

ACCION ANTIMICOTICA DE EXTRACTOS DE ALLIUM SATIVUM

Rubén García, Silvia Erazo, Igor Lemus, Rafael Donoso.
Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Hilda Pivet.
Hospital San José.

Waldo Lazo.
Departamento de Ciencias Ecológicas.
Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Luis Ferrada
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina
Sede Norte. Universidad de Chile.

RESUMEN

Se realizó un estudio fitomicrobiológico con extractos de *Allium sativum* (ajo). Se identificó en el extracto el principio activo alicina. Se estudió su acción antimicótica frente a varias cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y diversos dermatofitos. También se comparó la actividad antimicótica de estos extractos con diversos fármacos antimicóticos de uso clínico.

INTRODUCCION

El *Allium sativum* (ajo) es una planta perteneciente a la familia de las Liliaceae, con flores blancas, que en la raíz forma un bulbo blanco, redondo, compuesto de varias partes o dientes ovalados de olor marcado y de sabor picante.

Entre los muchos usos medicinales que ha tenido a lo largo de la historia, se encuentran los que derivan de sus efectos cardiovasculares, de su acción anticancerígena y de sus propiedades antibacterianas y antifúngicas (Bolton S. 1982, Lazo W. 1983).

El principio activo de *A. sativum* al cual se le atribuyen las propiedades antibacterianas y antifúngicas se ha denominado "alicina" (Cavallito C. y Bailey J. 1944). Esta sustancia no se encuentra como tal en la planta, sino que se forma al destruir el bulbo. Su precursor es la aliina, la que se transforma en alicina mediante la acción de la enzima aliinasa.

Se ha descrito en la literatura que la alicina es activa "in vitro" frente a varias especies pertenecientes al género *Aspergillus* (Yamada y Azuma, 1977). Estas mismas especies de *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus* y también, aunque con

SUMMARY

[Antimicrobial activity of *Allium sativum* extracts]

By a phyto-microbiological study of *Allium sativum* (garlic) it was obtained an antimycotic factor named allicin whose activity against *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and several dermatophytes was investigated. The antimycotic activity of these extracts was also compared with several antimycotic drugs of clinical use.

con menor frecuencia, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, pueden ser patógenos para el hombre (Yarzabal y col. 1974) y ocasionar micosis llamadas aspergilosis. Entre ellas está la "aspergilosis pulmonar" que es una micosis generalmente oportunista. La frecuencia de la enfermedad es difícil de precisar. En material de autopsias se ha informado de una frecuencia de 0.7 a 5.8 o/o en pacientes con neoplasias y alrededor de 3 o/o en pacientes transplantados con inmunosupresión (Oddó y González, 1984).

Las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de esta patología son escasas y no siempre efectivas.

Consideramos importante iniciar el estudio fitoquímico, microbiológico y farmacológico en *A. sativum* disponible en nuestro mercado y proyectar sus resultados futuros a modelos experimentales para su posible aplicación clínica en la aspergilosis pulmonar.

MATERIALES Y METODOS

Fitoquímica

A partir de un homogenizado de los bulbos

frescos de esta planta (Esquema N° 1), se obtuvo extractos usando los métodos descritos en la literatura (Cavallito y Bailey, 1944; Tansey y Appleton, 1975; Fromtling y Bulmer, 1978).

La estabilidad de estos extractos fue determinada mediante la variación de R_f que experimentaban en la cromatografía en capa fina a través del tiempo y en la disminución de la actividad antifúngica "in vitro" de los mismos.

La purificación de los extractos fue realizada aprovechando las diferencias de solubilidad de las sustancias que lo componen, mediante el tratamiento con sistemas de solventes de diferente polaridad (hexano/agua y cloroformo/agua).

La separación de las sustancias activas del extracto purificado (extracto activo) fue realizada por el sistema de cromatografía preparativa en capa fina de gel de sílice (cloroformo/acetato de etilo 9-1), que presenta ventajas en relación al tiempo del proceso y, por ende, una menor descomposición de los componentes activos en relación a otros procesos similares (columna cromatográfica).

MICROBIOLOGIA

Evaluación de la acción antifúngica de extractos de *A. sativum* "in vitro".

1. Extracto:

Una porción del extracto activo de pH 6-7 se suspendió en una solución de carboximetilcelulosa al 1 o/o. Esta suspensión de concentración conocida, se diluyó en forma adecuada para ser utilizada en los ensayos de sensibilidad.

2. Microorganismos de prueba:

Cepas aisladas de muestras clínicas tomadas en diferentes pacientes del Hospital San José:

Aspergillus fumigatus.

Aspergillus niger.

Candida albicans.

Trichophyton mentagrophytes.

Trichophyton rubrum.

Microsporum canis.

Microsporum gypseum.

3. Método de Inoculación:

En los estudios preliminares se utilizó el método de difusión en medio sólido, mediante el sistema de discos de papel de 6 mm de diámetro con 0.1 ml de la droga en estudio. Estos discos se impregnaron con extractos de alicina diluidos, alcanzando concentraciones entre 0.01-0.05 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Se colocaron 4 discos por cada placa de Petri, que contenía agar maltosa, previamente inoculado con 1 ml de suspensión de *A. fumigatus*. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 horas.

La concentración inhibitoria mínima (C.I.M.), se determinó por el método de dilución en serie en

medio líquido. Se utilizaron tubos que contenían, aproximadamente, 3 ml de caldo maltosado y diferentes concentraciones de alicina incluida en el extracto. Cada tubo se sembró con 0.05 ml de suspensión de esporas (1.5×10^6 esporas/ml) y luego fue incubado a 37° C. El resultado se evaluó a las 48 horas y los tubos fueron colocados nuevamente en la cámara a 37° C para estudiar la estabilidad del extracto.

Los dermatofitos fueron incubados a 25° C durante 5 días. Los demás hongos se incubaron a 37° C durante 48 horas.

Todos los fármacos fueron disueltos en dimetil-formamida (DMF), a razón de 5 ml por cada 20 mg del fármaco y luego suspendidos en volúmenes adecuados de una solución de carboximetilcelulosa al 1 o/o. El tubo control de agar Sabouraud contenía DMF al 0.5 o/o.

Los resultados fueron evaluados mediante observaciones macroscópicas cuando existió duda de la identidad del desarrollo (contaminación).

Fármacos utilizados en los estudios comparativos:

Anfotericina B, Clotrimazol, Diyodohidroquinolina, Ketoconazol, Nistatina, Tolnaftato, Griseofulvina.

Todos estos fármacos fueron disueltos en di-metil-formamida al 0.5o/o.

RESULTADOS

Acción antimicótica del extracto de alicina.

Mediante el procedimiento señalado en la parte fitoquímica de Materiales y Métodos, se logró separar la sustancia activa de este extracto e identificarla en base a análisis espectrofotométrico como alicina, sustancia ya descrita en *A. sativum*. Al mismo tiempo se pudo determinar que el extracto cloroformico era el más estable y presenta la ventaja adicional de ser de fácil evaporación a temperatura ambiente.

Esta sustancia presenta bandas características al infrarrojo a 3.000, 1.600 y 900 cm^{-1} debida al grupo S = O. La identificación fue realizada en base a aspectos comparativos entre el producto de descomposición de la alicina y el disulfuro de dialilo (I.C.N. Pharmaceutical INC), además de las características fisicoquímicas del producto sintetizado a partir de la oxidación del disulfuro.

Los resultados que se resumen en las Tablas 1 y 2 dan cuenta de las CIM determinadas en las mismas condiciones tanto para los fármacos como para el extracto de *A. sativum*.

Se determinó la sensibilidad de varias cepas de *A. fumigatus* frente al extracto de *A. sativum*, obteniéndose concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) entre 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los dermatofitos fueron menos sensibles al extracto de *A. sativum* que los fármacos antimicóticos

utilizados en el estudio comparativo.

El extracto de *A. sativum* presentó buena estabilidad durante la incubación a 37°C, comparado con la anfotericina B y la nistatina que, fueron los fármacos menos estables de los que se incluyeron en este estudio.

Al analizar los valores expuestos en la Tabla 1 se observa que las CIM del extracto frente a las diversas especies de *Aspergillus* estudiadas son semejantes a las de los fármacos antimicóticos usados.

Las CIM de ketoconazol, aunque algo elevadas, se encuentran dentro de los rangos descritos por Heel y col.

La inclusión de la diiodohidroxiquinolina en los estudios comparativos, aunque generalmente no se la describe como un fármaco antimicótico de uso sistémico, se debe a que ella ha sido utilizada en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar (Horsfield y col, 1977).

La dimetilformamida utilizada para disolver los fármacos no interfiere en los resultados obtenidos, ya que si bien esta presenta acción fungistática, lo

hace a concentraciones del 5 o/o o más (Kittila, 1967). En nuestros ensayos la concentración final de DMF fue siempre inferior al 1 o/o.

CONCLUSIONES

1. Mediante métodos fitoquímicos se aislaron tres sustancias de naturaleza alquiltiosulfonato (R-S-S-R) a partir de un extracto clorofórmico activo de la especie *A. sativum*. Una de las sustancias activas corresponde a la alicina, producto ya descrito en esta especie.

2. Se demostró la acción antifúngica del extracto. Se comparó dicha actividad con la de fármacos antimicóticos de uso clínico, frente a diferentes especies de hongos; encontrándose que el extracto activo presentaba una concentración inhibitoria mínima antifúngica semejante a la de los fármacos de uso clínico.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCION ANTIFUNGICA DE ALLIUM SATIVUM Y LOS PRINCIPALES FARMACOS ANTIMICOTICOS

TABLA 1

HONGO	FARMACO	AL	AT	CT	DY	KC	NT
<i>A. fumigatus</i> SM		10-15	10-15	0,5-1	5-10	5-10	5-10
<i>A. fumigatus</i> 110		10-20	10-20	0,5-1	5-10	5-10	5-10
<i>A. fumigatus</i> 360		20-30	10-20	1-2	10-20	10-20	10-20
<i>A. niger</i> 106		10-20	10-20	1-2	5-10	15-30	20-30
<i>C. albicans</i> 410		50-80	0.1-0.5	1-5	300-500	10-20	5-10

TABLA 2

HONGO	FARMACO	AL	CT	KC	NT	TN	GF
<i>T. mentagrophytes</i>		60-80	0.05-0.1	1-5	1-5	0.01-0.05	1-5
<i>T. rubrum</i> 305		15-30	0.01-0.05	1-5	0.1-0.5	0.005-0.01	0.1-0.5
<i>M. canis</i> MC		15-30	0.01-0.05	1-5	1-5	0.01-0.05	0.1-0.5
<i>M. gypseum</i> 201		50-60	0.01-0.05	1-5	1-5	0.01-0.05	1-5

AL: Extracto de *Allium*

AT: Anfotericina B

CT: Clotrimazol

DY: Diiodohidroxiquinolina

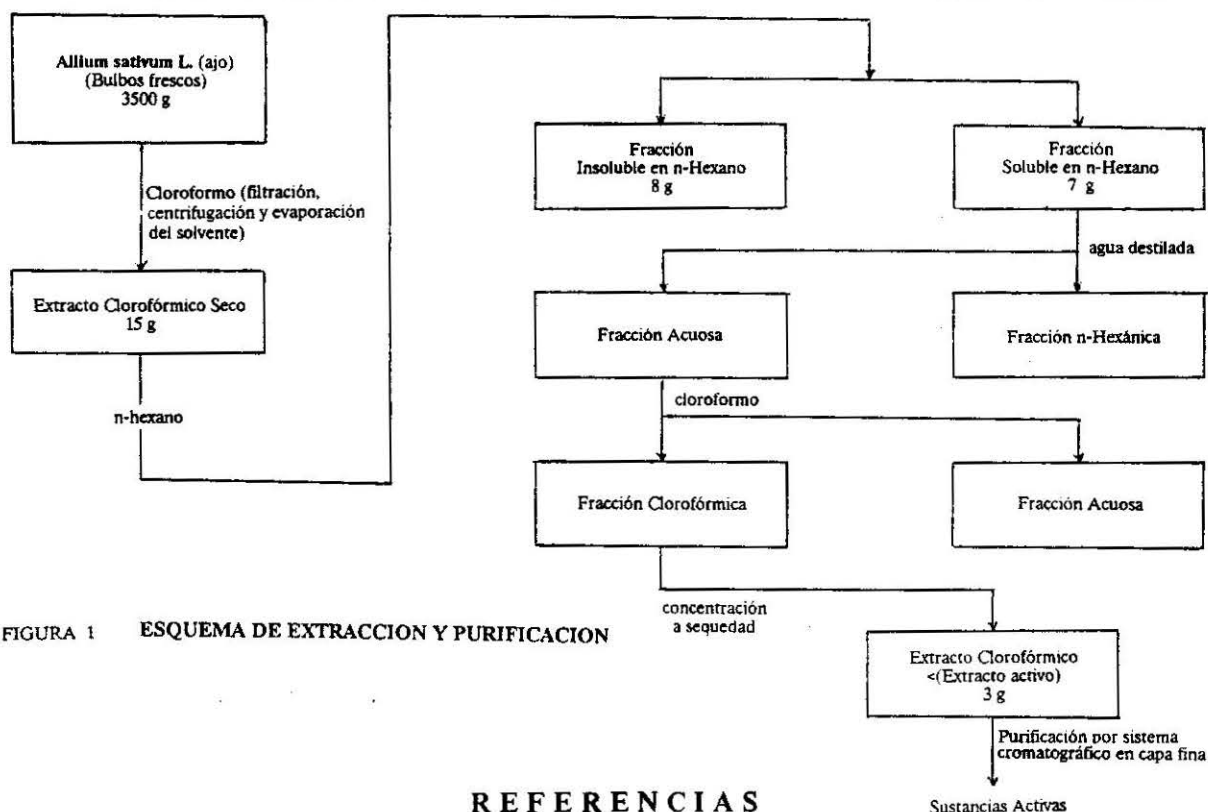
KC: Ketoconazol

NT: Nistatina

TN: Tolnaftato

GF: Griseofulvina

Los valores de las tablas corresponden a las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) determinadas a los 5 días para los dermatofitos y a las 48 horas para los demás microorganismos. Las CIM están expresadas en mcg/ml, excepto para Nistatina que están en U/ml.



REFERENCIAS

- Barone, F.E.; Tansey, M.R. (1977). Isolation, purification, synthesis and kinetics of activity of anticandidal component of *Allium sativum*, and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia* 69: 793-825.
- Bolton, S.; Null, G.; Troetel, W. (1982). The medical uses of garlic, fact and fiction. *American Pharmacy* NS 22: 40-43.
- Cavallito, C.J.; Bailey, J.M. (1944). Allicin the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 1950-1951.
- Cavallito, C.J.; Buck, J.S.; Suter, C.M. (1944). Allicin the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 1952-1954.
- Fromtling, R.A.; Bulmer, G.S. (1978). In vitro effect of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 70: 399-405.
- Goodman, L.S.; Gilman, A. (1985). *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*. 7 ed. N. York 1839 pp.
- Heel, R.C.; Brogden, R.N.; Carmine, A.; Morley, P.A.; Speight, T.M.; Avery, G.S. (1982). Ketoconazole: A review of its Therapeutics Efficacy in Superficial and Systemic Fungal Infections. *Drugs* 23: 1-36.
- Horsfield, K.; Nicholls, A.; Cumming, G.; Hume, M.; Prowse, K., (1977). Treatment of Pulmonary Aspergillosis with di-iodohydroxyquinoline. *Thorax* 32: 250-253.
- Kittila, R.S. (1967). Dimethylformamide chemical uses. E. I. Dupont du Nemours and Co. Wilmington Delaware.
- Lazo, W. (1983). Acción antifúngica de *Allium sativum*. *Bol. Micol.* 1: 185-186.
- Nakanishi, K. (1962). Infrared adsorption spectroscopy -practical- Nankodo Company Limited.
- Oddo, D.; González, S. (1984). Aspergilosis pulmonar en 15 casos de autopsias. *Rev. Med. Chile* 112: 213-218.
- Pasto, D.J.; Johnson, C.R. (1974). Determinación de estructuras orgánicas. Ed. Reverté.
- Small, L.V.; Bailey, J.H.; Cavallito, C.J. (1947). Alkyl Thiosulphinates. *J. Am. Chem. Soc.* 69: 1710-1713.
- Smith, G.R. (1972). Experimental aspergillosis in mice: aspects of resistance. *L. Hyg. Cam.* 70: 741-754.
- Tansey, M.R.; Appleton, J.A. (1975). Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* 67: 409-413.
- Toman, K. (1980). Despiatge et chimioterapie de la tuberculosis. Ed. Masson.
- Verna, L.C.; Herrero, F.J. (1952). *Micología*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires.
- Yamada, Y.; Azuma, K. (1977). Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 743-749.
- Yarzabal, L.; Sepúlveda, R.; Salamanca, L. (1974). Aspergilosis respiratoria humana. *Rev. Med. Chile* 102: 772.