



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO

PROPIEDADES Y EFECTOS DEL AJO (Allium sativum) SOBRE
EL CRECIMIENTO DE ALGUNAS ESPECIES DE HONGOS.

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

MA. MATILDE PEDRAZA RAMOS

ASESORADA POR

M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

1993



T

RM666

.G15

P4

C.1



1080077110

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO

PROPIEDADES Y EFECTOS DEL AJO (Allium satium) SOBRE
EL CRECIMIENTO DE ALGUNAS ESPECIES DE HONGOS.

TESIS PROFESIONAL

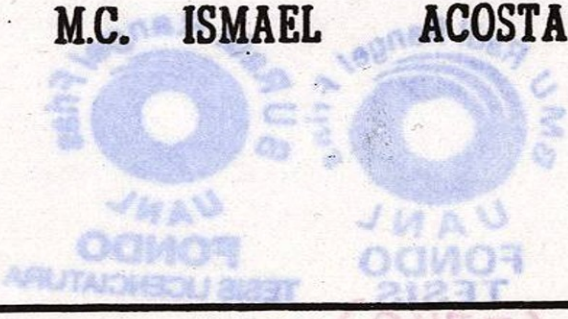
que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a :

MA. MATILDE PEDRAZA RAMOS

ASESORADA POR

M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ



T
RM 666
• 915
P4

UNIVERSITÀ
BUI, VIR
U L
TES (77110) TE LICENCIATURA

El secreto para poder alcanzar el éxito
es saber aprovecharlo cuando éste se
presenta.

DEDICATORIAS .

A Dios:
Porque me deja estar viviendo
el destino que me ha brindado.

A Mis Padres:
Por su sacrificio incondicional que
me ofrecieron para que pudiera ser
alguien en esta vida.

A His Hermanos:
Que me aconsejaron y me apoyaron
durante toda mi carrera.

A Mi Asesor: Ismael Acosta Rodríguez.
Que me dedicó parte de su tiempo para poder
lograr mi meta.
Por su apoyo y amistad.

INDICE GENERAL.

TITULO	Página.
Resumen.	1
Introducción.	2
Antecedentes.	13
Objetivo General.	16
Metodología.	17
Material y Equipo.	18
Preparación de Reactivos, Medios de Cultivos y Extractos.	19
Técnicas utilizadas.	21
Resultados.	24
Discusión.	43
Conclusiones.	45
Bibliografía.	46

INDICE DE TABLAS.

TITULO	Página
Tabla No.1.- Diferencias más notables entre procariotes y eucariotes.	4
Tabla No.2.- Sitios de acción de algunas drogas antimicóticas.	12
Tabla No.3.- Componentes del Ajo.	15
Tabla No.4.- Contenido de proteínas del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) determinado por Lowry.	26
Tabla No.5.- Efecto de diferentes Concentraciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Candida albicans</u> .	28
Tabla No.6.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de diferentes concentraciones de <u>Candida albicans</u> .	29
Tabla No.7.- Efecto del Carbón activado sobre la actividad inhibitoria del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) en <u>Candida albicans</u> .	33
Tabla No.8.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de diferentes especies de hongos.	34

INDICE DE FIGURAS.

TITULO	Página.
Fig. No.1.- Efecto de diferentes diluciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA).	27
Fig. No.2.- Vida media de la actividad antifúngica del Ajo a 4°C.	30
Fig. No.3.- Efecto de la actividad antifúngica del Ajo en tubos destapados.	31
Fig. No.4.- Efecto de la actividad antifúngica del Ajo en tubos destapados a diferentes temperaturas.	32
Fig. No.5.- Efecto de diferentes diluciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Candida albicans</u> .	35
Fig. No.6.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de diferentes concentraciones de <u>Candida albicans</u> .	36
Fig. No.7.- Efecto de diferentes concentraciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Candida albicans</u> .	37
Fig. No.8.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Histoplasma capsulatum</u> .	38
Fig. No.9.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Wangiella dermatitidis</u> .	39
Fig. No.10.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Cladosporium carrionii</u> .	40
Fig. No.11.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Mucor rouxii</u> .	41
Fig. No.12.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de <u>Penicillium marneffeii</u> .	42

RESUMEN.

El ajo ha sido usado como condimento, alimento y medicamento popular desde hace mucho tiempo. En la literatura se ha descrito que sus extractos poseen actividad "in vitro" contra el crecimiento de Candida sp., "in vivo" e "in vitro" contra dermatofitos, y hay contradicciones con respecto a su efecto sobre Cryptococcus neoformans (Louria y cols., 1989).

No se ha reportado en la literatura su efecto contra contaminantes ambientales, siendo por eso que en este estudio se analizaron algunos de esos hongos contaminantes como Alternaria alternata, Trichotecium sp para ver si existe o no un efecto inhibitorio del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre ellos.

También se estudiaron algunas de las propiedades del ECFA para observar si se modificaba la actividad antifúngica; para lo cual, se usó como control al hongo dimórfico Candida albicans.

Algunos factores que modificaron esta actividad antifúngica fueron los siguientes:

- Diluido 1:10, 1:100, 1:1000 en solución salina al 0.85% estéril.
- A 4°C y 28°C en recipientes destapados durante 24 hrs.
- A 60°C durante 60 min.
- A 4°C durante 55 y 60 días.
- En presencia de Carbón activado.

Mientras que por otro lado se determinó la cantidad de proteínas de un ECFA y un extracto viejo (inactivo) donde se vió que éste contenía más cantidad de proteína que el extracto fresco, esto se debe probablemente a que hay más proteínas precipitadas en el extracto viejo que en el fresco (28.2 mg/ml y 20.0 mg/ml respectivamente). Aún no encontrándose reportado nada de este dato en literaturas consultadas.

Por otra parte se realizó el estudio con diferentes concentraciones del ECFA donde se obtuvo que produce el mismo efecto de inhibición sobre el hongo y que a medida que aumenta la concentración de las levaduras, este efecto disminuye ligeramente.

Posteriormente se realizaron pruebas de inhibición sobre 19 especies de hongos diferentes de las cuales 17 fueron susceptibles, entre los que destacan:

Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Wangiella dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Criptococcus neoformans y diferentes especies de Aspergillus. Mientras que los hongos que no fueron inhibidos fueron Mucor rouxii y Penicillium marneffeii.

I N T R O D U C C I O N .

Contrariamente a lo ocurrido con la terapia antibacteriana, los avances en el tratamiento de enfermedades micóticas han sido lentos. Las razones para ello son múltiples: a) las infecciones fúngicas suelen ser menos frecuentes que las bacterianas, afectando mayormente a la población rural y de escasos recursos; b) las infecciones micóticas más comunes, como las dermatomycosis, no ponen en peligro la vida del paciente, por lo que no hay muchos incentivos para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos; c) los hongos son organismos eucariotes, y en consecuencia resulta difícil desarrollar agentes antifúngicos que tengan especificidad por estructuras del hongo, como es el caso de los más exitosos agentes antibacterianos.

No obstante estas premisas, actualmente se ha registrado un incremento en la frecuencia de las micosis, especialmente las sistémicas, debido a diversos factores tales como la mayor abundancia de pacientes inmunosuprimidos o el mejor control de otras infecciones, lo que favorece indirectamente la invasión por hongos. Motivos como estos han estimulado en años recientes la investigación en la terapéutica antifúngica, encaminada a encontrar drogas efectivas y altamente selectivas que permitan la recuperación rápida del paciente sin secuelas negativas para su salud (Rippon, 1990; San Blas, 1991).

Para acercarnos de una manera racional al estudio de los agentes antifúngicos y a los posibles desarrollos futuros en esta área, debemos analizar aunque sea someramente, las diferencias entre procariotes (bacterias) y eucariotes (hongos y otros organismos superiores), para discriminar las razones que hacen efectivos los antibióticos antibacterianos en terapéutica antifúngica y que drogas antifúngicas, además de ser inocuas contra bacterias, producen en muchos casos severos problemas colaterales en pacientes como dolor de cabeza, náuseas, somnolencia, urticaria, vómito y reacciones alérgicas.

La Tabla 1 presenta algunas de las diferencias más notables entre procariotes y eucariotes. La diferencia que da origen a la clasificación se refiere a la existencia de una membrana que define y aísla el contenido nuclear en eucariotes, membrana inexistente en procariotes. Otra diferencia está en la membrana citoplasmática, la cual tiene esteroides como componentes estructurales que en su lugar tiene cantidades apreciables de fosfolípidos. La pared celular es otra estructura diferencial entre procariotes y eucariotes (Watson, 1988).

En los primeros está constituida por varios componentes entre los cuales figura de manera notable el peptidoglucano que

sólo aparece en estos organismos vivientes, sin repetirse en la naturaleza. Esta exclusividad es la que hace posible la selectividad de la penicilina y sus análogos como drogas antibacterianas, ya que éstas actúan impidiendo la síntesis del peptidoglucano, originando así una pared celular defectuosa que no es capaz de soportar la presión osmótica del citoplasma y que causa finalmente la lisis bacteriana. Esta misma acción de la penicilina sobre la síntesis de peptidoglucano es la que la hace que no tenga efecto contra hongos carentes de estructura. La pared celular del hongo, en cambio, presenta otros polisacáridos tales como glucanos y quitina, estructuras que constituyen la única diferencia sustancial entre estas células eucariotes inferiores y las células de mamíferos (Bertrnicki, 1967).

TABLA No. 1 Diferencias más notables entre procariotes y eucariotes.

	PROCARIOTES	EUCARIOTES
NUCLEO	Ausencia de membrana nuclear; material genético en el citoplasma; un solo cromosoma.	Núcleo constituido y limitado por membrana nuclear; varios cromosomas.
MEMBRANA CITOPLASMATICA.	Carentes de esteroides.	Esteroides constitutivos.
PARED CELULAR	Peptidoglucano, el cual está formado de ácido teicoico en Gram +, lipopolisacáridos en Gram -.	Polisacáridos (glucano, quitina, celulosa) en hongos, ausentes en eucariotes superiores.

Siguiendo la clasificación de Kerridge con algunas modificaciones (Tabla 2), las drogas antifúngicas mas importantes en clínica o con más perspectiva de uso futuro, pueden agruparse en base a su mecanismo de acción, dependiendo de que actúen sobre el núcleo, la membrana citoplasmática o la pared celular. Otros lugares de acción de drogas experimentales pueden ser el ribosoma, la mitocondria, inhibición de rutas metabólicas o la acción de agentes quelantes.

1.- Antibióticos que actúan a nivel del núcleo.

Síntesis de RNA defectuoso (5-fluorocitosina).

El más común de los antibióticos que actúan a este nivel es la 5-fluorocitosina, en uso desde hace mas de 20 años; siendo su sitio de acción primario en la síntesis defectuosa de RNA en células susceptibles, es decir, aquellas que son capaces de transportar la 5-fluorocitosina al interior de la célula por medio de una citosina permeasa. Una vez allí, se convierte en 5-fluorouracilo con ayuda de la citosina deaminasa y posteriormente, por adiciones sucesivas, es transformada en la forma trifosforilada de la pirimidina. De esta forma y con ayuda de la UMP-pirofosforilasa, el 5-fluorouracilo se incorpora al RNA del hongo para conformarlo de forma defectuosa; siendo así, la célula no puede llevar a cabo su metabolismo normal, perdiendo viabilidad. Este efecto parece ser específico para el hongo y no para las células de mamíferos en razón de la poca o ninguna actividad de la citosina deaminasa en estas ultimas, por lo que su empleo como antibiótico antifúngico podría estar garantizado.

Ruptura del uso cromático (griseofulvina).

La griseofulvina es quizás el más antiguo de los antifúngicos todavía en uso bajo administración oral como agente contra infecciones producidas por dermatofitos. Si bien su mecanismo de acción no ha sido establecido con precisión, las evidencias disponibles hasta la fecha permiten suponer que el efecto fungistático de la griseofulvina es ocasionado por la ruptura del huso mitótico en la célula fúngica, razón por la cual se ha ubicado dentro de los antibióticos que actúan a nivel del núcleo.

2.- Antibióticos que actúan a nivel de la membrana citoplasmática.

Sin duda alguna, este grupo de antibióticos es el de uso más extenso en estos tiempos y a los cuales se ha dedicado enorme esfuerzo de investigación para aportar nuevas drogas

antimicóticas. Hasta cierto punto resulta sorprendente el hecho de que dada la aparente similitud entre las estructuras y funciones de las membranas citoplasmáticas en organismos eucariotes inferiores y superiores, esta membrana provee el blanco más significativo de las drogas antimicóticas más importantes en clínica actualmente. Estas drogas pueden ser subdivididas en varias clases, de acuerdo a su sitio de acción en la membrana.

2.1 Antibióticos que actúan sobre la integridad física de la membrana: Polienos (Anfotericina B, Nistatina).

La anfotericina B (de uso parenteral) y la nistatina (de uso tópico) pertenecen a un grupo de compuestos caracterizados por un anillo macrólico que contiene un sistema de dobles enlaces conjugados, llamado polieno. Han resultado efectivos sobre todo en el tratamiento de micosis sistémicas. Su mecanismo de acción está basado en el enlace que éstos establecen con los esteroides de la membrana citoplasmática de eucariotes, incrementando la permeabilidad celular y provocando una alteración en el flujo de constituyentes celulares a través de la membrana. Debido a este mecanismo, los antibióticos poliénicos no perjudican a las membranas citoplasmáticas bacterianas que carecen de esteroides, pero en cambio, actúan dañando no solo las membranas de hongos sino también las de células mamíferas que por ser eucariotes, comparten con las primeras una estructuración común en lo referente a la participación de esteroides (ergosterol en hongos; colesterol en eucariotes superiores) dentro de la membrana. De aquí se desprende la principal limitación en el uso de los antibióticos poliénicos; los efectos colaterales en pacientes sometidos a tratamientos con estas drogas pueden ser irreversibles, sobre todo en cuanto al daño sufrido por las células renales, cuyas membranas, por razones funcionales, tienen esteroides en alta proporción.

2.2 Antibióticos que actúan sobre la síntesis de ergosterol en la membrana.

Este grupo de antibióticos constituye el grupo más reciente de drogas antifúngicas desarrolladas en importantes laboratorios farmacéuticos. Dentro de ellos existen dos subgrupos: los inhibidores de la escualeno epoxidasa (alilaminas y tiocarbamatos) y los azoles que interfieren con la 14 alfa demetilasa del lanosterol dependiente de citocromo P-450.

2.2.1.- Inhibición de escualeno epoxidasa.

Los tiocarbamatos (tolnaftato, tolclolato) y las alilaminas (naftifina, terbinafina), son agentes recientemente desarrollados para tratamiento tópico de micosis superficiales y algunos como la terbinafina, están en evaluación clínica para tratamiento tópico y oral, reportándose un efecto fungicida en la mayoría de los casos. La naftifina presenta una alta actividad "in vitro" contra *Trichophyton*, buena actividad contra *Aspergillus sp.*, y actividad moderada contra *Candida sp.*, mientras que la terbinafina presenta una excelente actividad "in vitro" contra dermatofitos. Los tiocarbamatos tolnaftato y tolclolato inhiben el crecimiento de dermatofitos, sin afectar mayormente a *Candida albicans*. Todos estos antibióticos interfieren con la síntesis de ergosterol, por acumulación de escualeno, lo cual es indicativo de una acción sobre las escualeno epoxidasa. Esta enzima juega un papel esencial en la conversión del hidrocarburo escualeno en el esterol de estructura anillada que se requiere para la función correcta de la membrana en casi todos los hongos.

Se ha comentado por parte de otros laboratorios, que estas drogas son selectivas para hongos en cuanto que serían capaces de diferenciar entre las enzimas escualeno epoxidasa del hongo y de mamíferos, por lo cual tendrían mayor eficacia y menores efectos colaterales nocivos. Sin embargo, entre los efectos secundarios indeseables se han reportado problemas gastrointestinales (3-4% de los pacientes) y alergias (1%).

2.2.2.- Inhibición de la 14 alfa demetilasa del lanosterol: Azoles.

Este grupo se subdivide a su vez en imidazoles (ketoconazol, bifonazol, clotrimazol, miconazol, tioconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, terconazol). La mayoría de ellos son de uso tópico (miconazol, clotrimazol, econazol, isoconazol, saperconazol), mientras que el ketoconazol, el itraconazol, el fluconazol y el saperconazol también son usados por vía oral en el tratamiento de dermatofitosis, candidiasis, criptococcosis, aspergillosis y esporotricosis entre otras. El uso parenteral ha sido exitoso con miconazol, itraconazol, fluconazol y saperconazol. Su mecanismo de acción ha sido estudiado extensivamente. Los resultados experimentales indican que ambos tipos de azoles actúan inhibiendo la 14 alfa demetilación del lanosterol dependiente del citocromo P-450 a través de la unión del nitrógeno del anillo azólico al átomo de hierro

heme del citocromo P-450, ocupando de esta manera el sitio de unión del dioxígeno y por tanto, inhibiendo la activación del oxígeno y la consiguiente hidroxilación del grupo 14 alfa metil del lanosterol. En consecuencia se produce una acumulación de lanosterol que no puede reemplazar el ergosterol en la membrana citoplasmática, conduciendo a cambios en la permeabilidad celular, en la estructuración de la membrana, en la actividad de las enzimas de membrana y provocando una inhibición del crecimiento. La gran limitación reportada para el uso de estos antibióticos (en particular del ketoconazol) es que, por su mismo sitio de acción, ellos interfieren con el esquema de interconversión de esteroides en mamíferos.

2.3 Antibióticos que actúan sobre un sitio indefinido de la membrana: Ajoeno, Ramifina A, Cianeína.

En 1983, Apitz y cols., aislaron un compuesto, posteriormente llamado ajoeno; caracterizado como E,Z-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11,triene -9- óxido; producido por rearreglo y S-tioalilación de la alicina. Se demostró que el ajoeno ejercía acción como inhibidor de la agregación plaquetaria. Esta sustancia (ajoeno) ha sido probada en su capacidad antifúngica en razón de las propiedades antimicóticas del ajo. Yoshida y cols., observaron una inhibición del crecimiento "in vitro" de Aspergillus niger y Candida albicans, sugiriendo que el efecto radicaba en la pared celular, sin embargo, estudios posteriores de San Blas y cols., indican que la inhibición del crecimiento de las fases levaduriforme y micelial de Paracoccidioides brasiliensis por ajoeno (50 microlitros), resulta más bien de perturbaciones en la membrana citoplasmática que podría conducir a malformaciones de la pared celular por deficiencias en las enzimas sintetizadoras radicadas en la membrana.

Experimentos realizados con los antibióticos cianeína y ramihifina A, indicaron que estos antibióticos actuaban como antifúngicos "in vitro" en concentraciones mayores de 1 mg/ml en Penicillium chrysogenum, Aspergillus fumigatus, Blastomyces dermatitidis, Histoplasma capsulatum y Paracoccidioides brasiliensis. A concentraciones subletales fueron capaces de influir en la morfología del hongo, observándose en varios hongos incluyendo hongos, patógenos, la inducción de ramificaciones terminales por la cianeína y estimulación de ramificaciones laterales por ramihifina A, modificaciones que fueron acompañadas por cambios en el contenido de DNA, RNA y lípidos, así como en la estructuración definitiva de la

pared celular. Se ha postulado la hipótesis de que estos antibióticos interfieren con las funciones de la membrana fúngica, perturbando el metabolismo celular. El hecho que la cianeína sea capaz de inhibir tanto el crecimiento de levaduras como la transformación de la fase micelial saprofita a la levaduriforme patógena de Paracoccidioides brasiliensis, así como el crecimiento de otros hongos patógenos podría sugerir la posibilidad de su uso como agente antifúngico. Lamentablemente, esta línea de investigación no ha sido continuada en ninguno de los laboratorios que la iniciaron.

3.- La pared celular como sitio específico de ataque.

El papel prominente de la pared celular en la estructura y el comportamiento de los hongos y en sus relaciones con el huésped, ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. Desde un punto de vista químico, la pared celular de hongos está compuesta de polisacáridos en un 80-90 %, además de pequeñas cantidades de proteínas y lípidos. Los polisacáridos están organizados en forma de pares, de tal manera que su estructuración ha sido la base de la clasificación taxonómica de hongos. La existencia de una pared celular rígida, conformada por los polisacáridos (quitina, glucano, manano, celulosa) es la garantía de sobrevivencia de estos hongos, por cuanto su inexistencia o su estructuración defectuosa, condena inevitablemente al microorganismo a la muerte celular por lisis. Resulta obvio, en consecuencia, que la inhibición de la síntesis de algunos de estos componentes exclusivos de la pared celular de hongos debería ser, en teoría, un blanco ideal para el desarrollo de drogas antifúngicas altamente selectivas, carentes de efectos colaterales nocivos. De allí que actualmente están en curso investigaciones basadas en estas premisas que, de tener éxito, marcarían un avance en terapéutica antifúngica.

3.1.- Inhibidores de la síntesis de quitina.

La quitina, polisacárido de N-acetil-glucosamina (Glu-NAc), es uno de los componentes principales de las paredes celulares de la mayoría de los hongos patógenos para humanos. Su inexistencia en células de mamíferos lo convierte en un blanco ideal para algún antibiótico cuya acción se realice a través de la inhibición de la síntesis de quitina. Varios de estos inhibidores han sido descritos en la literatura, entre ellos los más importantes son: Polioxina D, Nikkomicina Z y Tetaína.

La Polioxina D y Nikkomicina Z pertenecen a un

grupo de antibióticos nucleósido-peptido, cuya acción se centra en la inhibición de la quitina sintetasa por competencia lineal con la UDP-N-acetil-glucosamina hacia el sitio de enlace con la enzima, efecto probablemente favorecido por la similitud de estructuras de estos antibióticos con la UDP-N-acetil-glucosamina con quien comparten la existencia de un grupo pirimidina-nucleósido en sus moléculas respectivas. Sobre estos antibióticos se ha reportado que son los inhibidores más efectivos contra hongos con mucha quitina en su pared celular (Acosta, 1984; Furter y Rast, 1985), menos efectivos contra levaduras (Acosta y cols., 1987) e inoocuos contra Aspergillus fumigatus (Furter y Rast, 1985).

La síntesis de quitina puede ser también bloqueada en un paso anterior al de la inactivación de la quitina sintetasa. Una de las enzimas importantes para proceder a la síntesis de quitina es la glucosamina 6-fosfato (GluNH₂-6-P) sintetasa. Esta enzima puede ser inactivada en presencia de Tetaína. Este antibiótico es un inhibidor del crecimiento de las fases levaduriforme y micelial de Candida albicans y de su transformación, causando agrupamiento y deformación de células e inhibición de la formación de septos. La Tetaína es transportada dentro de las células levaduriformes por una dipéptido-permeasa específica y dentro de la hifa, por el sistema de transporte de oligopeptidos. Una vez dentro de la célula, el antibiótico es cortado por peptidasas, dando origen a un aminoácido C-epoxiterminal, idéntico al antibiótico anticapsina que es el verdadero inhibidor de la enzima Glu-NH₂-6-P sintetasa, actuando como un análogo de glutamina.

3.2.- Inhibidores de la síntesis de Beta-1,3-glucano.

Al igual que la quitina, el Beta-1,3-glucano es un componente principal de la pared celular de los hongos patógenos más importantes, en los cuales, conforma junto con la quitina la estructura rígida de la pared. No existiendo estructura similar en la superficie de las células de eucariotes superiores, podría pensarse que los inhibidores de la síntesis de glucano deben funcionar como antibióticos específicos. Dentro de estos inhibidores encontramos un glucolípido: Papulacandina B y varios lipopeptidos: aculeacina A, equinocandina y cilofungina. La estructura de estos lipopeptidos constan de una porción polar constituida por un hexapéptido cíclico, cuya característica resultante es la de tener todos sus aminoácidos con uno o más grupos hidroxilo. En contraste con la porción peptídica, existe una región polar, constituida por un ácido graso de cadena lineal o ramificada de 8 o más átomos de carbono, que puede presentar puntos de

insaturación en la cadena y que se encuentra unido al péptido por el grupo amino terminal de la ornitina. Este ácido graso es linoleil para la equinocandina y palmitoil para la aculeacina. Dentro de este grupo, la familia de la equinocandina, aculeacina y cilofungina actúan provocando la ruptura de la membrana citoplasmática. Aunque en éste caso el sitio primario de acción es la inhibición de la síntesis de glucano de la pared celular del hongo, lo que provoca el desarrollo de células osmóticamente frágiles que son lisadas con facilidad. La papulacandina B es un antibiótico producido por el deuteromiceto Papularia spherosperma que también inhibe la síntesis de Beta-1,3-glucano de la pared celular de hongos. Este antibiótico contiene una porción hidrofílica con glucosa y galactosa y un residuo lipofílico con dos cadenas de ácidos grasos insaturados. Es capaz de inhibir el crecimiento de Sacharomyces cerevisiae, Candida albicans, Geotrichum lactis, Wangiella dermatitidis y el crecimiento de la fase micelial saprófita, aunque no de la levaduriforme patógena, de Paracoccidioides brasiliensis.

**TABLA No. 2 Sitios de acción de algunas drogas antimicóticas.
(Modificado de Kerridge).**

- 1.- SOBRE EL NUCLEO:**
Síntesis de RNA defectuoso (5 - fluorocitosina).
Ruptura del huso cromático (griseofulvina).
- 2.- SOBRE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA:**
 - 2.1.-** Sobre la integridad física de la membrana:
polienos (anfotericina B, nistatina).
 - 2.2.-** Sobre la síntesis de ergosterol de la membrana:
 - 2.2.1.-** Por inhibición de escualeno epoxidasa:
 - a) alilaminas (naftifina, terbinafina)
 - b) tiocarbamatos (tolnaftato, tolclolato)
 - 2.2.2.-** Por inhibición de 14 alfa demetilasa del lanosterol: azoles.
 - a) imidazoles (ketoconazol, miconazol)
 - b) triazoles (fluconazol, itraconazol)
 - 2.3.-** Sitio indefinido de la membrana:
ajoeno, ramihifina A, cianeína.
- 3.- SOBRE LA PARED CELULAR:**
 - 3.1.-** Síntesis de quitina:
nucleósido-péptidos (polioxina D, nikkomicina)
péptidos (tetaina)
 - 3.2.-** Síntesis de glucano:
lipopéptidos (equinocandina, aculeacina, cilofungina)
glucolípidos (papulacandina B)

ANTECEDENTES .

Los efectos nocivos de la mayoría de antifúngicos, principalmente de los polienos y el poco equilibrio enzimático que regula a los azoles, las alilaminas y los tiocarbamatos, así como el estrecho rango de hongos susceptibles, estimulan el desarrollo de nuevas líneas de investigación en esta área (San Blas, 1991). Dentro de ellas podemos citar investigaciones en el campo de nuevos azoles y otros agentes químicos que actúen a nivel de síntesis de ergosterol en la membrana fúngica sin interferencia con mecanismos similares en mamíferos, o investigación con nuevos compuestos que ejerzan su acción a niveles distintos de la membrana citoplasmática.

Así mismo, hay investigaciones basadas en el bloqueo de la síntesis de polisacáridos de la pared celular de los hongos. Ellos están limitados por el momento a uso experimental, ya que aún no se sabe si pueden tener efectos secundarios en humanos, aunque representan una línea de investigación promisoría en el campo de la terapia antifúngica (Maresca, 1992).

Otras líneas muy promisorias de investigación en antibióticos antimicóticos, se han centrado en el uso de algunas toxinas fúngicas (Gelderblom y cols., 1992) y en el ajo (Allium sativum) y algunos extractos del mismo (San Blas, 1992; Vázquez, 1989; Yamada y Azuma, 1977; Jain y Konor, 1950).

Las investigaciones conducentes a elucidar las bases científicas de uso medicinal del ajo y sus componentes (Tabla No.3) revelaron que los extractos de ajo poseen actividad "in vitro" contra el crecimiento de un gran número de hongos, incluyendo levaduras (Appleton y Tansi, 1977; Vazquez, 1989; Clapera, 1991); y además se ha demostrado que los extractos de ajo son más efectivos que la Nistatina, la Violeta de Genciana, y el Azul de Metileno contra levaduras patógenas (Kabelit, 1970; Ledezma, 1991). Así mismo, se ha reportado que inhíbe el crecimiento de los dermatofitos tanto "in vivo" como "in vitro" (Acosta y cols., 1992; Vázquez, 1989); y hay reportes contradictorios sobre el efecto contra Cryptococcus neoformans (Louria y cols., 1989); y se ha sugerido que se debe a los diferentes constituyentes de la pared celular (San Blas y cols., 1989), mientras que aún no se ha reportado en la literatura el efecto contra hongos mucorales (Mucor rouxii) y hongos del género Penicillium sp. y otros (Aspergillus sp., Alternaria sp., Sporotrix schenckii, Trichotecium).

Además, es de interés el estudio de algunas propiedades del Extracto Concentrado Fresco de Ajo para usarlo con la mayor eficiencia posible. Las propiedades son: Vida media, Concentración mínima inhibitoria, Efecto de incubación, Temperatura, la Adsorción con carbón activado. El carbón activado es uno de los adsorbentes más importantes y más ampliamente usados debido a su enorme capacidad de adsorción, bajo costo y afinidad por un amplio espectro de compuestos orgánicos.

Este es preparado de numerosos materiales semejantes como madera, aserrín, huesos de frutas, cáscara de coco, carbón,

lignito y/o residuos básicos del petróleo. Estos son mezclados con ácido fosfórico que degrada a la celulosa y otros compuestos presentes en dichos materiales.

El carbón activado posee una gran capacidad para adsorber compuestos orgánicos. La eliminación de compuestos orgánicos residuales de aguas de desecho por medio de carbón activado es el método avanzado que ha recibido mayor atención. El uso de adsorbedores de carbón activado por el tratamiento de aguas residuales se ha incrementado paulatinamente durante los últimos 20 años debido a que en estos adsorbedores es posible eliminar contaminantes orgánicos resistentes a la degradación biológica, entre estos contaminantes se puede mencionar a los colorantes sintéticos, herbicidas, fungicidas, detergentes y compuestos clorados.

Por lo escrito anteriormente, es de gran interés estudiar si el carbón activado tiene la capacidad de adsorber algunos de los componentes del ajo, con objeto de tratar de purificar parcialmente el principio activo. El carbón activado lo podemos encontrar en diferentes presentaciones, las que varían únicamente en su capacidad de adsorción dependiendo del tamaño de su molécula.

TABLA No.3 COMPONENTES DEL AJO.

	%
Material azoado	6.52
Agua	58.00
Celulosa	1.22
Materias amiláceas, azucaradas y mucilaginosas	33.68
Cenizas	1.43
Materias Grasas	0.15
Vitaminas	huellas
Sales	trazas
Minerales	trazas
** Sulfuro de alilo	

**** El principio activo del ajo es una esencia sulfurada denominada químicamente sulfuro de alilo. (500g. de ajo destilado con agua, suministran de 100 a 200 g. de este sulfuro).**

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar algunas propiedades del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (Allium sativum) y su efecto sobre el crecimiento de algunas especies de hongos.

M E T O D O L O G I A .

Para el estudio de las propiedades del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA), como temperatura, diluciones de este extracto entre otras, se utilizó el hongo dimórfico Candida albicans, por ser de rápido crecimiento en Agar Sabouraud Dextrosa; mientras que para el estudio de las propiedades antifúngicas se analizó el efecto del ECFA sobre las siguientes cepas de hongos proporcionadas por el laboratorio del Area Biológica del Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.S.L.P.

Candida albicans.
Aspergillus flavus.
Aspergillus terreus.
Aspergillus clavatus.
Aspergillus ochraceus.
Aspergillus niger.
Penicillium marneffeii.
Cladosporium carrionii.
Mucor rouxii.
Paecilomyces sp.
Malassezia furfur.
Trichothecium sp.
Alternaria alternata.
Sporothrix schenckii.
Histoplasma capsulatum.
Paracoccidioides brasiliensis.
Coccidioides immitis.
Cryptococcus neoformans.
Wangiella dermatitidis.

M A T E R I A L Y E Q U I P O .

1.- CRISTALERIA.

Cajas de Petri de Vidrio de 25 ml.
Matraz Erlenmeyer de 500 ml. y 250 ml.
Tubos de ensaye de 8 y 10 ml.

2.- VARIOS.

Gradilla Metálica.
Mechero Bunsen.
Micropipetas de 200 y 1000 microlitros.
Espátula.
Balanza granatária.
Estufa bacteriológica.
Asa de Platino.
Agitador Vórtex.
Agitador magnético Felisa.
Espectrofotómetro UV-Visible (UV-160A-Shimadzv).

3.- REACTIVOS.

Alcohol etílico industrial marca Monterrey.
Solución salina al 0.85% estéril.
Carbón Activado CAGR (Molido y Grano).
Agar Sabouraud Dextrosa
Agar para Malassezzia furfur.
Lowry A
Lowry B-1
Lowry B-2
Lowry C
Reactivo de Folin-Ciocalteau.

4.- EXTRACTOS.

De ajo (Allium sativum).

**PREPARACION DE REACTIVOS, MEDIOS DE
CULTIVO Y EXTRACTOS.**

Reactivos para la determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry

Lowry A: Agregar 4g. de Hidróxido de sodio y 20g. de Carbonato de sodio en un matraz volumétrico de 1 litro y aforar con agua desionizada.

Lowry B-1: Preparar una solución al 2% (partes por volumen) de Tartrato de Sodio anhidro en agua desionizada. 2g./100ml.

Lowry B-2: Preparar una solución al 1% (partes por volumen) de Sulfato cúprico anhidro en agua desionizada. 1g./100ml.

Lowry C: Esta solución se prepara agregando 1 ml. de solución de Lowry B-1, 1 ml. de solución de Lowry B-2 y 98 ml. de la solución Lowry A.

Reactivo de Folin-Ciocalteu (ya preparado): Este reactivo se diluye 1:3. (10 ml. de Folin-Ciocalteu y 30 ml. de agua desionizada.

Preparación de Solución Salina al 0.85% estéril.

Se disuelven 0.85g. de Cloruro de Sodio, en agua desionizada; y se esteriliza a 1 atmósfera de presión durante 15 min. Guardar en el refrigerador (4-10°C).

Medio de Agar Sabouraud Dextrosa.

Fórmula para 500 ml. del medio a preparar:

Caldo de Dextrosa Sabouraud.....	15.0 g.
Agar Purificado.....	7.5 g.
Agua desionizada.....	cbp 500.0 ml.

Preparación:

Adicionar el Caldo de Dextrosa Sabouraud y el Agar Purificado a los 500 ml. de agua desionizada, mezclandolos bien hasta que esté uniformemente disuelto; posteriormente esterilizar a 1 atm. de presión durante 15 min., enfriar a 45 - 50°C y vaciar en cajas de petri previamente esterilizadas (118-120°C).

Uso:

Emplear este medio para el cultivo de las diferentes especies de hongos a analizar.

Agar para Malassezia furfur

Fórmula para 100 ml. del medio a preparar.

Sabouraud simple.....	6.5 g.
Tween 80.....	2.0 ml.
Acido oléico (aceite de oliva).....	2.0 ml.
Vitamina A (zanahoria).....	huellas
Cloranfenicol.....	0.5 g.
Agua desionizada.....	cbp 100.0 ml.

Preparación:

Se añaden todos los reactivos ya mencionados en 100 ml. de agua desionizada mezclandolos bien hasta que estén completamente disueltos, se esteriliza a 1 atm de presión durante 15 min. y se enfria a 45-50°C para vaciarlo en cajas de petri previamente esterilizadas (118-120°C).

Uso:

Emplearlo para el cultivo de Malassezia furfur.

Preparación del Extracto de Ajo (Allium sativum).

Se extrae una suspensión del ajo que resulta de aproximadamente 15 cabezas de ajo crudas y peladas (previamente) en un extractor; esta suspensión se filtra sobre gasa presionandolo para obtener una mayor cantidad de filtrado, y se guarda en refrigeración tapado a 4°C para que no pierda su actividad.

TECNICAS UTILIZADAS .

1.- Efecto de diferentes diluciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de Candida albicans.

Del ECFA, se tomaron 100 microlitros y se diluyeron con diferentes volúmenes de solución salina (S.S) estéril al 0.85% según el siguiente cuadro:

DILUCION	ECFA microlitros	S.S microlitros
Concentrado	100	0
1:10	100	900
1:100	10	990
1:1000	10	9990

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 microlitros de cada una de las diluciones a analizar, y se les probó el efecto antifúngico en 1×10^6 levaduras/ml de Candida albicans, incubado a 28°C durante 24-48 horas en ASD.

2.- Efecto de diferentes concentraciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de C. albicans.

Se tomaron diferentes concentraciones del ECFA (0 a 50 microlitros = 0 a 1.0 mg/ml de proteínas) con objeto de obtener la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de C. albicans (como patrón de referencia) a una concentración de 1×10^6 levaduras/ml a 28°C durante 96 hrs. en ASD; comparando por cruces el crecimiento del control con respecto a los problemas.

3.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) (50 microlitros = 1 miligramos/ml de proteínas) sobre el crecimiento de diferentes concentraciones de C. albicans.

A diferentes concentraciones de C. albicans (1×10^6 a 10×10^6 levaduras/ml) esparcidas en cajas de petri conteniendo ASD, se les añadieron 50 microlitros de ECFA, incubándose a 28°C durante 96 hrs. y posteriormente se comparó el crecimiento por cruces con un control del mismo hongo sin ECFA.

4.- Vida media de la actividad antifúngica del ECFA a 4°C .

El ECFA fué incubado a 4°C y tapado durante 60 días con objeto de determinar el tiempo en el cual pierde sus propiedades antifúngicas, lo cual se comprobó al sembrar cada 5 días 1×10^6 levaduras / ml de C. albicans en ASD con 50 microlitros del ECFA, incubadas a 28°C durante 96h.

5.- Efecto del tapado de los tubos sobre la actividad antifúngica del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) a 4 y 28°C.

El ECFA se dividió en volúmenes de 5 ml en tubos de ensaye de 8 ml por duplicado, y se incubaron destapados a 4 y 28°C durante 24 hrs., tomando alícuotas de 50 microlitros de cada tubo cada 4 hrs. para determinar el efecto antifúngico en 1×10^6 levaduras/ml de C. albicans sembradas en ASD a 28°C durante 96 hrs.

6.- Efecto de diferentes temperaturas sobre la actividad antifúngica de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.

El ECFA se dividió en volúmenes de 5 ml en tubos de ensaye de 8 ml por duplicado, y se incubó a diferentes temperaturas según el siguiente cuadro.

Temperatura °C	Tiempo de incubación (min).
60	60
100	5

Posteriormente se tomaron alícuotas de 50 microlitros cada 20 minutos y se añadieron a cajas de petri conteniendo 1×10^6 levaduras/ml de C. albicans en ASD, incubadas a 28°C durante 96 hrs. comparando el crecimiento por cruces con respecto a un control sin ECFA.

7.- Efecto de la adsorción del carbón activado sobre la actividad antifúngica del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA).

En matraces Erlenmeyer de 125 ml, se colocaron 5 g. de carbón activado (CAGR, molido y en grano), enseguida se le añadieron a cada matraz 20 ml de ECFA y se incubaron a temperatura ambiente durante 6 días con agitación constante (Agitador magnético Felisa) y posteriormente se tomaron alícuotas de 50 microlitros cada 24 hrs. y se analizaron las propiedades antifúngicas del ECFA utilizando 1×10^6 levaduras/ml de C. albicans en ASD, incubadas a 28°C durante 24-48 hrs.

8.- Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry en Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) y extracto concentrado viejo de ajo.

Se toman 4 ml de la muestra; se diluyen con solución Lowry A de tal forma que la absorbancia final, después del desarrollo de color sea menor de 0.3 de absorbancia.

El rango de la curva de calibración de Albúmina es de 0-400 g/ml de proteína.

En un tubo de ensaye de 20 ml se pipetea 2 ml de

muestra diluída y se agregan 5 ml de solución Lowry C.

Se agita rigurosamente en un agitador Vórtex por espacio de 10 seg. Este tiempo es de extrema importancia en la reproducibilidad del método.

Se agrega 1 ml del reactivo Follin-Ciocalteau y se agita nuevamente por espacio de 20 seg.

Se deja reposar la solución 30 minutos y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible a 750 nanómetros.

La lectura observada se extrapola en la curva de calibración y se obtiene la concentración de proteína de la muestra.

NOTA: Se determina la concentración de proteína del ECFA y del extracto concentrado viejo (inactivo) del ajo, para ver si hay variación en el contenido de la misma en ambos extractos.

9.- Determinación del efecto antifúngico del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) sobre el crecimiento de 19 diferentes especies de hongos.

Se tomaron asadas de las diferentes especies de hongos a analizar, las cuales se suspendieron con 1 ml de solución salina al 0.85% estéril. En seguida se tomaron alícuotas de 50 microlitros de cada suspensión de los diferentes hongos y se sembraron en cajas de petri conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa.

Posteriormente, a cada especie de hongo en estudio se le añadió 50 microlitros de ECFA esparciendolo en toda la caja de petri con una varilla de vidrio en forma de triángulo.

Se incubaron las diferentes especies de hongos ya sembradas con inhibidor (ECFA) en la estufa bacteriológica a 28°C y se observó su crecimiento en un periodo de 48-72 hrs., y se comparo su crecimiento por cruces con los controles de los diferentes hongos sembrados sin ECFA.

10.- Controles.

Para los estudios de inhibición del crecimiento de los diferentes hongos analizados, se utilizó un control del hongo a probar sin el Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA), mientras que para determinar la actividad antifúngica del ECFA, se utilizó C. albicans sembrada en ASD con y sin ECFA.

R E S U L T A D O S .

Con respecto al contenido de proteínas, (del cual no hay reportes en la literatura) fué determinado por el método de Lowry encontrando que el extracto concentrado viejo de ajo tuvo una concentración de proteínas ligeramente mayor que el Extracto Concentrado Fresco de Ajo (ECFA) (28.2 mg/ml por 20.0 mg/ml respectivamente) (Tabla No. 4).

Por otro lado, en este trabajo se estudiaron algunas propiedades de la actividad antifúngica del ECFA, como: vida media, temperatura, efecto de diferentes diluciones, concentración mínima inhibitoria del extracto, etc., utilizando al hongo levaduriforme Candida albicans como estandar por ser de rápido desarrollo, encontrando los siguientes resultados:

Con respecto al efecto de las diferentes diluciones del ECFA, se encontró que cualquier dilución con solución salina estéril al 0.85% inhibe las propiedades antimicóticas del mismo, lo cual no ocurre al ser probado sin diluirlo previamente (Figuras No. 1 y No. 5). Por otra parte, la concentración mínima inhibitoria del crecimiento del hongo fué entre 40 y 50 microlitros de ECFA (0.8 y 1.0 mg/ml de proteína), mientras que la concentración de 50 microlitros utilizada inhibió de manera similar el crecimiento de diferentes concentraciones de C. albicans (1×10^6 a 10×10^6 levaduras/ml.), ya que no se observó crecimiento a 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 y solo hubo una cruz de desarrollo en las demás concentraciones utilizadas (Tabla No. 6; Fig. No. 6).

En relación a la Vida media de la actividad antifúngica del ECFA, se encontró que ésta se pierde totalmente entre 55 y 60 días a 4°C en recipientes tapados después de su obtención (aunque la pérdida de actividad se inicia a los 36 días) (Fig. No. 2), mientras que, en recipientes destapados tanto a 4°C como a 28°C pierde su actividad a las 24 hrs. de incubación (Fig No. 3), y a 60°C durante 60 minutos también pierde su actividad, tanto en recipientes tapados como destapados (Fig. No.4). Así mismo al tratar de purificar parcialmente el ECFA mediante el uso de carbón activado (molido y en grano) se observó que este tratamiento también elimina la actividad antifúngica del ECFA, ya que a las 76 hrs. se observa el crecimiento del hongo en los cultivos, siendo este crecimiento del 100% a los 6 días de incubación (Tabla No. 7).

Por otra parte, al probar el efecto antifúngico del ECFA sobre el crecimiento de 19 especies diferentes de hongos se encontró que se inhibe el desarrollo de 17 de éstas, entre las que se encuentran: Diferentes especies de contaminantes ambientales (Aspergillus sp., Alternaria alternata), el hongo responsable de la caspa (Malassezia furfur); y algunos patógenos como Sporothrix schenckii, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis, Criptococcus

neoformans y Wangiella dermatitidis (Tabla No. 8, Figs. No. 8, 9, 10), mientras que los únicos hongos que no fueron inhibidos por el ECFA fueron el Mucor rouxii y el Penicillium marneffeii (Figs. No. 11 y 12).

TABLA No. 4 Contenido de Proteínas del Extracto Concentrado Fresco de Ajo y del Extracto Concentrado Viejo de Ajo determinado por Lowry.

	PROTEINA (mg/ml)
Extracto Fresco	20.0
Extracto Viejo	28.2

EFFECTO DE DIFERENTES DILUCIONES DEL ECFA
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *C. albicans*

FIGURA 1 (1000000 LEV/ML. 28°C, ASD)

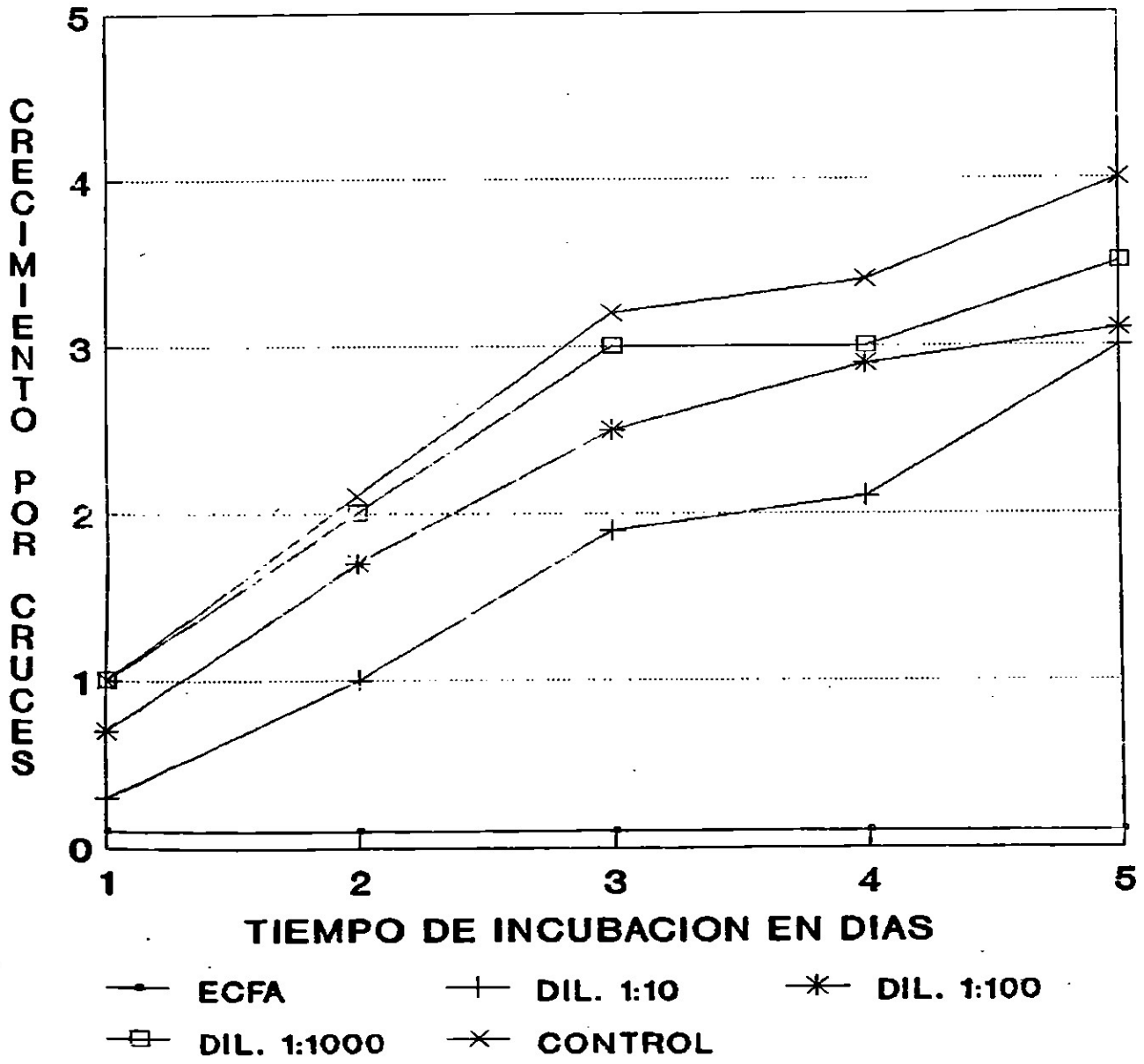


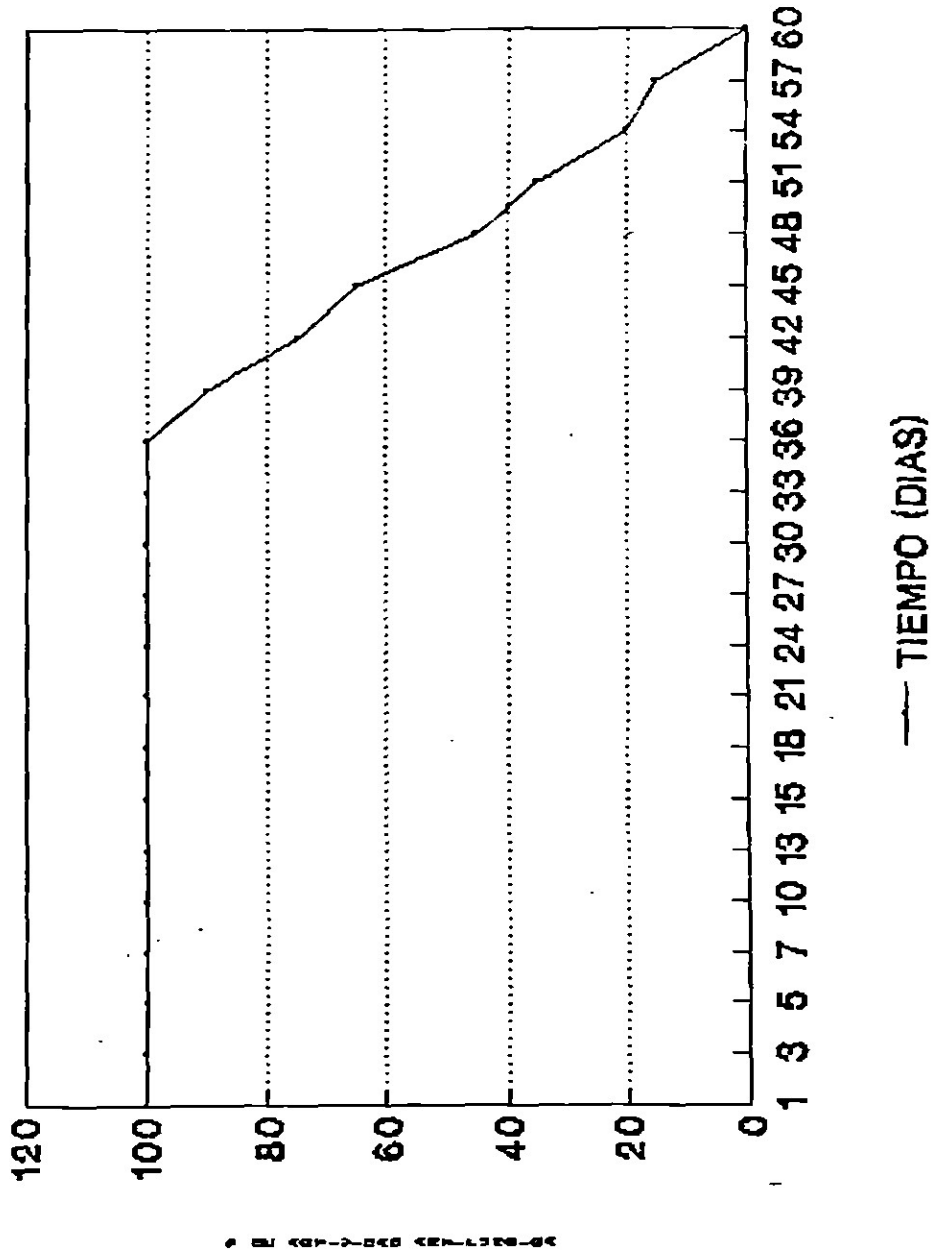
TABLA No. 5 Efecto de diferentes concentraciones del (ECFA) Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de C. albicans. (1×10^6 levaduras/ml., 28°C, ASD, 96 horas).

CONCENTRACION		CRECIMIENTO EN CRUCES
Microlitros	Proteina (mg/ml)	
0	0	++++
10	0.2	++
20	0.4	+
30	0.6	+
40	0.8	-
50	1.0	-

TABLA No. 6 Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo (50 microlitros=lmg/ml de proteínas) sobre el crecimiento de diferentes concentraciones de C. albicans (28°C, ASD, 96 hrs.).

CONCENTRACION DE <u>C. albicans</u>	CRECIMIENTO POR CRUCES.
CONTROL sin ECFA (1 x 10 ⁶)	++++
1 x 10 ⁶	-
2 x 10 ⁶	-
3 x 10 ⁶	-
4 x 10 ⁶	+
5 x 10 ⁶	+
6 x 10 ⁶	+
7 x 10 ⁶	+
8 x 10 ⁶	+
9 x 10 ⁶	+
10 x 10 ⁶	+
CONTROL sin ECFA (10 x 10 ⁶)	++++

**Figura 2 VIDA MEDIA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA
EL AJO A 4 °C**



EFFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL AJO EN TUBOS DESTAPADOS

Figura 3

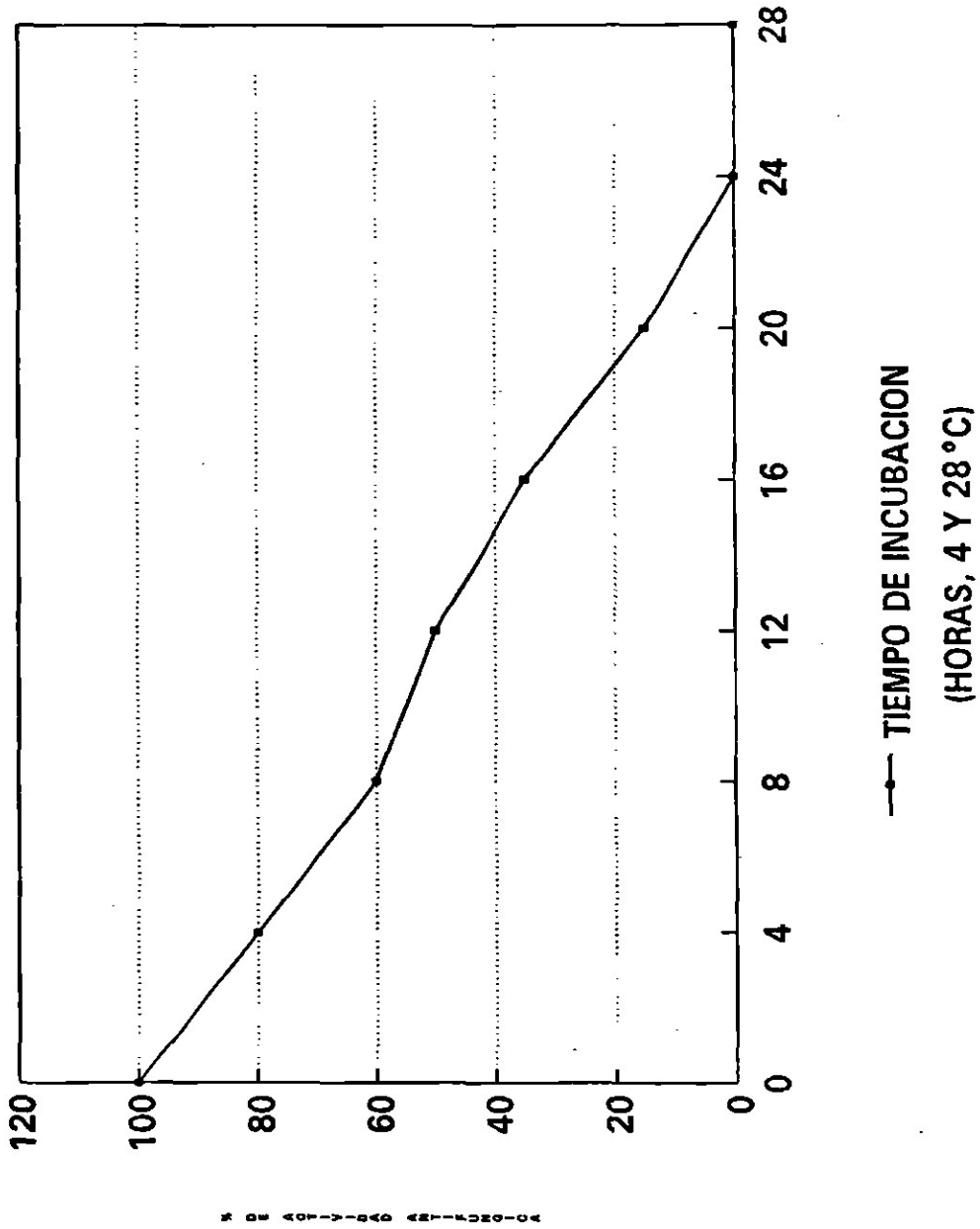


Figura 4

EFFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL AJO EN TUBOS DESTAPADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

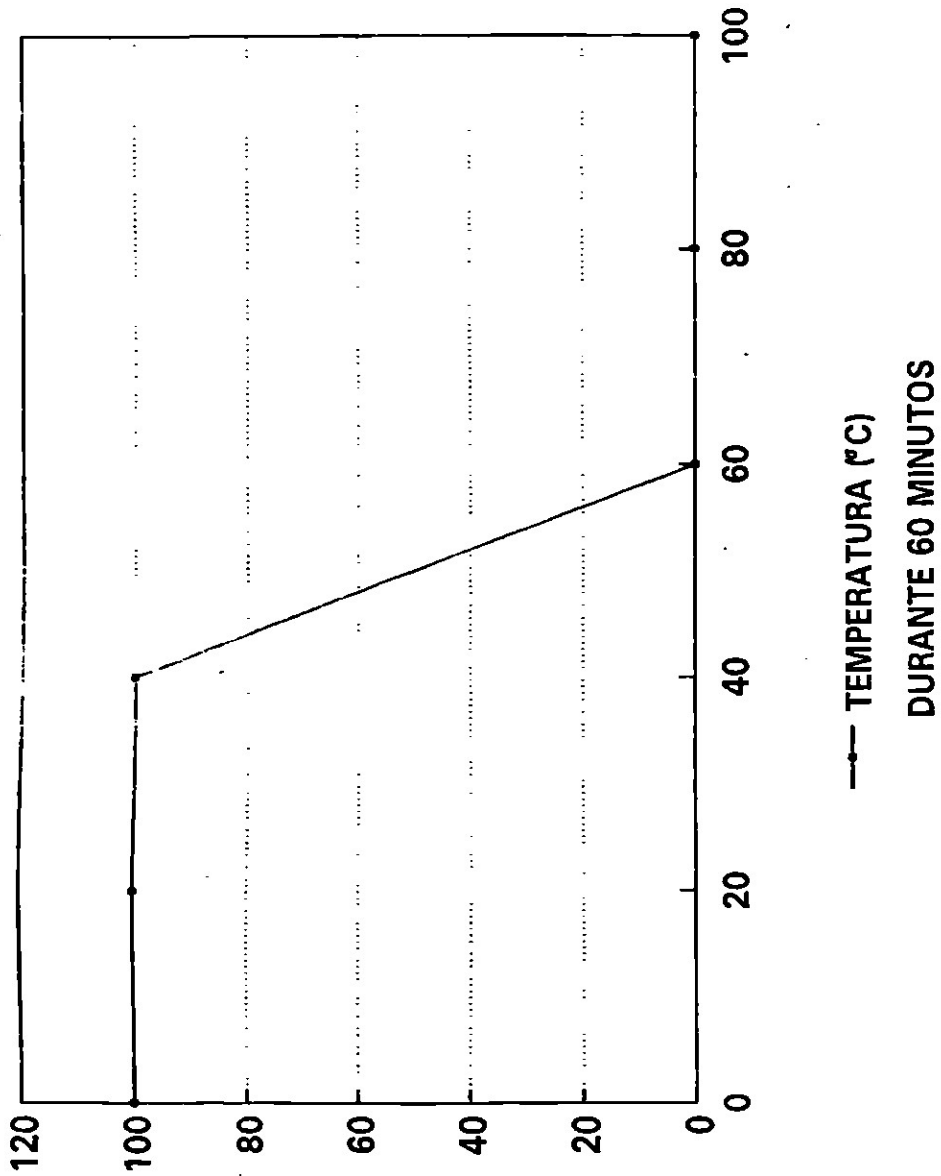


TABLA No. 7 Efecto del Carbón Activado (CAGR) sobre la actividad inhibitoria del Extracto Concentrado Fresco de Ajo en C. albicans. (1×10^6 levaduras/ml, 28°C., ASD, 96 horas).

** Tiempo de incubación (días)	Crecimiento por Cruces.	
	Molido	Grano
1	-	-
2	-	-
3	+	+
4	++	++
5	+++	+++
6	++++	++++

** Se tomaron diariamente alícuotas de 50 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo. Se sembró diariamente un control de C. albicans para análisis de comparación.

TABLA No. 8 Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de diferentes especies de hongos. (ASD, 28°C., 72-96 horas).

Especie	Crecimiento por cruces.
** Control	+ + + +
<u>Aspergillus flavus.</u>	-
<u>Aspergillus terreus.</u>	-
<u>Aspergillus clavatus.</u>	-
<u>Aspergillus ochraceus.</u>	-
<u>Aspergillus niger.</u>	-
<u>Penicillium marneffeii.</u>	+ +
<u>Cladosporium carrionii.</u>	-
<u>Mucor rouxii.</u>	+ + + +
<u>Paezilomyces sp.</u>	-
<u>Malassezia furfur.</u>	-
<u>Trichothecium sp.</u>	-
<u>Alternaria alternata.</u>	-
<u>Sporothrix schenckii.</u>	-
<u>Histoplasma capsulatum.</u>	-
<u>Paracoccidioides brasiliensis.</u>	-
<u>Coccidioides immitis.</u>	-
<u>Cryptococcus neoformans.</u>	-
<u>Wangiella dermatitidis.</u>	-

(**) Para cada hongo a probar se realizó un control del hongo sin Extracto Concentrado Fresco de Ajo.

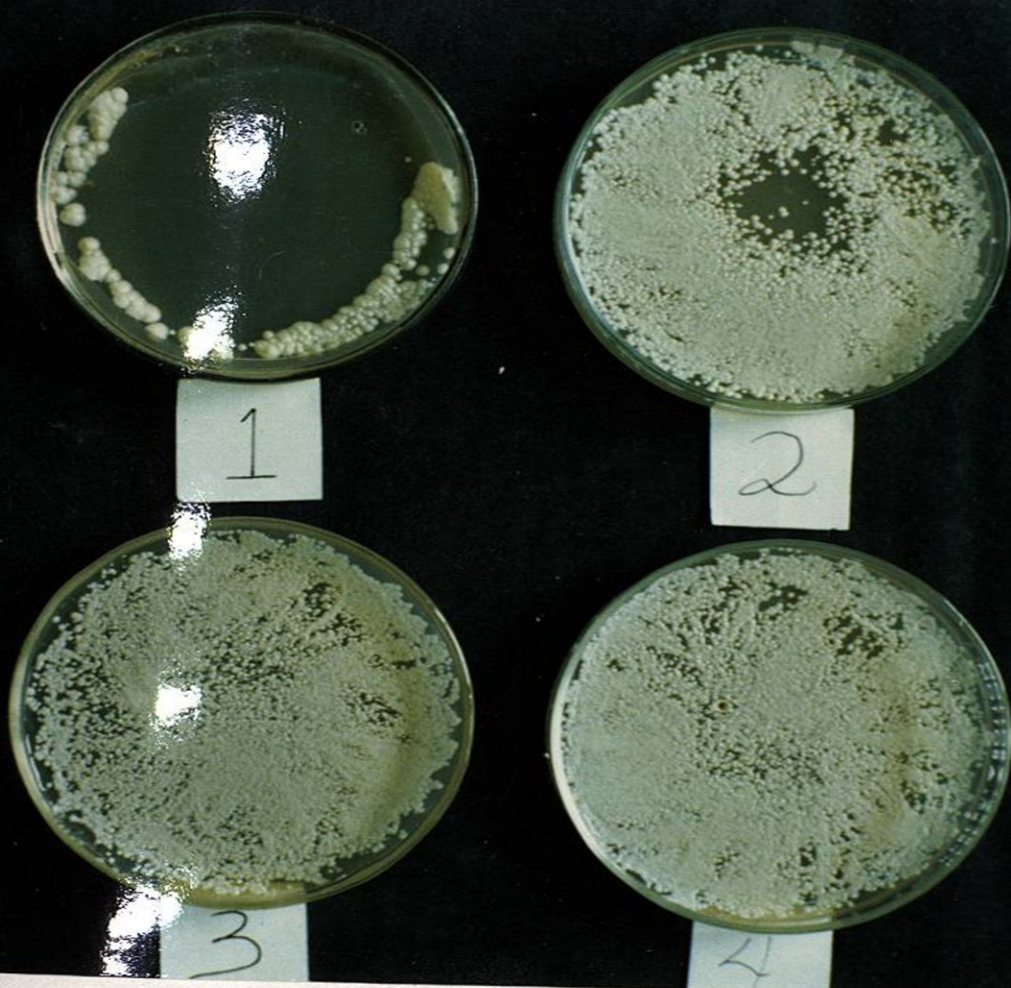


Fig. No. 5.- Efecto de diferentes diluciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo en solución salina estéril sobre el crecimiento de C. albicans (1×10^6 , ASD, 28°C , 48-72 hrs.).

- 1.-Control con Extracto Concentrado Fresco de Ajo
- 2.-Candida albicans+Extracto Concentrado Fresco de Ajo dil. 1:10
- 3.-Candida albicans+Extracto Concentrado Fresco de Ajo dil. 1:100
- 4.-Candida albicans+Extracto Concentrado Fresco de Ajo dil. 1:1000

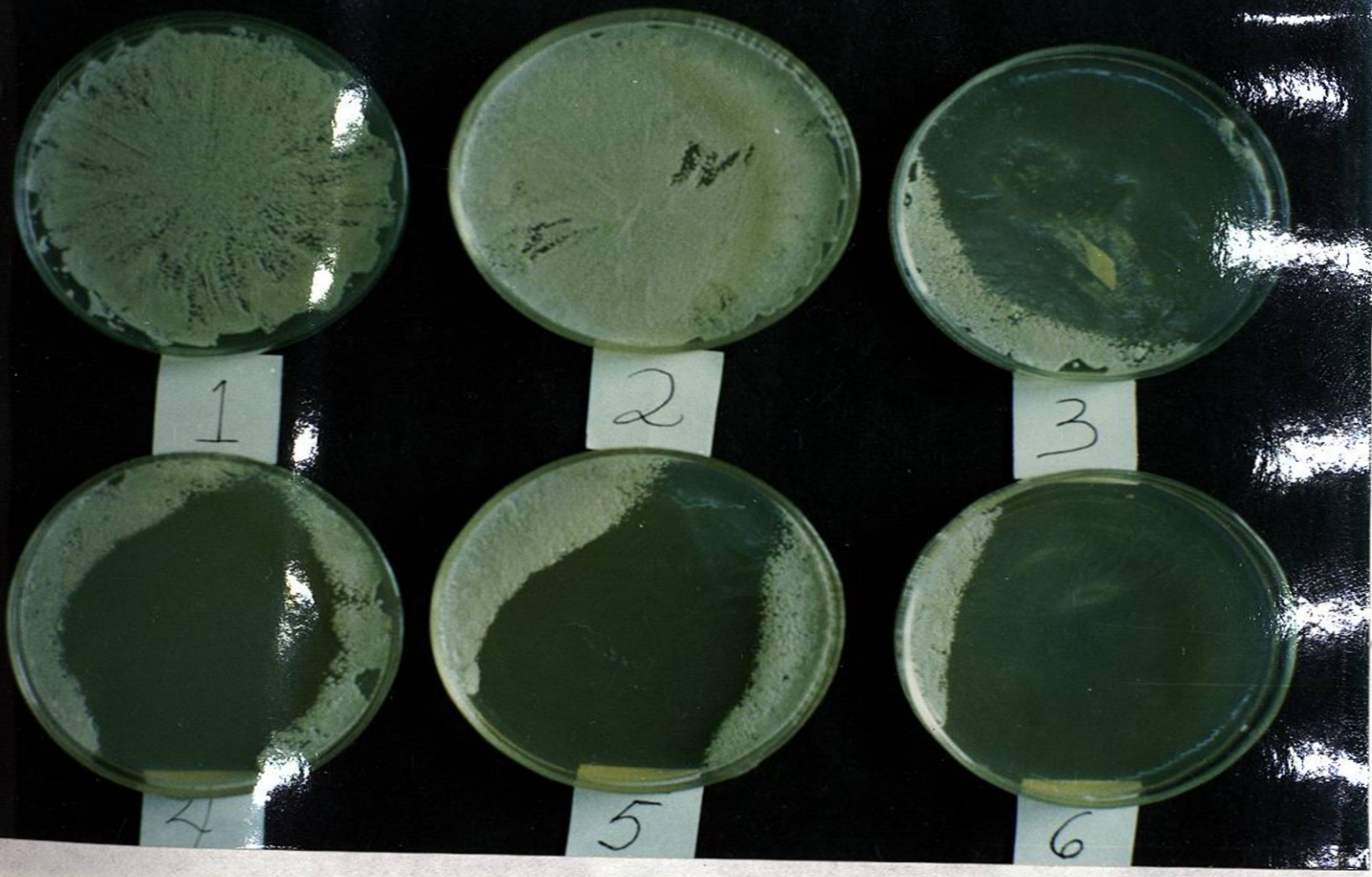


Fig. No. 6.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de diferentes concentraciones de C. albicans (ASD, 28°C 48-72 hrs., 50 microlitros).

- 1.- Candida albicans 1×10^6 sin Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 2.- Candida albicans 10×10^6 sin Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 3.- Candida albicans 5×10^6 con Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 4.- Candida albicans 6×10^6 con Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 5.- Candida albicans 7×10^6 con Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 6.- Candida albicans 8×10^6 con Extracto Concentrado Fresco de Ajo.

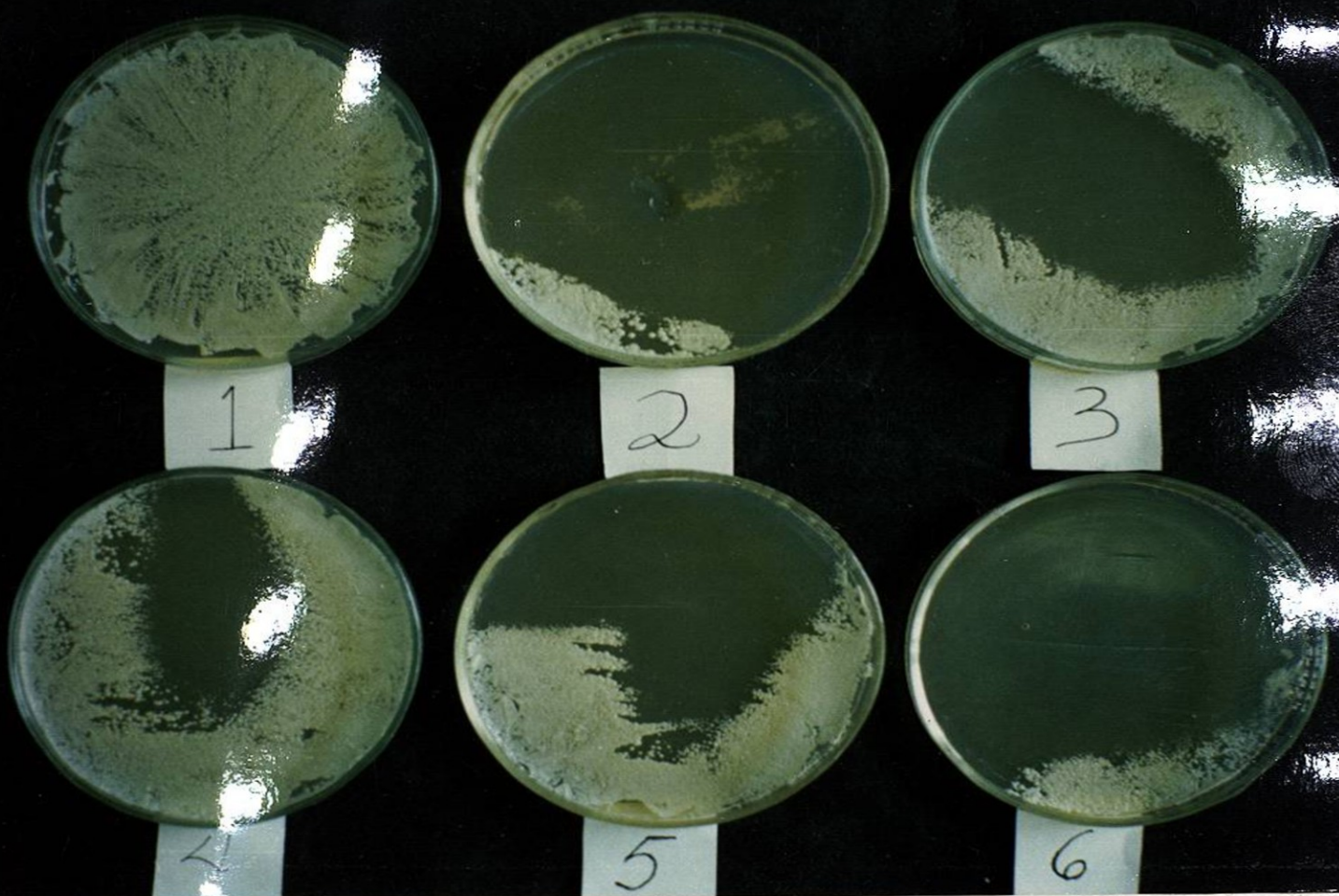


Fig. No. 7.- Efecto de diferentes concentraciones del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de C. albicans. (1×10^6 levaduras/ml, ASD, 28°C , 48-72 hrs.).

- 1.-Candida albicans 1×10^6 sin Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 2.-Candida albicans 1×10^6 +50 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 3.-Candida albicans 1×10^6 +10 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 4.-Candida albicans 1×10^6 +20 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 5.-Candida albicans 1×10^6 +30 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 6.-Candida albicans 1×10^6 +40 microlitros de Extracto Concentrado Fresco de Ajo.

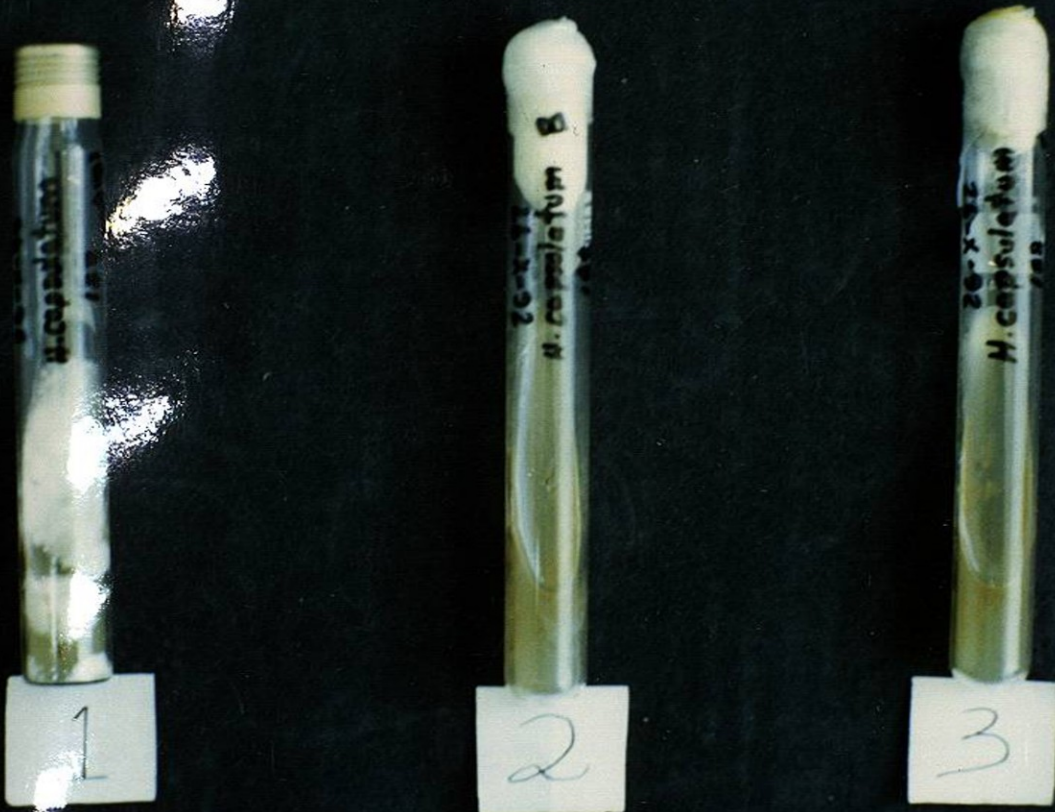


Fig. No. 8.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de Histoplasma capsulatum (50 microlitros, ASD , 28°C 15-22 días)

- 1.- Control.
- 2.- Problema 1.
- 3.- Problema 2.

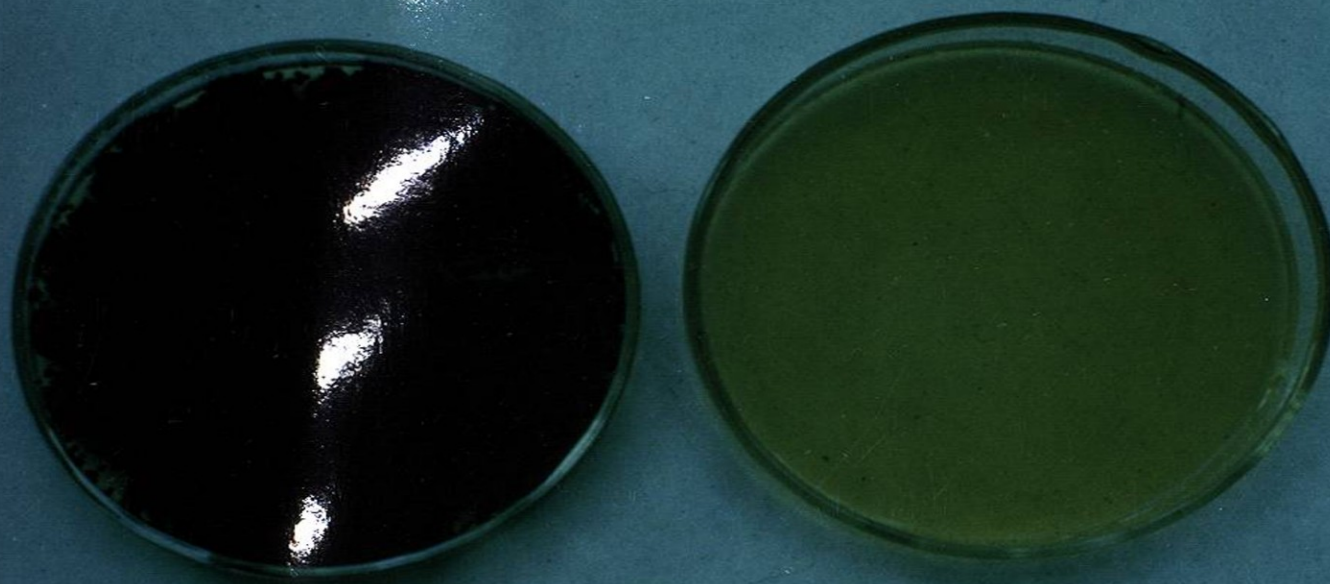
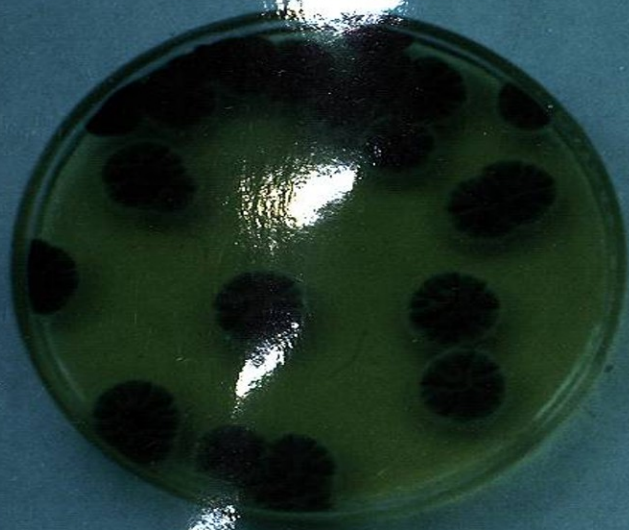
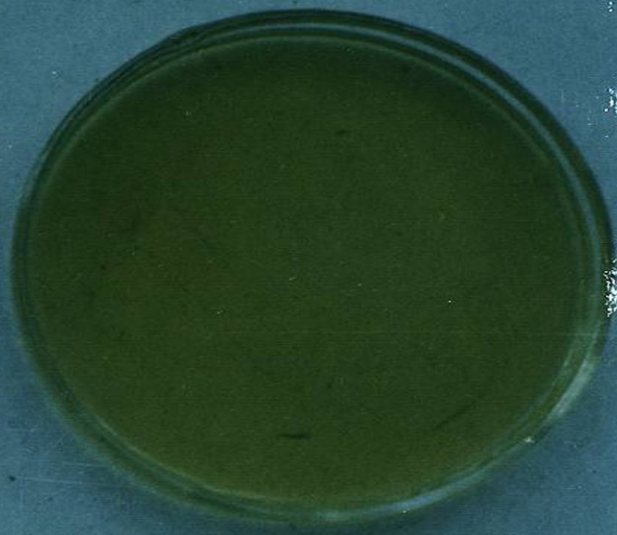


Fig. No. 9.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de Wanqiella dermatitidis (50 microlitros, ASD , 28° C 48-72 hrs).

- 1.- Control.
- 2.- Problema.



1



2

Fig. No. 10.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de Cladosporium carrionii (50 microlitros, ASD, 28°C, 48-72 hrs.).

- 1.- Control.
- 2.- Problema.



Fig. No. 11.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de Mucor rouxii (50 microlitros, ASD, 28°C, 48-72 hrs.).

- 1.- Control.
- 2.- Problema.
- 3.- Problema.



Fig. No. 12.- Efecto del Extracto Concentrado Fresco de Ajo sobre el crecimiento de Penicillium marneffeii (50 microlitros, ASD, 28°C 48-72 hrs.).

- 1.- Control.
- 2.- Problema.
- 3.- Problema.

D I S C U S I O N.

La quimioterapia antifúngica está lejos de haber alcanzado un alto grado de éxito, en tanto que las drogas actualmente en uso no son específicas para el hongo; ya que no se han aislado medicamentos eficientes que actúen exclusivamente sobre la pared celular, pues ésta es diferente a la de los demás microorganismos, y los pocos que se han aislado, o se encuentran en estudio son muy caros y presentan efectos secundarios muy severos (Torres Rodríguez, 1987; Rippon, 1990; San Blas, 1991); por otro lado, la mayoría de los medicamentos antifúngicos inducen bloqueos metabólicos al mismo huésped (síntesis de ergosterol, síntesis de lípidos de la membrana, entre otros); además, los resultados obtenidos "in vitro" en pruebas de sensibilidad a antibióticos antifúngicos no esta correlacionada con su actividad "in vivo", por lo que se buscan drogas más efectivas y selectivas para el tratamiento.

En base a lo anterior y tomando como referencia algunos reportes de la literatura en los cuales se describe que el ajo tiene un gran poder curativo (Samano, 1975; Yamada y Azuma, 1977, Vázquez, 1989), por lo que en este trabajo se estudiaron algunas propiedades del Extracto Concentrado Fresco de Ajo, como vida media, efecto de la temperatura, diluciones en solución salina entre otras, así como su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes especies de hongos; encontrando que el contenido de proteínas fué mayor en el extracto viejo que en el extracto fresco, debido tal vez a que se utilizaron ajos de diferentes procedencias (diferentes mercados) y además, en los diferentes reportes de los componentes del ajo no se menciona el contenido de proteína (Samano, 1975; Sifuentes y Ortega, 1990), lo que puede deberse a que no se han determinado, o a que los resultados obtenidos no hayan sido reproducibles. Las propiedades del ECFA estudiadas en este trabajo, no se han reportado en la literatura, (Samano, 1975; Cavallito y Bailey, 1944; Cavallito y cols., 1944; Jain y Konar, 1978; San Blas, 1991; Yamada y Azuma, 1977), únicamente se ha reportado la vida media y el efecto de la temperatura del ECFA (Ledezma, 1991) y los datos encontrados en este trabajo coinciden con lo reportado; además autores como Cavallito y cols., (1954) han estudiado e identificado el principio activo, que parece ser la alicina (o el sulfuro de alilo del cual se ha sugerido también como uno de los responsables de la actividad antimicótica); su peso molecular (162 kilodaltons), pH (6.5), y el contenido de azufre (40%) (Cavallito y cols., 1944; Cavallito y cols., 1954; Yamada y Azuma, 1977).

Con respecto al carbón activado, se ha reportado que tiene la propiedad de adsorber compuestos orgánicos de diferente peso molecular (Gomez Torres, 1986), por lo que en este trabajo se trató de purificar parcialmente el principio activo del ECFA (se usó esta técnica debido a que en el laboratorio no se cuenta con

las matrices de polisacáridos para realizar una purificación secuencial y con alto grado de eficiencia) pero se encontró que este tratamiento induce la pérdida de la actividad al adsorber el extracto por mecanismos hasta ahora desconocidos.

En relación a las propiedades antifúngicas del ECFA, en este trabajo se comprueba que es un excelente antimicótico para los diferentes hongos analizados entre los que se encuentran los hongos patógenos Histoplasma capsulatum y Paracoccidioides brasiliensis; el hongo levaduriforme Cryptococcus neoformans; los contaminantes ambientales Aspergillus sp. Alternaria alternata y otros; coincidiendo lo anterior con lo reportado por Yamada y Azuma (1977) para Candida albicans y Trichophyton mentagrophytes "in vitro"; por Acosta y cols. (1992) para Trichophyton mentagrophytes "in vivo".

Con respecto al sitio de acción, del principio activo del ajo aún no se sabe con certeza como actúa, pero, San Blas (1992) reportó que no tiene efecto inhibitorio sobre la actividad de glucana sintetasa de la pared celular de P. brasiliensis, por lo que el efecto puede ser a nivel de membrana plasmática.

Finalmente, 2 de los hongos analizados no fueron inhibidos por el Extracto Concentrado Fresco de Ajo (Penicillium marneffeii y Mucor rouxii), desconociendo porqué estos hongos no son sensibles al Extracto Concentrado Fresco de Ajo.

C O N C L U S I O N E S .

- 1.- El contenido de proteínas es mayor en el extracto viejo (inactivo) que en el extracto fresco (activo), no encontrando en la literatura otros reportes al respecto.
- 2.- La dilución del ECFA con solución salina al 0.85% inhibe las características antifúngicas del Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 3.- Diferentes concentraciones estudiadas del Extracto Concentrado Fresco de Ajo, tienen el mismo efecto inhibitorio.
- 4.- A medida que se aumenta la concentración de levaduras de Candida albicans disminuye parcialmente la efectividad del Extracto Concentrado Fresco de Ajo.
- 5.- El Extracto Concentrado Fresco de Ajo tiene una vida media de 45-60 días a 4°C, y en recipientes destapados pierde la actividad a 4°C y 28°C a las 24 horas.
- 6.- El ECFA a 60°C durante 60 min. pierde la actividad antifúngica.
- 7.- El tratamiento con Carbón activado también inhibe la actividad antifúngica.
- 8.- A excepción de Penicillium marneffeii y Mucor rouxii; las 17 especies de hongos estudiadas fueron inhibidos en su crecimiento por el Extracto Concentrado Fresco de Ajo; debido probablemente a las diferencias en los componentes de la membrana plasmática de estos hongos.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Acosta, I.. 1984. Purificación y Propiedades de la quitina sintetasa quitosomal de la fase micelial del hongo Mucor rouxii. Tesis Maestría. Biología Experimental. CIBE. Facultad de Química. Universidad de Guanajuato.
- 2.- Acosta, I. González, M. C. y Moctezuma, M. G. 1992. Inducción de T. mentagrophytes en animales de experimentación (ratones) y su curación con Extracto Concentrado Fresco de Ajo. Memorias del I Congreso Nacional de Micología. Guatemala, Guatemala. pp-TM-24.
- 3.- Acosta, I., Martínez Cadena, M. G. López Romero, E., González, C y Ruiz - Herrera, J. 1987. Stabilization of chitin synthetase and purification of chitosomes from several mycelial mucorales. Antonie Van Leewenhoek. VOL. 53. pp. 171-181.
- 4.- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Chemistry of fungal cell wall. Ann. Review of Microbiology. Vol. 22 pp 13-26.
- 5.- Cavallito, Ch. and Bailey, J. 1944. Allicin, the antibacterial principle of Allium sativum. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. J. A.M. Chem. Soc. Vol. 66 pp 1950-1951.
- 6.- Cavallito, Ch. Buck, J. and Suttr, C.M. 1944. Allicin, the antibacterial principle of Allium sativum. II. Determination of the Chemical Structure. J. A.M. Chem. Soc. Vol. 66 pp 1952-1954.
- 7.- Clapera Gómez, M.M. 1991. Efecto del Tepescohuite (Mimosa tenuiflora poir) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. Tesis Licenciatura. Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. U.A.S.L.P.
- 8.- Dra. Laura Samano. Cúrese con ajo limón y cebolla.
- 9.- Furter, A. and Rast, D.M. 1985. A. comparison of the chitin-synthase - inhibitory and antifungal efficacy of nucleoside - peptide antibiotics: structure-activity - relation ships. FEMS. Microbiol Lett. Vol. 28 pp 205-211.
- 10.- Gómez Torres S. A. 1986; Adsorción de compuestos orgánicos con Carbón activado. I.Q.
- 11.- Jain, R.C. and Konar, D.B. 1978. Effect of garlic oil in Experimental Cholesterol Atherosclerosis. Atherosclerosis. Vol. 29 pp 125-129.
- 12.- Ledezma Fernández, P.C. 1991. Estudio y comparación de algunos preparados antimicóticos sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. Tesis Licenciatura Q.F.B. Facultad de Ciencias Químicas. U.A.S.L.P.

- 13.- López - Romero, E. and Ruíz - Herrera, J. 1976. Synthesis of chitin by particulate preparations from Aspergillus flavus. Antonie Van Leewenhoek. Vol. 42 pp 261-276.
- 14.- San Blas, G. 1991. Antibióticos Antifúngicos: Hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. Rev. Iberoamericana de Micología. Vol. 8. pp 24-34.
- 15.- Sifuentes E. y Ortega M, 1990. Herbolaria y tradiciones etnomedicas de un pueblo Nahuatl. U.N.A.M. pp 21.
- 16.- Stoll, A. and Seebeck, E. 1948. Über Allicin, die genuine muttersubstanz des Knoblauchs. Helv. Chim. Acta. Vol. 31, pp. 189-211.
- 17.- Vázquez Vázquez, M.E. 1989. Efecto de algunos productos naturales sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. Tesis Licenciatura. Q.F.B. Facultad de Ciencias Químicas. U.A.S.L.P.
- 18.- Wentzel, C.A.; Maresca, W., Uleggaar, R., Thiel, P., and Cawood, M.E. 1992. Fumonisin: Isolation, Chemical Characterization and biological effects micipathal. Vol 117., pp. 11-16.
- 19.- Yamada, Y. and Azuma, K. 1977. Evaluation of the in vitro antifungal activity of Allicin. Antimicrob. Agr. Chemother Vol. 11, No. 4. pp. 743-749.

Arista 270, C.P.73000
San Luis Potosi, SLP.