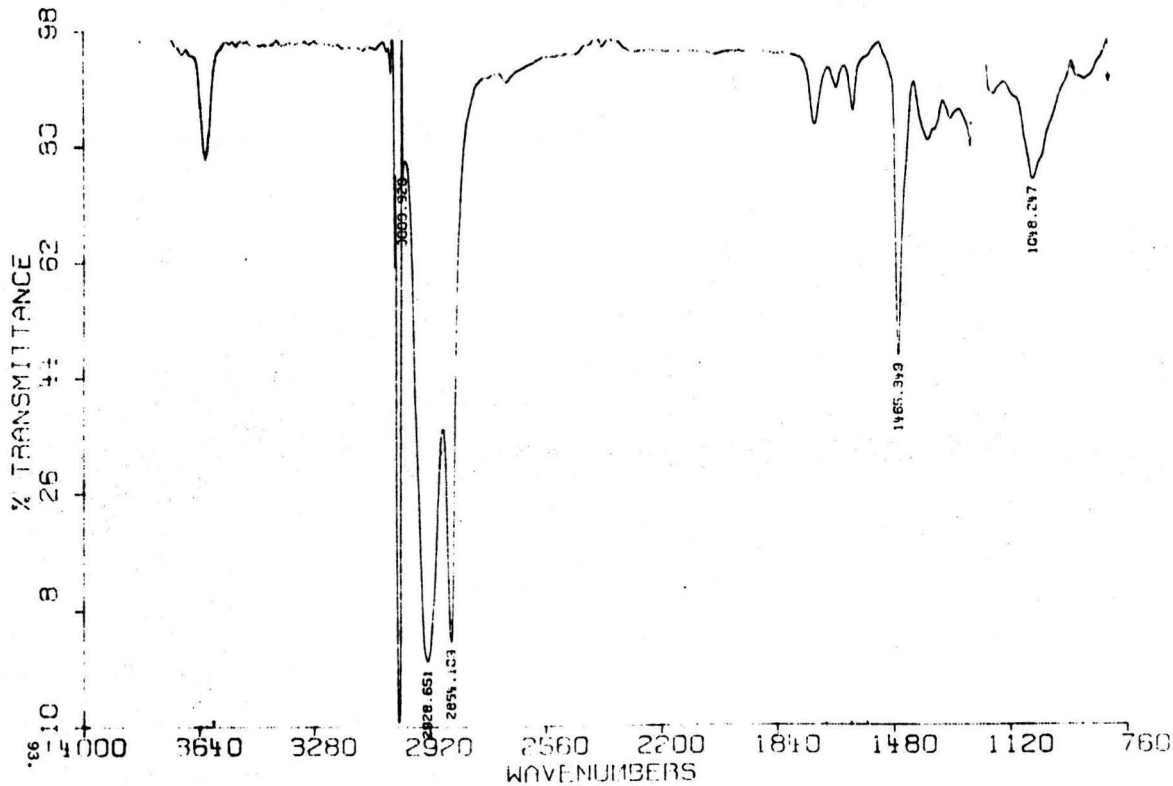
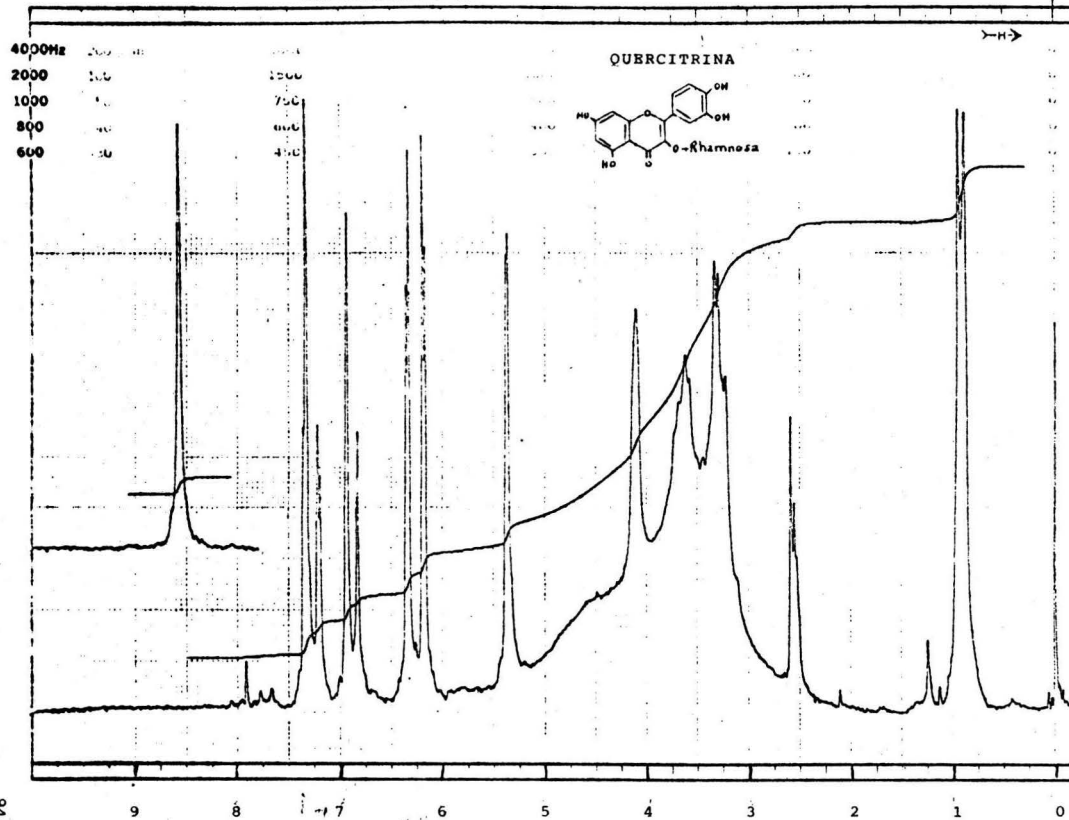


TABLA 19. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DEL COMPUESTO F-86



FT-80A SPECTRUM
 OPERATOR
 NUCLEUS FI
 SYNTHESIZER SETTI
 EXPERIMENT NAME
 FILE NAME
 SAMPLE
 →

LOCK INTERN
 LOCK SIGNAL
 SPIN RATE rps
 INSERT

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (.....)
 NO. OF TRANSIENTS:
 ACQUISITION TIME
 PULSE WIDTH (PW).....
 PULSE DELAY (PD).....
 DATA POINTS (DP).....

TRANSMITTER OFF:
 HIGH FIELD
 RECEIVER GAIN (RG).....

DECOUPLER MODE
 DECOUPLER OFF/SE
 NOISE BANDWIDTH
 ACQUISITION MODE

DISPLAY
 SENS. ENHANCEME
 WIDTH OF PLOT (W
 END OF PLOT (EP)
 WIDTH OF CHART (C
 END OF CHART (EC
 VERTICAL SCALE (V
 REFERENCE LINE (R

El resto del extracto etéreo se cromatografió en columna, pero ninguna de las fracciones fue homogénea, todas resultaron mezclas de compuestos. Las primeras fracciones fueron aromáticas y se analizaron por cromatografía de gases aquellas que resultaron lo suficientemente volátiles como para permitir su determinación (F-2, F-9, F-11 y 12, F-13, F-14 y F-15), en las mismas condiciones que se analizó el extracto total. Los resultados se anotan a continuación (Tabla 20 a 24).

Tabla 20

Fracción 2

COMPUESTO	%	TIEMPO DE RETENCION minutos
Acetato de bencilo	1.14	12.68
Mentol	1.06	18.34
Terpineol	1.46	19.60
Carvona	1.27	20.72
Citronelal	1.59	21.27
Acetato de geranilo	1.06	21.74
Cuminaldehido	1.87	22.39
Eugenol	1.43	24.52
Guayacol	2.85	24.88
-octalactona	1.61	25.45
-octalactona	1.41	25.82
Mirceno	3.42	26.39
Metil eugenol	2.40	27.29
Alcohol cinamico	5.63	27.79
Nerolidol	2.38	28.36
Cedrol	5.61	29.37
A	30.26	31.25
Acetato de terpinelo	4.46	33.48

Tabla 21

Fracción 9

COMPUESTO	%	TIEMPO DE RETENCION min.
Isoeugenol	2.29	18.63
α-octalactona	47.56	25.53
Nerolidol	47.34	28.76

Tabla 22

Fracción 11 - 12

COMPUESTO	%	TIEMPO DE RETENCION min.
Isoeugenol	2.48	18.72
α-octalactona	51.72	25.38
Nerolidol	43.07	28.53

Tabla 23

Fracción 13

COMPUESTO	%	TIEMPO DE RETENCION min.
α -pineno	2.19	3.70
Canfeno	2.23	4.72
α -felandreno	2.12	6.38
β -felandreno	6.83	6.93
Limoneno	0.52	7.25
A	22.93	8.37
B	5.64	9.03
C	17.65	9.50
D	3.45	10.56
Acetato de bencilo	6.30	12.51
E	2.14	13.07
Linalol	1.69	13.81
Acetato de linalilo	1.74	16.30
Cariofileno	0.73	17.64
Mentol	1.72	18.16
Isoeugenol	13.68	18.84

Tabla 24

Fracción 14

COMPUESTO	%	TIEMPO DE RETENCION
A	5.49	2.43
Canfeno	0.05	4.76
B-felandreno	3.37	6.62
Limoneno	1.11	7.13
Eucaliptol	0.91	7.57
B	1.00	8.21
C	43.65	8.59
D	7.04	9.23
E	16.49	9.82
F	2.66	10.84
Acetato de bencilo	8.28	12.76
Linalol	1.65	13.43
G	1.49	14.21
Dimicetal	0.69	14.71
H	1.04	15.60
I	1.04	16.82
Acetato de linalilo	0.25	17.28
Cedreno	0.48	17.99
Mentol	0.63	18.62

El análisis del extracto total (tabla 11), se efectuó hasta un tiempo de retención de 15.63, o sea, que registró los compuestos más volátiles del extracto. Los porcentajes más elevados correspondieron a dos compuestos no caracterizados, A y B (20.23% y 18.00%, respectivamente), al acetato de bencilo (21.15%) y al dimicetal (16.71).

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto total se corrieron en el cromatógrafo de gases con un rango mayor de tiempos de retención.

La fracción F-2 tuvo un componente principal A (30.26%), no caracterizado, con un tiempo de retención de 31.25. La fracción F-9 y la F-11 y 12 tuvieron como componentes principales α -octalactona y nerolidol.

La fracción F-13 registró un componente A (22.93%) con un tiempo de retención de 8.37, uno C (17.65%) con un tiempo de retención de 9.50 e isoeugenol (13.68%).

En la fracción F-14 se encontró un compuesto C en un 43.65% (tiempo de retención 8.59) y uno E en un 16.49% (tiempo de retención 9.82).

Los compuestos A y C de la fracción 13 y C y E de la fracción 14 tienen tiempos de retención muy semejantes, por lo que se puede suponer que ambas fracciones tienen los mismos componentes principales.

Del análisis de las fracciones de la cromatografía se puede apreciar que hubo fragmentación en la composición del extracto total, predominando en las fracciones 9 y 12 la α -octalactona y el nerolidol, en cambio en las fracciones 13 y 14 predominaron dos componentes con tiempos de retención menores y que de-

safortunadamente no se pudieron caracterizar por no registrarlos el patrón del que se dispone.

El acetato de bencilo, que es uno de los componentes principales del extracto crudo, se encontró en menor proporción en las fracciones 2, 13 y 14. Comparando nuestro aceite esencial con los reportados, se encuentran algunos de los componentes que los constituyen (α - pineno, β -cariofileno, α -felandreno, mirceno, linalol, geraniol etc.), sin embargo la composición total es diferente. No es posible hacer una comparación exacta de resultados en vista de que la metodología empleada por Craveiro (1981) no es la misma que la que se aplicó a los extractos de **Croton suberosus** .

3.3.2a.- Del extracto seco de acetato de etilo, al adicionar este mismo disolvente, precipitó un sólido amarillo (F-105) con un peso de -- 569 mg y punto de fusión de 174-176°C, que resultó idéntico al producto precipitado del extracto etéreo y que se identificó como -- **quercitrina**. El resto de este extracto (1.079 g) fue una cantidad pequeña para tratar de hacer una separación cromatográfica, dada su complejidad, por lo que esta no se efectuó.

3.3.2b.- El extracto metanólico resultó sumamente polar, disolviéndose sólo en el mismo disolvente, lo cual significa que no es una muestra que pueda cromatografiarse en una columna de **gel de sílice**. De este extracto se obtuvieron varios precipitados, pero todos ellos eran mezclas de compuestos, como se pudo apreciar en las cromatoplasas correspondientes.

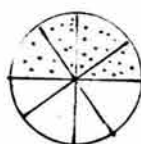
II. PARTE BIOLÓGICA

Los resultados de las lecturas del desarrollo de los hongos en ASD y en presencia del extracto hexánico se encuentran en las tablas 25 y 26 los correspondientes al ensayo con el extracto etéreo y el de acetato de etilo, en las tablas 27 y 28 con el extracto metanólico y el acuoso al 50%, en las tablas 29 y 30 y con los dos testigos, ketoconazol y griseofulvina, en las tablas 31 y 32 (páginas 108 a 120).

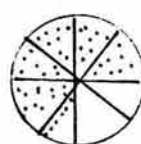
El análisis de estos resultados se tabuló en las tablas 24, - considerando el grado de desarrollo del hongo por área de crecimiento, de la siguiente manera:



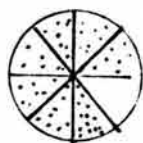
(+) 10%



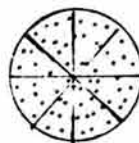
(++) 50%



(+++) 67%



(+++++) 85%



(+++++) 100%

Tabla 24.

COMPONENTES	<u>T.mentagrophytes</u>		<u>T.rubrum</u>		<u>T. concentricum</u>	
	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%
	5+	100	5+	100	2+	50
	5+	100	4+	85	2+	50
	5+	100	5+	100	3+	67
	5+	100	5+	100	5+	100
	5+	100	5+	100	3+	67
AGAR SABOURAUD	5+	100	4+	85	4+	85
DEXTROSA	5+	100	4+	85	4+	85
	3+	67	3+	67	5+	100
	5+	100	3+	67	3+	67
	5+	100	3+	67	4+	85
	PROMEDIO	96.7%		85.6%		75.6%
	3+	67	5+	100	4+	85
	5+	100	4+	85	3+	67
	5+	100	3+	67	2+	50
	5+	100	5+	100	3+	67
EXT. HEXANICO	5+	100	4+	85	3+	67
	5+	100	3+	67	2+	50
	5+	100	2+	50	cont	
	5+	100	3+	67	3+	67
	5+	100	5+	100	cont	
	5+	100	4+	85	3+	67
	PROMEDIO	96.7 %		80.6%		65.0%

Tabla 24.

COMPONENTES	<u>T. mentagrophytes</u>		<u>T. rubrum</u>		<u>T. concentricum</u>	
	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%
EXTRACTO ETEREO	0	0	0	0	+	10
	+	10	+	10	4+	85
	3+	67	2+	50	+	10
	2+	50	+	10	2+	50
	0	0	+	10	3+	67
	2+	50	2+	50	+	10
	+	10	4+	85	Cont	0
	2+	50	2+	50	+	10
	+	10	+	10	+	10
	+	10	+	10	2+	50
PROMEDIO		25.7		28.5%		30.2%
EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO	2+	50	2+	50	0	0
	+	10	+	10	+	10
	4+	85	+	10	+	10
	3+	67	0	0	+	10
	+	10	3+	67	+	10
	0	0	0	0	+	10
	0	0	3+	67	2+	50
	5+	100	2+	50	+	10
	3+	67	3+	67	+	10
	+	10	2+	50	+	10
PROMEDIO		39.9%		37.1%		13.0%

Tabla 24.

COMPONENTES	<u>T. mentagrophytes</u>		<u>T. rubrum</u>		<u>T. concentricum</u>	
	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%
EXTRACTO METANOLICO	5+	100	5+	100	3+	67
	3+	67	5+	100	2+	50
	5+	100	5+	100	5+	100
	2+	50	4+	85	2+	50
	2+	50	4+	85	5+	100
	2+	50	3+	67	4+	85
	5+	100	3+	67	2+	50
	5+	100	4+	85	2+	50
	5+	100	5+	100	5+	100
	2+	50	3+	67	3+	67
	5+	100	3+	67	5+	100
	2+	50	5+	100	3+	67
PROMEDIO		76.4%		85.2%		73.8%
EXTRACTO ACUOSO 50%	5+	100	5+	100	2+	50
	4+	85	2+	50	5+	100
	5+	100	4+	85	5+	100
	0	0	2+	50	2+	50
	0	0	4+	85	4+	85
	0	0	4+	85	0	0
	5+	100	5+	100	3+	67
	0	0	3+	67	2+	50
	0	0	3+	67	5+	100
	3+	67	4+	85	0	0
PROMEDIO		45.2%		77.4%		60.2%

Tabla 24.

COMPONENTES	<u>T.mentagrophytes</u>		<u>T.rubrum</u>		<u>T. concentricum</u>	
	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%	CRECIMIENTO AREA	%
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
KETOCONAZOL	+	10	0	0	0	0
	+	10	0	0	0	0
	+	10	0	0	0	0
	+	10	0	0	0	0
	+	10	0	0	0	0
PROMEDIO		0.5%		0		0
	+	10	+	10	+	10
	+	10	+	10	0	0
	+	10	0	0	+	10
GRISEOFULVINA	+	10	+	10	+	10
	+	10	0	0	+	10
	+	10	+	10	+	10
	2+	50	0	0	+	10
	+	10	+	10	0	0
	Cont	0	0	0	Cont	0
	Cont	0	+	10	0	0
PROMEDIO		15.0%		6.0%		6.6%

Los resultados del crecimiento por área de los hongos, con los diferentes extractos, nos indican que el orden de fungotoxicidad para cada uno es el siguiente:

Trichophyton mentagrophytes

EXTRACTO	Hexánico	Etéreo	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
% DE INHIBICION	3.3%	74.3%	60.1%	23.6%	54.8%

Etéreo > Acetato de etilo > Acuoso > Metanólico > Hexánico

Trichophyton rubrum

EXTRACTO	Hexánico	Etéreo	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
% DE INHIBICION	19.4	75.5%	62.9	14.8	22.6%

Etéreo > Acetato de etilo > Acuoso > hexánico > metanólico

Trichophyton concentricum

EXTRACTO	Hexánico	Etéreo	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
% DE INHIBICION	35%	69.8%	87.0%	26.2%	39.8%

Acetato de etilo > Etéreo > Acuoso > Hexánico > Metanólico

Los extractos que mayor actividad presentaron frente a las tres especies de hongos fueron el etéreo y el de acetato de etilo; en seguida, el acuoso, el metanólico y el hexánico que prácticamente no presentó actividad, pero hay que considerar que este extracto se aplicó mucho más diluído que los restantes. En un próximo ensayo habrá que probarlo a la misma concentración que el etéreo y el de acetato de etilo para poder hacer una comparación exacta. Respecto a la sensibilidad de los hongos, varía de acuerdo con el extracto. Para el extracto hexánico el más sensible fué *Trichophyton concentricum*.

Frente al extracto etéreo las tres especies presentaron una sensibilidad semejante. Para el extracto de acetato de etilo, --- *T. concentricum* fue el que mostró mayor sensibilidad, siendo la de los otros dos similar. Frente al extracto metanólico el más sensible fue *T. rubrum* y para el acuoso, *T. mentagrophytes*.

Las observaciones que se hicieron de las preparaciones con lugol, se ilustran con fotografías y presentan las características anotadas en las tablas correspondientes.

Tabla 25.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas (Foto 1)
		4	Hifas
AGAR SABOURAUD	T. concentricum	5	Hifas
DEXTROSA		6	Hifas enrolladas
		7	Hifas prolongandose
		8	Hifas
		1	Micelio y microconidias (Foto 2)
		2	Hifas (Foto 3)
		3	Hifas
AGAR SABOURAUD	T. mentagrophytes	4	Micelio
DEXTROSA		5	Micelio y poquitas microconidias (Foto 4).
		6	Microconidias y poco micelio

Tabla 25.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		1	Hifas y microconidias (Fotos 5 y 6).
AGAR SABOURAUD DEXTROSA	T. rubrum	2	Hifas y microconidias (Foto 7)
		3	Hifas
		4	Hifas (Foto 8)
		5	Hifas
		6	Hifas y microconidias muchas

Tabla 26.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
EXT. HEXANICO	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Hifas y microconidias
		2	Microconidias e hifas (Foto 14)
		3	Solo hifas
		4	Hifas
		5	Pocas microconidias e hifas.
		6	Blastosporas, microconidias, hifas.
		7	Hifas y microconidias
EXT. HEXANICO	<i>T. rubrum</i>	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas
		5	Pocas blastosporas (Foto 15)
		6	Hifas
		7	Solo microconidias

Tabla 26.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		1	Hifas y blastosporas
		2	Plasmólisis de las hifas transparentes.
EXT. HEXANICO	T. concentricum	3	Se ven los tabiques de la especie, las células transparentes, blastosporas e hifas - (Foto 16).
		4	Hifas
		5	Hifas
		6	Hifas
		7	Hifas dilatadas

Tabla 27

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
EXT. ETereo	<i>T. rubrum</i>	1	Hifas (foto 17)
		2	Hifas
		3	Hifas y pocas blastosporas
		4	Hifas
		5	Hifas
		6	Hifas
		7	Hifas
		8	Hifas y blastosporas
EXT. ETereo	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Hifas y microconidias (Fotos 18 y 19).
		2	Hifas y abundantes microconidias e hifas enrizadas.
		3	Pocas microconidias e hifas
		4	Muchas microconidias
		5	Muchas microconidias
		6	Pocas microconidias e hifas
		7	Pocas microconidias
		8	Macroconidias, microconidias pocas, hifas

Tabla 27.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		1	Hifas
		2	Blastosporas, hifas
		3	Hifas y blastosporas
		4	Blastosporas
EXT. ETereo	<i>T. concentricum</i>	5	Hifas y pocas blastosporas
		6	Hifas
		7	Hifas
		8	Blastosporas (Foto 20)
		9	Hifas

Tabla 28

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
EXT. DE ACETATO DE ETILO	<i>T. rubrum</i>	1	Macroconidias , microconidias (Fotos 21 y 22)
		2	Blastosporas e hifas
		3	Hifas
		4	Microconidias
		5	Hifas
		6	Hifas
		7	Hifas
		8	Hifas y blastosporas
		9	Hifas
EXT. DE ACETATO DE ETILO	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Hifas
		2	Hifas, blastosporas y microconidias (Foto 23).
		3	Hifas
		4	Hifas septadas, pocas cantidades de microconidias
		5	Hifas creciendo (Foto 24). Artrosporas y macroconidias

(continua ..)

Tabla 28

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		6	Pocas microconidias, muchas hifas bien desarrolladas, macroconidias.
EXT. DE ACETATO DE ETILO	<i>T. mentagrophytes</i>	7	Hifas
		8	Macroconidias escasas, hifas gran cantidad.
		9	Blastosporas, muchas macroconidias.
EXT. DE ACETATO DE ETILO	<i>T. concentricum</i>	1	Microconidias abundantes
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas
		5	Hifas creciendo
		6	Hifas germinando (Foto 25).
		7	Hifas
		8	Hifas

Tabla 29.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
EXT. METANOLICO	<i>T. rubrum</i>	1	Hifas y microconidias (Foto 26)
		2	Hifas (Foto 27)
		3	Hifas
		4	Hifas
		5	Hifas
		6	Microconidias e hifas (foto 28)
EXT. METANOLICO	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Hifas y microconidias (Foto 29)
		2	Hifas y pocas microconidias (Foto 30)
		3	hifas (foto 31)
		4	Hifas , esporas germinando (Foto 32)
		5	Hifas
		6	Hifas y pocas microconidias

Tabla 30.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
EXT. ACUOSO 50%	T. concentricum	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas germinando
		5	Hifas
		6	Hifas
		7	Hifas atrofiadas muy delgadas
EXT. ACUOSO 50%	T. rubrum	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas
		5	Microconidias germinando
		6	Hifas grandes a consecuencia de la germinación
		7	Hifas acortadas y microconidias
		8	Hifas grandes

Tabla 31.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
KETOCONAZOL	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Hifas y microconidias, blastosporas, artrosporas.
		2	Hifas, pocas microconidias, artrosporas (Foto 9).
		3	Hifas y pocas blastosporas, artrosporas.
		4	Hifas y microconidias
		5	Microconidias, pocas hifas
		6	Hifas
		7	Hifas mas delgadas
KETOCONAZOL	<i>T. concentricum</i>	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas septadas
		4	Hifas
		5	Hifas atrofiadas, microconidias, Blastosporas.
		6	Hifas
		7	Hifas, blastosporas

Tabla 31.

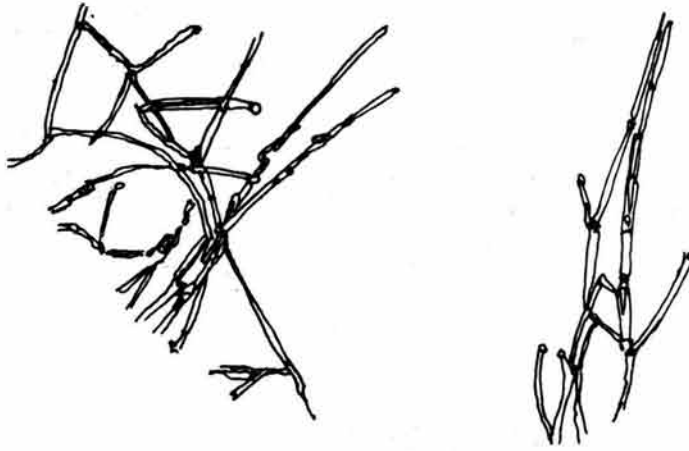
OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
		1	Hifas
		2	Hifas y microconidias
		3	Hifas y microconidias
		4	Tubos germinativos, hifas, microconidias en crecimiento (Foto 10).
KETOCONAZOL	<i>T. rubrum</i>	5	Hifas septadas y pocas microconidias
		6	Hifas atrofiadas
		7	Hifas atrofiadas

Tabla 32.

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES	DERMATOFITO	DIA	CARACTERISTICAS
GRISEOFULVINA	<i>T. mentagrophytes</i>	1	Microconidias germinando (Foto 11)
		2	Muchas microconidias
		3	Microconidias e hifas
		4	Hifas y microconidias
		5	Hifas y microconidias (Foto 12)
GRISEOFULVINA	<i>T. concentricum</i>	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas
		5	Hifas
GRISEOFULVINA	<i>T. rubrum</i>	1	Hifas
		2	Hifas
		3	Hifas
		4	Hifas (Foto 13)
		5	Hifas enrolladas



1.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Tercer día de cultivo.
 Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. concentricum*: Hifas septadas.



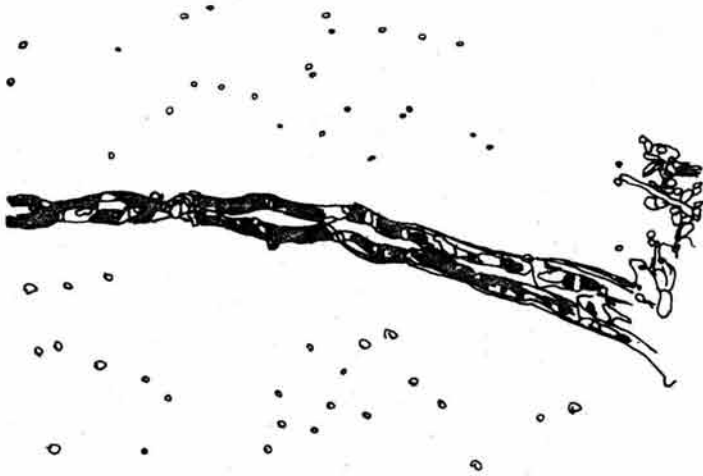
2.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Primer día de cultivo.
 Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. mentagrophytes*: Hifas septadas y algunos órganos de fructificación (microconidias).



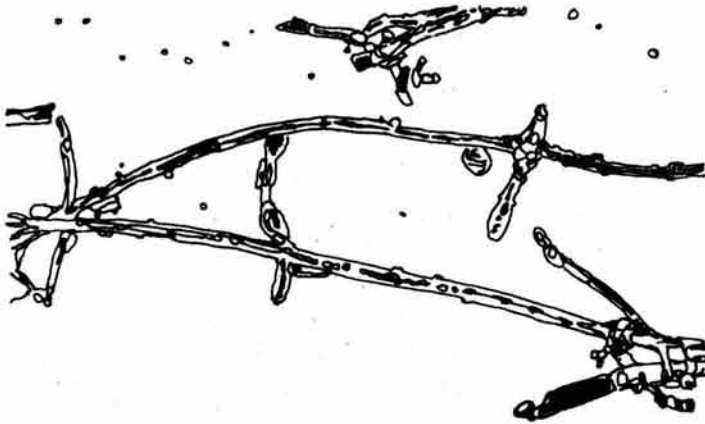
- 3.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Segundo día de cultivo.
Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. mentagrophytes*: Micelio e hifas septadas.



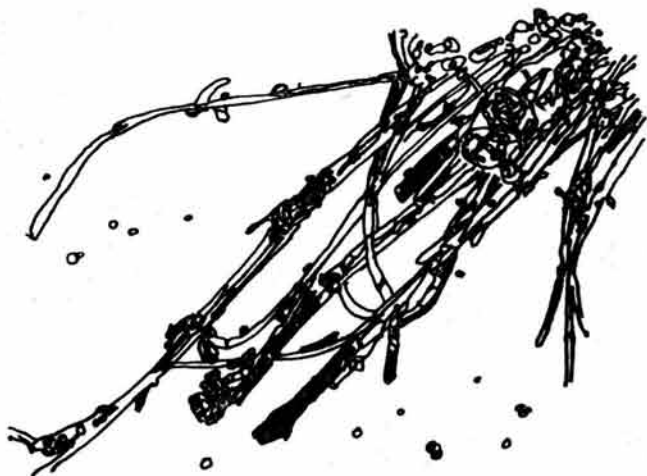
- 4.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Quinto día de cultivo.
Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. mentagrophytes*: Hifas con microconidias.



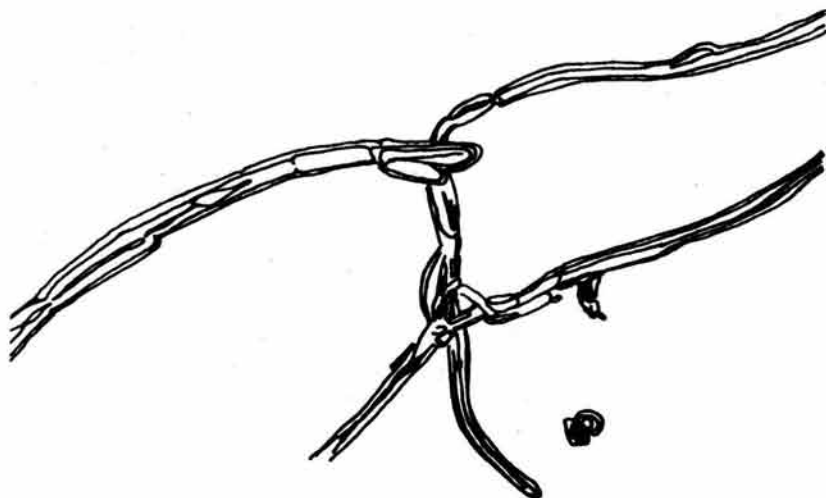
5.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Primer día de cultivo. Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. rubrum*. Hifas claramente septadas.



6.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Primer día de cultivo. Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa con *T. rubrum*: Hifas con conidióforos, de los cuales van emergiendo macroconidias, y blastosporas.



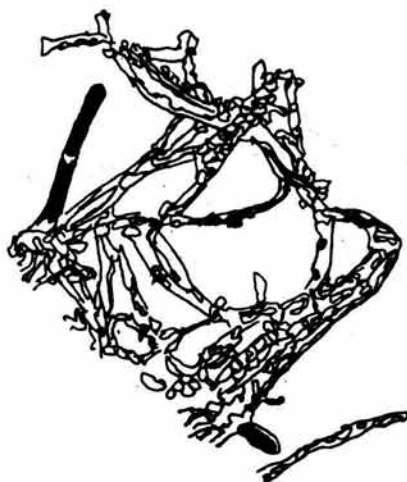
7.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Segundo día de cultivo.
Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa, con *T. rubrum*: Imagen de hifas agrandadas, algunas ya envejecidas.



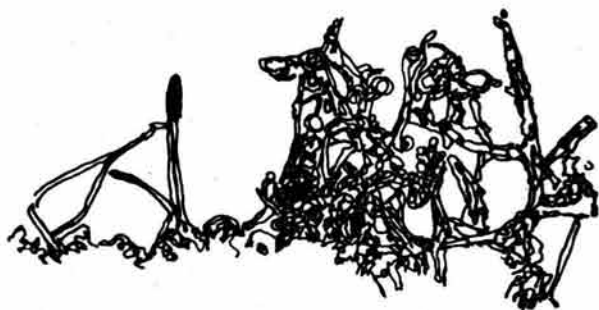
8.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 2 x 3.2 . Cuarto día de cultivo.
Ensayo en Agar Sabouraud Dextrosa, *T. rubrum*: Hifas bien desarrolladas, con su contenido citoplasmático intacto.



9.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Segundo día de cultivo.
Ensayo con Ketoconazol y *T. mentagrophytes*: Micelio con hifas septadas y presencia de artrosporas.



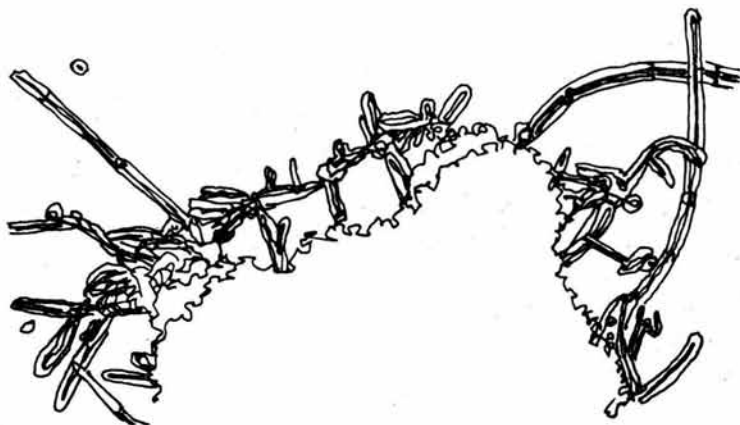
10.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Cuarto día de cultivo.
Ensayo con ketoconazol y *T. rubrum*: Imagen del micelio e hifas carentes de contenido celular.



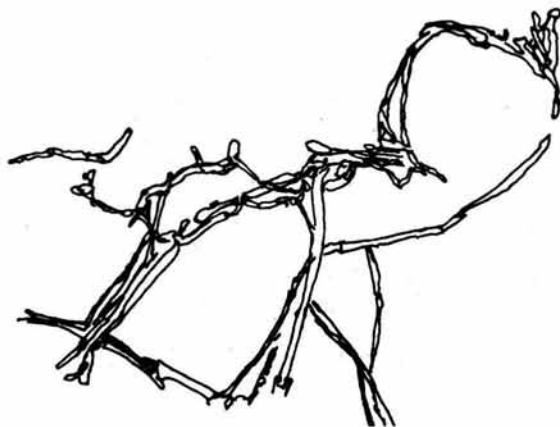
- 11.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Primer día de cultivo.
Ensayo con Griseofulvina y **T. mentagrophytes**: Presencia de hifas demasiado atrofiadas y engrandecidas.



- 12.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Quinto día de cultivo.
Ensayo con griseofulvina en presencia de **T. mentagrophytes**: Presencia de micelio septado e hifas espiraladas, algunas sin contenido citoplasmático.



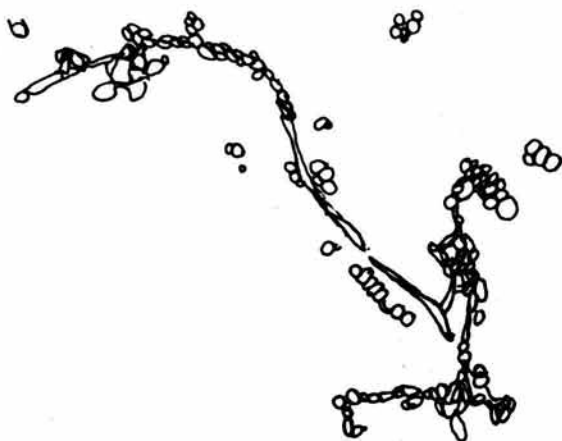
13.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Cuarto día de cultivo.
 Ensayo con griseofulvina en presencia de *T. rubrum*: Micelio septado y microconidias piriformes.



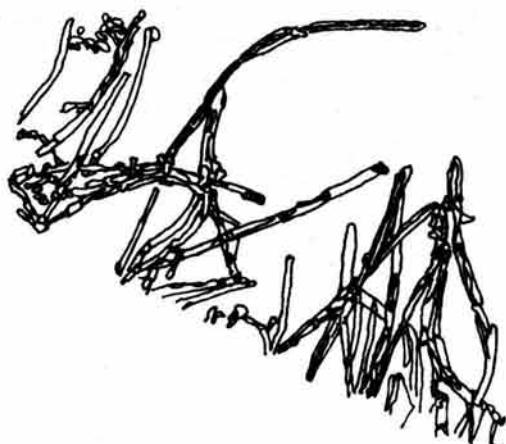
14.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Segundo día de cultivo.
 Ensayo con extracto hexánico y *T. nestagrophytes*: Aspecto del micelio transparente y muy pocas microconidias.



15.- Fotomicrografía en contraste de fases , filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Quinto día de cultivo.
 Ensayo con extracto hexánico y *T. rubrum*: En esta impresión se no ta el micelio atrofiado con muy pocos blastosporos.

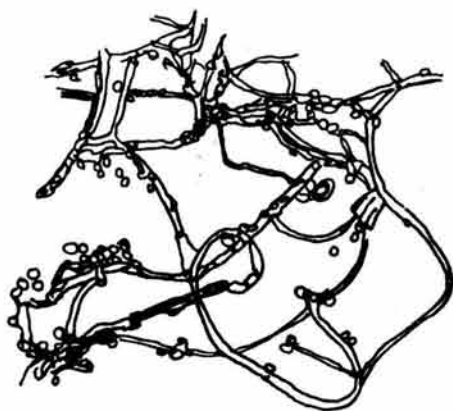


16.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Tercer día de cultivo.
 Ensayo con extracto hexánico y *T. concentricum*: Micelio con hifas septadas, hifas transparentes y microconidias.



17.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Primer día de cultivo.

Ensayo con extracto etéreo y *T. rubrum*: Presencia de micelio con hifas septadas y los poros de cada una muy visibles, algunas hifas casi deshechas.

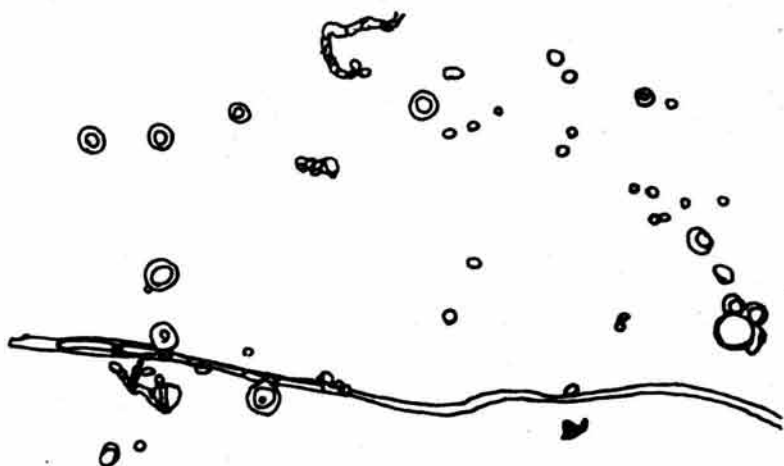


18.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Primer día de cultivo

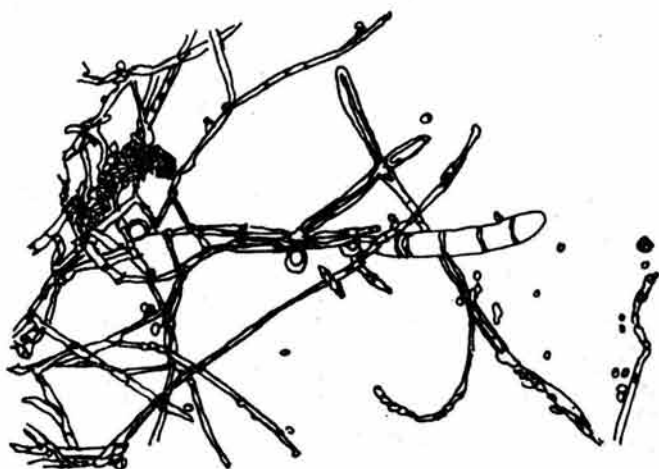
Ensayo con extracto etéreo y *T. mentagrophytes*: Aspecto de hifas espiraladas, mostrando las microconidias redondeadas características.



19.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Primer día de cultivo.
 Ensayo con extracto etéreo y con *T. mentagrophytes*: Aspecto del micelio e hifas.



20.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo.
 Ensayo con extracto etéreo y *T. concentricum*: Hifa septada.



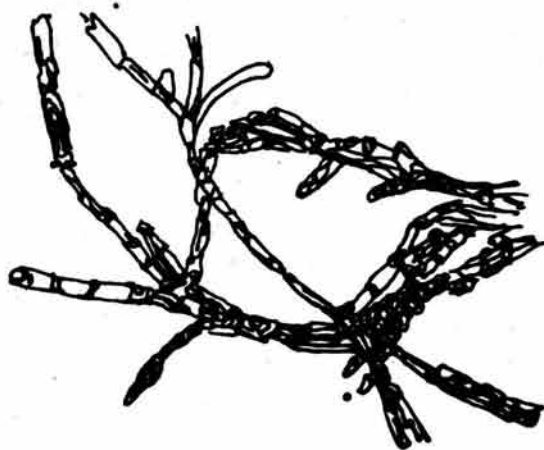
21.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 2 x 3.2 . Primer día de cultivo. Ensayo con extracto de acetato de etilo y *T. rubrum*: Imagen de ma cronidias, micelio septado y microconidias piriiformes.



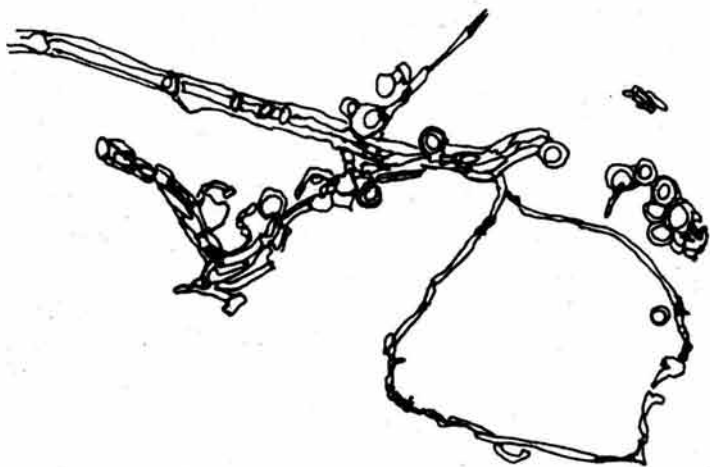
22.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 2 x 3.2. Primer día de cultivo. Ensayo con extracto de acetato de etilo y *T. rubrum*: Organos de fructificación, microconidias piriiformes.



23.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Segundo día de cultivo.
 Ensayo con extracto de acetato de etilo y *T. mentagrophytes*: Organos de fructificación (macroconidias y microconidias) así como micelio con hifas septadas.



24.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4. Quinto día de cultivo.
 Ensayo con extracto de acetato de etilo y *T. mentagrophytes*: Hifas en desarrollo y demasiado dilatadas, como si fueran a formar artrosporas.



- 25.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de cultivo.
 Ensayo con acetato de etilo y *T. concentricum*: Imagen de las hifas bifurcándose, así como esporas.



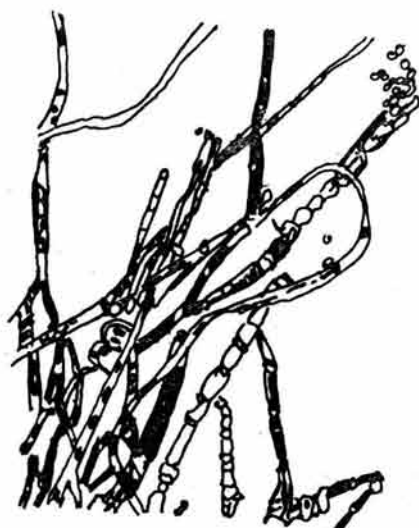
- 26.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Segundo día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. rubrum*: Hifas, algunas sin contenido citoplasmático, granulos del citoplasma vacuolizado, sin microconidias.



27:- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Segundo día de tratamiento.
Ensayo con extracto metanólico y *T. rubrum* : Hifas con los tabiques demasiado numerosos, algunas hifas ensanchadas.



28:- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. rubrum*: Hifas aglutinadas, así como desnaturalizadas.



- 29.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Primer día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y T. mentagrophytes: Aspecto de los órganos de fructificación (microconidias) e hifas.



- 30.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Segundo día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y T. mentagrophytes: Imagen de microconidias e hifas.



31.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Tercer día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. mentagrophytes*: Imagen del micelio.

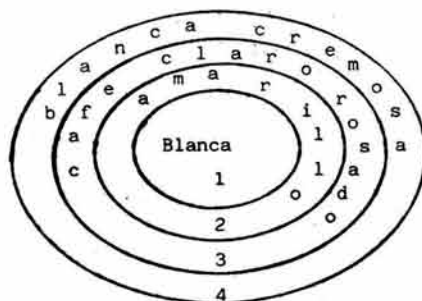


32.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Cuarto día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. mentagrophytes* : Aspecto de las esporas emitiendo su tubo germinativo, algunas ya con el tubo.

En una de las repeticiones del ensayo con extracto metanólico al 0.5%, en presencia de **Trichophyton mentagrophytes**, en el sexto día del tratamiento, se encontró que en cada caja Petri había diferentes coloraciones, que correspondían a diferentes fases de crecimiento. Para -- comprobar este hecho se tomaron pequeñas muestras de cada coloración, con una aguja de disección, y se efectuaron preparaciones (utilizando como colorante lugol) durante 4 días, hasta que la placa se había saturado del hongo.

OBSERVACIONES DE LA CAJA PETRI

- 1.- En el centro, donde originalmente se sembró un trozo de hongo, se observó una coloración blanca.
- 2.- El siguiente halo tuvo una coloración amarilla.
- 3.- El tercer halo, una coloración café claro rosado.
- 4.- El cuarto halo, una coloración blanca cremosa.



OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES Y HONGOS	CAPA	DIA	CARACTERISTICAS	FOTO
EXTRACTO METANOLICO <u>Trichophyton mentagrophytes</u>	CENTRO BLANCO	6	Micelio, hifas vacuolizadas (transparentes) y ensanchadas	33
			Micelio, hifas vacuolizadas (transparentes) y ensanchadas	34
		7	Hifas adelgazadas y microconidias	35
		8	Hifas vacuolizadas, blastosporos y microconidias	36
	AMARILLO	6	Hifas sin alteraciones, microconidias	37
		7	Abundantes microconidias, hifas septadas.	38
		8	Abundantes microconidias	39
			Hifas vacuolizadas, deformadas ensanchadas, pocas microconidias	40
	CAFE ROSADO	6	Hifas vacuolizadas, ensanchadas, pocas microconidias.	41
		7	Hifas vacuolizadas pocas microconidias	42
			Hifas vacuolizadas y microconidias	43
		8	Hifas, microconidias y artrosporas Microconidias, hifas desnaturalizadas y artrosporas.	44 45

OBSERVACIONES DE LAS PREPARACIONES CON LUGOL

COMPONENTES y HONGOS	CAPA	DIA	CARACTERISTICAS	FOTO
		6	Hifas envejecidas, artrosporas	46
	CREMA	7	Hifas desnaturalizadas y adelgazadas.	47
		8	Hifas imperfectas	48



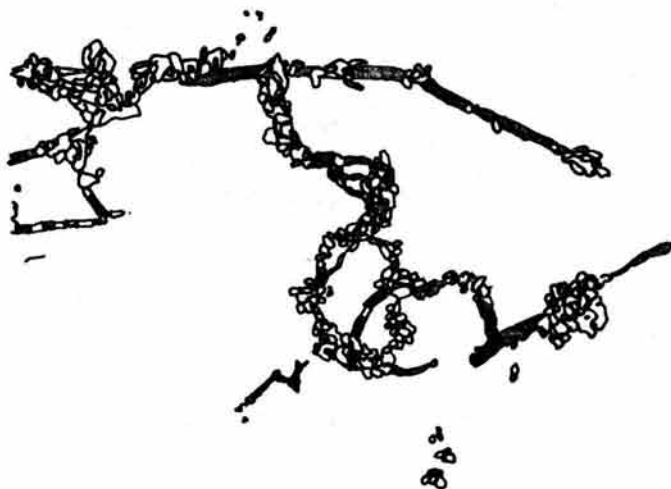
33.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de tratamiento. Ensayo en extracto metanólico al 0.5%, con T. mentagrophytes: Aspecto de las hifas vacuolizadas (transparente).



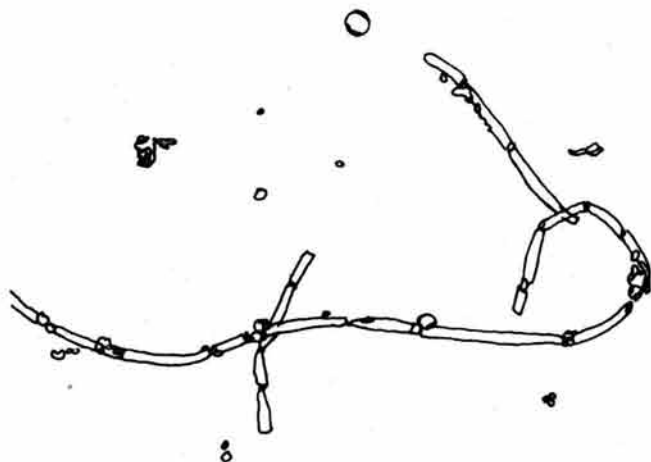
34.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de tratamiento. Ensayo en extracto metanólico al 0.5%, con T. mentagrophytes: Aspecto de las hifas vacuolizadas (transparente) y ensachadas.



35.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y T. mentagrophytes: Imagen de las hifas adelgazadas y algunas microconidias.



36.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y T. mentagrophytes: Imagen de hifas vacuolizadas con blastosporos, algunas hifas presentan los poros mas redondeados. Microconidias.



37.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. mentagrophytes*: Imagen de hifas sin alteraciones y presencia de pocas microconidias.



38.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Abundantes microconidias, hifas septadas.



F4

- 39.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Abundantes microconidias.



- 40.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Hifas vacuolizadas, deformadas y ensanchadas. Pocas microconidias y conidióforos.



41.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*:
 Hifas vacuolizadas, ensanchadas, pocas microconidias.



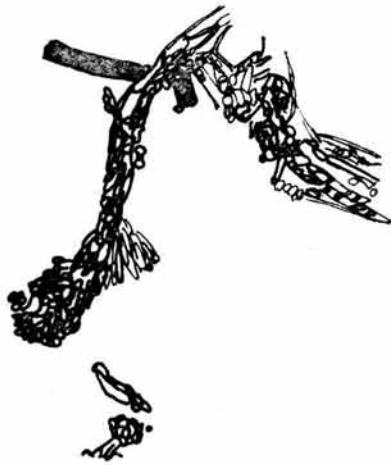
42.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo.
 Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Hifas vacuolizadas y pocas microconidias.



- 43.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5% y *T. mentagrophytes*: Hifas vacuolizadas y transparentes y órganos de fructificación (microconidias).



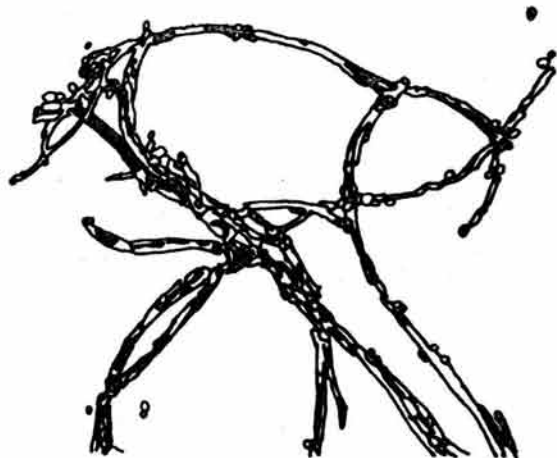
- 44.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Hifas envejecidas con aumento del número de tabiques de las mismas, redondeadas formando una larga cadena de esporas internas.



45.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. montagrophytes*: Presencia de órganos de fructificación y esporas internas.



46.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Sexto día de cultivo. Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. montagrophytes*: Hifas envejecidas, así como aumento del número de tabiques redondeados, formando una larga cadena de esporas internas.



47.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Séptimo día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5%, y *T. mentagrophytes*: Hifas con los poros muy juntos, desnaturalización de las mismas así como su adelgazamiento.



48.- Fotomicrografía en contraste de fases, filtro 80 b, fotocelda 8-2, aumento 40 x 4 . Octavo día de cultivo.
Ensayo con extracto metanólico al 0.5% , y *T. mentagrophytes*: Hifas imperfectas.

Actualmente existen muchos medicamentos para el tratamiento de las micosis, pero son pocas las sustancias activas y de valor para las afecciones superficiales y aún menos para las profundas. En los últimos años - se están estudiando algunas drogas que parecen ser promisorias.

Hace unas décadas la griseofulvina daba resultado contra hongos fitopatógenos. ¿ Podría poseer algún efecto contra agentes productores de micosis en el hombre ? Gentles (1967) tuvo el acierto de probarlo. La experiencia ha demostrado su valor; especialmente es útil para tratar las tiñas, incluyendo el favus, el granuloma de Wilson y la onicomycosis de mano. Sólo que omitió mencionar los efectos secundarios que esta sustancia produce en el ser humano, dañando el riñón, que es muy susceptible a este medicamento; además, produce fragilidad capilar, hipertensión y gastritis. Esta sustancia es un ejemplo de lo peligroso que puede ser el uso de los antimicóticos. Probablemente en un futuro más cercano se encuentren métodos más eficaces de prueba para la eliminación de los hongos, puesto que in vitro muchos medicamentos suelen tener efectos mortales en los dermatofitos, pero ya como tratamiento en el humano las condiciones ecológicas y fisiológicas suelen ser muy diferentes, pudiendo transformar el medicamento y no tener el mismo efecto.

Otra alternativa para remitir las tiñas serían los metabolitos secundarios que poseen algunas plantas. Su empleo no es tan peligroso, ya que es un medicamento de uso externo. Con este fin, en un estudio preliminar probamos la efectividad de los extractos hexánico, etéreo, de acetato de etilo, metanólico y acuoso de Croton suberosus, en la inhibición del crecimiento de Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum y T. concentricum.

Es sabido que en el género *Trichophyton* se presentan mutaciones ante la presencia de cualquier cambio externo (cambios en el medio, como son el pH, sales, glucosa, temperatura y sustancias) aún más, ante la presencia de antimicóticos. Y no es de extrañar, ya que los dermatofitos son muy inestables y enseguida sufren variaciones. Estos cambios han sido observados en innumerables ocasiones.

Es bien conocida la tendencia general que presentan los dermatofitos en el cultivo, de perder, después de un tiempo, los caracteres que los identifican, convirtiéndose en un micelio indiferenciado y estéril; paralelo a este cambio el hongo ya no conserva más sus propiedades patógenas.

Alteraciones morfológicas

Observaciones in vivo: Cuando las hifas van envejeciendo, el número de tabiques se multiplica y se redondean, formándose una larga cadena de esporas internas o artrosporas, que se liberan. De este modo el hongo se multiplica. Cada una de las esporas emite un tubo germinativo, que cuando adquiere una cierta longitud aparece un tabique, constituyéndose dos células. La interior detiene su crecimiento, la otra, apical, sigue multiplicándose. De aquí que se forme una amplia red de filamentos.

Observaciones in vitro: Cuando se cultivan las artrosporas se presenta una transformación extraordinaria. Aparecen esporas pequeñas (microconidias) que se sostienen sésiles, o bien, gracias a un pequeño pedículo, sobre el filamento. Existen otras grandes que reciben el nombre de macroconidias.

Después de tener en cuenta estas observaciones, nuestros resultados en las preparaciones con lugol fueron los siguientes:

En *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*, el ketoconazol produce cambios en las hifas, como la desnaturalización de las mismas (Foto 9 y foto 10). La griseofulvina muestra una acción parecida pero en menor grado, sólo sobre *T. mentagrophytes* (foto 11), produciendo al quinto día el factor rizante (foto 12); sobre *T. rubrum* y *T. concentricum* no hay cambios tan notables (foto 13). En esta fotografía se ven nítidamente las microconidias piriformes.

Los extractos de *Croton suberosus* que tuvieron los efectos más parecidos a la acción del ketoconazol fueron, el hexánico sobre de *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (foto 14 y 15 y el metanólico sobre *T. rubrum* - (foto 28). El extracto etéreo actúa sobre *T. mentagrophytes* formando esporas internas o artrosporas, que se liberan y emiten sus tubos germinativos (foto 19); lo mismo sucede con el extracto de acetato de etilo (foto 24), sólo que se observa un paso anterior a la formación de tabiques visualizándose además los poros que se redondean aún más y que posteriormente darán una larga cadena de esporas. La actividad del extracto etéreo sobre los otros hongos, *T. rubrum* y *T. concentricum* no es tan intensa como para pleomorfizarlos (foto 17 y 20). El extracto de acetato de etilo en presencia de *T. concentricum* altera muy poca la morfología de la hifa (foto 25). El mismo extracto, en presencia de *T. concentricum* altera muy poco la morfología de la hifa (foto 25). El mismo extracto, en presencia de *T. rubrum*, no la altera, dejando intactos los órganos de fructificación, su micelio, macroconidias y microconidias (foto 21 y 22). El extracto metanólico casi no altera a *T. mentagrophytes*, desarrollando diferentes coloraciones, di-

remos que el hongo trató, por todos los medios, de sobrevivir, pleomorfizándose hasta la formación de artrosporas, que sólo se observan *in vivo* (foto 33 a 48).

VII. CONCLUSIONES

PARTE QUIMICA

- 1.- Al igual que en otras especies, en **Croton suberosus** también se comprobó la existencia de alcaloides.
- 2.- Del extracto hexánico se aisló una cera, un alcohol graso y un producto que resultó mezcla de dos tri-terpenos.
- 3.- Del extracto etéreo, se analizó la composición de la fracción aromática, en la que se encontraron algunos de los componentes reportados para otros aceites esenciales de especies del género **Croton**.
- 4.- Se aisló quercitrina, tanto del extracto etéreo como del de acetato de etilo. Es probable que esta sustancia contribuya a la actividad antifúngica que tienen estos extractos, hasta ahora sólo se le ha asignado a la quercitrina propiedades insecticidas.

PARTE BIOLÓGICA

Los extractos etéreo y de acetato de etilo presentaron mayor actividad antifúngica que los otros, lo que hace pensar en la posibilidad de que la quercitrina que se encuentra en estos extractos, tenga actividad antimicrobiana.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ajello L., and Cheng, Shu-Lan. (1967). The perfect state of -- **Trichophyton mentagrophytes** . Sabouraudia, 5, 230-234.
- 2.- Ambrogi V.D., et al. (1970). Studies on the antibacterial and antifungal properties of 1,4-naphthoquinones. Br. J. Pharmacol. 40: 871-880.
- 3.- Barnerjee K.K., and Sen A. (1981). Purification and properties of a lectin from the seeds of **Croton tiglium** with hemolytic activity toward rabbit red cells. Archives of biochemistry and biophysic. Vol 212 (2): 740-753 (Osborne T. B. (Stillmark in 1888), 1924 in the vegetable proteins, pp. 115-116, Longmans, Green, London).
- 4.- Barnes R.A., and Soeiro O.M. (1981). The alkaloids of **Croton salutaris**. Phytochemistry Vol. 20 , 543-544.
- 5.- Barton D.H.R., et al. (1965). Investigations on the biosynthesis of morphine alkaloids. J. Chem. Soc., 2423.
- 6.- Berenblum I. (1941). The cocarcinogenic action of **Croton** resin. - Cancer Res, 1:44.
- 7.- Bettolo R.M., and Scarpati M.L. (1979) Alkaloids of **Croton dracoides**. Phytochemistry Vol. 18, 520.
- 8.- Bhakuni, D.S. and Dhar M.N. (1968) Crotsparine, a new proaporphine alkaloid from **Croton sparsiflorus** Morong. Experientia 24(1): 10-11.
- 9.- Bhakuni, D.S. and Dhar M.N. (1969) Crotsparinine, a dihydroproaporphine alkaloid from **Croton sparsiflorus**. Experientia, 15(4): 354.
- 10.- Bhakuni, D.S., Satish S., and Dhar M.N. (1970). The alkaloids of - **Croton sparsiflorus**. Phytochemistry 9, 2573.
- 11.- Bhakuni D.S., and Jain S. (1981). The biosynthesis of the alkaloids of **Croton sparsiflorus** Morong. 37(18): 3175-3181.
- 12.- Burke B.A., Chan W.R., and Pascoe K.O. (1981). The structure of crotonitenone, a novel casbane diterpene from **Croton nitens** Sw. (Euphorbiaceae). Journal Chemistry Society Perkin I., 2666-2669.
- 13.- Cairnes D.A., Mirvish S.S., Wallcave L., Nagel D.L., and Smith J. W. (1981). A rapid method for isolations phorbol **Croton** oil. Cancer -- letters., 14: 85-91.

- 14.- Chambers C., Haynes L.J., and Stuart K.L. (1966). Norsinoacutina y salutaridina isolated from **Croton balsamifera** Jacq., Chemical Communications, No. 14, 449.
- 15.- Chambers C., and Stuart K.L. (1968). Flavinantine and flavinine. Novel morphinandienone alkaloids from **Croton flavens** I. Chemical Communications, 328-329.
- 16.- Chatterjee A., Majumder P.L., Mukherjee R., Saha S.K., and Talapatra S. K. (1965). Structure of Sparsiflorine. An alkaloid of **Croton sparsiflorus** Morong. Tetrahedron letters, 1539.
- 17.- Chatterjee A., Banerjee A., and Bohlmann F. (1978). Isocrotocaudin, a new norclerodane-type diterpene from **Croton caudatus**. Phytochemistry Vol. 17; 1777-1779.
- 18.- Craveiro A.A., et al., (1981). Sonderianin, a furanoid diterpene from **Croton sonderianus**. Phytochemistry 20 (4): 852-854.
- 19.- Craveiro A.A., et al., (1981). Volatile constituents of Brazilian. Euphorbiaceae. Genus **Croton**. Journal of Natural Products. 44(5) : 602-608.
- 20.- Craveiro A.A., and Silveira E.R., (1982). Two cleistanthane type diterpenes from **Croton sonderianus**. Phytochemistry 21(10): 2571-2574.
- 21.- Crombie L., Games M.L., and Pointer D.J.(1968). Chemistry and Structure of phorbol, the diterpene parent of the co-carcinogens of **Croton** oil. J. Chem. Soc. (C)., 1347-1362.
- 22.- D'alessandro A.(1976). Diagnóstico micológico. Panamericana. Argentina, 41-44.
- 23.- Deacon J. W. (1980). Introduction to modern mycology. Black Well - Scientific. Publish Great Britain Vol. 7
- 24.- De Alvarenga M.A., et al. (1978). Diasin, a diterpene from **Croton diasii**. Phytochemistry Vol. 17, 1773-1776.
- 25.- Deshmukh S.D., Borle M.N. (1976). Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products. Indian Journal of Entomology 37(1): 11-18.

- 26.- Domínguez Pérez Tejada C.A. (1985). Ecología reproductiva de **Croton suberosus** (Euphorbiaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Ciencias, México D.F., 20, 22-23.
- 27.- Domínguez Vargas O. (1976). Plantas Medicinales y la incógnita homeopática. Estado actual del conocimiento en plantas medicinales. IMEPLAN. Edit. por Xavier Lozoya L. México, 197-216.
- 28.- Domínguez X.A. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa . México, 84,141,153,204 y 218.
- 29.- Frei J. V., and Ritchie A.C. (1962). Epidermal carcinogenesis by carcinogen followed by various concentrations of **Croton** oil. Journal Nat. Cancer. Inst. 29: 687-697.
- 30.- Friedewald, W.F., and Rous P. (1944). The initiating and promoting -- elements in tumor production. An analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin. J. Exper. Med. 80: 101-126.
- 31.- Gentles J.C. (1967). The determination of sensitivity of dermatophytes to griseofulvin. In recent advances of human and animal mycology Edited by E. Hegyi. Publishing House Slovak. Academy of Sciences Bratislava, 369-378.
- 32.- Gershon H., and Shanks L. (1975). Fungitoxicity of 1,4 naphthoquinones to **Candida albicans** and **Trichophyton mentagrophytes**. Can. J. Microbiology. Vol. 21: 1317-1321.
- 33.- Gershon H., and Shanks L. (1976). Antifungal properties of α -alkenedicarboxylic acids and their dimethyl esters. Can J. Microbiol. 22: 1198-1201.
- 34.- Gershon H., and Shanks L. (1978). Antifungal properties of halofumarates esters. Journal of Pharmaceutical Sciences 67(4): 578-580.
- 35.- Gómez Pompa A. (1966). Estudios botánicos en la Región de Misantla, Veracruz. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables A.C. México.
- 36.- Hanlin R.T. y Ulloa M. (1978). Atlas de micología básica. Edit. Concepto. México.

- 37.- Hashimoto T., and Blumenthal H.J. (1972). Characterization of L-leucine-induced germination of **Trichophyton mentagrophytes** microconidia. *Journal of Bacteriology* 112(2); 967-976.
- 38.- Hashimoto T., and Blumenthal H.J. (1978). Survival and resistance of **T. mentagrophytes**. *Arthrospores applied and environmental microbiology*. Vol. 35(2): 274-277.
- 39.- Haynes L.J., and Stuart K.L. (1963). Alkaloids from **Croton** species. Part I. The isolation of alkaloids from **Croton linearis** Jacq., and the detection of alkaloids of **C. glabellus** L., **C. humilis** L., and **C. flavens** L., *Journal Chem. Soc.* 1784-1788.
- 40.- Haynes L.J., Stuart K.L., Barton D.H.R., and Kirby G. W. (1966). Alkaloids from **Croton** species Part III. The constitution of the proaporphines crotonosine "Homolinarisine" Base A, and the dihidroproaporphine linearisine . *J. Chem. Soc. (C)*. 1676.
- 41.- Haynes L.J., Husbands G.E.M., Stuart K.L. (1967). The alkaloids 8,14-dihydrosalutaridine and 8,14-dihydronorsalutaridine from **C. linearis** Jacq. *Chemical Communications No. 1*, 15-16.
- 42.- Haynes L.J., Husbands G.E.M., and Stuart K.L. (1968). Alkaloids from **Croton** species. Part VIII. Morphinandienone derivatives from **C. linearis** Jacq. *Journal Chem. Soc. (c)*: 951-957.
- 43.- Humbolt y Bonpland (1817). *Nova genera et species plantarum*. Librairie Grecque-Latine-Allemande . Tome second. Lutetice. parisiorum , 68.
- 44.- Jungerman P.F., y Schwartzman R.M. (1977). *Micología médica veterinaria*. Edit. Continental CECSA. México, 33-37.
- 45.- Kerbs S., Hutton R.D., and Hollister J.W. (1978). Visual micromethod for assay of fungal growth. *Can. J. Microbiol.* 24: 574-578.
- 46.- Kitazawa E., et al. (1980). Novel diterpenelactones with anti-peptic ulcer activity from **Croton sublyratus**. *Chem. Pharm. Bull.* 28(1): 227-234.
- 47.- Kitazawa E., and Ogiso A. (1981). Two diterpene alcohols from **C. sublyratus**. *Phytochemistry* Vol. 20, 287-289.
- 48.- Kutney J.P., Klein F.K., and Eigendorf G. (1971). Alkaloids from ---- **Croton** species XII. Glutarimidepeptides from **C. humilis** L. *Tetrahedron letters* No. 52, 4973-4975.

- 49.- Martín del Campo R. (1976). Consideraciones acerca de las plantas medicinales en su posible proyección mundial. Estado actual del conocimiento en plantas medicinales. IMEPLAN, Edit. por Xavier Lozoya L. México, 97-104.
- 50.- McVaugh R. (1961). University Herbarium. University of Michigan Ann Arbor. Brittonia 13: 145-205.
- 51.- Miller, J.A. (1970). Carcinogenesis by chemicals: An over-view. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res., 30:559.
- 52.- Monte F.J.Q., Andrade C.H.S., and Craveiro A.A. (1984). New tetra cyclic diterpenes from *Croton argyrophylloides*. Journal of natural products. Vol. 47 No. 1, 55-58.
- 53.- Müller E., y Loeffler W. (1976). Micología. Omega. Barcelona.
- 54.- Ogiso A., et al. (1978). Isolation and structure of anti-peptic ulcer diterpene from Thai Medicinal Plant. Chem. Pharm. Bull. -- 26(10): 3117-3123.
- 55.- Oster K.A., and Golden M.J. (1948). Studies on alcohol-soluble fungistatic and fungicidal compounds. III. Evaluation of the anti-fungal properties of quinones and quinolines. J. Am. Pharm. Assoc. 37: 429-434.
- 56.- Rebell G., and Taplin D. (1970). Dermatophytes their recognition and identification. Second edition. University of Miami Press. Florida, 40,50 y 61.
- 57.- Robbins S.L., Angell M., Kumar V. (1985). Patología Humana. Edit. Interamericana. Tercera edición. México. 105-107.
- 58.- Rojas E.T., and Rodriguez-Hahn L. (1978). Nivenolide, a diterpene lactone from *Croton nivens*. Phytochemistry Vol. 17, 574-575.
- 59.- Sánchez S.O. (1980). La flora del valle de México. Edit. Herrero. Sexta edición. México, 236.
- 60.- Shubik, P., Baserga R., and Ritchie A.C. (1953). The life and progression of induced skin tumor in mice. Brit. J. Cancer 7: 342-351.

- 61.- Simon D.Z., Brookman S., Beliveau J., and Salvador R.L. (1977). Synthetic acetylenic antifungal agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 66 No. 3: 431-432.
- 62.- Stuart K.L., Haynes L.J., Barrett M., and Husbands G.E.M. (1968). Jacularine, a New reduced proaporphine from *Croton linearis* Jacq. *Tetrahedron letters*. No. 42: 4473-4474.
- 63.- Stuart K.L., Chambers C., and Byfield D. (1969). Morphinandienone alkaloids from *C. flavens* L. *Journal Chem. Soc. (C)*: 1681-1684.
- 64.- Stuart K.L., and Woo-Ming R.B. (1969). Alkaloids from *C. plumieri*. *Phytochemistry* Vol. 8 :777-780.
- 65.- Stuart K.L., Byfield D., Chambers C., and Husbands G.E.M. (1970). Alkaloids from *Croton* species Part X. Two New. Reduced proaporphine alkaloids. *Journal Chem. Soc. (C)*: 1228-1230.
- 66.- Takahashi S., et al (1983). Plaunolide, a furanoid diterpene from *C. sublyratus*. *Phytochemistry* Vol. 22 No. 1: 302-303.
- 67.- Takashio M. (1972). Is *Arthroderma benhamiae* the perfect state of - *Trichophyton mentagrophytes* ? *Sabouraudia* 10:122-127.
- 68.- Tiwari K.P., Choudhary R.N. and Pandey G.D. (1981). 3-metoxy-4,6-dihydroxymorphinandien-7-one, an alkaloid from *C. bonplandianum*. *Phytochemistry* Vol. 20 No. 4 : 863-864.
- 69.- Uchida I., Fujita T., and Fujita E. (1975). Terpenoids XXXIV *teuvidin*, a minor norditerpene from *Teucrium viscidum* var *miquelianum* *Tetrahedron* 31, 841.
- 70.- Ulloa M. y Hanlin R.T. (1978) *Atlas de micología básica*. Edit. *Concepto*. México.
- 71.- Wehmer, C. (1929). Other resins are known as *Sanguis draconis* (-- *Calamus draco*). *Drachen-Blut. (Calamus sciplonum)*. *Die pflanzensstoffe*. Fischer, Jena. 122.6.
- 72.- Weisburger, J.H., and Williams G. M. (1975). Metabolism of chemical carcinogens. In Becker, F.F. (ed.): *Canar: A comprehensive tretise*, Vol. 1. New York. *Pleanum Press*, 185.

- 73.- Yarkoni E., and Rapp H.J. (1979). Local tumor regression after intralesional injection of **Croton** oil. J. Natl Cancer Inst. 63(2): 503-506.
- 74.- Young, Celia N. (1968). Range of variation among isolates of --- **Trichophyton rubrum**. Sabouraudia, 6, 160-162.